



HAL
open science

Synthèse de composés anorexigènes, antidépresseurs et anticancéreux

Julien Alliot

► **To cite this version:**

Julien Alliot. Synthèse de composés anorexigènes, antidépresseurs et anticancéreux. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112218 . tel-01213777

HAL Id: tel-01213777

<https://theses.hal.science/tel-01213777>

Submitted on 9 Oct 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.



UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : ED470

CEA / DSV / iBiTec-S / SCBM

Laboratoire de Marquage au Tritium

DISCIPLINE : Chimie

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 08/10/2013

par

Julien ALLIOT

**Synthèse de composés anorexigènes,
antidépresseurs et anticancéreux.**

Directeur de thèse :

Dr. Eric DORIS

Chercheur (CEA Saclay)

Composition du jury :

Président du jury :

Rapporteurs :

Examineurs :

Pr. Cyrille KOUKLOVSKY

Dr. Nicolas BLANCHARD

Pr. Patrick PALE

Dr. Edmond GRAVEL

Dr. Marc NICOLAS

Professeur (Université Paris Sud)

Directeur de Recherche (Université de Haute Alsace)

Professeur (Université Strasbourg)

Chercheur (CEA Saclay)

Responsable CDP (Pierre Fabre, Gaillac)

Remerciements

Avant de passer à la présentation de mes résultats, je souhaiterais remercier toutes les personnes qui m'ont aidé dans cette aventure.

Tout d'abord je souhaiterais remercier mon directeur de thèse Eric Doris pour m'avoir encadré pendant trois ans mais également pour sa disponibilité, tous les conseils scientifiques qu'il m'a donné pour faire avancer les projets et nos réunions brain storming. Je le remercie aussi d'avoir pris le temps qu'il fallait pour la relecture de ma thèse.

Je souhaiterais ensuite remercier Edmond Gravel, mon co-directeur de thèse, également pour m'avoir encadré mais aussi pour ses conseils techniques et pour avoir orienté mes choix lors de certaines synthèses.

Je souhaiterais également remercier Marc Nicolas et Laurent Larquetoux des Laboratoires Pierre Fabre pour être les initiateurs de la plupart des projets présentés dans ce manuscrit.

Je remercie les Laboratoires Pierre Fabre et le CEA pour le co-financement de ce projet de thèse.

Je souhaite aussi remercier les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse. Merci au Dr. Nicolas Blanchard et au Pr. Patrick Pale de me faire l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Merci également au Pr. Cyrille Kouklovshy et au Dr. Marc Nicolas d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je souhaite également remercier l'équipe de Frédéric Ducongé du SHFJ pour avoir testé certains de mes produits et plus particulièrement Ioanna pour avoir pris le temps nécessaire pour m'expliquer ce qu'elle avait fait avec.

Je tiens également à remercier tout le service de chimie bio-organique et de marquage avec qui j'ai passé trois agréables années. Plus particulièrement, je tiens à remercier Bernard Rousseau d'avoir fait le nécessaire pour que je puisse faire ma thèse au sein de son service et pour m'avoir fait découvrir l'escalade. Je tiens également à remercier Chantal pour son aide pour les formalités administratives de début et de fin de thèse.

Je voudrais remercier Céline et David pour leur investissement et leur support mental lors d'analyses très critiques... vous formez vraiment une très bonne équipe ! Plus particulièrement je souhaiterais remercier Céline pour ta gaieté à toutes épreuves.

Ensuite je souhaiterais remercier les gens de la recherche avec qui j'ai passé de très bons moments au bord de la plage... et plus particulièrement Hélène, Sandrine, Pierre et Nicolas qui m'ont accompagné dans mes moments de détente du midi et autour de quelques gâteaux. Je n'oublierai pas non plus Julie, Guillaume et Clarisse avec j'ai aussi passé de très bons moments.

Bien évidemment je ne pourrais pas oublier toutes les personnes de l'équipe Tritium avec qui j'ai vécu au laboratoire. Florence pour nos petites discussions du matin avant que tout le monde arrive. Je n'oublierai pas nos footings le lundi midi, tes gâteaux-conférences et je te souhaite bon courage pour l'organisation de tes prochaines marches pour ELA. Je voudrais remercier Sébastien pour ton aide précieuse au laboratoire ; Grégory pour m'avoir bien aidé à la fin de ma thèse ; Jubi, Anyl et Dan pour nos petites discussions sur les coutumes indiennes ; Céline pour m'avoir évité de culpabiliser quand je ne mangeais que des frites toute la semaine ; Simon pour ton humour ; Léa, tu nous as bien fait rigoler avant que tu t'en ailles. Je souhaiterais aussi remercier ceux qui font presque partie de notre équipe, Karen pour ta bonne humeur ; Jean-Christophe pour toutes tes blagues, Valérie pour ton travail psychologique et Valentina pour m'avoir fait découvrir une partie de l'Italie.

Ensuite, je voudrais tout particulièrement remercier Naoko pour ta gentillesse, ton écoute et ton soutien. Merci aussi de m'avoir fait aimer les sushis et apercevoir la culture japonaise. Mon seul regret aura été que tu finisses ta thèse un an avant moi car tu m'as beaucoup manqué au labo par la suite. Je suis content qu'on ait réussi à se revoir assez souvent depuis et j'espère que même si vous partez à l'autre bout du monde on se reverra encore...

Manu, j'ai vraiment été très heureux de te rencontrer. Je tiens à te remercier également pour ton enthousiasme et pour ton coaching dans les moments un peu durs. Mon seul regret est que tu n'aies pas pu venir avec nous au Puy de Sancy. Merci aussi de m'avoir accueilli chez toi en Normandie et de m'avoir fait découvrir Caen. Grâce à toi, mon point de vue sur cette belle région a beaucoup évolué (en bien évidemment !). Avec toi et Naoko, nos petits moments sportifs du jeudi soir vont me manquer. J'espère qu'on pourra se revoir facilement par la suite et pourquoi pas autour d'un petit calva maison 50 ans d'âge...

Fabien, je suis tellement content qu'on ait fait notre thèse ensemble. Au moins on aura tout partagé, du début de la thèse jusqu'aux galères de fin de la rédaction. Je tiens à te remercier, avec Delphine, pour m'avoir sauvé je ne sais combien de week-end, j'ai passé beaucoup de bon moments avec vous. En apprenant à vous connaître j'ai rencontré de vrais amis. Grâce à vous j'ai appris (et surtout à toi Fabien) que l'alsace ne faisait pas tout à fait partie de la France, il faudrait vraiment que je rouvre un livre de géographie ! En tout cas si tous les alsaciens (et les mosellans) sont comme vous il doit faire bon vivre dans l'est de la France. J'espère que nos chemins vont se recroiser très rapidement, et pourquoi pas sur la ligne de départ d'une prochaine course...

Enfin, je voudrais remercier toute ma famille et en particulier mes parents et mes frères pour leur soutien et leur aide. Je souhaite remercier mes parents pour m'avoir toujours soutenu dans mes choix. Sans eux je ne serais jamais arrivé jusque là ! A Gaëlle, je te remercie pour ton écoute, ton soutien et ton optimisme. Maintenant que nos thèses sont terminées, nous allons enfin pouvoir faire des projets ensemble, à commencer par notre évasion en Australie...

Liste des abréviations

Ac	Acétyle
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide Désoxyribonucléique
APTS	Acide <i>p</i> -toluènesulfonique
ATC	Antidépresseurs Tricycliques
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMC	Concentration Micellaire Critique
DA	Diacétylène
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCM	Dichlorométhane
DI ₅₀	Dose Inhibitrice médiane
DIAD	Diisopropylazodicarboxylate
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DE ₅₀	Dose Efficace médiane
DL ₅₀	Dose Létale médiane
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
4'-DMEP	4'-Déméthylépipodophyllotoxine
EC ₅₀	Concentration Efficace médiane
EPR	Enhanced Permeation and Retention
ee	Excès énantiomérique
<i>E. macrocarpa</i>	<i>Eucalyptus macrocarpa</i>
HMPA	Hexaméthylphosphoramide
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HRMS	Spectrométrie de Masse Haute Résolution
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice médiane
IR	Infrarouge
IRSR	Inhibiteurs de la Recapture de la Sérotonine et de la Noradrénaline
ISRS	Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine
K _i	Constante d'inhibition
KHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de potassium
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
LDA	Diisopropylamidure de lithium

M-	Macrocarpal
nBz	Nitro-benzyle
NMP	<i>N</i> -Méthyl-2-pyrrolidone
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PDA	Poly-Diacétylène
PEG	Polyéthylène Glycol
Ph	Phényle
Podo	Podophyllotoxine
Py	Pyridine
Quant.	Quantitatif
Rdt	Rendement
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
S _N 2	Substitution Nucléophile d'ordre 2
S _N Ar	Substitution Nucléophile aromatique
S _N i	Substitution Nucléophile interne
STP	Système de Transport des Polyamines
T.	Température
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Triméthylsilyle
TopoII	Topoisomérase II
Ts	<i>p</i> -toluènesulfonyle
UV	Ultraviolet

Sommaire

AVANT-PROPOS	11
I MACROCARPALS	15
I.1 MACROCARPALS : DECOUVERTES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES	18
I.1.1 DECOUVERTE DU MACROCARPAL A	18
I.1.2 DECOUVERTE DES MACROCARPALS B A G	19
I.1.3 AUTRES MACROCARPALS DECRITS DANS LA LITTERATURE	22
I.2 OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	22
I.3 ÉTUDE DE LA DESHYDRATATION DU MACROCARPAL B	23
I.3.1 PREMIERS ESSAIS DE DESHYDRATATION DU MACROCARPAL B	23
I.3.2 LES MACROCARPALS C ET G SERAIENT ILS EN FAIT UNE SEULE ET MEME MOLECULE ?	27
I.3.3 REVISION DES HYPOTHESES	28
I.4 SYNTHÈSE DU MACROCARPAL G ET DE SES ANALOGUES	29
I.4.1 OPTIMISATION DE LA DESHYDRATATION <i>EXO</i> -CYCLIQUE DU M-A EN M-G	29
I.4.2 SYNTHÈSE DE NOUVEAUX MACROCARPALS	31
I.5 CONCLUSION	32
II LEVOMILNACIPRAN	35
II.1 LE MILNACIPRAN	39
II.1.1 SYNTHÈSE RACÉMIQUE	39
II.1.2 PHARMACOLOGIE ET PHARMACOCINÉTIQUE DU MILNACIPRAN	41
II.1.3 CONCLUSION	42
II.2 LE LEVOMILNACIPRAN	43
II.2.1 INTERETS DU LEVOMILNACIPRAN PAR RAPPORT A SA FORME RACÉMIQUE	43
II.2.2 SYNTHÈSES ENANTIOSELECTIVES DU LEVOMILNACIPRAN	44
II.2.3 SYNTHÈSES ENANTIOSELECTIVES DU (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-MILNACIPRAN	46
II.3 OBJECTIF DES TRAVAUX DE THESE	48
II.4 SYNTHÈSE ENANTIOSELECTIVE DU LEVOMILNACIPRAN	48
II.4.1 ACCES A LA (-)-LACTONE II.1'	48
II.4.2 DE LA (-)-LACTONE II.1' AU LEVOMILNACIPRAN	56
II.5 CONCLUSION	57
III SYNTHÈSE ENANTIOSELECTIVE DE 1,4-BENZODIOXANES	59

III.1 INTRODUCTION	61
III.1.1 LE MOTIF 1,4-BENZODIOXANE EN CHIMIE MEDICINALE	61
III.1.2 METHODES DE SYNTHESSES	62
III.2 OBJECTIF DES TRAVAUX DE THESE	66
III.3 SYNTHESE ENANTIOSELECTIVE DE F17807	67
III.3.1 SYNTHESE DE L'AMINE III.5	67
III.3.2 APPROCHE SYNTHETIQUE SELON LA VOIE A	68
III.3.3 APPROCHE SYNTHETIQUE SELON LA VOIE A'	70
III.3.4 SYNTHESE DU 1,4-BENZODIOXANE, VOIE B	72
III.4 CONCLUSION	77
<u>IV SYNTHESE D'ANALOGUES DE PODOPHYLLOTOXINES</u>	<u>79</u>
IV.1 HISTOIRE DES PODOPHYLLOTOXINES	82
IV.1.1 NOMENCLATURE ET NUMEROTATION	82
IV.1.2 DE LA PODOPHYLLOTOXINE A L'ETOPOSIDE	83
IV.1.3 LES TOPOISOMERASES	86
IV.2 F14512, DECOUVERTE ET MODE D'ACTION	87
IV.2.1 POLYAMINES, SYSTEME DE TRANSPORT DES POLYAMINES ET CANCER.	88
IV.2.2 F14512 : UN NOUVEL AGENT ANTICANCEREUX SELECTIF	89
IV.2.3 MODE D'ACTION	89
IV.3 OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	91
IV.4 SYNTHESE DE L'ANALOGUE IV.2	93
IV.5 SYNTHESE DE L'ANALOGUE IV.3	96
IV.5.1 INTRODUCTION DE L'AZOTE EN A SUR LE CARBONE C4	96
IV.5.2 FIN DE LA SYNTHESE DE L'ANALOGUE IV.3	101
IV.6 SYNTHESE DE L'ANALOGUE IV.4	102
IV.6.1 APPROCHE UNE : AU DEPART D'UN INTERMEDIAIRE DE LA SYNTHESE DE IV.3	102
IV.6.2 APPROCHE DEUX : AU DEPART D'UN INTERMEDIAIRE DE LA SYNTHESE DE IV.2	103
IV.7 CONCLUSION	103
<u>V FORMULATIONS NANOMETRIQUES DE PODOPHYLLOTOXINES</u>	<u>105</u>
V.1 CIBLAGE PASSIF OU ACTIF	107
V.1.1 CIBLAGE PASSIF	107
V.1.2 CIBLAGE ACTIF	109
V.1.3 NANOMEDICAMENTS DE TROISIEME GENERATION	109

V.2 NANOMEDICAMENTS	110
V.2.1 INTERETS DES NANOVECTEURS	110
V.2.2 LES DIFFERENTES FORMES DE NANOVECTEURS	111
V.3 MICELLES	114
V.3.1 CONCENTRATION MICELLAIRE CRITIQUE	114
V.3.2 NANOMEDICAMENTS MICELLAIRES	115
V.4 OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	116
V.5 SYNTHESE ET CARACTERISATION DE L'AMPHIPHILE C₁₈-PODO-SPER	117
V.5.1 SYNTHESE ENVISAGEE : VIA UNE REACTION DE MITSUNOBU	117
V.5.2 CARACTERISATION	119
V.6 SYNTHESE ET CARACTERISATION D'AMPHIPHILES PLUS COMPLEXES	121
V.6.1 SYNTHESE ET CARACTERISATION DE L'AMPHIPHILE DA-PODO-SPER	122
V.6.2 SYNTHESE ET CARACTERISATION DE L'AMPHIPHILE PHOTOSENSIBLE C ₁₈ -NBZ-PODO-SPER	124
V.6.3 SYNTHESE ET CARACTERISATION DE L'AMPHIPHILE C ₁₈ -PODO-PEG ₄₀₀	129
V.6.4 CONCLUSION : SYNTHESE ET CARACTERISATION DES AMPHIPHILES	130
V.7 PREMIERS RESULTATS BIOLOGIQUES	130
V.7.1 CIBLAGE CELLULAIRE	131
V.7.2 CIBLAGE TISSULAIRE	132
V.8 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	133
<u>CONCLUSION GÉNÉRALE</u>	<u>133</u>
<u>PARTIE EXPÉRIMENTALE</u>	<u>139</u>
I GENERAL	141
II ORGANIC SYNTHESIS	142
II.A CHAPTER I : MACROCARPALS	142
II.B CHAPTER II : LEVOMILNACIPRAN	146
II.C CHAPTER III : ENANTIOSELECTIVE SYNTHESIS OF 1,4-BENZODIOXANES	159
II.D CHAPTER IV : SYNTHESIS OF PODOPHYLLOTOXINES ANALOGUES	174
II.E CHAPTER V : NANOMETRIC FORMULATIONS OF PODOPHYLLOTOXINES	195
III CHARACTERIZATION OF AMPHIPHILES	207
III.A CRITICAL MICELLAR CONCENTRATION MEASUREMENT	207
III.B DYNAMIC LIGHT SCATERING	212
IV BIOLOGICAL TESTS	213
IV.A STP VECTORIZED MICELLES	213
IV.B EPR VECTORIZED MICELLES	214
<u>ANNEXES</u>	<u>215</u>
METHODOLOGY : REARRANGEMENT OF 2-BROMO-1-(BROMOMETHYL)ETHYL ESTERS	215

Avant-Propos

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre les Laboratoires Pierre Fabre et le Service de Chimie Bioorganique et de Marquage (SCBM) du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA) de Saclay. Elle a été co-financée par ces deux organismes.

Dans le cadre de cette collaboration, nous avons travaillé sur plusieurs projets relevant de la synthèse de composés à visée thérapeutique. Après un bref rappel bibliographique, les résultats obtenus pour chaque projet seront présentés.

Dans le premier chapitre, nous parlerons des macrocarpals, composés naturels extraits de certaines espèces d'Eucalyptus aux propriétés pharmaceutiques anorexigènes. Dans cette famille de composés, le macrocarpal G est le plus actif, c'est la raison qui nous a conduit à développer une voie d'accès semi-synthétique à ce composé.

Dans le deuxième chapitre, nous détaillerons une nouvelle synthèse énantiosélective du Lévomilnacipran. La forme racémique du Milnacipran est actuellement commercialisée par les Laboratoires Pierre Fabre comme antidépresseur sous le nom d'Ixel®. Cependant, l'énantiomère lévogyre est celui qui est le plus actif. Cette molécule vient d'obtenir son autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis et au Canada.

Dans le troisième chapitre, nous avons travaillé à la construction énantiosélective d'un dérivé de 1,4-benzodioxane chiral (F17807). Ces motifs sont présents dans de nombreux composés naturels mais aussi dans beaucoup de principes actifs. Nous détaillerons les différentes voies d'accès que nous avons développées.

Dans le quatrième chapitre, nous détaillerons la synthèse d'analogues d'un nouveau dérivé de l'épipodophyllotoxine, F14512, actuellement en phase I d'essais cliniques. Cet anticancéreux présente plusieurs avantages par rapport aux dérivés déjà sur le marché dont celui d'être vectorisé vers les cellules tumorales. Après avoir revu brièvement l'histoire des dérivés d'épipodophyllotoxines, nous détaillerons les synthèses des trois analogues que nous avons réalisées.

Dans le cinquième chapitre, nous avons travaillé sur de nouvelles formulations nanométriques du composé F14512 précédemment cité. Après avoir vu les différentes approches pour vectoriser un composé actif vers sa cible, nous présenterons les synthèses des quatre amphiphiles sur lesquels nous avons travaillé et les résultats biologiques préliminaires que nous avons obtenus.

Finalement, au cours de ce travail, nous avons développé une petite méthodologie concernant le réarrangement d'esters de 2-bromo-1-(bromométhyl)éthyl dans des conditions basiques. Cette méthodologie, ne représentant pas le corps du manuscrit, a été ajoutée dans les annexes.

Chapitre I

Macrocarpals

C'est au cours de la troisième expédition de l'explorateur James Cook en 1777 dans les mers du sud que le botaniste David Nelson collecte sur une île proche de la Tasmanie le premier échantillon d'eucalyptus. Cet échantillon a ensuite été envoyé au British Museum de Londres où il a été étudié et décrit par le botaniste français Charles-Louis L'Héritier sous le nom d'*Eucalyptus* L'Héritier ou *Eucalyptus obliqua* en 1788.¹ Le mot eucalyptus trouve son origine dans la langue grecque où « eu » et « calyptos » signifient « bien » et « couvert ». Cette appellation fait référence à la capsule qui protège le bourgeon des fleurs d'*Eucalyptus* (Figure 1).²



Figure 1 : Bourgeons d'*Eucalyptus*.

Aujourd'hui, le genre *Eucalyptus* est le plus répandu en Australie après le genre *Acacia*, et ne compte pas moins de 750 espèces différentes. Ces arbres croissant rapidement, ils présentent un intérêt économique pour la fabrication du papier. Bien que les aborigènes aient utilisé les eucalyptus depuis plus de 40.000 ans pour des applications médicales et probablement comme source de nourriture, seules une vingtaine d'espèces sont aujourd'hui exploitées commercialement pour leurs huiles essentielles.³ Ces huiles ne sont pas les seuls produits extraits de l'*Eucalyptus* et de nombreux sesquiterpènes peuvent en être isolés, dont l'aromadendrène qui est utilisé en chimie comme synthon chiral.⁴

Au début du XX^e siècle, Smith a distillé les huiles essentielles de plus de 140 espèces d'*Eucalyptus* et a mis en évidence que le (+)-aromadendrène, dont le squelette de base est l'aromadendrane, était le sesquiterpène majoritaire.⁵ La structure de l'aromadendrène a été élucidée en 1953 par Birch mais il faudra attendre 13 ans de plus et les travaux de synthèse totale de Büchi pour connaître sa structure absolue (Figure 2).^{6,7}

¹ <http://www.eoas.info/biogs/P005304b.htm> (Encyclopedia of Australia)

² <http://www.anbg.gov.au/>

³ Ghisalberti, E. L. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 7-22.

⁴ (a) Gijssen, H. J. M.; Kanai, K.; Stork, G.A.; Wijnberg, J.; Orru, R. V. A., Seelen, C.G.J.M.; van der Kerk, S. M. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7237-7246 ; (b) Gijssen, H. J. M.; Wijnberg, J.; Stork, G.A.; de Groot, A. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4409-4416 ; (c) Gijssen, H. J. M.; Wijnberg, J.; Stork, G.A.; de Groot, A. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2465-2476 ; (d) Gijssen, H. J. M.; Wijnberg, J.; van Ravenswaay, C. de Groot, A. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4733-4744.

⁵ Briggs, L. H.; Short, W. F. *J. Chem. Soc.* **1928**, 2524-2529.

⁶ Birch, A. J.; Lahey, F. N. *Aust. J. Chem.* **1953**, *6*, 379-384.

⁷ Büchi, G.; Hofheinz, W.; Paukstelis, J. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 4113-4114.

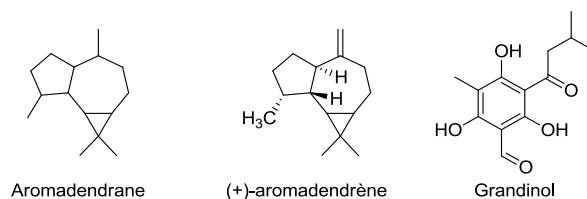


Figure 2 : Structure de l'Aromadendrane, du (+)-Aromadendrène et du Grandinol.

Plusieurs composés extraits de l'*Eucalyptus* ont montré des activités biologiques intéressantes. Par exemple, le grandinol, extrait des espèces *E. grandis* et *E. perriniana* présente une activité antibactérienne. Les euglobals (une famille de composés extrait de *E. globulus*) sont connus pour leurs activités anti-inflammatoires.

C'est dans la perspective de découvrir de nouvelles structures qu'en 1990 l'équipe de Murata a travaillé sur l'isolement du composé responsable de l'activité antiproliférative de *E. macrocarpa* sur certaines bactéries, champignons et levures. Après cristallisation, il a découvert le premier composé d'une nouvelle famille, les macrocarpals (macrocarpal A, M-A, Figure 3).⁸

Depuis cette découverte, d'autres structures de macrocarpals ont été extraites de plusieurs espèces d'*Eucalyptus*. Parmi ces nouveaux composés, le macrocarpal G (M-G) semble être le plus prometteur pour des applications pharmacologiques (coupe faim, inhibiteur de la recapture de catécholamines). Après avoir détaillé assez brièvement l'historique de cette famille de produits, nous présenterons les résultats obtenus au cours de notre travail sur l'hémi-synthèse du macrocarpal G.

I.1 Macrocarpals : découvertes et activités biologiques

I.1.1 Découverte du macrocarpal A

En 1990, Murata travaillait sur l'isolement de composés d'*E. macrocarpa* ayant une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*.⁸ Après différentes étapes de purification (extractions solide-liquide, chromatographie sur Séphadex LH-20, sur silice et par HPLC), plusieurs composés ayant des propriétés physico-chimiques et antibactériennes proches ont été isolés. Cependant, parmi les différents extraits, seule la structure du macrocarpal A (Figure 3) a pu être élucidée par cristallographie des rayons-X car ce composé cristallisait facilement dans le méthanol.

Ainsi, le M-A est formé d'une partie phloroglucinol couplée à un dérivé de l'aromadendrane : le globulol (Figure 3). M-A présente une activité antibactérienne contre les bactéries Gram positives telles que *Bacillus subtilis* PCI219 ou *Staphylococcus aureus* FDA209P.

⁸ Murata, M.; Yamakoshi, Y.; Homma, S.; Aida, K.; Hori, K.; Ohashi, Y. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 3221-3226.

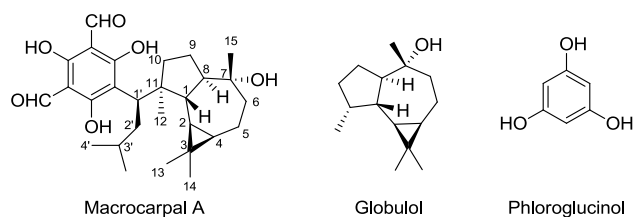


Figure 3 : Structure du Macrocarpal A (M-A), du Globulol et du Phloroglucinol.

I.1.2 Découverte des macrocarpals B à G

En 1992, deux publications, parues à deux mois d'intervalle, décrivent de nouveaux dérivés de macrocarpals apparentés au M-A.^{9,11} Ces deux publications identifient de nouveaux macrocarpals, référencés de B à G dans la première et de B à E dans la seconde. Ces nouveaux composés ayant été obtenus dans deux études indépendantes, leur dénominations respectives ne sont, a priori, pas corrélées. De plus, les analyses par RMN ont été conduites dans des solvants deutérés différents, rendant les comparaisons directes de structures difficiles.

I.1.2.1 Première série : macrocarpals B à G

En mars 1992, Murata publie la suite de ses travaux sur l'extraction de nouvelles molécules d'*E. macrocarpa*.⁹ Il décrit dans ce nouvel article, l'isolement et la caractérisation de six nouveaux macrocarpals, B à G. Ces produits présentent le même spectre UV que le M-A, indiquant qu'ils doivent contenir une partie phloroglucinol. De plus, les M-B à M-F présentent un pic de masse à 471 (M-1), indiquant un poids moléculaire à 472 (comme le M-A). Les analyses élémentaires ont montré que les M-B à M-F avaient la même formule moléculaire $C_{28}H_{40}O_6$. D'autre part, le M-G présente une masse moléculaire à 454 et une formule brute $C_{28}H_{38}O_5$.

Même si ces composés ont été étudiés par RMN du proton et du carbone 13, les auteurs n'ont pas été capables d'élucider toutes les structures isolées. Seules des structures planes des M-B et M-G et trois structures possibles du M-D ont été proposées (Figure 4).

⁹ Yamakoshi, Y.; Murata, M.; Shimizu, A.; Homma, S. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*, 1570-1576.

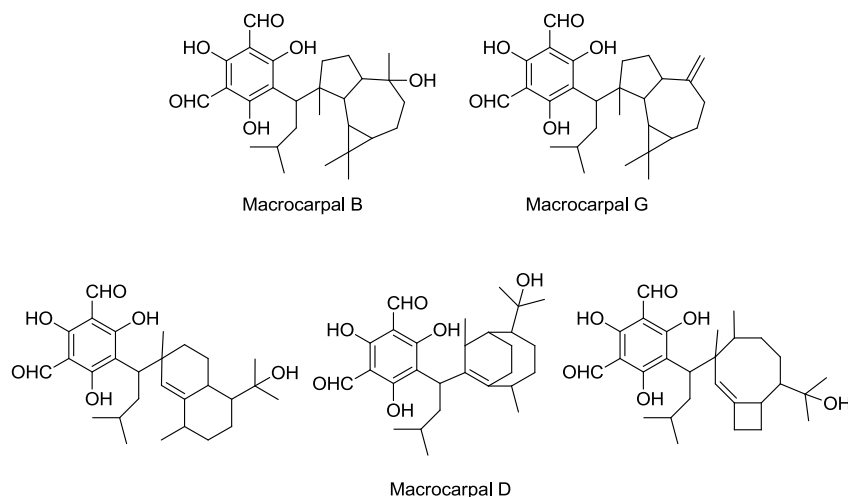


Figure 4 : Macrocarpal B, D et G selon Murata.

Tous les macrocarpals qui ont été isolés (M-A à M-G) par l'équipe de Murata présentaient une activité antibactérienne contre plusieurs souches Gram positives telles que *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycrococcus lueus* ou encore *Mycobacterium smegmatis* avec des concentrations minimales inhibitrices de l'ordre de 1 µg/mL (concentration minimale à laquelle l'inhibition de la croissance cellulaire est observée). En revanche, ces composés sont totalement inactifs sur les bactéries Gram négatives, les champignons et les levures.

La même année, Murata met en évidence que les macrocarpals A, B, D et G (les seuls dont il avait réussi à obtenir une structure plane) étaient également de bons inhibiteurs de l'aldose réductase avec des IC₅₀ comprises entre 2 et 3 µM.¹⁰

I.1.2.2 Deuxième série : macrocarpals B à E.

Deux mois seulement après la publication des travaux de Murata, Nishizawa a publié sa série de macrocarpals, B à E.¹¹ Ces nouvelles structures ont été découvertes indépendamment et n'ont, a priori, aucune relation avec les travaux de Murata.

En effet, alors que Murata travaillait sur l'isolement des composés antibactériens de *E. macrocarpa*, Nishizawa cherchait à isoler les composés de *E. globulus* responsables de l'activité inhibitrice de la rétrotranscriptase du VIH. Cette enzyme permet aux rétrovirus de transcrire leur ARN en ADN afin de l'incorporer dans les cellules de l'hôte infecté. Il a ainsi isolé le M-B dont il a obtenu une structure aux rayons X. Le M-B est un épimère du M-A au niveau de la position benzylique C1' (Figure 5).

¹⁰ Murata, M.; Yamakoshi, Y.; Homma, S.; Arai, K.; Nakamura, Y. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*, 2062-2063.

¹¹ Nishizawa, M.; Emura, M.; Kan, Y.; Yamada, H.; Ogawa, K.; Hamanaka, N. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2983-2986.

Nishizawa isole ensuite le M-C dont il proposa une structure plane à partir d'études RMN. Par différentes transformations chimiques, il réussit également à identifier sa structure absolue. Pour cela, la partie phloroglucinol de M-C a été méthylée et les groupements aldéhydes réduits avant d'être acétylés (Schéma 1, voie a). La double liaison *exo*-cyclique a ensuite été oxydée avec le *m*-CPBA pour conduire à l'époxyde correspondant qui a finalement été réduit avec NaBHET₃. Le dérivé de macrocarpal obtenu dans ces conditions est identique au produit de réduction/méthylation/acétylation du M-A (Schéma 1, voie b). Ainsi les M-A et M-C possèdent la même structure absolue au niveau des centres 1, 2, 3, 8, 11 et 1' (Schéma 1).

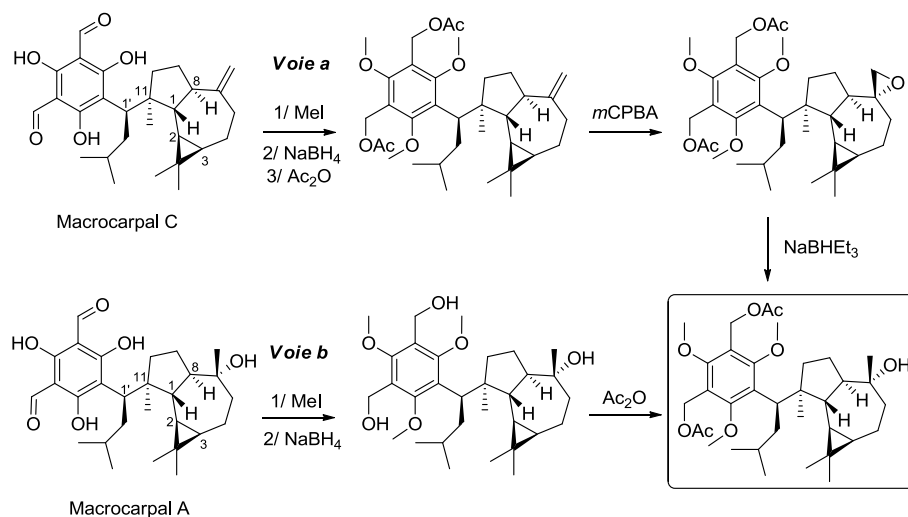


Schéma 1 : Détermination par voie chimique de la structure absolue du M-C.

Nishizawa a ensuite isolé deux autres macrocarpals (M-D et M-E, Figure 5). Pour ces deux derniers analogues, aucune structure absolue n'a pu être établie, en revanche, une structure plane à été proposée sur la base d'études RMN.

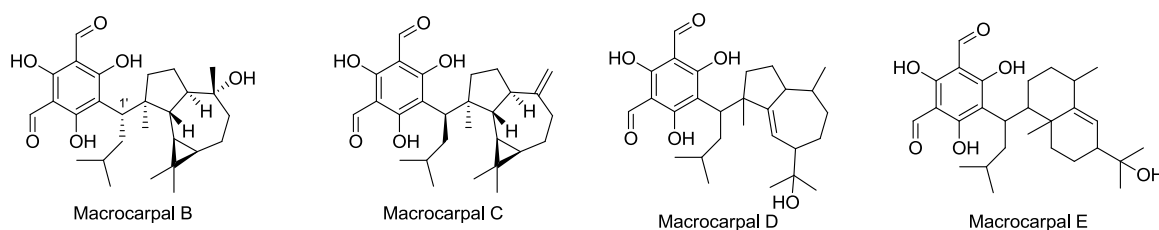


Figure 5 : Structures des macrocarpals B, C D et E selon Nishizawa.

Les différents macrocarpals A-E ont été évalués vis-à-vis de leurs activités inhibitrices de la rétrotranscriptase du VIH avec des valeurs d'IC₅₀ dans la gamme micro-molaire (Tableau 1).

Tableau 1 : IC₅₀ des M-A à M-E isolé par Nishizawa sur la rétrotranscriptase du VIH.

Molécule	M-A	M-B	M-C	M-D	M-E
IC ₅₀ (μM)	10,0	5,3	8,2	12,0	8,1

I.1.2.3 Comparaison des travaux de Murata et de Nishizawa

La comparaison directe des travaux de Murata et de Nishizawa est rendue difficile car les deux équipes ont réalisé leurs analyses RMN dans des solvants deutérés différents. Murata a décrit tous ses composés dans le méthanol- d_4 alors que Nishizawa a décrit les siens dans la pyridine- d_5 .

En revanche, les deux M-B décrits possèdent des propriétés physico-chimiques proches ce qui peut laisser penser qu'ils correspondent à un seul et même produit. Ils ont tous les deux été obtenus par recristallisation dans le méthanol et possèdent des points de fusion (198-200 °C / 196-198 °C) et pouvoir rotatoires (-17,5 / -14) proches.

I.1.3 Autres macrocarpals décrits dans la littérature

D'autres macrocarpals ont ensuite été décrits dans la littérature par différentes équipes japonaises. Ainsi, le macrocarpal-am-1 a été isolé de l'*E. amplifolia* alors que les macrocarpals H, I et J ont été isolés de *E. globulus*.^{12,13} Nos travaux ne se rapportant pas directement à ces molécules, nous ne détaillerons pas ces composés.

I.2 Objectifs des travaux de thèse

Ce projet a été conduit dans le cadre de la collaboration avec les Laboratoires Pierre Fabre et vise à développer une voie d'accès semi-synthétique au macrocarpal G. Ce dernier possède en effet des propriétés biologiques propres dont une activité anti-appétante marquée. Cette activité avait été mise en évidence en observant le comportement des koalas qui sont de gros consommateurs de feuilles d'eucalyptus. Il a été démontré qu'en fonction du plant consommé, les koalas mangeaient plus ou moins de feuilles. Plusieurs hypothèses, notamment sur la quantité d'eau, d'azote ou de monoterpènes présents dans les feuilles avaient été étudiées. Cependant, aucune de ces hypothèses ne permettaient d'expliquer les variations observées d'un arbre à un autre.¹⁴

Jusqu'en 1998, les chercheurs étaient convaincus qu'il y avait une relation entre la composition chimique des feuilles d'*Eucalyptus* et la quantité que pouvaient en manger les koalas, mais le (ou les) composé responsable n'était pas encore identifié. Pour tenter de répondre à cette énigme, Pass a comparé les quantités de feuilles de *E.ovata* et de *E. viminalis* mangées par deux espèces de marsupiaux australiens, le koala et l'opossum à queue en anneau (Common Ringtail Possum).¹⁵ Il a ensuite comparé les teneurs en M-G et les quantités de feuilles consommées.

¹² Singh, I. P.; Etoh, H. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1995**, *59*, 2330-2332.

¹³ Osawa, K.; Yasuda, H. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 823-827.

¹⁴ Pass, D. M.; Foley, W. J.; Bowden, B. *J. Chem. Ecol.* **1998**, *24*, 1513-1527.

¹⁵ Lawler, I. R.; Foley, W. J.; Eschler, B. M.; Pass, D. M.; Handasyde, K. *Oecologia* **1998**, *116*, 160-169.

Il a remarqué qu'à partir d'une concentration de $7,3 \times 10^{-6}$ mol/g de feuilles en M-G, les koalas commençaient à en manger moins et une chute de la consommation d'environ 70 % était observée pour une dose de $4,5 \times 10^{-5}$ mol/g. Ils ont donc identifié le M-G comme étant le composé principal qui engendre l'effet coupe faim sur les marsupiaux.

Le M-G présente également des activités intéressantes comme inhibiteur de la recapture des neurotransmetteurs dopamine, sérotonine et noradrénaline. Il présente une affinité plus importante pour les récepteurs de la dopamine que pour les autres neurotransmetteurs.¹⁶

Cependant, le M-G est difficilement isolable pur des feuilles d'eucalyptus et n'a jamais été cristallisé. Une solution pour accéder à M-G en quantité importante serait d'en réaliser son hémisynthèse au départ d'un composé parent qui serait accessible en grandes quantités. Or, les macrocarpals A et B peuvent être plus aisément isolés des feuilles d'eucalyptus.¹¹ Ces macrocarpals diffèrent du macrocarpal cible (G) par la présence en position 7 d'un groupement hydroxyle. Si nous étions capables d'opérer une déshydratation sélective *exo*-cyclique de ce groupement, nous serions en mesure d'accéder au M-G. Nous avons émis l'hypothèse de travail que le M-G et le M-B partageaient des centres stéréogènes communs même si la littérature reste ambiguë à ce propos. En effet, seule une structure plane a été proposée pour M-G. Nous avons donc, dans un premier temps, travaillé au développement de conditions de déshydratation sélectives du M-B pour accéder au M-G (appelé M-G_i tant que sa structure n'est pas confirmée) (Schéma 2).

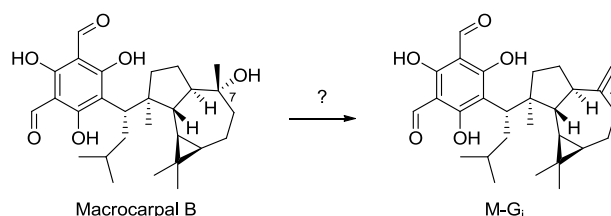


Schéma 2 : Hypothèse de départ : le M-G peut être obtenu par déshydratation du M-B.

I.3 Étude de la déshydratation du macrocarpal B

I.3.1 Premiers essais de déshydratation du macrocarpal B

Nous avons testé plusieurs conditions classiques de déshydratation telles que des catalyses acides plus ou moins fortes ou des activations d'alcools suivies d'éliminations. Cette réaction peut potentiellement mener à trois régiosomères : le M-G_i (double liaison *exo*-cyclique) et deux produits *endo*-cycliques (**I.1** et **I.2**) (Schéma 3).

¹⁶ Fiorini Puybaret, C.; Fabre, B.; Chauvin, C.; Joulia, P. FR2904557, 2006.

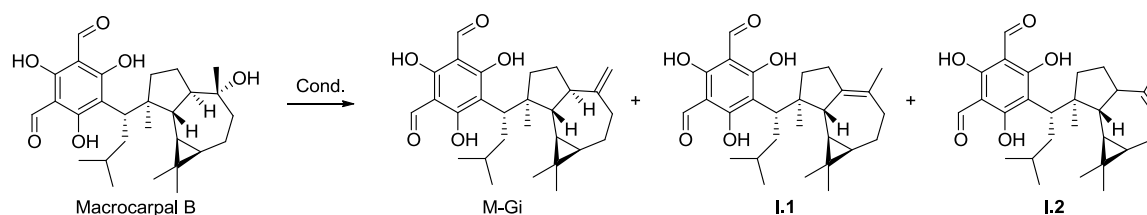


Schéma 3 : Déshydratation du M-B.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à des déshydratations catalysées en milieu acide (Tableau 2).

Tableau 2 : Conditions de déshydratation du M-B en catalyse acide.

Entrée	Réactif	Solvant	T. (°C)	Temps	endo / exo	Conversion (%)
1	PPTS	THF	40	3 jrs	NR	-
2	Montmorillonite K10	THF	40	3 jrs	NR	-
3	APTS, MS 4 Å	THF	40	3 jrs	1 / 0	40
4	H ₃ PO ₄	-	20	1 h	1 / 0	100
5	H ₂ SO ₄	THF	20	30 min	1 / 0	100
6	H ₂ SO ₄	MeCN	20	5 min	Dégradation	-

Quand les conditions acides ont été utilisées (entrées 1 à 6), l'unique produit obtenu à chaque fois a été un produit de déshydratation *endo*-cyclique facilement identifiable grâce à l'apparition d'un signal correspondant au méthyle vinylique en RMN ¹H à 1,5 ppm. L'acide faible PPTS et la Montmorillonite K10 (une argile aux propriétés acides) ne sont pas des acides suffisamment forts pour réaliser cette réaction (entrées 1 et 2). L'APTS qui est un acide plus fort permet de déshydrater le M-B mais seulement en chauffant à 40 °C (entrée 3). Finalement, seuls les acides forts H₃PO₄ et H₂SO₄ ont été capables de réaliser une déshydratation propre et complète. Cependant, l'unique produit obtenu de ces réactions contient une double liaison *endo*-cyclique.

L'ensemble de ces résultats montre que toute catalyse acide, qu'elle soit forte ou non mène à un seul des deux régioisomère *endo* (I.1 ; le produit I.2 n'a jamais été observé). Cette structure a été confirmée par des analyses RMN complémentaires (COSY, HMBC et HSQC).

Deux principaux mécanismes peuvent être envisagés pour l'élimination d'un alcool tertiaire : E1 et E2. Le mécanisme E1 étant la plupart du temps catalysé par un acide passe par un intermédiaire carbocationique. Le produit ainsi formé suit la règle de Zaitsev et l'alcène le plus substitué est alors obtenu (I.1). Cependant, notre objectif est de déshydrater le M-B en M-G dont la double liaison est *exo*-cyclique et la moins substituée.

Dans le cas des macrocarpals, il y a une contrainte assez forte au niveau du cycle à sept chaînons qui prend probablement une forme de chaise dans sa conformation la plus stable (Figure 6, A). En effet, la conformation B (Figure 6) est défavorisée car il y a une gêne stérique entre un des méthyles porté par le cyclopropane et les positions 6 et 15.

Dans cette conformation A, l'alcool se trouve en position équatoriale et donc aucune élimination E2 *intra*-cyclique ne peut se faire puisqu'il n'y a pas d'atome d'hydrogène en *anti*. La seule possibilité d'élimination est donc *exo*-cyclique en impliquant un des protons porté par le méthyle 15.

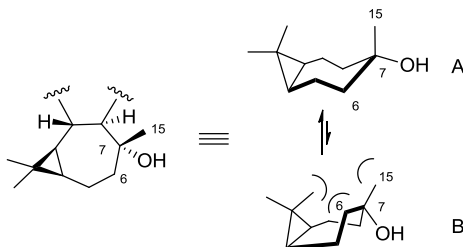


Figure 6 : Conformation possible du cycle à sept chaînons du M-B.

Les conditions de réaction précédemment utilisées (acides, mécanisme E1) menaient au produit *endo*-cyclique **I.1** uniquement. Nous avons alors testé d'autres conditions de déshydratation non acide (Tableau 3) afin de voir s'il était possible d'isoler le produit d'élimination *exo*-cyclique (M-G_i).

Tableau 3 : Conditions de déshydratation du M-B de type E2.

Entrée	Réactif	Solvant	T. (°C)	Temps	<i>endo</i> / <i>exo</i>	Conversion (%)
1	DIAD / PPh ₃ ,	THF	0 à 40	16 h	NR	NR
2	MsCl / Pyridine,	THF	70	3 h	-	Ajout Ms- sur M-B
3	POCl ₃ / Pyridine,	THF	20	1 h	1 / 1	100 ^a
4	SOCl ₂ / Pyridine,	THF	-78	1 h	NR	NR
5	SOCl ₂ / Pyridine,	THF	-40	1 h	1 / 0,6	70
6	SOCl ₂ / Pyridine,	THF	-15	1 h	1 / 0,7	100
7	SOCl ₂ / Pyridine,	THF	0	1 h	1 / 0,8	100
8	SOCl ₂ / Pyridine,	THF	20	1 h	1 / 1	100
9	T3P [®]	THF	reflux	10 h	1 / 5	100
10	T3P [®]	THF	reflux	4 h	1 / 10	50

^aDégradations.

Nous avons essayé d'activer cet alcool sous forme de sel de phosphonium avant élimination en traitant le M-B dans des conditions de Mitsunobu. Cependant, aucune déshydratation n'a été observée (entrée 1).

Nous avons ensuite essayé d'activer le groupement hydroxyle sous forme de mésylate tout en favorisant son élimination *in situ* en présence de pyridine. Malgré l'utilisation d'un excès de chlorure de mésyle, seule la mésylation d'un des trois phénols a été observée (entrée 2).

Nous sommes alors revenus à des méthodes plus classiques de déshydratation telles que POCl₃/pyridine ou SOCl₂/pyridine. Dans le premier cas, nous avons observé la formation du produit désiré, ainsi que beaucoup de produits de dégradation (entrée 3). L'utilisation du chlorure de thionyle en présence de pyridine et à différentes températures (entrées 4 à 8) conduit à une réaction bien plus propre puisqu'une conversion totale est observée à partir de - 15 °C. Cependant, même si le rapport

endo/exo augmente avec la température de réaction, nous n'avons pas été en mesure de dépasser 50% de sélectivité (ratio de 1/1). La séparation des deux isomères ne pouvant se faire que par HPLC préparative, une chute du rendement isolé est observée. Nous avons besoin d'une réaction qui soit plus sélective de la déshydratation *exo*-cyclique.

Finalement, nous avons testé l'anhydride cyclique de l'acide *n*-butylphosphonique (T3P[®]) qui est un réactif développé récemment (Figure 7). Ce réactif est principalement utilisé comme agent de couplage pour la formation d'amides ou d'esters. Simple d'utilisation, il n'induit qu'une très faible épimérisation quand il est utilisé pour réaliser des couplages peptidiques. Son sous-produit de réaction (l'acide *n*-butylphosphonique) est très soluble dans l'eau. Il est donc facilement éliminé du milieu réactionnel.^{17,18} Nous l'avons utilisé ici comme agent de déshydratation. Les premiers essais de déshydratation du macrocarpal B par T3P ont été réalisés à 20 °C. Cependant, à cette température, aucune conversion n'est observée. Cependant quand T3P est utilisé dans le THF à reflux, le produit de déshydratation *exo* (M-G₁) est obtenu majoritairement après 10 h (entrée 9). Nous avons remarqué que si la réaction était arrêtée après seulement 4 h, le produit *exo* pouvait être isolé avec une bonne sélectivité de 10 pour 1 mais avec des rendements de conversion faibles (entrée 10).

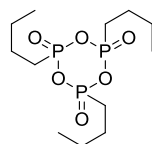


Figure 7 : Structure de l'anhydride cyclique de l'acide *n*-butylphosphonique (T3P).

Afin de s'assurer que le produit formé correspondait bien au macrocarpal G, nous l'avons comparé avec un échantillon authentique fourni par les Laboratoires Pierre Fabre. Ces réactions ayant été suivies par LC-MS, nous avons remarqué que le produit synthétisé et le M-G avait le même temps de rétention (un seul pic en co-injection) et une distribution de masse identique. Nous avons donc bien obtenu un produit de déshydratation. Cependant, lorsque nous avons analysé par RMN du proton le produit synthétisé et comparé son spectre à l'échantillon authentique, nous avons d'une part observé la présence caractéristique du méthylène *exo*-cyclique à 4,8 ppm (indicatif d'une déshydratation *exo*-cyclique) mais d'autre part une dissimilitude assez forte au niveau des autres signaux (Figure 8).

¹⁷ Llanès García, A. L. *Synlett*, **2007**, 8, 1328-1329.

¹⁸ Basavaprabhu; Vishwanatha, T. M.; Panguluri, N. R.; Sureshbahu, V. V. *Synthesis* **2013**, 45, 1569–1601.

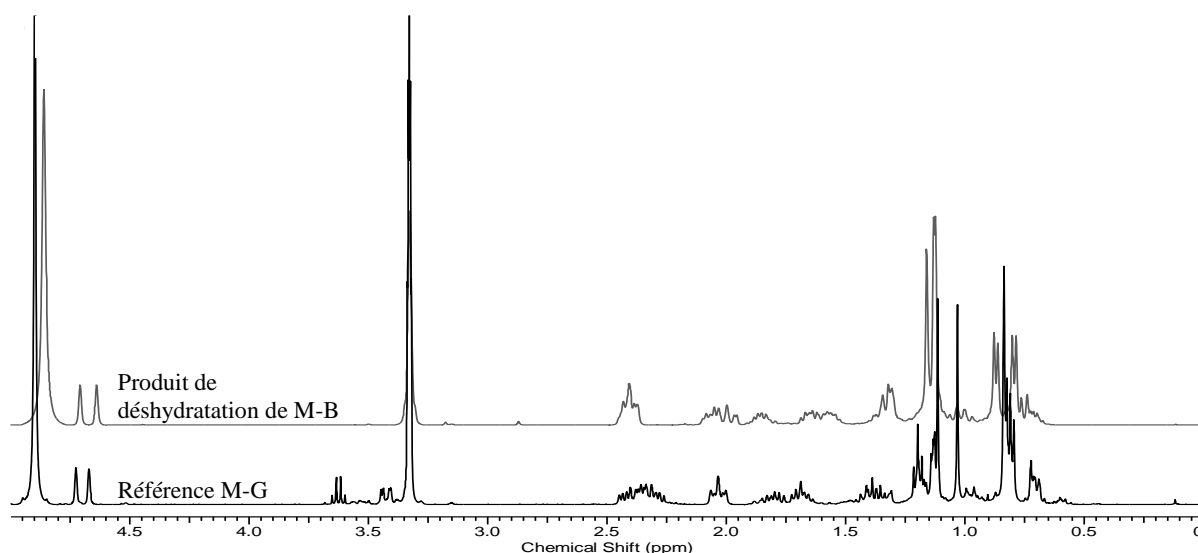


Figure 8 : Spectre RMN proton du produit synthétisé (M-G_i) et du M-G dans le MeOD.

À ce moment du projet, nous étions convaincus que nous avions réussi à réaliser une déshydratation *exo*-cyclique du M-B. Cependant le produit obtenu était structurellement différent du M-G de référence.

Dans la littérature, seule une structure plane du M-G avait été proposée.⁹ Sa structure absolue n'ayant jamais été déterminée, nous avons émis l'hypothèse que le produit obtenu (M-G_i) par déshydratation devait être un isomère du M-G.

I.3.2 Les macrocarpals C et G seraient ils en fait une seule et même molécule ?

En 1997, Iwata et son équipe ont décrit la première synthèse totale et stéréocontrôlée du M-C.^{19,20} La structure absolue du M-C avait déjà été validée par voie chimique.¹¹

La synthèse totale a été réalisée en utilisant une étape clef de couplage entre un éther d'énol silylé et un complexe chiral benzène hexasubstitué / chrome rendant la synthèse énantiosélective (Schéma 4).

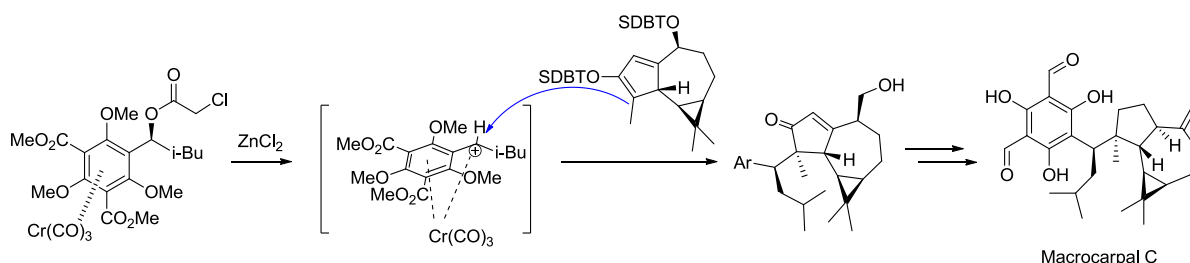


Schéma 4 : Synthèse totale énantiosélective du M-C.

¹⁹ Tanaka, T.; Mikamiyama, H.; Maeda, K.; Iwata, C.; In, Y.; Ishida, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9782-9793.

²⁰ Tanaka, T.; Mikamiyama, H.; Maeda, K.; Ishida, T.; In, Y.; Iwata, C. *Chem. Commun.* **1997**, 2401-2402.

À la fin de leur synthèse, les auteurs comparent le produit qu'ils ont obtenu à un échantillon naturel de M-C. Ces deux produits présentent les mêmes données spectrales mais un pouvoir rotatoire différent $[\alpha]_D^{25}$ -22,1 pour l'échantillon synthétisé contre $[\alpha]_D^{25}$ -3,0 pour le produit isolé de *E. globulus*.¹¹ Cette faible valeur du produit isolé a été attribuée à la présence probable d'impuretés qui ont faussé la mesure du pouvoir rotatoire.

Ils ont ensuite réalisé une analyse RMN (proton et carbone 13) de cet échantillon dans le méthanol-*d*₄ afin de le comparer avec les données du M-G rapportées par l'équipe de Murata.⁹ En effet, jusque là toute comparaison entre le M-C et le M-G avait été impossible car les RMN avaient été rapportées dans deux solvants deutérés différents (respectivement pyridine et méthanol).

En comparant les données spectrales ils se sont aperçus que le M-G et leur échantillon synthétique étaient identiques.

Ils ont donc conclu que le M-C et le M-G n'étaient en fait qu'une seule et même molécule (Figure 9).

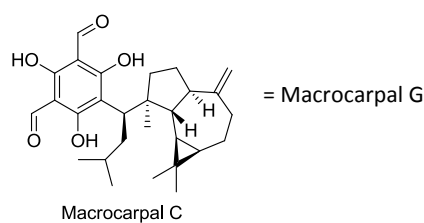


Figure 9 : Le M-C et le M-G ne sont qu'une seule et même molécule.

1.3.3 Révision des hypothèses

Dans notre projet, il avait été initialement postulé que le M-G pouvait être obtenu par déshydratation sélective du M-B. Cependant l'expérience montre que la déshydratation *exo*-cyclique du M-B ne conduit pas au M-G mais à un produit de déshydratation autre (M-G_i structurellement différent de M-G).

Une étude approfondie de la littérature indique que le M-G possède en fait la même structure que le M-C (voir ci-dessus) dont la stéréochimie des différents centres diffère du M-B mais est identique à celle du M-A. Nous avons alors émis l'hypothèse que nous devrions être capables d'accéder au M-G/C par déshydratation sélective du M-A.

Le M-A a donc été traité dans les mêmes conditions de déshydratation que le M-B (T3P, THF reflux, 4 h) (Schéma 5) pour conduire au M-G/C avec une sélectivité *endo/exo* 1/9. Le produit « *exo* » a été isolé par HPLC préparative et analysé. Les résultats obtenus montrent que le produit de déshydratation du M-A et le M-G possèdent des données RMN (¹H, ¹³C, Figure 10) identiques, le même profil LC-MS et des pouvoirs rotatoires très proches ($[\alpha]_D^{20}$ -25.8 (*c* 0.10, EtOH); (lit.,¹⁹ $[\alpha]_D^{25}$ -22.1 (*c* 0.15, EtOH)).

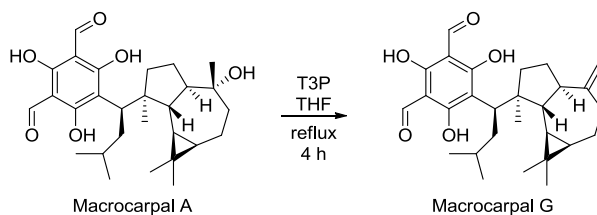


Schéma 5 : Synthèse de M-G par déshydratation du M-A.

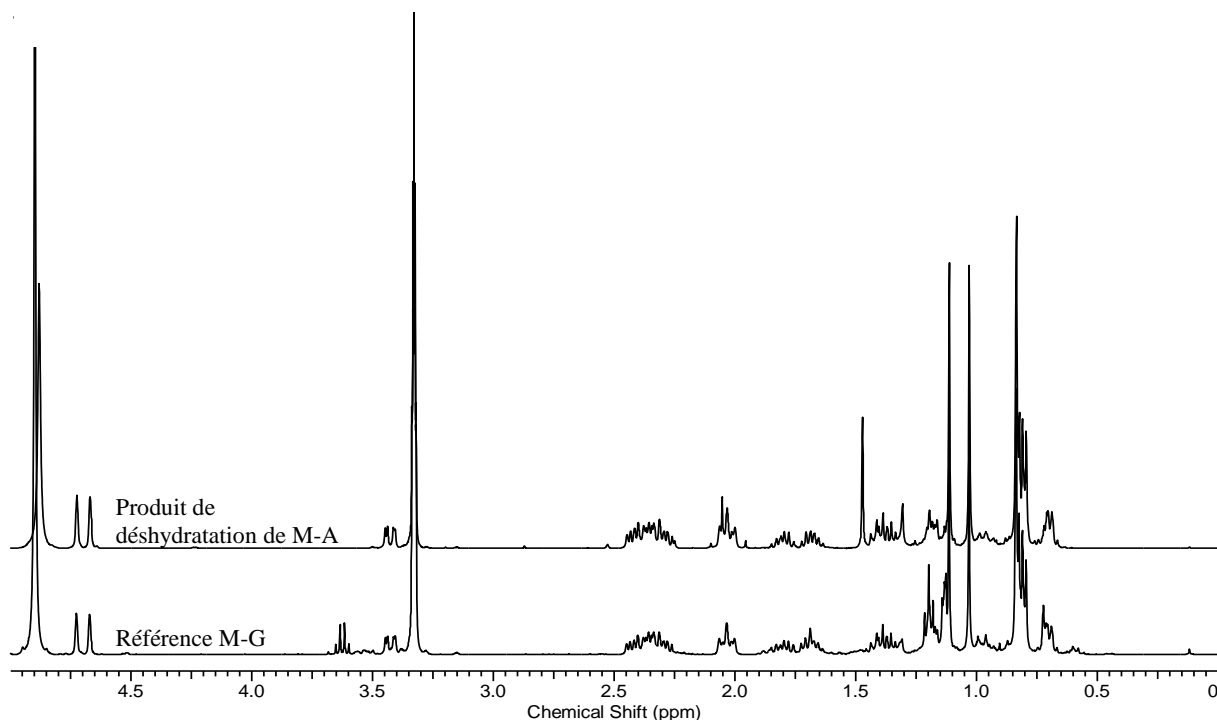


Figure 10 : Spectres RMN du proton du produit synthétisé et de la référence M-G dans le MeOD.

En conclusion, le M-G a pu être obtenu par voie semi-synthétique en partant du M-A et non du M-B. Cette réaction a ensuite été optimisée et de nouveaux analogues de macrocarpals ont été isolés.

I.4 Synthèse du macrocarpal G et de ses analogues

I.4.1 Optimisation de la déshydratation *exo*-cyclique du M-A en M-G

Le problème de cette méthode impliquant T3P est la formation parasite du produit de déshydratation *endo*-cyclique (**I.3**) qui nous empêche d'avoir une conversion totale en produit souhaité. Afin d'essayer de minimiser la formation de ce sous-produit, nous avons cherché à comprendre comment il se formait dans le milieu réactionnel.

1.4.1.1 Élucidation du mécanisme d'isomérisation du M-G

Nous avons observé que le traitement du M-A par T3P conduisait à une fraction de produit de déshydratation *endo* qui augmentait avec le temps de réaction. Par exemple un ratio *endo/exo* de 1/4 est obtenu après 10 h de réaction alors qu'il est de 1/9 après seulement 4 h. Nous avons donc cherché à comprendre pourquoi ce ratio augmentait avec le temps et avons supposé que le produit *endo*-cyclique (**I.3**) était issu d'une isomérisation du M-G.

Nous avons ainsi voulu savoir si la double liaison du M-G pouvait s'isomériser en conditions acides. Pour cela, du M-G a été traité dans le THF avec une quantité sous-stœchiométrique d'acide sulfurique (Schéma 6). Après une heure de réaction, on observe une isomérisation totale de la double liaison *exo*-cyclique (M-G) vers un alcène *endo*-cyclique (**I.3**). Un acide est donc capable de catalyser cette réaction.

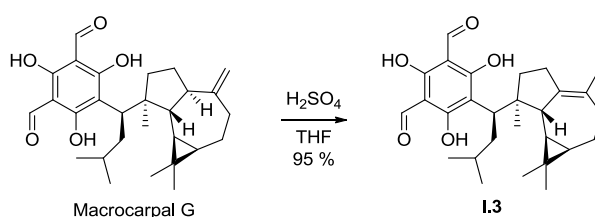


Schéma 6 : Isomérisation de la double liaison *exo*-cyclique du M-G en milieu acide.

Notre réaction de déshydratation n'implique pas directement de conditions acides. Cependant, l'anhydride *n*-butylphosphonique (T3P) en réagissant avec le groupement alcool s'hydrolyse effectivement en acide phosphonique. Afin de vérifier si ce dernier pouvait être à l'origine de l'isomérisation de la double liaison, nous avons utilisé un mélange de produits *endo/exo* (0,6/1) et l'avons traité dans les conditions de la déshydratation (T3P, THF, reflux). En parallèle, nous avons traité un autre échantillon par de l'acide *n*-butylphosphonique. Après 6 h au reflux du THF, alors que le ratio n'évolue quasiment pas dans la première expérience (*endo/exo* : 0,7/1), il augmente à 1,2/1 quand T3P est remplacé par de l'acide phosphonique (Tableau 4).

Tableau 4 : Elucidation du mécanisme d'isomérisation de la double liaison du M-G.

Entrée	Réactif	Solvant	T.	Temps	<i>Endo / Exo</i>
	Echantillon de départ				0,6 / 1
1	T3P [®]	THF	reflux	6 h	0,7 / 1
2	Acide <i>n</i> -butylphosphonique	THF	reflux	6 h	1,2 / 1

Il semble donc que le sous-produit de réaction de T3P, l'acide *n*-butylphosphonique, soit responsable de l'isomérisation de la double liaison du M-G dans le milieu réactionnel. Nous avons alors imaginé que nous pourrions inhiber la réaction parasite d'isomérisation en piégeant l'acide formé *in situ* avec une base.

I.4.1.2 Optimisation de la sélectivité de la déshydratation *exo*-cyclique du M-A

Dans un premier temps nous avons testé des bases classiques telles que la pyridine, la triéthylamine, ou la diisopropyléthylamine. Chacune de ces bases a été testée dans des conditions différentes de température, de nombre d'équivalents et de concentration mais jamais la formation du M-G n'a été observée et les bruts réactionnels présentaient de nombreux produits de dégradation. Nous avons alors pensé que ce manque de réactivité pouvait provenir de la nucléophilie des bases utilisées vis-à-vis de T3P mais également de la déprotonation des phénols du M-A. Nous avons alors utilisé une pyridine encombrée stériquement (2,5-di-*tert*-butyl pyridine) (Schéma 7) qui devrait moins interférer avec l'anhydride *n*-butylphosphonique. En présence de 2,5-di-*tert*-butyl pyridine, nous observons effectivement une réaction beaucoup plus sélective qu'avec T3P seul puisque le produit de déshydratation *exo*-cyclique est obtenu avec un très bon rendement (95 %) et une très bonne sélectivité de 1/19 (*endo/exo*) après 6 h de réaction. Ce résultat permet d'isoler le M-G, en partant du M-A en une seule étape de synthèse avec une purification facilitée (une simple colonne chromatographique est suffisante).

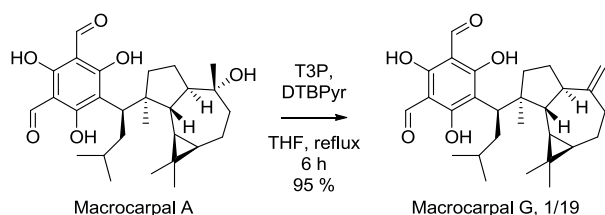


Schéma 7 : Conditions optimisées de déshydratation du M-A en M-G.

I.4.2 Synthèse de nouveaux macrocarpals

Nous avons ensuite mis à profit les observations faites au cours des différentes tentatives de déshydratation pour synthétiser de nouveaux analogues des macrocarpals.

I.4.2.1 Déshydratation *exo*-cyclique du M-B

La méthode développée ci-dessus a également été appliquée au M-B et le produit de déshydratation *exo*-cyclique (**I.4**) a été isolé avec un rendement de 87 % et une sélectivité supérieure à 95 % (Schéma 8).

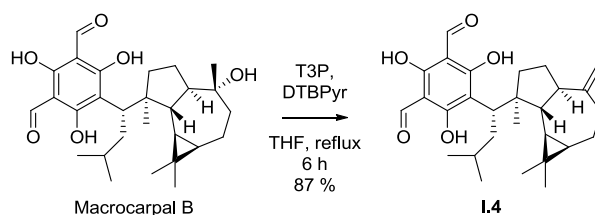


Schéma 8 : Déshydratation sélective *exo*-cyclique du M-B.

I.4.2.2 Déshydratations endo-cycliques des M-A et M-B

Comme nous l'avons remarqué au début de cette étude, l'utilisation d'une catalyse acide permet d'isoler de façon très sélective les produits *endo*-cycliques correspondants. Nous avons donc envisagé d'accéder à de nouvelles structures de dérivés de macrocarpals en déshydratant sélectivement les macrocarpals A et B en conditions acides (acide sulfurique / THF). Après une heure de réaction, les produits *endo*-cycliques correspondants ont été isolés purs avec des rendements respectifs de 90 % (**I.3**) et 78 % (**I.1**) (Schéma 9).

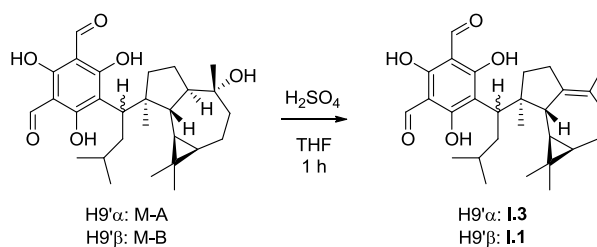


Schéma 9 : Déshydratation *endo*-cyclique des M-A et M-B.

Nous n'avons jamais observé au cours de ce travail la formation du régioisomère *endo*-cyclique le moins substitué (**I.2** ou **I.5**) que ce soit au départ du macrocarpal A ou B. La sélectivité du processus de déshydratation est probablement gouvernée ici par la règle de Zaitsev qui implique la formation de l'oléfine la plus substituée car la plus stable (Schéma 10).

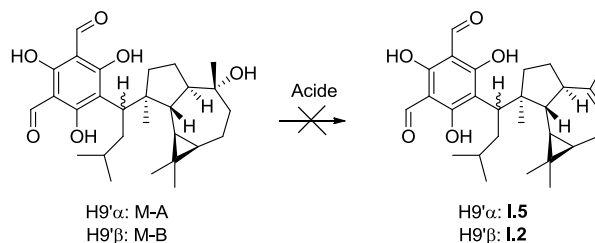


Schéma 10 : Déshydratation *endo*-cyclique non opérante des M-A et M-B.

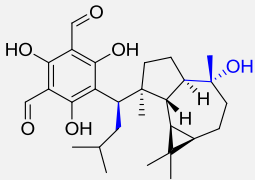
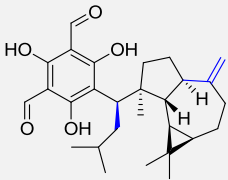
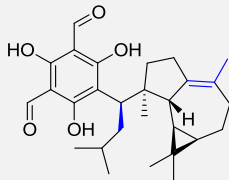
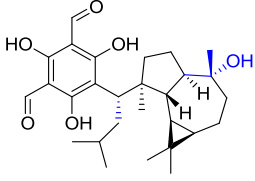
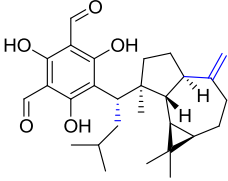
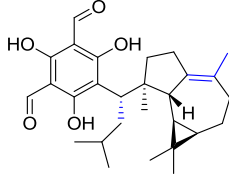
I.5 Conclusion

L'objectif initial de ce projet était d'accéder au M-G selon une approche semi-synthétique par déshydratation du M-B. Une réaction de déshydratation sélective a été mise au point en utilisant de l'anhydride *n*-butylphosphonique (T3P) combiné à la 2,5-di-*tert*-butyl pyridine. Cependant, la conversion du M-B conduit à un produit de déshydratation *exo*-cyclique dont la structure diffère du M-G de référence. Nous avons alors émis l'hypothèse que ce produit obtenu et le M-G étaient en fait des stéréoisomères. Cette hypothèse a été confortée par des travaux de synthèse totale d'Iwata qui mettent en évidence que M-C et G ne sont en fait qu'une seule et même molécule.

Sur la base de ce constat, nous avons repris notre hémi-synthèse, au départ cette fois du M-A dont la stéréochimie des différents centres est identique à celle du M-C. La transformation du M-A nous à permis d'obtenir le M-C/G avec 95% de rendement.

De nouveaux analogues de macrocarpals ont également été produits au cours de cette étude en réalisant la réaction de déshydratation en conditions acides. Deux structures « endo » ont ainsi été obtenues au départ des M-A et M-B (Tableau 5).

Tableau 5 : Bilan des macrocarpals synthétisés.

Réactif de départ	Déshydratation <i>exo</i> -cyclique	Déshydratation <i>endo</i> -cyclique
 <p>Macropal A</p>	 <p>Macropal G</p>	 <p>I.3</p>
 <p>Macropal B</p>	 <p>M-G, I.4</p>	 <p>I.1</p>

Chapitre II

Lévomilnacipran

Loin de la déprime passagère, la dépression est une maladie qui touche 19 % de la population française âgée de 15 à 75 ans soit près de 8 millions de personnes.²¹ Certains symptômes de la dépression sont liés à la concentration synaptique de trois neurotransmetteurs monoamine (dopamine, noradrénaline et sérotonine, Figure 11).

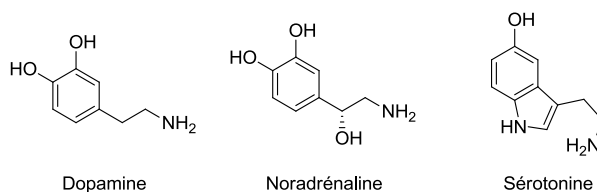


Figure 11 : Structures de la Dopamine, Noradrénaline et Sérotonine.

Il existe actuellement trois grandes classes d'antidépresseurs agissant sur ces récepteurs. Les antidépresseurs tricycliques (ATC, ex : Imipramine, Figure 12), développés dans les années 1950, agissent en inhibant la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline. Le principal problème de cette famille d'antidépresseurs est leur affinité plus ou moins prononcée pour les autres récepteurs aux monoamines, entraînant des effets secondaires pouvant être très désagréables.

Une deuxième classe d'antidépresseurs a alors été développée : les Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine (ISRS), mieux tolérés que les ATC, ils présentent cependant d'autres inconvénients tels que l'aggravation des dysfonctionnements sexuels et des interactions plus prononcées avec d'autres principes actifs. De plus, ils sont parfois moins actifs que les ATC sur les cas de dépressions sévères.

Afin de limiter les effets secondaires des ISRS liés à leur spécificité, une troisième classe d'antidépresseurs a été développée : les Inhibiteurs de la Recapture de la Sérotonine et de la Noradrénaline (IRSR). Contrairement aux ATC, ces antidépresseurs ne présentent qu'une très faible (voire aucune) affinité pour les autres récepteurs aux monoamines, limitant ainsi leurs effets secondaires.

Le Milnacipran (Figure 12) fait partie de cette dernière famille de composés. Il s'agit d'une molécule de faible poids moléculaire composé d'un cyclopropane comportant deux centres stéréogènes fonctionnalisés avec des fonctions amide et méthylène amine. Ces deux fonctions sont en *syn* par rapport au cyclopropane, ce qui confère au Milnacipran une stéréochimie relative *cis*.

²¹ Chan Chee, C.; Beck, F.; Sapinho, D.; Guilbert, P. La dépression en France, INPES, coll. Études santé, **2009**.

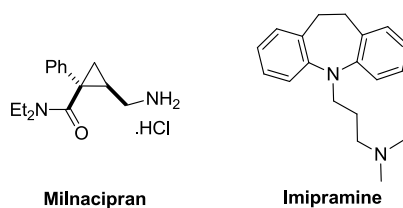


Figure 12 : Structure du Milnacipran et de l'Imipramine.

Les propriétés antidépressives du Milnacipran ont été mises en évidence pour la première fois dans les années 80 sur des modèles animaux. Elles étaient meilleures que celles de l'Imipramine, utilisée comme référence depuis 1957.²²

Le Milnacipran est aujourd'hui produit industriellement sous sa forme racémique et commercialisé sous le nom d'Ixel[®] par les laboratoires Pierre Fabre.

En 2003, une étude a montré que l'énantiomère dextrogyre du Milnacipran avait une meilleure activité que le composé racémique et présentait également moins d'effets secondaires que l'énantiomère lévogyre.²³ Ainsi, nous avons, au cours de cette étude, développé une nouvelle voie d'accès énantiosélective à l'énantiomère dextrogyre du Milnacipran (Figure 13).

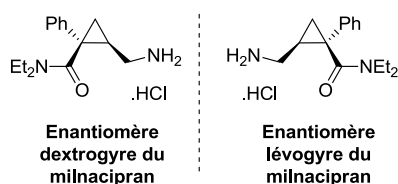


Figure 13 : Enantiomères dextrogyre et lévogyre du Milnacipran.

Remarque : Il peut y avoir une confusion dans la littérature sur le pouvoir rotatoire des énantiomères du Milnacipran. En effet, l'énantiomère qui nous intéresse du Milnacipran est lévogyre sous forme de base alors que la forme chlorohydrate est dextrogyre. Pour la suite de ce chapitre, le terme Lévomilnacipran référera donc à la forme base du Milnacipran (1*S*, 2*R*).

²² Bonnaud, B.; Cousse, H.; Mouzin, G.; Briley, M.; Strenger, A.; Fauran, F.; Couzinier J. P. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 318-325.

²³ Deregnaucourt, J.; Grosse, R. FR2851163(A1).

II.1 Le Milnacipran

II.1.1 Synthèse racémique

II.1.1.1 Première synthèse du Milnacipran

En 1978, l'équipe de Bonnaud a synthétisé une première série de cyclopropanes dérivés d'acides carboxyliques afin d'évaluer leurs propriétés pharmaceutiques antidépressives.²⁴ Pour cela, ils ont condensé l'anion de différents benzonitriles sur l'épichlorohydrine pour former un mélange racémique de cyclopropanes *cis* (**II.2**) et *trans* (**II.3**) (Schéma 11) qui ont été isolés par distillation. En effet, le cyclopropane *cis* tend à se lactoniser spontanément à 150 °C et peut ainsi être distillé. Une fois isolée, la lactone (**II.1**) est finalement rouverte en conditions basiques et le cyclopropane *cis* (**II.2**) est isolé pur.

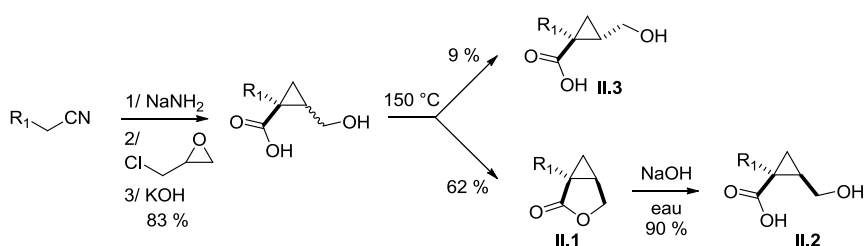


Schéma 11 : Synthèse de cyclopropanes dérivés d'acides carboxyliques.

Ces dérivés ont été évalués pour leurs propriétés antidépressives mais ont montré une très faible activité pharmaceutique.²⁵ L'équipe de Bonnaud a alors synthétisé une nouvelle série de cyclopropanes en remplaçant les acides carboxyliques par des amides et l'alcool primaire par des amines (Figure 14).²⁶

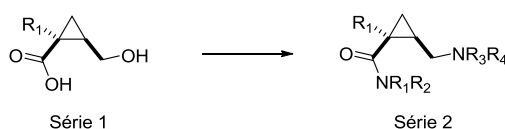


Figure 14 : Cyclopropanes acides carboxyliques (série 1) et dérivés (série 2).

Différents cyclopropanes ont été synthétisés et testés pour leur activité antidépressive. Le composé présentant l'activité la plus forte était le chlorhydrate du 1-phényl 1-diéthylaminocarbonyl 2-aminométhyl cyclopropane ((±)-Milnacipran).²⁶ Il a également présenté de meilleures activités biologiques que la Désimipramine, un ATC pris comme référence, sur plusieurs modèles.²⁷

²⁴ Mouzin, G.; Cousse, H.; Bonnaud, B. *Synthesis* **1978**, 304-305.

²⁵ Casadio, S.; Bonnaud, B.; Mouzin, G.; Cousse, H. *Boll. Chim. Farm.* **1978**, 331-335.

²⁶ Bonnaud, B.; Cousse, H.; Morre, M.; Mouzin, G.; Stenger, A. EP00068999A1 **1982**.

²⁷ Quinton, R.M. *Brit. J. Pharmacol.* **1963**, 21, 51-66.

Le Milnacipran est également peu toxique à des doses thérapeutiques utiles puisque la Dose Létale 50 sur des modèles de souris est comprise entre 300 et 1000 mg/kg (DL₅₀ : dose à laquelle 50 % des animaux meurent). Ces dérivés présentent donc une très faible toxicité.²⁶

La première synthèse du Milnacipran est publiée un peu plus tard par l'équipe de Bonnaud. En partant de la lactone **II.1**, ils isolent le Milnacipran en six étapes (Schéma 12).²² Tout d'abord, la lactone est ouverte en présence de HBr, puis l'acide carboxylique libéré (**II.4**) est activé avec du chlorure de thionyle. Le chlorure d'acide **II.5** est alors transformé en amide avec la diéthylamine. Le brome est enfin substitué par le phtalimide et l'amine est déprotégée avec de l'hydrazine pour conduire au Milnacipran.

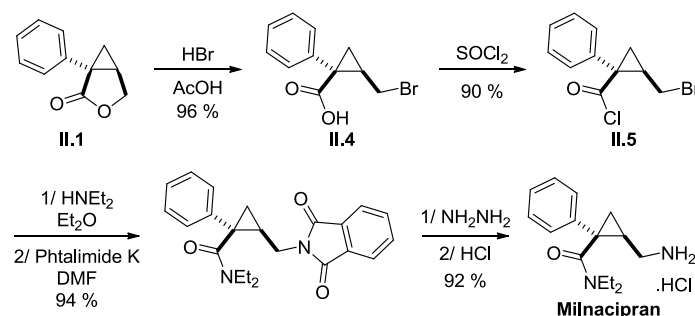


Schéma 12 : Première synthèse du (±)-Milnacipran.

II.1.1.2 Amélioration de la synthèse du (±)-Milnacipran

En se basant sur les travaux de Bonnaud publiés en 1978,²⁴ Shuto a proposé une synthèse courte et pratique du (±)-Milnacipran passant par la (±)-lactone **II.1**.²⁸ L'amélioration apportée se trouve au niveau de l'obtention de la (±)-lactone **II.1** en partant du phénylacétonitrile et de l'épichlorohydrine. La lactone **II.1** est isolée en une seule étape avec un rendement de 58 % suite à un traitement acide. La fin de la synthèse est également plus courte. La lactone **II.1** est ouverte par de l'amidure de diéthyle pour former l'amide-alcool **II.6**. Une réaction d'Appel permet ensuite de bromer l'alcool qui est substitué par un azoture dont la réduction conduit au (±)-Milnacipran avec un rendement global de 50 % (Schéma 13). Cette synthèse, et plus particulièrement l'addition de l'anion du phénylacétonitrile sur l'épichlorohydrine, a été discutée plus en détails à la page 46 (Schéma 18).

²⁸ Shuto, S.; Takada, H.; Mochizuki, D.; Tsujita, R.; Hase, Y.; Ono, S.; Shibuya, N.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2964-2968.

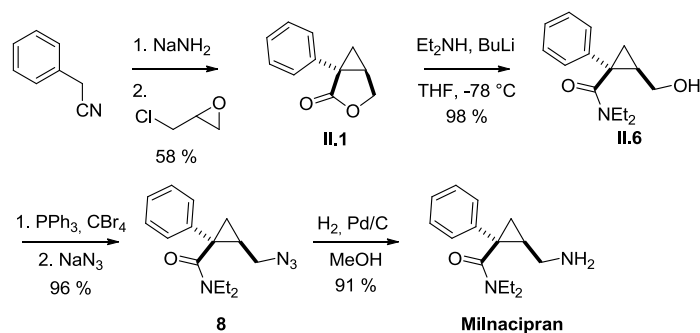


Schéma 13 : Synthèse du (±)-Milnacipran selon Shuto.

II.1.2 Pharmacologie et pharmacocinétique du Milnacipran

II.1.2.1 Aspects pharmacologiques du Milnacipran

L'utilisation du Milnacipran est recommandée pour le traitement d'épisodes dépressifs majeurs. Ce composé est un inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline.

Ces neurotransmetteurs permettent de faire circuler une information entre n neurone pré-synaptique et un neurone post-synaptique. Chez une personne non dépressive, les neurotransmetteurs vont être recaptés par le neurone pré-synaptique une fois que l'information est passée. Chez un patient dépressif, les neurotransmetteurs sont recaptés avant que le message n'ait pu circuler. Le Milnacipran agit en inhibant leur recapture de façon à augmenter leur concentration synaptique.

Le Milnacipran présente une sélectivité assez faible vis-à-vis des récepteurs des deux neurotransmetteurs noradrénaline/sérotonine (1/1,6), ce qui est un avantage par rapport aux autres inhibiteurs qui sont en général bien plus sélectifs de la sérotonine.²⁹

De plus, contrairement aux antidépresseurs tricycliques (ATC), le Milnacipran présente une très faible affinité pour les autres récepteurs aux monoamines, évitant ainsi de nombreux effets secondaires.^{30,31}

Certains ATC interagissent avec les canaux ioniques cellulaires. Ce phénomène entraîne une perturbation du rythme cardiaque qui peut conduire à la mort suite à une prise trop importante de ces antidépresseurs (overdose). À l'opposé, le Milnacipran n'a aucune interaction avec les canaux ioniques et n'a pas d'effet sur le rythme cardiaque.³²

Afin d'évaluer la dose thérapeutique du Milnacipran pour son activité inhibitrice de la recapture des monoamines, 12 volontaires sains ont reçu une dose allant de 25 à 400 mg.³³ L' ID_{50} du

²⁹ Kasper, S.; Pail, P. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2010**, *6* (Suppl 1), 23-31.

³⁰ Cusack, B.; Nelson, A.; Richelson, E. *Psychopharmacology* **1994**, *114*, 559-565.

³¹ Puozzo, C.; Panconi, E.; Deprez, D. *Int Clin Psychopharmacol.* **2002**, *17* (Suppl 1), 25-35.

³² Montgomery, S. A.; Prost, S. A.; Solles, A.; Briley, M. *Int Clin Psychopharmacol.* **1996**, *11* (Suppl 4), 47-51.

³³ Palmier, C.; Puozzo, C.; Lenehan, T.; Briley, M. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1989**, *37*, 235-238.

Milnacipran (dose en principe actif qui permet de lier 50 % de tous les récepteurs) a été évaluée pour la recapture de la sérotonine à 6.5 mg. Cette dose est de 4.1 mg pour la noradrénaline. Cela implique qu'à la dose thérapeutique recommandée (50 mg), il y aura une inhibition quasi complète de la recapture des neurotransmetteurs.

II.1.2.2 Aspects pharmacocinétiques du Milnacipran

Un des principaux risques des principes actifs réside dans leur capacité à être métabolisés. Ce problème est d'autant plus préoccupant qu'il n'y a le plus souvent aucun lien entre l'activité de la molécule administrée et l'activité du métabolite.

Le Milnacipran est faiblement métabolisé et ses métabolites sont peu ou pas actifs. Une étude *in vivo* a été conduite avec six patients volontaires qui ont reçu une dose de 100 mg de Milnacipran marqué au ^{14}C .³⁴ Approximativement 55 % du produit ingéré est excrété par les urines sous sa forme originale, 19 % sous une forme glycosylée et environ 8 % sous forme inactive *N*-deséthylmilnacipran. Aucun autre métabolite n'a été détecté en quantité significative dans les urines (Schéma 14).

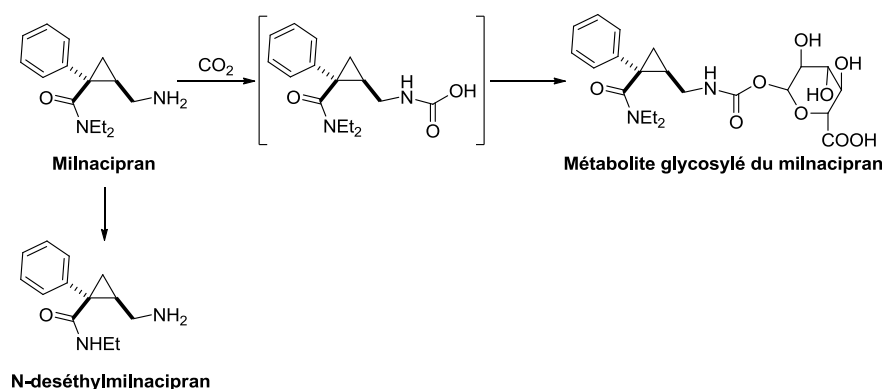


Schéma 14 : Métabolisation du Milnacipran.

Les différents métabolites du Milnacipran ont été évalués mais n'ont montré aucune activité pharmacologique aux doses utilisées en thérapie. Le Milnacipran représente le seul composé actif.

II.1.3 Conclusion

Découvert dans les années 80, le (\pm)-Milnacipran est une petite molécule utilisée pour aider les patients atteints de dépression. Inhibant la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, le Milnacipran présente l'avantage d'avoir beaucoup moins d'effets secondaires que les antidépresseurs tricycliques puisqu'il n'interagit pas avec les récepteurs des autres neurotransmetteurs. Il est peu métabolisé, et ses métabolites sont inactifs aux doses utilisées.

³⁴ Li, F.; Chin, C.; Wangsa, J.; Ho, J. *Drug Metabolism and Disposition* **2012**, *40*, 1723-1735.

Des études complémentaires ont récemment montré qu'un des deux énantiomères du mélange racémique (Lévomilnacipran) était plus actif pour traiter la dépression.

II.2 Le Lévomilnacipran

Le Lévomilnacipran (F2695) qui est la forme lévogyre du Milnacipran vient de recevoir son autorisation de mise sur le marché par la FDA aux Etats-Unis et au Canada. Il est produit par les laboratoires Pierre Fabre et sera commercialisé par les laboratoires Forest comme inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline.

II.2.1 Intérêts du Lévomilnacipran par rapport à sa forme racémique

II.2.1.1 Vitesse de métabolisation

Même si le (\pm)-Milnacipran présente de très bonnes propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques, il n'en reste pas moins un mélange racémique de deux produits aux propriétés différentes. Cela a été particulièrement mis en évidence dans l'étude menée par Li³⁴ sur la pharmacocinétique du (\pm)-Milnacipran. Il en est ressorti que le Lévomilnacipran se métabolisait moins vite (glycosylation plus lente) que son énantiomère dextrogyre augmentant d'autant sa disponibilité.

II.2.1.2 Intérêt pour le traitement de la dépression

Un brevet des Laboratoires Pierre Fabre décrit une activité pharmaceutique *in vitro* supérieure pour le Lévomilnacipran par rapport à la forme racémique (sur des hypothalamus de rats).²³ Les auteurs concluent que l'essentiel de l'activité IRSN (inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline) du (\pm)-Milnacipran est due à l'énantiomère lévogyre (Tableau 6).

Tableau 6 : IC₅₀ des inhibitions des captures de sérotonine et noradrénaline (nM)

Composé	Capture Noradrénaline	Capture Sérotonine
(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-milnacipran (lévogyre)	15	46
(\pm)-milnacipran	30	150
(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-milnacipran (dextrogyre)	750	600

En effet, le Lévomilnacipran est deux fois plus actif que le racémique et 25 fois plus actif que l'énantiomère dextrogyre pour la recapture de la noradrénaline. De même pour la sérotonine, le composé lévogyre est trois fois plus actif que le racémique et 12 fois plus actif que l'énantiomère dextrogyre.

II.2.1.3 Prévention des risques de suicide

D'autre part, alors qu'il est établi que le risque de suicide est accru pendant les premières semaines de la prise d'un antidépresseur,³⁵ le Lévomilnacipran induit une baisse des comportements suicidaires.^{36,37} Il ferait diminuer de façon significative le risque de suicide lié à la dépression, pouvant presque être utilisé en prévention. En effet, une étude conduite sur 563 sujets dépressifs indique que la proportion de patients présentant un risque suicidaire est de 2,1 % pour le placebo contre 4 % pour des sujets recevant d'autres antidépresseurs et de 0,4 % pour les sujets traités avec le Lévomilnacipran.

II.2.1.4 Diminution du risque cardio-vasculaire

L'altération du rythme cardiaque a été évaluée par administration d'une dose unique par voie orale chez le chien.²³ Alors que le (±)-Milnacipran induit une légère augmentation du rythme cardiaque, le Lévomilnacipran n'a que très peu d'effet. Le Lévomilnacipran entraîne également une augmentation moins forte de la pression artérielle que le mélange racémique. Ces différences témoignent d'une meilleure tolérance cardiovasculaire de l'énantiomère étudié.

II.2.2 Synthèses énantiosélectives du Lévomilnacipran

La première voie d'accès au Lévomilnacipran remonte à 1985 avec la séparation par HPLC sur phase chirale des deux isomères du Milnacipran.³⁸ Cette méthode présente deux inconvénients majeurs. Tout d'abord, elle conduit à une perte d'au moins 50 % du produit (mauvais énantiomère). Ensuite la séparation par HPLC n'est exploitable qu'à l'échelle du laboratoire mais plus difficilement industriellement. Le développement de voies de synthèse énantiosélectives reste donc souhaitable afin de contourner ces limitations.

II.2.2.1 Accès à la (1S,2R) (-)-lactone II.1' optiquement active

Il n'existe que deux synthèses énantiosélectives du Lévomilnacipran. Ces synthèses impliquent comme intermédiaire clef, la lactone **II.1'** optiquement active dont il existait déjà des méthodes de préparation par dédoublement du racémique. Par exemple, l'équipe de Furstoss a développé une hydrolyse biocatalysée de la lactone **II.1** impliquant une enzyme du champignon *Cunninghamella blakesleeana* DSM 1906. Cette enzyme est capable d'hydrolyser sélectivement la

³⁵ Gunnell, D.; Saperia, J.; Ashby, D. *Brit.Med. J.* **2005**, *330*, 385-330.

³⁶ Avedisova, A.; Borodin, V.; Zakharova, K.; Aldushin, A. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **2009**, *5*, 415-420.

³⁷ Mansuy, M. EP2288347 (A1).

³⁸ Bonnaud, B.; Calmel, F.; Patoiseau, J. F.; N'guyen, N.; Cousse, H. *Journal of Chromatography A* **1985**, *318*, 398-403.

(+)-lactone **II.1''** en n'altérant pas l'énantiomère (-). Cette méthode permet de produire la (-)-lactone **II.1'** avec un rendement de 32 % et un ee de 99 % (Schéma 15).³⁹

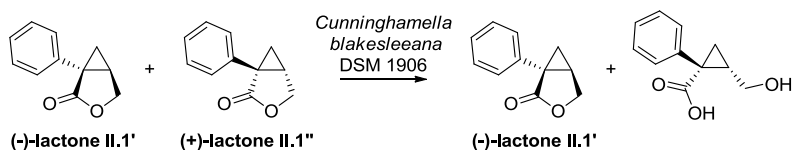


Schéma 15 : Dédoublage de la lactone **II.1** par voie enzymatique.

La même année, l'équipe de Poloński a publié une synthèse de la (+)-lactone **II.1''** en quatre étapes dont une impliquant le dédoublage d'un cyclopropane racémique (Schéma 16). L'anhydride cyclopropanoïque (**II.7**) de départ est transformé en acide-ester (**II.8**) avec un rendement de 74 %. L'acide racémique (**II.8**) est ensuite engagé dans une réaction de salification de la (1*S*,2*R*)-(+)-éphédrine avant précipitation d'un des deux diastéréomères sous forme de sel. L'acide carboxylique **II.8''** du produit optiquement actif est ensuite réduit, puis l'alcool intermédiaire (**II.9**) est cyclisé par transestérification intramoléculaire pour conduire à la (+)-lactone **II.1''**.⁴⁰

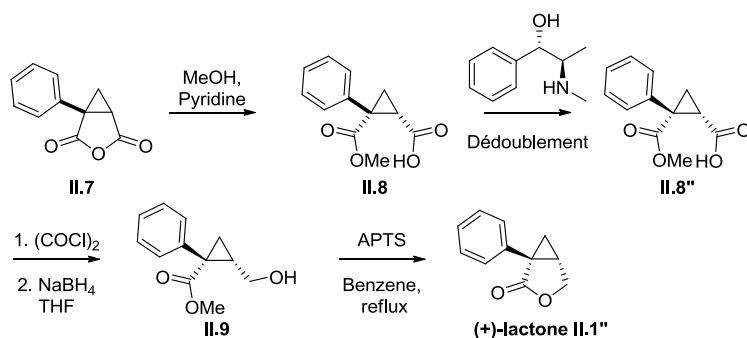


Schéma 16 : Dédoublage de la lactone par dédoublage.

Finalement, en 2000, l'équipe de Ronsisvalle publie un dédoublage en deux étapes.⁴¹ En partant de la lactone **II.1** racémique, en présence de (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine, ils ont obtenu un mélange d'amides diastéréomères qui ont été séparés par colonne de chromatographie. Après isolement du diastéréoisomère désiré, l'amide est hydrolysé avant de former la lactone **II.1'** en milieu acide. Cette technique permet d'isoler la lactone avec un rendement global de 33 % (Schéma 17).

³⁹ Viazzo, P.; Alphan, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 26, 4519-4522.

⁴⁰ Milewska, M. J.; Gdaniec, M.; Poloński, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 11, 3169-3180.

⁴¹ Ronsisvalle, G.; Marrazzo, A.; Prezzavento, O.; Pasquinucci, L.; Falcucci, B.; Di Toro, R.; Spampinato, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 1503-1513.

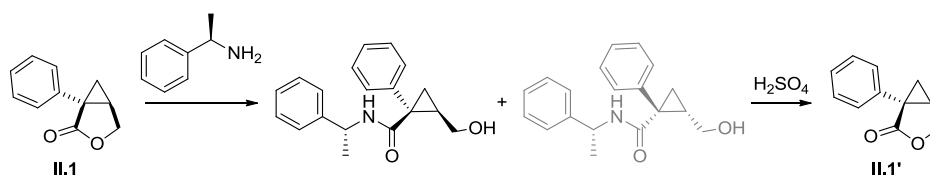


Schéma 17 : Résolution de la lactone par dédoublement chimique.

II.2.3 Synthèses énantiosélectives du (1*S*,2*R*)-Milnacipran

Comme déjà évoqué ci-dessus, il existe à ce jour deux synthèses énantiosélectives du (1*S*,2*R*)-Milnacipran. Ces deux synthèses reposent sur une étape clef de construction asymétrique de la (-)-lactone **II.1'** intermédiaire.

II.2.3.1 Approche de Shuto

Dans leur approche, Shuto et son équipe ont réalisé la synthèse énantiosélective de la lactone **II.1'** en s'inspirant de leur synthèse déjà publiée en version racémique (phénylacétonitrile + épichlorohydrine). Les auteurs se sont tout d'abord intéressés à la question de la régiosélectivité de l'attaque de l'anion du phénylacétonitrile sur l'épichlorohydrine optiquement active.⁴² Dans le chemin *a*, l'hypothèse émise est que la substitution nucléophile se fera sur l'époxyde de façon à former transitoirement une chlorohydrine qui se refermera ensuite en époxyde pour conduire finalement à la (-)-lactone **II.1'**. Dans le chemin *b*, le chlore est considéré comme meilleur groupe partant, dans ce cas la stéréochimie de l'époxyde ne change pas ce qui conduit à la (+)-lactone **II.1''**. De fait, l'absence de régiosélectivité de cette réaction entrainerait irréversiblement une chute de l'excès énantiomérique de la lactone produite (Schéma 18).

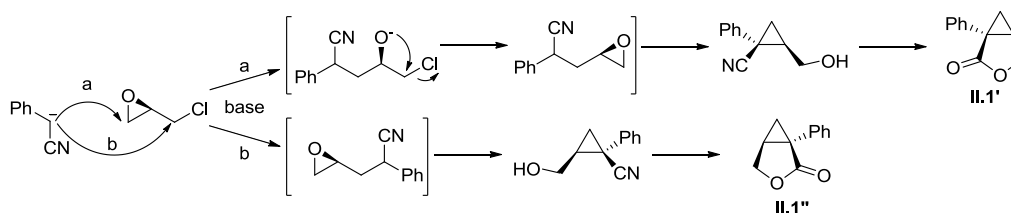


Schéma 18 : Attaques possibles du carbanion du benzonitrile sur l'épichlorohydrine.

En partant de la (*R*)-épichlorohydrine optiquement pure, dans les conditions opératoires utilisées, la (-)-lactone **II.1'** est obtenue avec un ee de 96 %. La substitution nucléophile de l'épichlorohydrine se fait donc majoritairement sur l'époxyde *via* le chemin *a*. On remarque tout de même une légère érosion de l'ee qui implique qu'environ 2% des substitutions se font sur le carbone portant le chlore. Une fois la lactone chirale obtenue, la synthèse est terminée comme dans la version racémique par ouverture de la lactone avec de l'amidure de diéthyle lithium, bromation de l'alcool

⁴² Shuto, S.; Ono, S.; Hase, Y.; Kamiyama, N.; Matsuda, A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 641-644.

primaire et substitution du brome par un azoture. L'azoture est finalement réduit en amine par hydrogénation catalytique pour conduire au Lévomilnacipran avec un ee de 96 % (Schéma 19).

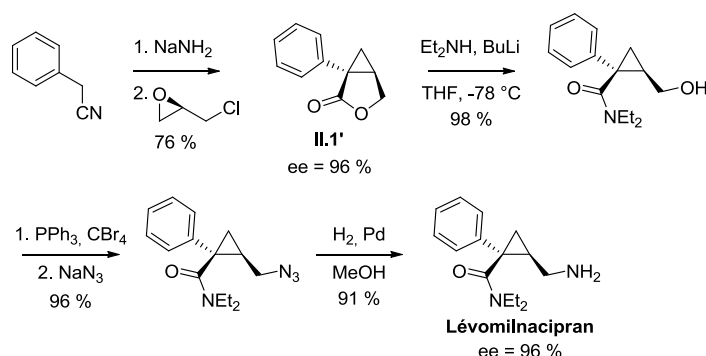


Schéma 19 : Première synthèse énantiosélective, approche selon Shuto.

II.2.3.2 Approche de Doyle

La deuxième synthèse énantiosélective du Lévomilnacipran repose sur la formation de la (-)-lactone **II.1'** *via* une étape de catalyse organométallique au rhodium(II). Dans un premier temps, le précurseur diazo **II.10** est préparé en deux étapes. Le chlorure de phénylacétylène est d'abord estérifié par l'alcool allylique puis le diazo est introduit sur la position benzylique en utilisant l'ABSAs et la DBU.⁴³

La lactone est ensuite préparée en une seule étape par cyclopropanation intramoléculaire. Cette réaction, catalysée au rhodium permet la création simultanée des deux centres stéréogènes, tout en contrôlant leur stéréochimie relative puisque seul le cyclopropane *cis* peut être formé au cours de cette étape. Cette stéréosélectivité est due à l'encombrement stérique que crée le ligand (Schéma 20) autour du rhodium. La lactone est isolée avec un ee de 68 %.

Doyle termine la synthèse du Lévomilnacipran en reprenant les mêmes transformations que celles développées par Shuto.

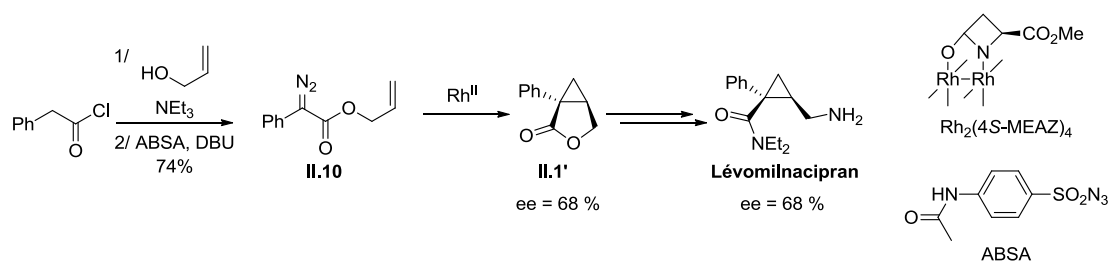


Schéma 20 : Synthèse énantiosélective selon Doyle.

⁴³ Doyle, M. P.; Hu, W. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 299-302.

Bien qu'innovante, cette synthèse nécessite la préparation du dérivé diazo précurseur de la lactone. Ces composés sont généralement instables et difficiles à manipuler à grande échelle. De plus, l'information stéréogénique du catalyseur n'est que partiellement transférée à la lactone. En effet, les catalyseurs utilisés sont optiquement purs alors que la lactone **II.1'** ne présente un excès énantiomérique que de 68 %.

Les deux synthèses énantiosélectives déjà décrites dans la littérature du Lévomilnacipran ont pour cible la (-)-lactone **II.1'**. Dans ce chapitre, nous nous proposons de développer une nouvelle approche pour la construction énantiosélective de cette lactone clef, intermédiaire de la synthèse du Lévomilnacipran.

II.3 Objectif des travaux de thèse

Nous avons travaillé sur la mise au point d'une nouvelle voie de synthèse énantiosélective du Lévomilnacipran en partant de l'acide phénylacétique. Notre cible est la lactone **II.1'** optiquement active dont on sait qu'elle pourra être transformée en Lévomilnacipran sans perte de l'information chirale.

Une analyse rétrosynthétique est illustrée dans le Schéma 21. L'information chirale sera introduite dès la première étape de la synthèse en utilisant une méthodologie récente développée par Zakarian pour former l'acide (2*S*)-phénylpent-4-énoïque. Cet acide pourrait être facilement converti en *cis*- γ -lactone (**II.12**) par iodolactonisation, puis en époxyde (**II.13**) par méthanolyse de la iodolactone **II.12**. La (-)-lactone **II.1'** serait enfin obtenue par substitution nucléophile intramoléculaire de l'époxyde par l'anion en α de l'ester méthylique pour former le cyclopropane **II.2'**, suivi par une lactonisation. Dans cette voie, lors de l'étape de iodolactonisation, il y a création d'un second centre chiral (en rouge) qui portera l'information indispensable à la réussite de notre approche.

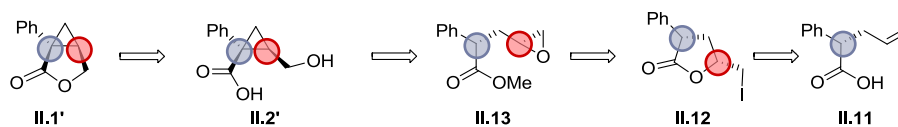


Schéma 21 : Rétrosynthèse de la (-)-lactone **II.1'**.

II.4 Synthèse énantiosélective du Lévomilnacipran

II.4.1 Accès à la (-)-lactone II.1'

Dans un premier temps, nous avons optimisé les différentes étapes de la synthèse de la lactone **II.1** en série racémique afin d'obtenir également des échantillons de référence de chaque intermédiaire pour des analyses en HPLC chirale. Les meilleures conditions trouvées ont ensuite été appliquées à la synthèse énantiosélective afin de vérifier que l'excès énantiomérique était conservé tout au long de la synthèse. Dans cette partie, seules les synthèses énantiosélectives sont détaillées.

II.4.1.1 Introduction de la chiralité

Le centre chiral a été introduit lors de la première étape de la synthèse en utilisant une méthodologie récemment développée par Zakarian.⁴⁴ Cette approche repose sur l'alkylation énantiosélective de l'acide phénylacétique en position α en utilisant un amidure de lithium chiral comme ligand stéréo-directeur (Schéma 22).

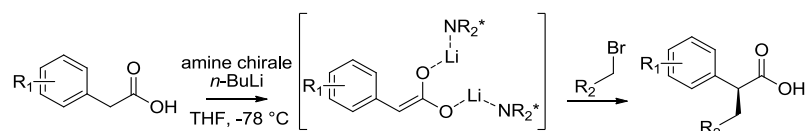


Schéma 22 : Mécanisme proposé par Zakarian pour expliquer l'énantiosélectivité de la réaction.

Dans cette méthodologie, les auteurs ont testé plusieurs diamines possédant des axes de symétrie C₂. Ils ont retenu l'amine de Koga (**II.14**, Figure 15) comme étant le ligand qui permettait d'obtenir le meilleur excès énantiomérique.⁴⁵

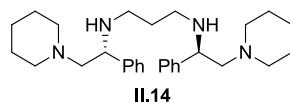


Figure 15 : Amine de Koga (**II.14**).

Dans un premier temps, nous avons synthétisé l'amine **II.14** en trois étapes en partant du (*R*)-phényloxirane (Schéma 23). L'ouverture de l'époxyde par la piperidine conduit à la formation d'un mélange d'alcools qui résulte d'une addition non-régiosélective. Ce manque de régiosélectivité au cours de cette étape n'est pas pénalisant puisque le mélange d'alcools est ensuite mésylé avant de faire l'objet d'une substitution intramoléculaire par la pipéridine pour former un unique aziridinium. Ce dernier est ensuite substitué par du 1,3-diaminopropane pour conduire à l'amine de Koga (**II.14**) optiquement pure avec un rendement global de 63 % après recristallisation. Le pouvoir rotatoire du produit synthétisé ($[\alpha]_D^{20} = -111.6$ (c 0,56 ; CHCl₃)) est très proche de celui décrit dans la littérature ($[\alpha]_D^{20} = -112$ (c 5,45 ; CHCl₃)).⁴⁵ La méthodologie développée par Zakarian permet le recyclage de cette amine à la fin de la réaction.

⁴⁴ Stivala, C. E.; Zakarian, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11936-11939.

⁴⁵ Fritzzle, M.; Caille, S.; Marshall, T. L.; McRae, K.; Nadeau, K.; Guo, G.; Wu, S.; Martinelli, M. J.; Moniz, G. A. *Org. Process. Res. Dev.* **2007**, *11*, 215-222.

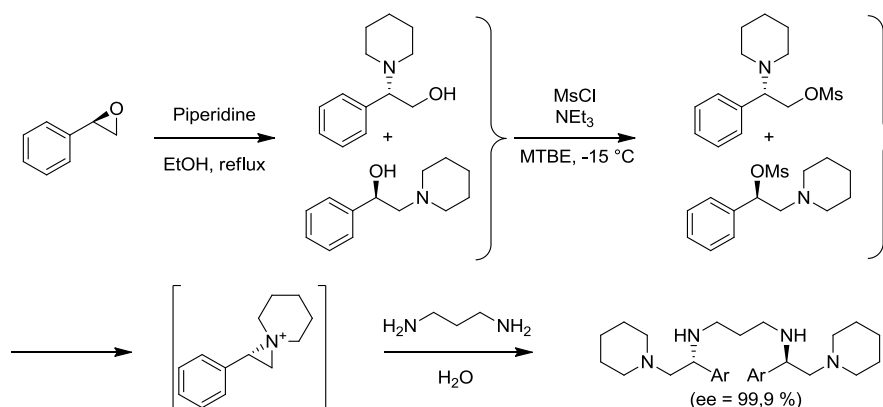


Schéma 23 : Mécanisme proposé pour expliquer l'énantiosélectivité de la réaction.

Nous avons ensuite utilisé cette diamine comme inducteur chiral dans la réaction d'alkylation énantiosélective de l'acide phénylacétique par le bromure d'allyle. Nous avons obtenu des rendements et des excès énantiomériques proches de ceux rapportés dans la publication de Zakarian puisque l'acide (2*S*)-phénylpent-4-énoïque **II.11** a été obtenu avec un rendement de 83 % et un ee de 88 % déterminé par HPLC chirale (Litt : rendement = 84 % et ee = 93 %) (Schéma 24).

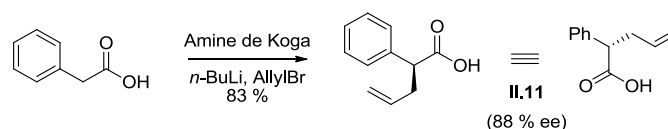


Schéma 24 : Synthèse de l'acide (2*S*)-phénylpent-4-énoïque.

Pour expliquer la stéréosélectivité de cette réaction, les auteurs ont proposés le modèle illustré dans le Schéma 25. Ce modèle a été suggéré sur la base de calculs de DFT, d'analyses RMN de l'azote 15 et du carbone 13, et par la caractérisation aux rayons X de la structure cristalline de complexes intermédiaires. L'état de transition proposé pour cette synthèse est donc un complexe comportant quatre atomes de lithiums coordonnés au ligand chiral (tétramine) et à l'énolate. Cette coordination encombre stériquement un côté de l'énolate rendant la substitution nucléophile possible uniquement sur la face la plus dégagée.⁴⁶

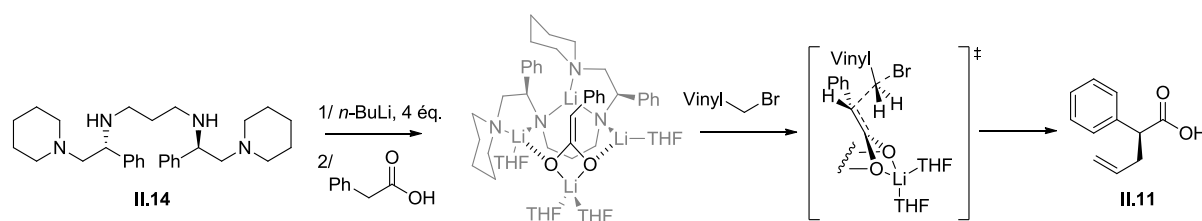


Schéma 25 : Modèle permettant d'expliquer la stéréosélectivité de la réaction d' α -alkylation.

⁴⁶ Ma, Y.; Stivala, C. E.; Wright, A. M.; Hayton, T.; Liang, J.; Karesztes, I.; Lobkovsky, E.; Collum, D.B.; Zakarian, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, DOI: 10.1021/ja403076u.

II.4.1.2 Iodolactonisation

La deuxième étape de la synthèse est la formation de la *cis*- γ -iodolactone (**II.12**). Le mécanisme de cette réaction passe par la formation initiale d'un iodonium transitoire suivi de son ouverture par le groupement carboxylate (Schéma 26). Cette cyclisation conduit à un mélange de deux lactones *cis* (**II.12**) et *trans* (**II.15**), dont nous avons essayé d'optimiser la sélectivité *cis*.

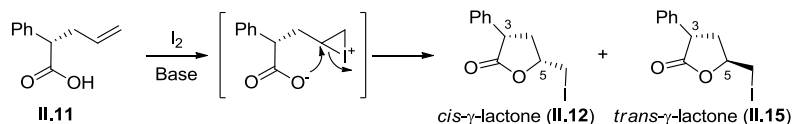


Schéma 26 : Mécanisme proposé pour la iodolactonisation.

Afin d'améliorer la sélectivité *cis/trans* de cette réaction, nous avons testé différentes conditions dans le THF (Tableau 7). Tout d'abord nous avons réalisé la iodolactonisation en absence de base.⁴⁷ Malgré l'utilisation de 3 équivalents de diiode, nous n'avons pas obtenu de rendements satisfaisants puisque la réaction s'arrête à 65 % de conversion (entrée 1). Nous avons ensuite testé l'ajout d'une base sous la forme d'une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium (entrées 2 et 3).^{48,49} Nous obtenons ici une conversion totale mais le ratio *cis/trans* de la iodolactone n'est pas très bon (65/35) et ce quelque soit la température de réaction. Nous avons alors testé le carbonate de potassium en suspension. Dans ces conditions, la conversion est également totale, et la sélectivité améliorée (Entrée 4). Les deux iodolactones diastéréoisomères pouvant être facilement séparées par colonne de chromatographie, nous n'avons pas cherché à optimiser davantage cette réaction.

Tableau 7 : Optimisation de la réaction de iodolactonisation

Entrée	T	Base	Temps	Cis/trans	Conversion
1	20 °C	-	5 h	68/32	65 %
2	20 °C	Na ₂ CO ₃ sat	5 h	65/35	100 %
3	0 °C	Na ₂ CO ₃ sat	5 h	65/35	100 %
4	0–20 °C	K ₂ CO ₃	5 h	70/30	100 %

Finalement, la *cis*- γ -lactone **II.12** a été isolée pure avec un rendement de 65 %, et un ee de 88 %. L'excès énantiomérique de l'acide phénylacétique substitué de départ **II.11** a été conservé au cours de cette transformation. La formation de cette lactone *cis* (**II.12**) a permis de transférer la chiralité du centre benzylique C3 vers le nouveau centre créé C5.

Afin d'essayer d'expliquer cette sélectivité en faveur de la iodolactone *cis*, nous proposons le modèle du Schéma 26 bis. Dans ce modèle, l'acide **II.11** peut prendre deux conformations possibles. Dans la voie A, les répulsions stériques entre les deux atomes d'hydrogènes sont minimisées par

⁴⁷ Gonzalez, F. B.; Bartlett, P. A. *Org. Synth.* **1990**, *7*, 164-168.

⁴⁸ Ding, Z.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 885-889.

⁴⁹ Chamberlin, A. R.; Dezube, M.; Dussault, P.; McMills, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5819-5825.

rapport à la voie B où l'atome d'hydrogène est face à un groupement phényle. Dans ces conditions, l'acide carboxylique se positionne sur la face inférieure de la molécule. Lors de la formation de l'iodonium sur la face supérieure, celui-ci est plus rapidement ouvert que s'il se formait sur l'autre face (modèle cinétique) favorisant ainsi la formation de la lactone *cis*.

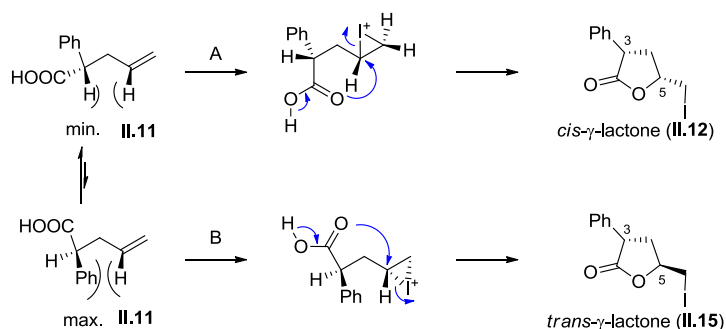


Schéma 26 bis : Sélectivité *cis/trans* lors de la iodolactonisation.

Dans les conditions utilisées pour cette réaction, nous n'avons jamais observé la formation du cycle à 6 chaînons car selon les règles de Baldwin, la transformation 5-*exo-tet* est favorisée alors que la 6-*endo-tet* est ne l'est pas (Schéma 27).

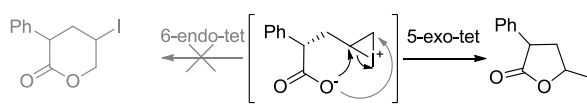


Schéma 27 : Sélectivité cycle à 5 – cycle à 6 chaînons lors de la iodolactonisation.

Une fois la iodolactone *cis* (II.12) optiquement active obtenue, nous avons cherché à l'ouvrir avec différents nucléophiles afin d'accéder à l'époxyde précurseur du cyclopropane.

II.4.1.3 Epoxydation

Dans une première approche, nous avons ouvert la iodolactone II.12 avec de la diéthylamine en présence d'un acide de Lewis (AlMe_3) dans le but d'installer directement la fonction amide du Lévomilnacipran (Schéma 28). L'amidation de la lactone conduit à la formation d'une halohydrine transitoire (II.16) qui est époxydée en conditions basiques. Il nous restait alors à induire une réaction de cyclopropanation par ouverture intramolécule de l'époxyde (II.17). Différentes conditions ont été testées pour abstraire le proton en α de l'amide. Cependant, la réaction de cyclopropanation n'a jamais été effective malgré l'utilisation de plusieurs bases fortes (LDA, NaH , $t\text{BuOK}$).

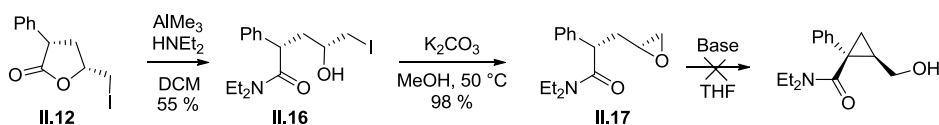


Schéma 28 : Aminolyse de la iodolactone.

Nous avons alors changé les conditions d'ouverture de la iodolactone en induisant une méthanolyse basique qui conduit à une halohydrine intermédiaire dont la fermeture génère l'époxyde (**II.13**) correspondant (Schéma 29).

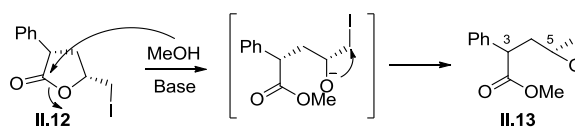


Schéma 29 : Mécanisme proposé pour la formation de l'époxyde.

L'utilisation de carbonate de sodium dans le méthanol permet d'avoir une réaction propre et rapide (Schéma 29).⁵⁰ Cependant, les conditions basiques d'ouverture de la lactone conduisent à une épimérisation totale du centre stéréogène 3 en α de l'ester. Cette épimérisation ne compromet pas la suite de la synthèse car l'étape clef de cyclopropanation va se faire selon une réaction de type S_N2 sur le centre « époxyde » qui porte l'information chirale.

L'époxyde (**II.13**) est ainsi isolé sous la forme d'un mélange équimolaire des deux diastéréoisomères avec un rendement de 98 %. Nous n'avons donc pas pu confirmer sur cet échantillon que la stéréochimie de l'époxyde était fixée. Nous avons cependant continué la synthèse du Lévomilnacipran et vérifié la pureté optique à l'étape suivante.

II.4.1.4 Obtention de la (-)-lactone II.1'

La quatrième étape de notre synthèse est une étape clef de notre approche puisqu'elle consiste à construire le motif cyclopropane du Lévomilnacipran.

En utilisant une base forte, nous avons déprotoné la position benzylique. L'anion ainsi formé est venu ouvrir l'époxyde pour former deux cyclopropanes *cis/trans* (**II.2'**/**II.3'**). En conditions acides, le cyclopropane *cis* **II.2'** a cyclisé de façon intramoléculaire pour donner la lactone désirée **II.1'** (Schéma 30).

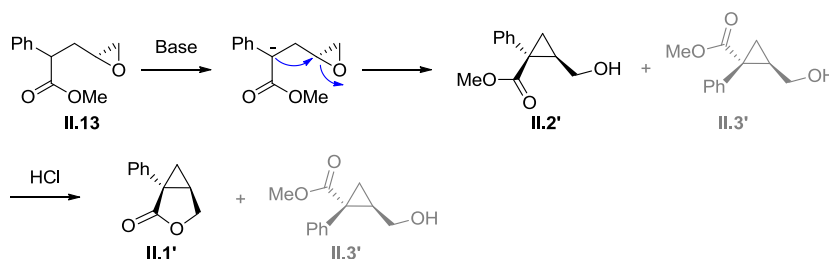


Schéma 30 : Mécanisme proposé pour la cyclopropanation/lactonisation.

⁵⁰ Bartlett, P. A.; Myerson, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3950-3952.

Afin d'optimiser au mieux cette réaction, nous avons fait varier plusieurs paramètres (base, température, solvant). À la fin de chaque réaction, le milieu réactionnel a été traité avec de l'acide chlorhydrique gazeux pour convertir le cyclopropane *cis* en lactone **II.1'**. Nous avons déterminé le rapport *cis/trans* par RMN du proton en intégrant les signaux caractéristiques de la lactone **II.1'** et ceux du cyclopropane *trans* (**II.3'**). Les résultats principaux de cette étude sont résumés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Optimisation de la réaction de lactonisation.

Entrée	Solvant	Base	T. (°C)	<i>cis/trans</i>
1	DMSO	Dimsyl sodium	20	50/50
2	DMSO	Dimsyl potassium	20	28/72
3	DMSO	DBU	60	NR
4	THF	KHMDS	20	0/100
5	THF	LDA	20	30/70
6	THF	LDA	80	45/55
7	THF/HMPA 9/1	LDA	80	55/45
8	1,4-dioxane/HMPA 9/1	LDA	100	70/30

Nous avons commencé cette optimisation en partant de conditions assez classiques, à savoir une base forte (dim syl sodium) dans un solvant dissociant, le DMSO. Dans ces conditions, nous n'avons obtenu aucune sélectivité entre la lactone **II.1'** et le cyclopropane *trans* (**II.3'**) (entrée 1). Lorsque la base est changée pour du dim syl potassium (contre ion plus chélatant, entrée 2) une sélectivité en faveur de l'isomère *trans* est observée. Aucune cyclopropanation n'est observée avec une base plus faible telle que DBU (entrée 3). Bien que nous ayons testé d'autres conditions de réactions dans le DMSO (ajout d'un co-solvant, température), nous n'avons jamais réussi à obtenir mieux qu'un rapport *cis/trans* de 50/50.

Nous avons ensuite changé de solvant et de base (KHMDS dans le THF). Lorsque la réaction est conduite à température ambiante, le cyclopropane *trans* (**II.3'**) est l'unique produit que nous avons isolé (entrée 4). Nous avons alors testé une base avec un contre ion plus petit et moins chélatant (LDA dans le THF). Cette fois, le cyclopropane *cis* a été obtenu comme produit minoritaire (entrée 5). En réalisant la réaction au reflux du THF, une bien meilleure sélectivité a été obtenue (entrée 6). L'utilisation d'un co-solvant dissociant (mélange THF/HMPA 9/1) permet d'améliorer la sélectivité en faveur de l'isomère *cis* par rapport au THF seul (entrées 6 et 7).

Il semble donc que l'utilisation d'un milieu dissociant et chaud favorise la formation du cyclopropane *cis* (**II.2**) par rapport au cyclopropane *trans* (**II.3**). À ce stade, nous étions limités par la température d'ébullition du THF. Nous avons donc choisi d'utiliser un éther qui aurait un point d'ébullition plus haut et avons retenu le 1,4-dioxane comme solvant. Nous avons effectivement observé qu'au reflux du 1,4-dioxane, la sélectivité *cis/trans* était la meilleure (1/0,4, entrée 8).

Au cours de cette optimisation, nous nous sommes aperçu que pour favoriser la formation du cyclopropane *cis* (**II.2**) par rapport au cyclopropane *trans* (**II.3**), il nous fallait être dans des conditions très dissociantes. Pour essayer d'expliquer le rôle du co-solvant, nous proposons un modèle qui est illustré dans le Schéma 31.

Dans des conditions non dissociantes (LDA dans le THF) une sélectivité en faveur du cyclopropane *trans* (**II.3**) est observée. Cette sélectivité pourrait s'expliquer par une chélation de l'oxygène de l'époxyde et de l'ester par le lithium qui induit une déprotonation orientée, conduisant à un énolate *Z* (Schéma 30, voie B). Ce dernier peut adopter deux conformations en équilibre dont la plus stable conduira préférentiellement au cyclopropane *trans* (**II.3**).

D'autre part, dans des conditions très dissociantes (ajout de HMPA), il n'y a plus de chélation de l'époxyde et de l'ester par le lithium (Schéma 30, voie A). L'énolate obtenu est alors *E*. L'étape de cyclopropanation est ici aussi gouvernée par la conformation préférentielle adoptée par l'énolate. La conformation plus stable conduit au cyclopropane *cis* (**II.2**).

L'obtention du cyclopropane *cis* (**II.2**) ou *trans* (**II.3**) serait donc directement reliée à la formation de l'énolate correspondant.

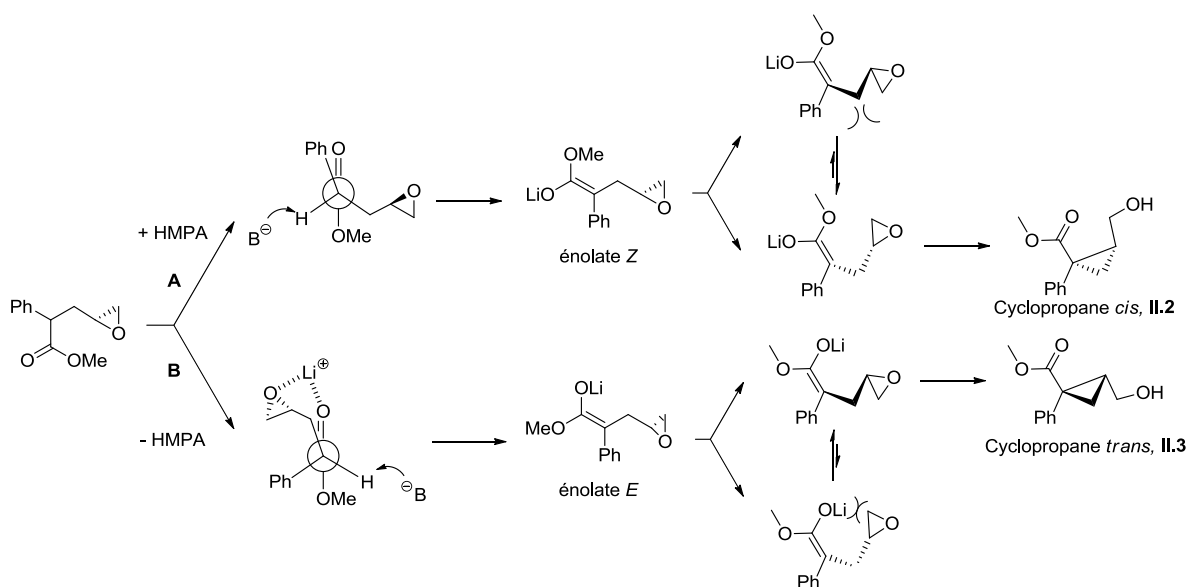


Schéma 31 : Modèle proposé permettant d'expliquer la sélectivité de la réaction en milieu dissociant (+HMPA) ou non-dissociant (-HMPA).

Les meilleures conditions trouvées dans cette étude (entrée 12), ont ensuite été appliquées à une réaction sur 200 mg d'époxyde départ (**II.13**) et la (-)-lactone **II.1'** a été isolée avec un rendement de 55 % pour les deux étapes (Schéma 32). L'excès énantiomérique, qui n'avait pas pu être mesuré à l'étape précédente, a cette fois pu être évalué à 88 % par HPLC chirale. Cette lactone **II.1'** a donc le même excès énantiomérique que l'acide (2*S*)-phénylpent-4-énoïque (**II.11**) obtenu lors de la première étape de cette synthèse.

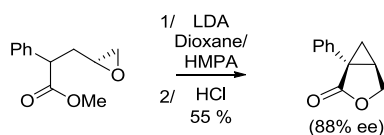


Schéma 32 : Quatrième étape, synthèse de la (-)-lactone clef II.1'.

À ce stade du travail, nous avons réalisé une synthèse formelle du Lévomilnacipran puisque la lactone **II.1'**, dont les centres stéréogènes sont fixés de façon irréversible, est l'intermédiaire clef des synthèses déjà connues de l'antidépresseur.^{42,43,51} Nous avons néanmoins terminé la synthèse selon la procédure mise en place industriellement pour la synthèse du Milnacipran dans sa version racémique.

II.4.2 De la (-)-lactone II.1' au Lévomilnacipran

Dans un premier temps, la lactone **II.1'** a été ouverte par la diéthylamine en présence du trichloroaluminium qui joue le rôle d'acide de Lewis (activateur). L'amide (**II.18**) correspondant a été isolé avec un rendement de 90 %. La fin de la synthèse consistant à remplacer l'alcool par une fonction amine, cette dernière a été introduite en activant l'alcool par du chlorure de thionyle. Le dérivé chloré obtenu (**II.19**) a ensuite été substitué par du phtalimide de potassium. Une déprotection de l'amine par de l'éthanolamine nous a finalement permis d'isoler le Lévomilnacipran avec 89% de rendement (Schéma 33).⁵²

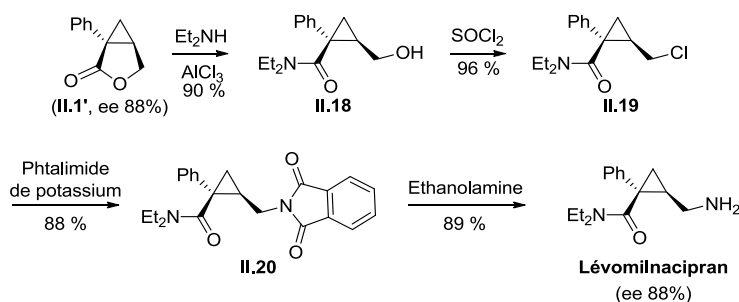


Schéma 33 : Fin de la synthèse du Lévomilnacipran.

Afin de mesurer l'excès énantiomérique du Lévomilnacipran, ce dernier a été dérivatisé en *N*-acétyl-Lévomilnacipran (**II.21**) pour faciliter la séparation des deux énantiomères sur colonne chirale d'HPLC (Schéma 34). L'excès énantiomérique du dérivé acétylé a été mesuré à 88 %, par HPLC chirale, ce qui indique que le Lévomilnacipran a également un ee de 88 %.

⁵¹ Roggen, H.; Kehler, J.; Stensbol, T. B.; Hansen, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2834-2837.

⁵² Diard, C.; Hellier, P.; Nicolas, M.; Subra, L. FR2941454, **2010**.

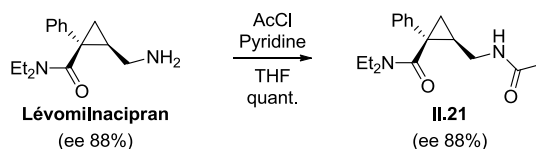


Schéma 34 : Dérivatisation du Lévomilnacipran.

Afin de comparer la valeur du pouvoir rotatoire du Lévomilnacipran (-88.3 (c 1.0, CHCl_3), forme basique), avec la littérature, nous l'avons dérivé sous sa forme chlorhydrate. Dans ce cas, son pouvoir rotatoire devient positif ($+71.9$ (c 0.70 ; CHCl_3), forme acide ; (lit.,⁴² $[\alpha]_D^{20} +72.8$ (c 0.95 ; CHCl_3), 96 % ee)).

II.5 Conclusion

Nous avons développé dans ce projet une nouvelle voie d'accès énantiosélective au Lévomilnacipran. Cette synthèse *de novo* commence par l'alkylation asymétrique de l'acide phénylacétique en utilisant la tétramine de Koga comme inducteur chiral (Schéma 35). L'acide (2*S*)-phénylpent-4-énoïque obtenu (**II.11**) avec un ee de 88% est ensuite transformé en *cis*- γ -iodolactone (**II.12**) qui nous a servi de relais de chiralité avant la formation de l'époxyde (**II.13**) précurseur du cyclopropane. Une mise au point des conditions de cyclopropanation nous a permis d'obtenir sélectivement la (-)-cyclopropyl-lactone (**II.1'**) qui a été isolée avec un excès énantiomérique de 88%. La synthèse a finalement été achevée selon une séquence décrite dans un des brevets des Laboratoires Pierre Fabre. Le Lévomilnacipran a été synthétisé en 9 étapes avec un rendement global de 32 % et un ee conservé de 88%.

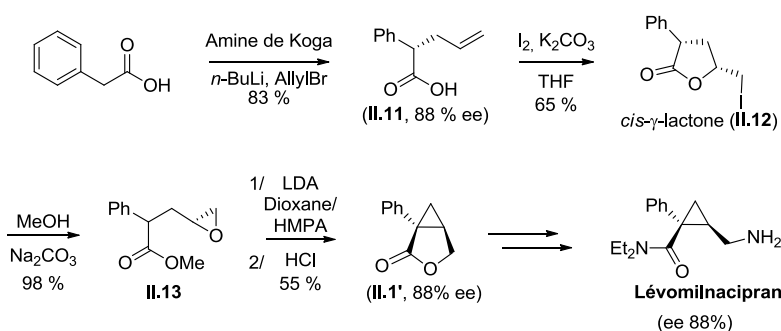


Schéma 35 : Synthèse énantiosélective du Lévomilnacipran.

Chapitre III

Synthèse

énantiosélective de

1,4-benzodioxanes

Le motif 1,4-benzodioxane est un motif que l'on retrouve dans de nombreux composés naturels mais également dans certains principes actifs pharmaceutiques. Après une description des composés pharmacologiquement actifs, nous aborderons les voies de synthèses les plus couramment utilisées pour y accéder.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à la mise en place d'une voie de synthèse énantiosélective d'un dérivé de benzodioxane en cours de développement par les Laboratoires Pierre Fabre. Ce nouveau composé F17807 est une molécule antipsychotique (Schizophrénie) qui a pour cible les récepteurs α_2 .

III.1 Introduction

III.1.1 Le motif 1,4-benzodioxane en chimie médicinale

III.1.1.1 Agents antihypertenseurs

Campbell a synthétisé une série de composés dérivés de 1,4-benzodioxane ayant des K_i (concentration inhibant 50 % de l'activité d'une enzyme) de l'ordre du nanomolaire pour les récepteurs adrénergétiques α_1 . Ces composés sont très sélectifs de leurs cibles et présentent des propriétés antihypertensives sur le rat.⁵³ De cette série, un composé (le sel de l'acide méthane sulfonique de Doxazosine, Figure 16) a été commercialisé aux Etats-Unis comme inhibiteur des récepteurs adrénergétiques α_1 . Il est utilisé comme antihypertenseur en favorisant la dilatation des vaisseaux sanguins. Dans le même domaine, l'énantiomère *S* du composé WB4101, synthétisé pour la première fois en 1965, montre une très forte affinité (nM) pour ces mêmes récepteurs (Figure 16).⁵⁴

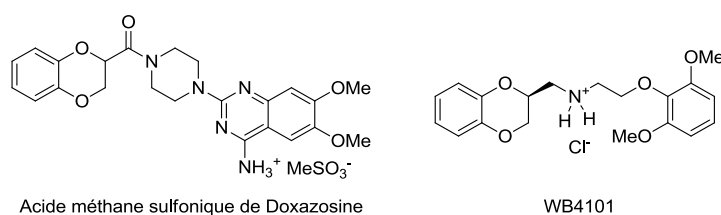


Figure 16 : Structures de composés antihypertenseurs comportant le motif 1,4-benzodioxane.

III.1.1.2 Agents antidépresseurs

La dépression se caractérise par une diminution de la concentration synaptique en neurotransmetteurs (sérotonine et noradrénaline). L'inhibition des récepteurs adrénergiques α_2 favorise la libération de sérotonine et de noradrénaline ce qui en fait des cibles parfaites pour traiter la dépression. En les bloquant il devrait donc être possible de favoriser la libération des

⁵³ Campbell, S. F.; Davey, M. J.; Hardstone, J. D.; Lewis, B. N.; Palmer, M. J. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 49-57.

⁵⁴ Fenton, H.; Green, P. N.; Shapero, M.; Wilson, C. *Nature* **1965**, *206*, 725-726.

neurotransmetteurs.⁵⁵ C'est dans ce but qu'ont été synthétisés les benzodioxinopyrroles illustrés dans la Figure 17.⁵⁶ Malgré des activités antidépressives avérées ces produits n'ont jamais été mis sur le marché.

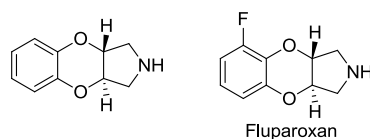


Figure 17 : Structures d'antidépresseurs comportant le motif 1,4-benzodioxane.

III.1.1.3 Propriétés anti-inflammatoires

Certains dérivés de 1,4-benzodioxane ont montré une activité inhibitrice *in vitro* sur la 5-lipoxygénase (5-LO). Cette enzyme est une cible potentielle pour le traitement de certaines maladies inflammatoires telles que l'asthme. L'activité *in vitro* augmente rapidement avec la présence d'un substituant phénoxy ou *p*-fluorophénoxy (R^1) sur la partie aromatique (Figure 18). Par exemple, le composé ($R^1 = p$ -fluorophénoxy) a un IC_{50} de 98 nM. Lorsque ce composé a été testé sur le chien à une dose de 1 mg/kg, les auteurs ont observé une action anti-inflammatoire pendant environ 8 h. L'énantiomère 2*S* est responsable de l'activité *in vitro* observée et de la durée d'action du principe actif.⁵⁷

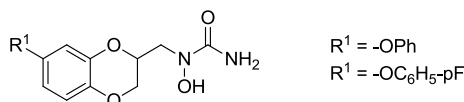


Figure 18 : Structures d'anti-inflammatoires comportant le motif 1,4-benzodioxane.

III.1.2 Méthodes de synthèses

La première synthèse de benzodioxane remonte au XIX^{ème} siècle lorsque Charles Moureu, a étudié la réaction de dégradation thermique de l'orthoxy-phénoxy-acétal **III.1** (Schéma 36). Pour cela, il a utilisé le sel mono-sodique du pyrocatechol comme nucléophile qu'il a fait réagir sur la chloroacétone. L'orthoxy-phénoxy-acétone **III.2** a ensuite été transformée en acétal **III.1** en présence d'orthoformiate d'éthyle qui se réarrange spontanément en 1,4-benzodioxane. Moureu décrit ainsi la première synthèse de 1,4-benzodioxanes.⁵⁸

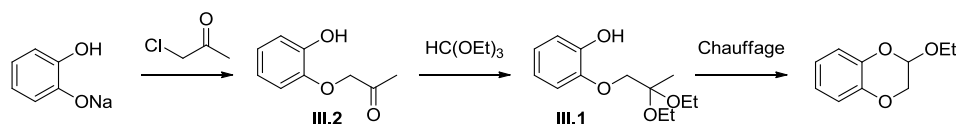


Schéma 36 : Synthèse du premier 1,4-benzodioxane.

⁵⁵ Pinder, R. M.; Wieringa, J. H. *Med. Res. Rev.* **1993**, *13*, 259-325.

⁵⁶ Crame, A. J.; Borthwick, A. D. FR2534921 (A1).

⁵⁷ Satoh, Y.; Powers, C.; Toledo, L. M.; Kowalski, T. J.; Peters, P. A.; Kimble, E. F. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 68-75.

⁵⁸ Moureu, C. *Bull. Soc. Chim. de Paris, Mémoires* **1899**, SER3, T21, 291-294.

III.1.2.1 Méthodes racémiques

Depuis les travaux de Moureu, d'autres méthodes ont été développées, essentiellement en version racémique. Ces composés sont en général obtenus en une ou deux étapes.

III.1.2.1.i Par condensation du pyrocatechol

En 1955, une série de 2,3-dihydro-1,4-benzodioxane a été synthétisée en couplant le pyrocatechol sur le 2,3-dibromopropanoate d'éthyle. Les amides finaux ont ensuite été obtenus par aminolyse de l'ester éthylique par de l'ammoniaque, de l'hydrazine, ou différentes amines primaires (Schéma 37).⁵⁹

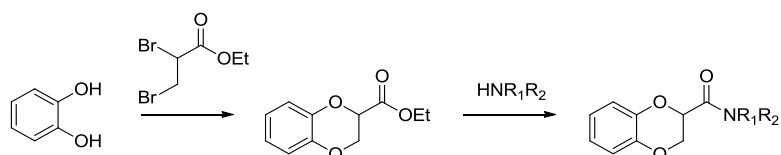


Schéma 37 : Condensation du pyrocatechol sur des esters α,β -bromés.

Vingt ans plus tard, l'équipe de Martin a utilisé une addition de Michael du pyrocatechol sur des alcènes α -halogénés comme voie d'accès aux benzodioxanes.⁶⁰ Le mécanisme proposé implique l'addition nucléophile de l'anion phénolate sur l'accepteur de Michael (Schéma 38). Le deuxième phénolate peut alors substituer le brome pour former le dioxane.

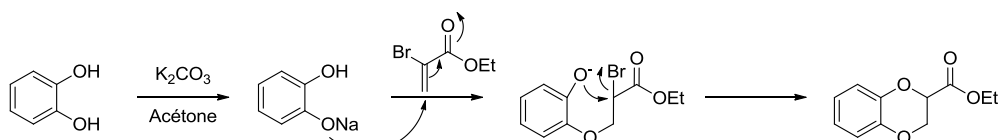


Schéma 38 : Mécanisme proposé pour la condensation du pyrocatechol sur les accepteurs de Michael.

Cette méthode a été utilisée pour la synthèse de l'Idazoxan (inhibiteur des récepteurs adrénergétique α_2) par condensation du chloroacrylonitrile avec le pyrocatechol (Figure 19). Le traitement du nitrile en milieu acide, suivi de la réaction avec l'éthylènediamine et acidification permet d'isoler le principe actif en seulement trois étapes.⁶¹

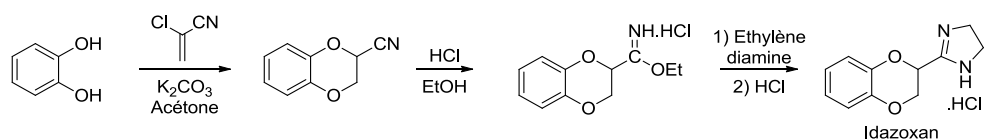


Figure 19 : Synthèse de l'Idazoxan.

⁵⁹ Koo, J.; Avakian, S.; Martin, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 5373-5375.

⁶⁰ Martin, A. R.; Mallick, S. K.; Caputo, J. F. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1808-1811.

⁶¹ Krapcho, J.; Lott, W. US 2979511, **1961**.

III.1.2.1.ii Voies d'accès à des benzodioxanes substitués

Il existe plusieurs voies d'accès aux benzodioxanes substitués sur la partie aromatique mais celles-ci souffrent souvent de problèmes de régiosélectivité lors de la construction de l'hétérocycle.

Dans certains cas particuliers, des catéchols substitués et non protégés ont pu être condensés directement sur le tosylate du glycidol. Dans l'exemple du Schéma 39, le catéchol est substitué par un groupement nitro. En raison de la forte électronégativité de ce groupement, la déprotonation du catéchol est régiosélective et un seul des deux régioisomères est obtenu.⁶²

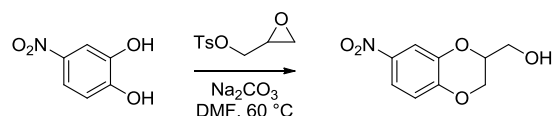


Schéma 39 : Régiosélectivité de l'addition du catéchol substitué avec un groupement nitro.

Pour résoudre le problème de régiosélectivité lorsque le cycle aromatique du 1,4-benzodioxane est substitué, le dioxane est la plupart du temps construit en plusieurs étapes en commençant par l'*O*-alkylation d'un catéchol mono-protégé comme dans l'exemple suivant (Schéma 40).⁶³ Le second phénol est ensuite déprotégé en milieu acide (débenzylation). Après déprotonation, le phénolate va ouvrir l'époxyde par substitution nucléophile et former le motif 1,4-benzodioxane.

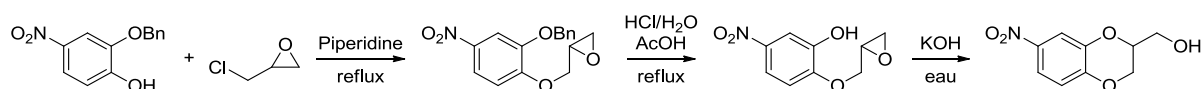


Schéma 40 : Synthèse d'un 1,4-benzodioxane en partant d'un catéchol mono-protégé.

D'autres accès plus originaux au motif 1,4-benzodioxane ont été développés récemment. Par exemple, après l'*O*-alkylation du phénol sur l'époxyde, l'oxyde de cuivre permet de réaliser le couplage entre l'iodobenzène et l'alcool secondaire libéré (Schéma 41). Cette méthode présente l'avantage d'être assez rapide et la réaction est tolérante à la nature de l'époxyde. En revanche, la synthèse des iodophénols de départ peut s'avérer complexe.⁶⁴

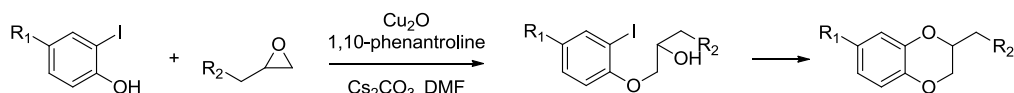


Schéma 41 : Synthèse de 1,4-benzodioxanes catalysée au cuivre.

En version racémique, les principales voies d'accès aux 1,4-benzodioxanes substitués restent la condensation de l'épichlorohydrine et ses dérivés sur des catéchols mono-protégés. Certaines de ces méthodes ont ensuite été adaptées pour la mise en œuvre de voies de synthèses énantiosélectives.

⁶² Ilić, M.; Dunkel, P.; Ilaš, J.; Chabielska, E.; Zakrzaska, A.; Mátyus, P.; Kikelj, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 329-340.

⁶³ Willard, A. K.; Smith, R. L.; Cragoe, E. J. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3847-3852.

⁶⁴ Bao, W.; Liu, Y.; Lv, X.; Quian, W. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3899-3902.

III.1.2.2 Synthèses énantiosélectives de 1,4-benzodioxanes

Dans un mélange racémique, il arrive souvent que l'activité pharmaceutique désirée ne soit apportée que par un seul des énantiomères. Le développement de méthodes permettant d'accéder sélectivement à l'un ou l'autre de ces énantiomères est donc important.

Une méthode a été développée au début des années 2000 pour dédoubler des benzodioxanes dérivés d'acides carboxyliques (Schéma 42). En utilisant une amine chirale ((+)-déhydroabietylamine), l'énantiomère (*R*) cristallise dans le méthanol sous forme d'un sel. Le sel de l'énantiomère (*S*) est alors récupéré dans le filtrat puis cristallisé dans l'heptane. Les deux acides carboxyliques sont obtenus après traitement basique des sels avec des rendements satisfaisants et de bons ee (98,9 % dans les deux cas, Schéma 42).⁶⁵

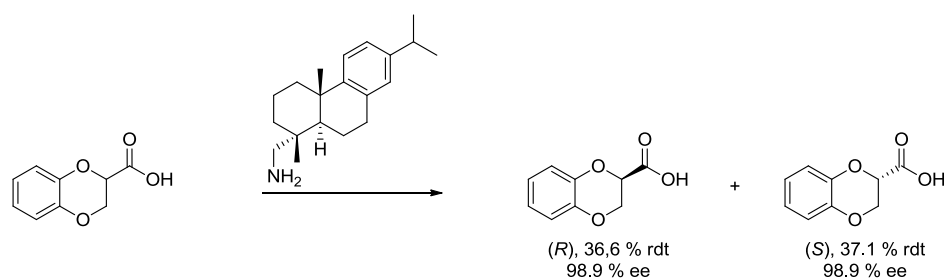


Schéma 42 : Dédoublage de l'acide 1,4-benzodioxane-2-carboxylique.

Bien qu'efficaces, les dédoublages de mélanges racémiques entraînent systématiquement la perte d'au moins la moitié de la matière première. Le développement de méthodes de synthèses énantiosélectives de 1,4-benzodioxanes reste donc souhaitable.

Les principales synthèses énantiosélectives décrites dans la littérature font intervenir l'épichlorohydrine ou le tosylate du glycidol optiquement purs comme synthon chiral. Par exemple, l'équipe de Lo Monte a utilisé la deuxième méthode en condensant directement un catéchol avec le tosylate dérivé du glycidol (Figure 20). La présence de l'ester méthylique va activer électroniquement le phénol en *para*, facilitant ainsi sa déprotonation. Le phénolate formé va substituer le tosylate puis le deuxième groupement hydroxyle va ouvrir l'époxyde dans un second temps. Le benzodioxane obtenu, qui est un précurseur d'un inhibiteur de la glycogène synthase kinase 3 α , a été isolé avec un rendement de 93 % et un ee de 96 %.⁶⁶

⁶⁵ Bolchi, C.; Fumagalli, L.; Moroni, B.; Pallavicini, M.; Valoti, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3779-3785.

⁶⁶ Lo Monte, F.; Kramer, T.; Gu, J.; Anumala, U. R.; Marinelli, L.; La Pietra, V.; Novellino, E.; Franco, B.; Demedts, D.; Van Leuven, F.; Fuertes, A.; Dominguez, J. M.; Plotkin, B.; Eldar-Finkelman, H.; Schmidt, B. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4407-4424.

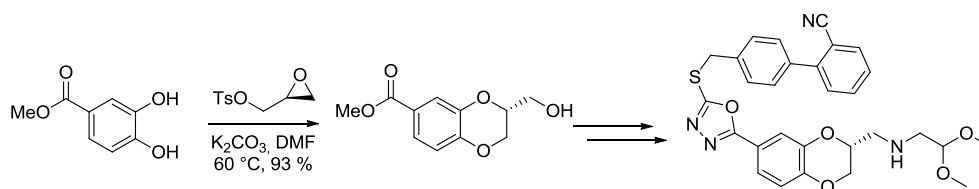


Figure 20 : Synthèse énantiosélective de 1,4-benzodioxanes.

Dans la littérature, la majorité des voies de synthèses énantiosélectives se font par condensation d'un catéchol, mono-protégé ou non, sur l'épichlorohydrine ou un de ses dérivés optiquement pur.

Dans le cadre de notre collaboration avec les Laboratoires Pierre Fabre, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'une synthèse énantiosélective d'un composé benzodioxane référencé F17807. Notre approche a consisté à développer une voie d'accès à ce principe actif ne faisant pas intervenir d'étape organométallique.

III.2 Objectif des travaux de thèse

Le composé F 17807 est un antipsychotique qui agit comme un antagoniste des récepteurs adrénergétiques α_2 . Il va favoriser la libération de noradrénaline dans l'espace synaptique.

Une synthèse énantiosélective avait déjà été développée par le partenaire industriel mais celle-ci présentait plusieurs inconvénients dont une légère chute de l'excès énantiomérique en début de synthèse et l'utilisation d'un ligand chiral breveté lors d'une étape clef de couplage pallado-catalysé. Pour des raisons de confidentialité cette synthèse ne sera pas présentée ici.

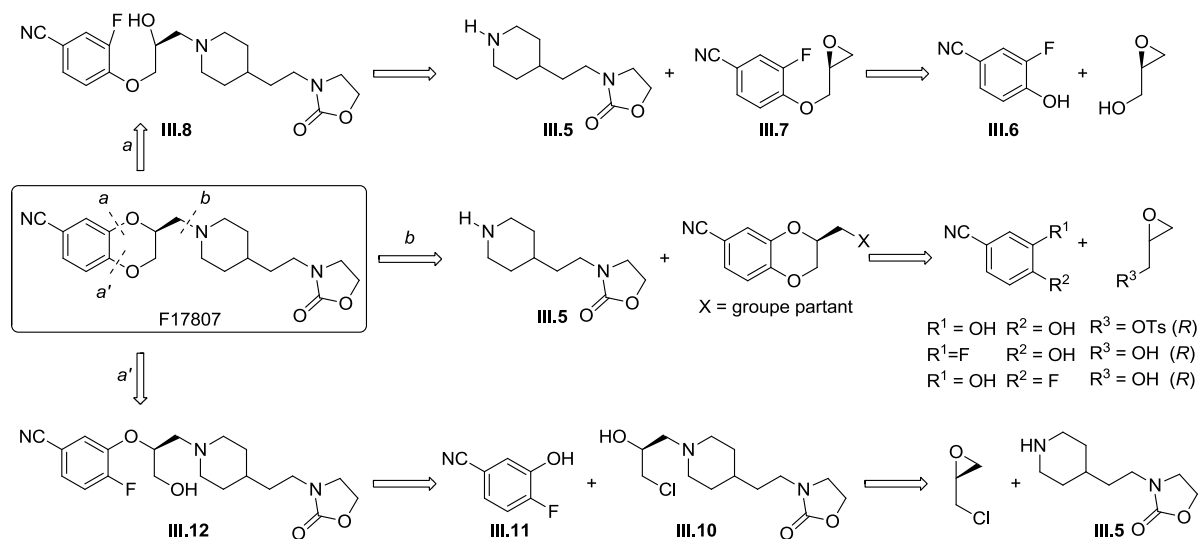
Une analyse rétrosynthétique du F17807 indique qu'il peut être fragmenté à trois endroits distincts (voies *a*, *a'* et *b*, Schéma 43). Les deux étapes clefs étant le couplage avec l'amine et la construction de l'hétérocycle chiral.

Ainsi, dans la voie *a*, la synthèse commencerait par la condensation entre le phénol **III.6** et le glycidol optiquement actif ce qui permettrait d'introduire la chiralité. La pipéridine **III.5** viendrait ensuite ouvrir l'époxyde chiral (**III.7**) pour former l'alcool **III.8**. Finalement l'hétérocycle serait formé par S_NAr intramoléculaire.

Dans la voie *a'*, l'amine **III.5** est d'abord couplée avec l'épichlorohydrine optiquement active. Cette substitution régiosélective permettrait de récupérer l'halohydrine chirale **III.10** qui pourrait ensuite être condensée sur le phénol **III.11**. Finalement, une S_NAr intramoléculaire permettrait en fin de synthèse de construire le motif 1,4-dioxane.

Dans la voie *b*, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la formation du 1,4-benzodioxane avant de le coupler à la pipéridine **III.5**. Ce 1,4-benzodioxane peut être obtenu de différentes façons. Il pourrait tout d'abord être obtenu par condensation directe d'un catéchol sur le

tosylate du glycidol optiquement actif. Il pourrait également être isolé par *O*-alkylation du (*R*)-glycidol sur le 4-hydroxy-3-fluorobenzonitrile suivi d'une S_NAr intramoléculaire. Et finalement, la dernière voie serait de commencer par une S_NAr du (*R*)-glycidol sur le 3-hydroxy-4-fluorobenzonitrile suivi de la fermeture du benzodioxane par condensation.



Dans le cadre de ce projet les trois voies de synthèse précédentes ont été étudiées.

Pour la suite de ce de chapitre, la numérotation suivante sera utilisée (Figure 21) : les atomes de carbone 1' à 6' correspondent aux carbones aromatiques alors que la partie dioxane sera numérotée de 1 à 4.

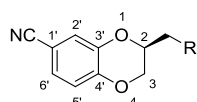


Figure 21 : Numérotation des 1,4-benzodioxanes.

III.3 Synthèse énantiosélective de F17807

III.3.1 Synthèse de l'amine III.5

La pipéridine **III.5** a été préparée en trois étapes en partant du *N*-Boc pipéridine éthanol (Schéma 44). Tout d'abord, l'alcool a été activé sous forme de mésylate (**III.3**) afin d'être substitué par l'oxazolidinone. L'amine protégée intermédiaire (**III.4**) a été isolée avec 86 % de rendement sur les deux premières étapes. Finalement, la fonction amine a été déprotégée en présence d'acide chlorhydrique dans l'isopropanol. Sa forme base (**III.5**) a été obtenue par un traitement aqueux basique.

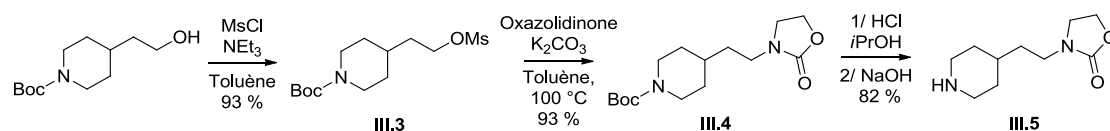


Schéma 44 : Synthèse de l'amine III.5.

Cette pipéridine est commune à toutes les voies de synthèse étudiées dans la suite de ce projet.

III.3.2 Approche synthétique selon la voie *a*

III.3.2.1 Synthèse de l'alcool III.8

Cette approche fait intervenir le phénol ortho fluoré III.6 qu'il nous a fallu préparer par déméthylation du 3-fluoro-4-méthoxybenzonnitrile commercial selon une procédure décrite dans la littérature.⁶⁷ La première étape de cette réaction fait intervenir la réduction *in situ* de Ph_2S_2 en thiophénolate correspondant par l'action de CaH_2 . Ce thiophénolate étant très nucléophile, il va réagir avec le groupement méthoxy du benzonnitrile et permettre la libération du phénol désiré. L'utilisation de ces conditions nous ont permis d'isoler le phénol III.6 avec un rendement de 95% (Schéma 45).

La suite de la synthèse a été réalisée à la fois en version racémique afin d'optimiser les étapes et d'obtenir une référence pour les analyses d'HPLC sur phase chirale, mais également en version optiquement active.

Dans la version énantiosélective, le (*R*)-glycidol a été couplé avec le phénol en utilisant une réaction de Mitsunobu. Cette étape nous permet d'introduire la chiralité désirée sur le synthon intermédiaire. L'époxyde III.7 est ensuite ouvert par la pipéridine III.5, préparée précédemment. L'addition de la pipéridine est totalement régiosélective puisque nous n'observons qu'un seul et unique produit de condensation III.8. Ces deux étapes fonctionnant particulièrement bien, nous avons réussi à les enchaîner sans isoler l'époxyde intermédiaire. L'alcool III.8, précurseur de la réaction de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$, a été isolé avec un rendement de 80% lorsque les deux étapes de synthèse sont combinées.

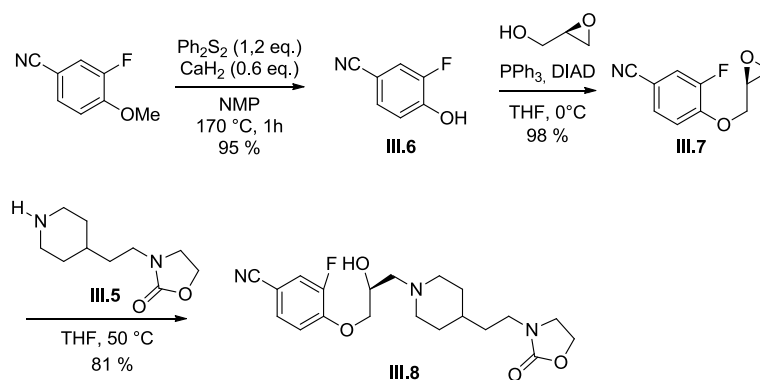


Schéma 45 : Synthèse de l'alcool III.8.

⁶⁷ Gavande, N. S.; Kundu, S.; Badjugar, N. S.; Kaur, G.; Chakraborti, A. K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4201-4204.

L'utilisation du (*R*)-glycidol comme époxyde de départ (ee 98 %) nous a permis d'introduire le centre stéréogène et le produit **III.8** est obtenu avec un ee conservé de 98 % comme mesuré par HPLC chirale.

III.3.2.2 Synthèse de F17807

La dernière étape de cette synthèse consistait à réaliser une S_NAr intra-moléculaire de l'alcool (issu de l'époxyde) sur le fluoro-phényle. Quand nous avons traité le produit **III.8** avec une base forte (*t*BuOK) dans le DMF à 20 °C, nous avons effectivement observé une réaction de substitution nucléophile aromatique mais avons isolé un mélange équimolaire de deux produits : le 1,4-benzodioxane F17807 désiré et son régioisomère **III.9** (Schéma 46). Les deux produits ont des temps de rétention identiques en LC-MS, ne présentent qu'un seul pic de masse à $m/z = 392$ correspondant à l'ion $[M+H]^+$ et ont des spectres RMN proton et carbone 13 très proches.

Afin d'essayer d'optimiser cette réaction, nous avons tenté d'élucider le mécanisme de formation de ce produit secondaire (Schéma 46). En écrivant les formes mésomères limites du benzonitrile de départ, nous pouvons voir que la présence du nitrile en *para* affaiblit électroniquement le carbone 4'. Cet effet électronique va activer la position 4' vis-à-vis de la S_NAr et favoriser la substitution du groupement alkoxy. En effet, la S_NAr est composée de deux étapes, une première étape d'addition du nucléophile sur le carbone électrophile, suivit de l'élimination du groupe partant (fluor ou alkoxy). Le fluor, qui a priori est un meilleur groupe partant en S_NAr , est ici dans une position moins favorable (*meta* du CN) que celle de l'alkoxy (*para* du CN) ce qui permettrait de rationaliser le manque de sélectivité observée de cette réaction.

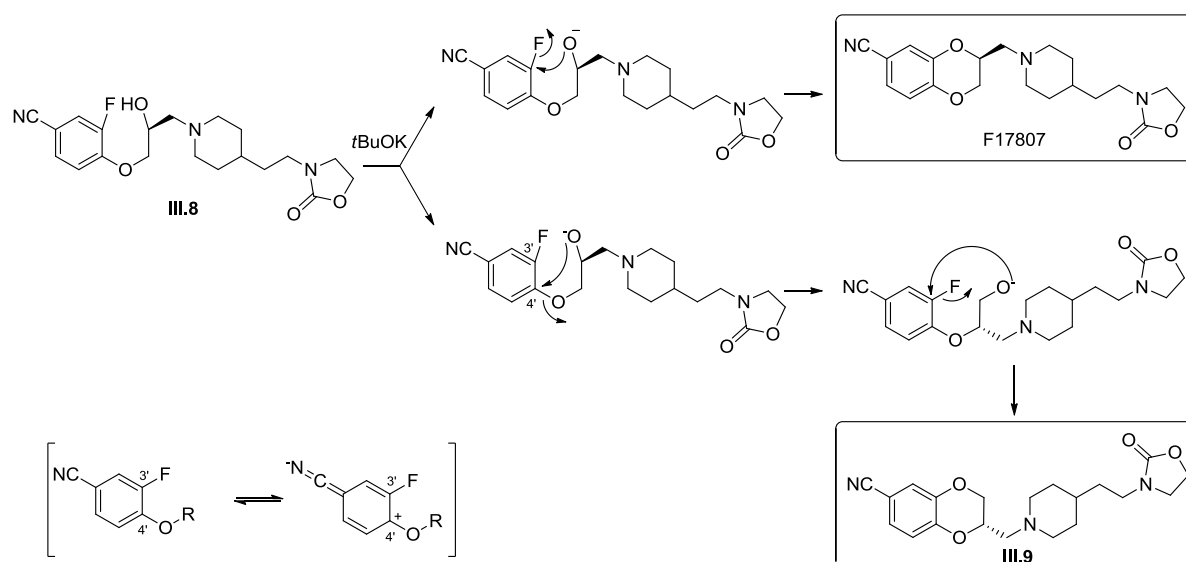


Schéma 46 : Mécanisme proposé pour la formation du régioisomère de F17807.

Afin de surmonter cette difficulté et empêcher la formation de ce sous-produit, nous avons testé plusieurs conditions de réaction : i) Base : *t*BuOK, CS_2CO_3 , DBU, NaH, KHMDS ; ii) Solvant :

DMF, DMSO, THF, Acétonitrile ; iii) Température. Malheureusement, un mélange équimolaire a été obtenu à chaque fois.

Suite à cette déconvenue due à la position « non favorable » du fluor (*meta* du CN), nous avons changé d'approche et essayé de construire le squelette du F17807 de façon à ce que l'étape clef de S_NAr se produise sur le carbone le plus activé 4' en *para* (voie *a'*).

III.3.3 Approche synthétique selon la voie *a'*

Pour cette partie du chapitre, nous avons travaillé sur une réaction modèle en utilisant la pipéridine au lieu de l'amine **III.5** (Schéma 47). En effet, la synthèse de l'amine **III.5** se fait en trois étapes en partant d'un produit relativement onéreux. Il va s'agir ici, dans une première étape, d'ouvrir régiosélectivement l'époxyde avec la pipéridine. L'halohydrine **III.13** obtenue sera ensuite couplée au phénol fluoré **III.11** avant fermeture du benzodioxane par S_NAr intramolécule.

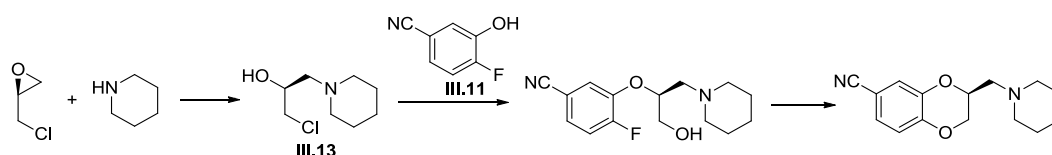


Schéma 47 : Modèle utilisé pour l'approche *a'*.

III.3.3.1 Synthèse de l'halohydrine III.13

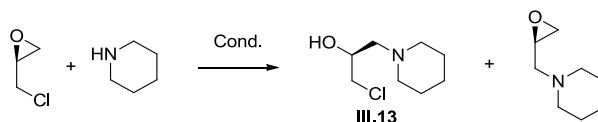
Il existe de nombreux exemples dans la littérature d'ouverture chimio et régiosélective d'épichlorohydrine optiquement active par des amines secondaires.^{68,69,70} Dans des solvants polaires et protiques, l'amine va substituer préférentiellement l'époxyde au niveau de l'atome de carbone le moins encombré par une réaction S_N2 conduisant à l'halohydrine correspondante. Nous avons dans un premier temps cherché à optimiser cette réaction en essayant d'atteindre une régiosélectivité totale. La réaction a été suivie par RMN proton du brut réactionnel qui nous a permis de déterminer le rapport entre l'halohydrine attendue et l'époxyde résultant de la substitution de l'atome de chlore (Tableau 9).

⁶⁸ Powell, N. A.; Ciske, F. L.; Clay, E. C.; Cody, W. L.; Downing, D. M.; Blazeczka, P. G.; Holsworth, D. D.; Edmunds, J. J. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4069-4072.

⁶⁹ Banoth, L. Narayan, T. K., Banerjee, U. C. *Tetrahedron-Asymmetry* **2012**, *23*, 1272-1278.

⁷⁰ Ledesma, G. N.; Signorella, S. R. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5699-5702.

Tableau 9 : Optimisation des conditions d'ouverture de l'épichlorohydrine.



Entrée	Solvant	Concentration (mol/L)	T. (°C)	Durée (h)	Halohydrine/époxyde
1	H ₂ O	0,5	20	1	53/47
2	H ₂ O	1,0	20	1	77/23
3	H ₂ O	1,0	20	0,5	77/23
4	H ₂ O	1,0	40	1	67/33
5	H ₂ O	1,0	4	1	82/18
6	MeOH	1,0	20	1	95/5
7	EtOH	1,0	20	1	100/0

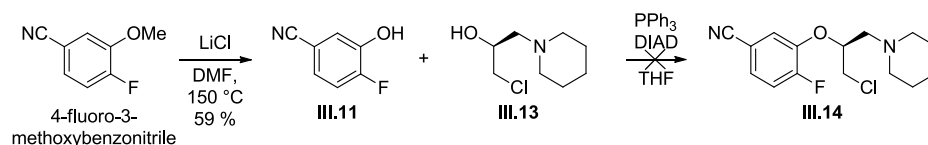
L'eau a été choisie comme solvant de départ pour notre optimisation et les réactions ont été réalisées dans un milieu concentré. Il semble en effet que plus le milieu réactionnel est concentré, plus la réaction est sélective (entrées 1 et 2). Afin de vérifier que l'halohydrine intermédiaire ne se reforme pas en cours de réaction, nous l'avons arrêté après 30 min (entrée 3) au lieu de 1 h (entrée 2) mais la même sélectivité a été observée. Nous avons ensuite modifié la température de réaction mais le chauffage du milieu réactionnel induit une sélectivité moins bonne (entrée 4) ; en refroidissant la réaction, une légère amélioration a été constatée (entrée 5).

Finalement, nous avons choisi d'utiliser un solvant organique polaire et protique, le méthanol (entrée 5). Dans ce solvant, une bien meilleure sélectivité est obtenue (95/5 en faveur de l'halohydrine). En passant du méthanol à l'éthanol une sélectivité totale a finalement été obtenue (entrée 6). Aucune trace de l'époxyde n'est détectée.

III.3.3.2 Couplage de l'halohydrine III.13 et du phénol III.11

L'étape suivante de notre synthèse consiste à coupler l'halohydrine obtenue ci-dessus avec le phénol **III.11**. Ce phénol a été préparé selon une procédure décrite dans la littérature en traitant le 4-fluoro-3-méthoxybenzonnitrile avec LiCl.⁷¹ Dans ces conditions, le produit **III.11** est isolé avec un rendement de 59 % (Schéma 48). Nous avons ensuite essayé de coupler, par une réaction de Mitsunobu, l'hydroxybenzonnitrile obtenu **III.11** sur l'halohydrine chirale **III.13** que nous avons précédemment synthétisée par ouverture de l'épichlorohydrine.

⁷¹ Bollini, M.; Domaol, R. A.; Thakur, V. V.; Gallardo-Macias, R.; Spasov, K. A.; Anderson, K. S.; Jorgensen, W. L. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8582-8591.

Schéma 48 : Synthèse du composé **III.14**.

Malgré l'utilisation de plusieurs conditions de réaction nous n'avons jamais réussi à isoler le produit attendu **III.14**. En revanche, nous avons obtenu à chaque fois le produit **III.15** provenant d'un réarrangement intramoléculaire de l'halohydrine (conversion : 100 %, Schéma 49). En effet, dans les conditions de Mitsunobu, l'alcool est activé en groupement partant sous la forme d'un sel de phosphonium. Ce dernier est déplacé intramoléculairement par la piperidine adjacente pour conduire à la formation d'un aziridium intermédiaire. C'est ce dernier qui réagit avec le phénol **III.11**. La substitution du phénol sur l'aziridium se fait régiosélectivement sur le carbone le moins encombré conduisant à la formation exclusive du régioisomère du produit attendu.

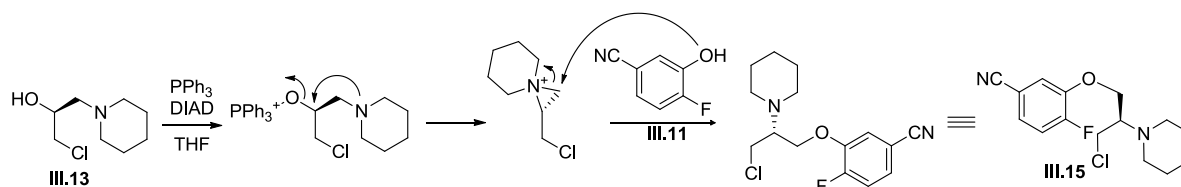


Schéma 49 : Mécanisme de formation du produit issu des réactions de Mitsunobu.

Cette voie de synthèse n'ayant pas abouti, nous avons choisi de concentrer nos efforts sur une synthèse qui serait plus convergente et qui impliquerait la synthèse du motif 1,4-benzodioxane chiral comportant un groupe partant en position 2. Ce groupement partant servirait, dans une deuxième étape, de point d'ancrage à la pipéridine substituée.

III.3.4 Synthèse du 1,4-benzodioxane, voie *b*

Cette partie concerne la mise en place de synthèses énantiosélectives du motif benzodioxane **III.23** et son couplage à la pipéridine substituée **III.5** afin d'accéder au composé F17807.

Trois voies d'accès ont été envisagées (Schéma 50). La première (voie *i*) permettait de construire le 1,4-benzodioxane en une seule étape en faisant réagir le catéchol avec le tosylate du glycidol.

Pour les deux autres voies de synthèse, nous avons procédé par étape en utilisant deux phénols fluorés distincts.

Dans la deuxième synthèse (voie *ii*) nous avons d'abord condensé le phénol avec le glycidol optiquement pur, avant d'essayer le former le dioxane par S_NAr .

Pour la troisième synthèse (voie *iii*), nous avons envisagé de commencer par une réaction de S_NAr entre l'isopropylidène glycérol et l'hydroxybenzonnitrile puis de fermer le dioxane par alkylation du phénol.

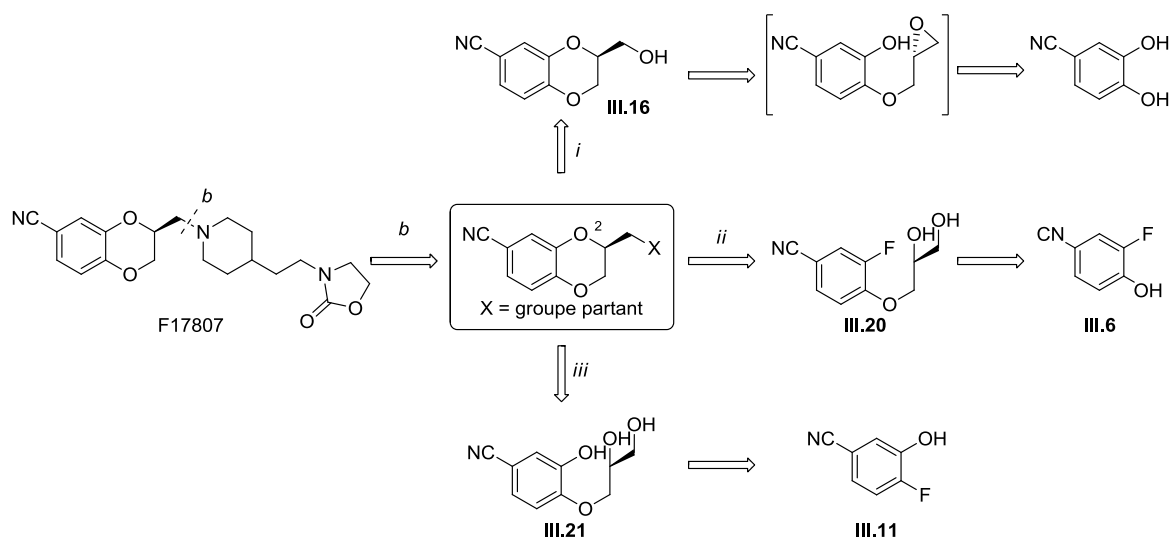


Schéma 50 : Rétrosynthèses envisagées pour le motif 1,4-benzodioxane chiral.

III.3.4.1 Accès au benzodioxane en une seule étape (voie *i*)

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, il est possible dans certaines conditions de condenser directement le catéchol sur le tosylate du glycidol. Dans le cas qui nous intéresse, si la substitution nucléophile initiale se fait avec le phénolate 4', le produit attendu sera obtenu alors que, si elle se fait avec le phénolate 3', le régioisomère correspondant sera produit (Schéma 51). Ces condensations fonctionnent en général bien s'il y a un groupement électroattracteur de type ester ou nitro en position 1'. Ici, le catéchol est substitué en position 1' par un nitrile.

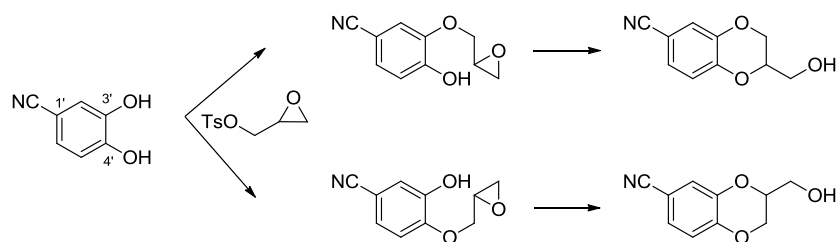
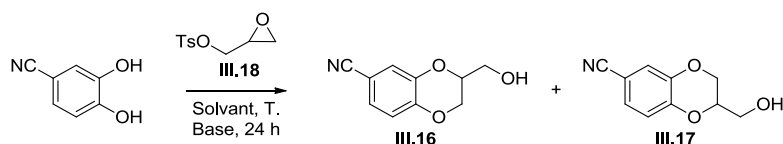


Schéma 51 : Régiosélectivité de l'attaque du phénol sur un dérivé de l'épichlorohydrine.

Avant de développer cette réaction en version énantiosélective, nous avons essayé d'optimiser sa régiosélectivité en version racémique. Afin de cerner au mieux cette réaction, nous avons joué sur le solvant, la température de réaction et la nature de la base. À l'issue de la réaction il n'est pas possible de séparer les deux régioisomères dont les proportions relatives ont été mesurées par RMN du proton (Tableau 10).

Tableau 10 : Optimisation de la réaction de condensation du catéchol sur le tosylate du glycidol (III.18).



Entrée	Solvant	T (°C)	Base	III.16/III.17
1	Acétone	40	K ₂ CO ₃	NR
2	Acétone	60	K ₂ CO ₃	72/28
3	DMF	60	K ₂ CO ₃	70/30
4	THF	60	K ₂ CO ₃	65/35
5	<i>t</i> BuOH	60	K ₂ CO ₃	65/35
6	MIBK	60	K ₂ CO ₃	65/35
7	Acétone	60	NEt ₃	NR
8	Acétone	60	Cs ₂ CO ₃	74/26

Dans un premier temps, nous avons voulu voir l'influence de la température sur la sélectivité de la réaction. Alors qu'aucune conversion n'a été observée à 40 °C (entrée 1), la cinétique de la réaction est lente à 60 °C et la sélectivité **III.16/ III.17** n'est pas très bonne (72/28, entrée 2).

Nous avons alors testé plusieurs solvants afin d'étudier leur impact sur la sélectivité de cette réaction (entrée 2-5). On remarque qu'avec les solvants les moins polaires (THF, *t*BuOH et MIBK) la sélectivité est légèrement moins bonne qu'avec des solvants les plus polaires (DMF et Acétone).

Sur le catéchol de départ, la présence du nitrile rend les deux phénols non équivalents et nous avons essayé de jouer sur cette différence de pKa afin de déprotoner sélectivement de phénol 4'. Nous avons donc testé plusieurs bases ayant des pKa proches de ceux des phénols (entrées 1, 7 et 8). Bien que la triéthylamine ait un pKa (13,7 dans le THF⁷², 10,6 dans l'eau⁷³) supérieur à celui des phénols (*m*-cyanophénol : 8,6 ; *p*-cyanophénol : 8,0 dans l'eau⁷⁴), aucune réaction ne s'est produite. Cela est probablement dû à une mauvaise dissociation de l'ammonium et du phénolate rendant ce dernier peu réactif (entrée 7). Nous avons également changé la nature du contre ion du carbonate (césium au lieu de potassium) mais une sélectivité similaire a été obtenue (entrée 1 et 8).

Aucune des conditions de réaction testées n'a vraiment permis d'améliorer cette réaction. Cette difficulté est probablement liée au fait que les deux groupements phénols ont une réactivité proche même si nous observons que le benzodioxane désiré se forme majoritairement dans tous les cas. Nous avons alors travaillé sur deux autres voies d'accès au 1,4-benzodioxane.

⁷² Garrido, G.; Koort, E.; Rafols, C.; Bosch, E.; Rodima, T.; Leito, I.; Roses, M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9062-9067.

⁷³ http://evans.harvard.edu/pdf/evans_pka_table.pdf

⁷⁴ Liptak, M. D.; Gross, K.C.; Seybold, P. G.; Feldgus, S.; Shields, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6421-6427.

III.3.4.2 Accès au benzodioxane par O-Alkylation/S_NAr (voie ii)

Suite au manque de sélectivité des réactions en une seule étape, nous avons choisi de travailler sur une synthèse séquentielle. Dans un premier temps, nous sommes repartis du phénol **III.6**. Nous voulions tout d'abord réaliser la réaction d'O-alkylation afin de pouvoir ensuite fermer le benzodioxane par S_NAr intramoléculaire. Cette synthèse a été optimisée en série racémique.

III.3.4.2.i O-alkylation du 4-hydroxy-3-fluorobenzonitrile

Dans cette synthèse le 4-hydroxy-3-fluorobenzonitrile est alkylé par le dérivé tosylé de l'isopropylidène glycidol (**III.19**), puis le diol **III.20** est déprotégé en milieu acide. Le précurseur **III.20** de la S_NAr intramoléculaire a été isolé avec un rendement de 43 % pour ces deux étapes de synthèse (Schéma 52).

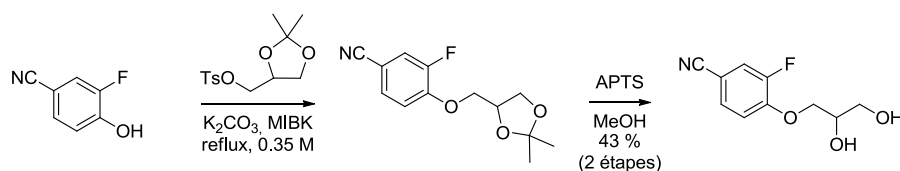


Schéma 52 : Synthèse du diol **III.20** en deux étapes.

III.3.4.2.ii S_NAr intramoléculaire

L'étape suivante consistait à refermer le dioxane *via* une S_NAr intramoléculaire entre l'alcool secondaire et le fluor en position 3'. Les conditions utilisées ne nous ont jamais permis d'isoler le produit désiré et nous observons systématiquement la re-formation du phénol **III.6** de départ. Cette réaction pourrait s'expliquer par la fermeture de l'alcool secondaire en époxyde avec libération concomitante du phénol (Schéma 53).

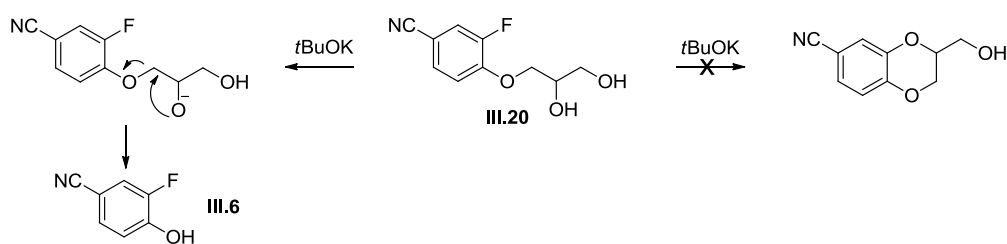


Schéma 53 : Mécanisme expliquant la formation du phénol **III.6**.

Suite aux difficultés rencontrées lors de ces synthèses, nous avons alors envisagé une dernière voie permettant d'arriver au motif 1,4-benzodioxane.

III.3.4.3 Accès au benzodioxane par S_NAr/O-alkylation (voie iii)

Après avoir essayé plusieurs conditions de S_NAr intramoléculaire entre le glycidol et le phénol **III.11** sans beaucoup de réussite, nous avons inversé la séquence des réactions et additionné, dans une première étape, le (*S*)-isopropylidène glycidol sur le phénol **III.11** par substitution nucléophile aromatique. Cette réaction ne fonctionne que dans des conditions drastiques (2 mol/L au reflux du

DMF (Schéma 54)). Le groupement isopropylidène protecteur du diol peut être ôté *in situ* lors du traitement de la réaction en conditions acides (HCl dilué). Le diol **III.21** est obtenu avec un rendement global de 72 %. Même si dans cette synthèse l'information chirale est apportée dès la première étape, l'excès énantiomérique n'a été mesuré que sur le produit final (F17807).

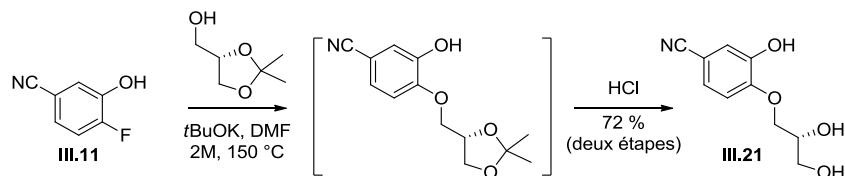


Schéma 54 : Synthèse du diol **III.21** par S_NAr .

À ce stade de la synthèse, il nous restait à construire le motif dioxane. Nous avons envisagé de réaliser la cyclisation du dioxane par une réaction de Mitsunobu entre le phénol et l'alcool secondaire. Cependant, l'alcool primaire peut également être activé au cours de cette étape et conduire à la formation de sous-produits non désirés. Nous avons donc masqué cet alcool sous la forme d'un halogénure qui pourra également être utilisé comme groupe partant dans l'ultime étape de notre synthèse qui va consister à greffer la pipéridine sur le benzodioxane. Le diol **III.21** est traité avec du tetrabromométhane et de la triphénylphosphine pour conduire au produit mono-bromé **III.22** attendu avec un rendement de 89 % (Schéma 55).

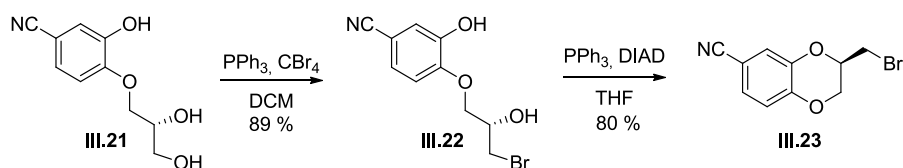


Schéma 55 : Monobromation du diol **III.21** suivie de la fermeture du dioxane.

L'alcool primaire ayant été protégé/activé, il ne nous restait plus qu'à refermer le dioxane en utilisant les conditions de la réaction de Mitsunobu. Cette transformation est encore une fois très efficace en utilisant le DIAD en présence de triphénylphosphine dans le tétrahydrofurane (Schéma 55). À ce stade de la synthèse, nous avons développé une voie simple qui permet en trois étapes d'accéder au motif 1,4-benzodioxane optiquement actif **III.23**.

L'ultime séquence de notre synthèse a consisté à greffer la pipéridine **III.5** sur le benzodioxane par substitution nucléophile du brome précédemment introduit (Schéma 56). Le composé F17807 est isolé avec un rendement de 58 % (non optimisé) et avec un excès énantiomérique de 98 % tel que mesuré par HPLC sur phase chirale. L'excès énantiomérique de l'isopropylidène glycérol de départ étant de 98 %, nous l'avons conservé tout au long de la synthèse.

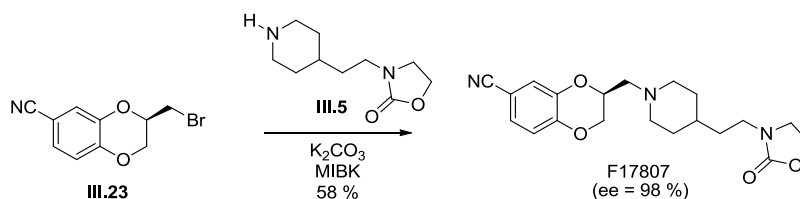


Schéma 56 : Couplage final pour obtenir F17807.

III.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons développé une synthèse énantiosélective du composé F17807 qui nous permet de contourner les limitations du procédé déjà en place, à savoir : une épimérisation partielle du centre stéréogène du benzodioxane dans une des étapes et l'utilisation d'un ligand breveté du palladium.

Après l'exploration de plusieurs voies de synthèses peu concluantes, nous avons développé un chemin synthétique efficace permettant l'accès au motif 1,4-benzodioxane en série optiquement active (Schéma 57). Cette synthèse commence par une S_NAr du (*S*)-isopropylidène glycidol sur le 3-hydroxy-4-fluorobenzonitrile suivie d'une déprotection *in situ* de l'acétal. Le diol **III.21** correspondant est ensuite mono-bromé et le dioxane refermé par une réaction de Mitsunobu. Finalement, le composé F17807 est obtenu en faisant réagir la pipéridine **III.5** sur le bromo-1,4-benzodioxane. L'excès énantiomérique de l'isopropylidène glycerol (98 %) de départ a été maintenu tout au long de la synthèse.

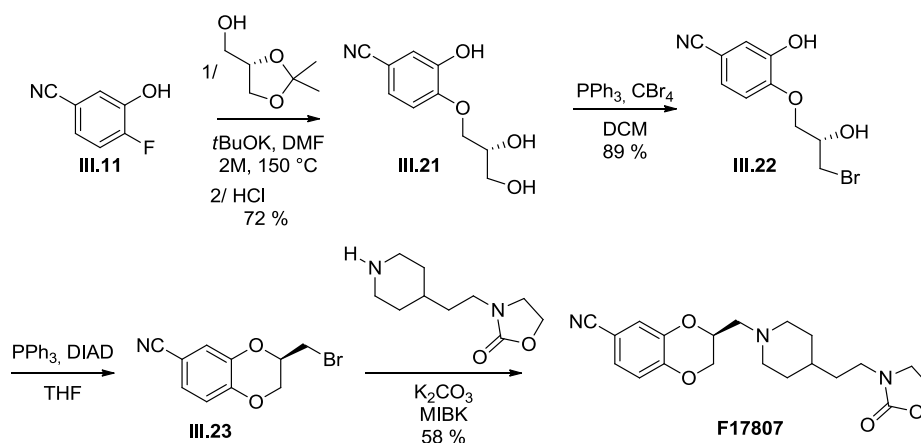


Schéma 57 : Synthèse énantiosélective du composé F17807.

Chapitre IV

Synthèse d'analogues de Podophyllotoxines

Les podophyllotoxines ont été utilisées comme médicaments depuis plus de 1000 ans. Au départ, seuls des extraits aqueux ou alcooliques de plantes étaient utilisés comme traitement. Des composés semi-synthétiques ont depuis été mis sur le marché essentiellement en tant qu'anticancéreux.

La plupart de ces dérivés non alcaloïdes proviennent de la Podophyllotoxine principale représentante de sa famille (Figure 22). Cette molécule est naturellement présente dans le genre *Podophyllum* et est principalement extraite des rhizomes et racines de certaines espèces. Inscrite à la pharmacopée américaine en 1820, elle ne fut que très peu utilisée car trop toxique pour l'estomac.

Néanmoins, conscients du potentiel que pouvait représenter cette famille de molécules, les chercheurs des laboratoires Sandoz ont travaillé des années sur l'élaboration de nouvelles molécules anticancéreuses ayant moins d'effets secondaires. C'est dans ce cadre qu'ils ont découvert l'Etoposide et le Ténoposide, deux agents anticancéreux mieux tolérés que le produit naturel. Bien qu'encore utilisés, ces principes actifs engendrent de nombreux effets secondaires indésirables. C'est pour répondre à ce problème que les Laboratoires Pierre Fabre ont développé le composé F14512, une nouvelle molécule cytotoxique actuellement en phase I d'essais cliniques.

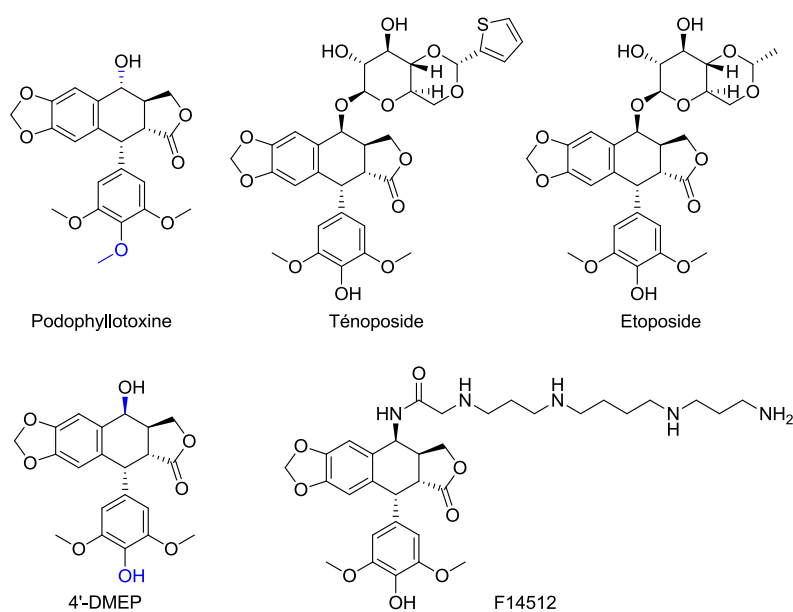


Figure 22 : Structures de Podophyllotoxine, Ténoposide, Etoposide, 4'-DMEP, F14512.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons dans un premier temps à l'histoire des podophyllotoxines et à l'élucidation de leur mode d'action. Nous décrirons ensuite l'approche des Laboratoires Pierre Fabre pour la mise en place d'une thérapie ciblée par greffage d'une polyamine sur le dérivé 4'-déméthylépipodophyllotoxine (4'-DMEP).

IV.1 Histoire des podophyllotoxines

Avant l'arrivée des premiers colons, les amérindiens utilisaient déjà un extrait aqueux des racines de certaines espèces de *Podophyllum* comme purgatif ou antiparasitaire. Les pionniers américains l'ont ensuite utilisé comme vomitif ou cholagogue (substance facilitant d'évacuation de la bile).⁷⁵

En 1844, John King isole un extrait alcoolique, la Podophylline, à partir de certaines espèces de *Podophyllum*.⁷⁶ Dix-sept ans plus tard, Bentley décrit les premiers effets anticancéreux de l'extrait contre des tumeurs bénignes.⁷⁷ C'est en 1946 que l'activité antimittotique de la Podophylline est mise en évidence puisque King et Sullivan observent l'arrêt de la croissance cellulaire lors de la mitose.⁷⁸

Pendant ce temps, Podwysstozki a isolé le composé principal contenu dans l'extrait : la Podophyllotoxine (**1**).⁷⁹ Dix ans plus tard, Neuberger la cristallisa pour la première fois et testa son activité sur plusieurs modèles animaux.⁸⁰ Il observa des effets toxiques similaires à ceux induits par la colchicine. Il faudra attendre 1956 et les travaux de Hartwell et Schreker pour connaître la structure absolue de la molécule.⁸¹ Des travaux plus récents ont permis d'élucider son mode d'action : c'est un inhibiteur de la polymérisation des microtubules.⁷⁵

IV.1.1 Nomenclature et numérotation

La nomenclature présentée ci-après est celle couramment employée dans la littérature (Figure 23). Les podophyllotoxines sont composées de cinq cycles. Les cycles A, B, C et D sont liés entre eux alors que le cycle aromatique E est indépendant. On parlera des positions 1, 2, ..., n pour les atomes des cycles A, B, C et D. Ceux du cycle E seront écrit avec un « prime » en plus : 1', 2', ..., n'. La numérotation commence (C1) sur le carbone qui porte les deux groupements benzyles (Figure 23).

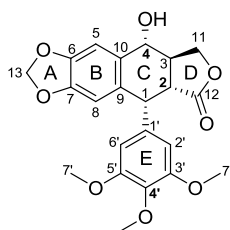


Figure 23 : Numérotation de la Podophyllotoxine.

Selon les conventions utilisées en stéréochimie, on parlera de configuration α lorsque le groupement considéré sera derrière le plan de la molécule et β quand il sera devant. À titre d'exemple, le cycle E porté par le carbone 1 (C1) est en position α . Il est à noter que :

- l'épimère en C2 de la Podophyllotoxine est nommé *picro*-podophyllotoxine (lactone *cis*).

⁷⁵ Imbert, T. *Biochimie* **1998**, *80*, 207-222.

⁷⁶ Constabel, F. *Medicinal Plant Biotechnology* **2010**, 323.

⁷⁷ Bentley, R. *Pharm. J. Trans.* **1861**, *3*, 456-464.

⁷⁸ King, L. S.; Sullivan, M. *Science* **1946**, *104*, 244-245.

⁷⁹ Podwysstozki, V. *Pharm. J. Trans.* **1881**, *12*, 217-218.

⁸⁰ Neuberger, J. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **1891**, *28*, 32-40.

⁸¹ Schrecker, A. W.; Hartwell, J.L. *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 381-382.

- lorsque le groupement hydroxyle porté par la Podophyllotoxine en C4 est β , on l'appellera 'épi', comme dans le dérivé 4'-déméthylépipodophyllotoxine (4'-DMEP, Figure 22).

D'un point de vue géométrique, les quatre cycles contigus de la Podophyllotoxine sont presque plans. Cette géométrie particulière entraîne un encombrement stérique important de la face arrière par le cycle E. Cette caractéristique est utile pour comprendre la réactivité des podophyllotoxines.

Note : tous les produits synthétisés pour ce projet seront obtenus en partant de la 4'-déméthylépipodophyllotoxine (4'-DMEP) qui nous a été fournie par les Laboratoires Pierre Fabre.

IV.1.2 De la Podophyllotoxine à l'Etoposide

Avant de continuer sur les podophyllotoxines, nous allons faire un bref rappel sur le cancer et comment il se développe. Nous verrons ensuite très succinctement les différentes phases du cycle cellulaire. Ces deux éléments nous permettront de comprendre le mode d'action des dérivés de podophyllotoxine et d'épipodophyllotoxine.

IV.1.2.1 Quelques généralités sur le cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération incontrôlée de cellules. Cette maladie est provoquée par une défaillance des mécanismes de régulation qui assurent le développement de notre organisme et est devenue depuis 2004 la première cause de mortalité en France, et le sera bientôt à l'échelle mondiale.⁸²

IV.1.2.1.i Les différentes phases de progression d'un cancer

La première étape de développement du cancer est une mutation génétique au niveau d'une cellule. Cette mutation fait suite à une agression extérieure ou un dommage ; la cellule devient alors incontrôlable et échappe à sa mort programmée.

La cellule entre dans une phase de multiplication intense ; on parle alors de prolifération. Cette multiplication anarchique des cellules entraîne la formation d'amas cellulaires qui forment les tumeurs. Asphyxiées et affamées, les cellules saines voisines doivent céder leur place. La tumeur grossit tellement vite qu'elle ne pourra plus se procurer l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa croissance par simple diffusion. Ses besoins sont d'autant plus importants qu'à ce stade le rythme de division cellulaire s'est accéléré. Elle va donc se connecter directement à une veine par la création de nouveaux vaisseaux sanguins, c'est l'angiogénèse. La création de ces vaisseaux sanguins est souvent trop rapide et certains d'entre eux présentent des anomalies.

⁸² www.arc-cancer.net

Au départ localisées dans un organe précis, les cellules cancéreuses acquièrent ensuite la capacité de quitter la tumeur initiale, elles vont alors coloniser d'autres organes *via* le réseau sanguin, formant des métastases. Le cancer est alors généralisé.

IV.1.2.1.ii Traitements actuels contre le cancer

Comme nous venons de le voir, le combat contre le cancer n'est pas une lutte contre un organisme extérieur, un virus ou une bactérie mais contre des cellules de l'organisme lui-même. Malgré quelques différences, elles ont donc beaucoup de points communs avec les cellules de l'organisme dans lequel elles évoluent. Les traitements efficaces contre les unes le sont donc également contre les autres, ceci est en partie responsable des effets secondaires graves engendrés. Aujourd'hui, les trois méthodes de traitement les plus utilisées sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

Face à une tumeur, l'arme la plus rapide reste la chirurgie. Dès qu'un amas de cellules anormal se développe dans un organe, le plus facile est de l'ôter pour résoudre le problème.

La radiothérapie est également un traitement local. Il s'agit d'irradier les cellules tumorales avec un rayonnement très énergétique afin qu'il détruise leur ADN.

Lorsqu'un cancer s'est étendu à plusieurs organes, il faut traiter l'ensemble du corps car des cellules cancéreuses circulent librement et peuvent donc créer des métastases. Dans ce cas, la chirurgie et la radiothérapie sont impuissantes, le recours à des thérapies à base de traitements chimiques est nécessaire. Ici, un principe actif va être directement utilisé pour aller détruire les cellules cancéreuses. Le principal problème de ce traitement reste son manque de sélectivité vis-à-vis des cellules saines.

IV.1.2.2 Le cycle cellulaire

La division constitue l'évènement de base qui permet aux organismes cellulaires de proliférer (Figure 24).⁸³ En effet, unité structurale de tous les organismes eucaryotes, la cellule ne peut se reproduire qu'en suivant le cycle cellulaire. Bloquer ce dernier peut donc constituer une cible intéressante pour les traitements anticancéreux. Ce cycle se compose de plusieurs phases :

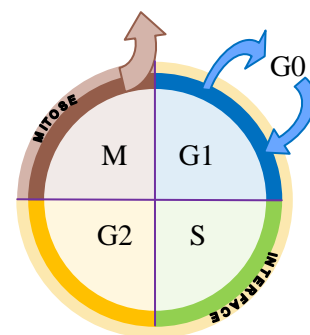


Figure 24 : Cycle cellulaire.

- la plupart des cellules d'un organisme vivant ne sont pas en train de se multiplier, elles sont au repos, dans un état appelé G0 ou quiescence.
- La phase G1 : à ce stade, rien ne la différencie des cellules en G0. C'est au cours de cette phase que la cellule utilise les éléments moléculaires externes pour assurer sa croissance et synthétiser tout le matériel dont elle aura besoin pour la suite.

⁸³ Le cycle cellulaire, S. Galas, Ed : DeBoeck, 2008.

- La phase S : c'est la phase durant laquelle le matériel génétique est répliqué par le biais des ADN polymérases.
- La phase G2 : à ce stade, la cellule contient un matériel génétique en double mais conserve encore un seul noyau. En dehors d'une taille double par rapport au stade G1, rien n'est détectable de l'extérieur. La cellule se prépare à entrer en division
- La phase M : il s'agit de la phase où la cellule va se diviser. Les chromosomes vont migrer dans la cellule grâce à leur prise en charge par le cytosquelette (tubuline, actine,...), puis l'enveloppe nucléaire va se rompre et deux nouvelles cellules filles vont naître. C'est au cours de cette phase qu'interviennent la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules.

IV.1.2.3 Sur les traces de l'Etoposide

Jusqu'à dans les années 1950, les podophyllotoxines ne pouvaient être utilisées en pharmacologie car ces produits étaient trop toxiques et trop peu solubles dans l'eau. Les chercheurs des laboratoires Sandoz ont alors émis une hypothèse : les dérivés de podophyllotoxines déjà identifiés doivent également exister sous leurs formes glycosylées dans les plantes. Ils espéraient que ces analogues soient tout aussi actifs, mais moins toxiques, que leurs parents non glycosylés puisqu'ils avaient déjà fait cette observation pour des séries de molécules utilisées pour le traitement de troubles cardiovasculaires. Après avoir isolé les analogues glycosylés de podophyllotoxine, ils se sont rendus compte que ceux-ci présentaient une meilleure solubilité dans l'eau et étaient moins toxiques. Malheureusement, leurs activités cytotoxiques étaient également moins bonnes.⁸⁴

Ils ont alors synthétisé de nouveaux analogues de ces composés glycosylés en traitant directement les extraits bruts des plantes avec divers aldéhydes. Il est ressorti de ces essais, une commercialisation en 1963, d'une formulation comprenant plusieurs dérivés glycosylés dont le composé principal était la podophyllotoxine- β -D-benzylidène glucoside (SP-G, Figure 25).

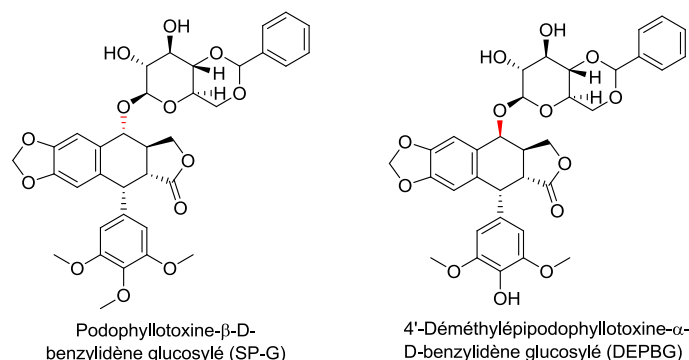


Figure 25 : Podophyllotoxines glycosylées.

⁸⁴ Stähelin, H. F.; Wartburg, A. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 5-15.

En 1962, ces mêmes chercheurs ont remarqué qu'à elle seule l'activité cytotoxique du SP-G ne pouvait pas complètement expliquer les effets cellulaires observés et qu'il devait y avoir des traces de produits non identifiés bien plus actifs. Après deux années de recherche, ils ont identifié un composé (DEPBG, Figure 25) qui permettait d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses. Ce composé, à la différence de tous les autres, possède le groupement glycosylé en position C4 en β alors que tous les autres étaient en α .⁸⁴

Une fois que ce nouveau dérivé, au mode d'action très différent, a été caractérisé, les chercheurs de Sandoz se sont lancés dans une course à l'analogue en condensant toute une librairie d'aldéhydes sur l'épimère α -glucosilé du 4'-déméthylépipodophyllotoxine. Il en est ressorti deux composés : le Ténoposide et l'Etoposide (Figure 22).

IV.1.2.4 Découverte du mode d'action de l'Etoposide

Jusqu'en 1965, tous les dérivés connus de podophyllotoxines agissaient selon le même mode d'action comme inhibiteurs de la polymérisation des microtubules. Les cellules traitées poursuivaient normalement leur cycle de division jusqu'à la phase M, puis arrêtaient leur croissance.

En revanche, lorsque des cellules leucémiques ont été traitées avec Ténoposide celles-ci se comportent presque normalement sauf qu'elles n'entrent pas dans le cycle cellulaire. En effet, 1 h après traitement, on ne détecte aucun signe de mitose dans les cultures cellulaires. Ce nouveau principe actif devait donc intervenir dans les premières phases du cycle (S ou G2).⁸⁵

Il a fallu attendre 1974 et les travaux de Loike qui rapporta l'observation de coupures sur l'ADN de cellules HeLa (cancer du col de l'utérus) traités avec un dérivé de l'Etoposide (VP-16-213).⁸⁶ Mais ce n'est qu'en 1983 que Long et Minocha firent la relation entre la coupure des brins d'ADN et l'inhibition de la topoisomérase II.^{87,88}

L'Etoposide, le Ténoposide et tous les dérivés d'épipodophyllotoxine sont des inhibiteurs des topoisomérase II. Ces enzymes sont essentielles à la survie cellulaire, les inhiber constitue donc une cible très intéressante pour lutter contre le cancer.

IV.1.3 Les topoisomérase

L'ADN est une molécule extrêmement longue (3×10^9 bases chez l'homme) qui contient toutes les informations nécessaires à la vie et à la reproduction d'une cellule. La compaction ainsi que sa structure en double hélice font que cette macromolécule présente un grand nombre de contraintes topologiques. Dans le noyau cellulaire, l'ADN se trouve sous une forme très compacte, dite

⁸⁵ Misra, N. C.; Roberts, D. *Cancer Res.* **1975**, *35*, 99-105.

⁸⁶ Loike, J.; Horwitz, S. B. *Biochemistry* **1976**, *15*, 5443-5448.

⁸⁷ Long, B. H.; Minocha, A. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1983**, *24*, 321-326.

⁸⁸ Ross, W.; Rowe, T.; Glisson, B.; Yalowich, J.; Liu L. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 5857-5860.

surenroulée. Pour être utilisé (réplication, transcription...), l'ADN doit être déroulé afin d'être lu par les enzymes. Or, la structure en double hélice et le surenroulement rendent toute séparation des doubles brins très difficile. Cette opération impliquerait un déroulage trop important de la structure. L'ingénierie cellulaire a alors développé tout un système d'enzymes nucléaires capables d'aider l'ADN lors de ces processus biologiques en le coupant, le déliant, et finalement en le refermant : les topoisomérases. En effet, ces enzymes agissent en amont et permettent d'éliminer les surenroulements afin de faciliter l'avancement de la lecture de la double hélice de l'ADN.⁸⁹

Ces enzymes se divisent en deux classes : les topoisomérases I qui induisent la coupure d'un seul des doubles brins et les topoisomérases II qui induisent une coupure complète du double brin.⁹⁰

Il existe deux familles d'inhibiteurs des topoisomérases II. Ceux qui vont inhiber son activité catalytique et ceux qui vont stabiliser le complexe topoII/ADN. Les épipodophyllotoxines appartiennent à la deuxième classe. Pour démêler l'ADN, la topoisomérase coupe le double brin en deux en se liant de façon covalente à l'extrémité de chaque morceau du double brin. Elle intervertit ensuite avec l'autre double brin afin de démêler l'ADN. Un tel inhibiteur va venir stabiliser ce complexe rendant la religation de l'ADN impossible et induisant la mort cellulaire par apoptose.⁹¹

IV.2 F14512, découverte et mode d'action

Le problème principal des agents anticancéreux est leur manque de sélectivité pour les cellules cancéreuses, par rapport aux cellules saines. Ce manque de sélectivité entraîne des effets secondaires lourds (toxicité, hémorroïdes, pertes de cheveux, aphtes...) chez les patients, rendant la prise de traitement encore plus difficile. S'il était possible d'amener le principe actif exclusivement à l'endroit où il est utile, cela limiterait de façon considérable ses effets indésirables. De nombreuses technologies ont été développées ces dernières années pour vectoriser des molécules actives vers les foyers tumoraux. À titre d'exemple, nous pouvons citer des cargos nanométriques micellaires recouverts de polyéthylène glycol (PEG) qui s'internalisent dans les tumeurs *via* un effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) qui permet une accumulation passive des objets sur le site d'action. Les méthodes de vectorisation de principes actifs seront discutées au chapitre V.

La partie glycosidique de l'Etoposide en position C4 ne joue aucun rôle lors de l'interaction du composé avec sa cible ni avec l'ADN.⁹² C'est pourquoi les Laboratoires Pierre Fabre ont envisagé

⁸⁹ Bates, A. D.; Maxell, A. DNA Topology **2005**, Chap 5, 125-144.

⁹⁰ Gellert, M.; Mizuuchi, K.; O'Dea, M. H.; Nash, H. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 3872-3876.

⁹¹ Champoux, J. J. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 369-413.

⁹² Pitts, S. L. ; Jablonsky, M. J.; Duca, M.; Dauzonne, D.; Monneret, C.; Arimondo, P. B.; Anklin, C.; Graves, D. E.; Osheroff, N. *Biochemistry* **2011**, *50*, 5058-5066.

d'utiliser cette position pour y attacher une polyamine ciblant les cellules tumorales sur-exprimant le système de transport des polyamines (STP). Ce nouveau dérivé est le composé F14512 (Figure 22).⁹³

IV.2.1 Polyamines, système de transport des polyamines et cancer.

Les polyamines, telles que la putrescine, la spermidine ou la spermine, sont des composés cationiques présents dans toutes les cellules eucaryotes (Figure 26). Elles jouent un rôle important dans le développement des cellules, que ce soit lors de la prolifération ou lors de leur différenciation. Elles affectent l'activité biologique des protéines, stabilisent les acides nucléiques et participent à la croissance cellulaire (facteurs de croissance).⁹⁴ Leur rôle et leur régulation sont donc vitaux pour les cellules ce qui en fait une cible de choix pour le développement de nouveaux traitements.

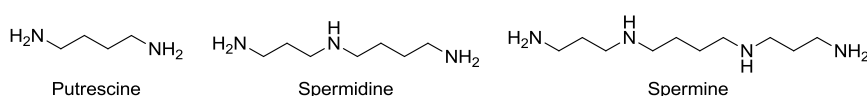


Figure 26 : Structure de la Putrescine, Spermidine et Spermine.

Il a été décrit que la seule prise d'un traitement inhibant la synthèse endogène de polyamines n'est pas suffisante pour faire diminuer le taux de polyamines intracellulaire.⁹⁵ De plus il a été démontré que des régimes appauvris en polyamines, accompagnés de ce traitement, permettaient de faire diminuer la taille des métastases sur des modèles animaux.⁹⁶ Cela signifie que les cellules disposent d'un moyen de puiser les polyamines dans le milieu extra-cellulaire : le système de transport des polyamines. L'intérêt majeur de ce système est qu'il est surexprimé dans certaines lignées cellulaires cancéreuses mais pas chez les cellules saines au niveau desquelles la synthèse endogène des polyamines suffit au développement. Cette différence primordiale entre cellules cancéreuses et cellules saines devrait permettre d'adresser une molécule cytotoxique associée à une polyamine vers une cellule cancéreuse *via* le STP.

Ce système de transport avait déjà été mis à profit dans la littérature pour la vectorisation de molécules actives mais les conjugués synthétisés ont montré, dans la plupart des cas, un effet antitumoral insuffisant ou une toxicité trop importante.⁹⁷ F14512 est le premier conjugué polyamine – principe actif exploitant le STP qui a passé avec succès tous ces tests.

⁹³ Barret, J. M.; Kruczynski, A.; Vispé, S.; Annereau, J. P.; Brel, V.; Guminski, Y.; Delcros, J. G.; Lansiaux, A. ; Guilbaud, N. ; Imbert, T. ; Bailly. *C. Cancer Res* **2008**, *68*, 23, 9845-9853.

⁹⁴ De Brandt, J. P.; Moinard, C.; Cynober, L. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* **2006**, *21*, 333-341.

⁹⁵ Wallace, H. M.; Fraser, A. V. *Amino Acids* **2004**, *26*, 353-365.

⁹⁶ Quemerer, V.; Blanchard, Y.; Chamaillard, L.; Havouis, R.; Cipolla, B.; Moulin, J. P. *Anticancer Res.* **1994**, *14*, 443-448.

⁹⁷ Palmer, A.J.; Wallace, H. M. *Amino Acids* **2010**, *38*, 415-422.

IV.2.2 F14512 : un nouvel agent anticancéreux sélectif

F14512 est composé de deux parties (Figure 22). La première partie, le cœur épipodophyllotoxine est responsable de l'activité cytotoxique du principe actif. La deuxième partie, la spermine, va jouer trois rôles importants : i) elle va permettre le ciblage du composé vers les cellules sur-exprimant le STP, ii) elle va augmenter la solubilité du principe actif dans l'eau et iii), elle va accroître son activité en stabilisant la complexe ADN/TopoII/F14512.

L'optimisation de la polyamine a été présentée dans un brevet de 2004.⁹⁸ Les chercheurs de Pierre Fabre ont testé plusieurs analogues d'acétamide d'épipodophyllotoxine greffés avec des polyamines, naturelles ou non, polysubstituées ou linéaires. L'IC₅₀ de ces composés sur des cellules de la lignée humaine A549 (cancer du poumon non à petites cellules) a été déterminé et comparé avec celui de l'Etoposide pris pour référence. Alors que l'IC₅₀ de l'Etoposide est de 1,8 µmol/L, celui de F14512 est 10 fois plus faible (0,2 µmol/L).

Des tests *in vivo* ont également été réalisés sur un modèle de leucémie murine P388, le composé F14512 présente une augmentation de survie (médiane de survie du groupe traité / médiane de survie du groupe contrôle × 100) de 129 % à une dose de 7,5 mg/kg. De même, la réduction des tumeurs de modèle de mélanome B16 et de carcinome mammaire humain MX-1 implantés en sous cutané ont été réalisés. Pour ces deux modèles, F14512 est bien plus actif que les autres composés même à des doses plus faibles. Pour le modèle MX-1, une éradication totale de la tumeur est même observée après administration de cinq doses de 2.5 mg/kg sur 11 jours.

Parmi toutes les polyamines testées, le conjugué spermine était celui qui présentait les meilleures activités.

IV.2.3 Mode d'action

IV.2.3.1 Vectorisation via le STP

Afin de vérifier l'internalisation préférentielle du F14512 vers les cellules sur-exprimant le STP, ce composé et l'Etoposide (référence) ont été testés sur des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) sur-exprimant les STP et des cellules mutantes CHO-MG ne les sur-exprimant pas. Il apparaît que F14512 est 73 fois plus cytotoxique pour les cellules CHO (STP+) avec un IC₅₀ de 0,12 µmol/L contre 8,7 µmol/L pour les cellules CHO-MG (STP-). À l'opposé, aucune différence de toxicité n'a été observée quand les deux lignées cellulaires ont été traitées avec l'Etoposide (1,1 et 0,9 µmol/L).⁹³

Afin de confirmer ce résultat, un test de compétition avec la ¹⁴C-spermidine a été réalisé. Pour cela, une quantité connue de ¹⁴C-spermidine a été incubée avec des cellules L1210 (leucémie) en

⁹⁸ Barret, J. M.; Guminski, Y.; Imbert, T.; Kruczynski, A. FR2869035-A1, **2005**.

présence d'une quantité croissante de F14512 et d'Etoposide. Alors que la quantité de radioactivité mesurée dans les cellules diminue fortement quand la quantité de F14512 augmente, elle reste inchangée quelle que soit la quantité d'Etoposide.⁹³

Les résultats obtenus sur les cellules L1210 et ceux obtenus sur les CHO / CHO-MG confirment l'internalisation de F14512 *via* le STP.

IV.2.3.2 Mise en évidence de l'activité inhibitrice de la topoisomérase II

La stabilisation du complexe ADN / topoisomérase II par l'Etoposide entraîne une rupture des doubles brins de l'ADN. En revanche, aucune interaction du produit avec l'ADN n'a été observée. À l'opposé, la structure polyammonium de F14512 fait qu'il peut se lier à l'ADN.⁹³

De plus, une étude consistant à étudier la coupure d'un plasmide (ADN surenroulé pLAZ) par la topoisomérase II (humaine) en présence d'une quantité croissante de F14512 et d'Etoposide a été réalisée. Dans cette expérience, un seul (Nck) ou les deux (Lin) double brins de l'ADN vont être coupés. Une électrophorèse sur gel d'agarose a permis de séparer les résidus de l'ADN.⁹³

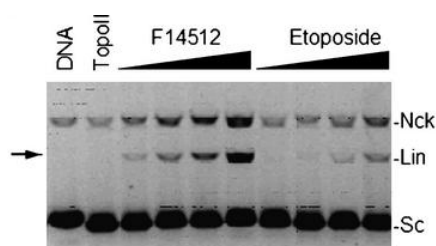


Figure 27 : Incubation d'ADN surenroulé (130 ng, pLAZ) avec 4 équivalents de topoisomérase II en l'absence (TopoII) ou en présence d'une quantité croissante de F14512 ou d'Etoposide (C = 5, 10, 20 et 50 µmol/L).⁹³

On peut alors observer une nette augmentation de l'intensité de la bande correspondant à la rupture du double brin d'ADN avec une quantité croissante de F14512. Cette intensité est bien moins importante pour l'Etoposide. On peut déjà remarquer la meilleure activité inhibitrice de F14512 par rapport à la topoisomérase II.

Il ressort donc de cette étude que F14512 est un inhibiteur puissant de la topoisomérase II. Cette activité importante est particulièrement due à la stabilisation du complexe topoisomérase II / ADN / F14512 par la polyamine du principe actif.

IV.2.3.3 Tests in vitro

Les activités du F14512 et de l'Etoposide ont été évaluées sur des cellules cancéreuses humaines de poumon (A549) qui sur-expriment le STP. Un test dit de « Comet assay »⁹⁹ a permis de mettre en évidence que le F14512 engendre en général moins de coupures que l'Etoposide. En

⁹⁹ Hellman, B.; Vaghef, H.; Boström, B. *Mutat. Res.* **1995**, 336, 2, 123-131.

revanche, F14512 est 35 fois plus actif.⁹³ On peut en déduire que les lésions entraînées par les deux principes actifs sont différentes mais que celles créées par F14512 sont bien plus efficaces.

Ces deux composés ont ensuite été testés sur 29 lignées cellulaires cancéreuses humaines. Il en ressort que l'EC₅₀ général pour F14512 est huit fois plus faible (0,18 µmol/L) que celui de l'Etoposide (1,4 µmol/L). De plus, le dérivé de spermine est plus toxique que l'Etoposide sur 21 de ces lignées.

Sur les tests *in vitro*, il ressort que F14512 est en général plus efficace que l'Etoposide.

IV.2.3.4 *Activité in vivo*

Lors des tests *in vitro*, le nouveau dérivé s'est montré particulièrement actif sur la lignée MX-1 (cancer du sein). Ces cellules ont alors été greffées entre les omoplates de la souris de façon à ce qu'elles développent des tumeurs solides sous-cutanées. Les animaux ont ensuite été traités pendant deux semaines avec F14512 ou Etoposide à des concentrations fixes. Avec une dose de 1,25 mg/kg/jour de F14512, les auteurs observent une régression totale de la tumeur pour 7 souris sur 10 avant la fin du traitement. En revanche, le traitement avec l'Etoposide à une dose de 20 mg/kg/jour ne permet pas d'obtenir de régression des tumeurs.

IV.3 Objectifs des travaux de thèse

Ce composé F14512 est actuellement en phase I d'essais cliniques. Il est important, pour des aspects réglementaires, de connaître et caractériser les impuretés qui pourraient apparaître dans le procédé de synthèse du principe actif. En effet, même si les procédés utilisés industriellement sont reproductibles et robustes, ils ne sont pas à l'abri d'une légère variation qui entraînerait l'apparition de sous-produits. Ces impuretés peuvent également apparaître lors des étapes de purification, ou du stockage du principe actif. Toutes les impuretés supérieures à 0,15 % ou qui représenteraient une dose journalière supérieure à 1 mg/j doivent être caractérisées et leur toxicité et activité biologique évaluées.¹⁰⁰ Le premier objectif de ce travail a été de réaliser la synthèse de trois stéréoisomères de F14512 susceptibles d'être des sous-produits de synthèse.

La synthèse industrielle de F14512 se fait en deux étapes en partant de la 4'-DMEP (Schéma 58).¹⁰¹

¹⁰⁰ Guideline Q3A(R2), ICH, 2006.

¹⁰¹ Grousseau, M.; Guminski, Y.; Imbert, T.; FR2921368, 2009.

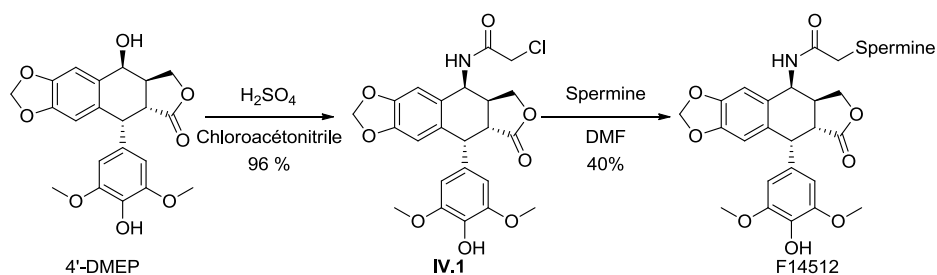


Schéma 58 : Synthèse brevetée de F14512.

Le point d'ancrage de la spermine sur le squelette de la 4'-DMEP est introduit *via* une réaction de Ritter sur la 4'-DMEP dans le chloroacétonitrile et en présence d'acide sulfurique en quantité sous-stoechiométrique. Cette réaction fonctionne avec un très bon rendement de 96 % et une excellente sélectivité faciale même si le mécanisme de la réaction de Ritter passe par un carbocation. En effet, la 4'-DMEP présente une structure rigide particulière dans laquelle le cycle aromatique E est en position quasi axiale ce qui empêche l'approche du chloroacétonitrile par la face inférieure (Figure 28).

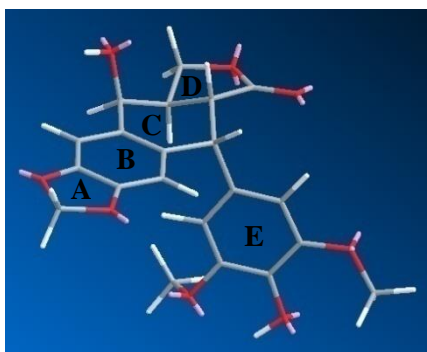


Figure 28 : Modélisation MM2 de la 4'-DMEP.

La deuxième étape de la synthèse du F14512 consiste à greffer la spermine par substitution nucléophile du chloroacétamide **IV.1** par l'une des deux amines primaires de la spermine. Cette réaction se fait sans avoir recours à des groupements protecteurs mais nécessite l'utilisation d'un excès de spermine (2,1 équivalents).

Au cours de cette synthèse en deux étapes, différents sous-produits peuvent apparaître (Figure 29). Le premier sous-produit est l'épimère du chloroacétamide qui peut se former au cours de la réaction de Ritter par addition du chloroacétonitrile sur le carbocation intermédiaire par la face α la plus encombrée (Figure 29, flèche orange, composés **IV.3** & **IV.4**). Le deuxième sous-produit possible est l'épimère de la lactone *trans* qui possède un centre stéréogène potentiellement labile puisque voisin du groupement carbonyle (Figure 29, flèche verte). En milieu basique, cette lactone peut potentiellement s'isomériser pour conduire à un dérivé de *picro*-épipodophyllotoxine (composés **IV.2** & **IV.4**). En effet, il existe une contrainte angulaire forte imposée par la lactone *trans* ce qui tend la structure de l'épipodophyllotoxine. Le caractère labile du centre stéréogène en α du carbonyle de la lactone est accentué car une épimérisation du centre C2 permettrait de « détendre » la molécule. La Figure 29 reprend les trois structures des analogues d'intérêt où nous avons fait varier d'abord

indépendamment le centre C2 (analogue **IV.2**), le centre C4 (analogue **IV.3**) puis les deux centres simultanément (analogue **IV.4**).

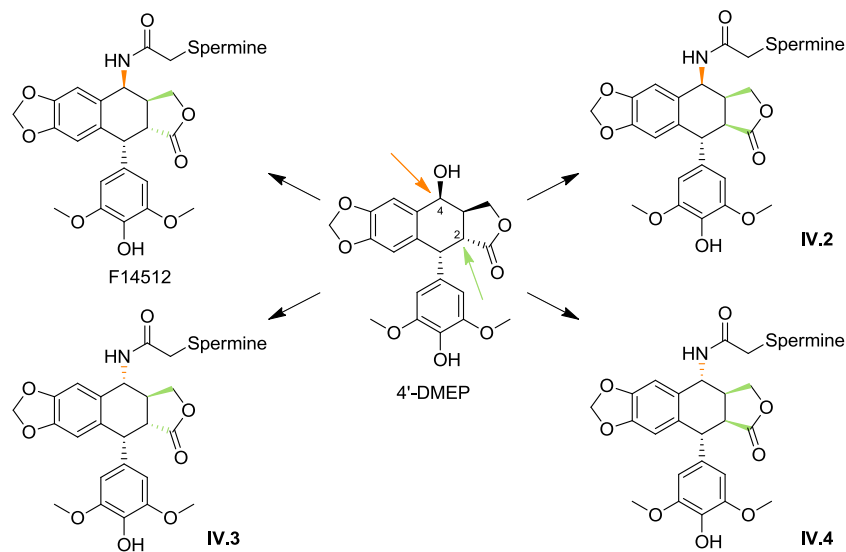


Figure 29 : Structure des trois analogues synthétisés.

Cette première partie sur les dérivés du F14512 va présenter les voies de synthèses que nous avons développées afin d'accéder aux composés présentés ci-dessus.

IV.4 Synthèse de l'analogue **IV.2**

Pour ce premier analogue, nous nous sommes intéressés uniquement à la variation de la stéréochimie du centre C2 de la lactone. Pour cette synthèse, nous avons retenu l'enchaînement suivant : addition du chloroacétamide en position C4, épimérisation de la lactone de la 4'-DMEP, et couplage à la spermine.

Nous avons choisi ici d'introduire la spermine en fin de synthèse afin de ne pas travailler sur plusieurs étapes avec un composé très polaire difficile à manipuler (ne migre pas sur CCM et n'est presque pas retenu sur C18). Notre synthèse débute avec la réaction de Ritter qui est réalisée selon le même mode opératoire que celui décrit dans le brevet de Pierre Fabre (H_2SO_4 cat., chloroacétonitrile). Le chloroacétamide **IV.1** est obtenu avec 96% de rendement et une stéréosélectivité totale en position C4.

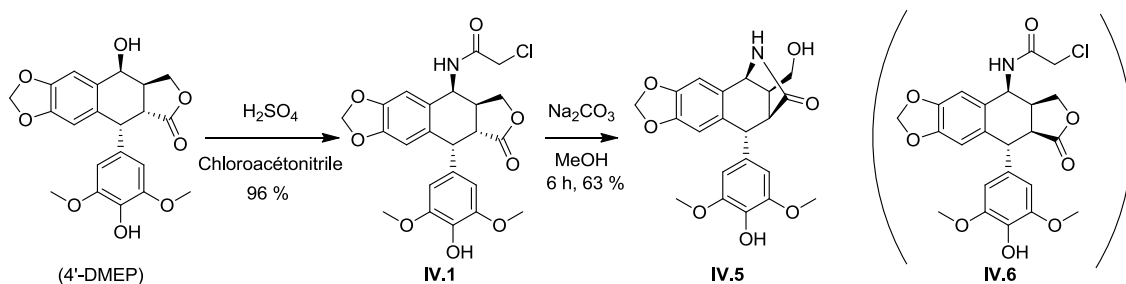


Schéma 59 : Première synthèse envisagée de l'analogue IV.2.

Afin de réaliser la réaction d'épimérisation de la lactone, nous avons ensuite traité l'acétamide par une base faible (Na_2CO_3) dans le méthanol à $40\text{ }^\circ\text{C}$. Cependant, nous avons observé, après 6 h, que le produit majoritaire de la réaction était le lactame **IV.5** mais nous n'avons détecté aucune trace de la lactone *cis* **IV.6** attendue.

Pour essayer de comprendre la formation de ce lactame, la réaction d'épimérisation a été arrêtée après 1 h afin d'isoler un éventuel intermédiaire de cette transformation. Nous observons à des temps plus courts de réaction la formation transitoire de la lactone **IV.6** ce qui indique donc que cette dernière est un intermédiaire de la réaction de formation du lactame (Schéma 59). Sur la base de ces observations, nous proposons le mécanisme suivant pour la conversion de la lactone *trans* **IV.1** en lactame **IV.5** (Schéma 60). Dans une première étape, il y a isomérisation de la lactone *trans* en lactone *cis* **IV.6** avec déprotection concomitante de l'amine dans les conditions basiques utilisées. Même si nous n'avons pas réussi à isoler l'amine intermédiaire **IV.7** du milieu réactionnel, il existe des précédents de méthodes « douces » de déprotection basique du groupement chloroacétamide.^{102,103} L'isomérisation de la lactone induit un rapprochement spatial entre les groupements amine et lactone qui facilite l'ouverture de cette dernière.

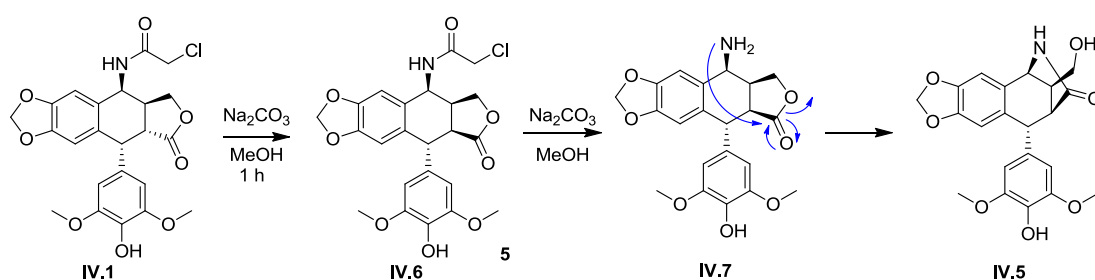


Schéma 60 : Mécanisme proposé pour la formation du lactame.

¹⁰² US2003/35784 A1.¹⁰³ Berry, J.; Doyle, P. M.; Young, D. W. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8963-8966.

Une réaction apparentée a déjà été décrite dans la littérature où la 4- β -amino-épipodophyllotoxine, lorsqu'elle est traitée par de la pyridine dans l'éthanol, conduit au lactame correspondant (Schéma 61).¹⁰⁴

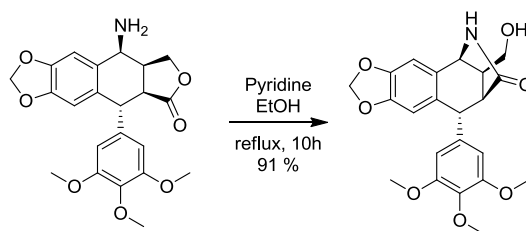


Schéma 61 : Réaction décrite de formation du lactame.

Face à cette réaction parasite qui nous a empêché d'obtenir le dérivé « lactone *cis* », nous avons dû revoir l'ordre des étapes de synthèse en réalisant en premier la réaction d'épimérisation de la lactone, suivie de la réaction de Ritter (Schéma 62).

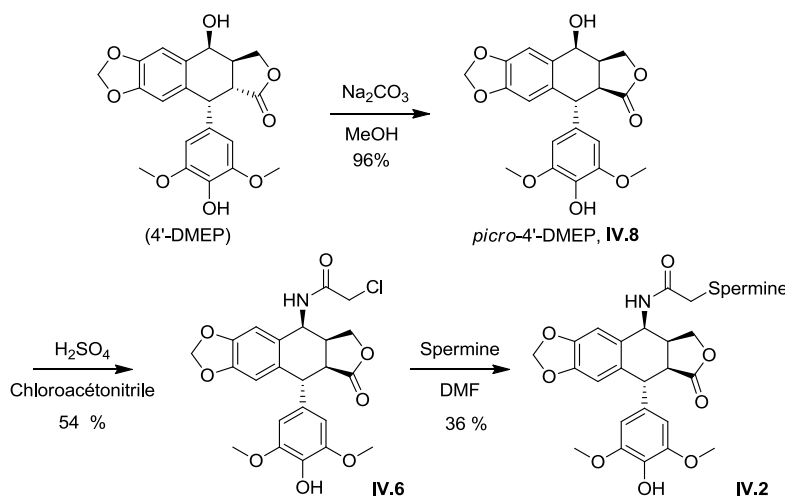


Schéma 62 : Synthèse de l'analogue IV.2.

L'épimérisation de la lactone de la 4'-DMEP a été conduite dans le méthanol en présence de carbonate de sodium. Cette réaction, dont la force motrice est une libération des contraintes angulaires de la déméthylépipodophyllotoxine, est quasi quantitative puisque la lactone *cis* est obtenue avec 96% de rendement.

La *picro*-4'-déméthylépipodophyllotoxine (*picro*-4'-DMEP, **IV.8**) a ensuite été traitée dans les conditions de la réaction de Ritter pour conduire au chloroacétamide **IV.6**. Ce dernier est obtenu avec un rendement plus faible (54%) que celui obtenu dans le cas de la lactone *trans* (96%). Cette chute du rendement de conversion a été attribuée à la formation parasite de l'épimère α en C4 (31%). En effet, la structure de la lactone *cis* **IV.8** étant moins contrainte que celle de la lactone *trans* (4'-DMEP), le

¹⁰⁴ Roulland, E.; Magiatis, P.; Arimondo, P.; Bertounesque, E.; Monneret, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3463-3471.

cycle aromatique E se retrouve en position quasi-équatoriale et n'encombre presque plus la face inférieure. L'addition du chloroacétonitrile sur le carbocation transitoire peut donc se faire sur les deux faces. Le sous-produit « α » (**IV.9**) est très insoluble dans le milieu réactionnel et peut être éliminé par simple filtration. Il est à noter que nous observons également au cours de cette transformation la formation d'une petite proportion de produit déshydraté **IV.10** (4 %) (Schéma 63).

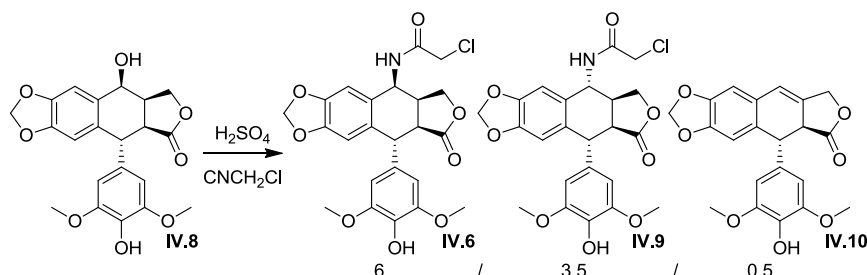


Schéma 63 : Réaction de Ritter sur la *picro*-4'-déméthylépipodophyllotoxine.

À partir du dérivé chloroacétamide **IV.6**, la dernière étape de notre synthèse consiste à substituer l'atome de chlore par la spermine. Cette réaction se fait avec un rendement de 36% et ne pose pas de problèmes particuliers.

La synthèse du premier analogue du F14512 a été réalisée en trois étapes avec un rendement global de 19 %.

IV.5 Synthèse de l'analogue **IV.3**

Pour cet analogue, il s'agit de faire varier la stéréochimie du centre C4 afin d'obtenir l'épimère en C4 du F14512. La stratégie mise en place vise à introduire une fonction amine sur la face α de l'épipodophyllotoxine avant d'aménager la partie spermine (Schéma 64).

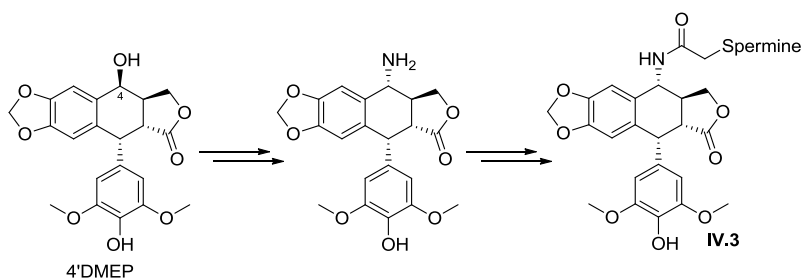


Schéma 64 : Stratégie de synthèse de l'analogue **IV.3**.

IV.5.1 Introduction de l'azote en α sur le carbone C4

Comme nous l'avons vu précédemment, alors qu'il est assez facile d'introduire le chloroacétamide sur la face supérieure β de la déméthylépipodophyllotoxine *via* une réaction de Ritter, l'introduction du même motif sur la face inférieure α est plus problématique dans la mesure où celle-ci

est encombrée par la présence du groupement aromatique. Cette observation nous a conduits à envisager un autre type de transformation que la réaction de Ritter pour aménager un groupement aminé sur la face α . L'option qui a été retenue va consister à activer l'alcool en position 4 et à le substituer avec un précurseur d'amine selon un mécanisme de S_N2 pour inverser la stéréochimie du centre considéré. Le groupement nucléophile qui a été retenu est un azoture qui pourra, dans une deuxième étape, être facilement réduit en amine. L'introduction de l'azoture sur le squelette de la 4'-DMEP peut être réalisée selon plusieurs approches comme la réaction de Mitsunobu (et ses variantes) ou par substitution directe d'un groupement nucléofuge.

IV.5.1.1 Via une réaction de Mitsunobu

Les conditions de Mitsunobu permettent d'opérer des inversions de configuration d'un alcool en azoture.¹⁰⁵ Pour cela, un azoture d'acide (par ex. : l'azoture de diphenylphosphoryle (DPPA)¹⁰⁶, l'azoture de mésyle (MsN_3)¹⁰⁷, l'azoture de benzoyle ou encore l'azoture de nicotinyne (NCA)¹⁰⁸) est utilisé pour cette transformation au lieu d'un acide carboxylique qui est le nucléophile classiquement utilisé (Figure 30).

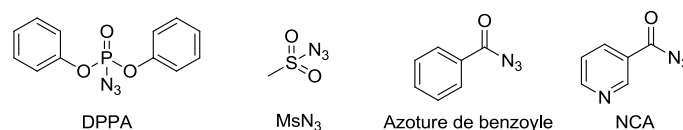


Figure 30 : Structures de DPPA, MsN_3 , Azoture de benzoyle, NCA.

Comme dans une réaction de Mitsunobu classique, la triphénylphosphine vient dans un premier temps s'additionner sur le diazocarboxylate pour former la bétaine intermédiaire qui vient ensuite déprotoner l'alcool (Schéma 65). L'alcoolate libéré va attaquer l'atome de phosphore électrophile libérant à son tour un nucléophile azoté qui va réaliser une addition-élimination sur l'azoture d'acide. L'azoture peut alors venir substituer l'alcool activé, libérant l'oxyde de triphénylphosphine.¹⁰⁸

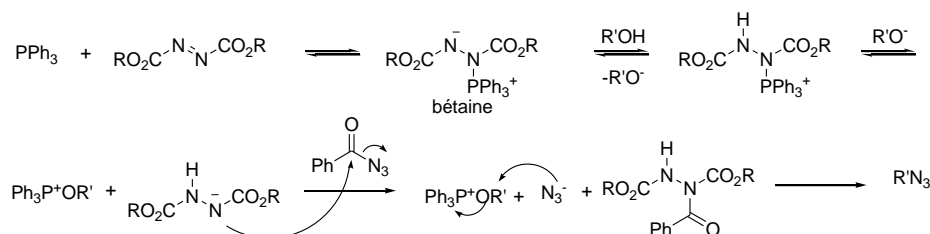


Schéma 65 : Mécanisme d'inversion de configuration d'un alcool en azide *via* une réaction de Mitsunobu.

¹⁰⁵ Kumara Swamy, K. C.; Bhuvan Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Pavan Kumar, K. V. P. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551–2651.

¹⁰⁶ Lal, B.; Pramanik, B. N.; Manhas, M. S.; Bose, A. K. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 1977-1980.

¹⁰⁷ He, L.; Wanunu M.; Byun, H. S.; Bittman, R. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6049-6055.

¹⁰⁸ Papeo, G.; Posteri, H.; Vianello P.; Varasi M. *Synthesis* **2004**, 2886-2892.

Lors de la première expérience nous avons testé les conditions suivantes : DPPA, PPh_3 , DIAD, THF ce qui nous a permis d'isoler le produit attendu avec un rendement global de 23 % et une sélectivité α/β de 70/30. Cependant cette expérience s'est montrée peu reproductible même en changeant l'agent azidant (azoture de benzoyle ou TMSN_3), en faisant varier la température (0 °C à 40 °C) ou le solvant (dichlorométhane, tétrahydrofurane). Ce problème est probablement dû à la présence du phénol libre de la 4'-DMEP qui doit interagir avec la bétaine intermédiaire avant que celle-ci ne réagisse avec l'agent azidant utilisé.

Nous avons alors testé une méthode alternative impliquant DPPA et DBU.¹⁰⁹ Dans cette réaction, l'alcool va réagir sur le DPPA et libérer un ion azoture (Schéma 66). Le sel de DBU formé par la libération de HN_3 a l'avantage d'être soluble dans les solvants organiques. Cet azoture va alors pouvoir aller substituer l'alcool activé.

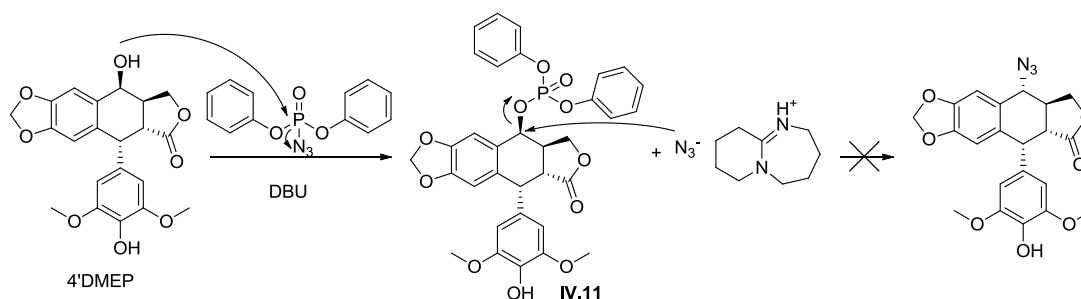


Schéma 66 : Mécanisme de la réaction au DPPA/DBU appliqué à la 4'-DMEP.

Les conditions décrites ci-dessus ont été utilisées sur le motif 4'-DMEP mais le produit désiré n'a pas été détecté. Nous avons cependant isolé avec un rendement d'environ 60 % l'intermédiaire phosphorylé (produit majoritaire dans le brut réactionnel, **IV.11**). Bien que l'azoture soit solubilisé dans le milieu réactionnel sous forme de sel organique, il est possible que le complexe $\text{DBU-H}^+ / \text{N}_3^-$ soit trop volumineux pour substituer l'alcool activé.

Cet intermédiaire phosphorylé correspond en fait à la forme activée de l'alcool. Nous avons donc tenté dans une deuxième étape de le substituer avec un azoture en forçant les conditions réactionnelles. Le composé phosphorylé (**IV.11**) a été isolé puis traité à 90 °C avec trois équivalents de NaN_3 , dans le DMF pendant 20 h. Cependant, aucune conversion n'est obtenue et le produit de départ est intégralement récupéré. Nous n'avons pas cherché plus loin dans cette direction.

Nous avons alors changé d'approche et tenté d'activer l'alcool sous forme de tosylate ou de mésylate.

¹⁰⁹ Thompson, A. S.; Humphrey, G. R.; DeMarco, A. M.; Mathre D. J.; Grabowski, E. J. J. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5886-5888.

IV.5.1.2 Activation de l'alcool sous forme de tosylate ou de mésylate

Dans un premier temps nous avons essayé de tosyler l'alcool secondaire de la 4'-DMEP en la traitant avec 4 équivalents de TsCl en présence de triéthylamine. Dans ces conditions, nous n'avons isolé que le produit de tosylation du phénol (**IV.12**) sans observer de tosylation du groupement alcool. Afin de renforcer la nucléophilie de l'alcool, nous avons utilisé une base forte (NaH) qui serait à même de le déprotoner, cependant sans amélioration (Schéma 67).

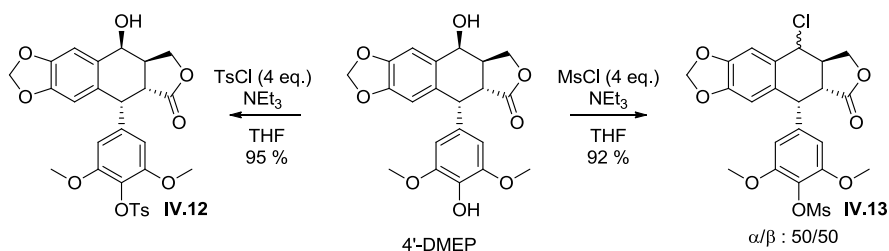


Schéma 67 : Réactivité du 4'-DMEP avec TsCl ou MsCl.

Nous avons alors changé de groupement activant et opté pour le chlorure de mésyle (Schéma 67). Dans les conditions classiques de mésylation (MsCl, triéthylamine, tétrahydrofurane ou dichlorométhane) il nous a été impossible d'isoler le produit désiré. En revanche, un mélange 50/50 d'isomères α/β -chlorés en position C4 et mésylés sur le phénol (**IV.13**) se forme avec un très bon rendement (92%). L'atome de chlore provient du déplacement du mésylate en C4 qui doit se former transitoirement. De façon surprenante, le dérivé chloré est obtenu sous la forme d'un mélange de deux épimères.

Nous avons alors choisi une troisième voie en transformant l'alcool en halogénure.

IV.5.1.3 Transformation de l'alcool en un dérivé halogéné

Nous avons vu qu'avec la réaction de Ritter il était possible d'introduire de façon sélective un nucléophile sur la face supérieure de la 4'-DMEP. Le mécanisme de cette réaction passant par un carbocation, nous avons tenté de le transposer à l'introduction d'un atome de brome en position C4 de la 4'-DMEP en traitant cette dernière avec de l'acide bromhydrique (Schéma 68).

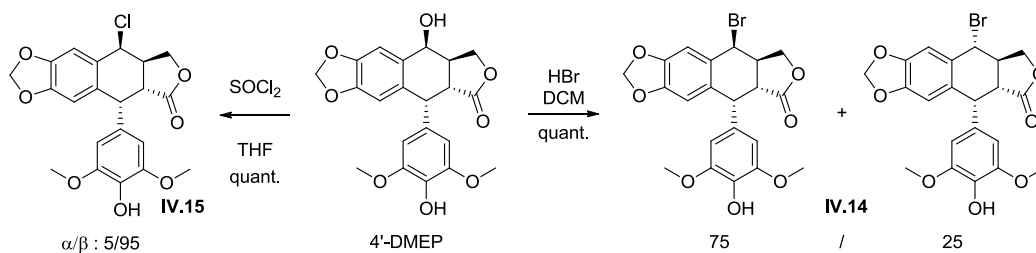


Schéma 68 : Réaction de bromation / chloration de la 4'-DMEP.

La réaction a été réalisée en faisant buller du HBr dans une solution chlorométhylénique de 4'-DMEP. Après 2 h de réaction, nous avons isolé le dérivé bromé (**IV.14**) attendu de façon quantitative et sous la forme d'un mélange 75/25 de deux épimères β/α . La réaction est opérante mais la sélectivité observée est moins bonne que dans le cas du chloroacétonitrile.

À ce stade du travail, nous n'avons pas beaucoup d'autres options pour la synthèse rapide de l'azoture **IV.16**. Une dernière tentative de chloration de la 4'-DMEP avec SOCl_2 a été réalisée en utilisant du chlorure de thionyle. En effet ce réactif est ambivalent et peut, selon les conditions réactionnelles, conduire au dérivé halogéné correspondant avec inversion de configuration ($\text{SOCl}_2/\text{pyridine}$, mécanisme de type $\text{S}_{\text{N}}2$) ou rétention de configuration (SOCl_2 seul, mécanisme de type $\text{S}_{\text{N}}1$).¹¹⁰ La réaction a donc été lancée en traitant la 4'-DMEP avec SOCl_2 dans le THF et nous avons eu l'agréable surprise d'observer la formation très majoritaire du produit chloré β (**IV.15**) dans le brut réactionnel (95/5, Schéma 68). La stéréochimie du centre C4 a été confirmée en analysant les constantes de couplage du proton porté par le carbone 4. En effet, le produit présent à plus de 95 % dans le mélange brut a une constante de couplage de 3,7 Hz (caractéristique d'une constante entre deux protons *cis* sur un cycle). Le sous-produit de la réaction (l'épimère α , 5%) présente quant à lui une constante de couplage de 10,5 Hz (deux protons *trans* dans un cycle). Cette hypothèse a été confirmée en comparant les spectres obtenus avec les données spectrales de la littérature pour le composé chloré **IV.15**.¹¹¹

Ces produits n'ont pas été purifiés car ils se dégradent sur silice et ont été engagés directement dans l'étape suivante de substitution par un azoture.

La réaction du dérivé halogéné (95/5) **IV.15** avec de l'azoture de sodium dans du DMF conduit majoritairement à la 4 α -azido-4'-déméthylpodophyllotoxine (**IV.16**) sous la forme d'un mélange 95/5 de deux épimères avec un rendement global de 91 % (Schéma 69). À ce stade il nous a été impossible de séparer les deux épimères.

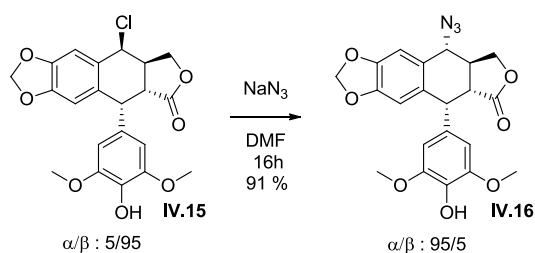


Schéma 69 : Substitution du chlore par un azoture.

Nous avons donc réussi à introduire de façon stéréosélective l'azoture sur la face α de la molécule. Il ne nous restait alors plus qu'à réaliser le couplage avec la spermine.

¹¹⁰ Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 75, 332-338.

¹¹¹ Kuhn, M.; Keller-Juslén, C.; Wartburg, A. *Helv. Chim. Acta* 1969, 52, 944-947.

IV.5.2 Fin de la synthèse de l'analogue IV.3

L'azoture **IV.16** a été réduit par hydrogénation catalytique sur Pd/C (0.05 éq.) dans un mélange acétate d'éthyle /méthanol : 2/1 pour conduire à l'amine **IV.17** qui a pu être isolée avec un rendement de 85 %, sous la forme d'un seul épimère (α) après chromatographie sur colonne de silice (Schéma 70). L'amine a ensuite été acétylée par du chlorure de chloroacétyle en milieu pyridine. Même en travaillant avec un défaut de chlorure de chloroacétyle, nous n'avons jamais pu isoler le produit de mono addition sur l'amine avec un rendement satisfaisant puisque le phénol réagit également pour conduire à l'ester correspondant. Nous avons donc décidé de convertir intégralement l'amino-phénol **IV.17** en amido-ester **IV.18** en utilisant un excès de réactifs (4 équivalents de chlorure de chloroacétyle et de pyridine) avant de déprotéger sélectivement le phénol. Le di-adduit **IV.18** a ainsi été isolé avec un rendement de 95 %.

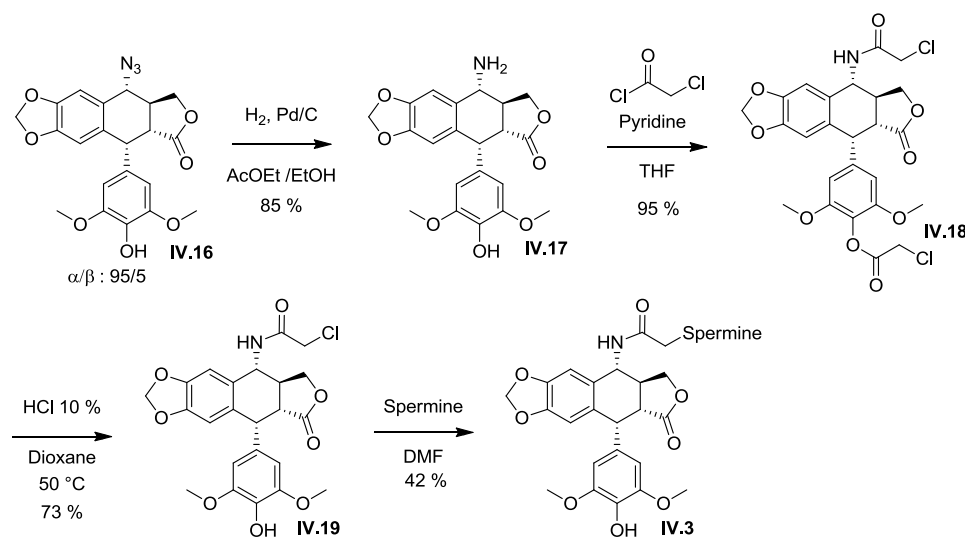


Schéma 70 : Fin de la synthèse de l'analogue IV.3.

La déprotection du phénol **IV.18** a été réalisée dans un premier temps avec du tétrahydroborate de sodium ($NaBH_4$) dans l'éthanol. Le problème de ce réactif est qu'il possède un caractère basique qui induit une isomérisation de la lactone à hauteur de 50 %. Nous avons alors tenté une hydrolyse douce de l'ester phénolique avec de l'acétate de sodium dans l'éthanol. Cette réaction conduite à 60°C induit également une isomérisation de la lactone à hauteur de 10 %. Finalement, des conditions d'hydrolyse appropriées ont été trouvées en réalisant la déprotection « sud » dans un mélange 1,4-dioxane/HCl 10 % à 50 °C. Le phénol correspondant **IV.19** est isolé avec un rendement de 73 % et l'utilisation de conditions acides a permis d'éviter l'isomérisation de la lactone.

À ce niveau de la synthèse, il ne nous restait plus qu'à substituer le chlore par la spermine dans les conditions utilisées précédemment. L'épimère C4 de F14512 (**IV.3**) est obtenu avec 42 % de rendement sur cette dernière étape.

La stratégie de synthèse de l'analogue **IV.3** repose sur l'introduction par la face arrière d'une fonction amine. Cette transformation a été réalisée en traitant successivement la 4'-DMEP avec le chlorure de thionyle puis l'azoture de sodium. L'azoture a ensuite été réduit, puis l'amine acétylée avant couplage à la spermine. L'analogue **IV.3** a été synthétisé en 6 étapes linéaires avec un rendement global de 23 %.

IV.6 Synthèse de l'analogue IV.4

Pour cet analogue, nous avons élaboré une synthèse qui autorise la permutation de la stéréochimie de deux centres, C4 et lactone. Pour cela nous avons développé deux voies de synthèse différentes reposant sur le travail déjà réalisé pour la préparation des analogues **IV.2** et **IV.3**.

IV.6.1 Première approche : au départ d'un intermédiaire de la synthèse de l'analogue IV.3

Nous sommes repartis de l'intermédiaire **IV.18** qui avait été obtenu en quatre étapes à partir de la 4'-DMEP par chloration en C4, déplacement du chlore par un azoture, hydrogénation catalytique de l'azoture et acétylation. Nous avons déjà observé que les conditions basiques (tétrahydroborate de sodium) utilisées pour déprotéger le phénol (synthèse de l'analogue **IV.3**) induisaient également une épimérisation de la lactone. Nous avons donc envisagé d'hydrolyser l'ester phénolique et d'induire de façon concomitante l'épimérisation de la lactone dans un solvant protique en présence d'une base. C'est ce que nous avons réalisé en traitant l'intermédiaire diacétylé **IV.18** avec du carbonate de potassium dans du méthanol. La lactone *cis* présentant le chloroacétamide en α (**IV.9**) a ainsi été isolée avec un rendement de 74 % (Schéma 71).

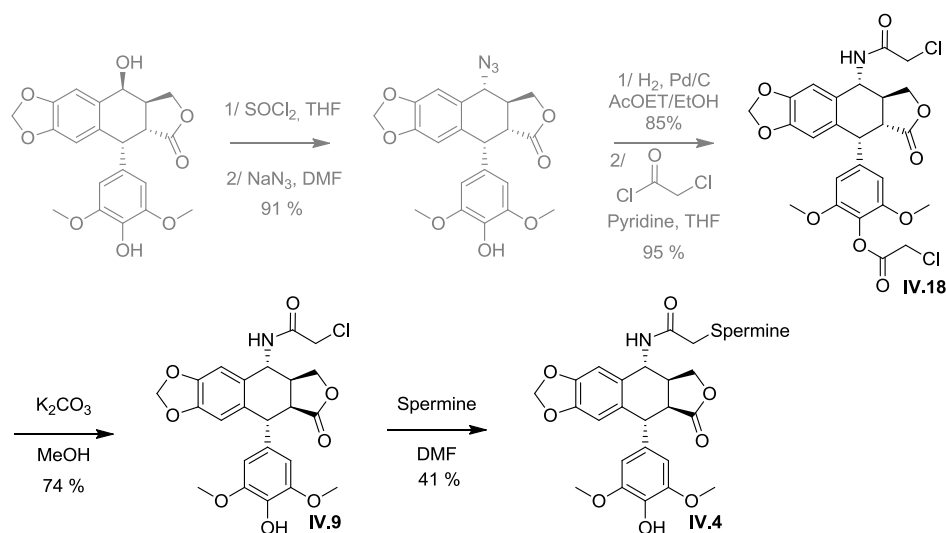


Schéma 71 : Synthèse de l'analogue **IV.4** en six étapes.

La synthèse de l'analogue IV.4 de la 4'-DMEP est terminée par substitution du chlore par la spermine et le composé désiré est isolé avec 41 % de rendement (rendement global de 22 % pour six étapes).

IV.6.2 Deuxième approche : au départ d'un intermédiaire de la synthèse de l'analogue IV.2

Dans l'approche mise en place pour la synthèse de l'analogue IV.2, nous avons observé (Schéma 63) que lorsque la réaction de Ritter était réalisée sur la *micro*-4'-DMEP, nous isolions les deux épimères α/β du chloroacétamide dans des proportions proches de 4/6. L'épimère α (IV.9) était éliminé par filtration car très insoluble dans les solvants organiques usuels. Or, dans l'approche que nous souhaitons développer ici, il s'agit de l'épimère qui nous intéresse. L'épimère α a donc été recyclé en lui greffant la spermine avec un rendement de 41 % (Schéma 72).

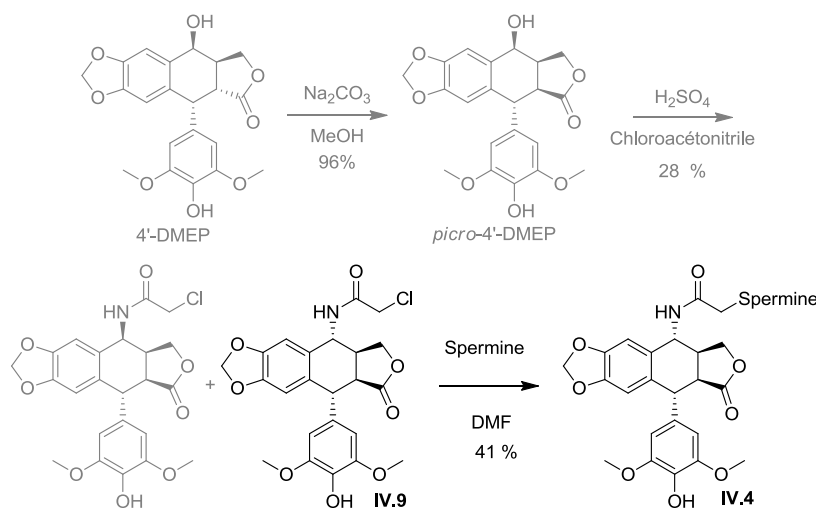


Schéma 72 : Synthèse de l'analogue IV.4 en trois étapes.

Bien que cette synthèse soit plus courte que la précédente (3 étapes en partant du 4'-DMEP), l'analogue IV.4 a été synthétisé avec un rendement global de seulement 11 % (contre 22 % et 6 étapes pour la synthèse qui précède).

IV.7 Conclusion

Nous avons travaillé dans ce chapitre sur la synthèse d'analogues du composé F14512 dans le but de pouvoir caractériser les impuretés qui pourraient apparaître au cours de sa fabrication ou de son stockage.

Trois analogues de F14512 ont été synthétisés en opérant des variations structurales sur les centres C2 et C4.

L'analogue IV.2 contenant une lactone *cis* a été obtenu par simple traitement basique de la 4'-DMEP dans le méthanol pour conduire au produit thermodynamiquement le plus stable. Le

chloroacétamide a été introduit *via* une réaction de Ritter. Après condensation avec la spermine, le composé désiré a été obtenu en 3 étapes avec un rendement global de 19 %.

Pour l'analogue **IV.3**, la stratégie repose sur l'introduction d'un groupement aminé sur la face α du squelette podophyllotoxine. Pour cela, nous avons mis à profit l'encombrement stérique de la face inférieure de la molécule pour transformer l'alcool C4 en chlore (avec rétention de configuration), puis en azoture (avec inversion de la configuration). Cet azoture, introduit sur la face α a ensuite été réduit, acétylé et la spermine couplée. Cette synthèse linéaire (6 étapes) a permis d'isoler le produit désiré avec un rendement de 23 %.

Finalement, pour l'analogue **IV.4**, nous avons fait varier les deux positions C2 et C4. Ce produit a été obtenu selon deux approches différentes en reprenant les synthèses des analogues **IV.2** et **IV.3**.

Les propriétés pharmacologiques des produits obtenus ainsi que des intermédiaires de synthèse sont actuellement en cours d'évaluation par les laboratoires Pierre Fabre.

Chapitre V
Formulations
Nanométriques de
Podophyllotoxines

« Nanotechnology has the potential to revolutionize cancer diagnosis and therapy ». C'est avec cette phrase que Robert Langer introduit son article de revue sur la nanomédecine publiée en 2007 dans *Nature Nanotechnology*.¹¹² En effet, les nanotechnologies sont aujourd'hui utilisées dans différents domaines de la médecine, que ce soit pour diagnostiquer une maladie, la soigner, ou suivre son évolution.¹¹³

Comme nous venons de le voir dans la partie précédente, l'adressage des agents anticancéreux vers les cellules tumorales est important afin de limiter les interactions avec les cellules saines. Nous avons vu qu'avec le composé F14512, il était possible d'adresser un principe actif vers des cellules cancéreuses qui sur-expriment le système de transport des polyamines (STP). Il existe d'autres formulations qui permettent de prendre en charge (vectorisation) et d'emmener des principes actifs médicamenteux au contact de leur cible (adressage), parmi lesquelles certaines formulations nanométriques telles que les liposomes, dendrimères, matrices polymères ou encore des conjugués principe actif / protéine. Cette liste n'est pas exhaustive et nous reviendrons un peu plus loin sur ces différents objets. Ces objets sont des cargos nanométriques capables de vectoriser une molécule pharmacologiquement intéressante vers sa cible. Pour cela, ils sont habillés de façon à cibler les foyers tumoraux (ciblage passif) ou les cellules cancéreuses (ciblage actif).

V.1 Ciblage passif ou actif

Il existe deux types de ciblage de ces nano-objets : passif ou actif. La première permet leur accumulation progressive dans les foyers tumoraux par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) alors que la seconde repose sur une interaction entre des récepteurs sur-exprimés par les cellules tumorales et des ligands de surface du vecteur nanométrique.

V.1.1 Ciblage passif

Dans la première stratégie, des nano-objets sont vectorisés vers les foyers tumoraux par **effet EPR**. Les tumeurs sont en effet irriguées par des vaisseaux sanguins qui ont une croissance extrêmement rapide qui conduit à la formation de vaisseaux imparfaits dans lesquels les cellules endothéliales (constitutives de la paroi vasculaire) ne sont pas jointives. Cette disjonction va donner naissance à des pores qui ont un diamètre compris entre 200 et 600 nm (Figure 31)¹¹⁴ selon le type de tumeur et qui peuvent laisser passer des objets (nanométriques) qui ont une taille adéquate. Par opposition, dans un vaisseau sanguin normal l'endothélium est jointif et ne peut pas laisser passer les

¹¹² Peer, D.; Karp, J.M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751-760.

¹¹³ Boisseau, P.; Loubaton, B. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **2011**, *12*, 620-636.

¹¹⁴ Hobbs, S. K.; Monsky, W. L.; Yuan, F.; Roberts, W. G.; Griffith, L.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4607-4612.

nanoobjets mais seulement les molécules de petite taille. Les particules nanométriques ne peuvent donc a priori que diffuser dans les foyers tumoraux.

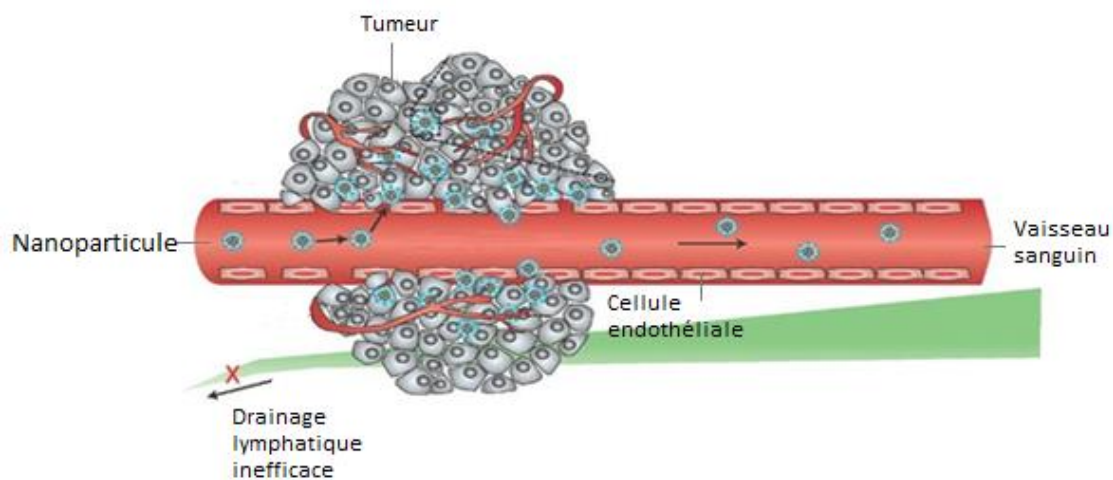


Figure 31 : Effet EPR au niveau tissulaire.

Une fois que la particule a pénétré dans la tumeur, elle ne peut plus en ressortir car le drainage lymphatique tumoral est faible. Les particules chargées en molécule active vont alors s'accumuler dans la tumeur et avoir une action thérapeutique. Pour un effet EPR « optimal », il est nécessaire d'avoir des particules circulantes qui vont s'accumuler progressivement à chaque fois qu'elles passeront à proximité du foyer tumoral. Elles doivent donc être protégées de la métabolisation ou de l'élimination par voie hépatique ou rénale. Cette « protection » du vecteur nanométrique peut être conférée par des motifs polyéthylène glycols (PEG) exprimés à la surface de la nanoparticule.¹¹⁵ En effet, les PEG présentent plusieurs avantages : i) ils sont solubles dans l'eau, ii) peu immunogènes et surtout iii) induisent un encombrement stérique tel à la surface du nanovecteur que les protéines impliqués dans la première ligne de défense de l'organisme (opsonines) ne peuvent plus se fixer à la surface de la particule. La « non fixation » des opsonines va retarder la capture des particules nanométriques par les macrophages, augmentant de ce fait le temps de résidence sanguine du vecteur en le rendant « furtif ».¹¹⁶

En outre, la taille de ces nanovecteurs influence leur temps de circulation puisque les particules de diamètre supérieur à 200 nm seront plus facilement détruites par les macrophages (phagocytose),¹¹⁷ alors que les particules plus petites que 5 nm seront évacuées très rapidement par clairance rénale. Elle influera également sur leur biodistribution et leur pénétration dans la cellule.¹¹⁸

¹¹⁵ Lukyanov, A. N.; Gao, Z.; Mazzola, L.; Torchilin, V.P. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1424-1429.

¹¹⁶ Kavitha, K.; BhalaMurugan, G. L. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* **2013**, *4*, 296-304.

¹¹⁷ Ogier, J.; Arnault, T.; Doris, E. *Future Med. Chem.* **2009**, *4*, 693-711.

¹¹⁸ Petros, R. A.; DeSimone, J. M. *Nature Reviews* **2010**, *9*, 615-627.

V.1.2 Ciblage actif

Dans cette deuxième catégorie, les nanostructures sont fonctionnalisées sur leur couche extérieure avec des **molécules ciblantes**. De fait, les cellules cancéreuses sur-expriment certains récepteurs ou protéines à leur surface ou dans leur microenvironnement. En fonctionnalisant les nano-objets, il va donc être possible de les vectoriser de façon préférentielle vers les cellules ou les foyers tumoraux en ciblant ces protéines. Ces fonctionnalisations peuvent être diverses, on retrouve par exemple :

- des **anticorps monoclonaux** qui permettent de fonctionnaliser des nanoparticules afin de les vectoriser notamment vers les cellules sur-exprimant un antigène spécifique ;¹¹⁹
- des **aptamères** (oligonucléotides de 5 à 40 kDa) qui fonctionnent un peu comme les anticorps puisqu'ils ont une grande sélectivité et une grande affinité pour leur cible ;
- des **ligands naturels** tels que l'acide folique. En effet, la plupart des tissus cancéreux (surtout épithéliaux, ovariens, mammaires, pulmonaires, cérébraux, cervicaux et hépatiques) sur-expriment les récepteurs à l'acide folique alors que ceux-ci sont peu présents dans les tissus sains. L'acide folique est une petite molécule, stable, non-immunogène et surtout qui maintient une certaine affinité pour les récepteurs, même une fois conjugué à un principe actif ou un agent de contraste.^{120,121} Les **polyamines** et leur système de transport font également partie de ces ligands naturels.

V.1.3 Nanomédicaments de troisième génération

Les propriétés de ciblage passif et actif peuvent être mises en commun afin de cumuler leurs effets et donner naissance à des nanomédicaments dits de troisième génération. Pour cela ces nanovecteurs doivent combiner plusieurs caractéristiques :

- être de taille inférieure à 200 nm pour augmenter leur temps de circulation ;
- posséder une enveloppe extérieure recouverte de PEG (ou autre polymère) permettant de rendre le matériau furtif ;
- être fonctionnalisé en surface avec des molécules ciblantes (ex : anticorps, acide folique, polyamines...);
- être capable de prendre en charge une quantité importante de molécules actives.

¹¹⁹ Barrajon-Catalan, E.; Menendez-Gutiérrez, M. P.; Falcó, A.; Saceda, M.; Catania, A.; Micol, V. Immunoliposomes : A Multipurpose Strategy in Breast Cancer Targeted Therapy, *Breast Cancer - Current and Alternative Therapeutic Modalities*, Prof. Esra Gunduz (Ed.), **2011**, 435-453.

¹²⁰ Mansoori, A.; Brandenburg, K.; Shakeri-Zadeth, A. *Cancers* **2010**, *2*, 1911-1928.

¹²¹ Zwicke, G. L.; Mansoori, G. A.; Jeffery, C. J. *Nano Reviews* **2012**, *3*, 1-11.

V.2 Nanomédicaments

Les nanomédicaments résultent de l'application des nanotechnologies à la médecine.

V.2.1 Intérêts des nanovecteurs

Environ 40 % des composés présentant une activité pharmaceutique à l'issue des criblages à haut-débit ne sont pas valorisés car ils sont trop peu solubles dans l'eau. Beaucoup de molécules anticancéreuses présentent cette caractéristique (souvent des composés polycycliques, ex : camptothécine, paclitaxel, Figure 32) car elle leur permet de passer la membrane phospholipidique des cellules. Les nanomédicaments permettent de résoudre ce problème de solubilité aqueuse en prenant en charge la molécule active.

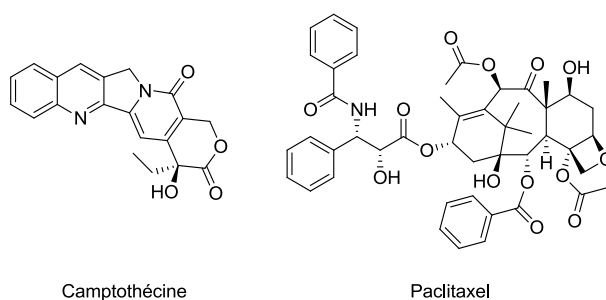


Figure 32 : Structure de la Camptothécine et du Paclitaxel.

En amenant le médicament directement là où il doit agir, le nanomédicament limite les effets secondaires sur les organes sains. Il devient alors possible de diminuer la dose administrée aux patients.

Il existe plusieurs formes de nanovecteurs capables d'emmener un produit sur son site d'action. Idéalement, ces objets doivent présenter un certain nombre de propriétés par rapport au principe actif seul :¹¹²

- ils doivent le **protéger** du milieu biologique extérieur (dégradation et interactions avec d'autres objets biologiques) ;
- ils doivent augmenter son **absorption** dans les tissus tumoraux ;
- ils doivent permettre de contrôler la **pharmacocinétique** du produit ainsi que sa **distribution** dans les tissus ;
- ils doivent augmenter son **internalisation** cellulaire ;
- ils doivent le **vectoriser** de façon préférentielle vers les cellules ou tissus atteints ;
- ils doivent pouvoir transporter **plusieurs molécules thérapeutiques** à la fois.

D'autre part le nanovecteur doit avoir certaines caractéristiques :

- ils doivent être **biocompatibles** et facilement fonctionnalisables ;

- ils doivent être **solubles dans l'eau** ou être sous forme d'une suspension colloïdale ;
- ils doivent avoir une **demi-vie** de circulation dans le sang assez **longue**.

Il existe plusieurs structures de nanovecteurs qui répondent à ces critères. Chaque objet ayant des propriétés physico-chimiques et des modes de fonctionnement différents.

V.2.2 Les différentes formes de nanovecteurs

Plusieurs systèmes de 70 à 200 nm de diamètre ont été développés afin de cibler les foyers tumoraux par effet EPR. Parmi ces objets nous retrouvons les matrices polymères, les liposomes, les dendrimères, les nanotubes de carbone, des nanoparticules métalliques ou céramiques et des micelles.

V.2.2.1 Matrices polymériques

Les matrices composées de polymères biocompatibles et biodégradables peuvent encapsuler, solubiliser ou être liées de façon covalente aux molécules organiques (principes actifs ou fluorophores). Leur taille est habituellement comprise entre 100 et 200 nm. Ces nanoparticules peuvent se présenter sous plusieurs formes. La première est une suspension d'un polymère hydrophobe dans une solution aqueuse avec un tensioactif. Pour une application médicale, ce polymère doit être biodégradable (ex : poly(acide lactique) (PLA) ou poly(cyanoacrylates d'isohexyl) (PHCA) Figure 33). Ces formulations hydrophobes sont cependant rapidement éliminées de la circulation sanguine par phagocytose.¹²²

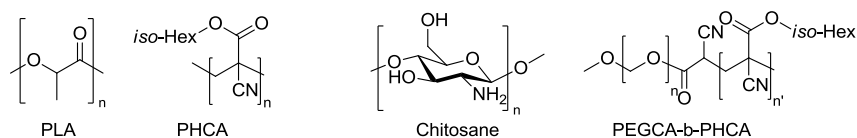


Figure 33 : Quelques polymères utilisés pour des applications médicales.

Afin de masquer cette hydrophobicité et d'améliorer la tolérance, une deuxième classe de copolymères mixtes hydrophiles / hydrophobes a été développée. Comme polymères hydrophiles on retrouve les éthers de PEG, mais également des sucres naturels (chitosane).^{123, 124} Par exemple, l'équipe de Couvreur a développé une nanoparticule de poly(héxadécylcyanoacrylate) recouvertes de PEG. Ces nanoparticules (PEGCA-co-PHCA) ont des temps de circulation dans le sang bien plus long. Six heures après injection intraveineuse à des souris, 30 % du copolymère injecté est toujours présent dans la circulation sanguine alors que le PHCA seul est éliminé après quelques minutes.¹²⁵

¹²² Vauthier, C.; Dubernet, C.; Fattal, E.; Pinto-Alphandary, H.; Couvreur, P. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 519-548.

¹²³ Zweers, M. L. T.; Engbers, G. H. M.; Grijpma, D. W.; Feijen, J. *J. Control Release* **2006**, *114*, 317-324.

¹²⁴ Zhang, Z.; Li, S. H.; Feng, S. S. *Biomaterials* **2007**, *28*, 1889-1899.

¹²⁵ Perachia, M. T.; Fattal, E.; Desmaële, D.; Besnard, M.; Noël, J. P.; Gomis, J. M.; Appel, M.; Angelo, J.; Couvreur, P. *J. Control. Release* **1999**, *60*, 121-128.

V.2.2.2 Liposomes

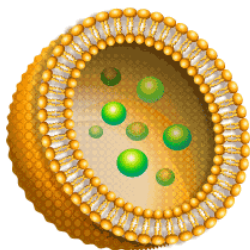


Figure 34 : Structure d'un liposome.

Les liposomes sont des particules colloïdales formées d'une double couche lipidique enveloppant un cœur aqueux (Figure 34). Ici deux types de molécules pourront être transportés : les molécules hydrophiles dans le cœur et les molécules hydrophobes dans la bicouche lipidique.

Comme les nanoparticules polymériques, les liposomes peuvent être vectorisés par voie passive ou active en fonctionnalisant leur surface. La vitesse de libération des produits encapsulés dépend essentiellement de l'épaisseur de la double couche lipidique. Pour former un liposome, il faut que l'amphiphile utilisé ait une chaîne hydrophobe assez importante (cf. paramètre d'empilement critique, CPP) rendant la double couche peu perméable au passage des molécules hydrophiles dans le cœur.

Des polymères biodégradables tels que des PLA-co-PEG ont été utilisés afin de rendre les liposomes un peu plus perméables. À titre d'exemple, lorsque le taxotère est chargé dans un tel polymère, 60 % de la dose initiale est libérée en 1 jour contre seulement 25 % pour un polymère non biodégradable (PEG-polybutadiène).¹²⁶ Plusieurs liposomes ont déjà été approuvés par la FDA, par exemple : Doxyl[®] en 1995 ou DepoDur[®] en 2004.

Paramètre d'empilement critique :¹²⁷

La structure selon laquelle un amphiphile va se structurer peut être déterminée théoriquement en calculant son paramètre d'empilement critique (« Critical Packing Parameter », CPP ou P, Figure 35) dont la formule est : $CPP = \frac{v}{l_c \times a_0}$.

Avec :

- v : le volume de la partie carbonée
- l_c : la longueur de la chaîne carbonée
- a_0 : l'aire de la tête polaire

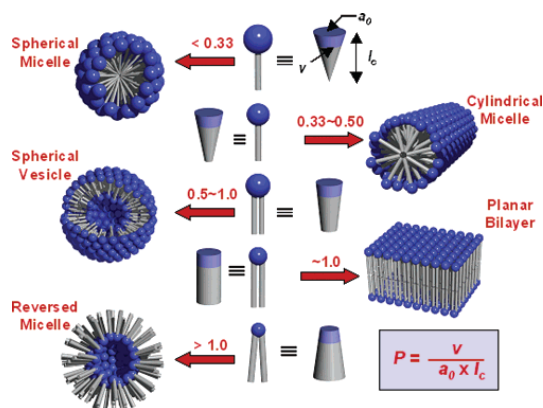


Figure 35 : Détermination de la structure colloïdale grâce au CPP.¹²⁷

On peut donc déterminer des ordres de grandeur de CPP pour chaque structure colloïdale :

- $CPP < 0,33$: micelle sphérique
- $0,33 < CPP < 0,50$: micelle cylindrique
- $0,50 < CPP < 1,00$: liposomes ou vésicules

¹²⁶ Ahmed, F.; Pakunlu, R. I.; Brannan, A.; Bates, F.; Minko, T.; Discher, D. E. *J. Control. Release* **2006**, *116*, 150-158.

¹²⁷ Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, H. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1401-1443.

- CPP ~ 1,00 : bicouche
- CPP > 1,00 : micelles sphériques ou cylindriques inverses

V.2.2.3 Les dendrimères

Un dendrimère est une macromolécule organique (environ 10 nm de diamètre) constituée de dendrons qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central (Figure 36).¹²⁸ À chaque nouvelle couche on parle de nouvelle génération. Alors que les premières générations de dendrimères ont des formes plates (disque), les générations supérieures prennent des formes « sphériques ». Il se crée alors une cavité hydrophobe à l'intérieur du dendrimère. Ainsi, la solubilité aqueuse du paclitaxel est augmentée d'un facteur 270 avec un dendrimère de poly(glycerol) de troisième génération et d'un facteur 430 avec un dendrimère de cinquième génération.¹²⁹ Dans cette formulation, le principe actif est encapsulé dans la matrice hydrophobe du composé mais il peut également être lié de façon covalente à sa surface. Plusieurs molécules anticancéreuses ont ainsi été greffées (Doxorubicine, *cis*-platine, Paclitaxel...). Dans tous les cas, une amélioration de l'efficacité des nanomédicaments a été observée, notamment due à la multiprésentation du composé à ses cibles.¹³⁰

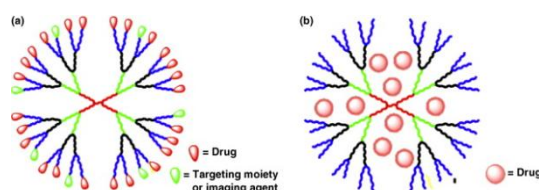


Figure 36 : Structure de dendrimères liant ou encapsulant un principe actif.¹²⁸

V.2.2.4 Les nanotubes de carbone

Depuis leur découverte en 1991 par Iijima, les nanotubes de carbone ont connu des applications dans de nombreux domaines dont celui de la nanomédecine.^{131,132} Des études ont montré que le nanotube de carbone peut être fonctionnalisé de façon non-covalente avec un phospholipide-PEG. La partie hydrophobe du polymère forme un complexe avec le nanotube pour le stabiliser en solution. Il se crée donc une interface hydrophobe à la surface du nanotube qui a été mise à profit pour encapsuler de la Doxorubicine (Figure 37).¹³³

Des applications *in vivo* ont également été décrites. Des molécules de Paclitaxel (PTX) ont été greffées à la surface des nanotubes de carbone *via* un lien PEG-phospholipide (Figure 37). Après

¹²⁸ Menjoge, A. R.; Kannan, R. M.; Tomalia, D. A. *Drug Discovery Today* **2010**, *15*, 171-185.

¹²⁹ Gupta, U.; Agashe, H. B.; Asthana, A.; Jain, N. K. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 649-658.

¹³⁰ Gingras, M.; Raimundo, J. M.; Chabre, Y. M *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1010-1017.

¹³¹ Iijima, S. *Nature* **1991**, *354*, 56-58.

¹³² Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 674-679.

¹³³ Liu, Z.; Sun, X.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H. *ACS Nano*. **2007**, *1*, 50-56.

injection de ces nanoparticules à des souris xénotransplantées avec des cellules cancéreuses 4T1 (cancer du sein), les auteurs ont observé une meilleure accumulation du PTX dans les foyers tumoraux (effet EPR) et une diminution 10 fois plus rapide du volume des tumeurs par rapport à l'utilisation du PTX seul.¹³⁴

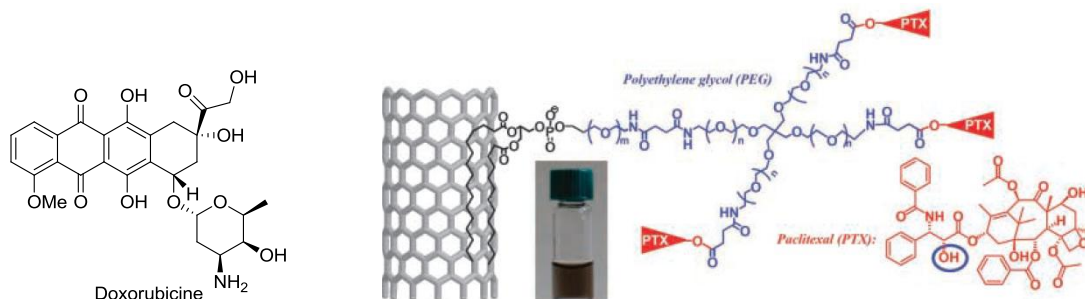


Figure 37 : Structure de la Doxorubicine et Nanotubes de carbone fonctionnalisés avec des copolymères phospholipidique-PEG conjugués au PTX.

V.3 Micelles

La liste de nanomédicaments présentée précédemment n'est pas exhaustive et d'autres nanovecteurs font l'objet de recherches. Parmi ces derniers, les micelles sont des formulations nanométriques attractives par la simplicité de leur structure sur lesquelles notre laboratoire travaille depuis quelques années. Les micelles sont des auto-assemblages supramoléculaires formant des suspensions colloïdales nanométriques (entre 5 et 100 nm). Elles ont un cœur hydrophobe permettant d'encapsuler des molécules organiques et une enveloppe hydrophile. Ce cœur hydrophobe a déjà été mis à profit et certaines micelles ont été approuvées par la FDA comme transporteurs de principes actifs pharmaceutiques. Par exemple, l'œstradiol a été approuvé sous forme de micelle (Estrasorb[®]) en 2003.¹³⁵ Les micelles peuvent également être utilisées pour vectoriser des agents de contraste afin de réaliser des diagnostics.¹³⁶

V.3.1 Concentration micellaire critique

Un **amphiphile**, l'élément de base de la micelle, est composé d'une tête hydrophile (polaire) qui assurera la stabilité dans l'eau et d'une partie hydrophobe qui formera le cœur de la micelle.

La **concentration micellaire critique** (CMC) est définie comme étant la concentration en amphiphile à partir de laquelle la première micelle sphérique va se former. En dessous de la CMC, une monocouche d'amphiphiles se forme à la surface du liquide (ici l'eau) et le reste est dispersé. En

¹³⁴ Liu, Z.; Chen, K.; Davis, C.; Sherlock, S.; Cao, Q.; Chen, X.; Dai, H. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 6652-6660.

¹³⁵ Torchilin, V. P. *Pharm. Res.* **2006**, *24*, 1-16.

¹³⁶ Torchilin, V. P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 235-252.

augmentant la concentration en amphiphiles, ces derniers vont commencer à s'auto-assembler pour former des micelles ($C > CMC$) (Figure 38).

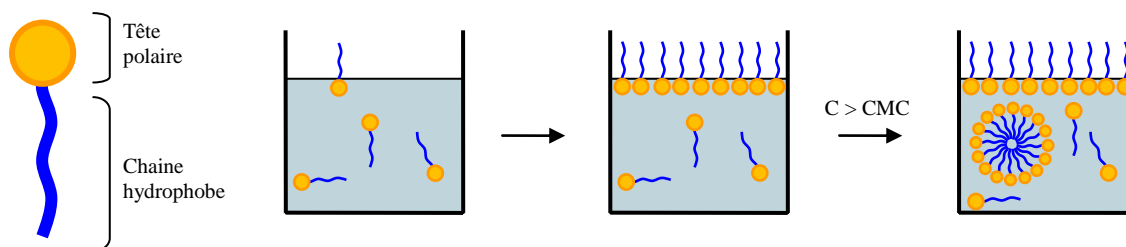


Figure 38 : Structure d'un amphiphile / Concentration micellaire critique.

La force régissant la formation des micelles est la diminution des répulsions entre la chaîne hydrophobe et le milieu aqueux ainsi qu'à la reconstitution de son réseau de liaisons hydrogènes. De plus, il y a un gain d'énergie lors de ce processus par la création d'interactions de van der Waals entre les chaînes hydrophobes au cœur de la micelle. Les têtes hydrophiles se positionnent alors à la surface de la micelle de façon à « masquer » le cœur et le stabiliser dans le milieu aqueux.

V.3.2 Nanomédicaments micellaires

V.3.2.1 Accumulation passive

Des amphiphiles simples (PEG-co-PE) ont été testées chez la souris avec différentes tailles de PEG. Il a été mis en évidence que la demi-vie de circulation de ces nanoparticules était de l'ordre de 1,2 h pour les micelles formées par un PEG₇₅₀ et de 2,1 h pour les micelles de PEG₅₀₀₀. Un éther de PEG de plus haut poids moléculaire permet donc une élimination moins rapide.¹³⁷

La taille réduite des micelles peut être un atout pour le traitement de certaines tumeurs cancéreuses dont les vaisseaux sanguins présentent une limite de porosité inférieure à 200 nm. Par exemple, dans le cas du cancer murin du poumon, cette porosité est de 100 nm. Des micelles PEG-b-PE mesurant entre 15 et 20 nm de diamètre ont pu vectoriser une protéine (STI) par effet EPR contrairement aux liposomes (> 100 nm) qui sont trop volumineux.¹³⁸

V.3.2.2 Micelles ciblant

Le ciblage cellulaire peut être encore accentué en adjoignant des ligands à la surface des micelles. Parmi les ligands déjà utilisés, on retrouve évidemment l'acide folique ou les polyamines puisque les cellules tumorales ont tendance à sur-exprimer leurs récepteurs.

Un peu plus complexe, des micelles fonctionnalisées par des anticorps monoclonaux ont été développées. Il a été montré que de telles micelles fonctionnalisées avec l'anticorps mAb 2C5 pouvaient encapsuler le paclitaxel (Figure 39). Leur efficacité sur des cellules MCF-7 (cancer du sein

¹³⁷ Lukyano, A. N.; Gao, Z.; Mazzola, L.; Torchilin, V. P. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1424-1429.

¹³⁸ Weissig, V.; Whiteman, K. R.; Torchilin, V. P. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1552-1556.

humain) est supérieure celle des micelles simples, qui sont elles mêmes plus efficaces que le principe actif seul.¹³⁹

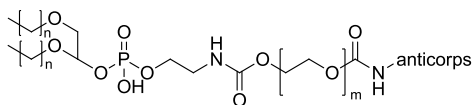


Figure 39 : Structure d'un amphiphile anticorps-PEG-PE.

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés à de nouvelles formulations de F14512 sous forme micellaire.

V.4 Objectifs des travaux de thèse

Notre laboratoire ayant une certaine expérience des formulations micellaires, nous avons travaillé sur la synthèse de nouvelles structurations nanométriques du composé F14512. Ces nouvelles formulations micellaires pourraient présenter un certain nombre d'avantages par rapport à la forme libre du médicament :

- **Multiprésentation** au niveau du système de transport des polyamines (récepteur) afin d'augmenter l'avidité pour celui-ci ;
- Possibilité d'**encapsuler** un fluorophore pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques ;
- Possibilité d'encapsuler un deuxième agent anticancéreux afin de développer une **double thérapie**.
- Possibilité d'utiliser l'**effet EPR** pour cibler le tissu cancéreux ;
- **Protection** de l'épipodophyllotoxine au sein de la micelle.

L'approche pour laquelle nous avons opté repose sur la construction de micelles dans lesquelles le principe actif serait partie intégrante de l'unité amphiphile. En effet, le composé F14512 présente déjà une partie spermine polaire à laquelle sera adjointe une chaîne lipophile (Figure 40) afin de former des amphiphiles capables de s'auto-assembler.

¹³⁹ Gao, Z.; Lukyanov, A. N.; Chalikam, A. R.; Torchilin, V. P. *J. Drug Target* **2003**, *11*, 87-92.

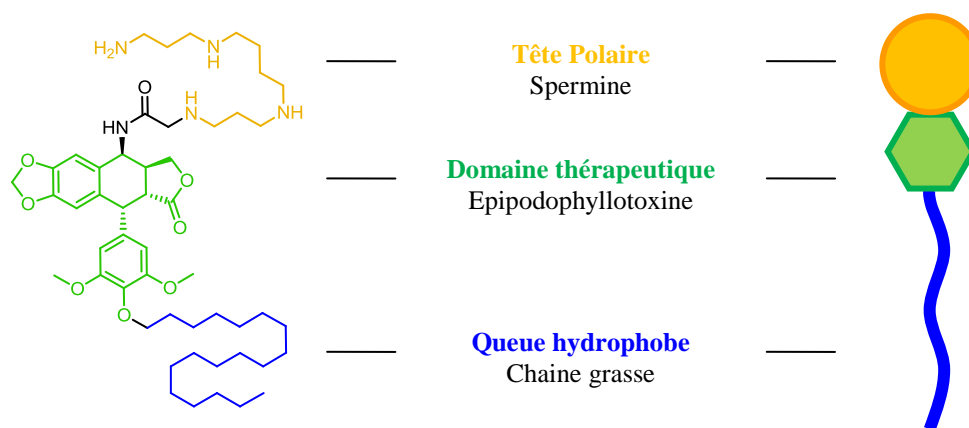


Figure 40 : Motif épipodophyllotoxine dans l'amphiphile (C₁₈-Podo-Sper).

V.5 Synthèse et caractérisation de l'amphiphile C₁₈-Podo-Sper

L'amphiphile C₁₈-Podo-Sper est composé de trois parties :

- une tête polaire : la spermine qui est liée à l'épipodophyllotoxine par un lien acétamide ;
- un domaine thérapeutique : l'épipodophyllotoxine ;
- une partie lipophile : chaîne C₁₈H₃₇ linéaire reliée au cœur épipodophyllotoxine par un lien éther.

V.5.1 Synthèse envisagée : via une réaction de Mitsunobu

Nous avons choisi d'alkyler le phénol du composé F14512 en utilisant une réaction de Mitsunobu sur le produit de la réaction de Ritter (composé **IV.1**) avant de greffer la spermine par déplacement du chlore (Schéma 73).

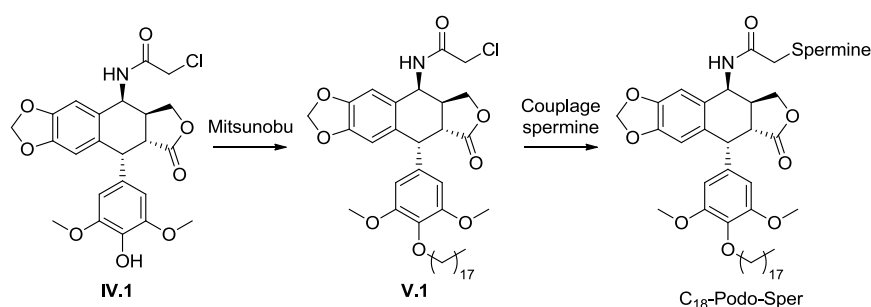
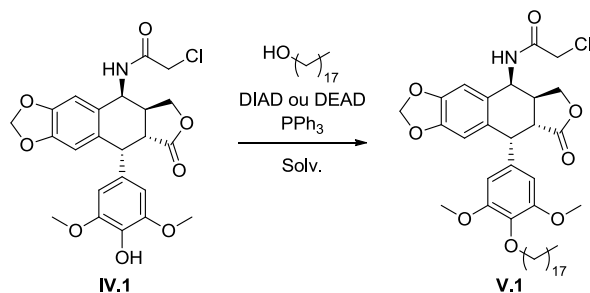


Schéma 73: Synthèse de l'amphiphile C₁₈-Podo-Sper.

V.5.1.1 Alkylation du phénol en utilisant la réaction de Mitsunobu

La réaction de Mitsunobu est couramment utilisée pour l'alkylation de phénols.¹⁴⁰ Compte tenu de l'épimérisation du carbone C2 lors des réactions d'alkylation basique du phénol, nous avons préféré utiliser cette méthode (Tableau 11).

Tableau 11 : Optimisation de la réaction de Mitsunobu.



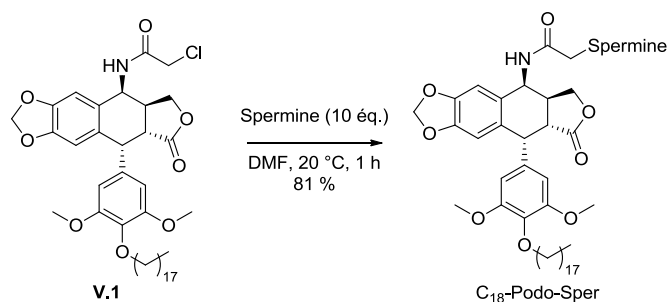
N°	Sol.	DEAD / DIAD	T. (°C)	Conc.(mol/L)	Tps (h)	Rdt. (%)
1	THF	DEAD	0 à 60	0,1	10	NR
2	THF	DIAD	0 à 60	0,1	10	NR
3	DCM	DIAD	0 à 20	1,0	1	67
4	THF	DIAD	0 à 20	1,0	1	78

Avec le motif épipodophyllotoxine, nous sommes en présence d'un phénol encombré qui ne réagit pas dans les conditions classiques de dilution (0,1 mmol/L) où les produits de départ sont recouverts intacts à l'issue de la réaction (entrées 1 et 2). Nous avons alors concentré notre milieu réactionnel à 1 mol/L et réalisé la réaction dans deux solvants différents. Dans ces conditions nous avons observé une bonne conversion du produit de départ avec des rendements de 67 % dans le dichlorométhane (entrée 3) et 78 % dans le THF (entrée 4). Il est à noter qu'aucune isomérisation de la lactone (centre C2) n'a été observée dans les conditions de Mitsunobu.

V.5.1.2 Couplage de la spermine

Cette partie concerne le greffage de la tête polaire de l'amphiphile. Nous avons choisi d'utiliser une sur-stœchiométrie (10 équivalents) de spermine (Schéma 74). En effet, ne connaissant pas la réactivité de la spermine vis-à-vis des composés de type V.1 où le phénol est substitué par une chaîne grasse, nous ne voulions pas courir le risque d'obtenir des structures dimériques.

¹⁴⁰ Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1, 1-28.

Schéma 74 : Dernière étape de synthèse de l'amphiphile C₁₈-Podo-Sper.

Dans ces conditions utilisés, l'amphiphile désiré a été obtenu avec un rendement de 81 % en 1 h de réaction dans le DMF à 20 °C.

Cette synthèse rapide de l'amphiphile C₁₈-Podo-Sper se fait en deux étapes en partant du chloroacétamide **IV.1**. Dans un premier temps, la chaîne grasse est couplée à la partie « sud » de la molécule en utilisant une réaction de Mitsunobu. La spermine est ensuite greffée sur la partie « nord » avec un bon rendement de 81 %. Nous avons ensuite vérifié que l'amphiphile C₁₈-Podo-Sper s'auto-assemblait bien dans l'eau pour former des micelles.

V.5.2 Caractérisation

Il existe plusieurs façons de déterminer la CMC d'un amphiphile (tensiométrie, fluorescence, absorbance...). Compte tenu du matériel disponible au laboratoire, nous avons choisi de la déterminer en mesurant l'absorbance du pyrène en suspensions dans les micelles.

À une concentration inférieure à la CMC, aucune micelle n'est présente dans le milieu et le pyrène n'est que très peu solubilisé (solubilité résiduelle dans l'eau pure : $1,3 \times 10^{-5}$ g/L). Lorsque la CMC est atteinte ou dépassée, l'absorbance UV augmente à mesure que l'amphiphile est additionné et que de nouvelles micelles se forment pour solubiliser le pyrène (Figure 41).

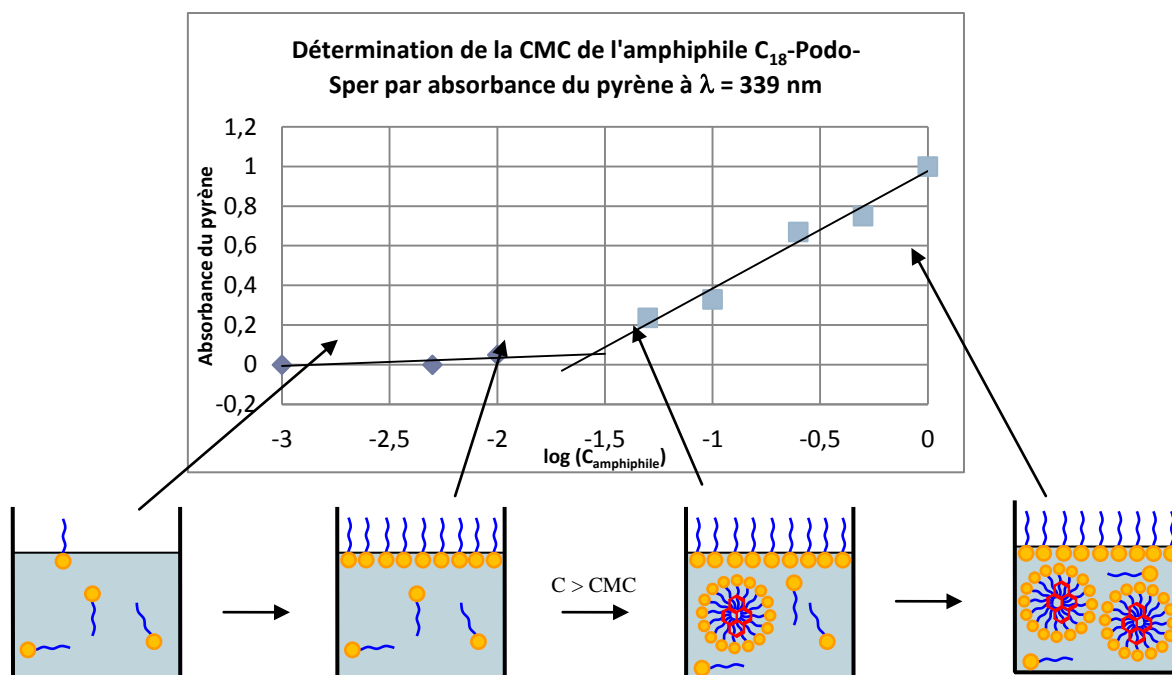


Figure 41 : Détermination de la CMC d'un amphiphile par mesure d'absorbance du pyrène.

En utilisant cette méthode, nous trouvons une CMC au croisement des deux droites de l'ordre de 22 mg.L^{-1} pour l'amphiphile C₁₈-Podo-Sper. Cela confirme qu'à partir de $22 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, les amphiphiles C₁₈-Podo-Sper s'auto-assemblent effectivement pour former des micelles.

Afin de confirmer la présence de micelles, leur diamètre a été mesuré par DLS (Dynamic Light Scattering) pour une solution à 1 mg/mL . Dans ces conditions, le diamètre moyen des micelles a été mesuré à environ 5 nm (Figure 42).

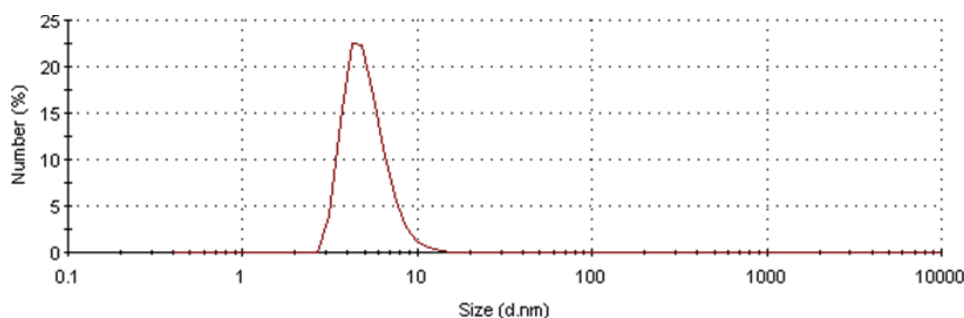


Figure 42 : Mesure DLS de l'amphiphile C₁₈-Podo-Sper.

La synthèse et la caractérisation du composé C₁₈-Podo-Sper nous a permis de mettre en évidence le caractère amphiphile de ce composé puisqu'il s'auto-assemble dans l'eau pour former des micelles. En parallèle de la synthèse de C₁₈-Podo-Sper, nous nous sommes également intéressés à la synthèse d'amphiphiles plus complexes.

V.6 Synthèse et caractérisation d'amphiphiles plus complexes

La formation de micelles est gouvernée par la CMC de l'amphiphile correspondant. Lors de grandes dilutions, il est possible de passer en dessous de la CMC et dans ce cas les micelles se désagrègent sous forme d'unimères. Il existe des moyens d'abaisser artificiellement cette CMC. Par exemple, le laboratoire a une expérience sur la synthèse de micelles ayant un cœur polymérisé.¹⁴¹ Ces micelles présentent l'avantage d'être beaucoup plus stables que les micelles non polymérisées et surtout continuent d'encapsuler des produits organiques à des concentrations très faibles (en dessous de la CMC des amphiphiles libres) (PDA-Podo-Sper, Figure 43).

Ensuite nous avons travaillé sur la synthèse d'un amphiphile photo-clivable. L'ajout d'une chaîne lipophile sur l'épipodophyllotoxine pouvant perturber son activité pharmaceutique, la mise en place d'un lien photosensible entre la chaîne grasse et le principe actif permettra de le libérer à la demande dans la cellule (C_{18} -nBz-Podo-Sper, Figure 43).

Ces trois micelles présentent l'intérêt de pouvoir être adressés vers les cellules sur-exprimant le système de transport des polyamines. Nous avons également développé un amphiphile capable d'être vectorisé passivement vers le tissu tumoral par effet EPR en remplaçant la spermine par un éther de polyéthylène glycol (C_{18} -Podo-PEG₄₀₀, Figure 43).

La suite de ce chapitre sera articulée en deux grandes parties où nous présenterons dans un premier temps la synthèse des amphiphiles puis les tests biologiques que nous avons réalisés.

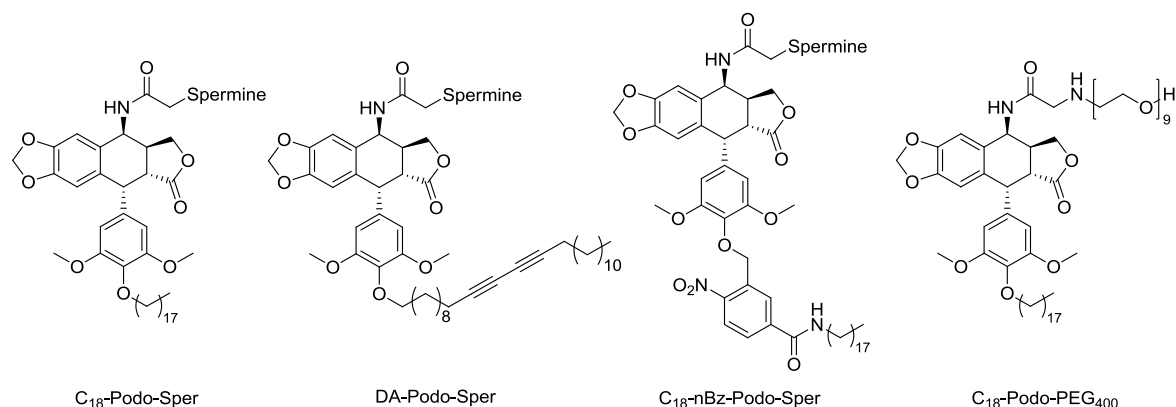


Figure 43 : Amphiphiles à base de podophyllotoxine.

¹⁴¹ Mackiewicz, N.; Gravel, E.; Garofalakis, A.; Ogier, J.; John, J.; Dupont, M. D.; Gombert, K.; Tavitian, B.; Doris, E.; Ducongé, F. *Small* **2011**, *19*, 2786-2792.

V.6.1 Synthèse et caractérisation de l'amphiphile DA-Podo-Sper

Les micelles sont des assemblages supramoléculaires qui ne présentent pas une stabilité intrinsèque très forte puisque celle-ci est gouvernée par la CMC. En dessous de la CMC, les amphiphiles agissent comme des unimères qui sont en équilibre avec leur forme micellaire. Ce phénomène étant réversible, ces structures s'assemblent et se désassemblent en fonction de la concentration. Une solution pour stabiliser la micelle en milieu dilué serait d'utiliser des amphiphiles avec des CMC très basses ou de diminuer artificiellement cette CMC en polymérisant la micelle.

Le premier amphiphile photopolymérisable étudié au laboratoire est le composé DA-NTA formé d'une chaîne grasse de 25 atomes de carbone comportant une fonction diacétylène (DA) et d'une tête polaire formée par l'acide nitrilotriacétique (NTA) (Figure 44).¹⁴²

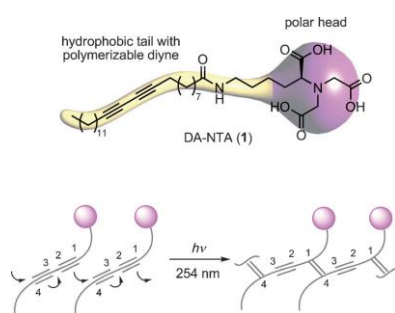


Figure 44 : Premier amphiphile photopolymérisable étudié dans l'équipe.

Sous irradiation UV, les motifs diacétylènes vont polymériser en formant une chaîne de polymère conjugué alternant alcènes et alcyènes (Figure 44). Cet amphiphile a été polymérisé en utilisant une lampe à vapeur de mercure (40 W, 254 nm) et la conversion est totale au bout de 5 h (Figure 45).

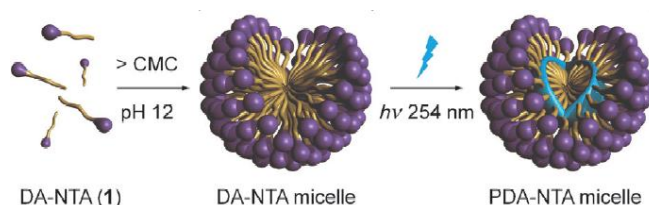


Figure 45 : Principe de la micelle photopolymérisée.

Afin de renforcer l'architecture de notre micelle de composé F14512 qui avait initialement été construite sur la base d'un amphiphile « simple », nous avons synthétisé un analogue incorporant une chaîne grasse diacétylénique polymérisable.

¹⁴² Gravel, E.; Ogier, J.; Arnauld, T.; Mackiewicz, N.; Ducongé, F.; Doris, E. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 400-408.

V.6.1.1 Synthèse de l'amphiphile DA-Podo-Sper

Pour la synthèse de notre amphiphile polymérisable, nous avons repris le même chemin réactionnel que celui développé ci-dessus pour la synthèse de l'amphiphile C₁₈-Podo-Sper. Nous avons ainsi alkylé le phénol **IV.1** dans les conditions de Mitsunobu avec un rendement de 58 % en remplaçant la chaîne lipophile simple par une version diacétylénique (**V.2**). Pour finir la synthèse, le chlore (**V.3**) a été substitué par la spermine et le composé désiré a été obtenu avec un rendement de 80 % (Figure 46).

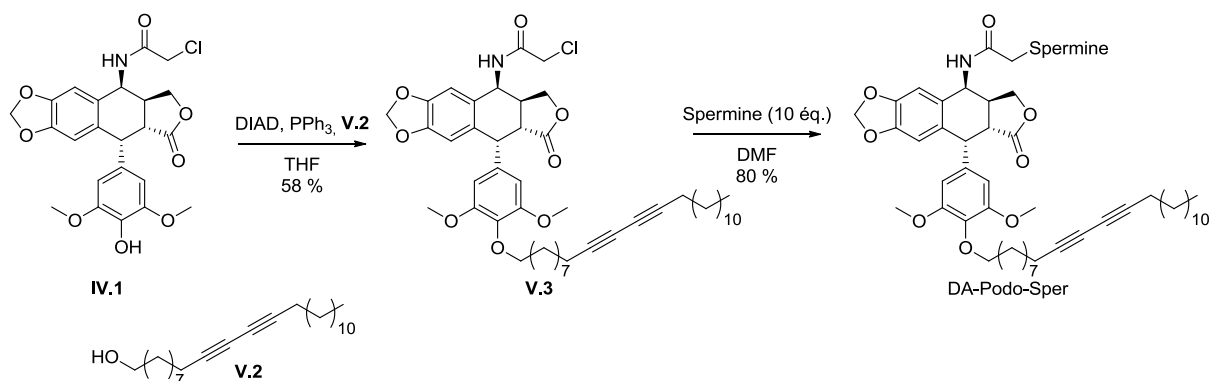


Figure 46 : Synthèse de l'amphiphile DA-Podo-Sper

L'amphiphile DA-Podo-Sper a ensuite photopolymérisé et nous avons comparé les caractéristiques (CMC, diamètre) des deux micelles (polymérisée / non polymérisée).

V.6.1.2 Photopolymérisation

Afin de vérifier que la structure épipodophyllotoxine ne se dégradait pas dans les conditions de photopolymérisation, nous avons irradié une solution de F14512 dans l'eau à une concentration de 7,5 mg.mL⁻¹. Après 4 h d'irradiation, nous observons moins de 5 % de dégradation par RMN du proton. La structure du composé F14512 est donc résistante à une irradiation prolongée à cette longueur d'onde.

En parallèle, une solution aqueuse de l'amphiphile DA-Podo-Sper à une concentration de 5,5 mg.mL⁻¹ a été irradiée à 254 nm pendant 5 h. A l'issue de l'irradiation, la solution présente la coloration jaune caractéristique de la conjugaison alcènes-alcynes.¹⁴²

Afin de vérifier qu'il n'y a pas eu de dégradation pendant la photopolymérisation, nous avons comparé les spectres infrarouges de l'amphiphile non polymérisé et de la micelle polymérisée. Aucune variation n'a été observée, les deux spectres présentant exactement les mêmes bandes pour les fonctions suivantes : C=O (lactone) : 1770 cm⁻¹ ; C=O (amide) : 1681 cm⁻¹ ; N-H : 3429 cm⁻¹ (bande large).

V.6.1.3 Caractérisation des micelles

La CMC de l'amphiphile et de l'amphiphile polymérisé a été déterminée dans les mêmes conditions que précédemment. Pour l'amphiphile seul, la CMC a été évaluée à 31 mg/L alors que celle des micelles polymérisées est de 22 mg /L. Nous observons ici une très légère baisse entre l'amphiphile polymérisé et le non polymérisé. Ce résultat est un peu surprenant puisqu'en général, les diminutions de CMC observées après polymérisation sont plus importantes.

Des mesures de tailles par DLS ont été enregistrées pour les micelles avant et après photopolymérisation. Alors que la micelle simple a un diamètre d'environ 5 nm, la micelle photopolymérisée a un diamètre un peu plus grand de 9 nm.

V.6.2 Synthèse et caractérisation de l'amphiphile photosensible C₁₈-nBz-Podo-Sper

Le rôle de la fonction phénol dans le mode d'action de F14512 n'est pas clairement établi dans la littérature et il existe un risque que la présence d'une chaîne grasse à cette position pose problème en termes d'activité biologique. Nous avons donc travaillé sur une micelle qui permettrait de libérer le composé F14512 directement dans le milieu intracellulaire après internalisation. Certains vecteurs ont été conçus pour pouvoir se dégrader une fois qu'ils ont atteint leur cible. Cette action peut être induite par une variation de pH, de la température ou de la présence d'enzymes spécifiques. L'approche que nous avons choisi de mettre en œuvre, pour la construction d'une micelle dégradable, repose sur l'utilisation d'un motif photosensible. Le principal intérêt d'une micelle photosensible est sa capacité à se dégrader à la demande sous l'influence d'une irradiation lumineuse à un endroit et à un moment choisis,¹⁴³ permettant de libérer le principe actif directement sur son site d'action.

Pour cela nous avons travaillé avec le groupement 1-(alkoxyméthyl)-2-nitrobenzène synthétisé pour la première fois en 1966.¹⁴⁴ Ce groupement a également été largement utilisé en chimie organique pour la protection et la photodéprotection d'alcools.¹⁴⁵

Le mécanisme de la photo-coupeure a été étudié en 2004 par une équipe suisse (Schéma 75).¹⁴⁶ Cette coupeure se réalise sous irradiation lumineuse UV vers 300 nm, à la longueur d'onde d'excitation du groupement nitro. Elle commence donc par la formation d'un di-radical au niveau du nitro (état triplet). Il y a ensuite un transfert de proton du carbone benzylique vers le radical formé. Ce transfert permet une délocalisation des deux radicaux sur le cycle aromatique qui se recombinent en un cycle à 5 chaînons. Ce cycle finit par se fragmenter pour libérer d'une part l'acide (ou l'alcool) désiré et le sous-produit nitroso provenant du groupement photosensible.

¹⁴³ Gohy, J. F.; Zhao, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7117-7129.

¹⁴⁴ Barltrop, J. A.; Plant, P. J.; Schoffeld, P. *Chem. Comm.* **1966**, *22*, 823-823.

¹⁴⁵ Spetch, A.; Goeldner, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 2008-2012.

¹⁴⁶ Il'ichev, Y.V.; Schoworer, M. A.; Wirz, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4581-4595.

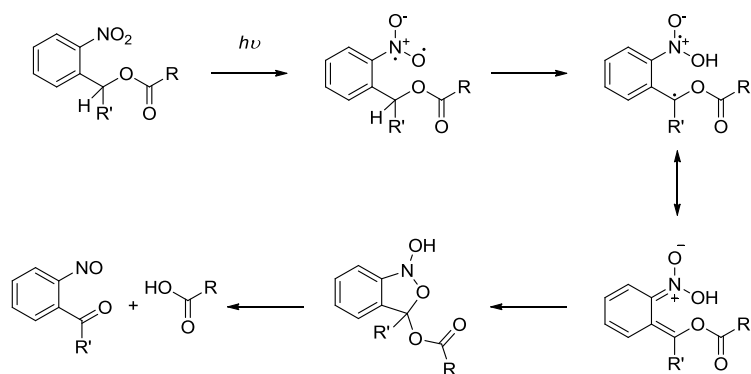


Schéma 75 : Mécanisme de photocoupeure du nitrobenzene.

Plusieurs assemblages photo-sensibles impliquant le groupement 1-(alkoxyméthyl)-2-nitrobenzene ont déjà été réalisés. À titre d'exemple, des copolymères se comportant comme des amphiphiles quand ils sont protégés se retrouvent complètement hydrophiles après irradiation.¹⁴⁷ Les micelles libèrent alors leur chargement dans le milieu (Figure 47).

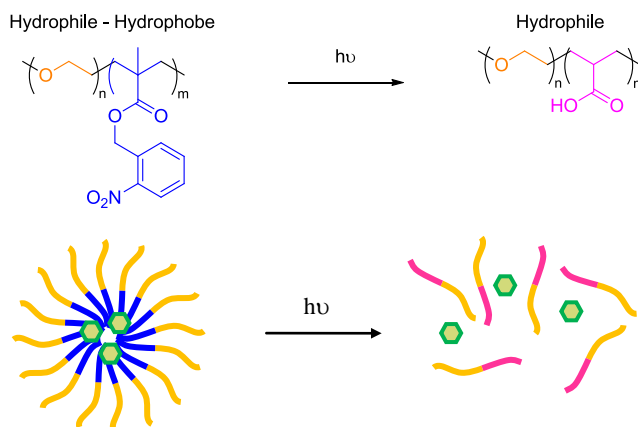


Figure 47 : Exemple de copolymère photosensible

Dans notre cas, l'amphiphile doit comporter le pharmacophore (cœur épipodophyllotoxine) et pouvoir se couper sous l'influence d'une irradiation lumineuse de façon à libérer le principe actif F14512 (Figure 48).

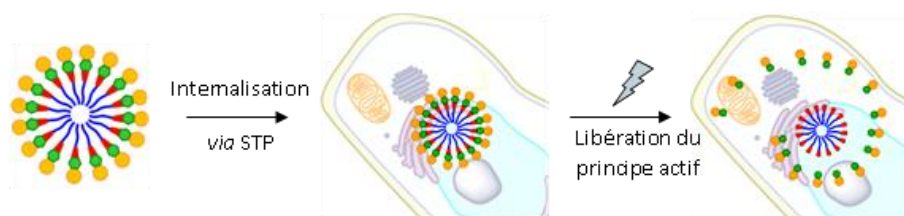


Figure 48 : Principe de fonctionnement de l'amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper.

¹⁴⁷ Schumers, J. M.; Fustin, C. A.; Gohy, J. F. *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 1588-1607.

Pour cela, nous avons travaillé sur la structure d'amphiphile suivante. Cette structure est composée de quatre parties (Figure 49):

- une tête polaire : spermine qui permettra de vectoriser la micelle vers les cellules sur-exprimant le STP ;
- un domaine thérapeutique : le cœur épipodophyllotoxine ;
- le groupement photosensible : un dérivé du 1-(alkoxyméthyl)-2-nitrobenzène ;
- une queue hydrophobe : chaîne grasse.

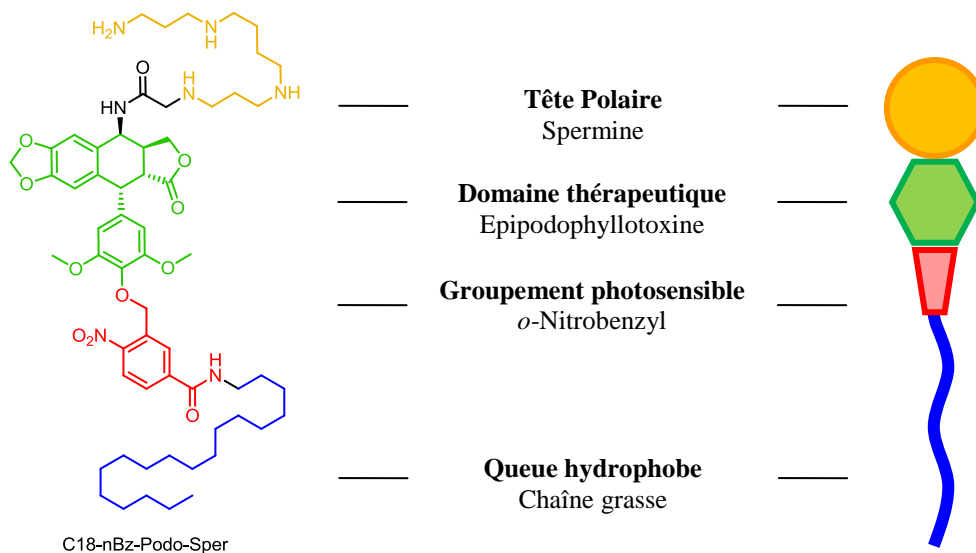


Figure 49 : Structure de l'amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper.

V.6.2.1 Synthèse de l'amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper

Pour cette synthèse, nous avons utilisé les résultats obtenus pour les amphiphiles précédemment décrits, notamment pour la mise en place de la partie basse de l'amphiphile par une réaction de Mitsunobu entre l'alcool **V.5** et le cœur épipodophyllotoxine.

V.6.2.1.i Synthèse de l'alcool **V.5**

L'alcool **V.5** a été synthétisé en deux étapes en partant de l'acide 4-(bromométhyl)-3-nitrobenzoïque (Schéma 76). Tout d'abord le brome a été remplacé par un groupement hydroxyle qui permettra ensuite de réaliser la réaction de Mitsunobu avec le chloroacétamide **IV.1**. L'acide carboxylique a ensuite été dérivatisé par une chaîne lipophile selon une réaction d'amidation.

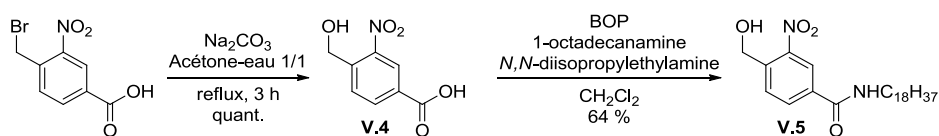


Schéma 76 : Synthèse de l'alcool E.

V.6.2.1.ii Construction de l'amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper

Le composé amphiphile photoclivable a été assemblé au départ du chloroacétamide **IV.1** sur lequel l'alcool **V.5** a été couplé dans les conditions de Mitsunobu (Schéma 77). La synthèse est finalement terminée en greffant la spermine sur la partie supérieure de la molécule. Cet amphiphile a été synthétisé en deux étapes en partant du chloroacétamide **IV.1** avec un rendement global de 39 %.

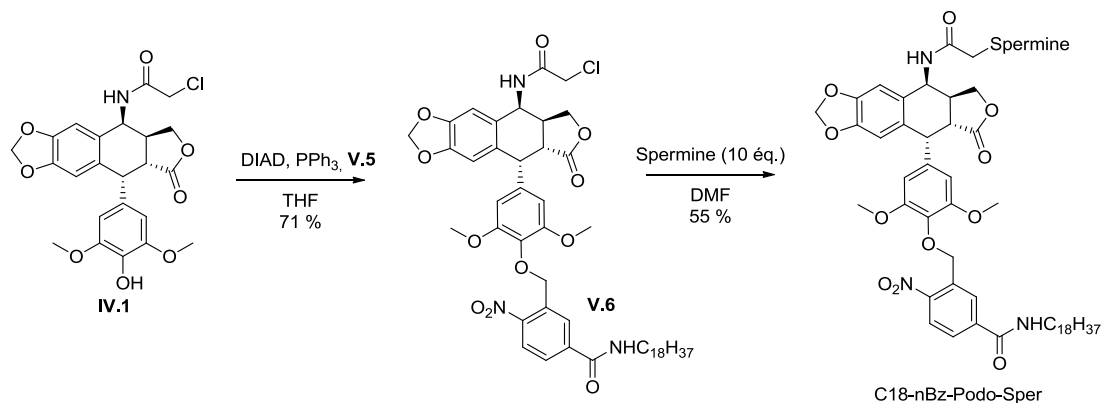


Schéma 77 : Synthèse de l'amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper.

V.6.2.2 Caractérisation des micelles

La CMC de cet amphiphile a été évaluée à 79 mg/L en utilisant la technique d'encapsulation du pyrène. Nous pouvons remarquer que cette valeur est supérieure aux autres mesures de CMC. Cela pourrait s'expliquer par la présence d'une partie rigide plus importante au cœur de l'amphiphile (motif épipodophyllotoxine + nitrobenzyl). Des mesures de DLS indiquent un diamètre d'environ 10 nm pour ces micelles (contre 5 nm pour l'amphiphile de base C₁₈-Podo-Sper).

Sur le spectre d'absorbance UV-visible (Figure 50) de l'amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper, nous pouvons voir une bande d'absorption à 204 nm correspondant aux bandes $\pi \rightarrow \pi^*$ des groupements aromatiques (dont nitro-benzyl) et une bande large entre 280 et 300 nm correspondant à l'absorbance du groupement nitro.

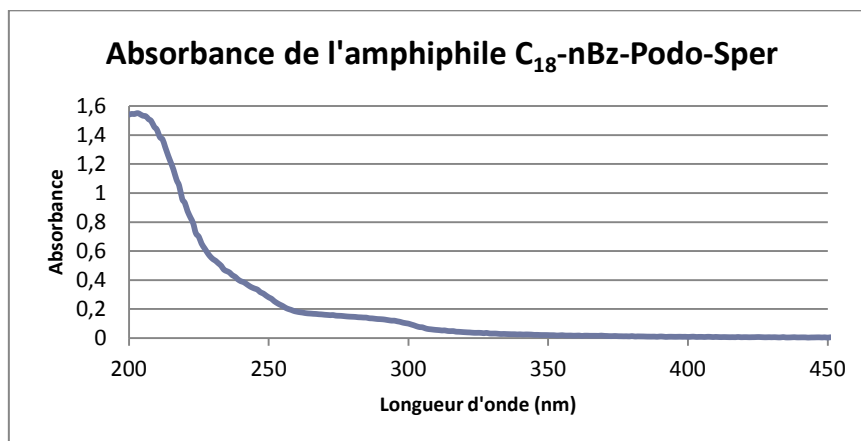


Figure 50 : Absorbance de l'amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper à 0,05 mg/mL dans l'eau.

L'étape suivante de notre travail a consisté à mettre en évidence la capacité de la micelle à se désassembler sous l'influence d'un stimulus lumineux.

V.6.2.3 Photo-coupage de l'amphiphile

Avant de réaliser les tests de libération de principe actif *in vitro*, nous avons voulu vérifier que l'amphiphile était effectivement capable de se cliver par irradiation lumineuse. Pour cela, nous avons irradié une solution à 0,05 mg/mL de l'amphiphile dans l'eau à l'aide d'une lampe à vapeur de mercure et nous avons pris un spectre UV de l'échantillon à 20 min, 40 min, 1 h, 2 h et 3,75 h (Figure 51). La lampe à vapeur de mercure présente l'avantage d'émettre à des longueurs d'ondes différentes dont celles dont nous avons besoin (entre 280 et 300 nm). Après 3h45, une conversion de 75 % a été observée par RMN du proton.

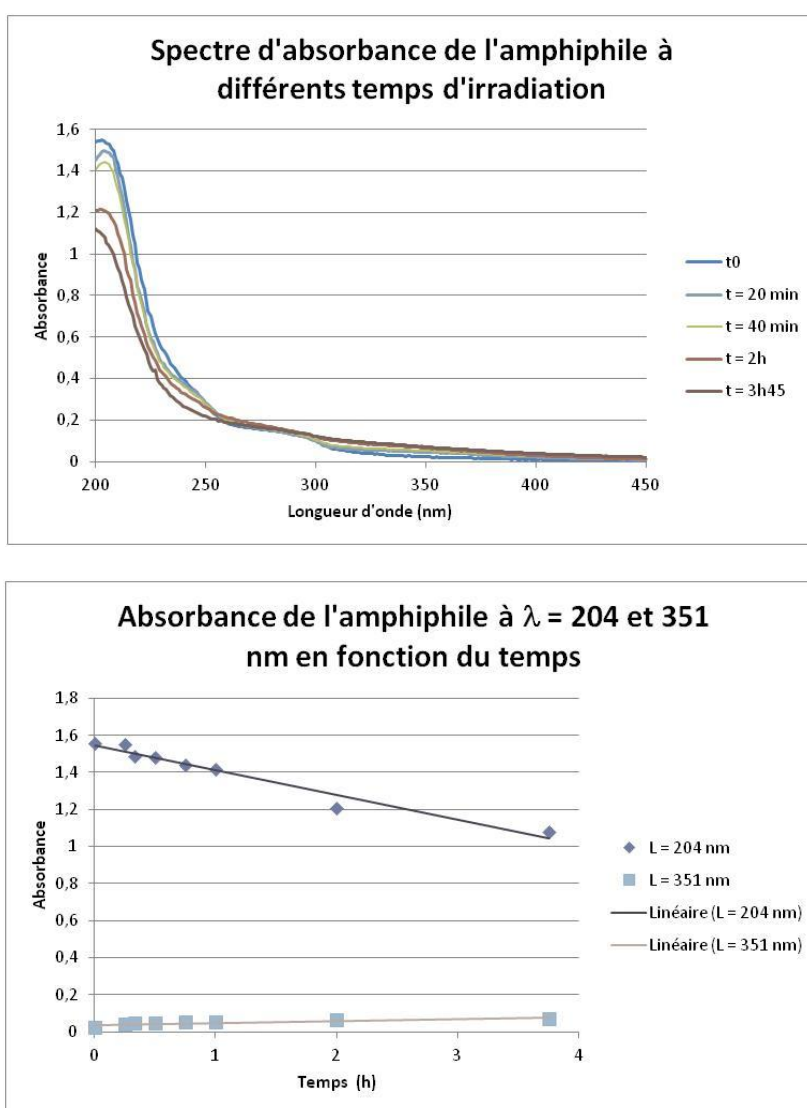


Figure 51 : Mise en évidence de la coupure de l'amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper sous irradiation.

Nous pouvons observer la diminution de la bande à 204 nm, qui est une bande caractéristique des nitrobenzenes (Schéma 78). D'autre part, nous pouvons également observer l'apparition d'une

bande beaucoup moins intense à 351 nm correspondant à la formation du sous-produit nitroso.¹⁴⁸ Ces mesures indiquent donc que la coupure souhaitée a bien été opérante.

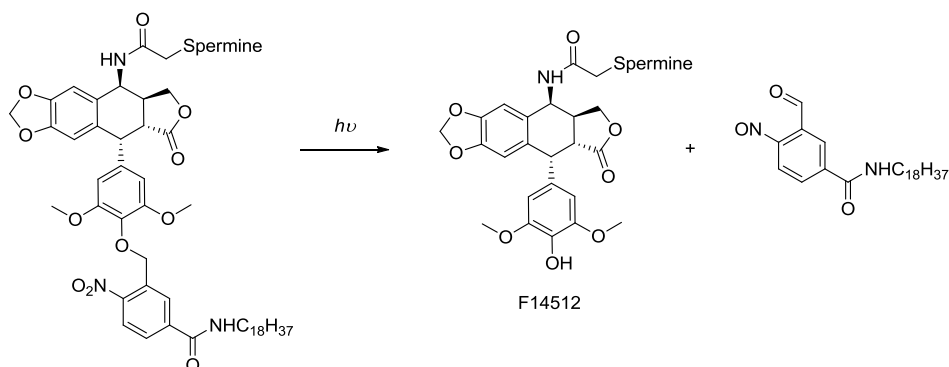


Schéma 78 : Réaction de photo-couppure de l'amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper.

Avec l'amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper, nous avons un composé capable de s'auto-assembler dans l'eau pour former des micelles. De plus, ces amphiphiles sont photosensibles et permettent de libérer le composé actif F14512 sous irradiation (Schéma 78).

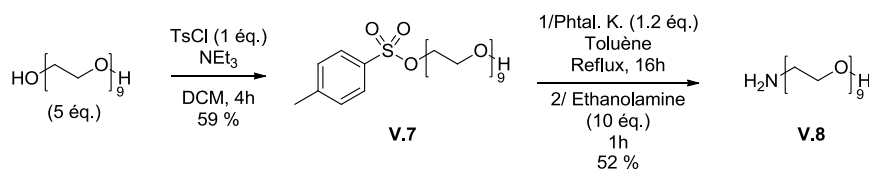
Jusqu'à présent, nous avons synthétisé et étudié des amphiphiles comportant une spermine comme tête polaire, les variations ayant été apportées au niveau de la chaîne grasse. Le choix de la tête polaire polyamine était motivé par la possibilité d'avoir une sélectivité accrue pour les cellules sur-exprimant le STP (ciblage actif). Nous avons également synthétisé un amphiphile comportant un petit PEG à la place de la spermine dans le but d'induire un ciblage passif.

V.6.3 Synthèse et caractérisation de l'amphiphile C₁₈-Podo-PEG₄₀₀

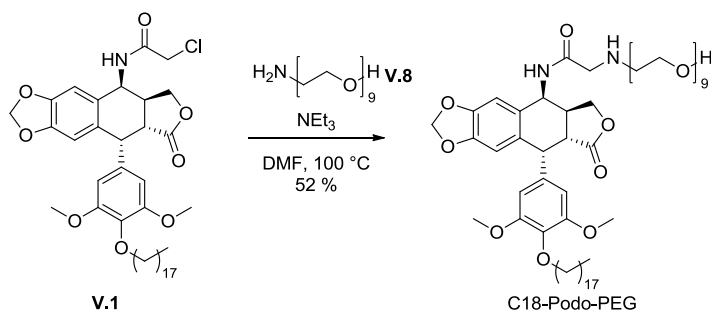
Pour le dernier amphiphile que nous avons synthétisé, nous avons choisi de changer le mode de vectorisation de la micelle en remplaçant la spermine par un PEG₄₀₀ (Figure 43). La présence du PEG permettrait cette fois de faire de la vectorisation tissulaire (ciblage passif) plutôt que cellulaire (ciblage actif) grâce à une extravasation des micelles vers les foyers tumoraux par effet EPR.

Dans un premier temps, il nous a fallu synthétiser le PEG₄₀₀ fonctionnalisé avec une amine afin de pouvoir le coupler avec l'épipodophyllotoxine, en lieu et place de la spermine. L'éther de PEG de poids moléculaire 400 a été mono-tosylé en utilisant une sous stœchiométrie (0,2 éq.) de chlorure de tosyloxy. Le tosylate obtenu a ensuite été substitué par le phtalimide de potassium qui a été coupé à l'éthanolamine. Cette dernière étape se faisant en un seul pot (Schéma 79).

¹⁴⁸ Peng, L.; Goeldner, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 185-191.

Schéma 79 : Synthèse du PEG-NH₂.

Nous avons ensuite directement couplé ce PEG mono-aminé **V.8** sur le chloroacétamide de l'épipodophyllotoxine (**IV.1**). Les conditions de cette réaction sont un peu plus dures que celles utilisées pour greffer la spermine, puisqu'il faut chauffer à 100 °C pour que la réaction fonctionne. L'amphiphile désiré est récupéré avec un rendement de 52 % (Schéma 80).

Schéma 80 : Synthèse de l'amphiphile C18-Podo-PEG₄₀₀.

La CMC de l'amphiphile C₁₈-podo-PEG₄₀₀ a été évaluée à 42 mg/mL en mesurant l'absorbance du pyrène encapsulé et leur diamètre a été évalué à 8 nm par DLS.

V.6.4 Conclusion : synthèse et caractérisation des amphiphiles

Pour conclure cette partie synthèse et caractérisation des amphiphiles, nous avons préparé tous les amphiphiles au départ du chloroacétamide de la 4'-DMEP (**IV.1**). Les chaînes grasses ont ensuite été ajoutées en utilisant une réaction de Mitsunobu avec les alcools correspondants. Finalement les têtes polaires (spermine ou PEG) ont été greffées en dernière étape par substitution nucléophile du chloroacétamide. Ces amphiphiles s'auto-assemblent tous en micelle une fois dans l'eau et présentent des CMC < 90 mg/L et des diamètres compris entre 5 et 10 nm. Certains de ces composés ont ensuite été testés *in vitro* et *in vivo*.

V.7 Premiers résultats biologiques

Dans cette partie, nous verrons dans un premier temps les tests préliminaires *in vitro* qui ont été réalisés sur les amphiphiles dont la tête polaire est constituée d'une spermine (ciblage cellulaire). Nous verrons ensuite les premiers résultats *in vivo* que nous avons obtenus avec les micelles à tête polaire PEG (ciblage tissulaire). Ces tests ont été réalisés par Ioanna Theodorou de l'équipe de

Frédéric Ducongé dans le cadre d'une collaboration avec le Service Hospitalier Frédéric Joliot (CEA / DSV / I²BM) de l'hôpital d'Orsay.

V.7.1 Ciblage cellulaire

Nous avons tout d'abord vérifié que les micelles obtenues par assemblage des amphiphiles fonctionnalisés par une spermine s'internaient préférentiellement dans les cellules sur-exprimant le STP. Il avait déjà été montré que F14512 utilisait ces récepteurs pour pénétrer dans les cellules, et nous voulions être sûrs que les micelles utilisaient la même voie d'entrée. Pour cela, nous avons chargé le cœur des micelles C₁₈-Podo-Sper et PDA-Podo-Sper avec un fluorophore, le DiD. Cela nous a permis de suivre le devenir de la micelle *in vitro*. Le DiD est excité à 644 nm et émet à 665 nm. Deux lignées cellulaires leucémiques ont été utilisées, une sur-exprimant le STP (HL-6015) et une autre ne le sur-exprimant pas (U-937).¹⁴⁹

Dans ces tests, nous voulions vérifier l'internalisation préférentielle des amphiphiles C₁₈-Podo-Sper et PDA-Podo-Sper dans les cellules sur-exprimant le STP. L'amphiphile C₁₈-Podo-PEG₄₀₀ ne possédant pas de spermine a donc été utilisé comme référence négative pour les expériences témoins. L'internalisation a pu être évaluée en mesurant la fluorescence des cellules par cytométrie de flux. La fluorescence étant uniquement due au DiD, plus elle sera forte, plus la quantité de micelles ayant été internalisées dans les cellules sera grande (Figure 52).

Ces expériences ont été réalisées en plaques 6 puits et une mesure de fluorescence a été prise toutes les heures pendant 5 h.

Pour les cellules U-937 (STP-), nous pouvons observer que les amphiphiles C₁₈-Podo-Sper et C₁₈-Podo-PEG s'internaient à la même vitesse (Figure 52). Par contre, une internalisation plus rapide des micelles photopolymérisées est observée, mais ce phénomène n'a pas pu être expliqué.

Pour les cellules HL-6015 (STP+), nous observons une internalisation plus rapide (3,5 fois) des micelles C₁₈-Podo-Sper et PDA-Podo-Sper par rapport aux micelles C₁₈-Podo-PEG (Figure 52).

¹⁴⁹ Annereau, J. P.; Brel, V.; Dumontet, C.; Guminski, Y.; Imbert, T.; Broussas, M.; Vispé, S.; Bréand, S.; Guilbaud, N.; Barret, J. M.; Bailly, C. *Leukemia Res.* **2010**, *34*, 1383-1389.

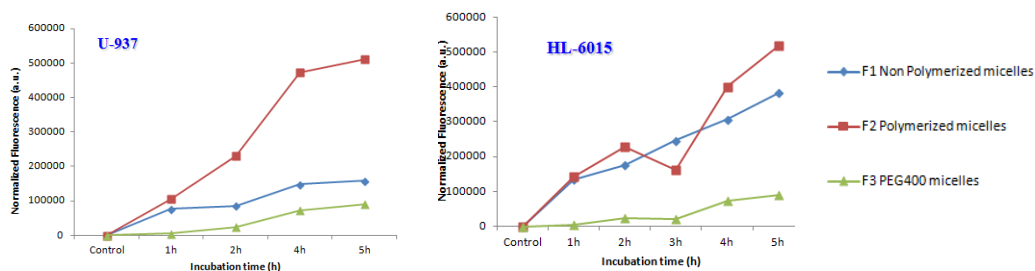


Figure 52 : Tests d'internalisation des micelles C₁₈-Podo-Sper et PDA-Podo-Sper dans des cellules ne sur-exprimant pas le STP (U-937) et des cellules le sur-exprimant (HL-6015).

Par ailleurs, les micelles C₁₈-Podo-PEG s'internalisent à la même vitesse dans les deux lignées cellulaires, indiquant que la voie d'internalisation de la référence micellaire ne passe pas par le système de transport de polyamines. En revanche, l'internalisation des micelles amphiphiles fonctionnalisées avec une spermine est beaucoup plus rapide dans les cellules sur-exprimant le STP que dans la lignée STP-. Cette observation suggère que ces dernières entrent probablement dans les cellules par le système de transport des polyamines.

Nous avons ainsi réussi à formuler le composé F14512 sous la forme de différentes micelles qui conservent les propriétés intrinsèques de ciblage du principe actif médicamenteux. En parallèle au ciblage actif, nous avons évalué le potentiel du composé micellaire C₁₈-podo-PEG₄₀₀ à cibler de façon passive les tumeurs cancéreuses.

V.7.2 Ciblage tissulaire

Avec l'amphiphile fonctionnalisé avec un PEG₄₀₀, nous avons voulu voir si nos micelles pouvaient s'accumuler dans les foyers tumoraux par effet EPR. Pour cela, trois souris ont été xénotreffées dans la zone dorsale avec des cellules de cancer du sein humain (MDA-MB231 GFP).

Une solution de C₁₈-Podo-PEG₄₀₀ chargée avec 10 % de DiR a été injectée aux souris par voie intraveineuse. Par rapport au DiD, le DiR présente un spectre d'émission et d'absorption décalé vers l'infrarouge avec une longueur d'onde d'excitation à 750 nm et une longueur d'onde d'émission maximale à 780 nm. L'intérêt d'utiliser ce fluorophore est que la matière vivante n'absorbe pas à ces longueurs d'onde (proche infrarouge). Il est alors possible de suivre l'évolution du DiR et donc celle des micelles, dans le corps de la souris en temps réel par imagerie de fluorescence (Figure 53).

La première observation est liée à la distribution uniforme de la fluorescence dans l'animal une minute après injection des micelles chargées en fluorophore. Cette fluorescence tend à s'estomper progressivement avec cependant un début d'accumulation dans la tumeur au bout de trois heures. Le meilleur contraste tissu cancéreux/tissu sain est observé après 24 h et se maintient au-delà de 48 h.

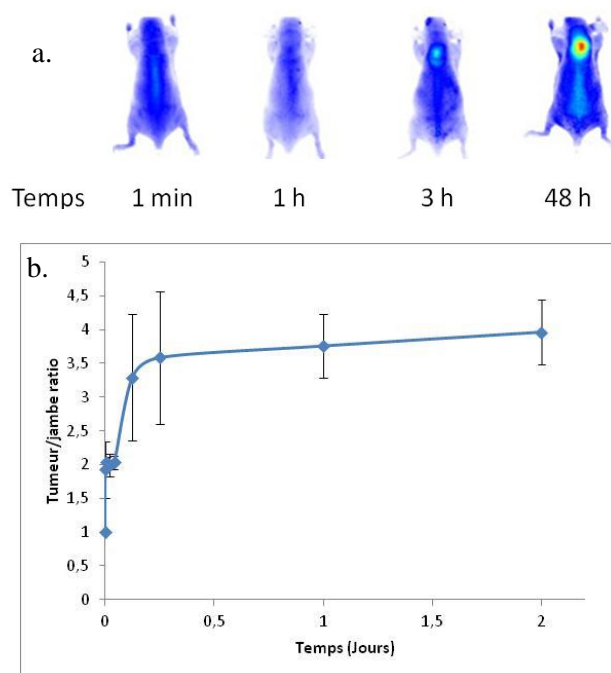


Figure 53 : a. Fluorescence de la souris après injection des micelles DiR@C₁₈-Podo-PEG₄₀₀. b. Ratio de fluorescence entre la tumeur et les jambes.

Ces expériences *in vivo* nous ont permis de vérifier que les micelles C₁₈-Podo-PEG₄₀₀ étaient effectivement capables de s'accumuler de façon passive dans la tumeur par effet EPR. Une accumulation passive dans la tumeur de DiR seul (qui se serait échappé de la micelle) est à exclure car l'on sait, par des expériences de biodistributions antérieures, que le fluorophore libre est très rapidement éliminé de l'organisme par les voies hépato-biliaires.

La micelle étant capable de s'accumuler dans la tumeur, il nous faudrait maintenant mesurer son efficacité à induire de la régression tumorale *in vivo*. Des études sont actuellement en cours au laboratoire.

V.8 Conclusions et perspectives

Dans ce projet, nous avons dans un premier temps synthétisé trois amphiphiles comportant un motif spermine en guise de tête polaire. Après avoir vérifié que ces amphiphiles s'auto-assemblaient bien sous forme de micelle, nous avons testé ces nouvelles formulations sur cellules et avons constaté qu'elles s'internalisaient plus rapidement dans les cellules sur-exprimant le système de transport des polyamines. Ces micelles conservent donc la propriété principale du composé F14512, à savoir sa vectorisation active vers ces cellules.

Nous avons également conçu une micelle photo-clivable capable de libérer le principe actif F14512 sous irradiation lumineuse. Ce composé a été étudié pour ses propriétés photo-physiques (capacité à libérer le composé anticancéreux) mais n'a pas encore été testé *in vitro*.

Le dernier type de micelle développé contient un éther de PEG₄₀₀ à la place du motif ciblant spermine. Cette micelle a été évaluée *in vivo* sur des souris porteuses de tumeurs. Les résultats obtenus montrent une accumulation passive efficace de la micelle pégylée dans la zone tumorale, ouvrant ainsi des perspectives pour une évaluation thérapeutique.

Nous avons, dans tous les cas étudiés, des objets qui possèdent une cavité centrale hydrophobe qui pourrait être mise à profit pour charger un deuxième principe actif médicamenteux. En effet, les dérivés de l'épipodophyllotoxine sont connus pour être des inhibiteurs de la topoisomérase II. Nous pourrions profiter de ce domaine pour transporter un autre agent anti-cancéreux tel que le Paclitaxel, qui est un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules. Ces nano-objets nous permettraient alors d'avoir un médicament possédant deux modes d'actions simultanés.

Conclusion générale

Dans une première partie de ce travail, nous avons développé une nouvelle voie d'accès hémisynthétique au macrocarpal G. Ce produit d'origine naturel est intéressant d'un point de vue pharmacologique pour ses propriétés anorexigènes et comme inhibiteur des récepteurs aux catéchols amines. Cependant, il est difficilement isolable pur par extraction. Nous avons mis au point une hémisynthèse du macrocarpal G par déshydratation *exo*-cyclique du macrocarpal A en utilisant T3P® en présence d'une pyridine encombrée. Nous avons également synthétisé trois analogues originaux de macrocarpals.

Dans le deuxième chapitre, nous avons développé une nouvelle synthèse énantiosélective de l'antidépresseur Lévomilnacipran. Cette synthèse *de novo* commence par l'alkylation stéréosélective de l'acide phénylacétique par le bromure d'allyle en utilisant une méthodologie récemment développée par Zakarian. L'acide (2*S*)-phénylpent-4-énoïque avec un ee de 88% en utilisant une tétramine comme inducteur chiral. Cet acide a ensuite été transformé en *cis*- γ -iodolactone qui nous a servi de relais de chiralité pour la formation de l'époxyde précurseur du cyclopropane. La (-)-cyclopropyl-lactone **II.1'** a été obtenue par cyclopropanation intramoléculaire et transformée en Levomilnacipran avec un ee de 88%.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse énantiosélective d'un dérivé de benzodioxane, le composé F17807 pour lequel nous avons développé une approche originale ne faisant pas intervenir de catalyse métallique. La stratégie mise en place nous a permis d'obtenir le composé F17807 en cinq étapes et avec un ee de 98 %.

Dans une quatrième partie, nous nous sommes intéressés à un nouvel anticancéreux, F14512. Ce produit est composé d'un cœur épipodophyllotoxine responsable de son activité cytotoxique et d'une spermine qui permet sa vectorisation préférentielle vers les cellules tumorales. Nous avons réalisé la synthèse de trois stéréoisomères de F14512 en faisant varier par hémisynthèse la position de deux centres stéréogènes. Ces analogues sont actuellement en cours d'évaluation par les laboratoires Pierre Fabre.

Dans la dernière partie de ce travail nous nous sommes intéressés à de nouvelles formulations nanométriques micellaires du composé le composé F14512. Pour cela nous avons dans un premier temps ajouté une chaîne grasse (C₁₈) sur F14512. Après avoir vérifié que ces produits s'auto-assemblaient bien pour former des micelles, nous avons synthétisé trois amphiphiles plus complexes : i) un amphiphile photopolymérisable (pour conférer de la stabilité à la micelle), ii) un amphiphile photo-clivable (pour libérer à la demande le principe actif), et iii) un amphiphile pégylé (pour le ciblage passif des tumeurs). Ces amphiphiles ont été assemblés en micelles puis évalués *in vitro* et *in vivo* montrant un très bon potentiel pour des applications thérapeutiques.

Partie Expérimentale

I. General

Chemicals

Unless otherwise specified, chemicals were purchased and used without further purification. Reactions were carried out under nitrogen using dry solvents, unless otherwise stated.

THF was distilled from sodium/benzophenone before use. Dichloromethane was distilled from CaH_2 . 1,4-Dioxane and toluene were distilled from sodium and stored under argon over 4Å molecular sieve.

Flash chromatography was carried out on Kieselgel 60 (230–240 mesh, Merck) and analytical TLC was performed on Merck precoated silica gel (60 F₂₅₄); visualization was carried out with UV and/or heating with a solution of KMnO_4 in water and/or with a 5-7 % solution of PMA in EtOH.

Analysis

HRMS were recorded at “Service de Spectrométrie de Masse de l’Institut de Chimie des Substances Naturelles” in Gif-sur-Yvette (France).

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DPX 400 spectrometer at 400 and 100 MHz respectively. Chemical shifts (δ) are given in ppm and coupling constants (J) in hertz. Multiplicity of signals will be written following the next abbreviations:

s : singlet	quad. : quadruplet
d: doublet	q : quintuplet
t : triplet	m : multiplet

IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer System 2000 FT-IR.

Optical rotations were determined using the sodium D line (589 nm) on a Perkin Elmer 341 polarimeter.

UV spectra were recorded on a Varian Carry 50 Scan UV-Vis in quartz cells.

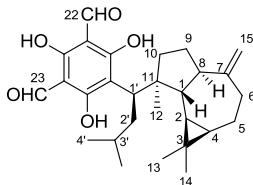
Material

Sonication was performed using an ultrasound probe Branson Sonifier 450 probe (60W, 20 kHz).

II. Organic synthesis

a. Chapter I : Macrocarpals

Macrocarpal G



Under N₂, macrocarpal A (100 mg, 0.212 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in anhydrous THF (10 mL) before T3P (1 mL of a 50% soln in ethyl acetate, 8 equiv.) and 2,5-di-*tert*-butyl pyridine (380 μ L, 8 equiv.) were added. The reaction mixture was heated to reflux for 6 h. It was then quenched with 1 M HCl (8 mL) and diethyl ether (8 mL) was added. The organic phase was collected and the aqueous layer was extracted twice with diethyl ether (2 \times 8 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under vacuum. The crude residue was purified over silica (CH₂Cl₂/acetic acid 99.9:0.1 \rightarrow 97:3) to give **3** (M-G, 95%).¹⁵⁰

¹H NMR (CD₃OD): δ 10.12 (s, 1H, H₂₃), 10.11 (s, 1H, H₂₂), 4.70 (s, 1H, H₁₅), 4.64 (s, 1H, H₁₅), 3.40 (dd, $J = 12.8$ Hz, $J = 3.6$ Hz, 1H, H_{1'}), 2.47-2.22 (m, 4H, H₈, H₆, H₁₀ and H_{2'}), 2.08-1.96 (m, 2H, H₆ and H₅), 1.79 (m, 1H, H₉), 1.67 (m, 1H, H₉), 1.43-1.30 (m, 2H, H₁₀ and H₁), 1.23-1.18 (m, 2H, H_{3'} and H_{2'}), 1.09 (s, 3H, H₁₃), 1.01 (s, 3H, H₁₄), 0.95 (m, 1H, H₅), 0.81 (s, 3H, H₁₂), 0.80 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, H_{4'}), 0.78 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, H_{4'}), 0.62-0.72 (m, 2H, H₄ and H₂).

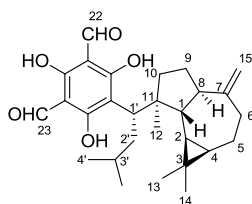
¹³C NMR (CD₃OD): δ 193.1, 192.9, 170.9, 170.4, 168.7, 156.5, 111.3, 106.2, 106.1, 106.1, 52.5, 50.6, 51.7, 40.5, 38.7, 37.4, 36.0, 29.5, 29.3, 28.6, 28.5, 28.2, 26.8, 24.9, 23.9, 22.4, 21.0, 17.4.

IR (neat): 3204, 2952, 2867, 1627, 1446 cm⁻¹.

HRMS: calcd for C₂₈H₃₇O₅ [M-H]⁺ 453.2641, found 453.2623.

[α]_D²⁰ -25.8 (*c* 0.10, EtOH); (lit.,¹⁵¹ [α]_D²⁵ -22.1 (*c* 0.15, EtOH).

¹⁵⁰ Tanaka, T.; Mikamiyama, H.; Maeda, K.; Iwata, C.; In, Y.; Ishida, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9782–9793.

Macrocarpal I.4 (M-G_i)

Under N₂, macrocarpal B (100 mg, 0.212 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in anhydrous THF (10 mL) before T3P (1 mL of a 50% soln in ethyl acetate, 8 equiv.) and 2,5-di-*tert*-butyl pyridine (380 μL, 8 equiv.) were added. The reaction mixture was heated to reflux for 6 h. It was then quenched with 1 M HCl (8 mL) and diethyl ether (8 mL) was added. The organic phase was collected and the aqueous layer was extracted twice with diethyl ether (2 × 8 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under vacuum. The crude residue was purified over silica (CH₂Cl₂/acetic acid 99.9:0.1 → 97:3) to give **I.1** (82%).

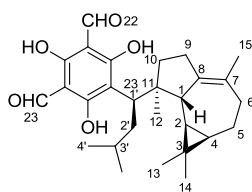
¹H NMR (CD₃OD): δ 10.12 (s, 1H, H₂₃), 10.11 (s, 1H, H₂₂), 4.69 (s, 1H, H₁₅), 4.62 (s, 1H, H₁₅), 3.33 (m, 1H, H₁), 2.38 (m, 3H, H₈, H₆ and H₂), 2.04 (m, 1H, H₅), 1.96 (m, 1H, H₆), 1.83 (m, 1H, H₉), 1.63 (m, 1H, H₁₀), 1.55 (m, 1H, H₉), 1.27-1.40 (m, 2H, H₁ and H₂), 1.25-1.10 (m, 11H, H₁₃, H₁₄, H_{10a}, H₁₂ and H₃), 1.00 (m, 1H, H₅), 0.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H₄), 0.83-0.62 (m, 5H, H₄, H₂ and H₄).

¹³C NMR (CD₃OD): δ 193.0, 193.0, 171.0, 170.4, 168.5, 157.0, 111.5, 106.1, 106.0, 105.6, 56.4, 54.8, 51.0, 42.7, 41.1, 40.6, 36.5, 31.7, 29.4, 28.1, 28.0, 27.3, 27.1, 24.8, 21.6, 20.7, 19.8, 17.5.

IR (neat): 3423, 2951, 2864, 1632, 1446 cm⁻¹.

HRMS: calcd for C₂₈H₃₇O₅ [M-H]⁺ 453.2641, found 453.2619.

[α]_D²⁰ +9.8 (*c* 0.10, EtOH).

Macrocarpal I.3

Under N_2 , macrocarpal A (50 mg, 0.106 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in anhydrous THF (4 mL) and three drops of concentrated sulfuric acid were added. After stirring for 4 h at room temperature, water (5 mL) and diethyl ether (5 mL) were added. The aqueous layer was extracted twice with diethyl ether (2 x 5 mL). The combined organic layer was washed with brine (5 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified over silica (CH_2Cl_2 / acetic acid: 99.9/0.1 \rightarrow 99/1) to afford **I.2** (*endo-A*) (90%).

1H NMR (CD_3OD): δ 10.12 (s, 1H, H_{23}), 10.11 (s, 1H, H_{22}), 3.50 (dd, $J = 14.6$ Hz, $J = 5.1$ Hz, 1H, $H_{1'}$), 2.51 (brs, 1H, H_1), 2.34 (m, 1H, H_2), 2.31-2.01 (m, 4H, H_6 and H_9), 1.85 (m, 1H, H_{10}), 1.72 (m, 1H, H_5), 1.52 (s, 3H, H_{15}), 1.50-1.41 (m, 2H, H_{10} and H_5), 1.22-1.10 (m, 2H, $H_{2'}$ and $H_{3'}$), 1.06 (s, 3H, H_{14}), 1.05 (s, 3H, H_{13}), 0.82 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H, $H_{4'}$), 0.81 (d, $J = 5.9$ Hz, 3H, $H_{4'}$), 0.76-0.68 (m, 4H, H_{12} and H_2), 0.55 (m, 1H, H_4).

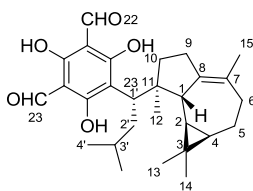
^{13}C NMR (CD_3OD): δ 193.1, 192.9, 171.0, 170.3, 168.6, 138.4, 126.7, 111.2, 106.1, 106.0, 49.7, 45.8, 37.2, 36.9, 35.7, 35.3, 31.5, 30.3, 29.1, 28.3, 27.4, 24.9, 24.2, 22.3, 22.2, 21.9, 20.0, 16.8.

IR (neat): 2924, 1622, 1454, 1376 cm^{-1} .

HRMS: calcd for $C_{28}H_{37}O_5$ $[M-H]^+$ 453.2641, found 453.2637.

$[\alpha]_D^{20}$ -20.5 (c 0.055, EtOH).

Macrocarpal I.1



Under N_2 , macrocarpal B (50 mg, 0.106 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in anhydrous THF (4 mL) and three drops of concentrated sulfuric acid were added. After stirring for 4 h at room temperature, water (5 mL) and diethyl ether (5 mL) were added. The aqueous layer was extracted twice with diethyl ether (2 x 5 mL). The combined organic layer was washed with brine (5 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified over silica (CH_2Cl_2 / acetic acid: 99.9/0.1 \rightarrow 99/1) to afford either **I.3** (*endo*-B) (78%).

1H NMR (CD_3OD): δ 10.12 (s, 1H, H_{23}), 10.10 (s, 1H, H_{22}), 3.32 (dd, $J = 13.1$, $J = 3.9$ Hz, 1H, $H_{1'}$), 2.44 (m, 1H, H_1), 2.38 (td, $J = 12.9$, 3.2 Hz, 1H, $H_{2'}$), 2.24-2.07 (m, 4H, H_6 and H_9), 1.73 (m, 1H, H_5), 1.55 (m, 1H, H_5), 1.52 (s, 3H, H_{15}), 1.42-1.33 (m, 2H, $H_{2'}$ and H_{10}), 1.22 (m, 1H, $H_{3'}$), 1.17 (s, 3H, H_{14}), 1.07 (m, 1H, H_{10}), 1.06 (s, 3H, H_{13}), 1.05 (s, 3H, H_{12}), 0.86 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, $H_{4'}$), 0.84-0.76 (m, 4H, H_2 and $H_{4'}$), 0.56 (m, 1H, H_4).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 191.6, 191.5, 169.5, 168.7, 166.9, 138.3, 125.4, 109.9, 104.6, 104.5, 49.1, 48.9, 40.4, 37.1, 35.7, 35.6, 30.3, 29.7, 27.7, 26.7, 26.0, 23.5, 22.6, 20.9, 19.2, 18.2, 17.5, 15.1.

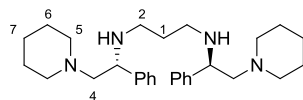
IR (neat): 2924, 1623, 1452, 1376 cm^{-1} .

HRMS: calcd for $C_{28}H_{37}O_5$ $[M-H]^+$ 453.2641, found 453.2634.

$[\alpha]_D^{20}$ +47.1 (c 0.10, EtOH).

b. Chapter II : Levomilnacipran

***N*¹-*N*³-bis(*R*)-1-phenyl-2-(piperidin-1-yl)ethylpropane-1,3-diamine (Koga's amine) (II.14)¹⁵²**



Under N₂, (*R*)-styrene oxide (2 g, 16.6 mmol, 1.0 equiv.) was diluted in EtOH (10 mL) before piperidine (2 mL, 1.2 equiv) was added. The solution was heated to reflux for 5 h. Volatiles were removed under vacuum by azeotropic distillation with toluene (2 × 6 mL). The mixture was then diluted in MTBE (18 mL) before NEt₃ (8.7 mL, 3.8 equiv) was added. After 10 min at rt, the reaction mixture was cooled down to -15 °C and stirred for additional 10 min. Methane sulfonyl chloride (1.54 mL, 1.2 equiv) was then added dropwise over 25 min and under vigorous stirring. After 40 min at -15 °C, 1,3-diaminopropane (0.7 mL, 0.5 equiv) was added, followed by H₂O (8.2 mL). The reaction mixture was warmed to rt over 1 h during which time the precipitate dissolved. The organic phase was collected and the aqueous layer was extracted with MTBE (2 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue (3.1 g) was first purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 99:0.5:0.5 → 85:14.5:0.5). The product was then recrystallized from *i*-PrOH/H₂O at 0 °C, collected and dried under vacuum for 72 h. The title compound **II.14** was recovered as a white solid (2.3 g, 62%).

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.36-7.21 (m, 10H, H_{arom}), 3.71 (dd, *J* = 10.8 Hz, *J* = 3.5 Hz, 2H, H₃), 2.53–2.21 (m, 18H, NH, H₂, H₄, H₅), 1.68–1.33 (m, 14H, H₁, H₆, H₇).

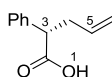
¹³C NMR (CDCl₃): δ 143.3, 128.2, 127.3, 126.8, 66.6, 60.1, 54.6, 46.2, 31.5, 26.1, 24.5.

IR (neat): 3301, 2934, 2801, 1452 cm⁻¹.

[α]²⁰_D -111.6 (*c* 0.56, CHCl₃); (lit.,¹ [α]²⁰_D -112 (*c* 5.45, CHCl₃), 99.9% ee).

ESI-MS (ES⁺): 449 [M+H]⁺.

¹⁵² Fritzzle, M.; Caille, S.; Marshall, T. L.; McRae, K.; Nadeau, K.; Guo, G.; Wu, S.; Martinelli, M. J.; Moniz, G. *Org. Process. Res. Dev.* **2007**, *11*, 215-222.

(S)-2-phenylpent-4-enoic acid (II.11)¹⁵³

Under N₂ and at 0 °C, to a solution of phenylacetic acid (200 mg, 1.47 mmol, 1.0 equiv) and (*R*)-Koga's amine (686 mg, 1.04 equiv) in dry THF (10 mL), *n*-BuLi (2.35 mL of a 2.5 M soln in hexane, 4 equiv) was added over 5 min. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 15 min, cooled down to -78 °C, and allyl bromide (509 μL, 4 equiv) was added over 10 min. After the addition, the reaction was immediately quenched with MeOH/THF 1:3 (1.9 mL) and stirred for 5 min. 1 M HCl (10 mL) and EtOAc (10 mL) were added. The organic phase was collected and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 10 mL). The combined organic layers were washed with 1 M HCl (5 mL), brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give compound **II.11** (214 mg, 83%) as a yellowish oil. No further purification was needed for this product.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.37–7.25 (m, 5H, H_{arom}), 5.78–5.67 (m, 1H, H₅), 5.09 (dd, *J* = 17.2 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, H₆), 5.02 (dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, H₆), 3.65 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₃), 2.87–2.79 (m, 1H, H₄), 2.57–2.49 (m, 1H, H₄).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 179.0, 137.7, 134.8, 128.6, (2C), 127.9 (2C), 127.5, 117.1, 51.2, 36.9.

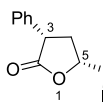
IR (neat): 3067 (OH), 1706 (CO) cm⁻¹.

Chiral HPLC: (Chiralcel OJ 250 × 4.6, hexane/*i*-PrOH 9:1, flow rate: 1 mL min⁻¹, detection at 220 nm), *t*_{major} = 9.6 min, *t*_{minor} = 11.5 min, 88% ee.

[α]_D²⁰ +77.6 (*c* 0.85, CHCl₃); (lit.,² [α]_D²⁰ +77.2 (*c* 1.00, CHCl₃), 93% ee).

ESI-MS (ES⁺): 177 [M+H]⁺.

¹⁵³ Stivala, C. E.; Zakarian, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *133*, 11936-11939.

(3*S*,5*R*)-5-(iodomethyl)-3-phenyldihydrofuran-2(3*H*)-one (II.12)¹⁵⁴

Under N₂ and at 0 °C, to a solution of acid **II.11** (330 mg, 1.87 mmol, 1.0 equiv) in Et₂O (12 mL), K₂CO₃ (310 mg, 1.2 equiv) was added, followed by I₂ (522 mg, 1.1.0 equiv) portionwise over 20 min. The dark mixture was stirred at 0 °C for 1 h and 5 h at rt. Iodide in excess was quenched with sat Na₂S₂O₃ (5 mL). The organic phase was collected and the aqueous layer was extracted with Et₂O (2 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (EtOAc/*n*-hexane 2:8) to give compound **II.12** as a white solid (365 mg, 65%).

R_f 0.25 (EtOAc/*n*-hexane 3:7).

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.40–7.25 (m, 5H, H_{arom}), 4.55–4.48 (m, 1H, H₅), 3.95 (dd, *J* = 12.4 Hz, *J* = 8.8 Hz, 1H, H₃), 3.53 (dd, *J* = 10.6 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1H, H₆), 3.37 (dd, *J* = 10.6 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₆), 2.99–2.92 (m, 1H, H₄), 2.19–2.10 (m, 1H, H₄).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 175.7, 135.9, 128.8 (2C), 128.0 (2C), 127.8, 76.1, 47.3, 38.3, 6.4.

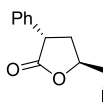
IR (KBr): 1771 (CO) cm⁻¹.

Chiral HPLC: (Daicel OJ-R 150 × 4.6, H₂O/MeOH 1:9, flow rate: 1 mL min⁻¹, detection at 254 nm), *t*_{minor} = 4.1 min, *t*_{major} = 5.0 min, 88% ee.

[α]_D²⁰ +30.9 (*c* 0.50, CHCl₃).

ESI-MS (ES⁺): 303 [M+H]⁺.

¹⁵⁴ Ding, Z.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 885-889.

(3*S*,5*S*)-5-(iodomethyl)-3-phenyldihydrofuran-2(3*H*)-one (II.15)

Under N₂ and at 0 °C, to a solution of acid **II.11** (330 mg, 1.87 mmol, 1.0 equiv) in Et₂O (12 mL), K₂CO₃ (310 mg, 1.2 equiv) was added, followed by I₂ (522 mg, 1.1 equiv) portionwise over 20 min. The dark mixture was stirred at 0 °C for 1 h and 5 h at rt. Iodide in excess was quenched with sat Na₂S₂O₃ (5 mL). The organic phase was collected and the aqueous layer was extracted with Et₂O (2 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (EtOAc/*n*-hexane 2:8) to give compound **II.15** as a white solid (157 mg, 28%).

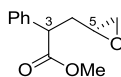
R_f 0.35 (EtOAc/*n*-hexane 3:7).

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.40–7.28 (m, 5H, H_{arom}), 4.75–4.71 (m, 1H, H₅), 4.02 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₃), 3.47 (dd, *J* = 10.1 Hz, *J* = 4.2 Hz, 1H, H₆), 3.37 (dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₆), 2.64–2.57 (m, 2H, H₄).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 176.2, 136.6, 129.0 (2C), 127.8, 127.4 (2C), 76.8, 45.7, 36.4, 6.8.

IR (KBr): 1772 (CO) cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 303 [M+H]⁺.

Methyl 3-((S)-oxiran-2-yl)-2-phenylpropanoate (II.13)

To a solution of lactone **II.12** (264 mg, 0.87 mmol, 1.0 equiv) in MeOH (8.7 mL) was added K_2CO_3 (241 mg, 2 equiv). The mixture was stirred for 2 h at rt, and the solvent was removed under vacuum. The solid was suspended in Et_2O , filtered and washed twice with Et_2O (2×4 mL). Volatiles were evaporated under vacuum to give compound **II.13** as a colorless oil (175 mg, 98%).

R_f 0.35 (EtOAc/cyclohexane 3:7).

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.37–7.27 (10H, m), 3.84–3.78 (2H, m), 3.68 (3H, s), 3.67 (3H, s), 2.98–2.95 (1H, m), 2.80–2.75 (2H, m), 2.70–2.67 (1H, m), 2.53–2.51 (1H, m), 2.47–2.40 (2H, m), 2.17–2.11 (2H, m), 1.87–1.80 (1H, m).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 173.7, 173.6, 138.5, 137.9, 128.7 (2C), 127.9 (2C), 127.7 (2C), 127.6, 127.5 (2C), 127.4, 52.1, 52.0, 50.3, 49.9, 48.4, 48.3, 47.3, 47.2, 36.4, 36.1.

IR (neat): 1734 (CO) cm^{-1} .

ESI-MS (ES⁺): 207 [M+H]⁺.

HRMS: calcd for $C_{12}H_{15}O_3$ [M+H]⁺ 207.1017, found 207.1023.

(1S,5R)-1-phenyl-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-one (II.1')¹⁵⁵

To a refluxing solution of epoxy ester **II.13** (202 mg, 0.98 mmol, 1.0 equiv) in anhydrous 1,4-dioxane (9 mL) and HMPA (1.2 mL), LDA (2 mL of a 0.6 M soln in THF, 1.2 equiv) was added quickly. After 2 min, the reaction was cooled down to rt and HCl was bubbled until pH < 1. Et₂O (10 mL) and H₂O (10 mL) were added. The organic phase was collected and the aqueous layer was extracted with Et₂O (2 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude mixture was purified by column chromatography (EtOAc/cyclohexane 2:8) to give compound **II.1'** as a colorless liquid (94 mg, 55%).

R_f 0.40 (EtOAc/cyclohexane 3:7).

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.45–7.28 (m, 5H, H_{arom}), 4.47 (dd, *J* = 9.4 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H, H₆), 4.29 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H₆), 2.58–2.54 (m, 1H, H₅), 1.65 (dd, *J* = 7.6 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H, H₄), 1.37 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H₄).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 175.9, 134.0, 128.5 (2C), 128.2 (2C), 127.6, 67.9, 31.6, 25.0, 20.0.

IR (neat): 1760 (CO) cm⁻¹.

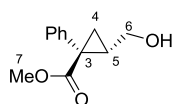
Chiral HPLC: (Daicel OJ-R 150 × 4.6, H₂O/MeOH 4:6, flow rate: 1 mL min⁻¹, detection at 254 nm), t_{major} = 15.4 min, t_{minor} = 17.7 min, 88% ee.

[α]_D²⁰ -62.4 (*c* 0.48, MeOH), ; (lit.,¹⁵⁶ [α]_D²⁰ -78.5 (*c* 1.42, MeOH), 96% ee).

ESI-MS (ES⁺): 175 [M+H]⁺.

¹⁵⁵ Roggen, H.; Kehler, J.; Stensbol, T. B.; Hansen, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2834-2837.

¹⁵⁶ Shuto, S.; Ono, S.; Hase, Y.; Kamiyama, N.; Takada, H.; Yamasihita, K.; Matsuda, A. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 915-920.

(1*S*,2*R*)-methyl 2-(hydroxymethyl)-1-phenylcyclopropanecarboxylate (II.3)¹⁵⁷

Under N₂ and at 0 °C, to a solution of epoxy ester **II.13** (10 mg, 0.048 mmol, 1.0 equiv) in anhydrous THF (0.5 mL), KHMDS (0.5 M in toluene, 120 μL, 1.2 equiv) was added. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h and 1 h at 20 °C. The reaction was then quenched with HCl 1 M (2 mL) and extracted with diethylether (3 x 2 mL). The organic phase was collected and the aqueous layer was extracted with Et₂O (2 x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (EtOAc/*n*-hexane 2:8) to give compound **II.3** as a colorless oil (7.3 mg, 87 %).

R_f 0.25 (DCM/MeOH 95:5).

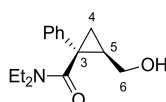
¹H NMR (CDCl₃): δ 7.35-7.28 (m, 5H, H_{arom}), 3.63 (s, 3H, H₇), 3.49-3.38 (m, 1H, H₆), 3.18 (dd, *J* = 11.8 Hz, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₆), 2.21-2.17 (m, 1H, H₅), 1.72 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H, H₄), 1.27 (dd, *J* = 7.1 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H, H₄).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 174.4, 135.4, 130.9 (2C), 128.3 (2C), 127.5, 62.4, 52.4, 33.7, 29.7, 18.3.

IR (neat): 1735 (CO) cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 207 [M+H]⁺.

¹⁵⁷ Mourzin, G.; Cousse, H.; Bonnaud, B. *Communications* **1978**, 304-305.

(1*S*,2*R*)-*N,N*-diethyl-2-(hydroxymethyl)-1-phenylcyclopropanecarboxamide (II.18)¹⁵⁸

Diethylamine (210 μ L, 2.6 equiv) was added to a suspension of AlCl_3 (137 mg, 1.3 equiv) in anhydrous toluene (1.5 mL), under N_2 . After 10 min, lactone **II.1'** (138 mg, 0.79 mmol, 1.0 equiv) diluted in toluene (2 mL) was added dropwise. The suspension was stirred for 2 h and quenched with 0.1 N HCl (3 mL). The organic phase was collected and the aqueous layer extracted with toluene (2×3 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by filtration over silica ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 99:1 \rightarrow 80:20) to give compound **II.18** as a colorless oil (176 mg, 90%).

R_f 0.10 (EtOAc/cyclohexane 3:7).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 7.32–7.19 (m, 5H, H_{arom}), 4.05 (dd, $J = 12.4$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 1H, H_6), 3.55–3.44 (m, 1H, $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_3$), 3.43–3.35 (m, 3H, $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_3$), 3.18 (dd, $J = 12.0$ Hz, $J = 10.4$ Hz, 1H, H_6), 2.74 (br.s, 1H, $-\text{OH}$), 1.66 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 5.6$ Hz, 1H, H_5), 1.60–1.54 (m, 1H, H_4), 1.13 (t, $J = 8.4$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.09 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, H_4), 0.91 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$).

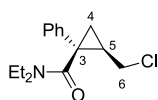
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ 171.1, 140.2, 128.6, 126.5, 125.6, 64.8, 41.9, 39.4, 34.3, 31.9, 16.6, 13.0, 12.3.

IR (neat): 3418 (OH), 1616 (CO) cm^{-1} .

$[\alpha]_D^{20}$ +50.8 (c 0.51, CHCl_3).

ESI-MS (ES^+): 248 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

¹⁵⁸ Doyle, M. P.; Hu, W. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 299–302.

(1*S*,2*R*)-2-(chloromethyl)-*N,N*-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide (II.19)

Under N₂, SOCl₂ (77 μL, 1.6 equiv) was added dropwise to a solution of alcohol **II.18** (164 mg, 0.66 mmol, 1.0 equiv) in anhydrous toluene (4 mL). After 2 h, volatiles were removed under vacuum. The crude residue was purified by filtration over silica gel (CH₂Cl₂/EtOAc 99:1 → 80:20) to give compound **II.19** as a white solid (168 mg, 96%).

R_f 0.60 (EtOAc/cyclohexane 3:7).

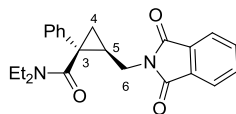
¹H NMR (CDCl₃): δ 7.33–7.20 (m, 5H, H_{arom}), 3.70–3.50 (m, 4H, -CH₂-CH₃, H₆), 3.19–3.12 (m, 1H, -CH₂-CH₃), 3.10–3.04 (m, 1H, -CH₂-CH₃), 2.21–2.16 (m, 1H, H₅), 1.66–1.61 (m, 1H, H₄), 1.18 (dd, *J* = 9.2 Hz, *J* = 5.2 Hz, 1H, H₄), 1.12 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, -CH₃), 0.55 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, -CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 168.9, 140.2, 128.7 (2C), 126.8, 126.5 (2C), 45.6, 42.3, 39.6, 37.3, 26.9, 21.2, 12.3, 12.2.

IR (KBr): 1630 (CO) cm⁻¹.

[α]_D²⁰ +146 (*c* 0.62, CHCl₃).

ESI-MS (ES⁺): 266 [M+H]⁺.

(1*S*,2*R*)-2-((1,3-dioxisoindolin-2-yl)methyl)-*N,N*-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide**(II.20)**¹⁵⁹

Under N₂, cyclopropane **II.19** (120 mg, 0.45 mmol, 1.0 equiv) was diluted in anhydrous toluene (2 mL) and potassium phthalimide (167 mg, 2 equiv) was added. The reaction mixture was heated to reflux for 3 h, cooled down to rt, and quenched with H₂O (3 mL). The organic phase was collected and the aqueous layer was extracted with toluene (2 × 3 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to give **II.20** as a white solid (148 mg, 88%).

R_f 0.30 (EtOAc/cyclohexane 3:7).

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.85–7.81 (m, 2H, H_{phthal}), 7.73–7.68 (m, 2H, H_{phthal}), 7.35–7.10 (m, 5H, H_{arom}), 4.16 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 4.0 Hz, 1H, H₆), 3.59–3.53 (m, 1H, -CH₂-CH₃), 3.49–3.41 (m, 2H, -CH₂-CH₃, H₆), 3.35–3.29 (m, 1H, -CH₂-CH₃), 3.17–3.10 (m, 1H, -CH₂-CH₃), 2.05–1.99 (m, 1H, H₅), 1.65 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, H₄), 1.19–1.08 (m, 4H, H₄, -CH₃), 0.65 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, -CH₃).

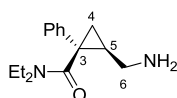
¹³C NMR (CDCl₃): δ 169.1, 168.2 (2C), 140.3, 133.9 (2C), 132.1 (2C), 128.6 (2C), 126.5, 126.0 (2C), 128.1 (2C), 41.8, 39.5, 39.3, 34.8, 24.5, 20.6, 12.7, 12.5.

IR (KBr): 1771, 1714, 1632 (CO) cm⁻¹.

[α]_D²⁰ -64.6 (*c* 0.46, CHCl₃).

ESI-MS (ES⁺): 377 [M+H]⁺.

¹⁵⁹ Bonnaud, B.; Cousse, H.; Mouzin, G.; Briley, M.; Strenger, A.; Fauran, F.; Couzinier J. P. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 318-325.

(1*S*,2*R*)-2-(aminomethyl)-*N,N*-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide¹⁵⁸

Under N₂, phthalimide **II.20** (61 mg, 0.16 mmol, 1.0 equiv) was diluted in anhydrous toluene (2 mL) and ethanolamine (98 μ L, 10 equiv) was added. The reaction mixture was heated to 100 °C for 3 h, cooled down to rt, and quenched with 20% NaCl (3 mL). The aqueous layer was extracted with toluene (2 \times 3 mL). The combined organic layers were washed with 20% NaCl (2 \times 3 mL) and 1 M HCl (2 \times 3 mL). The organic phase was discarded. The combined aqueous layers were basified with 20% NaOH and extracted with toluene (3 \times 3 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to give Levomilnacipran as an oil (36 mg, 89%).

*R*_f 0.20 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

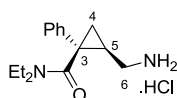
¹H NMR (CDCl₃): δ 7.30–7.10 (m, 5H, H_{arom}), 3.55–3.44 (m, 2H, -CH₂-CH₃), 3.25–3.11 (m, 2H, -CH₂-CH₃), 2.78 (dd, *J* = 13.0 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₆), 2.65 (dd, *J* = 13.0 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₆), 1.77–1.72 (m, 1H, H₅), 1.56 (2H, -NH₂), 1.34–1.30 (m, 1H, H₄), 1.15 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 5.2 Hz, 1H, H₄), 1.09 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, -CH₃), 0.66 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, -CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 170.1, 141.1, 128.6 (2C), 126.3, 125.9 (2C), 43.6, 41.6, 39.2, 34.7, 29.5, 19.4, 12.7, 12.3.

IR (neat): 1626 (CO) cm⁻¹.

[α]_D²⁰ -88.3 (*c* 1.0, CHCl₃).

ESI-MS (ES⁺): 247 [M+H]⁺.

(1S,2R)-2-(aminomethyl)-N,N-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide hydrochloride¹⁶⁰

To a solution of Levomilnacipran (base) (18 mg, 0.073 mmol) in Et₂O (2 mL), was added a saturated solution of HCl in Et₂O (0.5 mL). The hydrochloride **1'** precipitated out spontaneously. The reaction mixture was further stirred for 15 min, decanted, and the supernatant was discarded. The solid was suspended in Et₂O (2 mL), stirred for 15 min, decanted and the supernatant was discarded. The washing step was repeated twice. Finally, the solid was collected and dried under vacuum overnight to give the desired compound as a white solid (20 mg, 97 %).

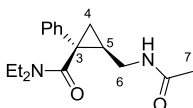
¹H NMR (CDCl₃): δ 8.83 (br. s, 3H), 7.30–7.15 (m, 5H, H_{arom}), 3.84–3.72 (m, 1H, H₆), 3.47–3.27 (m, 4H, -CH₂-CH₃), 2.53–2.35 (m, 1H, H₆), 1.87–1.82 (m, 1H, H₅), 1.80–1.62 (m, 1H, H₄), 1.31–1.09 (m, 4H, H₄, -CH₃), 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, -CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 170.7, 138.1, 128.9 (2C), 127.3, 125.6 (2C), 43.1, 42.0, 39.6, 34.6, 25.5, 17.9, 13.0, 12.2.

IR (KBr): 1615 (CO) cm⁻¹.

[α]_D²⁰ +71.9 (*c* 0.70, CHCl₃); (lit., ¹⁶⁰ [α]_D²⁰ +72.8 (*c* 0.95, CHCl₃), 96% ee).

¹⁶⁰ Shuto, S.; Ono, S.; Hase, Y.; Kamiyama, N.; Matsuda, A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 641-644.

(1*S*,2*R*)-2-(acetamidomethyl)-*N,N*-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide (II.21)

Under N₂, Levomilnacipran (3.5 mg, 0.018 mmol, 1.0 equiv) was diluted in anhydrous dichloromethane (0.5 mL) and acetyl chloride (4 μL, 4 equiv) and triethylamine (10 μL, 4 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred at 20 °C for 1 h and then quenched with aqueous Na₂CO₃ 10% (2 mL). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 × 2 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude mixture was purified by flash chromatography (EtOAc/methanol 9:1) to give the title compound as an oil (5.1 mg, quant.).

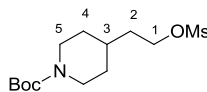
R_f 0.60 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.31-7.15 (m, 5H, H_{arom}), 7.07 (br s, 1H, -NH) 4.20-4.15 (m, 1H, H₆), 3.51-3.41 (m, 2H, -CH₂-CH₃), 3.36-3.29 (m, 2H, -CH₂-CH₃), 2.52 (td, *J* = 10.2 Hz, *J* = 3.2 Hz, 1H, H₆), 1.98 (s, 3H, H₇), 1.57 (dd, *J* = 8.9 Hz, *J* = 5.3 Hz, 1H, H₅), 1.48-1.44 (m, 1H, H₄), 1.14 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, -CH₃), 1.10 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H₄), 0.88 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, -CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 170.6, 169.7, 140.4, 128.7 (2C), 126.5, 125.3 (2C), 41.8, 41.2, 39.4, 33.7, 29.4, 23.5, 17.5, 13.0, 12.4.

Chiral HPLC: (Daicel OJ-R 150 × 4.6 mm, H₂O/MeOH 5:5, flow rate: 1 mL min⁻¹, detection at 200 nm), t_{major} = 7.0 min, t_{minor} = 8.9 min, 88% ee.

ESI-MS (ES⁺): 287 [M+H]⁺.

c. Chapter III: Enantioselective synthesis of 1,4-benzodioxanes***N*-Boc-4-piperidinyl mesylate (**III.3**)¹⁶¹**

Under N₂, mesyl chloride (0.72 mL, 7.3 mmol, 2 equiv.) was added dropwise to a solution of *N*-Boc piperidine ethanol (840 mg, 3.7 mmol, 1.0 equiv.) and triethylamine (1.0 mL, 7.3 mmol, 2 equiv.) in anhydrous toluene (20 mL) at 20 °C. The solution was stirred for 4 h and then quenched with HCl 1 M (20 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residual oil was crystallized from heptane (40 mL) to provide pure **III.3** (1.05 g, 93 %).

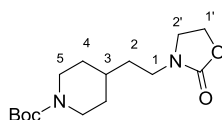
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.30 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H₁), 3.04 (s, 3H, -OMs), 2.71 (t, J = 12.5 Hz, 2H, H₅), 1.75-1.60 (m, 7H, H₃, H₄, H₅), 1.47 (s, 9H, -Boc), 1.21-1.15 (m, 2H, H₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 154.8, 79.4, 77.4, 67.4, 37.5, 35.6, 32.4, 31.7, 28.5.

IR (neat): 2925, 1775, 1682 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 308 [M+H]⁺.

¹⁶¹ WO2007/3962 A2

***N*-Boc-4-(2-(2-oxooxazolidin-3-yl)ethyl)piperidine (III.4)**

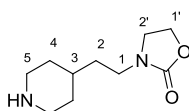
Under N₂, oxazolidinone (321 mg, 3.7 mmol, 1.2 equiv.) and potassium carbonate (511 mg, 3.7 mmol, 1.2 equiv.) were added to a solution of **III.3** (950 mg, 3.1 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous toluene (10 mL). The suspension was heated at 100 °C for 17 h. At the end of the reaction, water (20 mL) was added. After separation, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (diethyl ether:methanol, 100:0 to 95:5) to give the desired product **III.4** (860 mg, 93%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.35 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H_{1'}), 3.56 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{2'}), 3.35 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H₁), 2.71 (t, *J* = 11.7 Hz, 2H, H₅), 1.75-1.68 (m, 2H, H₅), 1.54-1.41 (m, 14H, H₃, H₄, -Boc), 1.22-1.09 (m, 2H, H₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 158.4, 154.8, 79.3, 77.3, 61.7, 44.4, 41.8, 33.9, 33.5, 31.9, 28.5.

IR (neat): 2925, 1751, 1687 cm⁻¹

ESI-MS (ES⁺): 299 [M+H]⁺.

3-(2-(piperidin-4-yl)ethyl)oxazolidin-2-one (III.5)

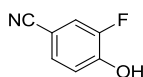
A solution of **III.4** (820 mg, 2.73 mmol, 1.0 equiv.) in HCl.isopropanol (2.2 M, 10 mL) was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched by the addition of aqueous sodium hydroxyde 5 % (20 mL). Then brine was added (20 mL) and the mixture was extracted with ethyl acetate (4 x 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residual oil which crystallized was then used without further purification (443 mg, 82 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.35 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_{1'}), 3.57 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_{2'}), 3.35 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H₁), 3.11-3.06 (m, 2H, H₅), 2.71 (td, $J = 12.1$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 2H, H₅), 1.73 (br. s., 3H, H₄, N-H), 1.52 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H₄), 1.45-1.37 (m, 1H, H₃), 1.22-1.09 (m, 2H, H₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 158.4, 77.3, 61.6, 44.4, 41.8, 34.5, 33.7, 33.2.

IR (neat): 3429, 2922, 1741 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 199 [M+H]⁺.

3-fluoro-4-hydroxybenzonitrile (III.6)¹⁶²

Under N₂, diphenyl disulfide (0.51 g, 2.3 mmol, 0.6 equiv.) and calcium hydride (0.26 g, 6.3 mmol, 1.6 equiv.) were added to a solution of 3-fluoro-4-methoxybenzonitrile (0.6 g, 3.9 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous NMP (3 mL). The solution was heated at 170 °C for 1h. After cooling down, it was quenched by the slow addition of HCl 1 M (50 mL). It was then extracted with diethylether (3 x 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography (dichloromethane:methanol, 100:0 to 98:2) to give the 3-fluoro-4-hydroxybenzonitrile (**III.6**) as a white solid (0.51 g, 95 %).

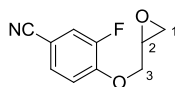
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.44-7.30 (m, 2H, H_{arom}), 7.10 (t, J_{H-F} = 8.2 Hz, 1H, H_{arom}), 6.04 (br. s.; 1H, -OH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 150.5 (d, J_{C-F} = 242 Hz), 148.3 (d, J_{C-F} = 13.8 Hz), 130.0 (d, J_{C-F} = 4.6 Hz), 119.7 (d, J_{C-F} = 21.4 Hz), 118.5 (d, J_{C-F} = 3.1 Hz), 117.9, 103.7.

IR (neat): 3209, 2243, 1520 cm⁻¹.

ESI-MS (ES+): 138 [M+H]⁺.

¹⁶² Gavande, N. S.; Kundu, S.; Badjugar, N. S.; Kaur, G.; Chakraborti, A. K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4201-4204.

3-fluoro-4-(oxiran-2-ylmethoxy-benzonitrile (III.7)

Under N₂, triphenylphosphine (684 mg, 2.61 mmol, 1.2 equiv.), glycidol (174 μ L, 2.62 mmol, 1.2 equiv.) and DIAD (510 μ L, 2.60 mmol, 1.2 equiv.) were added dropwise to a solution of 3-fluoro-4-hydroxybenzonitrile **III.6** (300 mg, 2.18 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous tetrahydrofuran (10 mL) at 0 °C. The solution was warmed up to 20 °C and stirred for 2 h. The reaction was quenched with water (10 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (dichloromethane) to give the desired product **III.7** (413 mg, 98%).

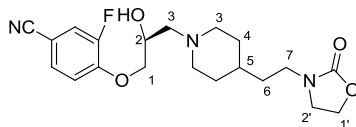
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.44 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H_{arom}), 7.40 (dd, $J_{\text{H-F}} = 10.4$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H_{arom}), 7.09 (t, $J = 8.6$ Hz, $J_{\text{H-F}} = 8.6$ Hz, 1H, H_{arom}), 4.45 (dd, $J = 11.4$ Hz, $J = 2.7$ Hz, 1H, H₃), 4.08 (dd, $J = 11.4$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 1H, H₃), 3.43-3.39 (m, 1H, H₂), 2.97 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H, H₁), 2.81 (dd, $J = 4.5$ Hz, $J = 2.7$ Hz, 1H, H₁).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 153.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 250$ Hz), 150.6 (d, $J_{\text{C-F}} = 9.2$ Hz), 129.7 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.1$ Hz), 120.0 (d, $J_{\text{C-F}} = 21.5$ Hz), 117.8, 115.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.1$ Hz), 104.7 (d, $J_{\text{C-F}} = 9.2$ Hz), 70.2, 49.7, 44.4.

IR (neat): 3059, 2233 cm⁻¹.

ESI-MS (ES+): 194 [M+H]⁺.

(S)-3-fluoro-4-(2-hydroxy-3-(4-(2-oxooxazolidin-3-yl)ethyl)piperidin-1-yl)propoxylbenzonitrile
(III.8)



Under N₂, triphenylphosphine (63 mg, 0.24 mmol, 1.2 equiv.), glycidol (16 μ L, 0.24 mmol, 1.2 equiv.) and DIAD (48 μ L, 0.24 mmol, 1.2 equiv.) were added dropwise to a solution of 3-fluoro-4-hydroxybenzonitrile **III.6** (28 mg, 0.2 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous tetrahydrofuran (1 mL) at 0 °C. The solution was warmed up to 20 °C and stirred for 2 h. Then the amine **III.5** (40 mg, 0.2 mmol, 1.0 equiv.) was added and the reaction mixture was heated at 50 °C overnight. After concentration, the crude mixture directly loaded onto the top of a chromatographic column and eluted (dichloromethane:methanol, from 99:1 to 90:10). The desired product **III.8** was isolated as a white solid (62 mg, 81%).

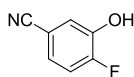
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.43 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H_{arom}), 7.40 (dd, $J_{\text{H-F}} = 10.4$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H_{arom}), 7.09 (t, $J = 8.6$ Hz, $J_{\text{H-F}} = 8.6$ Hz, 1H, H_{arom}), 4.35 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_{1'}), 4.15-4.10 (m, 3H, H₁, H₂), 3.57 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_{2'}), 3.34 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H₇), 3.01 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, H₃), 2.85 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, H₃), 2.56-2.49 (m, 2H, H₃), 2.33 (td, $J = 9.7$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H, H₃), 2.02 (td, $J = 9.7$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, H₃), 1.78 (d, $J = 9.7$ Hz, 2H, H₄), 1.52 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, H₄), 1.37-1.25 (m, 3H, H₅, H₆).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 158.4, 152.0 (d, $J_{\text{C-F}} = 251$ Hz), 151.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 10.7$ Hz), 129.6 (d, $J_{\text{C-F}} = 4.6$ Hz), 119.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 21.4$ Hz), 117.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.7$ Hz), 115.1, 104.3, 77.3, 71.8, 65.2, 61.6, 60.2, 44.4, 41.9, 33.8, 33.1, 32.4.

IR (neat): 3421, 2229, 1746 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 392[M+H]⁺.

Chiral HPLC: (Chiralpak AD 150 \times 4.6 mm, hexane/ethanol 40/60, flow rate: 1 mL min⁻¹, detection at 220 nm) $t_{\text{major}} = 11.7$ min, $t_{\text{minor}} = 13.7$ min, 98% ee.

4-fluoro-3-hydroxybenzonitrile (III.11)¹⁶³

To a solution of 4-fluoro-3-methoxybenzonitrile (2.0 g, 12.3 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous DMF (10 mL) was added lithium chloride (1.7 g, 39.5 mmol, 3 equiv.). The reaction mixture was stirred overnight under reflux. After cooling down, it was quenched with HCl 1 M (50 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to provide pure 4-fluoro-3-hydroxybenzonitrile (1.0 g, 59 %).

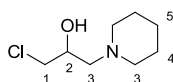
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.34 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H, H_{arom}), 7.25-7.17 (m, 2H, H_{arom}), 5.48 (br. s.; 1H, -OH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 153.7 (d, $J_{C-F} = 248$ Hz), 144.2 (d, $J_{C-F} = 15.4$ Hz), 125.7 (d, $J_{C-F} = 7.7$ Hz), 121.3 (d, $J_{C-F} = 3.1$ Hz), 117.8, 116.8 (d, $J_{C-F} = 19.4$ Hz), 109.1.

IR (neat): 3266, 2246, 1508 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 138 [M+H]⁺.

¹⁶³ Kelly, S. M. *Helv. Chem. Act.* **1984**, 67, 1572-1579.

1-chloro-3-(piperidin-1-yl)propan-2-ol (III.13)¹⁶⁴

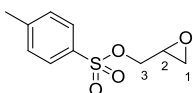
Epichlorohydrine (0.4 mL, 5 mmol, 1.0 equiv.) was added to a solution of piperidine (0.5 mL, 5 mmol, 1.0 equiv.) in absolute ethanol (5 mL). The solution was stirred at room temperature for 1 h. After concentration, the desired halohydrine was recovered as a colorless oil (900 mg, quant.).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.94-3.91 (m, 1H, H₂), 3.57 (d, J = 5.3 Hz, 2H, H₁), 2.60 (br. s, 2H, H₃), 2.45-2.38 (m, 4H, H₃), 1.63-1.57 (m, 4H, H₄), 1.48-1.45 (m, 2H, H₅).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 66.4, 58.9, 54.7, 47.2, 26.1, 24.1.

IR (neat): 3375, 2943 cm⁻¹.

¹⁶⁴ Banoth, L.; Narayan, T. K.; Pujala, B.; Chakraborti, A. K.; Banerjee, U. C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, 23, 1564–1570.

Oxiran-2-ylmethyl 4-methylbenzenesulfonate (III.18)¹⁶⁵

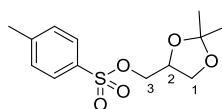
Under N₂, a solution of tosyl chloride (2.45 g, 12.8 mmol, 0.95 equiv.) in dichloromethane (12.5 mL) was added dropwise, over 10 min, to a solution of glycidol (1.0 g, 13.5 mmol, 1.0 equiv.), DMAP (83 mg, 0.68 mmol, 0.05 equiv.), and triethylamine (3.75 mL, 26.9 mmol, 2 equiv.) in dichloromethane (12.5 mL) at 0°C. The reaction mixture was stirred at 20 °C for 2 h. It was then quenched with HCl 0.5M (25 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 25 mL). The combined organic layers were washed with brine (25 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude reaction was purified by flash chromatography (dichloromethane:ethyl acetate, 10:0 to 9:1) to give the desired product **III.18** (1.98 g, 68 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{arom}), 7.38 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{arom}), 4.25 (dd, *J* = 11.5 Hz, *J* = 3.3 Hz, 1H, H₃), 3.97 (dd, *J* = 11.5 Hz, *J* = 6.0 Hz, 1H, H₃), 3.23-3.19 (m, 1H, H₂), 2.84 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H₁), 2.61 (dd, *J* = 4.6 Hz, *J* = 2.6 Hz, 1H, H₁), 2.48 (s, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 145.2, 132.7, 129.9 (2C), 127.9 (2C), 70.4, 48.8, 44.6, 21.7.

IR (neat): 3061, 2925 cm⁻¹.

¹⁶⁵ Ilic, M.; Dunkel, P.; Llas, J.; Chabielska, E.; Zakrzeska, A.; Mátyus, P.; Kikelj, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 329-340.

(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl 4-methylbenzenesulfonate (III.19)¹⁶⁶

Under N₂, triethylamine (3.7 mL, 27.0 mmol, 2 equiv.), DMAP (82 mg, 0.67 mmol, 0.05 equiv.) and tosyl chloride (2.45 g, 12.8 mmol, 0.95 equiv.) were added to a solution of isopropylidene glycerol (1.67 mL, 13.5 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous dichloromethane (25 mL) at 0 °C. The solution was stirred for 1.5 h and then concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate:cyclohexane, 1:9 to 2:8) to give the desired product **III.19** (3.30 g, 91 %).

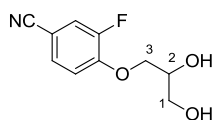
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.81 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.37 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_{arom}), 4.30 (quint., $J = 5.8$ Hz, 1H, H₂), 4.08-4.02 (m, 2H, H₃, H₁), 3.98 (dd, $J = 10.1$ Hz, $J = 5.8$ Hz, 1H, H₃), 3.78 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 5.8$ Hz, 1H, H₁), 2.47 (s, 3H, -CH₃ (tosyl)), 1.36 (s, 3H, -CH₃), 1.33 (s, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 145.1, 132.6, 129.9 (2C), 128.0 (2C), 110.1, 72.9, 69.5, 66.2, 26.6, 25.2, 21.7.

IR (neat): 2997, 1362 cm⁻¹.

ESI-MS (ES+): 309 [M+Na]⁺.

¹⁶⁶ Dams, I.; Chodyński, M.; Krupa, M.; Pietraszek, A.; Zezula, M.; Cmoch, P.; Kosińska, K.; Kutner, A. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 1634-1648.

4-(2,3-dihydroxypropoxy)-3-fluorobenzonitrile (III.20)

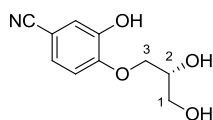
To a solution of **III.6** (100 mg, 0.72 mmol, 1.0 equiv.) and **III.19** (250 mg, 0.87 mmol, 1.2 equiv.) in methylisobutylketone (2 mL) was added potassium carbonate (120 mg, 0.87 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred for 8 hours at 20 °C. It was then quenched with HCl 1 M (5 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was then diluted in methanol (4 mL) and paratoluenesulfonic acid (25 mg, 0.13 mmol, 0.18 equiv.) was added. The mixture was stirred 8 h at 20 °C. It was then diluted with diethylether (10 mL) and stirred in the presence of an aqueous solution of 5 % sodium hydroxide (5 mL) for 1 h. It was then separated. The aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (dichloromethane:methanol, 96:4) to give the desired product **III.20** (65 mg, 43%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.46 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H, H_{arom}), 7.40 (dd, $J_{H-F} = 10.5$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H, H_{arom}), 7.07 (t, $J = 8.6$ Hz, $J_{H-F} = 8.6$ Hz, 1H, H_{arom}), 4.24-4.16 (m, 3H, H₁, H₂), 3.94-3.87 (m, 1H, H₃), 3.84-3.78 (m, 1H, H₃), 2.67 (br. s., 1H, -OH), 2.12 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, -OH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 152.1 (d, $J_{C-F} = 249$ Hz), 150.1 (d, $J_{C-F} = 21.1$ Hz), 129.7 (d, $J_{C-F} = 3.1$ Hz), 119.7 (d, $J_{C-F} = 21.5$ Hz), 117.8, 114.8, 104.7 (d, $J_{C-F} = 9.2$ Hz), 70.5, 69.9, 63.2.

IR (neat): 3332, 2927, 2234 cm⁻¹.

ESI-MS (ES+): 212 [M+H]⁺.

(R)-4-(2,3-dihydroxypropoxy)-3-hydroxybenzonitrile (III.21)

Under N₂, (*S*)-isopropylidene glycerol (330 μL, 2.66 mmol, 1.2 equiv.) and potassium *tert*-butoxide (560 mg, 5.00 mmol, 2.3 equiv.) were added to a solution of 4-fluoro-3-hydroxybenzonitrile (**III.11**) (300 mg, 2.15 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous dimethylformamide (1 mL). The suspension was stirred under reflux for 3 h. After cooling down to 70 °C, HCl 5 M (4 mL) was added and the reaction was kept to cool down to room temperature. It was then diluted with water (5 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude reaction was purified by flash chromatography (dichloromethane:methanol, 99:1 to 90:10) to give the desired product **III.21** (323 mg, 72%).

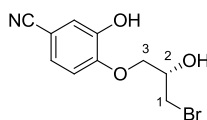
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 7.25 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{arom}), 7.15 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{arom}), 7.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H_{arom}), 4.99 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H₁), 4.70 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H₁), 4.09 (dd, *J* = 9.9 Hz, *J* = 3.8 Hz, 1H, H₃), 3.92 (dd, *J* = 9.9 Hz, *J* = 6.2 Hz, 1H, H₃), 3.85-3.81 (m, 1H, H₂).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): δ 151.6, 147.5, 152.2, 119.7, 118.4, 113.8, 103.2, 70.9, 70.2, 62.8.

IR (neat): 3432, 3341, 2941, 2230 cm⁻¹.

[α]_D²⁰ +28.3 (*c* 0.57, EtOH).

ESI-MS (ES+): 210 [M+H]⁺.

(S)-4-(3-bromo-2-hydroxypropoxy)-3-hydroxybenzonitrile (III.22)

Under N₂, triphenylphosphine (626 mg, 2.39 mmol, 2.5 equiv.) and tetrabromomethane (785 mg, 2.39 mmol, 2.5 equiv.) were added to a solution of **III.21** (200 mg, 0.95 mmol, 1.0 equiv.) in dichloromethane (5 mL). The solution was stirred for 2 h at 20 °C and then quenched with HCl 1 M (5 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (ethyl acetate:cyclohexane, 1:9 to 5:5) to give the desired product (**III.22**) (230 mg, 89%).

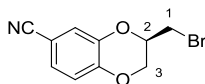
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.53 (br. s, 1H, -OH), 7.22-7.18 (m, 2H, H_{arom}), 6.92 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H_{arom}), 4.44-4.31 (m, 1H, H₂), 4.29-4.19 (m, 2H, H₃), 3.67-3.57 (m, 2H, H₁).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 149.5, 146.4, 125.4, 119.0, 118.9, 112.7, 105.4, 70.6, 69.5, 33.6.

IR (neat): 3455, 3246, 2937, 2245, 1521 cm⁻¹.

[α]_D²⁰ +0.8 (c 0.54, DCM).

ESI-MS (ES+): 272.0 – 274.0 [M+H]⁺.

(R)-3-(bromomethyl)-2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxine-6-carbonitrile (III.23)

Triphenylphosphine (86 mg, 0.33 mmol, 1.2 equiv.) and DIAD (65 μ L, 0.33 mmol, 1.2 equiv.) were added dropwise at 0 °C to a solution of **III.22** (75 mg, 0.27 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous tetrahydrofuran (2.7 mL). The solution was warmed up to 20 °C and stirred for 2 h. Volatils were then distilled and the crude mixture directly loaded onto the top of a chromatographic column and eluted (dichloromethane). The desired product was isolated as a white solid (**III.23**) (59 mg, 80 %).

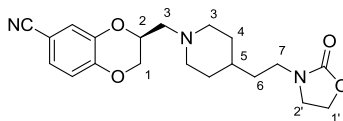
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.25-7.16 (m, 2H, H_{arom}), 6.98 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H_{arom}), 4.49-4.42 (m, 2H, H₂, H₃), 4.25 (dd, J = 11.9 Hz, J = 6.8 Hz, 1H, H₃), 3.60 (dd, J = 10.9 Hz, J = 4.9 Hz, 1H, H₁), 3.51 (dd, J = 10.9 Hz, J = 7.1 Hz, 1H, H₁).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 147.0, 142.7, 126.4, 121.3, 118.6, 118.2, 105.2, 71.9, 66.1, 28.1.

IR (neat): 2935, 2217 cm⁻¹.

$[\alpha]_D^{20}$ +8.5 (c 0.52, DCM).

(S)-3-((4-(2-(2-oxooxazolidin-3-yl)ethyl)piperidin-1-yl)methyl)-2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxine-6-carbonitrile (F17807)



Under N₂, potassium carbonate (21 mg, 0.156 mmol, 1.5 equiv.) was added to a solution of **III.23** (26 mg, 0.104 mmol, 1.0 equiv.) and amine **III.5** (23 mg, 0.115 mmol, 1.1 equiv.) in methyl-isobutylketone (1 mL). The reaction mixture was stirred at 110 °C for 5 h. The reaction was quenched with HCl 1 M (5 mL) and extracted with diethyl ether (1 x 5 mL). The aqueous layer was basified with NaOH 20 % and extracted with ethyl acetate (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (dichloromethane:methanol, 99:1 to 90:10) to give the desired product as a solid (26 mg, 58 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.18 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H_{arom}), 7.14 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, H_{arom}), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H_{arom}), 4.40-4.28 (m, 4H, H₁, H₂, H_{2'}), 4.03 (dd, *J* = 11.4 Hz, *J* = 7.3 Hz, 1H, H₁), 3.57 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{1'}), 3.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H₇), 2.97 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H₃), 2.89 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H₃), 2.67 (dd, *J* = 13.3 Hz, *J* = 5.7 Hz, 1H, H₃), 2.55 (dd, *J* = 13.3 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, H₃), 2.19-2.06 (m, 2H, H₃), 1.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H₄), 1.51 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, H₄), 1.37-1.25 (m, 3H, H₅, H₆).

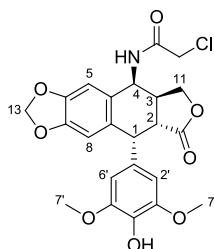
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 158.4, 147.5, 143.4, 125.8, 121.3, 118.9, 115.0, 104.5, 71.5, 67.3, 61.7, 58.6, 54.2, 44.4, 41.9, 33.8, 32.9, 32.2.

IR (neat): 2923, 2224, 1748 cm⁻¹.

[α]_D²⁰ +28.3 (*c* 0.50, DCM).

ESI-MS (ES⁺): 392 [M+H]⁺.

Chiral HPLC: (Chiralpak AD 150 × 4.6 mm, hexane/ethanol 40/60, flow rate: 1 mL min⁻¹, detection at 220 nm) *t*_{major} = 11.4 min, *t*_{minor} = 13.5 min, 98% ee.

d. Chapter IV: Synthesis of Podophyllotoxin analogues**i. Synthesis of F14512****4 β -chloroacetamide-4'-demethylpodophyllotoxin (IV.1)¹⁶⁷**

To a suspension of 4'-demethylepipodophyllotoxin (2.0 g, 5.0 mmol, 1.0 equiv.) in chloroacetonitrile (5 mL) were added three drops of sulfuric acid. The suspension was stirred for 1 h, then isopropanol (25 mL) was added. The suspension was stirred for 1 h before filtration. The solids were washed with cold isopropanol (2 x 5 mL). After drying, **IV.1** was recovered as a white solid (2.3 g, 96 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.74 (s, 1H, H₅), 6.64 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, -NH_{amide}), 6.55 (s, 1H, H₈), 6.29 (s, 2H, H₂, H₆), 6.00 (s, 1H, H₁₃), 5.99 (s, 1H, H₁₃), 5.42 (s, 1H, OH), 5.23 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 1H, H₄), 4.62 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, H₁), 4.42 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J = 7.6$ Hz, 1H, H₁₁), 4.12 (s, 2H, -CH₂Cl), 3.83-3.77 (m, 7H, H₇, H₁₁), 3.09-2.95 (m, 1H, H₃), 2.85 (dd, $J = 14.4$ Hz, $J = 5.0$ Hz, 1H, H₂).

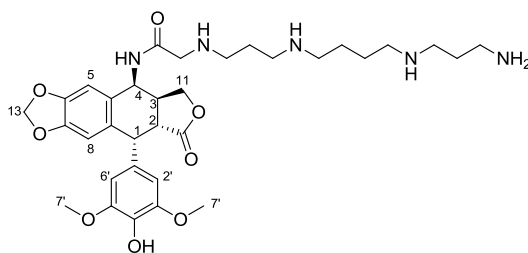
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 8.64 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, -NH_{amide}), 6.77 (s, 1H, H₅), 6.53 (s, 1H, H₈), 6.23 (s, 2H, H₂, H₆), 6.00 (s, 1H, H₁₃), 5.97 (s, 1H, H₁₃), 5.15 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 1H, H₄), 4.50 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₁), 4.27 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₁₁), 4.09 (s, 2H, -CH₂Cl), 3.77 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₁₁), 3.61 (s, 6H, H₇), 3.13 (dd, $J = 14.4$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₂), 3.01 – 2.93 (m, 1H, H₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.0, 166.3, 148.7, 147.8, 146.5 (2C), 134.2, 132.8, 130.0, 127.8, 110.3, 108.9, 107.8 (2C), 101.8, 68.7, 56.4 (2C), 48.7, 43.6, 42.3, 41.9, 37.2.

IR (neat): 3454, 3371, 1775, 1508 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 476-478 [M+H]⁺.

¹⁶⁷ Guminski, Y.; Grousseau, M.; Imbert, T. US2009/137826 A, **2009**.

4 β -(2-(spermine)-acetamide)-4'-demethylpipodophyllotoxin (F14512)¹⁶⁷

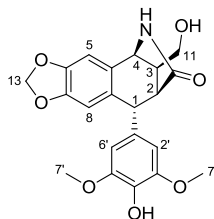
Spermine (90 mg, 0.44 mmol, 2.1 equiv.) was added to a solution of **IV.1** (100 mg, 0.21 mmol, 1.0 equiv.) in dimethylformamide (1.3 mL). After 1 h, ethanol (4.5 mL) was added followed by HCl.iPrOH (2.5 M, 1.4 mL). The suspension was stirred for 30 min before filtration. The solids were washed with isopropanol (2 x 2 mL). The crude mixture was purified by flash chromatography on reverse phase (HCl 5 mM:acetonitrile, 95:5). Purest fractions were lyophilized and **F14512** was recovered as a white solid (66 mg, 40 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.10 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH_{amide}), 6.79 (s, 1H, H₅), 6.53 (s, 1H, H₈), 6.23 (s, 2H, H₂, H₆), 6.00 (s, 1H, H₁₃), 5.98 (s, 1H, H₁₃), 5.22 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 4.1$ Hz, 1H, H₄), 4.50 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₁), 4.26 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H, H₁₁), 3.93 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H, H₁₁), 3.77 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H, CO-CH₂-NH), 3.61 (s, 6H, H₇), 3.21 (dd, $J = 14.4$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₂), 3.07-2.86 (m, 13H, H₃, H_{spermine}), 2.09-2.05 (m, 2H, H_{spermine}), 1.99-1.95 (m, 2H, H_{spermine}), 1.72 (br. s, 4H, H_{spermine}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): δ 174.9, 165.2, 147.7, 147.5 (2C), 146.9, 135.8, 132.7, 130.5, 130.4, 109.9, 109.5, 108.8 (2C), 101.7, 68.0, 56.3 (2C), 47.9, 47.5, 46.3, 44.5, 44.1, 43.2, 41.4, 40.4, 36.8, 36.5, 36.2, 23.9, 22.9 (2C), 22.5.

IR (KBr): 3412, 3004, 1768, 1679, 1484, 997 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 642 [M+H]⁺.

ii. Synthesis of analogue IV.2**Lactame IV.5**

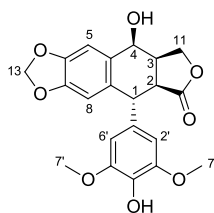
Potassium carbonate (120 mg, 0.86 mmol, 3.5 equiv.) was added to a solution of **IV.1** (120 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv.) in methanol (4 mL). The suspension was stirred for 6 h at 40 °C. After cooling down, the reaction mixture was quenched with HCl 1 M (5 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (ethyl acetate:methanol; 10:0 to 9:1) to provide the desired product as a white powder (62 mg, 63 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 8.21 (s, 1H, -NH_{amide}), 8.18 (s, 1H, Ph-OH), 6.80 (s, 1H, H₈), 6.42 (s, 1H, H₅), 6.25 (s, 2H, H₂, H_{6'}), 5.97 (s, 1H, H₁₃), 5.92 (s, 1H, H₁₃), 4.73 (t, , $J = 5.4$ Hz, 1H, CH₂-OH), 4.13 (s, 2H, H₁, H₄), 3.66 (s, 6H, H_{7'}), 3.45-3.38 (m, 1H, H₁₁), 3.26-3.21 (m, 1H, H₁₁), 2.27 (s, 1H, H₃), 2.23 (s, 1H, H₂).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): δ 177.7, 148.2 (2C), 146.9, 145.5, 136.4, 135.4, 134.7, 129.5, 111.5, 107.1, 106.6 (2C), 101.2, 61.0, 56.4 (2C), 55.3, 50.8, 45.8, 45.2.

IR (neat): 3361, 1681 (C=O amide) cm⁻¹.

ESI-MS (ES+): 399 [M+H]⁺.

picro-4'-demethylepipophyllotoxin (IV.8)¹⁶⁸

Sodium carbonate (2.2 g, 20.8 mmol, 4 equiv.) was added to a suspension of 4'-demethylepipodophyllotoxin (2.1 g, 5.2 mmol, 1.0 equiv.) in methanol (75 mL). The suspension was stirred for 9 h, then quenched with HCl 1 M (70 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (ethyl acetate:cyclohexane, 5:5 to 10:0) to provide pure **IV.8** as a white solid (2.0 g, 96 %).

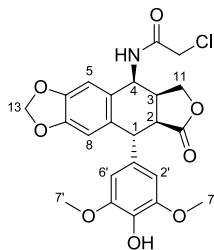
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.00 (s, 1H, H₅), 6.60 (s, 1H, H₈), 6.39 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 5.99 (s, 1H, H₁₃), 5.95 (s, 1H, H₁₃), 5.45 (s, 1H, OH), 4.85 (br. s, 1H, H₄), 4.44 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H₁), 4.38-4.34 (m, 2H, H₁₁), 3.84 (s, 6H, H_{7'}), 3.45 (dd, $J = 10.6$ Hz, $J = 3.5$ Hz, 1H, H₂), 3.21-3.14 (m, 1H, H₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 178.7, 147.5, 147.1 (2C), 147.0, 133.6, 132.9, 131.0, 130.4, 109.7, 106.2, 104.6 (2C), 101.1, 68.0, 67.9, 56.4 (2C), 44.9, 44.4, 39.4.

IR (neat): 3504, 1766, 1483, 1114 cm⁻¹.

ESI-MS (ES-): 399 [M-H]⁺.

¹⁶⁸ Aso, Y.; Hayashi, Y.; Yoshioka, S.; Takeda, Y.; Kita, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 422-424.

***picro*-(4 β -chloroacetamide-4'-demethylpodophyllotoxin) (IV.6)**

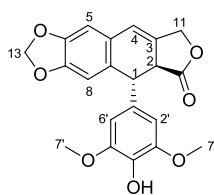
To a suspension of *picro*-4'-demethylepipodophyllotoxin **IV.8** (600 mg, 1.5 mmol, 1.0 equiv.) in chloroacetonitrile (7 mL) was added three drops of sulfuric acid. The suspension was stirred for 1 h at room temperature. It was then diluted with water (10 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layer containing solids were washed with brine (30 mL) and filtered (solids were C4-epimer). The filtrate was concentrated and purified by flash chromatography (dichloromethane:ethyl acetate; 10:0 – 2:8). The title compound was recovered as a white powder (384 mg, 54%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.75 (s, 1H, H₅), 6.69 (d, J = 8.8 Hz, 1H, NH_{amide}), 6.65 (s, 1H, H₈), 6.35 (s, 2H, H₂, H₆), 5.99 (s, 1H, H₁₃), 5.97 (s, 1H, H₁₃), 5.46 (s, 1H, OH), 5.39 (dd, J = 8.8 Hz, J = 5.6 Hz, 1H, H₄), 4.45 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H₁), 4.36 (t, J = 8.6 Hz, 1H, H₁₁), 4.16-4.11 (m, 3H, H₁₁, -CH₂Cl), 3.84 (s, 6H, H₇), 3.42 (dd, J = 10.0 Hz, J = 2.8 Hz, 1H, H₂), 3.36-3.29 (m, 1H, H₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 178.2, 166.1, 147.7, 147.5, 147.3 (2C), 133.7, 132.5, 130.5, 127.4, 110.2, 105.7, 104.4 (2C), 101.4, 68.0, 56.4 (2C), 48.1, 45.3, 45.1, 42.6, 37.8.

IR (neat): 3418, 1762, 1663 cm⁻¹

ESI-MS (ES⁺): 476-478 [M+H]⁺.

3,4-dehydro-4'-demethylpodophyllotoxine (IV.10)

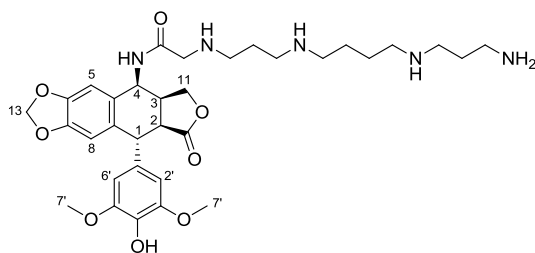
To a suspension of 4'-demethylepipodophyllotoxin (50 mg, 0.125 mmol, 1.0 equiv.) in dichloromethane (1 mL) was added one drop of sulfuric acid. The suspension was stirred for 5 h, then quenched with water (5 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residual solids were slurried in 2 mL of dichloromethane and filtered to provide the desired alkene as a white powder (32 mg, 67%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 6.83 (s, 1H, H₅), 6.58 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.48 (s, 1H, H₄), 5.95 (s, 1H, H₈), 5.93 (s, 1H, H₁₃), 5.90 (s, 1H, H₁₃), 4.97 (s, 2H, H₁₁), 4.11 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H₂), 3.92 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H₁), 3.71 (s, 6H, H₇).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): δ 175.0, 149.3, 146.8, 146.2, 134.7, 133.8, 132.0, 131.3, 127.5, 119.4, 108.5, 107.2, 101.4, 69.2, 56.4 (2C), 45.7, 43.4. (we could not see carbons 2' and 6' on the ¹³C NMR spectra, but according to the HSQC, the chemical shift of these carbons is around 107 ppm).

IR (neat): 3454, 1780 cm⁻¹.

ESI-MS (ES+): 405 [M+Na]⁺.

***picro-4β*-(2-(spermine)-acetamide)-4'-demethylpodophyllotoxin (IV.2)**

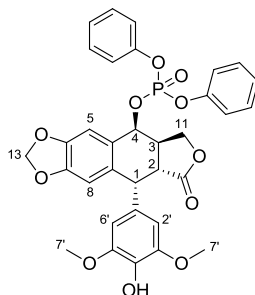
Spermine (133 mg, 0.66 mmol, 2.1 equiv.) was added to a solution of **IV.6** (150 mg, 0.32 mmol, 1.0 equiv.) in dimethylformamide (1.5 mL). After 1 h, ethanol (3.5 mL) was added followed by HCl.*i*PrOH (2.5 M, 2.5 mL). The suspension was stirred for 30 min before filtration. The solids were washed with isopropanol (2 x 2 mL). The crude mixture was purified by flash chromatography on reverse phase (HCl 5 mM:acetonitrile, 95:5). Purest fractions were lyophilized and **IV.2** was recovered as a white solid (90 mg, 36 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.06 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, NH_{amide}), 6.98 (s, 1H, H₅ or H₈), 6.95 (s, 1H, H₈ or H₅), 6.43 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.02 (s, 1H, H₁₃), 6.01 (s, 1H, H₁₃), 4.70 (dd, $J = 9.1$ Hz, $J = 5.4$ Hz, 1H, H₄), 4.40 (br. s, 1H, H₁), 4.30 (t, $J = 9.9$ Hz, 1H, H₁₁), 4.70 (dd, $J = 9.9$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 1H, H₁₁), 3.87-3.80 (m, 2H, CO-CH₂-NH), 3.68 (s, 6H, H_{7'}), 3.87-3.79 (m, 1H, H₃), 3.09-2.87 (m, 13H, H₂, H_{spermine}), 2.06-1.99 (m, 2H, H_{spermine}), 1.98-1.91 (m, 2H, H_{spermine}), 1.72 (br. s, 4H, H_{spermine}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): δ 178.9, 165.9, 148.3 (2C), 146.9, 146.8, 134.6, 131.4, 130.8, 128.9, 110.1, 106.4, 105.1 (2C), 101.4, 68.3, 56.5 (2C), 48.1, 47.0, 46.3 (2C), 45.6, 44.6, 44.2, 44.0, 37.5 (2C), 36.5, 23.9, 22.9 (2C), 22.6.

IR (KBr): 3421, 1768, 1679, 1484 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 642 [M+H]⁺.

iii. Synthesis of analogue IV.3**4 β -diphenylphosphoryle-4'-demethylepipodophyllotoxin (IV.11)**

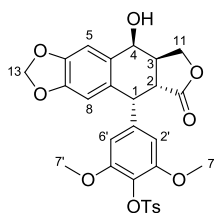
Under N₂, a solution of DPPA (42 mg, 0.15 mmol, 1.2 equiv.) in anhydrous dichloromethane (0.4 mL) was added dropwise to a solution of 4'-demethylepipodophyllotoxin (50 mg, 0.127 mmol, 1.0 equiv.) and DBU (50 μ L, 0.335 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous toluene (0.4 mL). After stirring for 3h30, the reaction mixture was quenched with HCl 1 M (5 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (ethyl acetate:acetone, 7:3). The desired product **IV.11** was recovered as a white solid (47 mg, 60%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.37-7.33 (m, 8H, H_{aromatic phosphine}), 7.22-7.18 (m, 2H, H_{aromatic phosphine}), 7.02 (s, 1H, H₅), 6.77 (s, 1H, H₈), 6.30 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 5.99 (s, 1H, H₁₃), 5.95 (s, 1H, H₁₃), 4.76 (br. s, 1H, H₄), 4.44 (br. s, 1H, H₁), 4.35-4.26 (m, 2H, H₁₁), 3.57 (s, 6H, H_{7'}), 3.38 (dd, $J = 10.4$ Hz, $J = 3.1$ Hz, 1H, H₂), 3.15-3.12 (m, 1H, H₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 178.7, 151.7 (2C), 150.9, 150.8, 147.4, 147.2, 131.3, 129.5, 129.4 (4C), 129.3, 129.2, 125.1 (2C), 120.4 (4C), 109.7, 106.2, 104.3 (2C), 101.2, 67.9, 67.2, 55.9 (2C), 45.3, 44.6, 39.2.

IR (neat): 3423, 2920, 1763, 1601 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 633 [M+H]⁺.

4'-demethylepipodophyllotoxin-4'-tosylate (IV.12)

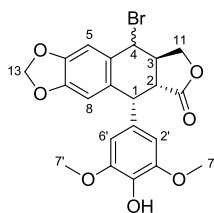
Tosyl chloride (380 mg, 2.00 mmol, 4 equiv.) and triethylamine (200 μ L, 2.5 mmol, 5 equiv.) were added to a solution of 4'-demethylepipodophyllotoxin (200 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous tetrahydrofuran (6 mL). After stirring for 24 h, the reaction mixture was quenched with HCl 0.1 M (5 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude was purified by filtration over silica gel (dichloromethane:methanol, 10:0 to 9:1). The desired product **IV.12** was recovered as a white solid (264 mg, 95%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{\text{arom tosyl}}$), 7.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{\text{arom tosyl}}$), 6.84 (s, 1H, H_5), 6.47 (s, 1H, H_8), 6.24 (s, 2H, $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{6'}$), 5.95 (s, 1H, H_{13}), 5.93 (s, 1H, H_{13}), 4.83 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H_4), 4.44 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H_1), 4.36-4.28 (m, 2H, H_{11}), 3.51 (s, 6H, $\text{H}_{7'}$), 3.38 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H, H_2), 2.78-2.69 (m, 1H, H_3), 2.15 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 175.1, 152.5 (2C), 148.2, 147.3, 144.4, 139.3, 134.7, 132.5, 131.0, 129.0 (2C), 128.3 (2C), 127.1, 110.1, 109.5, 107.6 (2C), 101.4, 67.8, 66.1, 55.9 (2C), 43.9, 40.3, 38.4, 21.6.

IR (neat): 3532, 1773, 1598 cm^{-1} .

ESI-MS (ES+): 554 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4-bromo-4-deoxy-4'-demethylpodophyllotoxine (IV.14)

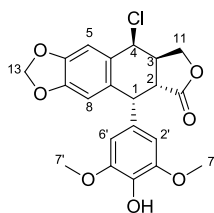
To a solution of 4'-demethylepipodophyllotoxin (300 mg, 0.75 mmol, 1.0 equiv.) in dichloromethane (8 mL) was bubbled HBr (from NaBr (4g) suspended in acetic acid (20 mL) and heated at 105 °C) for 20 min. After stirring for 2 h, nitrogen was bubbled for 30 min, then volatils were distilled to provide **IV.14** as a mixture of epimers (α/β : 25/75) (slight brown solid, 342 mg, quant.).¹⁶⁹

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.20 (s, 1H, H_{5 α}), 6.89 (s, 1H, H_{5 β}), 6.51 (s, 1H, H_{8 α}), 6.47 (s, 1H, H_{8 β}), 6.41 (s, 2H, H_{2' α} , H_{6' α}), 6.31 (s, 1H, H_{2' β} , H_{6' β}), 6.02-5.97 (m, 2 x 2H, H_{13 α} , H_{13 β}), 5.62 (d, J = 3.5 Hz, 1H, H_{4 β}), 5.29 (d, J = 10.4 Hz, 1H, H_{4 α}), 4.67 (d, J = 5.2 Hz, 1H, H_{1 β}), 4.62-4.58 (m, 2H, H_{1 α} , H_{11 α}), 4.39-4.36 (m, 2H, H_{11 β}), 4.04-3.99 (m, 1H, H_{11 α}), 3.83 (s, 6H, H_{7' α}), 3.80 (s, 6H, H_{7' β}), 3.39 (dd, J = 13.5 Hz, J = 5.3 Hz, 1H, H_{2 β}), 3.35-3.25 (m, 1H, H_{3 α}), 2.91-2.83 (m, 1H, H_{3 β}), 2.80 (dd, J = 14.4 Hz, J = 4.3 Hz, 1H, H_{2 β}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (only epimer β) 173.9, 148.9, 147.4, 146.5 (2C), 134.2, 131.4, 130.6, 130.2, 110.1, 109.6, 107.8 (2C), 101.7, 67.9, 56.5 (2C), 43.6, 41.7, 37.7, 25.5.

IR (neat): 3530, 1750 cm⁻¹.

¹⁶⁹ Kuhn *and al. Helvetica Chimica Acta* **1969**, 52, 944-947.

4 β -chloro-4'-deoxy-4'-demethylepipodophyllotoxine (IV.15)¹⁶⁹

Under N₂, thionyl chloride (0.30 mL, 4.13 mmol, 3.3 equiv.) was added dropwise to a solution of 4'-demethylepipodophyllotoxin (500 mg, 1.27 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous tetrahydrofuran (12 mL). After stirring for 3h30, nitrogen was bubbled for 30 min, and concentrated to provide **IV.15** as a pale yellow solid (530 mg, quant.).

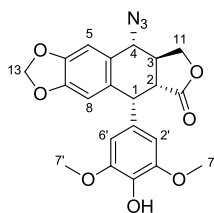
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.88 (s, 1H, H₅), 6.50 (s, 1H, H₈), 6.28 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.01 (s, 1H, H₁₃), 5.98 (s, 1H, H₁₃), 5.39 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H₄), 4.65 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₁), 4.39 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H₁₁), 3.78 (s, 6H, H_{7'}), 3.36 (dd, $J = 13.6$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₂), 3.1-3.12 (m, 1H, H₃).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 7.02 (s, 1H, H₅), 6.50 (s, 1H, H₈), 6.18 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.03 (s, 1H, H₁₃), 6.01 (s, 1H, H₁₃), 5.69 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H₄), 4.56 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₁), 4.45 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H₁₁), 4.15 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H₁₁), 3.60 (s, 6H, H_{7'}), 3.27 (dd, $J = 13.6$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₂), 3.20-3.17 (m, 1H, H₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.9, 148.9, 147.4, 146.5 (2C), 134.2, 131.6, 130.2, 129.6, 110.1, 109.4, 107.9 (2C), 101.7, 69.4, 59.1 (4), 56.6 (2C), 43.6, 40.8, 37.7.

IR (neat): 3423, 1773 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 441-443[M+Na]⁺.

4 α -azido-4-deoxy-4'-demethylepipodophyllotoxine (IV.16)¹⁷⁰

Sodium azide (240 mg, 3.69 mmol, 2.9 equiv.) was added to a solution of **IV.15** (530 mg, 1.27 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (3 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h, then quenched with HCl 0.1 M (10 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was precipitated in diethyl ether (5 mL) and filtered to provide pure **IV.16** as a white solid (491 mg, 91%, 95% purity).

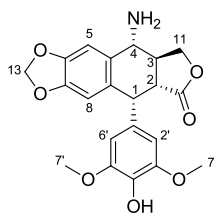
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.04 (s, 1H, H₅), 6.56 (s, 1H, H₈), 6.37 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.04 (s, 1H, H₁₃), 6.01 (s, 1H, H₁₃), 5.43 (s, 1H, -OH), 4.65-4.60 (m, 2H, H₁, H₁₁), 4.29 (d, J = 10.4 Hz, 1H, H₄), 4.06 (t, J = 9.6 Hz, 1H, H₁₁), 3.78 (s, 6H, H_{7'}), 2.98-2.93 (m, 1H, H₃), 2.84 (dd, J = 14.0 Hz, J = 4.4 Hz, 1H, H₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.4, 148.2, 147.8, 146.5 (2C), 133.9, 132.1, 130.2, 127.9, 110.1, 107.9 (2C), 106.8, 101.7, 70.6, 63.4, 56.6 (2C), 45.7, 43.8, 37.5.

IR (neat): 3353, 2095 (N₃), 1777, 1484 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 426 [M+H]⁺.

¹⁷⁰ Laatsch, H.; Ernst, B. P.; Hoffmann, D. *Liebigs Annalen* **1995**, *10*, 1773-1778.

4 α -amino-4'-demethylepipodophyllotoxine (IV.17)

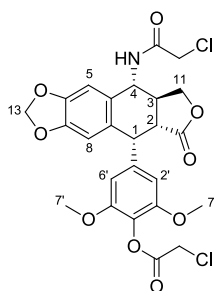
To a suspension of **IV.16** (1 g, 2.3 mmol, 1.0 equiv.) in ethyl acetate (20 mL) and methanol (10 mL), was added Pd/C 10% (120 mg, 0.11 mmol, 0.05 equiv.). The suspension was stirred, at room temperature, under hydrogen for 19 h and then filtered over Celite[®] (3 x 50 mL). The filtrate was concentrated and purified by flash chromatography (ethyl acetate:cyclohexane, 6:4 – 10:0). Analytically pure amine **IV.17** was recovered as a white solid (760 mg, 81 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.10 (s, 1H, H₅), 6.49 (s, 1H, H₈), 6.37 (s, 2H, H₂, H₆), 5.97 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H₁₃), 5.94 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H₁₃), 4.59-4.55 (m, 2H, H₁, H₄), 4.27 (dd, $J = 6.0$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₁₁), 3.88 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H₁₁), 3.78 (s, 6H, H₇), 2.83 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 1H, H₂), 2.59-2.48 (m, 1H, H₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.8, 147.5, 147.2, 146.4 (2C), 134.9, 133.9, 131.2, 131.9, 109.8, 107.9 (2C), 106.1, 101.3, 71.6, 56.4 (2C), 54.9, 46.3, 44.1, 41.3.

IR (neat): 3449 (OH), 3384 (NH₂), 3295 (NH₂), 1764, 1483 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁻): 398 [M-H]⁺.

4 α -chloroacetamide-4'-chloroacetyl-4'-demethylpodophyllotoxin (IV.18)

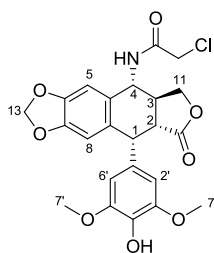
Under N₂, pyridine (1.5 mL, 18.6 mmol, 4.0 equiv.) was added to a solution of **IV.17** (1.8 g, 4.6 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous THF (60 mL). The solution was cooled down to 0 °C and then chloroacetylchloride was added dropwise (1.5 mL, 18.6 mmol, 4.0 equiv.). The reaction mixture was stirred, at room temperature, for 20 min and then quenched with HCl 0.1 M (40 mL). It was extracted with dichloromethane (3 x 40 mL). The combined organic layer were washed with a buffer (pH = 6.5, 40 mL) and then with brine (40 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. Amido-ester **IV.18** was recovered as a pale yellow solid (2.4 g, 95 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.82 (s, 1H, H₅), 6.78 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NH_{amide}), 6.58 (s, 1H, H₈), 6.43 (s, 2H, H₂, H₆), 6.02 (s, 1H, H₁₃), 6.00 (s, 1H, H₁₃), 5.13 (t, J = 9.2 Hz, 1H, H₄), 4.68 (d, J = 4.8 Hz, 1H, H₁), 4.44 (dd, J = 7.2 Hz, J = 5.2 Hz, 1H, H₁₁), 4.35 (s, 2H, -CH₂Cl amide), 4.23-4.09 (m, 3H, H₁₁, -CH₂Cl ester), 3.72 (s, 6H, H₇), 2.93 (dd, J = 14.4 Hz, J = 4.8 Hz, 1H, H₂), 2.73-2.62 (m, 1H, H₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.8, 166.6, 165.2, 151.3 (2C), 148.0 (2C), 138.5, 131.7, 128.9, 127.4, 110.4, 107.6 (2C), 106.2, 101.7, 71.2, 56.2 (2C), 52.8, 45.9, 43.8, 42.4, 40.6, 39.3.

IR (neat): 1774, 1665 cm⁻¹.

ESI-MS (ES+): 552-554-556 [M+H]⁺.

4 α -chloroacetamide-4'-demethylpodophyllotoxin (IV.19)

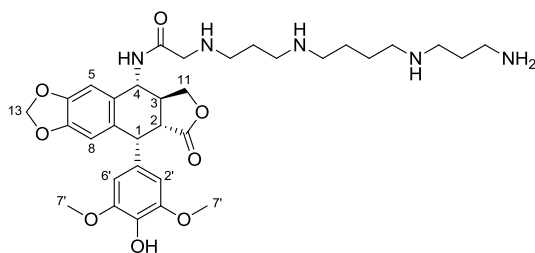
A suspension of **IV.18** (350 mg, 0.63 mmol, 1.0 equiv.) in 1,4-dioxane (5 mL) and HCl 10% in water (4 mL) was heated to 50 °C. After 8 h, the reaction mixture was diluted with water (10 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude reaction was purified by flash chromatography (ethyl acetate:cyclohexane; 4:6 – 8:2). The desired amide **IV.19** was recovered as a white solid (218 mg, 73 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.81 (s, 1H, H₅), 6.79 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NH_{amide}), 6.57 (s, 1H, H₈), 6.38 (s, 2H, H₂, H₆), 6.00 (s, 1H, H₁₃), 5.98 (s, 1H, H₁₃), 4.64 (dd, J = 9.2 Hz, J = 8.8 Hz, 1H, H₄), 4.63 (d, J = 4.4 Hz, 1H, H₁), 4.40 (dd, J = 9.2 Hz, J = 7.2 Hz, 1H, H₁₁), 4.22-4.11 (m, 3H, H₁₁, -CH₂-Cl), 3.80 (s, 6H, H₇), 2.90 (dd, J = 14.0 Hz, J = 4.4 Hz, 1H, H₂), 2.72-2.67 (m, 1H, H₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.9, 166.4, 148.0, 147.9, 146.5 (2C), 134.2, 132.4, 130.6, 128.8, 110.4, 107.9 (2C), 106.0, 101.6, 71.2, 56.5 (2C), 52.7, 46.1, 43.5, 42.4, 39.5.

IR (neat): 3326, 1774, 1483 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 476-478 [M+H]⁺.

micro-4 α -chloroacetamide-4'-demethylpodophyllotoxin (IV.3)

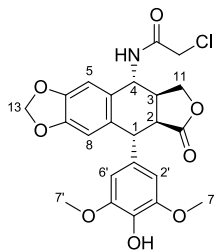
Spermine (90 mg, 0.44 mmol, 2.1 equiv.) was added to a solution of **IV.19** (100 mg, 0.21 mmol, 1.0 equiv.) in dimethylformamide (1.3 mL). After 1 h, ethanol (1.5 mL) was added followed by HCl.*i*PrOH (2.5 M, 1.4 mL). The suspension was stirred for 30 min before filtration. The solids were washed with isopropanol (2 x 2 mL). The crude mixture was purified by flash chromatography on reverse phase (HCl 5 mM:acetonitrile, 95:5). Purest fractions were lyophilized and **IV.3** was recovered as a white solid (68 mg, 41 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.26 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH_{amide}), 6.92 (s, 1H, H₅), 6.52 (s, 1H, H₈), 6.32 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 5.98 (s, 2H, H₁₃), 5.02 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H₄), 4.48 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H₁), 4.36 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, H₁₁), 4.05 (dd, $J = 9.2$ Hz, $J = 4.1$ Hz, 1H, H₁₁), 3.86-3.78 (m, 2H, CO-CH₂-NH), 3.48 (s, 6H, H_{7'}), 3.26 (dd, $J = 14.2$ Hz, $J = 4.1$ Hz, 1H, H₂), 3.12-2.91 (m, 13H, H₃, H_{spermine}), 2.13-2.02 (m, 2H, H_{spermine}), 2.01-1.91 (m, 2H, H_{spermine}), 1.72 (br. s, 4H, H_{spermine}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): δ 174.9, 166.1, 147.5 (2C), 147.1, 147.0, 135.0, 132.4, 131.2, 130.8, 110.1, 109.1 (2C), 106.9, 101.6, 70.9, 56.6 (2C), 51.7, 48.2, 46.3 (2C), 45.1, 44.6, 44.1 (2C), 43.4, 38.4, 34.4, 23.9, 22.8 (2C), 22.5.

IR (KBr): 3414, 1768, 1658, 1484 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 642 [M+H]⁺.

iv. Synthesis of analogue IV.4***picro-4 α -chloroacetamide-4'-demethylpodophyllotoxin (IV.9)***

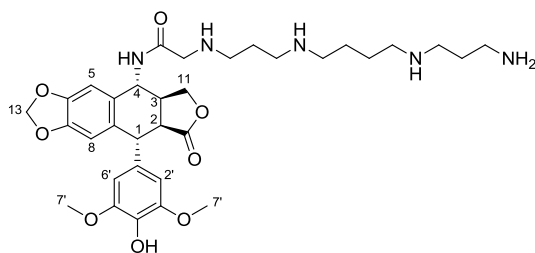
Potassium carbonate (500 mg, 3.62 mmol, 4.0 equiv.) was added to a solution of **IV.18** (500 mg, 0.91 mmol, 1.0 equiv.) in methanol (12 mL). After 4 h, the reaction mixture was quenched with HCl 2 M (10 mL). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL) and concentrated. After concentration, the desired product was recovered as a slight yellow powder and used without further purifications (315 mg, 74 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.09 (br. s, 1H, NH_{amide}), 6.75 (s, 1H, H₅), 6.54 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.07 (s, 1H, H₈), 5.91 (s, 1H, H₁₃), 5.89 (s, 1H, H₁₃), 4.64 (dd, $J = 10.4$ Hz, $J = 9.4$ Hz, 1H, H₄), 4.39 (dd, $J = 9.1$ Hz, $J = 6.2$ Hz, 1H, H₁₁), 4.32 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H, -CH₂-Cl), 4.26 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H, -CH₂-Cl), 4.19 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H₁₁), 3.98 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H₁), 3.72 (s, 6H, H_{7'}), 3.41 (dd, $J = 9.2$ Hz, $J = 7.1$ Hz, 1H, H₂), 2.78-2.72 (m, 1H, H₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 177.8, 167.5, 148.4 (2C), 146.4, 146.2, 134.7, 133.3, 132.9, 130.7, 108.3, 106.9 (2C), 105.8, 101.3, 69.6, 56.5 (2C), 48.9, 44.7, 43.4, 43.3, 40.5.

IR (neat): 3311, 1753, 1165, 1479 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 476-478 [M+H]⁺.

***picro-4a*-(2-(spermine)-acetamide)-4'-demethylpodophyllotoxin (IV.4)**

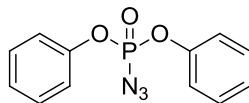
Spermine (90 mg, 0.44 mmol, 2.1 equiv.) was added to a solution of **IV.9** (100 mg, 0.21 mmol, 1.0 equiv.) in dimethylformamide (1.3 mL). After 1 h, ethanol (1.5 mL) was added followed by HCl.iPrOH (2.5 M, 1.4 mL). The suspension was stirred for 30 min before filtration. The solids were washed with isopropanol (2 x 2 mL). The crude mixture was purified by flash chromatography on reverse phase (HCl 5 mM:acetonitrile, 95:5). Purest fractions were lyophilized and **IV.4** was recovered as a white solid (68 mg, 41 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.21 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, NH_{amide}), 6.88 (s, 1H, H₅), 6.53 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.06 (s, 1H, H₈), 5.92 (s, 1H, H₁₃), 5.90 (s, 1H, H₁₃), 4.70 (dd, $J = 11.5$ Hz, $J = 9.7$ Hz, 1H, H₄), 4.36 (dd, $J = 9.5$ Hz, $J = 5.6$ Hz, 1H, H₁₁), 4.26 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, H₁₁), 4.10-4.05 (m, 1H, CO-CH₂-NH), 3.96 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H₁), 3.92-3.89 (m, 1H, CO-CH₂-NH), 3.72 (s, 6H, H_{7'}), 3.44 (dd, $J = 9.2$ Hz, $J = 7.3$ Hz, 1H, H₂), 3.11-2.89 (m, 12H, H_{spermine}), 2.74-2.70 (m, 1H, H₃), 2.13-2.07 (m, 2H, H_{spermine}), 2.00-1.95 (m, 2H, H_{spermine}), 1.72 (br. s, 4H, H_{spermine}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): δ 178.8, 166.1, 148.1 (2C), 146.5, 146.3, 133.9, 133.2, 132.8, 130.5, 108.1, 106.4 (2C), 104.9, 101.4, 69.7, 56.4 (2C), 48.9, 46.6 (2C), 44.7, 44.4 (2C), 43.5 (2C), 40.4, 38.4, 36.4, 23.7, 22.8 (2C), 22.5.

IR (KBr): 3419, 3004, 1762, 1674 cm⁻¹.

ESI-MS (ES+): 642 [M+H]⁺.

v. Others**Diphenylphosphate azide**¹⁷¹

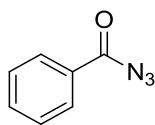
Sodium azide (380 mg, 5.8 mmol, 1.2 equiv.) was added to a solution of diphenylchlorophosphate (1 mL, 4.8 mmol, 1.0 equiv.) in acetone (15 mL). The suspension was stirred overnight at room temperature and then filtered. The filtrate was concentrated and the residue was slurried in diethylether for 1 h. After filtration, the filtrate was concentrated and pure diphenylphosphate azide (DPPA) was recovered as a colorless oil (1.27 g, 96 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.41-7.37 (m, 4H), 7.27-7.23 (m, 6H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 149.8 (d, J_{C-P} = 9.8 Hz), 130.0 (d, J_{C-P} = 1.2 Hz, 2C), 126.0 (d, J_{C-P} = 1.8 Hz, 2C), 120.1 (d, J_{C-P} = 5.0 Hz).

IR (neat): 2170 (N₃) cm⁻¹.

¹⁷¹ Davis, M. C. *Synthetic Communications* **2007**, 37, 3519-3528.

Benzoyl azide¹⁷²

Sodium azide (340 mg, 5.2 mmol, 1.2 equiv.) was added to a solution of benzoyl chloride (0.5 mL, 4.3 mmol, 1.0 equiv.) in acetone (10 mL). The suspension was stirred overnight at room temperature and then filtered. The filtrate was concentrated and the residue was slurried in diethylether for 1 h. After filtration, the filtrate was concentrated and pure benzoyl azide was recovered as a colorless oil (396 mg, 63 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.02 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.62 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.46 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 172.7, 134.2, 129.8 (2C), 129.6 (2C), 128.8.

IR (neat): 2135 (N₃) cm⁻¹.

¹⁷² Miloserdov F. M., Grushin V. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3668-3672.

Mesyl azide¹⁷³

Sodium azide (118 mg, 1.8 mmol, 2 equiv.) was added to a solution of mesyl chloride (70 μ L, 0.9 mmol, 1.0 equiv.) in methanol (1 mL). The suspension was stirred overnight at room temperature and then filtered. The filtrate was concentrated and the residue was slurried in diethylether for 1 h. After filtration, the filtrate was concentrated and pure mesyl azide was recovered as a colorless oil (54 mg, 42 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.26 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 42.6.

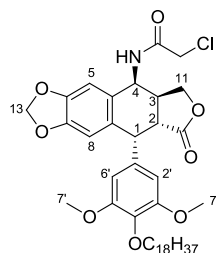
IR (neat): 2138 (N₃) cm⁻¹.

¹⁷³ Waser, J.; Gaspar, B.; Nambu, H.; Carreira E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11693-11712.

e. Chapter V: Nanometric formulations of Podophyllotoxines

i. Synthesis of amphiphile C₁₈-Podo-Sper

4 β -chloroacetamide-4'-octadecyl-4'-demethylpodophyllotoxin (V.1)



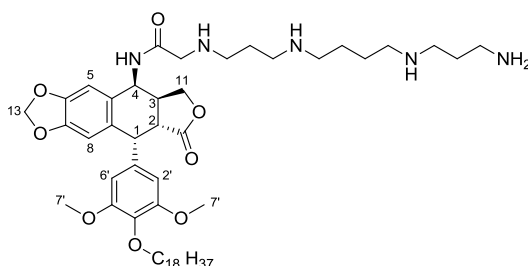
Under N₂, triphenylphosphine (0.65 g, 2.5 mmol, 1.2 equiv.), 1-octadecanol (0.68 g, 2.5 mmol, 1.2 equiv.) and DIAD (0.49 mL, 2.5 mmol, 1.2 equiv.) were added to a suspension of **IV.1** (1.0 g, 2.1 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous dichloromethane (5 mL). The reaction mixture was stirred, at room temperature, for 1.5 h and then quenched with HCl 0.1 M (5 mL). It was extracted with diethylether (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude reaction was purified by flash chromatography (diethylether:pentane, 5:5 – 10:0), phenolic ether **V.1** was recovered as a white solid (1.2 g, 78 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.76 (s, 1H, H₅), 6.67 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, NH_{amide}), 6.58 (s, 1H, H₈), 6.29 (s, 2H, H₂, H₆), 6.03 (s, 1H, H₁₃), 6.02 (s, 1H, H₁₃), 5.25 (dd, $J = 7.4$ Hz, $J = 5.1$ Hz, 1H, H₄), 4.65 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H₁), 4.45 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H₁₁), 4.15 (s, 2H, -CH₂Cl), 3.93 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂-OPh), 3.82 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H₁₁), 3.75 (s, 6H, H₇), 3.04-3.00 (m, 1H, H₃), 2.86 (dd, $J = 14.4$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 1H, H₂), 1.75 (quint., $J = 7.4$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-OPh), 1.45-1.43 (m, 2H, alkyl chain), 1.27-1.23 (m, 28H, H_{alkyl chain}), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.8, 166.1, 152.8 (2C), 148.6, 147.8, 136.8, 134.1, 132.6, 127.8, 110.3, 108.8, 108.4 (2C), 101.7, 73.4, 68.6, 56.3 (2C), 48.6, 43.6, 42.2, 41.7, 37.1, 31.8, 30.0, 29.6 (9C), 29.5, 29.4, 29.3, 25.7, 22.6, 14.0.

IR (neat): 2924, 1776, 1484 cm⁻¹

ESI-MS (ES⁺): 728-730 [M+H]⁺.

Amphiphile C₁₈-Podo-Sper

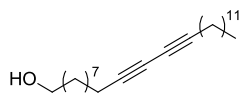
Spermine (465 mg, 2.30 mmol, 10 equiv.) was added to a solution of **V.1** (170 mg, 0.23 mmol, 1equiv.) in dimethylformamide (2 mL). The reaction mixture was stirred, at room temperature, for 1 h and then HCl in isopropanol (3 M, 2.5 mL) was added dropwise. The solids were filtered and washed with isopropanol (2 x 2 mL). The crude mixture was purified by flash chromatography on reverse phase (HCl 5 mM:acetonitrile, 95:5 to 30:70). Purest fractions were lyophilized and **C18-Podo-Sper** was recovered as a white solid (193 mg, 81 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH_{amide}), 6.79 (s, 1H, H₅), 6.55 (s, 1H, H₈), 6.27 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.00 (s, 1H, H₁₃), 5.98 (s, 1H, H₁₃), 5.23 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 1H, H₄), 4.56 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, H₁), 4.27 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H, H₁₁), 3.91 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H, H₁₁), 3.78-3.70 (m, 4H, -CO-CH₂-NH-, -CH₂-OPh), 3.62 (s, 6H, H_{7'}), 3.22 (dd, $J = 14.6$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₂), 3.07-2.86 (m, 13H, H₃, H_{spermine}), 2.09-2.05 (m, 2H, H_{spermine}), 1.99-1.95 (m, 2H, H_{spermine}), 1.73 (br. s, 4H, H_{spermine}), 1.57 (quint., $J = 6.8$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-O-Ph), 1.36 (quint., $J = 6.8$ Hz, 4H, alkyl chain), 1.30-1.17 (m, 26H, H_{alkyl chain}), 0.84 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): δ 174.7, 162.3, 152.5 (2C), 147.7, 147.0, 136.2, 135.8, 132.3, 130.0, 109.8, 109.5, 108.6 (2C), 101.7, 72.6, 68.7, 56.2 (2C), 48.1, 47.5, 46.4 (2C), 44.2 (2C), 43.5, 41.3, 41.1, 36.9, 36.6, 31.7, 30.1, 29.5 (10C), 29.2, 29.1, 25.8, 24.1, 23.0, 22.7, 22.6 (2C), 14.4.

IR (neat): 3424, 2920, 1773, 1678 cm⁻¹

ESI-MS (ES⁺): 894 [M+H]⁺.

ii. Synthesis of amphiphile DA-Podo-Sper**Pentacos-10,12-diyne-1-ol (V.2)**¹⁷⁴

To a solution of pentacos-10,12-diyne-1-ol (2 g, 5.4 mmol, 1.0 equiv.) in diethyl ether (100 mL) cooled at 4 °C on an ice bath, lithium aluminium hydride (410 mg, 10.8 mmol, 2 equiv.) was added under nitrogen atmosphere. After stirring for 1.5 h at 20 °C, the reaction was quenched with HCl 2M (50 mL), extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with hydrochloric acid (2 x 20 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated. Alcohol **V.2** was obtained as a white solid (1.86 g, 96%).

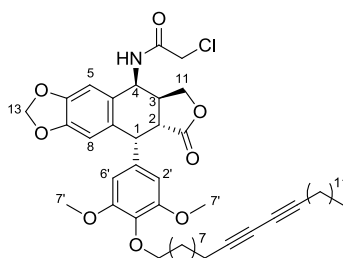
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.63 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, -CH₂-OH), 2.23 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H, CH₂-C≡), 1.60-1.45 (m, 6H, -CH₂), 1.44-1.24 (m, 28H, -CH₂), 0.86 ppm (t, $J = 7.0$ Hz, 3H; -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 77.5, 77.4, 65.2, 65.2, 63.1, 32.7, 31.9, 29.6 (3 C), 29.4 (2C), 29.3 (3 C), 29.1, 29.0, 28.8, 28.7, 28.3, 28.2, 25.7, 22.6, 19.2, 14.1.

IR (KBr): 3411, 2955, 2850 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 361 [M+H]⁺.

¹⁷⁴ Mackiewicz, N.; Gravel, E.; Garofalakis, A.; Ogier, J.; John, J.; Dupont, D. M.; Gombert, K.; Tavitian, B.; Doris, E.; Ducongé, F. *Small* **2011**, 7, 2786-2792.

4 β -chloroacetamide-4'-(pentacosa-10,12-diyn)-4'-demethylpodophyllotoxin (V.3)

Under N₂, triphenylphosphine (251 mg, 0.96 mmol, 1.2 equiv.), pentacosa-10,12-diyn-1-ol **V.2** (294 mg, 0.96 mmol, 1.2 equiv.) and diisopropyl azodicarboxylate (189 μ L, 0.96 mmol, 1.2 equiv.) were added to a suspension of **IV.1** (380 mg, 0.80 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous dichloromethane (2 mL). The reaction mixture was stirred, at room temperature, for 2 h and then quenched with HCl 1 M (3 mL). It was extracted with diethylether (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude reaction was purified by flash chromatography (diethylether:pentane, 3:7 – 10:0), phenolic ether **V.3** was recovered as a white solid (358 mg, 58 %).

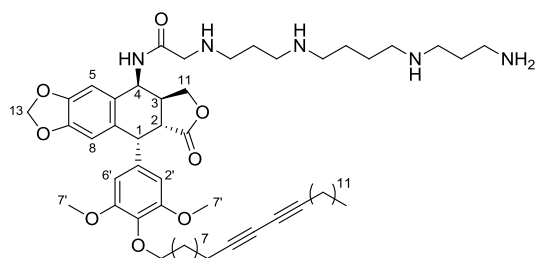
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.75 (s, 1H, H₅), 6.67 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH_{amide}), 6.56 (s, 1H, H₈), 6.28 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.03 (s, 1H, H₁₃), 6.02 (s, 1H, H₁₃), 5.25 (dd, $J = 7.4$ Hz, $J = 5.1$ Hz, 1H, H₄), 4.63 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H₁), 4.43 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H₁₁), 4.13 (s, 2H, -CH₂Cl), 3.90 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂-OPh), 3.78 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H₁₁), 3.73 (s, 6H, H_{7'}), 3.04-3.00 (m, 1H, H₃), 2.86 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 1H, H₂), 2.23 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H, -CH₂-C \equiv), 1.72 (quint., $J = 7.2$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-O-Ph), 1.51 (quint., $J = 7.6$ Hz, 4H, -CH₂-CH₂-C \equiv), 1.40-1.25 (m, 28H, H_{alkyl chain}), 0.89 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.9, 166.3, 152.9 (2C), 148.7, 147.8, 136.8, 134.2, 132.7, 127.8, 110.4, 108.8, 108.4 (2C), 101.7, 77.5, 77.2, 73.5, 68.7, 65.2 (2C), 56.4 (2C), 48.7, 43.7, 42.3, 41.8, 37.2, 31.9, 30.1, 29.7, 29.6 (2C), 29.5 (2C), 29.4 (2C), 29.3, 29.1, 29.0, 28.9 (2C), 28.4 (2C), 25.8, 22.7, 19.2, 14.1.

IR (neat): 2926, 2250, 1776, 1668, 1484 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 818 [M+H]⁺.

Amphiphile DA-Podo-Sper



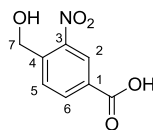
Spermine (660 mg, 3.27 mmol, 10 equiv.) was added to a solution of **V.3** (250 mg, 0.327 mmol, 1equiv.) in dimethylformamide (4 mL). The reaction mixture was stirred, at room temperature, for 1 h. Then HCl in dioxane (4 M, 3 mL) was added dropwise and the solids were filtered and washed with isopropanol (2 x 2 mL). The crude mixture was purified by flash chromatography on reverse phase (HCl 5 mM:acetonitrile, 95:5 to 30:70). Purest fractions were lyophilized and **DA-Podo-Sper** was recovered as a white solid (295 mg, 80 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.13 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH_{amide}), 6.80 (s, 1H, H₅), 6.53 (s, 1H, H₈), 6.26 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 5.99 (s, 1H, H₁₃), 5.98 (s, 1H, H₁₃), 5.23 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 4.1$ Hz, 1H, H₄), 4.50 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, H₁), 4.26 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H, H₁₁), 3.96 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H, H₁₁), 3.80-3.68 (m, 4H, CO-CH₂-NH, CH₂-OPh), 3.61 (s, 6H, H_{7'}), 3.21 (dd, $J = 14.6$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₂), 3.07-2.86 (m, 13H, H₃, H_{spermine}), 2.24 (t, $J = 9.0$ Hz, 4H, -CH₂-C \equiv), 2.09-2.05 (m, 2H, H_{spermine}), 1.99-1.95 (m, 2H, H_{spermine}), 1.73 (br. s, 4H, H_{spermine}), 1.57 (quint., $J = 7.0$ Hz, 4H, H_{alkyl chain}), 1.45-1.18 (m, 30H, H_{alkyl chain}), 0.84 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): δ 174.7, 165.3, 152.6 (2C), 147.8, 147.2, 136.2, 135.7, 132.3, 130.0, 110.0, 109.7, 108.7 (2C), 101.7, 78.4 (2C), 72.7, 65.8 (2C), 56.3 (2C), 48.1, 47.6, 46.4, 44.7, 44.2, 43.5, 41.1, 37.1, 36.7, 31.7, 30.1, 29.5, 29.4-27.8 (several), 24.1, 23.0, 22.7, 22.6, 18.7, 14.1.

IR (neat): 3429, 2729, 1772, 1680 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 985 [M+H]⁺.

iii. Synthesis of amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper**4-(hydroxymethyl)-3-nitrobenzoïc acid (V.4)**

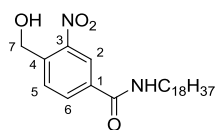
A solution of 4-(bromomethyl)-3-nitrobenzoïc acid (150 mg, 0.57 mmol, 1.0 equiv.) and sodium carbonate (320 mg, 3.02 mmol, 5 equiv.) in acetone (2.5 mL) and water (2.5 mL) was heated under reflux for 3 h. After cooling down, the reaction was quenched with HCl 2 M (5 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to provide **V.4** as a white powder (112 mg, quant.)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 8.49 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H, H₂), 8.28 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H, H₆), 7.99 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H₅), 5.71 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, OH), 4.90 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H, H₇).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): δ 166.0, 147.1, 143.6, 134.4, 130.9, 129.3, 125.4, 60.4.

IR (neat): 3442, 1695, 1526 cm⁻¹.

ESI-MS (ES+): 196 [M+H]⁺.

4-(hydroxymethyl)-3-nitro-N-octadecylbenzamide (V.5)

A solution of 4-(hydroxymethyl)-3-nitrobenzoic acid **V.4** (112mg, 0.57 mmol, 1.0 equiv.), BOP reagent (302 mg, 0.68 mmol, 1.2 equiv.), 1-octadecanamine (184 mg, 0.68 mmol, 1.2 equiv.), and N,N-diisopropylethylamine (120 μ L, 0.68 mmol, 1.2 equiv.) in anhydrous dichloromethane (2 mL) was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with HCl 2 M (3 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude mixture was purified by flash chromatography (dichloromethane:ethyl acetate, 1:0 – 7:3). The desired compound **V.5** was recovered as a white solid (164 mg, 64 %).

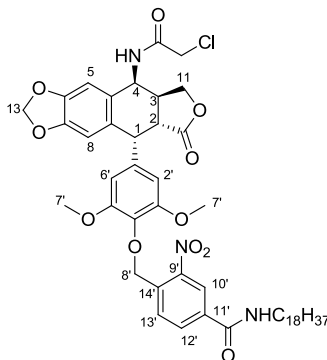
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.46 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H_2), 8.09 (dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H, H_6), 7.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_5), 6.15 (br. s, 1H, OH), 5.06 (s, 2H, H_7), 3.47 (q, $J = 5.2$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{NH}$), 1.66-1.60 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 1.38-1.20 (m, 30H, $\text{H}_{\text{alkyl chain}}$), 0.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 164.7, 147.2, 139.9, 135.2, 132.3, 129.9, 123.3, 62.2, 40.5, 31.9, 29.8 (9 C), 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 27.0, 22.7, 14.1.

IR (neat): 3339, 1638, 1529 cm^{-1}

ESI-MS (ES+): 449 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4 β -chloroacetamide-4'--(4-(hydroxymethyl)-3-nitro-N-octadecylbenzamide)-4'-demethylpodophyllotoxin (V.6)



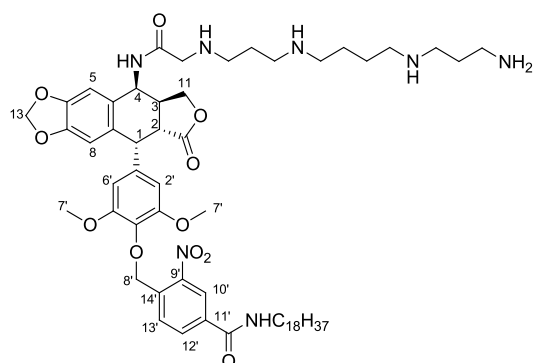
Under N₂, triphenylphosphine (30 mg, 0.12 mmol, 1.2 eq), **V.5** (42 mg, 0.098 mmol, 1.0 equiv.) and diisopropyl azodicarboxylate (23 μ L, 0.12 mmol, 1.2 equiv.) were added to a solution of **IV.1** (46 mg, 0.098 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous tetrahydrofuran (0.4 mL). The reaction mixture was stirred, at room temperature, for 1 h and then quenched with HCl 0.1 M (2 mL). It was extracted with diethylether (3 x 2 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. After purification by flash chromatography (ethyl acetate:cyclohexane, 2:4 – 4:6), phenolic ether **V.6** was recovered as a white solid (94 mg, 71 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.40 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H_{10'}), 8.23 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H_{13'}), 8.05 (dd, J = 8.3 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, H_{12'}), 6.77 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NH_{amide}), 6.74 (s, 1H, H₅), 6.50 (s, 1H, H₈), 6.45 (br. s, 1H, -NHC₁₈H₃₇), 6.27 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 5.98 (s, 2H, H₁₃), 5.37 (s, 2H, H_{8'}), 5.25 (dd, J = 7.4 Hz, J = 5.1 Hz, 1H, H₄), 4.59 (d, J = 4.7 Hz, 1H, H₁), 4.41 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H₁₁), 4.11 (s, 2H, -CH₂Cl), 3.82 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H₁₁), 3.67 (s, 6H, H_{7'}), 3.44 (t, J = 5.0 Hz, 2H, -CH₂-NHCO), 3.04-2.98 (m, 1H, H₃), 2.86 (dd, J = 14.4 Hz, J = 4.7 Hz, 1H, H₂), 1.61 (quint., J = 5.0 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NHCO), 1.45-1.18 (m, 30H, H_{alkyl chain}), 0.89 (t, J = 7.4 Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.9, 166.3, 165.1, 152.6 (2C), 148.7, 147.9, 148.7, 138.1, 135.6, 135.3, 134.7, 132.4, 131.7, 130.1, 127.9, 122.7, 110.3, 108.9, 107.9 (2C), 101.8, 70.9, 68.8, 56.1 (2C), 48.6, 43.8, 42.3, 41.7, 40.42, 37.2, 31.9, 29.7, 29.6 (10C), 29.5, 29.4, 27.0, 22.7, 14.1.

IR (neat): 2924, 1776, 1645, cm⁻¹

ESI-MS (ES⁺): 906-908 [M+H]⁺.

Amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper

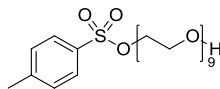
Spermine (183 mg, 0.90 mmol, 10 equiv.) was added to a solution of **V.6** (80 mg, 0.090 mmol, 1.0 equiv.) in dimethylformamide (1.1 mL). The reaction mixture was stirred, at room temperature, for 1 h and then HCl in isopropanol (3 M, 2 mL) was added dropwise. The solids were filtered and washed with isopropanol (2 x 2 mL). The crude mixture was purified by flash chromatography on reverse phase (HCl 5 mM:acetonitrile, 95:5 to 30:70). Purest fractions were lyophilized and **C18-nBz-Podo-Sper** was recovered as a white solid (65 mg, 55 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.13 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH_{amide}), 8.53 (br. s, 1H, H_{10'}), 8.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{12'}), 8.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{13'}), 6.79 (s, 1H, H₅), 6.57 (s, 1H, H₈), 6.31 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.01 (s, 1H, H₁₃), 5.99 (s, 1H, H₁₃), 5.27-5.20 (m, 3H, H₄, H_{8'}), 4.59 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₁), 4.30 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H, H₁₁), 3.93 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H, H₁₁), 3.78 (br. s, 2H, CO-CH₂-NH), 3.62-3.22 (s, 9H, H₇, H₂, -CH₂-NHCO), 3.07-2.86 (m, 13H, H₃, H_{spermine}), 2.09-2.05 (m, 2H, H_{spermine}), 1.99-1.95 (m, 2H, H_{spermine}), 1.73 (br. s, 4H, H_{spermine}), 1.57 (quint., $J = 6.8$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NHCO), 1.36-1.17 (m, 30H, H_{alkyl chain}), 0.83 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 174.4, 165.8, 164.2, 152.3 (2C), 147.8, 147.1, 147.0, 137.1, 136.8, 135.4, 135.2, 132.6, 132.3, 130.1, 129.6, 123.6, 109.9, 109.6, 108.5 (2C), 101.8, 85.8, 71.0, 68.7, 56.3 (2 C), 48.1, 47.6, 46.4, 44.7, 44.2, 43.5, 41.3, 36.9, 36.6, 34.1, 31.7, 29.5 (several), 29.4, 29.2, 26.9, 24.1, 23.0 (2C), 22.7, 22.5, 14.4.

IR (neat): 3431, 2922, 1770, 1680 cm⁻¹.

ESI-MS (ES⁺): 1072 [M+H]⁺.

iv. Synthesis of amphiphile C₁₈-Podo-PEG₄₀₀**O-tosyl-nonaethylene glycol (V.7)**

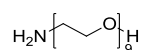
Under N₂, tosyl chloride (87 mg, 0.46 mmol, 1.0 equiv.) and triethylamine (128 μ L, 0.92 mmol, 2.0 equiv.) were added to a solution of PEG₄₀₀ (900 mg, 2.3 mmol, 5.0 equiv.) in anhydrous dichloromethane (1.5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. After concentration, the crude reaction was purified by flash chromatography (silica gel: 600 mL; dichloromethane:methanol, 99/1 – 95/5). The title compound **V.7** was recovered as a colorless oil (738 mg, 59 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.80 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_{tosyl}), 7.34 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_{tosyl}), 4.15 (t, J = 4.9 Hz, 2H, -CH₂OTs), 3.60-3.20 (m, 34H, -CH₂O), 2.45, (s, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 144.6, 133.3, 129.8 (2C), 127.8 (2C), 72.6, 70.6 (several), 68.9, 61.7, 21.7.

IR (neat): 3475, 2870, 2363 cm⁻¹

ESI-MS (ES+): 569 [M+H]⁺.

O-aminoethyl-octaethylene glycol (V.8)

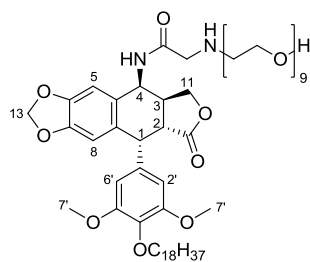
Potassium phthalimide (220 mg, 1.18 mmol, 1.1 equiv.) was added to a solution of **V.7** (600 mg, 1.09 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous toluene (10 mL). The reaction mixture was stirred overnight under reflux. Then, ethanolamine (660 μ L, 10.9 mmol, 10 equiv.) was added and the reaction mixture was kept under reflux for 3 h. After concentration, the crude reaction was purified by flash chromatography on reverse phase (TFA, 0.1 %). The title compound **V.8** was recovered as a colorless oil (227 mg, 52 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 3.75-3.58 (m, 36H, $-\text{CH}_2\text{O}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 72.7, 70.4 (several), 70.3, 70.2, 61.6, 41.2.

IR (neat): 3475 cm^{-1}

ESI-MS (ES+): 414 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Amphiphile C₁₈-Podo-PEG₄₀₀

Triethylamine (32 μ L, 0.28 mmol, 1.2 equiv.) and **V.8** (130 mg, 0.283 mmol, 1.5 equiv.) were added to a solution of **IV.1** (137 mg, 0.19 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous dimethylformamide (2 mL). The solution was then stirred at 100 °C for 5 h. It was then cooled down, diluted with HCl 1 M (4 mL) and extracted with dichloromethane (5 x 5 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. After purification by flash chromatography (dichloromethane:methanol, 97:3 – 85:15), the desired product was isolated as a colorless solid (91 mg, 42 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.76 (s, 1H, H₅), 6.55 (s, 1H, H₈), 6.30 (s, 2H, H₂, H₆), 5.99 (s, 2H, H₁₃), 5.28 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H₄), 4.63 (d, J = 4.7 Hz, 1H, H₁), 4.41 (t, J = 8.1 Hz, 1H, H₁₁), 3.92 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CO-CH₂-NH), 3.88-3.83 (m, 1H, H₁₁), 3.74 (s, 6H, H₇), 3.73-3.69 (m, 2H, CH₂-OPh), 3.68-3.50 (m, 36H, H_{PEG}), 3.02-2.98 (m, 1H, H₃), 2.81-2.77 (m, 1H, H₂), 1.74 (quint., J = 7.4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-OPh), 1.45-1.43 (m, 2H, H_{alkyl chain}), 1.27-1.23 (m, 28H, H_{alkyl chain}), 0.90 (t, J = 7.4 Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.5, 172.0, 152.8 (2C), 148.3, 147.5, 136.8, 134.6, 132.4, 129.4, 110.1, 109.0, 108.5 (2C), 101.5, 73.5, 72.7, 70.5 (several), , 70.2, 70.1, 70.0, 68.9, 61.6, 56.3 (2C), 51.9, 49.3, 47.4, 43.8, 41.8, 37.2, 31.9, 30.1, 29.6 (several), 29.5, 29.4, 29.3, 25.8, 22.7, 14.1.

IR (neat): 3425, 2931, 1770, 1682 cm⁻¹

ESI-MS (ES+): 1106 [M+H]⁺.

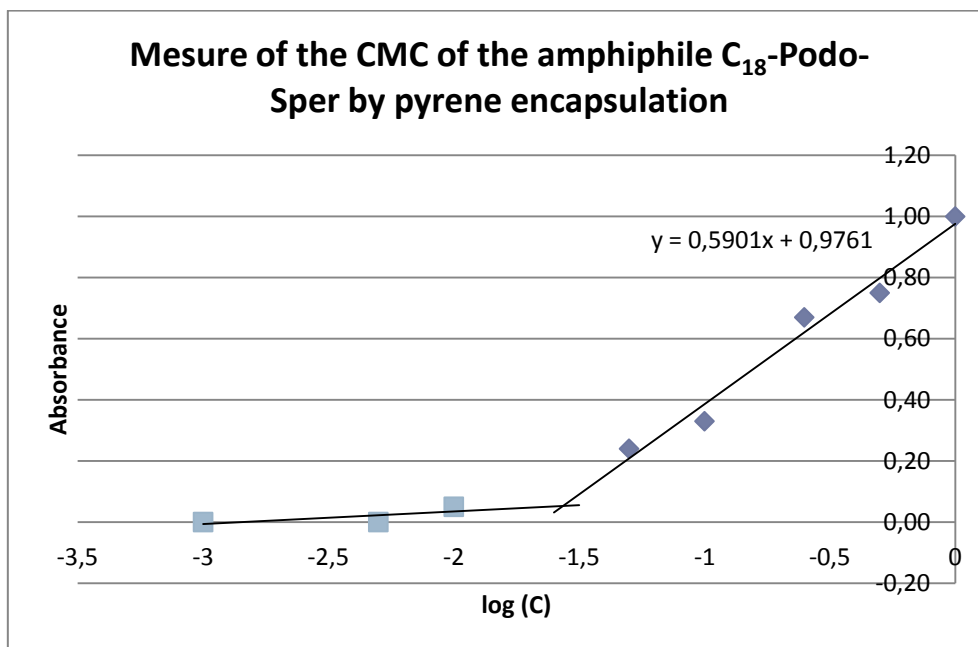
III. Characterization of amphiphiles

a. Critical Micellar Concentration measurement

A concentration range was prepared for each amphiphile from 1 mg/mL to 0.0001 mg/mL (typically, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005 and 0.0001 were prepared). 20 μ L of a solution of pyrene in DMSO (0.1 M) were added in 2 mL of each solution. Each solution was then sonicated for 3 min using an ultrasonic probe (Branson Sonifier 450 at 30 %). They were then filtered on 0.22 μ m membranes to remove insoluble pyrene aggregates. The absorbance of each solution was then measured at 339 nm (absorbance of pyrene).

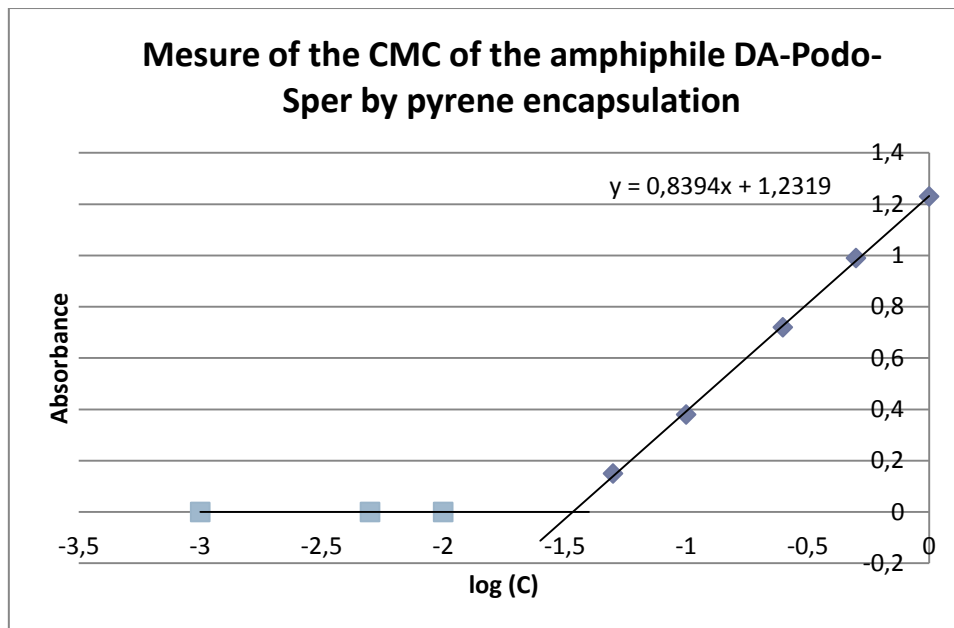
Amphiphile C₁₈-Podo-Sper :

C (mg/mL)	log C	Abs (339nm)
1,00	0	1,00
0,50	-0,30	0,75
0,25	-0,60	0,67
0,10	-1,00	0,33
0,05	-1,30	0,24
0,01	-2,00	0,05
0,005	-2,30	0
0,001	-3	0



Amphiphile DA-Podo-Sper :

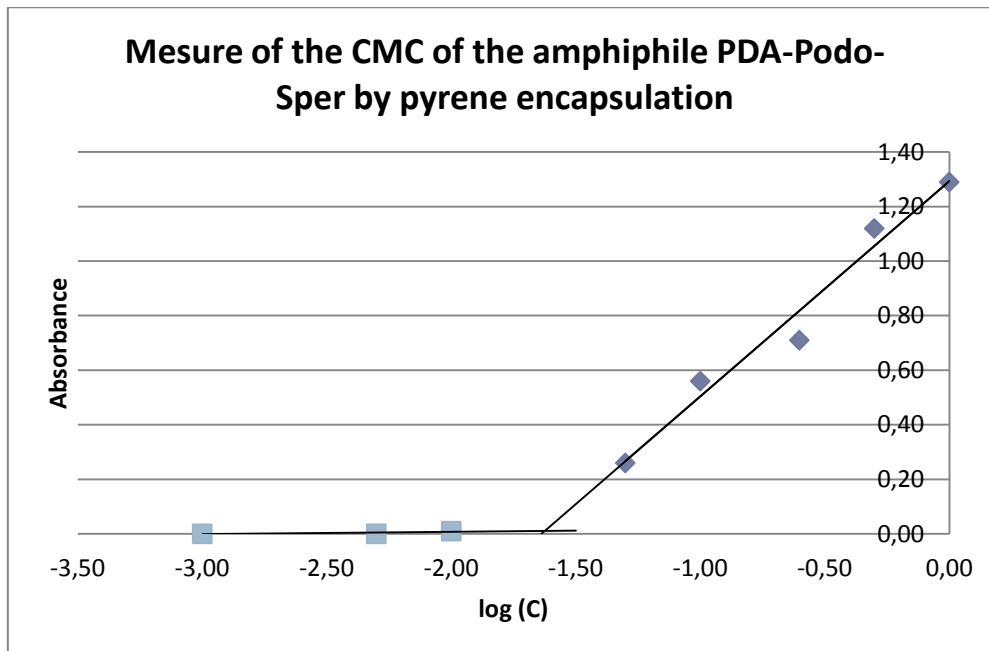
C (mg/mL)	log C	Abs (339nm)
1,00	0,00	1,23
0,50	-0,30	0,99
0,25	-0,60	0,72
0,10	-1,00	0,38
0,05	-1,30	0,15
0,01	-2,00	0,01
0,005	-2,30	0,00
0,001	-3,00	0,00



Amphiphile PDA-Podo-Sper :

This amphiphile absorbs at 339 nm. The absorbance of the solution was determined by measuring the difference of absorbance between the solution containing the pyrene and the solution without pyrene.

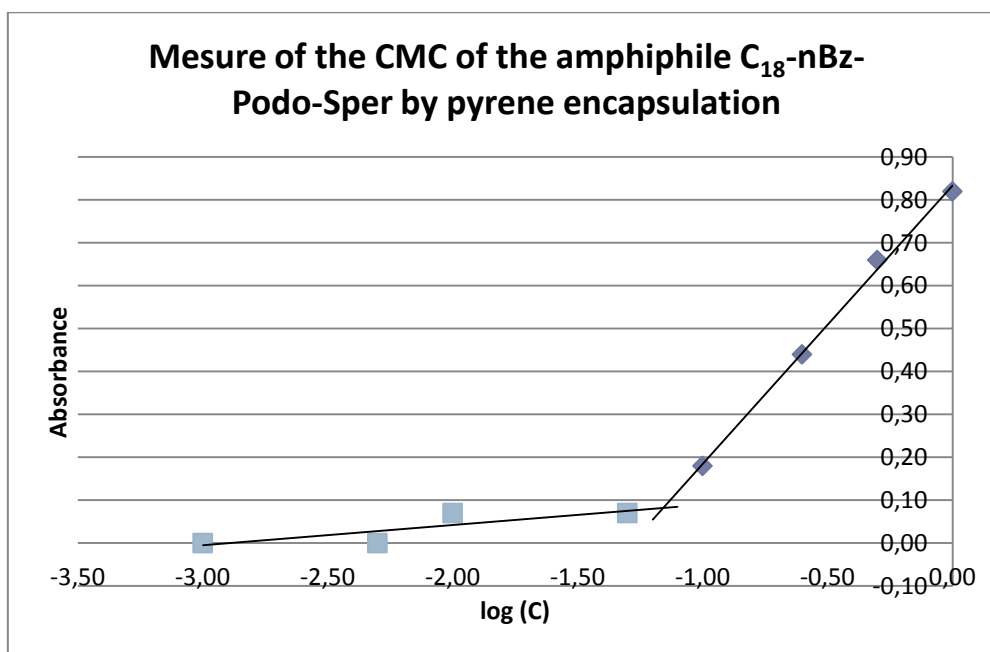
C (mg/mL)	log C	Abs without pyrene	Abs with pyrene	Difference
1,00	0,00	0,61	1,90	1,29
0,50	-0,30	0,38	1,50	1,12
0,25	-0,60	0,20	0,91	0,71
0,10	-1,00	0,06	0,62	0,56
0,05	-1,30	0,04	0,30	0,26
0,01	-2,00	0,01	0,02	0,01
0,005	-2,30	0,00	0,00	0,00
0,001	-3,00	0,00	0,00	0,00



Amphiphile C₁₈-nBz-Podo-Sper :

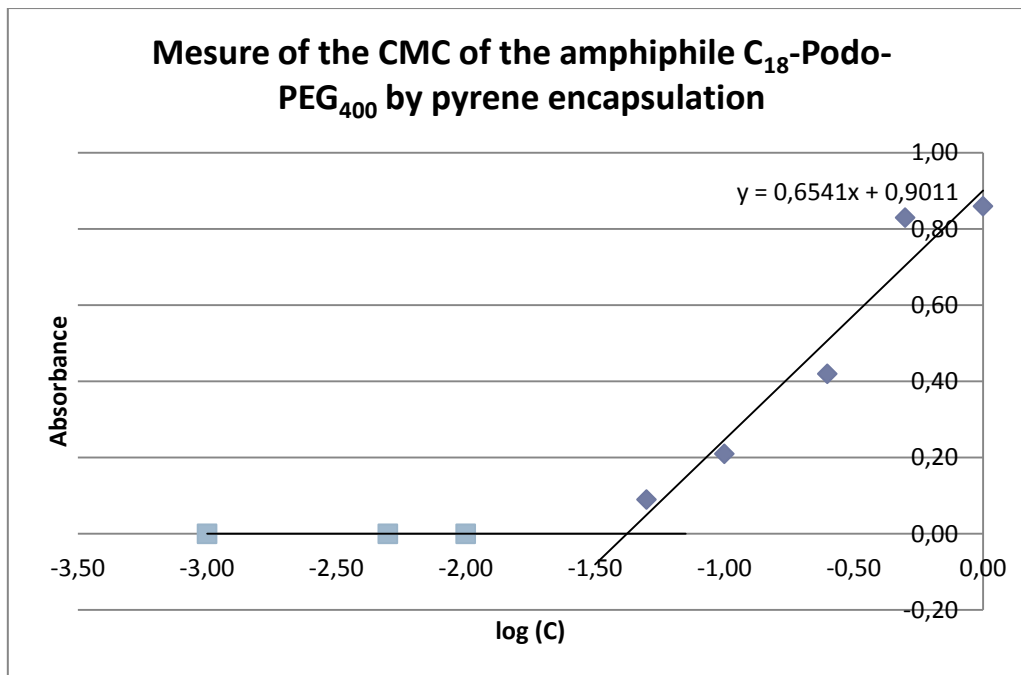
This amphiphile absorbs at 339 nm. The absorbance of the solution was determined by measuring the difference of absorbance between the solution containing the pyrene and the solution without pyrene.

C (mg/mL)	log C	Abs without pyrene	Abs with pyrene	Difference
1,00	0,00	0,59	1,41	0,82
0,50	-0,30	0,32	0,98	0,66
0,25	-0,60	0,18	0,62	0,44
0,10	-1,00	0,10	0,28	0,18
0,05	-1,30	0,00	0,07	0,07
0,01	-2,00	0,00	0,07	0,07
0,01	-2,30	0,00	0,00	0,00
0,00	-3,00	0,00	0,00	0,00



Amphiphile C₁₈-Podo-PEG₄₀₀ :

C (mg/mL)	log C	Abs (339nm)
1,00	0,00	0,86
0,50	-0,30	0,83
0,25	-0,60	0,42
0,10	-1,00	0,21
0,05	-1,30	0,09
0,01	-2,00	0,00
0,005	-2,30	0,00
0,001	-3,00	0,00



b. Dynamic Light Scattering (DLS)

The DLS was used to measure the size of the micelles.

Principle:

When the laser light reaches the small particles, the light is scattered in all directions. It is possible to measure the intensity of light scattered by particles at a given angle (typically 90 °) over time. In fact, the particles, in a liquid, are subject to Brownian motion due to thermal agitation. The distance between broadcasters (local concentration) changes constantly. This results in constructive or destructive interference and the total measured intensity contains information about the speed of movement of the particles. Mathematical algorithms allow converting this information into the size of the particule.

Results:

The following sizes were measured for the micelles:

Amphiphile	Size (in number, nm)
C ₁₈ -Podo-Sper	5
DA-Podo-Sper	5
PDA-Podo-Sper	9
C ₁₈ -nBz-Podo-Sper	10
C ₁₈ -Podo-PEG ₄₀₀	8

IV. Biological Tests

a. STP vectorized amphiphiles

i. Preparation of DiD loaded

Compound C₁₈-Podo-Sper or PDA-Podo-Sper were solubilized in deionized water (10 mmol/mL, 2.5 mL) and DiD (ex/em: 644 nm/663 nm) solubilized in chloroform (25 mg/mL, 30 µL) was added. The biphasic mixture was sonicated with the ultrasonic probe (Branson Sonifier 450 at 30 %) for 10 min yielding a homogenous and limpid blue solution. They were then filtered on 0.22 µm membranes to remove potential aggregates (stock solution).

ii. Internalization in cells over-expressing the PTS

These tests were performed by Ioanna Theodorou at the SHFJ.

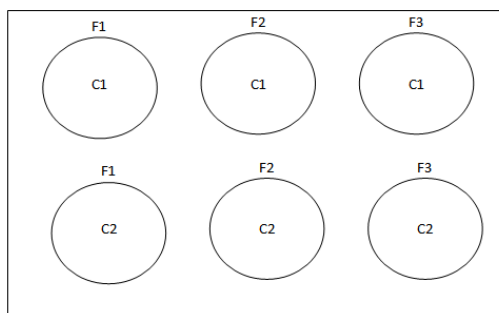
To test the spermine-nanomicelles, the established conditions were they were monitoring fluorescence over a period of 1 to 5 hours.

Samples :

These experiments were done on plates where:

- C1 and C2 are cell lines, respectively HL6015 (PTS+) and U-937 (PTS-)
- F1, F2 and F3 are nanomicelles, respectively C18-Podo-Sper (F1), PDA-Podo-Sper (F2), and C18-Podo-PEG (F3).

Plate :



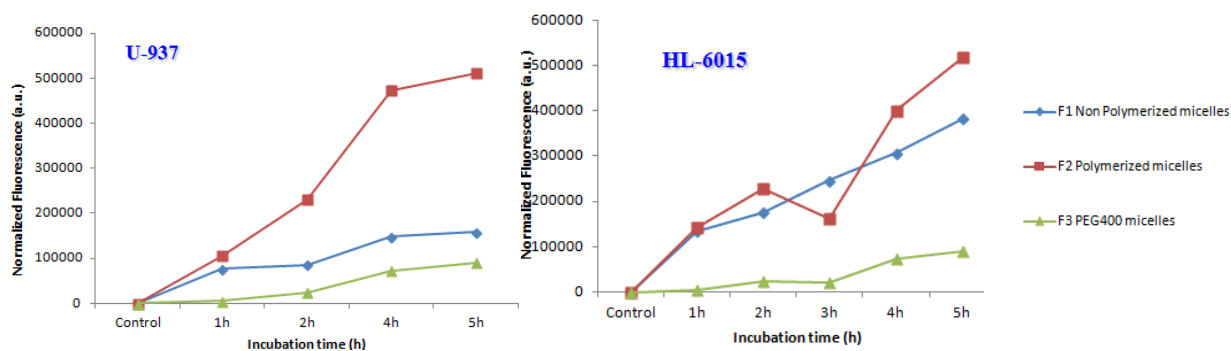
Each well was loaded with 1.4 mL of cell culture plus 1.4 µL of stock nanomicelles. The control well was loaded with 1.4 mL of cell culture only.

After adding the nanomicelles, they incubated the plates at 37 °C, 5% CO₂ for 1 to 5 h.

Each hour 200µL of each sample was collected from each well and centrifuged at 300G for 5mins. The supernatant was removed and 200 µL of PBS (-)Mg, (-)Ca were added in order to re-suspend the cells.

Samples were kept in ice prior to the cytometry measurements.

Analysis : All samples were analyzed with cytometry to measure their fluorescence levels.

Results :***b. EPR vectorized micelles*****i. Preparation of DiD loaded C18-Podo-PEG400.**

Compound C₁₈-Podo-PEG₄₀₀ (10 mg) was solubilized in deionized water (1 mL) and DiR (1 mg) solubilized in chloroform (50 μ L) was added. The biphasic mixture was sonicated with the ultrasonic probe (Branson Sonifier 450 at 30 %) for 10 min affording a homogenous and limpid blue solution. They were then filtered on 0.22 μ m membranes to remove potential aggregates.

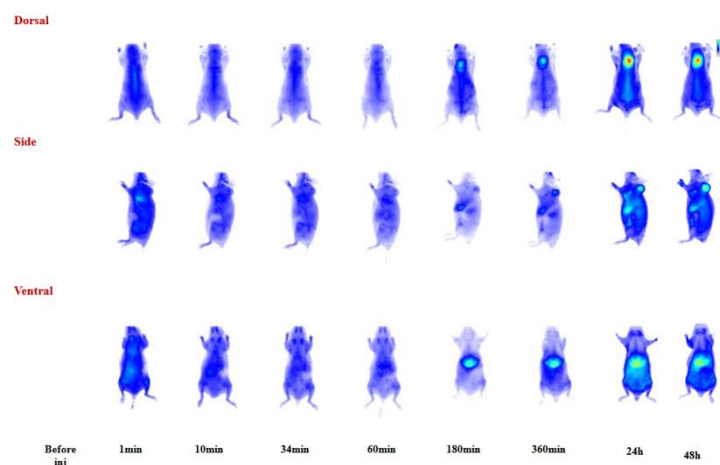
ii. Internalization in tumors

The internalization of the C₁₈-Podo-PEG₄₀₀ micelles was followed by fluorescence of the encapsulated DiR using the TomoFluo3D technology.

The micelles (from 150 μ L up to 200 μ L) were injected in the tail of three nude (nu/nu) female mice with an insulin syringe. The mice fluorescence was measured at 1 min, 10 min, 30 min, 60 min, 180 min, 360 min, 24 h and 48 h.

For planar imaging they used:

- Excitation filter sets: White and 680 nm (arrays of LEDs).
- Emission filter sets: a longpass (LP) filter set from 760 nm spanning to NIR (over 850 nm).

Result:

Annexes

Title: Synthesis of anorexigenic, anti-depressive and anti-carcinogenic compounds.

Abstract:

This thesis deals with the synthesis of biologically active compounds.

In the first chapter, we developed a semi-synthetic process for the *exo*-dehydration of macrocarpals A and B to get access to macrocarpal G which is a drug known for its anorexigenic activity.

The second chapter is dealing with the enantioselective synthesis of the anti-depressive drug Levomilnacipran which has recently been approved by the FDA. This *de novo* synthesis was performed in 9 steps with an overall yield of 32 % and with an enantiomeric excess of 88 % which was maintained throughout our synthesis.

In the third chapter we worked on a novel route for the enantioselective synthesis of the antipsychotic drug F17807. Our four-step synthesis of the 1,4-benzodioxan unit relied, as the key step, on the S_NAr reaction of optically active (*S*)-isopropylidenglycerol on a properly functionalized fluorophenol and subsequent transformations. F17807 was produced with an ee of 98%.

The fourth chapter reports our investigations for the synthesis of three stereoisomers of F14512 which is a targeted epipodophyllotoxin-based anticancer drug.

Finally, new nanometric formulations of F14512 were designed in the fifth chapter. Four different drug-containing amphiphilic compounds were synthesized, assembled into the corresponding micelles, and evaluated as delivery systems. Preliminary *in vitro* and *in vivo* results indicate that the nanomicelles are highly promising for the targeting of tumors as visualized by fluorescence imaging.

Key words: Macrocarpal, Levomilnacipran, Benzodioxans, Podophyllotoxins, micelle, nanomedicine.

Titre : Synthèse de composés anorexigènes, antidépresseurs et anticancéreux.

Résumé :

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse de composés biologiquement actifs.

Dans un premier temps, nous avons étudié la déshydratation des macrocarpals A et B en vue d'obtenir un accès semi-synthétique rapide au macrocarpal G qui possède des propriétés anorexigènes.

Dans un second temps, nous avons développé une nouvelle synthèse énantiosélective du Lévomilnacipran qui est un antidépresseur qui vient de recevoir son autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis et au Canada. Cette synthèse *de novo* nous a permis d'obtenir le produit actif en neuf étapes avec un rendement global de 32 % et un excès énantiomérique conservé de 88 %.

Nous avons ensuite mis au point une synthèse énantiosélective du 1,4-benzodioxane F17807. Cette synthèse en quatre étapes repose sur une étape clé de S_NAr du (*S*)-isopropylidèneglycerol sur un fluorophénol. Cette étape permet d'introduire l'information chirale qui sera maintenue tout au long de la synthèse puisque le produit final est isolé avec un excès énantiomérique de 98 %.

Nous avons également synthétisé des analogues du dérivé d'épipodophyllotoxine, F14512. Ces stéréoisomères sont des impuretés qui peuvent apparaître dans la formulation finale du principe actif.

Pour finir, nous avons imaginé de nouvelles formulations nanométriques du composé F14512 afin que celui-ci s'auto-assemble en micelle. Pour cela, quatre amphiphiles ont été synthétisés et les premiers tests montrent une internalisation préférentielle au niveau des tumeurs ou des cellules surexprimant le STP en fonction de leur fonctionnalisation.

Mots clefs: Macrocarpal, Lévomilnacipran, Benzodioxanes, Podophyllotoxines, micelle, nanomédicaments.