



HAL
open science

Synthèse et étude de nouveaux analogues de l'acadésine pour circonvenir les résistances dans les hémopathies malignes

Hela Amdouni

► **To cite this version:**

Hela Amdouni. Synthèse et étude de nouveaux analogues de l'acadésine pour circonvenir les résistances dans les hémopathies malignes. Autre. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2016. Français. NNT : 2016AZUR4065 . tel-02003542

HAL Id: tel-02003542

<https://theses.hal.science/tel-02003542>

Submitted on 1 Feb 2019

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 CÔTE d'AZUR – UFR Sciences
Ecole Doctorale de Sciences Fondamentales et Appliquées

THESE

Pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences

de l'UNIVERSITE CÔTE d'AZUR
Discipline : Chimie

Présentée et soutenue par
Hela AMDOUNI

« Synthèse et étude de nouveaux analogues de l'acadésine pour
circonvenir les résistances dans les hémopathies malignes »

Thèse dirigée par le Dr. Rachid Benhida et co-encadrée par le Dr. Anthony
Martin

Soutenue le 28 Septembre 2016

Jury:

Pr. Franck Suzenet	Professeur, Université d'Orléans	Rapporteur
Dr. Ling Peng	Directeur de recherche CNRS, Université Aix Marseille	Rapporteur
Dr. Joelle Dubois	Directeur de recherche CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette	Examineur
Dr. Patrick Auberger	Directeur de recherche INSERM, Centre méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice	Examineur
Dr. Anthony Martin	Chargé de recherche, Université Côte d'Azûr	Co-encadrant de thèse
Dr. Rachid Benhida	Directeur de recherche CNRS, Université Côte d'Azûr	Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à l'Institut de Chimie de Nice (ICN) de l'Université Côte d'Azur, au sein de l'équipe « Molécules Bioactives » et elle a été financée par l'Institut National du Cancer.

J'aimerais, tout d'abord, remercier le Dr. Ling Peng ainsi que le Pr. Franck Suzenet pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Mes remerciements vont également au Dr. Joelle Dubois et au Dr. Patrick Auberger pour l'examen de ces recherches.

Je voudrais ensuite chaleureusement remercier le Dr. Rachid Benhida pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe « Molécules Bioactives », non seulement durant ces trois années de thèse mais aussi durant mes stages de Master 1 et 2. Merci de m'avoir fait confiance à chaque fois. Merci de vous être battu personnellement pour obtenir cette bourse de thèse. Merci pour votre présence et investissement au quotidien.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Anthony Martin, pour son encadrement et implication mais aussi pour son amitié... Merci pour ton écoute et tes conseils. Merci d'avoir pris à cœur la correction de ce manuscrit. Merci pour ta présence dans les moments les plus difficiles et enfin merci pour tous ces repas partagés, ces soirées, ces anniversaires, ces fou rires, cette bonne humeur au quotidien... Merci.

J'aimerais également remercier nos collaborateurs biologistes : le Dr. Patrick Auberger et le Dr. Guillaume Robert, avec qui nous avons eu des échanges interdisciplinaires enrichissants. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire. Merci de m'avoir donné l'occasion de participer à vos travaux expérimentaux. Merci à Alix et Nathan de m'avoir accompagnée durant ces quelques semaines de « stage intensif ». Ce fut un grand plaisir.

Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe « Molécules Bioactives » qui ont contribué à mon apprentissage, chacun à sa façon. Je tiens à remercier tout particulièrement les Dr. Benoît Michel, Luc Demange et Cyril Ronco pour leur disponibilité. Je remercie

également le Dr. Marc Gaysinski et le Dr. Lionel Massi qui s'occupent des plateformes de RMN et de spectrométrie de masse et qui nous sont d'une aide précieuse.

Ces années de thèse n'auraient évidemment pas été pareilles sans la présence de mes amis, mes compagnons de route :

Janah, merci pour ces échanges mixtes (arabe-français-anglais) ! Merci de m'avoir fait découvrir le Liban. Merci pour ton aide et ton soutien. A nos rires et enguelades, à nos joies et peines, à notre amitié ! Bon vent mon grand !

Najiba, je n'ai jamais vraiment eu l'occasion de te remercier pour tout ce que tu as fait moi...Je te l'écris ici : merci infiniment pour ton grand coeur et ton amitié. Je suis ravie d'avoir croisé ton chemin.

Nicolas (ou le fan inconditionnel d'Apple), celui que je connais depuis mon premier jour à Nice. Merci pour ta gentillesse, merci de toujours répondre présent pour aider. Merci pour ta simplicité.

Antoine, mon voisin de paillasse, merci pour ta bonne humeur et ton organisation. Merci pour tous ces moments partagés. Merci pour ces discussions philosophiques... J'aimerais d'ailleurs informer tous ceux qui pourraient être concernés que Toinou a résolu la plupart des questions existentielles que Socrate et autres ont échoué à solutionner.

Je n'oublie pas de remercier tous mes autres collègues et amis : Assia, Malika, Hélène, Nedra, Luisa, Dylan, Camille, Mohsine, Anh, Coralie, Florian, Mauro, Sacha, Alexandra, Hamza.

Du fond du cœur, j'aimerais à présent remercier mes parents, pour leur amour inconditionnel et soutien indéfectible. A ma maman, le pilier de notre famille, pour sa force et sa sagesse. Tu es ce que nous avons de plus cher. A mon papa chéri, pour les valeurs de bonté et de générosité qu'il nous a transmises, pour ses sacrifices et pour nous avoir donné tous les moyens de réussir. Votre fierté est ma feuille de route.

Je n'oublie pas Mohamed, mon frère, mon compagnon de toujours, et sa future épouse Sandouda, je vous souhaite tout le bonheur du monde.

Je remercie aussi du fond du cœur mes beaux parents, tata Najoua et tonton Adnane, pour leur affection et soutien. Merci pour vos encouragements et votre présence. Je suis reconnaissante d'avoir une famille aussi unie et aimante. Rayhane et Kais, je ne vous oublie évidemment pas.

Je remercie tous les membres de ma famille et belle-famille pour leur présence dans ma vie. Une pensée spéciale à mes tantes (Radhia, Hedia, Neila et Karima), ma tante Hajer et ma tante Ginane, incarnations de la femme tunisienne forte, libre et épanouie. A mémé, pour son sourire angélique et sa générosité. A mon grand-père, cette lumière qui guide mes pas. A mes grands-parents, votre bienveillance me parvient de là où vous êtes, je ne vous oublie pas, jamais.

Je me tourne à présent vers mon petit frère, mon étoile, pour son amour inconditionnel et pour la fierté que je vois dans ses yeux quand il me regarde. Notre relation fusionnelle, seuls toi et moi pouvons la comprendre. Mon amour pour toi et ma fierté sont infinis. Pour le meilleur comme pour le pire, je serai là, infailliblement et pour toujours.

J'aimerais enfin m'adresser à mon Arslane, ma moitié : je ne pourrai jamais te remercier suffisamment pour tout ce que tu fais pour moi et je ne trouverai jamais les mots justes pour te dire à quel point je suis reconnaissante de t'avoir... Je te dirai simplement que sans ton soutien, je n'aurais jamais été au bout de cette thèse. Sans toi, je ne rêverais pas aussi grand. Tu es ma force et mon inspiration... De tout mon cœur, je t'aime. Et je crois qu'on y est babytouti, il est enfin temps pour nous de nous unir pour la vie.

Abréviations

ABL : gène tronqué Abelson	dMAF : <i>para</i> -Diméthylaminoflavone
ACA : Acadésine	DMAP : 4-Diméthylaminopyridine
ADME : Absorption, distribution, métabolisation et élimination	DMF : Diméthylformamide
AICAR : Aminoimidazole-carboxamide-ribose	DMSO : Diméthoxysulfonamide
ALH : Accepteur de liaison-H	ESI : Ionisation par électronébulisation (<i>ElectroSpray</i>)
AREB-t : Anémie réfractaire avec excès de blastes, en transformation	FAB : <i>French-American-British</i>
ATG : <i>Autophagy related genes</i>	FDA : <i>Food and drug administration</i>
ATP : Adénosine triphosphate	FISH : Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence
AZA : Azacytidine	HER-2 : <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
BCR : <i>Breakpoint cluster region</i>	HMBC : Corrélacion hétéronucléaire à travers plusieurs liaisons
BODIPY : <i>Boron-dipyrromethene</i>	HOBt : Hydroxybenzotriazole
Calcd : <i>Calculated</i>	HOMO : Orbitale moléculaire occupée la plus haute
CAN : Nitrate d'ammonium cérique	HPLC : Chromatographie liquide haute pression
CGH-array : Hybridation génomique comparative sur puces à ADN	HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution
Chromosome Ph : Chromosome Philadelphie	HSP : <i>Heat shock proteins</i>
CI₅₀ : Concentration inhibitrice 50	HSQC : Spectroscopie hétéronucléaire simple quantum
CMF : Cytométrie en flux	IBD : Iodosobenzene diacétate
COSY : Spectroscopie de corrélation via les couplages scalaires	iCuAAC : <i>Iodoalkyne version of the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>
CuAAC : Cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre	inv : Inversion
DAPI : 4',6'-Diamidino-2-phénylindole	IM : Imatinib
DBU : 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène	IMPDH : Inosine-5'-monophosphate déshydrogénase
DCM : Dichlorométhane	IRIS : <i>International Randomized study of Interferon versus STI-571</i>
del : Délétion	ITK : Inhibiteur de tyrosine kinase
DFT : Théorie des fonctionnelles de la densité	JAK2 : Janus kinase 2
DIC : Diisopropylcarbodiimide	
DIPEA : <i>N,N</i> -diisopropyléthylamine	
DLH : Donneur de liaison-H	
DMA : <i>N,N</i> -diméthylacétamide	

LAM : Leucémie aigue myéloïde

LAL : Leucémie aigue lymphoblastique

LBM : Hémopathie lymphoïde chronique B mature

LC3 : *Microtubule-associated protein 1 light chain 3*

LMC : Leucémie myéloïde chronique

LRL : Liaison à rotation libre

LUMO : Orbitale moléculaire vacante la plus basse

Lymphocytes NK : *Natural Killer*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*

MEKP : Peroxyde de méthyléthylcétone

MS (ESI⁺) : Spectrométrie de masse (Electrospray en mode positif)

m-TOR : *Mammalian target of rapamycin*

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)

NBS : *N*-bromosuccinimide

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

NIS : *N*-iodosuccinimide

NCI : *National Cancer Institute*

NOESY : Spectroscopie de corrélation par effet Overhauser nucléaire

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PARP : Poly(ADP-Ribose)Polymerase

PBMC : *Peripheral blood mononuclear cell*

PBS : Tampon phosphate salin

PDGFR : *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*

PFA : *para*-Formaldéhyde

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PM : Poids moléculaire

t : Translocation réciproque

TBTA : Tris(benzyltriazolyl)méthylamine

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

TMEDA : Tétraméthyléthylènediamine

TTTA : Tris(4-trimethylsilylmethyl-1,2,3-triazolylmethyl)amine

SMC : Syndrome myéloprolifératif chronique

SMD : Syndrome myélodysplasique

STAT5: *Signal transducer and activator of transcription 5*

RMN : Résonance magnétique nucléaire

r.t. : *Room temperature*

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

WHO : *World health organization*

Zvad-fmk : Z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorométhylcétone

Table des matières

Remerciements	3
Abréviations	7
Introduction générale.....	12
1. Chapitre 1.....	13
Hémopathies malignes et thérapies ciblées	13
1.1. L'hématopoïèse	14
1.2. Les hémopathies malignes.....	16
1.2.1. Hémopathies myéloïdes	17
1.2.2. Hémopathies lymphoïdes	19
1.3. Cytogénétique hémato-oncologique	22
1.3.1. Description des anomalies chromosomiques	23
1.3.2. Anomalies spécifiques dans les hémopathies malignes	24
1.4. Thérapie ciblée	25
1.4.1. Mécanismes moléculaires dans les cellules cancéreuses	25
1.4.2. Nouvelle approche thérapeutique.....	26
1.5. L'imatinib, premier inhibiteur de tyrosine-kinase.....	27
1.5.1. La tyrosine-kinase BCR-ABL, cible de choix	27
1.5.2. L'imatinib et ses résistances.....	28
2. Chapitre 2.....	33
La chimie des 1,2,3-triazoles.....	33
2.1. La cycloaddition 1,3-dipolaire.....	34
2.1.1. Cycloaddition de Huisgen	34
2.1.2. Cycloaddition catalysée au cuivre (CuAAC).....	35
2.2. Description détaillée de la CuAAC	36
2.2.1. Etude mécanistique	36
2.2.2. Le couple catalytique Cu ^I -Ligand	40
2.3. Formation de 1,2,3-triazoles-1,4,5-trisubstitués	41
2.3.1. 5-iodo-1,2,3-triazole :	42
2.3.2. 5-alcynyl-1,2,3-triazole	49
3. Chapitre 3.....	60
Synthèse et évaluation biologique d'analogues nucléosidiques de l'adésine.....	60

3.1.	Stratégie du projet.....	61
3.1.1.	L'autophagie : Généralités	61
3.1.2.	Autophagie et cancer	62
3.1.3.	Interconnexion autophagie-apoptose.....	63
3.1.4.	Ciblage de l'autophagie-Nouvelle approche thérapeutique	64
3.1.5.	L'acadésine : point de départ.....	64
3.2.	Synthèse et évaluation de l'activité antiproliférative d'analogues nucléosidiques de l'ACA	65
3.2.1.	Famille I- Modification des groupements protecteurs	67
3.2.2.	Famille II- Modification de la stéréochimie.....	73
3.2.3.	Famille III- Modification des groupements en positions 4 et 5 du triazole	77
3.2.4.	Famille IV- Modification des groupements esters et réduction de la triple liaison	81
3.2.5.	Récapitulatif de l'étude structure-activité	84
3.2.6.	Tests de Cytométrie en Flux sur la lignée K562	85
3.2.7.	Tests XTT sur lignée résistante de LMC et lignées de SMD.....	87
3.2.8.	Tests sur un large panel de cancers	88
3.2.9.	Tests sur des lymphomes B humains	90
3.3.	Etude pharmacologique du candidat sélectionné 5.....	91
3.3.1.	Concept de drug-likeness	91
3.3.2.	Profil Lipinski-Veber du composé 5	93
3.3.3.	Tests de stabilité du composé 5.....	93
3.3.4.	Toxicité.....	99
3.3.5.	Récapitulatif de l'étude pharmacologique.....	100
3.4.	Etude de l'activité du candidat 5 <i>in vivo</i>	100
3.5.	Mode d'action de 5	102
3.5.1.	Tests enzymatiques	102
3.5.2.	Etude par électrophorèse	104
3.6.	Conclusion et perspectives du chapitre 3	105
4.	Chapitre 4.....	107
	Synthèse et évaluation biologique d'analogues non nucléosidiques de l'acadésine	107
4.1.	Synthèse et évaluation de l'activité antiproliférative des analogues non nucléosidiques de l'ACA.....	109
4.1.1.	Famille I'- Modification de la position 5 du triazole	109

4.1.2.	Famille II' - Modification de la position 1 du triazole	112
4.1.3.	Famille III' - Modification des positions 4 et 5 du triazole (en conservant la fonction alcyne)	115
4.1.4.	Récapitulatif de l'étude structure-activité	118
4.1.5.	Tests de Cytométrie en Flux sur la lignée K562	119
4.1.6.	Evaluation des activités de 78 et 91 sur d'autres lignées cellulaires.....	120
4.2.	Etude pharmacologique des composés <i>lead</i> 78 et 91	122
4.2.1.	Profils Lipinski et Veber des composés 78 et 91.....	122
4.2.2.	Tests de solubilité et stabilité chimique	123
4.2.3.	Toxicité de 78 et 91	124
4.3.	Mode d'action de 78 et 91	125
4.3.1.	Etude de la mort cellulaire induite par 78 et 91	125
4.3.2.	Localisation intracellulaires des composés <i>lead</i> 78 et 91	127
4.3.3.	Elucidation de la cible moléculaire	132
4.3.4.	La cible des composés <i>lead</i> 78 et 91 est elle une enzyme à cystéine ?.....	137
4.4.	Conclusion du chapitre 4 et perspectives	139
	Conclusion générale	142
	Bibliographie	146
	Partie expérimentale	151
	Annexes	196

Introduction générale

S'inscrivant à l'interface chimie–biologie, cette thèse a pour objectif de développer de nouvelles molécules actives contre certaines hémopathies malignes. Elle vise particulièrement à circonvenir les phénomènes de résistance décrits pour ces processus tumoraux à travers un mode d'action original (l'autophagie).

Le premier chapitre introduit l'hématopoïèse et les différentes classes d'hémopathies malignes. Il décrit ensuite l'origine moléculaire de ces pathologies et la naissance de la thérapie ciblée. L'exemple de l'imatinib, premier représentant de cette thérapie, est également détaillé dans ce chapitre.

Le deuxième chapitre est consacré à la chimie des 1,2,3-triazoles en raison de son utilisation pour la synthèse de nos molécules bioactives. Après un rappel bibliographique de la cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC), nous exposons des méthodologies permettant la formation de 1,2,3-triazoles 1,4,5-tri-substitués et discutons leurs mécanismes réactionnels. Nous décrivons également une méthodologie donnant accès aux 5-alcynyl-triazoles, développée et utilisée dans le cadre de cette thèse.

Dans la troisième partie de ce manuscrit, nous introduisons brièvement l'autophagie et son rôle dans les processus tumoraux. Nous présentons ensuite la synthèse de quatre familles de composés nucléosidiques ainsi que l'évaluation de leur activité antiproliférative contre la leucémie myéloïde chronique. Après la sélection d'un produit *lead*-optimisé, nous présentons une évaluation biologique approfondie de ce dernier : activité sur différentes lignées cellulaires tumorales, profil pharmacologique, activité *in vivo* et mode d'action.

Dans la quatrième partie, une série de molécules non nucléosidiques est exposée. Le développement de cette nouvelle série a pour objectifs la mise au point de nouveaux composés *lead* ainsi que l'étude de l'influence de la différence structurale entre les deux séries sur leurs activités biologiques et leurs modes d'action. Dans ce contexte, trois familles de composés non nucléosidiques sont présentées. Ceci a donné deux nouveaux composés *lead* dont les profils pharmacologiques et les modes d'actions sont présentés. De plus, deux dérivés fluorescents et un dérivé biotinylé de ces composés *lead* ont été synthétisés afin d'apporter des réponses quant à leur parcours intracellulaire et cible(s) moléculaire(s).

Enfin, dans une conclusion générale, nous exposerons les principaux résultats de ces travaux de thèse et suggérerons des perspectives.

1. Chapitre 1

Hémopathies malignes et thérapies ciblées

Avec 8 millions de décès annuels et 12 millions de nouveaux cas enregistrés à l'échelle planétaire, le cancer se situe parmi les premières causes de mortalité chez l'être humain. Ce constat reste valable à l'échelle de la France avec 385 000 nouveaux cas et 149 500 décès enregistrés en 2015 (données de l'Institut National du Cancer). Les projections de ces chiffres d'incidence et de mortalité sont, de surcroît, préoccupantes en raison de la multiplication des facteurs de risque tels que le vieillissement de la population, le tabagisme, l'obésité et les expositions environnementales et professionnelles.

Pour surmonter ce problème majeur de santé publique, différents types de traitements ont été développés (la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie...). En dépit de leur efficacité, des limitations importantes persistent. On peut citer par exemple les effets secondaires importants et imprévisibles, les spécificités génétiques et biologiques de chaque tumeur qui requièrent idéalement un traitement personnalisé ou encore l'émergence des phénomènes de résistances qui présentent des limitations majeures pour différents types de thérapies (chimiorésistance, radiorésistance).

Les travaux que nous présentons ici s'inscrivent dans le cadre de cette lutte contre le cancer. Nous ciblons particulièrement les résistances développées contre les traitements de certaines hémopathies malignes. Dans ce contexte, nous allons commencer par introduire l'hématopoïèse et les différentes classes d'hémopathies malignes.

1.1. L'hématopoïèse

Le sang est composé de plasma et de trois types de cellules sanguines générées dans la moelle osseuse ; les érythrocytes (globules rouges), les thrombocytes (plaquettes) et les leucocytes (globules blancs : polynucléaires neutres, basophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes) (Figure 1). Chaque composant possède une fonction indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. Ainsi, le plasma transporte des substances (telles que les substances alimentaires, les déchets du métabolisme, les hormones...) d'un point à un autre du corps. Les érythrocytes transportent l'oxygène *via* l'hémoglobine. Les thrombocytes participent à la coagulation et enfin les leucocytes interviennent dans la réponse immunitaire.

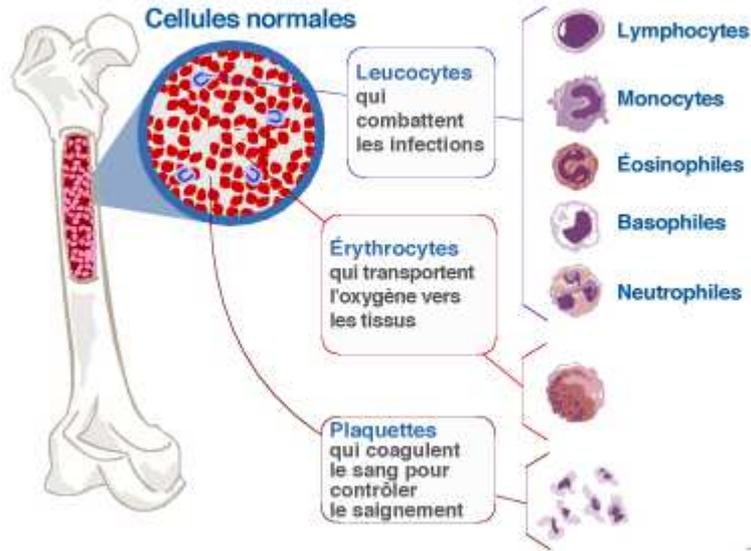


Figure 1 : Les types de cellules sanguines [<http://www.mycmlife.eu/be/fr/>]

Les cellules sanguines, appelées également hémocytes, sont générées, renouvelées et régulées *via* l'hématopoïèse (Figure 2). Il s'agit d'un processus qui se produit au niveau de la moelle osseuse et qui conduit à tous types de cellules sanguines à travers des différenciations successives. Le point de départ de l'hématopoïèse est une cellule primitive dont l'existence a été prouvée en 1961 *via* des expériences d'irradiation et de greffe de moelle osseuse menées par les chercheurs canadiens Ernest McCulloch et James Till ¹. Cette cellule primitive nommée « cellule souche hématopoïétique » est caractérisée par trois éléments essentiels : la multipotence, la différenciation et l'auto-renouvellement (multiplication sans différenciation). En réponse à des stimuli externes, tels que des cytokines, elle déclenche l'hématopoïèse et se différencie en cellules progénitrices. Ces dernières sont engagées dans le lignage myéloïde ou lymphoïde et possèdent une capacité de différenciation et d'auto-renouvellement plus faibles. Le niveau suivant de différenciation donne naissance au troisième compartiment hématopoïétique : les « précurseurs ». Il s'agit de cellules encore plus engagées dans le lignage correspondant (lymphoïde ou myéloïde), capables uniquement de division et de maturation. Enfin, une dernière étape de différenciation aboutit aux cellules matures, fonctionnelles et capables de passer dans le sang. Pour les précurseurs pro-B et pro-T, la maturation se déroule en deux étapes. La première permet aux précurseurs d'apprendre à reconnaître et à être stimulés par leur antigène. La deuxième expose ces lymphocytes « naïfs » à leur antigène pour induire l'expression de leurs capacités fonctionnelles. L'immunopoïèse est alors accomplie et les lymphocytes sont dits activés. Contrairement aux lymphocytes B et

T, le développement et la maturation des lymphocytes NK (*Natural Killer* ou cellules tueuses naturelles) ne sont pas bien connus. On sait néanmoins qu'ils découlent du progéniteur lymphoïde et qu'ils ne nécessitent pas d'activation. Ils sont ainsi capables d'interagir avec les cellules pathologiques et de les tuer sans maturation préalable. Pour cette raison, on parle de système immunitaire inné pour les lymphocytes NK tandis qu'on parle de système immunitaire acquis pour les lymphocytes B et T².

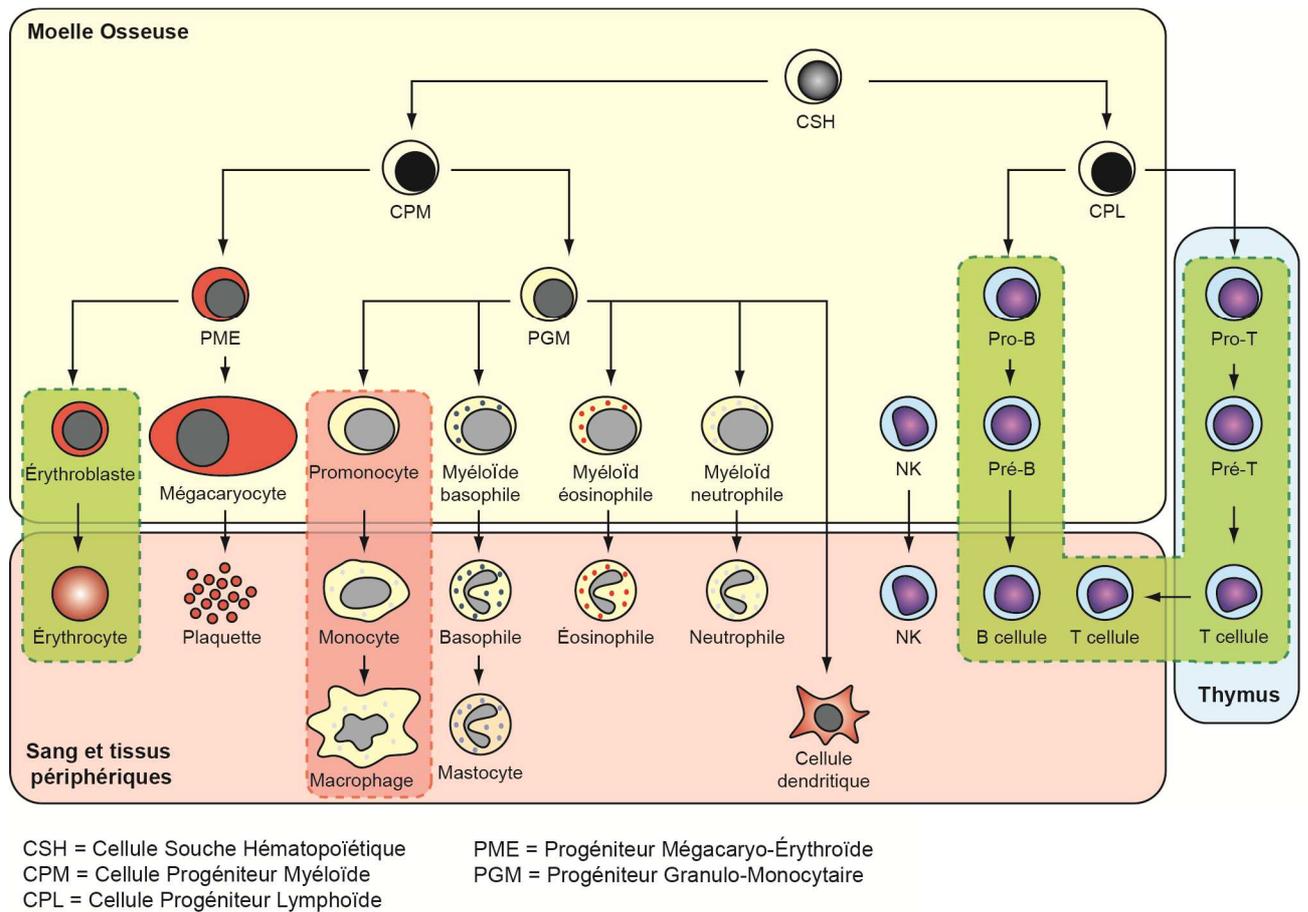


Figure 2: Les compartiments de l'Hématopoïèse [<http://www.msamerique.ca/articles/tc-ntp-un-modulateur-cle-du-systeme-immunitaire>]

1.2. Les hémopathies malignes

Des dysfonctionnements peuvent survenir au cours de l'hématopoïèse engendrant différents types de pathologies regroupées sous le nom d'hémopathies malignes. Pour les classer, plusieurs paramètres sont pris en compte :

- ✓ **L'évolution de la maladie** : aigue ou chronique. La première se développe à partir de cellules immatures tandis que la deuxième affecte des cellules matures.
- ✓ **Le site de développement de la maladie** : moelle osseuse ou organes lymphoïdes. Dans le premier cas, on parle de leucémie et dans le deuxième on parle de lymphome.
- ✓ **Le lignage des cellules affectées** : myéloïde ou lymphoïde. On parle respectivement d'hémopathie myéloïde et lymphoïde.

En raison du nombre et de la complexité des critères existants, il a été difficile de trouver un moyen consensuel de classer les hémopathies. Différents systèmes de classification se sont ainsi succédé depuis les années 1970. Une première classification a notamment été établie et publiée par le groupe FAB (*French-American-British*) en 1976. Elle s'appuie sur des données morphologiques, immunophénotypiques, cytochimiques et cliniques. A partir de l'an 2000, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a décidé de prendre en compte les facteurs génétiques et a publié une nouvelle classification qui a été mise à jour en 2008 avec l'édition du livre « *WHO Classification of Tumors of Haemtopoietic and Lymphoid Tissues* »³. L'importance accordée aux systèmes de caractérisation de ces pathologies s'explique par leur influence sur le choix de la prise en charge thérapeutique.

Dans le cadre de ce travail, nous utiliserons la classification récente et consensuelle de l'OMS pour introduire et définir les différents types d'hémopathies malignes.

1.2.1. Hémopathies myéloïdes

Comme leur nom l'indique, ces affections se développent à partir de précurseurs engagés dans le lignage myéloïde (lignées granuleuse, érythroblastique, mégacaryocytaire, histio-monocytaire). Suivant le nombre de blastes médullaires et le niveau de différenciation des cellules anormales, on peut distinguer trois types d'hémopathies myéloïdes : les syndromes myéloprolifératifs chroniques (SMC), les syndromes myélodysplasiques (SMD) et les leucémies aiguës myéloïdes (LAM).

1.2.1.1. Les syndromes myéloprolifératifs chroniques (SMC)

Les syndromes myéloprolifératifs chroniques surviennent à une fréquence de 12,1% par rapport à l'ensemble des hémopathies malignes (Tableau 1). Ils sont dus à une anomalie clonale des cellules souches myéloïdes favorisant la prolifération médullaire sans blocage de différenciation. Ceci donne lieu à une accumulation excessive de cellules différenciées avec une prédominance d'une lignée particulière par type de syndrome. Ainsi, la leucémie myéloïde chronique (LMC) se caractérise par une prédominance de la lignée granuleuse, la polyglobulie de Vaquez par une prédominance de la lignée érythrocytaire et la thrombocytémie essentielle par une prédominance de la lignée mégacaryocytaire. La splénomégalie myéloïde est quant à elle la seule sous-catégorie où la prolifération se fait au niveau des différentes lignées, sans prédominance.

1.2.1.2. Les syndromes myélodysplasiques (SMD)

Les syndromes myélodysplasiques présentent 7,3% de l'ensemble des hémopathies malignes. Il s'agit d'affections clonales des cellules souches myéloïdes engendrant une maturation défectueuse et favorisant des dysplasies morphologiques et fonctionnelles (Tableau 1). Ces cellules mal formées sont reconnues comme étrangères par l'organisme et éliminées par apoptose. On parle d'avortement intra-médullaire. S'ensuivent une ou plusieurs cytopénies sanguines contrastant avec une moelle hématopoïétique de richesse augmentée. Ces cytopénies sont responsables de plusieurs types d'anémies (l'anémie réfractaire, l'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne, l'anémie réfractaire avec excès de blastes) ainsi que d'autres syndromes tels que le syndrome 5q – ou la cytopénie réfractaire avec dysplasies multi-lignées. Les syndromes myélodysplasiques présentent d'importants risques de se transformer en leucémie aigue myéloïde.

1.2.1.3. Les leucémies aigues myéloïdes (LAM)

Les leucémies aigues myéloïdes présentent 9,2% de l'ensemble des hémopathies malignes. Il s'agit de proliférations malignes clonales de cellules myéloïdes immatures, appelées blastes, bloquées à un stade précoce de leur différenciation (Tableau 1). L'accumulation de ces blastes dérégule l'hématopoïèse et peut conduire à une anémie, une neutropénie (manque de polynucléaires) ou une thrombocytopénie. La classification de l'OMS a distingué quatre sous-

catégories pour les LAM. La première est définie par l'observation d'anomalies cytogénétiques (translocation, inversion du chromosome...) sous le nom de LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes. La deuxième, LAM avec dysplasie multi-lignée, est caractérisée par des cellules myéloïdes morphologiquement anormales, en dehors des blastes. La troisième, LAM dite secondaire à une chimiothérapie, s'identifie par des anomalies déjà connues et ayant reçu des chimiothérapies et/ou de la radiothérapie. La quatrième sous-catégorie a conservé la classification FAB et comprend 8 groupes (LAM0 à LAM7) selon le type et le degré de différenciation (granuleuse, monocytaire, érythroblastique ou mégacaryocytaire).

Les principales caractéristique des hémopathies myéloïdes sont récapitulées ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des hémopathies myéloïdes

Type d'hémopathie myéloïde	Fréquence ^a (%)	Nombre de blastes médullaires	Niveau de différenciation	Signes biologiques
SMC	12.1	-	Pas de blocage de différenciation	Accumulation médullaire et sanguine de cellules différenciées
SMD	7.3	< 20%	Maturation défectueuse	Accumulation médullaire et cytopénie sanguine
LAM	9.2	> 20%	Blocage complet de la différenciation	Accumulation médullaire et sanguine de cellules immatures

^aFréquence par rapport à l'ensemble des hémopathies malignes

1.2.2. Hémopathies lymphoïdes

Les hémopathies lymphoïdes sont des affections qui se développent à partir des précurseurs engagés dans le lignage lymphoïde (lignées lymphoblastiques B, T et NK). Elles sont classées en quatre grandes catégories : leucémie aigue lymphoblastique (LAL), hémopathies B matures (LBM), hémopathies T et NK matures et la maladie de Hodgkin. Les trois premières catégories sont distinguables par la lignée cellulaire affectée et la nature aigue ou chronique de la pathologie. La quatrième catégorie, bien qu'affectant la lignée lymphoïde B, est

considérée comme particulière, en raison de caractéristiques cliniques et histopathologiques spécifiques.

1.2.2.1. Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)

Les leucémies aiguës lymphoblastiques présentent 1.5% de l'ensemble des hémopathies malignes. Il s'agit de proliférations malignes clonales médullaires et extra-médullaires de cellules immatures de la lignée lymphoïde, dont la différenciation est bloquée au stade des lymphoblastes (Tableau 2). Le contingent de cellules sanguines normales s'en retrouve insuffisant, ce qui induit l'anémie, la neutropénie, la thrombopénie, et l'infiltration des lymphoblastes dans les tissus. Pour les classer, l'OMS s'appuie sur la distinction cellules lymphocytaires B-cellules lymphocytaires T (LAL-B ou LAL-T) et y associe, dans un second temps, les facteurs cytogénétiques. La nature de ces derniers est corrélée à la gravité des pronostics.

1.2.2.2. Les hémopathies lymphoïdes chroniques B matures (LBM)

Cette sous-catégorie est également connue sous l'appellation « lymphocytoses B monoclonales (LBM) ». Avec un pourcentage supérieur à 56%, elle représente l'hémopathie maligne la plus fréquente en Europe (Tableau 2). Elle est due à une prolifération maligne monoclonale de lymphocytes matures anormaux de la lignée B dans la moelle osseuse, le sang et les organes lymphoïdes. Cette surabondance de lymphocytes matures est appelée lymphocytose. Son origine est majoritairement attribuée à l'étape de maturation antigène-dépendante (cf. paragraphe 1.1); celle-ci nécessite en effet d'importants remaniements géniques, assujettis à des erreurs et pouvant aboutir à la prolifération d'un clone lymphoïde malin. Au vu de leur forte implication dans ces pathologies, les anomalies cytogénétiques ont une valeur pronostique importante et servent de système de sous-classification pour les LBM. Ainsi, plusieurs sous-types de cette hémopathie maligne sont caractérisés par des anomalies cytogénétiques spécifiques (Cf. paragraphe 1.3.2.) comme le lymphome diffus à grandes cellules B, le myélome multiple, le lymphome de Burkitt, le lymphome folliculaire et le lymphome du manteau (Cf. Tableau 3). En raison de caryotypes complexes, les autres sous-types se caractérisent plutôt par des spécificités cytologiques. C'est notamment le cas pour la leucémie prolymphocytaire B, le lymphome splénique à lymphocytes villeux ou la leucémie à tricholeucocytes.

1.2.2.3. Les hémopathies T/NK matures

Nettement plus rares que les hémopathies B matures (pourcentage de fréquence de 4%, Tableau 2) et se distinguant des LAL-T essentiellement par un envahissement médullaire inférieur à 20%, les hémopathies T/NK matures sont issues de proliférations de lymphocytes T matures post-thymiques. Etant donné le manque d'anomalies génétiques spécifiques, la sous-classification de ces pathologies s'appuie majoritairement sur des paramètres cliniques. Elles sont ainsi subdivisées en trois sous-groupes : formes leucémiques disséminées (ex : leucémie prolymphocytaire T, leucémie à lymphocytes à grains T), formes extraganglionnaires (ex : mycosis fungoïde, lymphome T intestinal) et formes ganglionnaires (ex : lymphome T ou anaplasique à grandes cellules).

1.2.2.4. Les lymphomes Hodgkiniens

Décrite pour la première fois par Thomas Hodgkin en 1832, cette pathologie se distingue par son profil histologique ; elle se présente sous forme d'un infiltrat polymorphe de nature réactionnelle. Ce dernier se caractérise par une minorité de cellules tumorales spécifiques appelées « cellules de Reed-Sternberg ou de Hodgkin » (Tableau 2). Ces cellules de Hodgkin sont d'origine lymphoïde, précisément de type B, d'où la classification de cette pathologie parmi les hémopathies lymphoïdes.

Les principales caractéristique des hémopathies lymphoïdes sont récapitulées ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2 : Caractéristiques des hémopathies lymphoïdes

Type d'hémopathie myéloïde	Fréquence ^a (%)	Niveau de différenciation	Signes biologiques
LAL	1.5	Blocage complet de la différenciation	Accumulation médullaire et extra-médullaire de blastes lymphoïdes de type B ou T.
LBM	56.6	Différenciation subissant des mutations géniques	Accumulation de lymphocytes matures B anormaux dans la moelle osseuse, le sang et les organes
Hémopathies T/NK matures	4	Pas de blocage de la différenciation	Accumulation de lymphocytes T matures post-thymiques
Lymphomes Hodgkiniens	6	-	Présence de cellules spécifiques dites « cellules de Reed-Sternberg ou de Hodgkin »

^aFréquence par rapport à l'ensemble des hémopathies malignes

1.3. Cytogénétique hémato-oncologique

En soulignant le caractère clonal (transmission d'anomalies à toutes les cellules issues d'une cellule initialement altérée) des hémopathies malignes, la classification OMS (Cf. paragraphe 1.2) témoigne de l'implication directe des remaniements chromosomiques dans ces processus tumoraux. Ce lien anomalie chromosomique-cancer a initialement été suggéré par Boveri *via* sa théorie : « le cancer serait une maladie génétique de la cellule »⁴. Il a ensuite été investigué *via* la cytogénétique : une discipline, née en 1956 avec le dénombrement des chromosomes humains et ayant bénéficié de techniques de plus en plus performantes :

Caryotype conventionnel : Analyse globale mais non résolutive du génome (résolution d'environ 5 à 10 millions de paires de bases) ; elle permet de détecter seulement les anomalies flagrantes de structure et de nombre.

Hybridation in situ en fluorescence (FISH) : Analyse ciblée et résolutive du génome (résolution d'environ 100-300 kb) ; elle donne accès seulement à des segments de chromosomes mais avec une bonne précision.

Hybridation génomique comparative sur puces à ADN (CGH-array) : Analyse globale et résolutive du génome (résolution inférieure à 150 kb) ; elle permet de détecter avec précision

les segments chromosomiques remaniés mais ne révèle que les anomalies de type perte ou gain.

1.3.1. Description des anomalies chromosomiques

Les progrès techniques dont a bénéficié la cytogénétique ont permis de mettre en évidence différents types d'anomalies chromosomiques :

Anomalies constitutionnelles et anomalies acquises : Les anomalies constitutionnelles sont présentes à la naissance (ex : trisomie 21, monosomie X), tandis que les anomalies acquises apparaissent après la naissance. Ces dernières sont très majoritairement observées dans les cellules tumorales dont 75% sont liées à des hémopathies malignes.

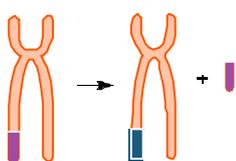
Anomalies de structure et anomalies de nombre : Les anomalies de structure surviennent suite à des cassures chromosomiques et « recollements » défectueux, tandis que les anomalies de nombre sont dues à un mauvais appariement ou une mauvaise séparation des chromosomes.

Anomalies équilibrées et anomalies déséquilibrées : On parle d'anomalies déséquilibrées si un excès ou un défaut au niveau du matériel génétique est enregistré. Si la quantité de matériel génétique n'est pas affectée, on parle d'anomalies équilibrées.

Anomalies homogènes et anomalies en mosaïque : Si l'anomalie est présente dans toutes les cellules examinées on parle d'anomalie homogène. Si elle est présente dans une fraction de cellules uniquement, on parle d'anomalie en mosaïque.

Nous détaillons, ci-dessous, uniquement les types d'anomalies chromosomiques impliquées dans les hémopathies malignes étudiées, à savoir la délétion, l'inversion et la translocation. Il s'agit d'anomalies de structure distinguables par le nombre de chromosomes impliqués. Ainsi, la délétion et l'inversion touchent un seul chromosome tandis que la translocation affecte deux chromosomes à la fois.

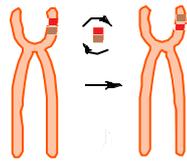
a) **La délétion (del)** : Il s'agit d'une ou de deux cassures survenant au niveau d'un même



chromosome et induisant la perte d'un segment. Il en existe deux types ; la délétion terminale qui se définit par la perte d'un segment terminal (distal), représentée ci-contre, et la délétion

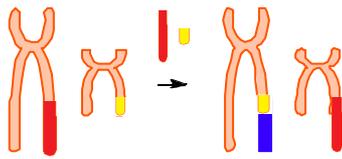
intercalaire due à deux cassures avec perte du segment intermédiaire.

b) L'inversion (inv) : Elle est due à deux cassures se produisant sur le même



chromosome avec recollement, après inversion, du segment intermédiaire. Il en existe deux types ; inversion para-centrique, représentée ci-contre, pour les cassures se produisant sur un même bras et inversion péri-centrique pour les cassures se produisant de part et d'autre du centromère.

c) La translocation réciproque (t) : Il s'agit d'un échange de segments chromosomiques



entre deux chromosomes non homologues ayant subi chacun une cassure. Nous pouvons citer l'exemple de la translocation observée dans le cas des LMC entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 : $t(9;22)(q34;q11)$.

1.3.2. Anomalies spécifiques dans les hémopathies malignes

Au-delà de cet aspect descriptif (*Cf.* paragraphe 1.3.1), les progrès de la cytogénétique ont montré que les anomalies chromosomiques étaient récurrentes et spécifiques. Ainsi, pour différentes pathologies, des altérations cytogénétiques caractéristiques ont été mises en évidence. Nous en donnons ci-dessous quelques exemples décrits pour les hémopathies malignes (Tableau 3). Remarquons qu'en raison de cette spécificité, les anomalies chromosomiques peuvent servir à établir le diagnostic/pronostic des cancers d'où leur utilisation par la classification de l'OMS (*Cf.* paragraphe 1.2).

Tableau 3 : Hémopathies malignes caractérisées par des anomalies hautement spécifiques

Pathologie	Anomalie chromosomique
SMC : Leucémie myéloïde chronique LMC	95% $t(9;22)(q34;q11)$ [chromosome Ph]
SMD : syndrome myélodysplasique	délétion 5q isolée
LBM : Leucémie lymphoïde chronique	$t(14;19)(q32;q13)$
LBM : Lymphome folliculaire	80-90% $t(14;18)(q32;q21)$
LBM : Lymphome de Burkitt	80% $t(8;14)(q24;q32)$
LBM : Lymphome du manteau	75% $t(11;14)(q13;q32)$
LBM : Immunocytome	50% $t(9;14)(q13;q32)$

LBM : Lymphome diffus à grandes cellules B	t(3;14)(q27;32) [+ autres anomalies].
Lymphome anaplasique à grandes cellules T	t(2;5) (p23;q35)

1.4. Thérapie ciblée

1.4.1. Mécanismes moléculaires dans les cellules cancéreuses

Au-delà de l'établissement du lien altération chromosomique-oncogénèse, les progrès de la biologie donnent accès aux conséquences génétiques de ces anomalies et aux mécanismes moléculaires qu'ils empruntent pour transformer des cellules saines en cellules tumorales. Les anomalies chromosomiques dérèglent en effet certaines fonctions cellulaires principales en activant des oncogènes ou en inactivant des gènes suppresseurs de tumeurs. Ces dérégulations confèrent à la cellule les trois éléments essentiels à sa transformation : la prolifération, la survie et la dissémination.^{5,6}

a) Prolifération

Pour induire la prolifération incontrôlée, plusieurs voies peuvent être amorcées par les oncogènes. On peut les subdiviser en deux catégories suivant la position des acteurs moléculaires affectés par rapport aux récepteurs transmembranaires : voies « en amont » et voies « en aval ». La voie amont s'appuie sur une dérégulation de la production des facteurs de croissances et de leurs récepteurs associés, tandis que la voie aval affecte les protéines de transduction du signal de prolifération et les facteurs de transcription⁷ (Figure 3).

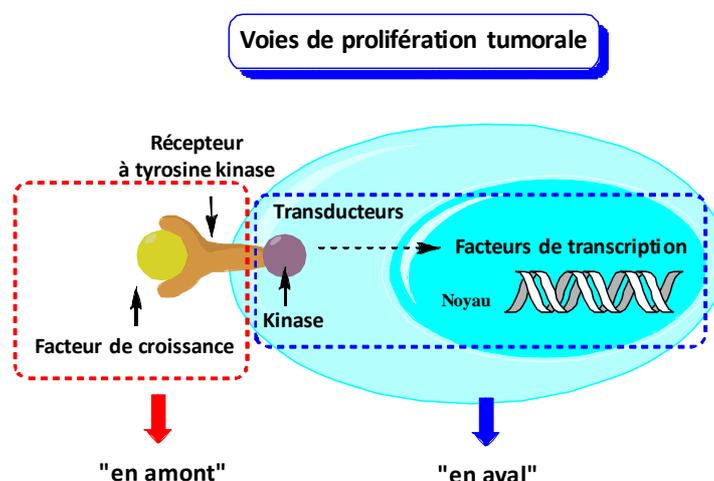


Figure 3 : Acteurs mobilisés par la prolifération tumorale

b) Survie

Pour assurer leur survie, les cellules tumorales peuvent présenter des altérations au niveau des gènes codant pour les protéines qui régulent l'apoptose. On peut citer, notamment, la surexpression des gènes Bcl-2 codant pour des protéines anti-apoptotiques. La survie peut également être assurée par l'altération de certains gènes suppresseurs de tumeurs spécialisés dans le processus apoptotique ⁷.

c) Invasions métastatiques

Les gènes à l'origine des propriétés métastatiques et invasives sont moins bien connus que ceux de la prolifération. Nous pouvons néanmoins associer les invasions métastatiques à l'altération des facteurs de croissance angiogènes responsables de la vascularisation de la tumeur : angiogénine, VEGF... Nous pouvons également noter la surexpression de certaines protéines impliquées dans les métastases et l'angiogenèse : les collagènes, les plasmines, les intégrines, etc. ⁷

1.4.2. Nouvelle approche thérapeutique

L'identification des acteurs moléculaires impliqués dans le processus tumoral a été révolutionnaire pour la prise en charge thérapeutique. Elle a donné naissance à une approche innovante qui consiste à développer des agents dirigés spécifiquement vers ces acteurs : on parle de thérapie ciblée. Dans ce contexte, deux nouvelles familles d'agents thérapeutiques ont émergé : les anticorps monoclonaux et les molécules de faible poids moléculaire inhibitrices des protéines kinases. Les anticorps synthétiques bloquent la liaison récepteur-ligand en ciblant soit le ligand soit le récepteur (voie « en amont »), tandis que les inhibiteurs de kinases bloquent la transduction intracellulaire du signal (voie « en aval »). Le premier anticorps monoclonal et le premier inhibiteur de tyrosine-kinase ont été approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) respectivement, en 1998 et 2001. Le premier, le Trastuzumab (Herceptin), cible le récepteur transmembranaire HER-2 associé à l'oncogène portant le même nom et impliqué dans le cancer du sein. Le deuxième, l'imatinib (Gleevec), vise une protéine chimérique à activité tyrosine-kinase provenant d'un gène de fusion bcr-abl spécifiquement lié à la leucémie myéloïde chronique.

1.5. L'imatinib, premier inhibiteur de tyrosine-kinase

Etant donné que nous nous intéressons dans le cadre de cette thèse aux hémopathies malignes, nous détaillons ci dessous le développement de l'imatinib (IM).

1.5.1. La tyrosine-kinase BCR-ABL, cible de choix

Des études cytogénétiques s'étalant sur trois décennies ont permis de mettre en évidence, la présence déterminante de la tyrosine-kinase BCR-ABL dans le processus oncologique de la leucémie myéloïde chronique :

-**1960** : Nowell et Hungerford mettent en évidence une anomalie chromosomique portée par le chromosome 22 appelé « chromosome Philadelphie »⁸.

-**1973** : Rowley identifie la nature de cette anomalie : une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 notée t(9;22)(q34;q11)⁹.

-**1983** : Bartman et Groffen découvrent que cette translocation juxtapose sur le chromosome 22, deux gènes ; *bcr* (*breakpoint cluster region*) et *abl* (gène tronqué Abelson) situés respectivement sur les bras longs des chromosomes 22 (22q11) et 9 (9q34). Cette juxtaposition donne le gène de fusion *bcr-abl*^{10,11}.

-**1990** : Lugo montre que cet oncogène de fusion est traduit en protéine chimérique à activité tyrosine-kinase constitutive impliquée dans le processus prolifératif de la leucémie myéloïde chronique¹².

-**1990** : Daley réussit à induire chez la souris une pathologie très proche de la leucémie myéloïde chronique en lui greffant un rétrovirus contenant le gène *bcr-abl*. Ils confirment ainsi le lien causal entre le gène de fusion et le développement de la LMC¹³.

L'importance de la protéine chimérique p210 BCR-ABL, dans le processus tumoral, a incité les chercheurs à étudier de plus près ses effets. Ils ont montré notamment qu'elle était associée à une inhibition de l'apoptose, une activation de la multiplication cellulaire et une atténuation de l'adhérence des cellules leucémiques au stroma médullaire¹⁴. Les investigations autour des voies de signalisation cellulaire empruntées par BCR-ABL ont été nombreuses (et continuent à l'être)¹⁵. Il en découle des associations complexes entre les substrats de cette onco-protéine. Nous pouvons les classer suivant l'effet engendré^{16,14,17} :

- ✓ Ras/Raf-1/MEK-1,2/MAPK : Activation de facteurs de transcription
- ✓ JAK2/STAT5 : Prolifération et survie cellulaire ¹⁸
- ✓ PI3K/Akt/mTOR : Prolifération cellulaire
- ✓ PI3K/Akt/Bad/Bcl-X : Inhibition de l'apoptose
- ✓ protéines du cytosquelette : Altération de l'adhésion cellulaire

Ceci est récapitulé de façon simplifiée ci-dessous (Figure 4).

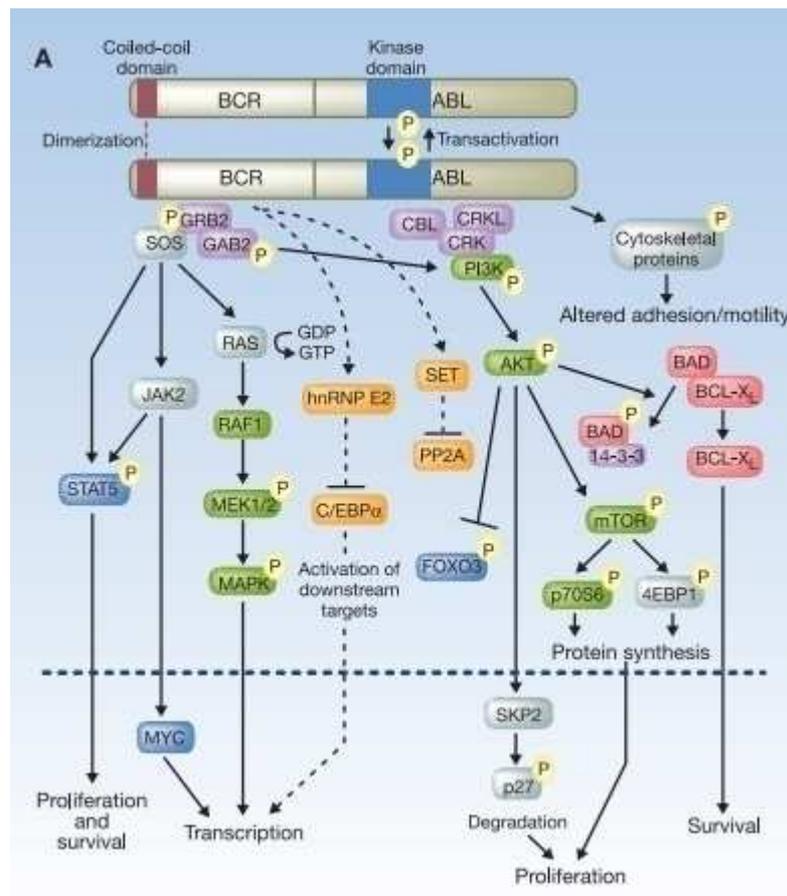


Figure 4 : Version simplifiée des voies de signalisation cellulaire empruntées par BCR-ABL ¹⁶

1.5.2. L'imatinib et ses résistances

Des chercheurs ont tiré avantage de la découverte de la tyrosine-kinase BCR-ABL en expérimentant la thérapie ciblée ¹⁹. En partant d'un screening *in vitro* sur la protéine kinase C puis sur des tyrosine-kinases et moyennant une étude structure-activité, l'IM (Figure 5) a été sélectionné pour un développement clinique car hautement actif et sélectif de BCR-ABL ^{20,21}.

Son mode d'action a été investigué par des études de modélisation moléculaire ²² et de cristallographie en rayons X ^{23,20} montrant qu'il se lie à la protéine BCR-ABL *via* le site qui est normalement dédié à l'adénosine triphosphate (ATP). Cette liaison provoque un changement conformationnel qui empêche la kinase d'accueillir l'ATP (son substrat naturel) et donc de phosphoryler les protéines substrats. Par conséquent, la transduction du signal de prolifération est interrompue. Le mode d'action a été détaillé davantage en analysant l'impact de l'IM sur les voies de signalisation de BCR-ABL. Il a notamment été montré que l'IM inhibe STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*), freine la résistance à l'apoptose provoquée par l'activation excessive de Bcl-X et diminue la phosphorylation de la protéine adaptatrice CRKL.

Suite à son approbation par la FDA en 2001, l'IM a été mis sur le marché sous la marque déposée Gleevec®. L'étude IRIS (*International Randomized study of Interferon versus STI-571*) ²⁴ s'est chargée d'évaluer ce nouveau traitement *via* un suivi de patients s'étalant sur 8 ans. Elle a enregistré 81% de survie sans évolution particulière et 92% de non progression vers les phases accélérée ou blastique. Le taux de survie global s'élève à 85% après 8 ans et 93% si on considère uniquement les décès directement lié à la LMC et précédant une greffe de cellules souches ²⁵.

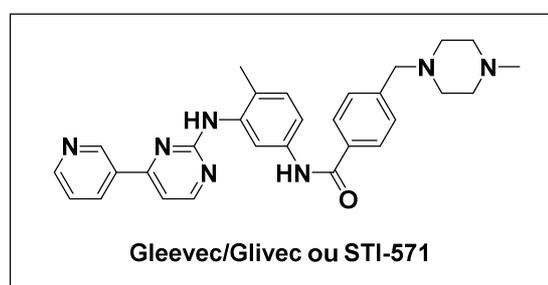


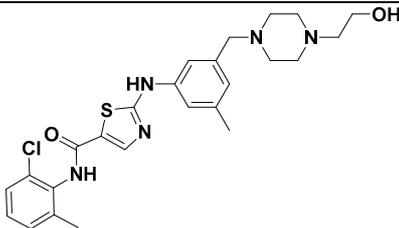
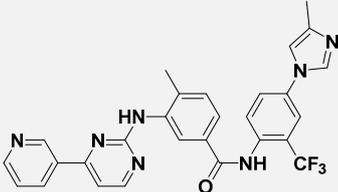
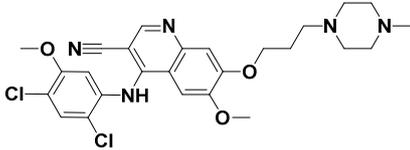
Figure 5 : Structure de l'imatinib

Malheureusement, malgré ces bons résultats, plusieurs types de résistance se sont développés particulièrement pour les patients en phase blastique avec 70% de rechute et ce en 3 à 6 mois de traitement. Parmi ces résistances, on peut citer : une amplification du gène BCR-ABL, une trentaine de mutations au niveau du domaine kinase de BCR-ABL avec une prévalence de la mutation T315I et un efflux dû à l'affinité du Gleevec pour la Glycoprotéine-P.

Pour contourner ces résistances, d'autres molécules ont été développées suivant cette nouvelle approche de thérapie ciblée. Parmi ces nouveaux composés actifs, nous pouvons citer le dasatinib, le nilotinib et le bosutinib (Tableau 4). Ces derniers sont des inhibiteurs de tyrosine

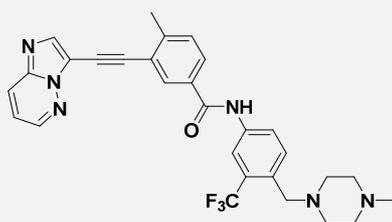
kinase (ITK) dits de seconde génération ²⁶. Ils sont respectivement 325, 30 et 50 plus actifs que l'IM (Tableau 4). Un quatrième exemple est exposé : le ponatinib. Ce dernier est dit de troisième génération. Il est particulièrement efficace car actif contre la majorité des mutations pouvant survenir au niveau de l'enzyme BCR-ABL, y compris la mutation dominante T315I (Tableau 4). Pour cette raison, il est qualifié d'ITK pan-BCR-ABL ²⁶.

Tableau 4 : Composés développés pour contourner les résistances à l'imatinib

Composé actif	Structure	Principales caractéristiques
<p>Dasatinib</p> <p>Approuvé en décembre 2006 en Europe</p>	 <p>Sprycel® ou BMS-354825</p>	<p>325 fois plus actif que l'IM.</p> <p>Induit une réponse cytogénétique majeure pour 40% des patients en phase chronique et résistants à l'IM.</p> <p>Problème de sélectivité : actif contre plus de 50 kinases.</p>
<p>Nilotinib</p> <p>Approuvé en novembre 2007 en Europe</p>	 <p>Tasigna® ou AMN107</p>	<p>30 fois plus actif que l'IM.</p> <p>Induit une réponse cytogénétique majeure pour 59% des patients en phase chronique et résistants à l'IM.</p> <p>Plus sélectif que l'IM et le dasatinib.</p>
<p>Bosutinib</p> <p>Approuvé en février 2014 en Europe</p>	 <p>Bosulif® ou SKI-606</p>	<p>50 fois plus actif contre ABL.</p> <p>Inactif contre c-KIT et PGDFR donc plus sélectif.</p> <p>Inactif contre la mutation T315I.</p>

Ponatinib

Approuvé en
juillet 2013 en
Europe



Le seul à être actif contre la mutation dominante T315I du domaine kinase BCR-ABL.

Iclusig® ou AP24534

Nos collaborateurs (équipe du Dr. P. Auberger, C3M, Nice) se sont aussi intéressés à ce phénomène de résistance et ont identifié une solution potentielle à cette problématique *via* l'acadsine (ACA) (Figure 6) : composé endogène connu pour son activité contre la leucémie chronique lymphocytaire à cellules B ²⁷. En étudiant l'activité de cette molécule, ils ont en effet montré qu'elle avait un effet antiprolifératif contre les cellules de LMC résistantes à l'IM, y compris celles qui présentent la mutation T315I ²⁸. De plus, ils ont mis en évidence l'originalité de son mode d'action qui induit une mort cellulaire autophagique (Chapitre 3, paragraphe 1.1), à la différence de l'IM qui induit une mort apoptotique. En dépit de ces propriétés attrayantes, l'activité de l'ACA s'est malheureusement montrée bien trop faible : CI₅₀ de l'ordre du milli-molaire. Dans le cadre de cette thèse, nous nous proposons de synthétiser deux grandes familles d'analogues de l'ACA dans le but d'optimiser son activité contre la leucémie myéloïde chronique mais aussi contre d'autres hémopathies malignes, notamment le syndrome myélodysplasique. Nous ambitionnons également de conserver le mode d'action présenté par l'ACA.

Dans le cadre de la synthèse de nos deux séries d'analogues, nous avons choisi de remplacer le noyau imidazole trisubstitué de l'ACA (AICAR) par un noyau 1,2,3-triazole trisubstitué (Figure 6). La chimie des 1,2,3-triazoles est en effet plus accessible et plus modulaire. De plus, notre équipe a développé deux méthodologies donnant un accès simple et rapide aux 1,2,3-triazoles trisubstitués. Cette option synthétique devrait permettre de tester une grande variété de fonctionnalités au niveau des trois positions 1, 4 et 5 du triazole et conduire ainsi à une étude détaillée de la relation structure-activité.

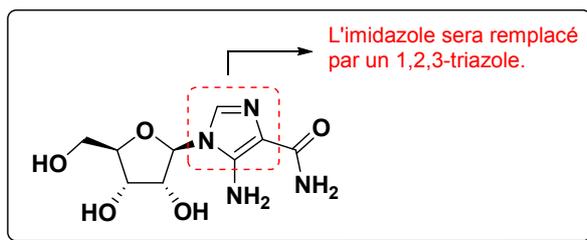


Figure 6 : Structure de l'ACA (AICAR, aminoimidazole-carboxamide-ribosyl)

La chimie des 1,2,3-triazoles étant au centre de ces travaux de recherche, le chapitre suivant comportera une synthèse bibliographique autour des méthodologies donnant accès à ces unités ainsi que leurs mécanismes réactionnels. Il inclura également une nouvelle méthode de synthèse, développée au cours de cette thèse et donnant accès aux 5-alcynyl-1,2,3-triazoles.

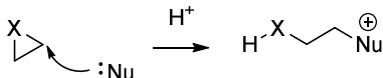
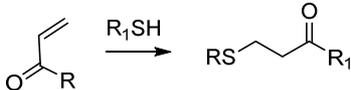
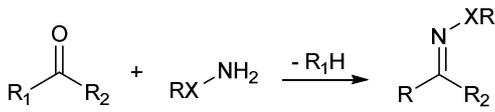
2. Chapitre 2

La chimie des 1,2,3-triazoles

2.1. La cycloaddition 1,3-dipolaire

En 2001, Sharpless a conceptualisé une chimie qu'il a qualifiée de « clic ». Elle désigne des réactions devant remplir certains critères dont l'obtention d'un très bon rendement, l'utilisation d'un solvant bénin tel que l'eau, la tolérance vis-à-vis d'un grand nombre de fonctionnalités, l'absence de sous produits ou une élimination facile -non chromatographique- de ces derniers, des conditions réactionnelles douces et une applicabilité à petite comme à grande échelle ²⁹. Bien qu'il soit difficile de satisfaire cette liste d'exigences, un nombre non négligeable de réactions clic a émergé. On peut ainsi citer les ouvertures de cycles (époxydes, aziridines...) par attaque nucléophile, les réactions avec carbonyles de type non aldol (formation d'urées, oximes, hydrazones) et les additions sur liaisons insaturées C-C telles que les additions de Michael (Tableau 5). Parmi ces réactions clic, on compte aussi les réactions de cycloaddition ³⁰ telles que la cycloaddition de Diels-Alder [4+2] et la cycloaddition 1,3-dipolaire [2+3]. Cette dernière sera détaillée dans ce qui suit ³¹.

Tableau 5 : Exemples de réactions clics

Ouverture d'époxydes ou d'aziridines par addition nucléophile :	
Addition sur liaisons insaturées C-C (additions de thio-Michael) :	
Réactions avec carbonyles de type non aldol (formation d'urées, oximes, hydrazones) :	

X = O, NR, etc.

2.1.1. Cycloaddition de Huisgen

En 1963, Huisgen a mis au point une fusion thermique entre les dipôles-1,3 (azoture, oxyde de nitrile, diazoalcane) et les dipolarophiles (alcène, alcyne, carbonyle, nitrile) donnant directement accès à divers hétérocycles à cinq chaînons (Figure 7) ³².

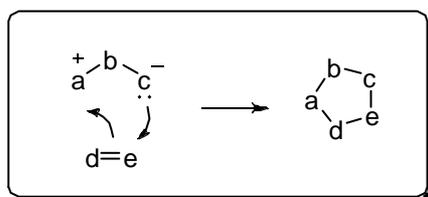


Figure 7 : Cycloaddition 1,3-dipolaire

La cycloaddition [2+3] qui a suscité le plus d'intérêt est celle qui fait la connexion entre un alcyne et un azoture conduisant aux 1,2,3-triazoles. Dans le cas où l'alcyne est dissymétrique (ex : alcyne terminal), la réaction donne un mélange de deux régioisomères : 1,2,3-triazole-1,4/1,5-disubstitués (Figure 8). Ceci est dû à la haute température requise et à la similarité énergétique des orbitales HOMO et LUMO pour chacun des deux substrats (alcyne et triazole).

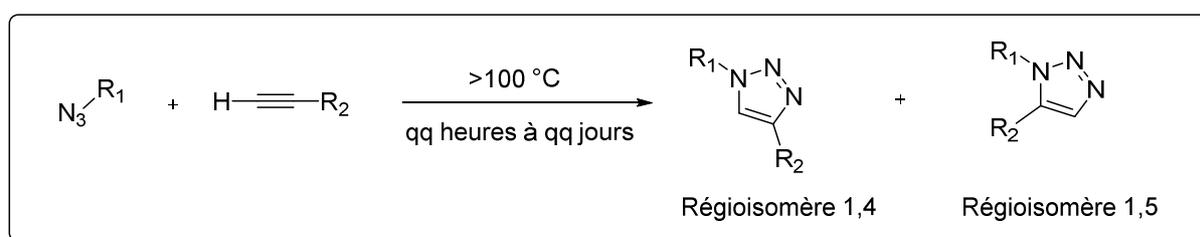


Figure 8 : Mélange des isomères 1,2,3-triazoles-1,4/1,5-disubstitués

Malgré l'attrait synthétique que présente cette réaction, pendant des décennies, il ne lui a pas été porté l'intérêt escompté notamment pour des raisons de sécurité qualifiées par Sharpless d'« *azidophobie* » (l'azoture ayant un caractère inflammable/explosif). Il a ainsi fallu attendre la mise au point de conditions plus douces pour que cette transformation connût le succès.

2.1.2. Cycloaddition catalysée au cuivre (CuAAC)

Des travaux réalisés séparément par Meldal³³ et Sharpless³⁴ ont montré que cette formation de triazoles pouvait s'affranchir de la haute température appliquée par la méthodologie de Huisgen. Comme les conditions réactionnelles de Meldal incluent un support solide et que nous nous intéressons dans le cadre de ce travail aux réactions en milieu homogène, nous allons nous focaliser sur la proposition de Sharpless. Cette dernière s'appuie sur une catalyse au Cuivre (I) qui accélère la cinétique réactionnelle 10^7 fois par rapport aux conditions de Huisgen³⁵, élimine la nécessité de chauffer et donne accès au régioisomère 1,4-disubstitué-

1,2,3-triazole de façon exclusive (Figure 9). En revanche, cette cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC) n'est applicable qu'à des alcynes vrais. Ceci est expliqué par le mécanisme de la réaction (*cf.* paragraphe 2.2.1). L'éco-compatibilité du solvant, l'absence de sous-produits, la tolérance d'un grand nombre de fonctionnalités (l'azoture et l'alcyne peuvent tous deux présenter une variété de propriétés stériques et électroniques sans que cela n'affecte le fonctionnement de la réaction), la régiosélectivité et les rendements élevés confèrent à la CuAAC la qualité de réaction clic par excellence.

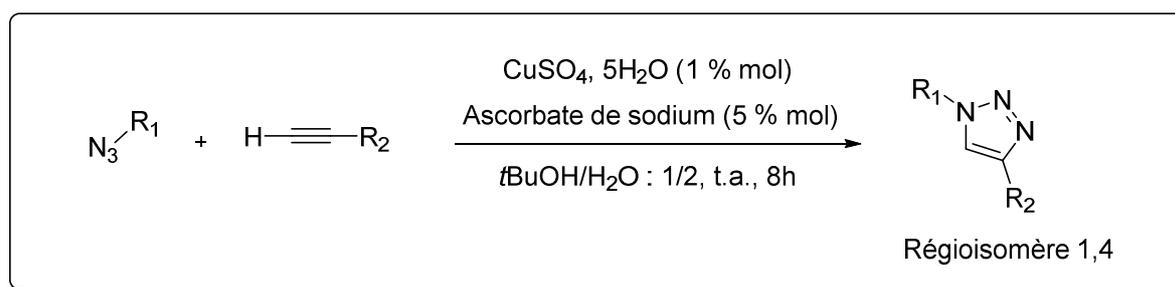


Figure 9 : Cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne et un azoture catalysée au Cuivre CuAAC

2.2. Description détaillée de la CuAAC

2.2.1. Etude mécanistique

Le cuivre est un métal de transition doté de propriétés uniques tels que des potentiels rédox bas : 0.159 V pour $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ et 0.520 V pour Cu^+/Cu^0 , un effet de « rétro-donation » faible, une tendance à former des agrégats polynucléaires, un échange rapide au sein de sa sphère de coordination et une possibilité de réaliser à la fois des liaisons σ et π ³⁶. Ceci lui confère une réactivité lui permettant de catalyser des réactions impossibles à conduire avec les autres métaux de transition Ag(I), Pd(0/II), Pt(II), Au(I/III), Hg(II). C'est notamment valable pour la cycloaddition d'alcyne terminal et d'azoture donnant accès aux 1,2,3-triazole-1,4-disubstitués³⁶. Cependant, ces mêmes propriétés induisent, dans le milieu réactionnel, un équilibre dynamique entre plusieurs espèces réactives dont l'identité et la nucléarité sont difficiles à identifier. Pour cette raison, le mécanisme de la CuAAC a été particulièrement difficile à élucider. Dans ce contexte, plusieurs études mécanistiques (étude computationnelle, étude cinétique, caractérisation d'intermédiaires réactionnels, enrichissement isotopique) ont été réalisées.

a) **Première proposition mécanistique :**

Des calculs de DFT (théorie des fonctionnelles de la densité) ont permis d'élaborer une première approche mécanistique. La mesure des barrières énergétiques indique que, contrairement à la cycloaddition 1,3-dipolaire thermique qui est concertée, la CuAAC se déroule pas à pas³⁵. Pour décrire ce mécanisme, nous prenons comme exemples l'alcyne **A** et l'azoture **B** (Figures 10 et 11). La première étape consiste à échanger un ligand de type « L » dans la sphère de coordination du Cu^I et à complexer l'alcyne **A** ; complexe **I** (Figure 10). Ceci diminue le pKa du proton acétylénique de 10 unités facilitant la déprotonation et la formation de l'acétylure de Cuivre **II**. La nécessité de déprotoner l'alcyne pour former la liaison σ C-Cu explique l'utilisation exclusive d'alcynes terminaux.

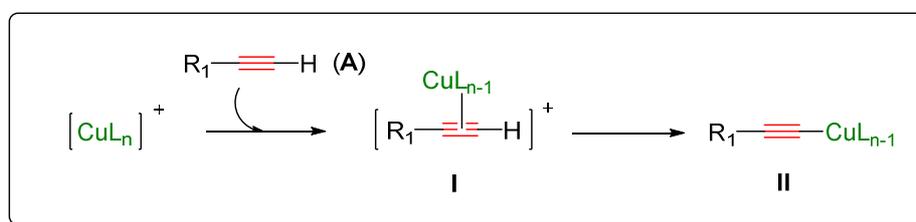


Figure 10 : Formation de l'acétylure de cuivre

L'étape suivante se présente comme un deuxième échange dans la sphère de coordination du cuivre conduisant à une coordination avec l'azoture **B**, (**III**, Figure 11). Cette coordination induit une activation nucléophile au niveau de l'alcyne et une activation électrophile au niveau de l'azoture, de façon concomitante. Ceci conduit à la formation de la première liaison C-N avec l'atome d'azote, ce qui génère le métallacycle à six chaînons **IV** caractérisé par une haute contrainte stérique et un degré d'oxydation de III pour le cuivre. Le relâchement de cette tension cyclique est énergétiquement favorable. Il conduit au Cu^I-triazolyle **V**, un intermédiaire clé qui a pu être isolé dans le cas d'azotures organiques présentant un encombrement stérique³⁷. Le produit désiré est enfin obtenu par proto-décupration. L'atome de cuivre, étant sous l'état d'oxydation (I), est à nouveau engagé dans la même suite réactionnelle ce qui fournit un cycle catalytique (Figure 11).

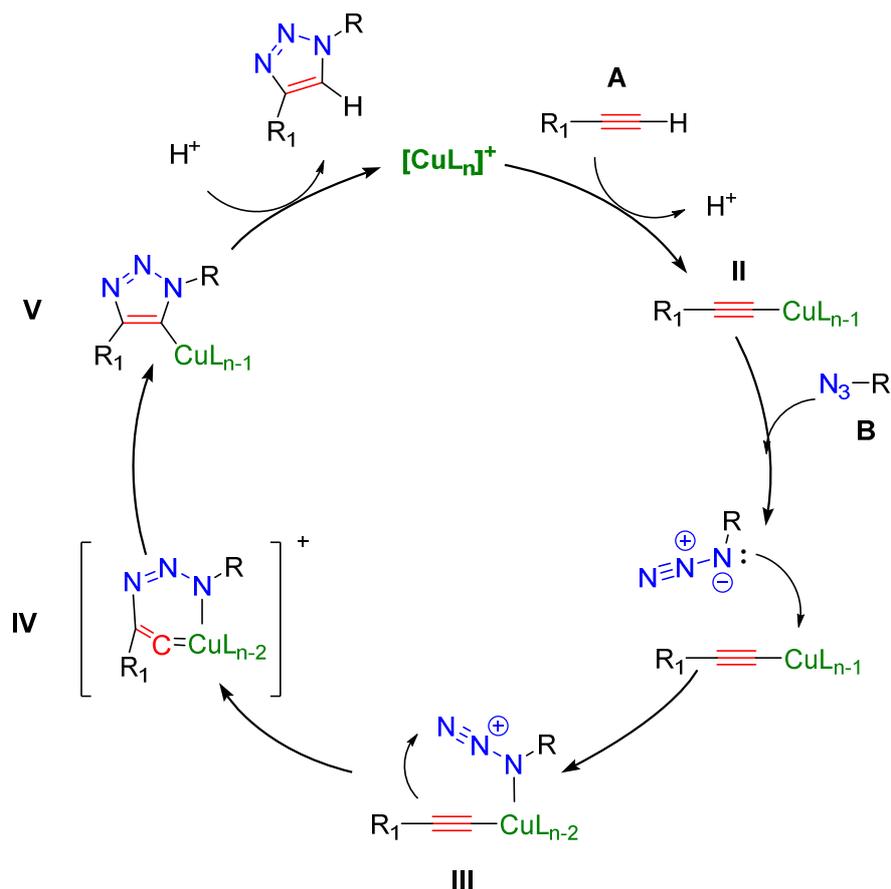


Figure 11 : Premier cycle catalytique proposé pour la CuAAC

b) Proposition mécanistique revisitée :

La première approche mécanistique a été revisitée à travers des études cinétiques montrant une dépendance de second-ordre par rapport à la concentration du catalyseur³⁸, ce qui suggérait, en dépit de la non homogénéité du profil cinétique, la présence d'un acétylure de cuivre di-nucléaire. Cette proposition a été confortée par de nouveaux calculs DFT qui ont mis en évidence une baisse de l'énergie d'activation en faisant intervenir un deuxième noyau cuivreux^{39,40}. Par ailleurs, des investigations autour de complexes acétylures de cuivre polynucléaires (et en particulier tétra-nucléaires) ont montré que ces derniers étaient moins favorables que les bi-nucléaires⁴⁰. Pour appuyer ces résultats, des expériences ont été réalisées par le groupe de Fokin en 2013⁴¹. L'une d'elles consistait à mettre en présence un acétylure de cuivre stable préalablement préparé et une quantité stœchiométrique d'azoture en y additionnant ou non un catalyseur cuivreux supplémentaire. Dans le premier cas, une conversion totale a été observée, tandis que dans le deuxième la réaction n'a pas eu lieu.

L'ensemble de ces éléments met en évidence l'implication de deux noyaux cuivreux dans le mécanisme réactionnel de la CuAAC (Figure 12).

Dans cette mise à jour mécanistique, le premier catalyseur forme l'acétylure (**I**, Figure 10) *via* une liaison σ . En s'associant à l'acétylure de cuivre par une liaison π , le deuxième noyau cuivreux stabilise le premier par effet donneur (**II**, Figure 12). Après la formation de la liaison C-N (**III**), la charge négative de l'atome d'azote 3 est stabilisée par les deux noyaux cuivreux qui, à ce stade, peuvent s'échanger entre eux (**IV**). S'ensuit la formation de la deuxième liaison C-N générant le Cu-triazolyle **V**. Enfin, par proto-décupration, le produit désiré est obtenu accompagné du complexe cuivreux. Ce dernier est alors réinjecté dans le cycle catalytique représenté ci-dessous (Figure 12).

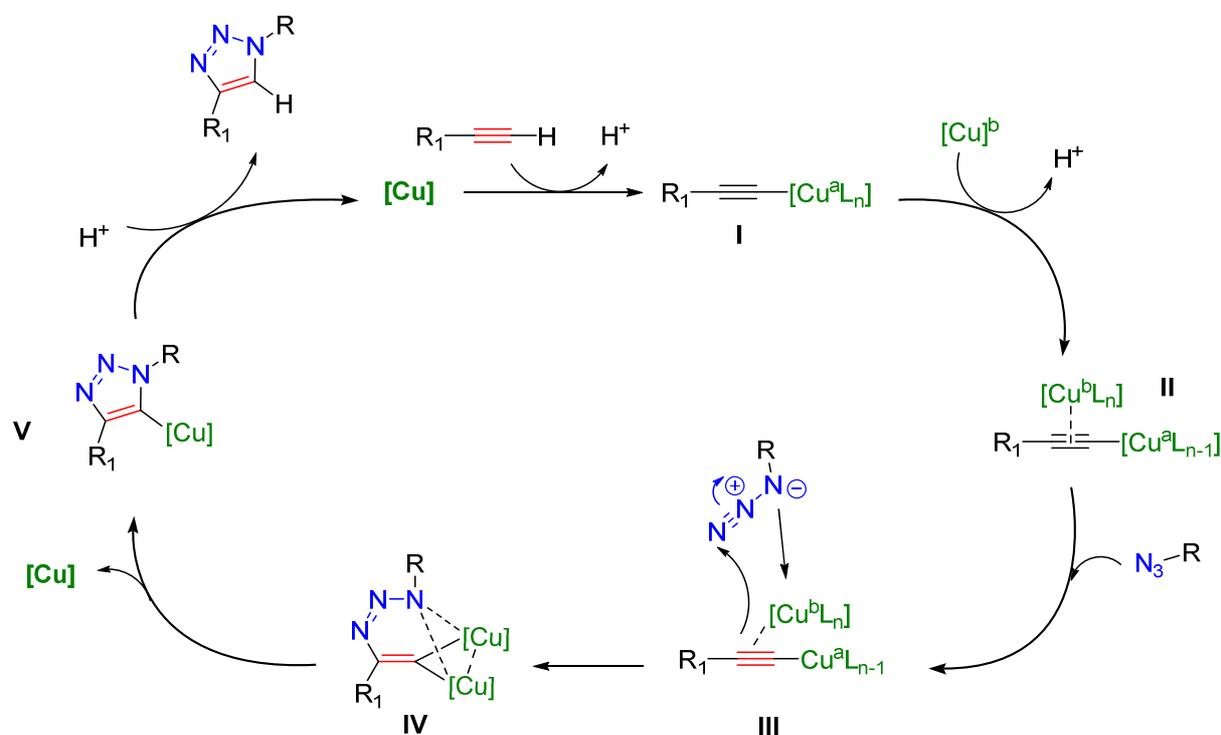


Figure 12 : Nouveau cycle catalytique de la CuAAC

2.2.2. Le couple catalytique Cu^I-Ligand

Les potentiels redox du Cuivre [0.159 V pour Cu²⁺/Cu⁺ et 0.520 V pour Cu⁺/Cu⁰] témoignent de l'instabilité thermodynamique du Cu^I qui peut facilement s'oxyder en Cu^{II} ou se dismuter en Cu⁰ et Cu^{II}. Par conséquent, son utilisation requiert des conditions inertes. Pour s'affranchir de cette contrainte, la CuAAC s'appuie sur la réduction *in situ* du Cu^{II} en Cu^I grâce à l'action de l'ascorbate de sodium. Bien que cette méthode soit efficace, elle a montré certaines limitations. Sur un plan synthétique, le système Cu^{II}/ascorbate échoue à catalyser la formation des 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués pour certains substrats tels que les azotures fluoro-alkyles⁴². Sur un plan applicatif, le système Cu^{II}-ascorbate s'est révélé inefficace dans le cadre de la bio-conjugaison pour trois raisons. La première est en rapport avec l'aérobie des milieux biologiques : comme dans ces conditions le Cu^I généré s'oxyde rapidement, une plus grande quantité de Cu^{II} et d'agent réducteur est nécessaire. Or, les sels réducteurs tels que l'ascorbate de sodium peuvent interagir avec les protéines chaînes induisant des altérations au niveau de la structure de l'ADN⁴³. La deuxième raison est d'ordre cinétique : la CuAAC catalysée par le système de Sharpless n'est pas compatible avec la cinétique requise pour la conjugaison en milieu biologique. Enfin, la troisième raison est en rapport avec la toxicité du cuivre en milieu cellulaire⁴⁴. Pour circonvenir ces limitations, des travaux se sont inspirés de l'activité catalytique des métallo-enzymes qui font intervenir le Cu^I en lui fournissant un environnement de coordination adapté^{45,46,47}. Pour mimer cette enveloppe de protection, il a été proposé l'utilisation de ligands pouvant :

- Stabiliser l'état d'oxydation + I pour éviter l'oxydation et la dis-mutation.
- Protéger la sphère de coordination du cuivre pour éviter la formation de complexes polynucléaires (agrégats) inactifs tout en permettant à l'azoture d'y accéder.
- Offrir une bonne densité électronique au cuivre pour une meilleure réactivité sans perturber son état d'oxydation.

Grâce à son caractère acide de Lewis intermédiaire mou-dur à légèrement mou, le cuivre est potentiellement compatible avec différents types de ligands. Ainsi, un large panel de ligands a été investigué. Cependant, ces travaux ont été réalisés dans des conditions réactionnelles très différentes les unes des autres, ce qui a compliqué la comparaison des résultats obtenus. On peut, néanmoins, définir deux classes de ligands en se basant sur leur caractère donneur.

a) **Ligands mous** :

Cette classe inclut une variété de ligands tels que les phosphines, nitriles, guanidines, imines, thiols, halogènes. Elle est subdivisée en deux sous-classes. La première est caractérisée par une labilité prononcée et donc une protection marginale de la sphère de coordination du Cuivre (ex : halogène). La deuxième se distingue par une liaison forte avec le Cuivre, ce qui inhibe l'activité de ce dernier (ex : nitrile⁴⁸). Dans les deux cas, ces ligands ne sont pas assez favorables à la réaction.

b) **Ligands durs** :

Cette classe est dominée par les amines qui sont largement utilisées en raison de leur double fonction base-ligand. Le caractère basique aide à la déprotonation (surtout dans les solvants organiques) tandis que son potentiel chélateur prévient la formation d'agrégats, facilite la coordination de l'azote au cuivre et favorise la solubilité du complexe. On peut citer plusieurs exemples d'amines tertiaires fréquemment utilisées telles que la triéthylamine, la *N,N*-diisopropyléthylamine, la 2,6-lutidine, etc. La TBTA (tris(benzyltriazolyl)méthylamine) (Figure 13)⁴⁶ est particulièrement intéressante pour des applications de bio-conjugaison⁴⁹. Son efficacité est attribuée à son caractère à la fois mou (faible potentiel de liaison de ses « bras ») et dur (effet donneur de l'atome d'azote central).

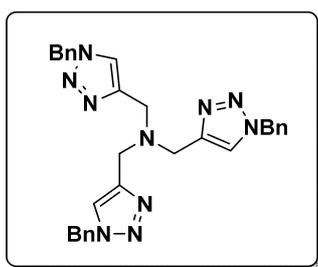


Figure 13 : Structure de TBTA

2.3. Formation de 1,2,3-triazoles-1,4,5-trisubstitués

En catalysant les réactions CuAAC par un couple Cu^I-ligand dans des solvants organiques non désaerés, plusieurs types de produits secondaires portant un noyau 1,2,3-triazole ont été observés (Figure 14) : le 5-hydroxy-1,2,3-triazole (**a**), le 5-alcynyl-1,2,3-triazole (**b**) et le bis-1,2,3-triazole (**c**)³⁶. Un quatrième sous-produit a été répertorié dans le cas particulier où le

catalyseur utilisé est l'iodure de cuivre. Il s'agit du 5-iodo-1,4-disubstitué-1,2,3-triazole (**d**)^{50,51} (Figure 14).

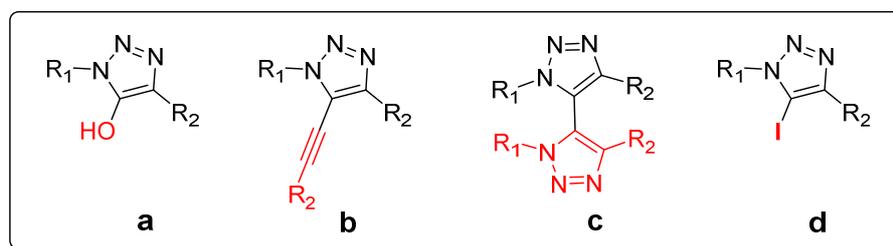


Figure 14 : Produits secondaires des CuAAC

La possibilité d'accéder aux 1,2,3-triazoles trisubstitués en une seule étape à partir de l'azoture a inspiré différents groupes. Ainsi, de nombreux travaux ont été réalisés pour transformer ces produits minoritaires en produits majoritaires.

Nous allons ici nous intéresser particulièrement aux méthodologies de synthèse donnant accès aux produits **b** et **d** car les analogues de l'ACA que nous décrirons dans les chapitres 3 et 4 feront appel à ces voies de synthèse.

2.3.1. 5-iodo-1,2,3-triazole (**d**) :

2.3.1.1. Méthodologies de synthèse

En s'appuyant sur le mécanisme de la CuAAC, il a été suggéré que le 5-iodo-1,2,3-triazole provenait du piégeage de l'intermédiaire réactionnel Cu-triazolyle dont le carbone en position 5 possède un caractère nucléophile (Figure 15)⁵². Ce piégeage pouvant théoriquement être étendu à divers électrophiles, de nombreux travaux ont été réalisés pour fonctionnaliser la position 5 non seulement par un I^+ mais par différents groupements déficients en électrons.

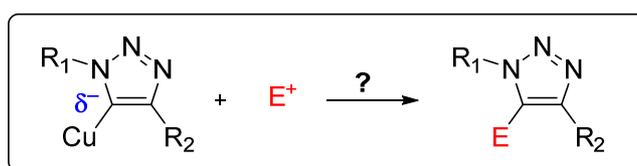


Figure 15 : Piégeage électrophile du carbanion en position 5⁵²

En 2005, Wu et ses collaborateurs ont publié une méthodologie pionnière fonctionnalisant la position 5 par différents électrophiles : I^+ , allyl $^+$, PhC(O) $^+$, CH₃C(O) $^+$ (Figure 16). Le système décrit pour cette transformation fait appel au couple CuI/NEt₃ en présence de réactifs électrophiles de type RX (ICl, allyl-Br, PhC(O)Cl, CH₃C(O)Cl)⁵². En dépit de son innovation, ce travail présente trois inconvénients majeurs : la faiblesse des rendements, la nécessité d'employer une quantité stœchiométrique de cuivre et l'utilisation du composé, particulièrement toxique ICl pour l'iodation. Ceci a incité différents groupes à rechercher des méthodologies alternatives.

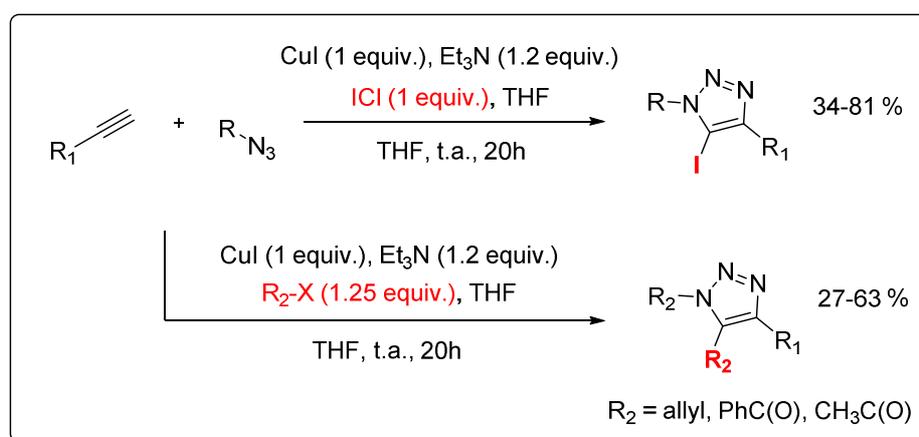


Figure 16 : Méthodologies de Wu

Ainsi, plusieurs systèmes ont été développés ; en 2008, le groupe de Zhang a mis au point une méthode faisant appel à l'iodure de cuivre en présence de NBS (*N*-bromosuccinimide) et de DIPEA (*N,N*-diisopropyléthylamine)⁵³. Deux ans plus tard, l'équipe de Dzyuba a proposé le couple CuI-DMAP (4-diméthylaminopyridine)⁵⁴ et en 2012, le groupe de Zhu a décrit un système générant le Cu^I *in situ* : à partir de Cu(ClO₄)₂.6H₂O/NaI/DBU (DBU : 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène)^{55,56} (Figure 17, voie **a**). Bien qu'efficaces, ces méthodologies sont fonctionnelles uniquement pour l'iodation, exceptée la méthodologie de Wu qui permet l'introduction de fonctions allyles et acyles mais malheureusement avec un faible rendement. En 2009, notre groupe s'est intéressé à ce problème et a mis au point des conditions réactionnelles permettant la fonctionnalisation de la position 5 avec une plus grande variété d'électrophiles (Cl $^+$, Br $^+$, I $^+$, 4-Me-C₆H₄CO $^+$, PhSe $^+$). Les rendements obtenus sont médiocres à bons (30-87%). Le système décrit pour cette transformation fait appel au couple CuI/DIPEA en présence d'un électrophile de type RX (NCS, NBS, I₂, PhSeBr, 4-Me-C₆H₄C(O)Cl, etc.)⁵⁷ (Figure 17, voie **b**). Bien qu'offrant une voie d'accès à des 1,2,3-

triazoles trisubstitués et en particulier, aux 5-iodo-1,4-disubstitué-1,2,3-triazoles, l'ensemble de ces méthodologies présente un inconvénient majeur : elles ne résolvent pas la problématique initiale de la quantité stœchiométrique de cuivre décrite par Wu. En 2005, le groupe de Kuijpers ⁵⁸ a proposé une solution pour s'affranchir de cette contrainte. Il a montré qu'en remplaçant un alcyne terminal par un haloalcyne, le 5-halo-1,2,3-triazole pouvait être généré avec une quantité catalytique de cuivre (Figure 17, voie c). Ainsi, il a synthétisé des 5-bromo-1,2,3-triazoles avec seulement 40 mol% de catalyseur mixte Cu^I/Cu^{II}. En 2009, l'équipe de Fokin a réussi à réduire davantage la quantité de cuivre requise ; elle a obtenu des 5-iodo-1,2,3-triazoles avec 5 mol% de Cu^I/TTTA (TTTA : (tris(4-triméthylsilylméthyl-1,2,3-triazolylméthyl)amine) ⁵⁹. Cette nouvelle cycloaddition faisant intervenir l'iodoalcyne a été baptisée iCuAAC (*iodoalkyne version of the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*).

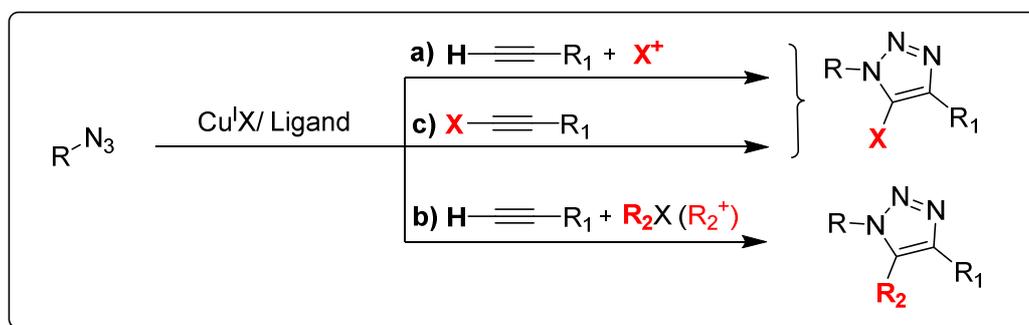


Figure 17 : Voies de fonctionnalisation de la position 5

D'autres méthodologies existent pour insérer un électrophile en position 5 ^{60,61,62}, mais dans le cadre de notre projet de recherche, nous nous sommes restreints à celles qui s'apparentent directement à la CuAAC et qui sont réalisées dans des solvants organiques.

2.3.1.2. Description mécanistique

Suivant l'utilisation d'un alcyne terminal ou un halo-alcyne, il a été proposé deux mécanismes différents.

a) Alcyne terminal (Méthodologie M1)

Pour les réactions faisant intervenir des alcynes terminaux, le piégeage du Cu-triazole par un électrophile est généralement admis ^{63,53,57,54,55,64}. Ainsi, pour cette méthodologie (M1), il a été proposé un mécanisme similaire à celui de la CuAAC avec un piégeage du composé C

(Figure 18) par toute espèce électrophile présente dans le milieu (I^+ , H^+ ...), d'où l'observation du sous-produit 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué **D** en plus du produit d'intérêt 1,2,3-triazole-1,4,5-trisubstitué **E**.

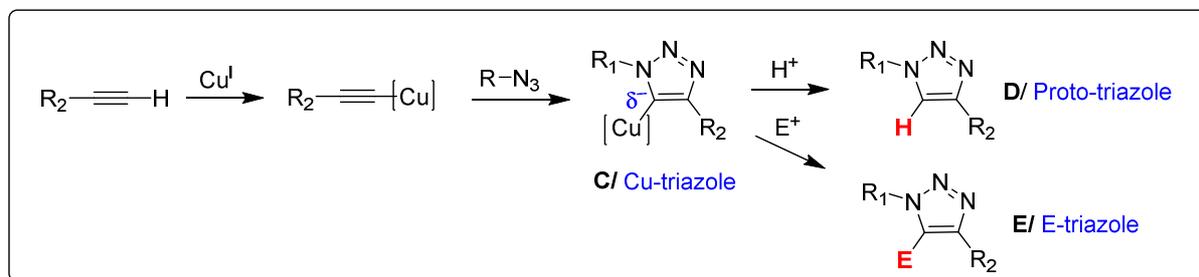


Figure 18 : Premier mécanisme pour les réactions impliquant des alynes terminaux

a) Iodo-alcyne (Méthodologie M2)

Concernant la méthodologie faisant intervenir l'iodo-alcyne **F**, deux voies réactionnelles ont été proposées³⁶. La première (Figure 19/ voie **a**) est similaire à une CuAAC classique, à ceci près qu'en début de réaction, deux étapes supplémentaires sont requises pour déhalogéner l'iodo-alcyne et former l'acétylure de cuivre **I**. On retrouve ensuite les étapes habituelles de la CuAAC qui donnent le 5-Cu-triazolyle **II**. Ce dernier est subséquentement transformé en 5-iodo-1,2,3-triazole *via* une métathèse de sa liaison σ C-Cu avec un autre équivalent d'iodoalcyne. La deuxième voie (Figure 19/ voie **b**) débute avec l'activation de l'iodoalcyne par le cuivre donnant le complexe π : **III**. Ce dernier réagit avec l'azoture pour former le complexe **IV**. S'ensuit une cyclisation *via* un intermédiaire de type vinyl-cuprate **V** qui génère l'iodo-triazole et le Cu^I . Remarquons que cette deuxième voie se caractérise par la conservation de la liaison C-I de l'iodo-alcyne tout au long de la réaction.

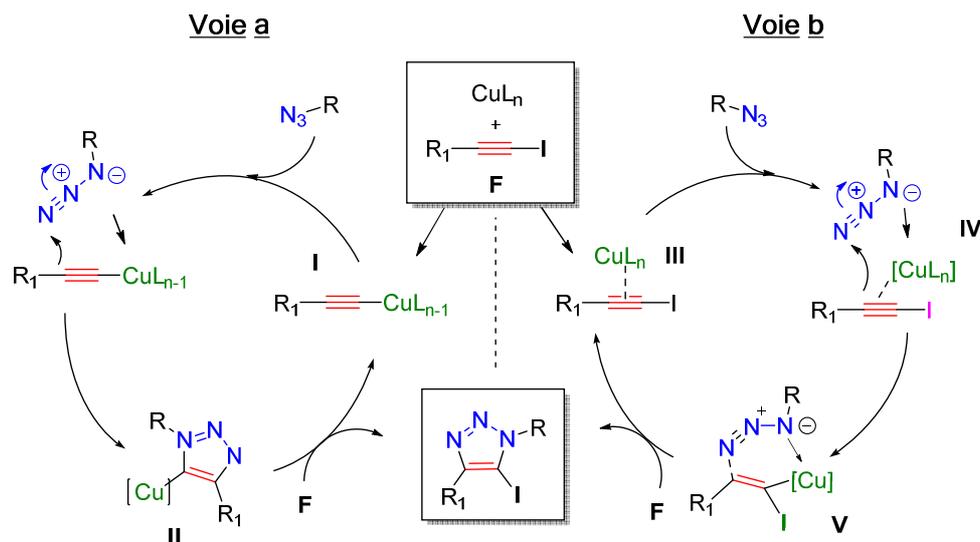


Figure 19 : Le double cycle catalytique des réactions impliquant les iodo-alcynes comme réactif³⁶

b) Discussion mécanistique

Telles que présentées plus haut, les voies mécanistiques des deux méthodologies **M1** (Figure 18) et **M2** (Figures 19) semblent indépendantes. Pourtant, différentes études expérimentales ont mis en évidence des éléments pouvant soutenir la thèse d'un mécanisme commun.

✓ L'iodoalcyne est observé dans le cadre de la méthodologie M1

En partant d'un alcyne terminal, plusieurs groupes ont noté la présence récurrente, dans le milieu réactionnel, de l'iodo-alcyne correspondant^{56,65,64}. Ceci laisse supposer que même dans le cas d'alcynes terminaux, la voie **b** présentée pour la méthodologie **M2** (Figure 19) pourrait être envisageable. Elle serait précédée d'une étape supplémentaire visant à former l'iodo-alcyne (Figure 20).

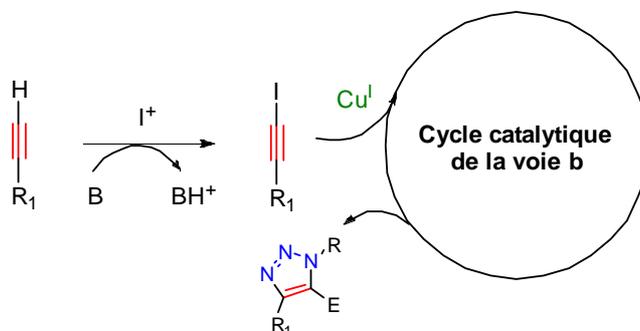


Figure 20 : Voie b potentiellement commune aux deux méthodologies M1 et M2

✓ La méthodologie M1 nécessiterait seulement une quantité catalytique de cuivre

L'élément fondamental qui nous conduit à proposer deux mécanismes différents pour les méthodologies M1 et M2 est la quantité stœchiométrique de cuivre requise dans le premier cas face à son utilisation catalytique dans le deuxième. Or, plusieurs observations indiquent que la méthodologie M1 ne devrait nécessiter qu'une quantité catalytique de cuivre.

La CuAAC qui est identique à la méthodologie M1 en tout point sauf pour la nature de l'électrophile inséré (H^+/I^+), nécessite seulement une quantité catalytique de cuivre (Cf. Paragraphe 2.2.1). Dans le cas de la méthodologie M1, le Cu^I devrait aussi pouvoir être récupéré et réinjecté dans le cycle catalytique après l'iodo-décupration, comme c'est le cas après la proto-décupration de la CuAAC (Figure 21).

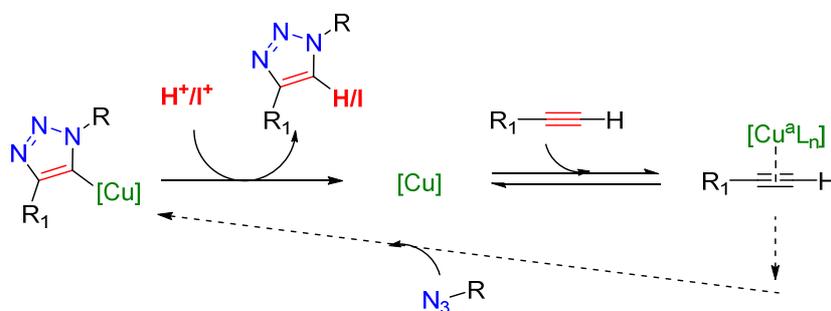


Figure 21 : Cycle catalytique théorique pour la méthodologie M1

Plusieurs éléments expérimentaux soutiennent cette thèse :

1/ En 2008, l'équipe de Li⁵³ a montré que le couple NBS/CuI ne donnait pas le bromotriazole mais l'iodotriazole. De plus, elle a noté que l'efficacité du couple NBS/CuI pour l'obtention de l'iodotriazole était supérieure à celle du couple NIS/CuI. Ceci permet de conclure que la source de I^+ n'est pas le NIS comme on pourrait le penser mais le CuI. La quantité stœchiométrique de CuI serait donc nécessaire à la formation d'une quantité stœchiométrique de l'électrophile (I^+) et non une quantité stœchiométrique de Cu^I .

2/ En 2009, notre équipe⁵⁷ a testé différentes sources potentielles de I^+ , en y additionnant une quantité stœchiométrique de CuI : NIS, I_2 (1, 2 ou 3 équivalents), I_2/CAN : 2/1 (CAN : Nitrate d'ammonium cérique) et I_2/IBD : 2/1 (IBD : Iodosobenzène diacétate) (Tableau 6).

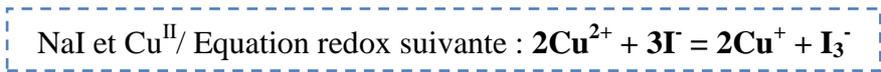
Tableau 6 : Optimisation des conditions réactionnelles pour l'obtention du 5-iodo-Triazole

Entrée	alcyne/CuI/DIPEA (équiv)	Source de I ⁺ /Oxydant (équiv.)	Rendement (%)
1	2 : 2 : 5	I ₂ (1)	21
2	2 : 2 : 5	I ₂ (3)	64
3	1.2 : 1.2 : 5	I ₂ /CAN (2 : 1)	83
4	1.2 : 1.2 : 5	I ₂ /IBD (2 : 1)	90
5	1.2 : 1.2 : 1.5	NIS (1)	39
6	1.2 : 1.2 : 1.5	NIS (3)	74

Nous remarquons que les meilleurs rendements sont fournis par les couples I₂/CAN et I₂/IBD (entrées 3 et 4), tandis qu'avec un équivalent de I₂ (entrées 1 et 2) ou de NIS (entrées 5 et 6), le rendement est médiocre. Ceci laisse penser que ces réactifs ne fournissent pas l'électrophile (I⁺) mais jouent plutôt le rôle d'oxydants pour transformer le I⁻ provenant du CuI en I⁺ (équation redox présentée ci-dessous). Ceci soutient l'hypothèse proposée ci-dessus, à savoir : la quantité stœchiométrique de CuI serait nécessaire à la formation d'une quantité stœchiométrique de l'électrophile (I⁺) et non une quantité stœchiométrique du catalyseur Cu^I.



3/ Bien que plausible, l'explication fournie ci-dessus ne peut justifier l'utilisation d'une quantité sur-stœchiométrique (2 équivalents) de cuivre pour la réaction de Zhu ⁵⁶. En effet, cette dernière fait appel au système suivant : (Cu(ClO₄)₂.6H₂O/NaI/DBU : 2/4/1) où le Cu(ClO₄)₂ ne peut évidemment pas être une source de I⁺. Les auteurs expliquent, que dans leur cas, la grande quantité de Cu^{II} est nécessaire à l'oxydation *in situ* du I⁻ (fourni par NaI) en I⁺ (équation redox présentée ci-dessous). Et ils affirment que pour diminuer la quantité de cuivre, il suffit de trouver un oxydant alternatif ⁶⁵.



c) Proposition mécanistique

Au vu des éléments présentés ci-dessus, on peut envisager que les deux voies réactionnelles, celle partant de l'alcyne terminal (méthodologie **M1**) et celle partant de l'iodoalcyne (méthodologie **M2**), reposent sur un cycle catalytique commun (voie **a**, Figure 22), avec une étape supplémentaire, dans le cas **M1**, visant à former l'iodo-alcyne **F**. Par ailleurs, comme la méthodologie **M1** présente la possibilité d'insérer d'autres types d'électrophiles (H^+ , $RC(O)^+$, RSe^+), on peut suggérer pour cette dernière un deuxième cycle catalytique de type CuAAC (voie **b**, Figure 22). Celui-ci serait en compétition avec la voie **a**.

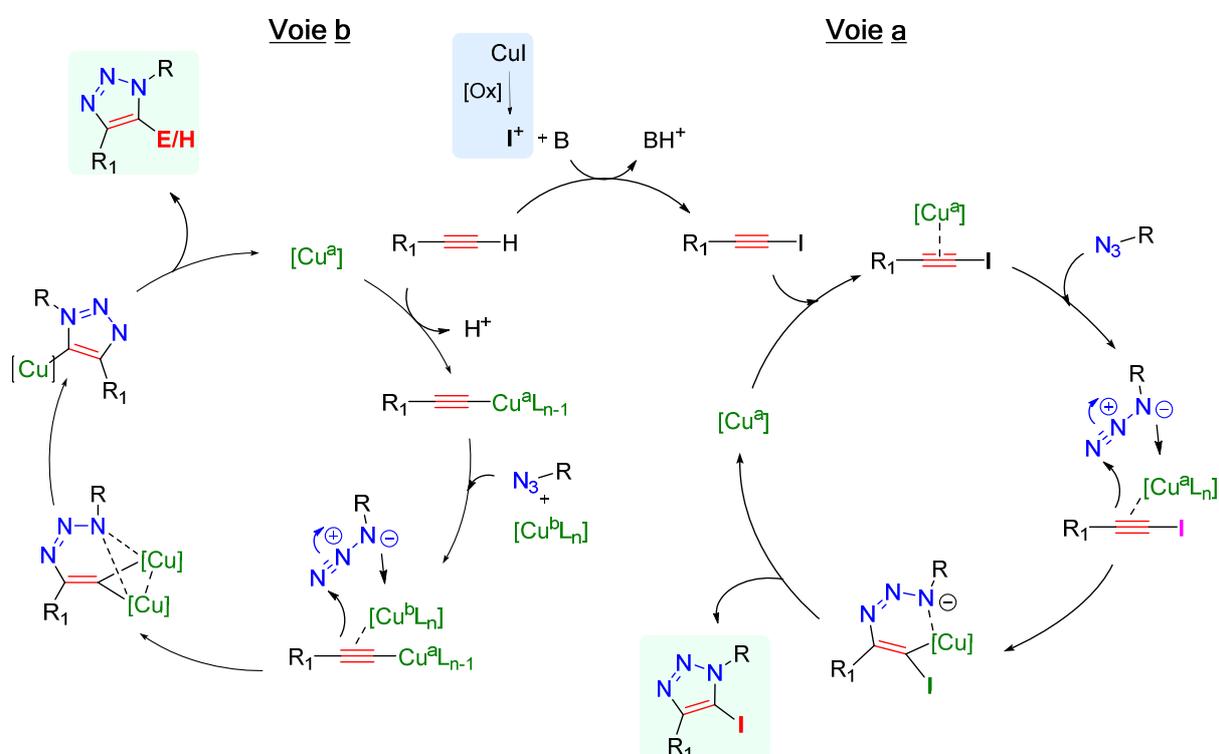


Figure 22 : Mécanisme global- insertion d'un électrophile en position 5 des 1,2,3-triazoles

2.3.2. 5-alkynyl-1,2,3-triazole

Après avoir décrit les voies d'accès aux 5-iodo-1,2,3-triazoles, nous allons maintenant présenter les voies d'accès aux 5-alkynyl-1,2,3-triazoles ainsi que l'apport de notre laboratoire sur ce sujet. Rappelons que nous nous intéressons à ces 2 classes de produits car les analogues de l'ACA que nous décrivons dans les chapitres 3 et 4 feront appel à ce type de fonctionnalisation.

2.3.2.1. Bibliographie

i. Méthodologie de synthèse

En 2006, l'équipe de Porco ⁶⁶ a développé une méthodologie permettant l'accès aux 5-alcynyl-1,2,3-triazoles, initialement décrits comme sous produits de réaction clic ⁶². En étudiant l'effet des ligands sur la solubilité des catalyseurs cuivreux, Porco a en effet observé, de façon surprenante, la formation de 5-alcynyl-1,2,3-triazoles. A travers une optimisation des paramètres réactionnels, tels que la source de cuivre et la nature du ligand, l'équipe a pu favoriser la formation du produit 5-alcynyl-1,2,3-triazole par rapport au 5-proto-triazole (Figure 23). Les rendements de l'exemplification de la réaction ($R_2 = \text{CH}_3\text{OCH}_2, n\text{Pr}, \text{Ph}$) varient entre 31 et 68% et la formation concomitante du 5-proto-triazole n'a pas pu être circonvenue.

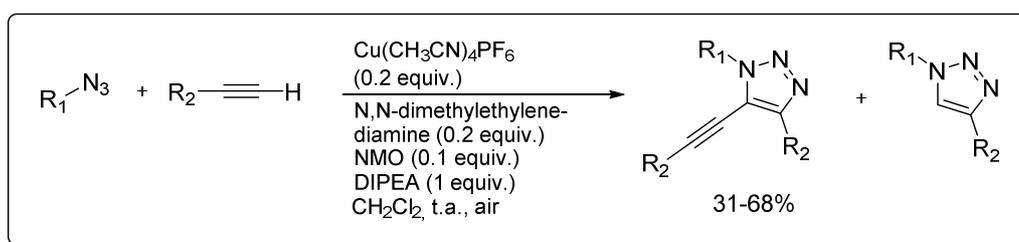


Figure 23 : Méthodologie optimisée de Porco

Bien que nous ayons ici la première méthodologie fournissant des 5-alcynyl-triazoles comme produits majoritaires, les rendements obtenus sont médiocres à moyens. De plus, il est intéressant de noter que cette réaction semble être substrat-dépendante. En effet, les auteurs ont remarqué que la formation des 5-alcynyl-triazoles était favorisée par l'utilisation d'un azoture α -hydroxylé. Ils expliquent cette observation par la chélation du cuivre *via* l'hydroxyle (Figure 24).

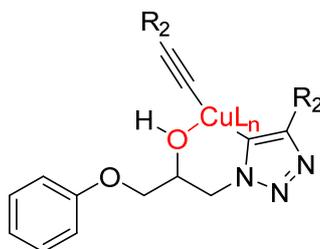


Figure 24 : Chélation du cuivre par le groupement hydroxyle

Deux autres groupes ont essayé d'améliorer le rendement de cette réaction et d'étendre la réaction à une plus grande variété de substrats. Le premier, le groupe d'Alonso, a développé une méthodologie s'appuyant sur le catalyseur Cu₂O dans le MeOH et fournissant des 5-alcynyl-1,2,3-triazoles (Figure 25-haut) avec des rendements allant de 50 à 90% ⁶⁷. Le deuxième groupe de recherche est celui de Li ^{68,69}. Il a mis en place un système associant le bromure de cuivre et la base inorganique KOH. Les rendements associés à cette réaction s'échelonnent de 64 à 77% (Figure 25-bas).

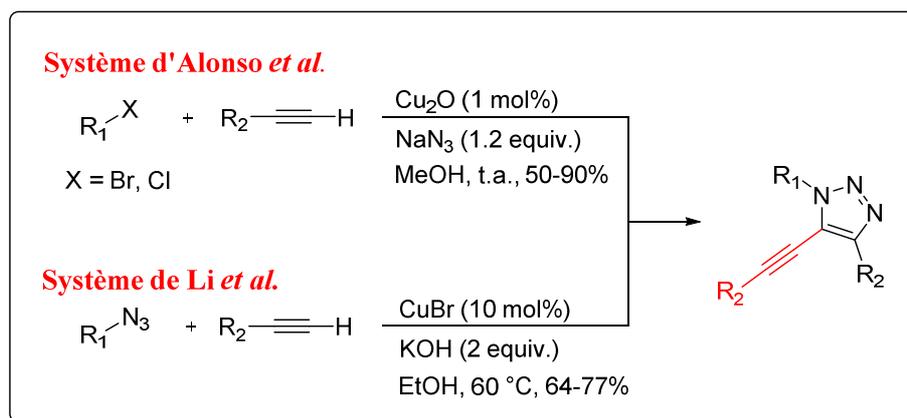


Figure 25 : Les systèmes catalytiques d'Alonso et de Li

ii. Etude mécanistique :

Les investigations mécanistiques réalisées par les groupes de Porco Jr., Alonso et Li, s'accordent sur l'importance de l'oxygène pour cette réaction. Ils ont constaté l'impossibilité de synthétiser le 5-alcynyl-triazole sous atmosphère inerte. Par ailleurs, dans des conditions aérobies, le couplage de Glaser (formation de diyne) est envisageable. Ainsi, les auteurs ont évalué la possibilité de cycloaddition entre un azoture et un diyne comme moyen d'accès aux 5-alcynyl-1,2,3-triazoles ⁷⁰. Il s'est avéré que cette dernière (Figure 26-a) n'était pas efficace dans les conditions mises au point par les trois groupes de recherche. Ce résultat était à prévoir car les cycloadditions azoture-homodiyne se font dans des conditions drastiques avec, notamment, des températures se situant entre 80 et 110 °C ⁷⁰. Une deuxième possibilité correspondant à un mécanisme séquentiel CuAAC classique/C-H activation a été étudiée. Cette hypothèse a aussi été invalidée suite à l'échec de formation du 5-alcynyl-triazole à partir du 5-*H*-triazole et d'alcyne (Figure 26-b) ^{66,67,68}.

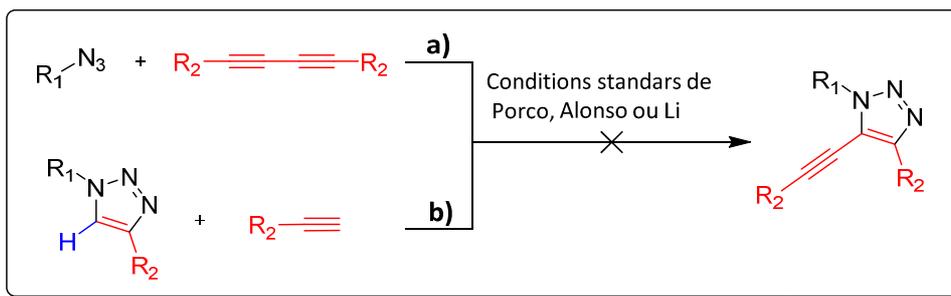


Figure 26 : a/Cycloaddition azoture-diyne et b/C-H activation

Ces deux hypothèses étant éliminées, les auteurs ont suggéré que le couplage oxydatif était préalable à la dernière étape conventionnelle de la CuAAC (proto-décupration). Dans les conditions appliquées par ces groupes, le triazolyl-cuprate **I** serait donc un intermédiaire commun qui, selon l'atmosphère du milieu réactionnel (oxygénée ou pas) peut être piégé par un proton ou se complexer à une deuxième molécule d'alcyne et *in fine* conduire au 5-alkynyl-triazole. Cette proposition a été confortée par l'observation unanime suivante : en présence d'oxygène, le produit majoritaire est le 5-alkynyl-triazole tandis qu'en milieu désoxygéné, le 5-proto-triazole passe de produit minoritaire à exclusif. D'autre part, comme l'élimination réductrice n'est pas favorable en présence de Cu^{II} (intermédiaire **II**)⁷¹, ils ont proposé une étape d'oxydation supplémentaire conduisant au Cu^{III} (intermédiaire **III**) avant l'obtention du 5-alkynyl-triazole (Figure 27).

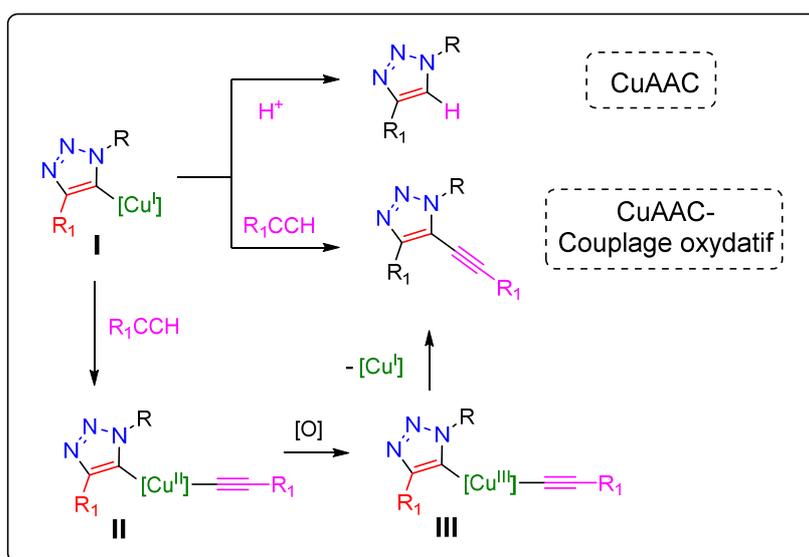


Figure 27 : Cu-triazole intermédiaire commun potentiel à la CuAAC et CuAAC-couplage oxydatif

2.3.2.2. Travaux réalisés dans le cadre de cette thèse

En dépit des rendements appréciables énoncés plus haut, il était nécessaire, dans le cadre de notre projet, de développer une nouvelle méthodologie. En effet, pour trois différentes raisons, les méthodes de Porco, Alonso et Li n'ont pas été efficaces pour nos substrats. **1)** La méthode d'Alonso génère l'azoture *in situ via* une substitution nucléophile halogène-N₃ à partir de l'halogénure correspondant. Or, une grande partie de nos produits porte un motif ribosyle et ne peut donc pas suivre ce schéma réactionnel. **2)** La méthode de Li nécessite un chauffage à 60 °C incompatible avec la plupart de nos composés pour des raisons de stabilité. **3)** Bien que non optimale, la méthode de Porco ne présente théoriquement pas d'incompatibilité avec nos substrats. Nous l'avons donc testée mais elle n'a malheureusement pas permis de donner les produits d'intérêt.

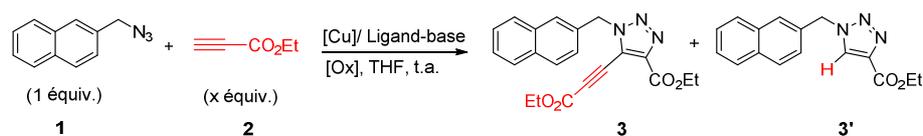
i. Méthodologie de synthèse :

Dans le cadre de nos travaux d'optimisation, nous avons utilisé le 2-(azidométhyl)naphthalène et le propiolate d'éthyle comme substrats modèles. Nous avons étudié les paramètres suivants : la source de cuivre, son état d'oxydation, la nature de l'oxydant, la nature du ligand/base et le nombre d'équivalents d'alcyne (Tableau 7). La stœchiométrie de chaque composé et la nature du solvant ont également été étudiées.

Notre méthodologie s'est appuyée sur une première observation : sous atmosphère ambiante, un excès d'alcyne conduit au 5-alcynyl-1,2,3-triazole comme produit secondaire marginal (Tableau 7, entrée 1). Sachant, de par la littérature, que ce produit est favorisé en conditions oxydantes, nous avons commencé par tester différents oxydants (entrées 2 à 9). Le meilleur ratio 5-alcynyl-triazole/proto-triazole (**3/3'**) ayant été obtenu avec le peroxyde d'hydrogène, ce dernier a été conservé pour la suite de l'optimisation. Nous avons ensuite évalué l'effet de la stœchiométrie de cet oxydant sur le ratio **3/3'**. Il s'est avéré que l'abaissement de la stœchiométrie à 1 équivalent par rapport à l'azoture était nuisible à ce ratio (entrée 8). En revanche, une augmentation à 5 équivalent a permis de l'améliorer (entrée 9). La DIPEA a été utilisée à la fois comme ligand et base d'où les deux équivalents additionnés au milieu réactionnel. Bien qu'il n'y ait pas de différence notable au niveau du ratio quand un seul équivalent de DIPEA est employé (entrées 9 et 10), nous avons remarqué que dans ce cas le substrat **1** n'était plus totalement consommé. Ceci est en accord avec la suggestion de Hay⁷²

selon laquelle deux équivalents de ligand monodentate (par rapport au cuivre) sont nécessaires pour éviter la formation d'acétylures de cuivre insolubles. Nous avons ensuite évalué la nature et la stœchiométrie de la source de cuivre. Nous avons noté qu'une quantité sous-stœchiométrique de cyanure cuivreux induisait une baisse du ratio **3/3'** (entrée 11). Nous avons donc gardé la quantité utilisée initialement, soit 1,2 équivalent par rapport à l'azoture. Différentes sources de Cu^I ont également été testées révélant que le cyanure cuivreux est le complexe cuivreux optimal pour la réaction (entrées 12-14). Il est à noter que l'iodure de cuivre conduit au 5-iodo-1,2,3-triazole comme produit majoritaire tandis que le chlorure de cuivre et le bromure de cuivre, ne promeuvent pas la formation des 5-chloro- et 5-bromo-triazoles. D'autres sources de cuivre ont par la suite été testées. Ainsi, le cuivre métallique qui peut être oxydé *in situ* en Cu^I par l'action du peroxyde d'hydrogène, a été évalué avec succès mais le ratio **3/3'** obtenu n'était pas satisfaisant (entrée 15). Ensuite la stœchiométrie de l'alcyne a été réduite de 3 équivalents à 2,2 équivalents (entrée 16). Ceci s'est accompagné d'une diminution du ratio **3/3'**. A l'inverse, l'augmentation de cette stœchiométrie à 4 équivalents a donné un meilleur ratio 5-alcynyl/5-proto-triazole (entrée 17). Enfin, des essais avec deux amines tertiaires autres que la DIEPA ont donné des résultats moins satisfaisants (entrées 18 et 19). Ainsi, au terme de cette optimisation, nous avons retenu les conditions réactionnelles représentées au niveau de l'entrée 17 pour la préparation de nos analogues de l'ACA qui seront présentés dans les chapitres 3 et 4.

Tableau 7 : Optimisation des conditions réactionnelles pour l'obtention du 5-alcynyl-triazole



Entrée ^a	2	[Cu]	[Ox]	Ligand/base	3/3' ^b
1	3	CuCN (1.2)	Air	DIPEA (2)	0.1:1
2	3	CuCN (1.2)	H ₂ O ₂ (3)	DIEPA (2)	1.8:1
3	3	CuCN (1.2)	MnO ₂ (3)	DIEPA (2)	1.0:1
4	3	CuCN (1.2)	KMnO ₄ (3)	DIEPA (2)	0.3:1
5	3	CuCN (1.2)	CrO ₃ (3)	DIEPA (2)	0.1:4
6	3	CuCN (1.2)	t-BuOOH	DIEPA (2)	0.0:1

			(3)		
7	3	CuCN (1.2)	MEKP (3)	DIEPA (2)	0.0:1
8	3	CuCN (1.2)	H ₂ O ₂ (1)	DIEPA (2)	1.0:1
9	3	CuCN (1.2)	H ₂ O ₂ (5)	DIEPA (2)	2.4:1
10	3	CuCN (1.2)	H ₂ O ₂ (5)	DIEPA (1)	2.2:1 ^c
11	3	CuCN (0.5)	H ₂ O ₂ (5)	DIEPA (2)	1.3:1
12	4	CuI (1.2)	H ₂ O ₂ (5)	DIEPA (2)	0.5:3.5:1 ^d
13	4	CuBr (1.2)	H ₂ O ₂ (5)	DIEPA (2)	1.3:1
14	4	CuCl (1.2)	H ₂ O ₂ (5)	DIEPA (2)	0.9:1
15	4	Cu ⁰ (1.2)	H ₂ O ₂ (5)	DIEPA (2)	1.0:1
16	2.2	CuCN (1.2)	H ₂ O ₂ (5)	DIEPA (2)	0.9:1
17	4	CuCN (1.2)	H ₂ O ₂ (5)	DIEPA (2)	3.0:1
18	4	CuCN (1.2)	H ₂ O ₂ (5)	NEt ₃ (2)	0.7:1
19	4	CuCN (1.2)	H ₂ O ₂ (5)	Pyridine (2)	0.4:1

^aSolvant utilisé est le THF ^bLes ratios obtenus ont été déterminés par ¹H RMN du brut (conversion totale de **1**) en s'appuyant sur les méthylènes de **3** et **3'** qui ont des déplacements chimiques de 5.79 et 5.71 ppm respectivement. ^cConversion de **1** à hauteur de 78%. ^d**3/3''/3'** : 0.5/3.5/1 où **3''** correspond au 5-iodo-1,2,3-triazole.

ii. Observations liées à l'optimisation de la méthodologie

Au cours de l'optimisation de notre méthodologie, nous avons fait des constatations qui seraient importantes à signaler.

Dans le tableau d'optimisation, nous pouvons remarquer la différence majeure d'efficacité entre les deux peroxydes : H₂O₂ et MEKP (peroxyde de méthyléthylcétone). Or, à la différence du MEKP, le peroxyde d'hydrogène se décompose à température ambiante en H₂O et O₂ [2 H₂O₂ = 2 H₂O + O₂]; effervescence visible durant la réaction. Il serait donc raisonnable de penser que c'est bien le dioxygène qui est l'oxydant terminal du système, comme hypothétisé par Alonso ⁶⁷.

Ainsi, tandis que les systèmes de Li et Alonso utilisent l'oxygène atmosphérique, dans notre

cas, il proviendrait de H₂O₂. Cela nous semble extrêmement important d'autant que la quantité d'O₂ fournie semble définir la distribution des produits. En effet, Alonso décrit une expérience intéressante où sa réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif est réalisée sous atmosphère d'oxygène grâce à l'utilisation d'une baudruche d'O₂. Au lieu d'un rendement maximal en 5-alcynyl-triazole, il a obtenu un nouveau sous-produit provenant du couplage de Glaser (homodiyne, Figure 28). Ceci montre que la quantité d'O₂ présente dans le milieu possède une influence prépondérante et qu'il existe une quantité optimale d'oxygène à injecter au milieu (pas nécessairement maximale). En outre, Alonso explique que si sa réaction est opérationnelle uniquement dans le méthanol c'est parce que ce solvant favorise un équilibre de solubilité de l'oxygène qui serait idéal pour la réaction.

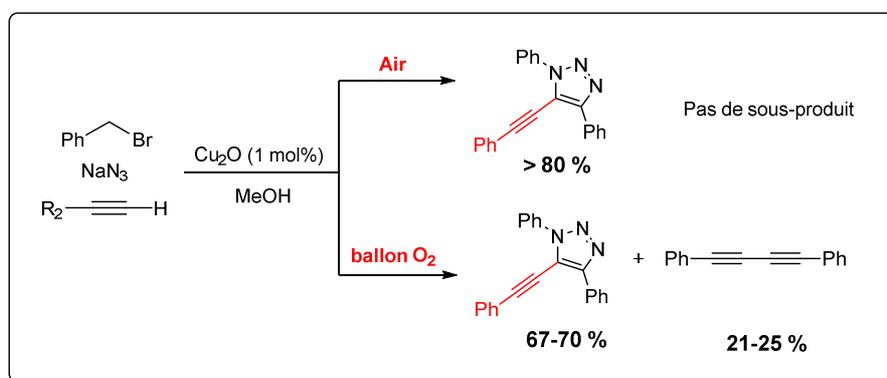


Figure 28 : Expérience d'Alonso

Notons que les rendements de nos réactions ont présenté une fluctuation assez importante (atteignant parfois 20%) même en présence de substrats et de conditions identiques. En s'appuyant sur l'hypothèse énoncée ci-dessus, cette observation pourrait être expliquée par l'irrégularité de dégagement et de solubilisation de l'oxygène fourni par le peroxyde d'hydrogène.

En résumé, il nous est apparu impossible de pousser plus avant l'optimisation de cette réaction pour trois raisons : **1)** Il est difficile de contrôler la quantité d'oxygène dissoute dans le milieu **2)** le peroxyde d'hydrogène conduit à la formation d'équilibres complexes entre différentes espèces du cuivre en solution (mélange équilibré Cu(I), Cu(II) et Cu(III))⁷³. **3)** Enfin, comme décrit par Zhang⁷⁴ l'association du Cu^{II} avec un alcyne et un ligand (TMEDA dans leur cas), conduit à la réduction du cuivre et à l'homo-couplage de l'alcyne ; et donc à une réaction secondaire inévitable.

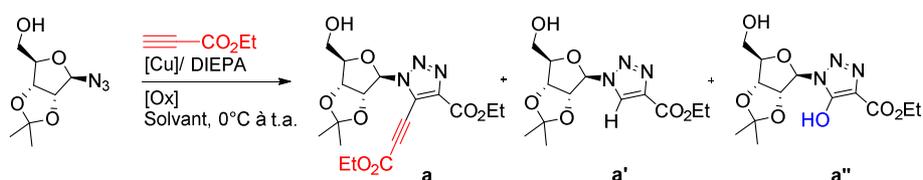
iii. Considérations mécanistiques

Bien que la complexité du système ne permette pas de proposer un mécanisme, il serait intéressant de noter quelques résultats surprenants obtenus au cours de l'optimisation de nos conditions.

✓ L'eau favorise la formation des 5-hydroxy-triazoles

Dans le cadre de l'optimisation de notre méthodologie, nous avons réalisé des expériences supplémentaires à celles décrites dans le Tableau 7, en utilisant un substrat modèle de type nucléosidique (Tableau 8). Nous avons notamment tenté de remplacer le Cu^I par un complexe de Cu^{II} afin d'étudier l'influence du degré d'oxydation du complexe cuivreux sur la distribution des produits. Nous avons noté lors de ces tests que le Cu(OAc)₂ donnait un ratio 5-alcynyl/5-proto-triazole aussi satisfaisant que celui obtenu avec le CuCN (Tableau 8, entrées 1 et 2). Ceci confirme la mise en place d'équilibres redox par le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène. En plus de cette constatation, nous avons remarqué que le 5-hydroxytriazole, généralement formé en quantité très marginale, devient le produit majoritaire quand la réaction est effectuée dans l'eau (entrées 5 et 6).

Tableau 8 : L'effet de l'eau sur la distribution des produits



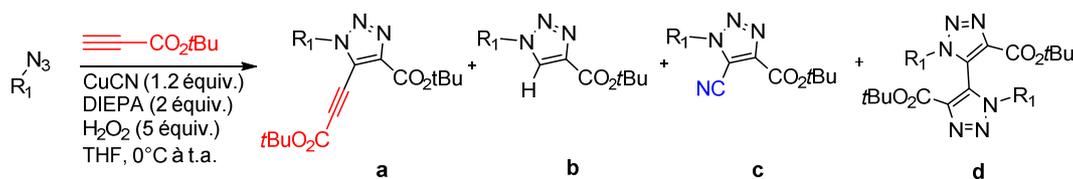
Entrée ^a	[Cu]	[Ox] (nombre d'équivalents)	Solvant	a/a'/a'' ^b
1	CuCN	H ₂ O ₂ (5)	THF	75:25:0
2	Cu(OAc) ₂	H ₂ O ₂ (5)	THF	70:30:0
3	Cu(OAc) ₂	H ₂ O ₂ (5)	THF/H ₂ O : 3/1	69:31:0
4	Cu(OAc) ₂	Air	THF/H ₂ O : 3/1	41:59:0
5 ^c	Cu(OAc) ₂	H ₂ O ₂ (5)	H ₂ O	18:54:26
6 ^c	Cu(OAc) ₂	Air	H ₂ O	15:56:28

^aDIPEA (1 équiv.) ^bLes ratios ont été déterminés par RMN ¹H du brut ^c5-hydroxy-triazole analysé par RMN ¹H et SM (ES).

✓ Les alcynes encombrés favorisent la formation des 5-cyano-triazoles

En effectuant la réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif avec un alcyne présentant un encombrement stérique (propiolate de *tert*-butyle), nous avons détecté un nouveau sous-produit : le 5-cyano-triazole (Tableau 9). Sachant que le nitrile est un ligand dur fortement associé au cuivre, on peut envisager sa présence dans la sphère de coordination tout au long de la réaction. Avec un alcyne encombré, la complexation du deuxième équivalent d'alcyne au cuivre serait défavorable en raison de la gêne stérique. Au lieu de générer une liaison entre le C(5) du triazole et l'alcyne, l'élimination réductrice lierait ainsi le groupement cyano au triazole. Cette thèse peut être soutenue par les rendements qui sont plus importants pour les triazoles présentant une gêne stérique supplémentaire (cas du 2-fluoro-phényl et du ribosyl).

Tableau 9 : Distribution des produits suivant le substrat



R ₁					
a	22%	9%	12%	27%	14%
b	30%	22%	?	?	35%
c	3%	2%	7%	14%	16%
d	0.5%	-	-	-	?

Les pourcentages représentent des rendements de produits isolés/ Les 5-cyano-triazole ont été identifiés par RMN ¹H et IR (bande caractéristique de la liaison CN à 2226 cm⁻¹).

iv. Conclusion

L'association des éléments présentés plus haut laisse penser que le mécanisme de la réaction pourrait obéir à la proposition développée dans la littérature. Le Cu-trizole pourrait ainsi se complexer à un ligand (alcyne, nitrile, eau), s'oxyder puis suivre une élimination réductrice. Seulement, les réactions redox pouvant être générées par le peroxyde d'hydrogène font potentiellement intervenir un anion radicalaire. On pourrait donc aussi envisager un mécanisme radicalaire, d'autant plus que nous avons isolé de façon récurrente un produit surprenant (Figure 31) dont la caractérisation est détaillée en annexe.

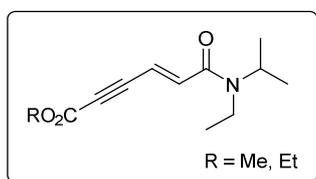


Figure 31 : Produit secondaire récurrent

3. Chapitre 3

Synthèse et évaluation biologique d'analogues nucléosidiques de l'acadésine

3.1. Stratégie du projet

Comme indiqué dans le chapitre 1 (paragraphe 5.1), nous nous intéressons dans le cadre de ce projet à l'ACA pour son activité antiproliférative contre les cellules de LMC résistantes à l'IM, ainsi que pour l'originalité de son mode d'action qui induit une mort cellulaire autophagique, tandis que l'IM induit une mort apoptotique. Après une synthèse bibliographique autour de l'autophagie, nous présenterons notre stratégie et détaillerons les travaux que nous avons réalisés pour mener à bien ce projet de recherche.

3.1.1. L'autophagie : Généralités

La macro-autophagie, communément appelée autophagie, est un processus cellulaire qui a été décrit par Christian Duve conséquemment à sa découverte du lysosome (Prix Nobel de physiologie et médecine 1974)⁷⁵. C'est un mécanisme participant à l'homéostasie cellulaire *via* la dégradation d'une partie du contenu de la cellule : protéines à longue demi-vie (supérieure à 5h), organelles. L'élimination de ce matériel intracellulaire défectueux ou excédentaire, repose sur un transport vacuolaire amorcé par la formation d'une double membrane appelée phagophore (Figure 32). Cette dernière s'allonge pour former l'autophagosome responsable de la séquestration et de l'acheminement du matériel cytoplasmique jusqu'au lysosome. Après fusion avec ce dernier, le contenu de l'autophagolysosome est dégradé par les enzymes lysosomales. Il est ensuite recyclé pour synthétiser de nouvelles macromolécules et produire de l'énergie dans la cellule. Au sein de chaque cellule, un niveau basal de ce recyclage catabolique peut être observé. En outre, en cas de modification des conditions environnementales (carences en nutriments, absence de facteurs de croissance, hypoxie), l'autophagie peut s'adapter pour fournir à la cellule l'énergie nécessaire à son métabolisme et donc à sa survie. On parle d'« autophagie nutritionnelle ». Cependant, la fonction de la macro-autophagie ne se limite pas à la cyto-protection. Dans certains cas, son adaptation aux facteurs environnementaux peut induire la mort cellulaire (mort programmée de type II) *via* une activation excessive ou une séquestration sélective des facteurs vitaux. Sur un plan moléculaire, l'autophagie est associée à la famille des gènes ATG (*autophagy related genes*) et elle est principalement régulée par la voie de signalisation impliquant la sérine-thréonine-kinase m-TOR.

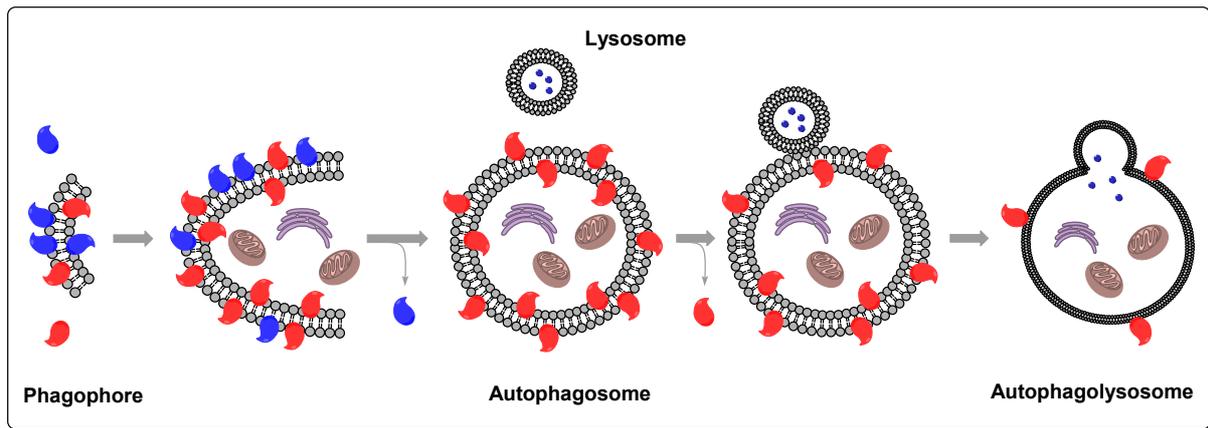


Figure 32 : Machinerie autophagique

3.1.2. Autophagie et cancer

La dualité de la fonction autophagique dans les processus de vie et de mort cellulaire est retrouvée dans le cadre du cancer. Différentes études montrent que suivant le contexte biologique, l'autophagie peut être pro- ou anti-tumorale (Figure 33)^{76,77,78,79}.

a) Mécanismes anti-tumoraux induits par l'autophagie

Le potentiel anti-tumoral de l'autophagie a été initialement rapporté par Beth Levine en 1999⁸⁰. Son groupe a mis en évidence des délétions monoalléliques du gène autophagique BECN1 (ATG6) dans 40 à 75% des cancers du sein, de la prostate et de l'ovaire⁸¹. De plus, ils ont observé une réduction des tumeurs par réintroduction du gène dans des cellules de cancers mammaires⁷⁹. Ce caractère suppresseur de tumeur de l'autophagie a ensuite été étudié de plus près et plusieurs mécanismes anti-tumoraux ont été identifiés ; la suppression des éléments cellulaires défectueux, la limitation de la croissance cellulaire, la conservation du génome et l'induction de la mort autophagique génétiquement programmée en cas de stress prolongé^{78,82}.

b) Mécanismes pro-tumoraux induits par l'autophagie

Initialement considérée comme un inhibiteur de la progression tumorale, l'autophagie a été redéfinie comme un processus hautement complexe pouvant être à la fois associé à des mécanismes pro-et anti-tumoraux. En effet, il a été constaté que sa fonction physiologique de survie cellulaire pouvait être détournée au profit de la tumorigenèse en répondant aux besoins énergétiques accrus des cellules cancéreuses⁸³. Une deuxième observation valide ces

propriétés pro-tumorales, à savoir que quand l'autophagie est inhibée, les cellules cancéreuses sont plus sensibles aux chimiothérapies ^{84,85}.

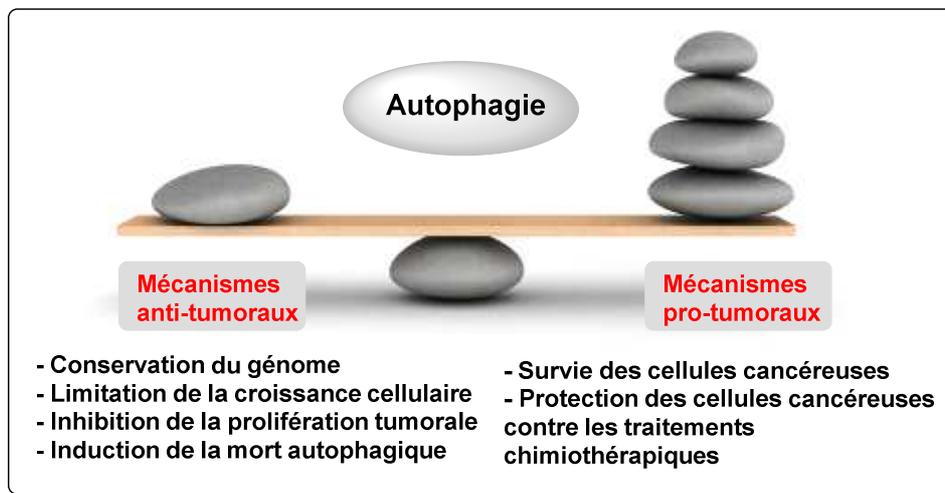


Figure 33 : Paradoxe de la fonction autophagique dans le cadre du cancer

3.1.3. Interconnexion autophagie-apoptose

En plus de l'identification des actions décrites plus haut, il a été montré que l'autophagie fonctionnait de concert avec l'apoptose ou mort programmée de type I. Contrairement à l'autophagie qui est à la fois un mécanisme de survie et mort cellulaire, l'apoptose est génétiquement codée pour induire uniquement le suicide de la cellule. En raison de leurs voies de signalisation entremêlées et leurs régulateurs communs, ces deux mécanismes fonctionnent suivant une interconnexion qui dépend intimement du contexte biologique : type de tumeur, stade d'avancement, région affectée, nature, intensité et durée des stimuli, etc. Cette interconnexion est régie par différentes possibilités d'interactions autophagie-apoptose (Figure 34). **a)** Par élimination de certains compartiments cellulaires endommagés (notamment les mitochondries), l'autophagie peut agir comme un antagoniste de l'apoptose en évitant son déclenchement ⁸⁶. **b)** L'autophagie peut favoriser l'apoptose en freinant les inhibiteurs endogènes de cette mort cellulaire ou en activant certaines de ses protéines telles que la capase 8 ⁸⁶. **c)** L'autophagie peut constituer un mécanisme de mort cellulaire alternatif à l'apoptose quand cette dernière est défectueuse ⁸⁷. **d)** Quand l'intensité ou la durée du stress dépassent la capacité de gestion de la cellule, l'apoptose inhibe l'autophagie et s'auto-déclenche ^{86,87}.

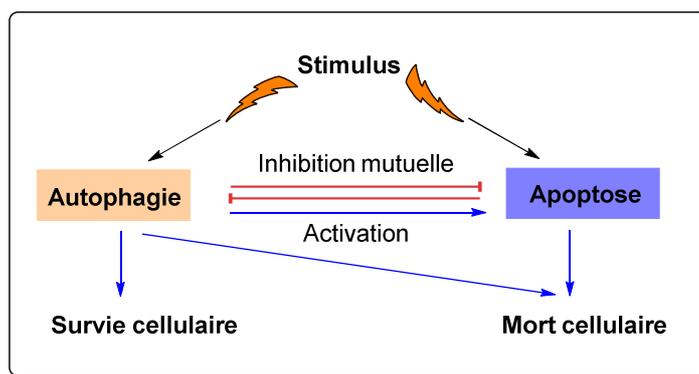


Figure 34 : Equilibre autophagie-apoptose ⁸⁷

3.1.4. Ciblage de l'autophagie-Nouvelle approche thérapeutique

L'identification de la mort cellulaire de type II ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques. Elle fournit, en effet, une cible autre que l'apoptose pour freiner la progression tumorale. Malheureusement, la complexité du processus autophagique enraie le développement de tels traitements. Son double caractère pro- et anti-tumoral pose une question préalable à tout choix thérapeutique : Faut-il activer ou inhiber l'autophagie pour obtenir un effet anticancéreux ?

Cette dualité de traitement est illustrée, à titre d'exemple, par l'activité anti-tumorale de la chloroquine ⁸⁵ et du tamoxifène ⁸², respectivement, inhibiteur et inducteur de l'autophagie. Afin d'être en mesure de définir une stratégie thérapeutique adaptée, il est donc impératif d'élucider avec une plus grande précision le mécanisme de l'autophagie. Dans ce contexte, la conception d'outils chimiques spécialement dédiés mériterait d'être développée.

3.1.5. L'acadésine : point de départ

Dans le cadre du traitement de la LMC, des résistances contre l'action de l'IM ont émergé. Parmi les mécanismes de ces résistances, on trouve une activation rapide du processus autophagique. Ceci assure la survie des cellules cancéreuses en dépit de la réduction des signaux de croissance induite par l'IM. Le ciblage de l'autophagie peut donc présenter ici une approche thérapeutique judicieuse. Deux solutions peuvent notamment être envisagées :

- a) Associer à l'action de l'IM une inhibition de l'autophagie ⁸⁵
- b) Induire une mort autophagique indépendante de l'action de l'IM.

De façon intéressante, nos collaborateurs biologistes (équipe du Dr. P. Auberger, C3M, Nice) ont montré que l'acadésine (ACA) pouvait correspondre à la deuxième stratégie. En testant

son activité, ils ont en effet constaté un effet antiprolifératif associé à une induction de mort autophagique sur les lignées LMC, sensibles et résistantes à l'IM. De plus, l'activité de l'ACA contre les cellules portant la mutation dominante T315I de BCR-ABL (lignée cellulaire Ba/F3) témoigne notamment de l'efficacité de cette voie alternative. Ces résultats encourageants ont incité nos collaborateurs à tester l'ACA sur des lignées cellulaires du syndrome myélodysplasique (SMD). Ils ont à nouveau constaté une activité antinéoplasique accompagnée de l'expression de marqueurs autophagiques à la fois sur les lignées sensibles et résistantes au traitement de référence : l'Azacytidine (Figure 35). Malgré ce mode d'action intéressant contre les deux hémopathies myéloïdes LMC et SMD, l'activité de l'ACA, mesurée à l'aide des tests de métabolisme cellulaire, s'est montrée bien trop faible (CI₅₀ de l'ordre du milli-molaire). Le but est donc ici de réaliser des modifications chimiques variées au niveau de la structure de l'ACA pour obtenir des molécules présentant une meilleure activité contre les LMC et SMD tout en préservant son mode d'action. Par ailleurs, ces nouvelles molécules pourraient servir d'outils chimiques spécialement dédiés à l'étude des relations autophagie-apoptose ou encore autophagie-tumorigénèse.

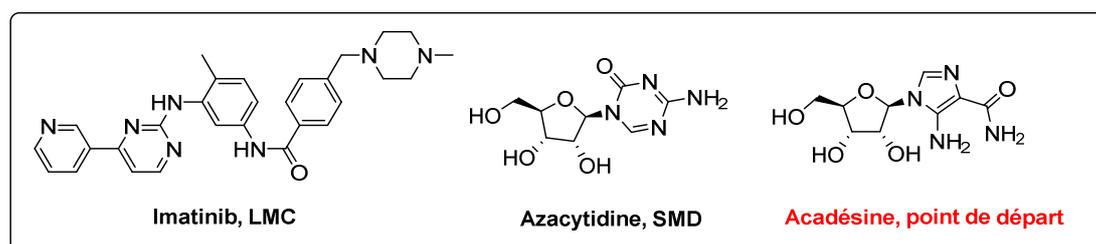
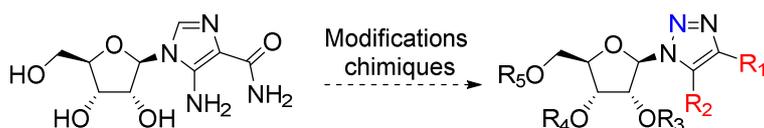


Figure 35 : Structures de l'imatinib, l'Azcytidine et l'acadésine

3.2. Synthèse et évaluation de l'activité antiproliférative d'analogues nucléosidiques de l'ACA

Au laboratoire, une première série d'analogues de l'ACA a été préparée (Tableau 10). La structure générale comprend un noyau ribosyle et un motif triazole qui substitue l'imidazole de l'ACA. Les modifications chimiques réalisées ont porté sur les hydroxyles du saccharide ainsi que les positions 4 et 5 du 1,2,3-triazole. La préparation de cette série de molécules fit appel aux deux voies de synthèse des 1,2,3-triazoles 1,4,5-trisubstitués décrites au chapitre 2, à savoir : la CuAAC-Piégeage électrophile (Cf. paragraphe 2.3.1) et la CuAAC-couplage oxydatif qui n'était pas encore optimisée.

Tableau 10 : Travaux antérieurs de l'équipe



R ₁	R ₂	CI ₅₀ (μM)	R ₁	R ₂	CI ₅₀ (μM)
-CO ₂ Et	-Allyl	> 10	-CO ₂ Et	-CC-CO ₂ Et	0,4-0,7
-CO ₂ Et	-CO-furanyl	> 10	Ph-	-CC-Ph	> 10
-CO ₂ Et	-CO-thienyl	> 10	4- <i>F</i> -Ph	-CC-4- <i>F</i> -Ph	> 10
4- <i>n</i> Pr-Ph-	-CO- <i>n</i> Hexyl	> 10	-thienyl	-CC-thienyl	> 10
-CO ₂ Et	Ph-	> 10	- <i>n</i> heptyl	-CC- <i>n</i> heptyl	> 10
-CO ₂ Et	-thienyl	> 10	- <i>n</i> Pr-Ph	-CC- <i>n</i> Pr-Ph	> 10

R₃, R₄ et R₅ = H, acétyl, benzoyl, toluoyl/ R₅ = H, R₃ et R₄ = isopropylidène

L'évaluation biologique de ces produits sur une lignée cellulaire de LMC (K562) a montré que les composés portant des groupements de type allyle ou aryle en position 5 du 1,2,3-triazole n'étaient pas actifs (CI₅₀ >10 μM). A l'inverse, elle a indiqué que l'insertion de certains types d'alcynes sur cette position pouvait donner une très bonne activité antiproliférative. Ainsi, les composés **4** et **5** (Figure 36) dont les alcynes portent un ester éthylique se sont montrés efficaces (CI₅₀ = 0,4-0,7 μM). Ces résultats intéressants ont incité notre équipe ainsi que l'équipe du Dr. P. Auberger (C3M) à déposer un brevet (WO2012143624 A2) pour protéger leur utilisation contre les hémopathies myéloïdes, particulièrement, la LMC de stade avancé (phase de transformation aigue).

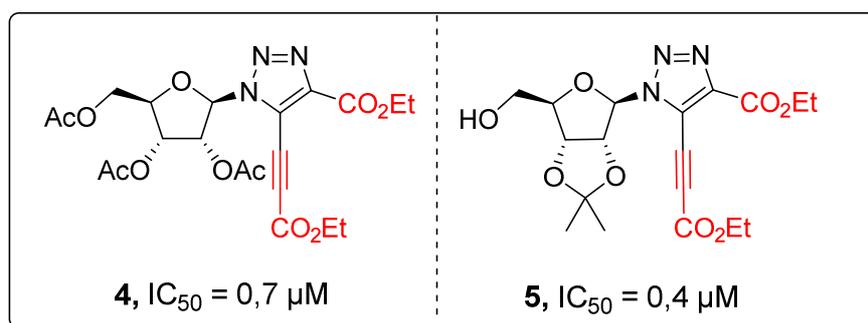


Figure 36 : Structures des composés lead

Le premier objectif de cette thèse a été d'optimiser l'activité antiproliférative des structures lead **4** et **5**. Dans ce contexte, nous nous sommes proposé d'évaluer l'importance de chacun de leurs groupements a) le noyau saccharidique et les groupements portés par ses hydroxyles.

b) le motif 1,2,3-triazole et les groupements qu'il porte au niveau des positions 4 et 5. **c)** Nous nous sommes également attachés à étudier l'influence de changements stéréochimiques. Ainsi, nous avons synthétisé quatre familles d'analogues (**I**, **II**, **III** et **IV**) : pour la famille **I**, nous avons diversifié les groupements portés par les hydroxyles du noyau saccharidique : R_3 , R_4 et R_5 (Figure 37). Pour la famille **II**, nous avons procédé à des changements de type stéréochimique. La famille **III** a été obtenue par fixation de la position 4 du 1,2,3-triazole et variation du groupement porté par l'alcyne (R_2 , Figure 37). Enfin, pour l'obtention de la famille **IV**, nous avons à la fois modifié la nature de l'ester porté en R_1 et R_2 (Figure 37) et évalué l'importance de l'alcyne en position 5 du triazole.

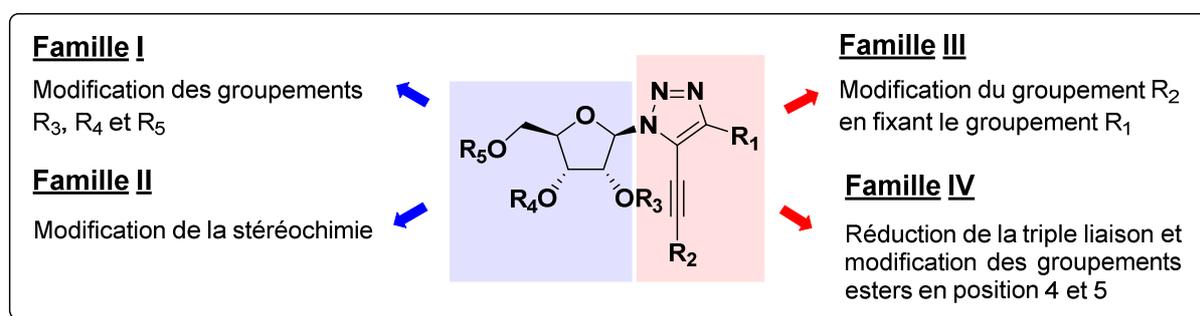


Figure 37 : Récapitulatif des modifications chimiques apportées à la structure *lead*

3.2.1. Famille I- Modification des groupements protecteurs

Nous avons initialement envisagé de ne pas protéger les hydroxyles portés par le noyau ribosyle, en raison de leur influence sur l'hydro-solubilité du produit. Cependant, la déprotection des hydroxyles 2', 3', et 5' de **4** et **5** a été corrélée à une baisse drastique de l'activité antinéoplasique. Dans l'objectif d'obtenir des produits plus actifs, nous avons donc décidé d'insérer différents types de groupements au niveau de ces hydroxyles saccharidiques. Les résultats obtenus sont présentés dans ce qui suit à travers deux parties distinctes : **a)** le chemin réactionnel suivi pour la synthèse des analogues (subdivisé en préparation des synthons azotures et réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif). **b)** l'évaluation des activités antiprolifératives de ces composés.

3.2.1.1. Préparation des synthons azotures de la famille I

La synthèse des azotures de la famille **I** s'appuie sur un intermédiaire clé (**8**, Figure 38) dont les trois hydroxyles sont libres et peuvent être facilement fonctionnalisés. Ce dernier est

obtenu en deux étapes à partir du substrat commercial β -D-tétra-*O*-acétylribofuranose (**6**, Figure 38). La première étape consiste à substituer l'acétyle en position anomère par un azoture selon le mode opératoire de Logue⁸⁸. Elle est catalysée par un acide de Lewis (trifluoroborate) qui, en se liant à l'acétyle en position 1', génère un oxonium (**A**, Figure 38). Ce dernier réagit avec le groupement participant en position 2 bloquant ainsi la face *endo* du ribosyle. Par conséquent, l'attaque nucléophile de l'azoture se produit exclusivement sur la face *exo*. Cette contrainte mécanistique est appelée assistance anchimérique. La deuxième étape permet d'éliminer les groupements acétyles *via* l'action de l'ammoniaque (Figure 38).

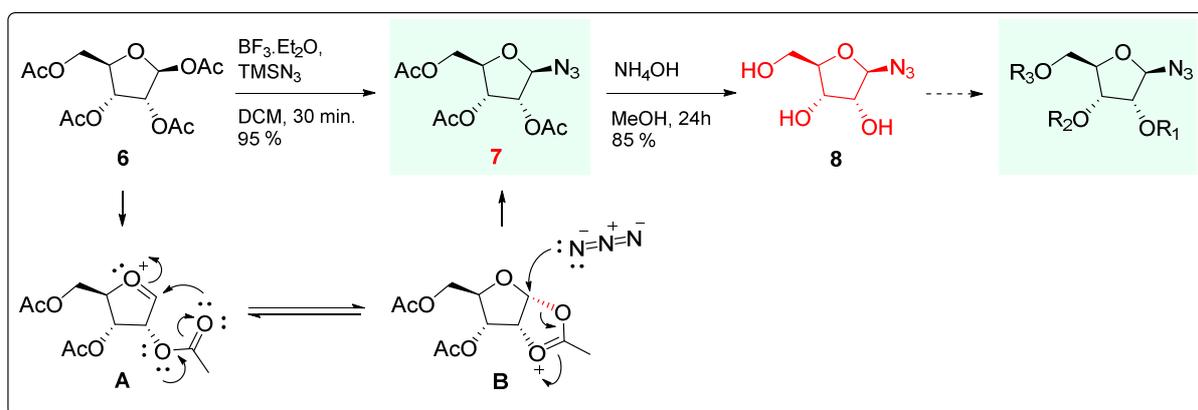


Figure 38 : Formation de l'intermédiaire clé de la famille I

Nous avons constaté que l'hydrolyse des trois acétyles en positions 2, 3 et 5 se faisait de façon non simultanée. Ainsi, le composé **7** ne conduit pas directement au produit **8** mais passe par un intermédiaire dont l'acétyle en position 5 est toujours présent (**9**, Figure 39). Cette régiosélectivité a également été décrite dans la littérature par l'utilisation d'ions fluorures⁸⁹.

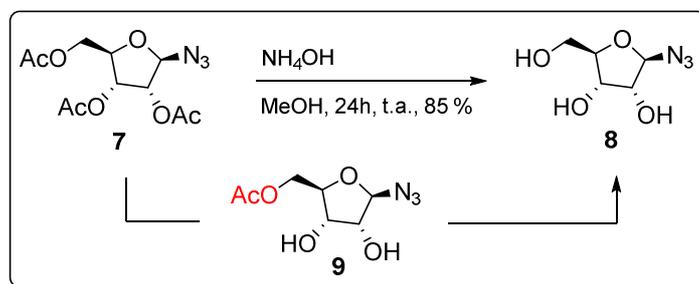


Figure 39 : L'hydrolyse des trois acétyles n'est pas simultanée

Fonctionnalisation du *cis*-diol-2',3' : L'intermédiaire commun **8** a été fonctionnalisé au niveau du 2',3'-*cis*-diol par différents groupements cétaux (Figure 40). Le composé **10** a été

obtenu par utilisation de la heptan-4-one, en présence d'une quantité catalytique d'acide de Brønsted, avec un rendement de 63%. Les composés **11**, **12** et **13** ont été formés en utilisant, respectivement, le 2,2-diméthoxy-propane, le 1,1-diméthoxycyclohexane et 1,1-diméthoxyethylbenzene, en présence d'une quantité catalytique d'acide de Lewis, avec des rendements allant de 68 à 85%. Il est à noter que le temps de réaction pour le composé **10** est nettement plus long pour les trois autres composés (24h vs. 1h).

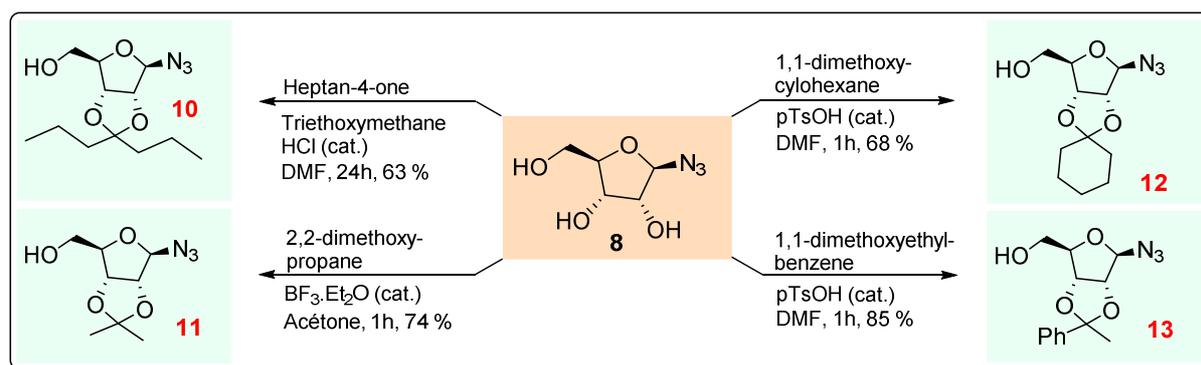


Figure 40 : Protections du diol vicinal

Notons par ailleurs que le composé **13** possède un nouveau centre chiral et que nous n'avons observé qu'un seul de ses diastéréo-isomères. La stéréochimie de ce dernier a été analysée par la technique spectroscopique NOESY. L'observation d'un couplage entre les protons du méthyle et les H₂ et H₃ (Figure 41) nous a permis de déduire que ces noyaux se trouvent tous du même côté du cyclique dioxolane et donc que la configuration du nouveau centre asymétrique est (*R*).

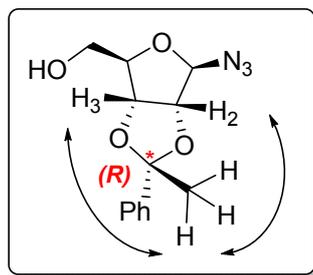


Figure 41 : Configuration du composé 13

En contrôlant les cinétiques d'hydrolyse des acétyles en positions 2 et 3 du ribose par rapport au 5, nous avons pu isoler l'intermédiaire **9** (Figure 39). Afin d'agrémenter l'étude structure-activité, nous avons fonctionnalisé son 2',3'-*cis*-diol en utilisant 2,2-diméthoxypropane

(Figure 42). Ceci a conduit à l'azoture saccharidique **14** dont les trois hydroxyles sont distinctement protégés.

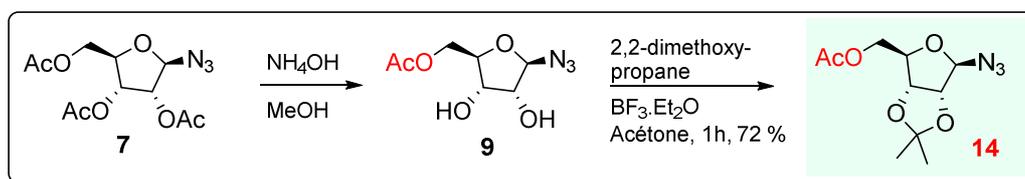


Figure 42 : Préparation de l'azoture **14**

Formation des azotures *O*-méthylés **15 et **16** :** Afin d'aboutir à une relation structure-activité assez complète, nous avons souhaité une plus grande diversification au niveau des groupements portés par les hydroxyles. Dans cet objectif, nous avons décidé de fonctionnaliser les hydroxyles libres des composés **8** et **11** par des groupements méthyles, en raison de leur encombrement stérique minimal et leur bonne stabilité chimique. Les composés **15** et **16** ont ainsi été obtenus par l'action de l'iodure de méthyle sur **8** et **11**, en présence de d'hydrure de sodium (Figure 43).

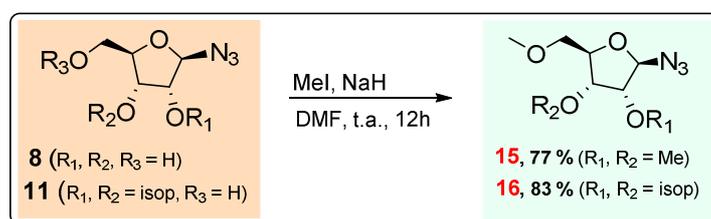


Figure 43 : Formation des composés *O*-méthylés **15** et **16**

3.2.1.2. Réaction Tandem Cycloaddition-Couplage oxydatif appliquée à la famille I

Une fois préparés, les azotures **7** et **10-16** ont été engagés dans le processus tandem cycloaddition/couplage oxydatif (Figure 44) dont l'optimisation a été décrite au Chapitre 2 (Cf. Paragraphe 2.3.2.2). Les triazolonucléosides **4**, **5** et **17-22** constituant la famille **I** ont été obtenus avec des rendements allant de 40 à 64% (Figure 44) et des puretés HPLC satisfaisantes pour une évaluation *in cellulo* (>95%).

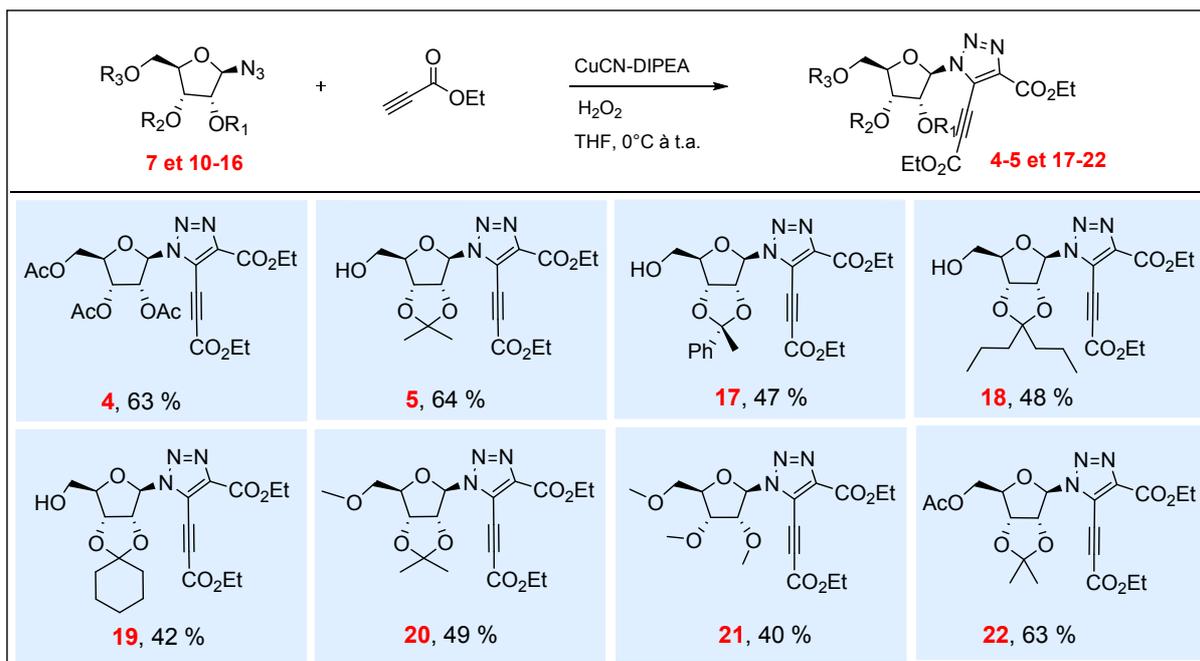


Figure 44 : Formation des produits de la famille I

3.2.1.3. Evaluation biologique des produits finaux de la famille I

L'évaluation de l'activité antiproliférative de l'ensemble de nos produits a été réalisée sur la lignée de LMC K562 en mesurant la viabilité cellulaire par la technique XTT. Avant de présenter les résultats de ces tests pour la famille I, nous allons introduire brièvement la lignée cellulaire K562 ainsi que la technique mentionnée ci-dessus et le protocole général utilisé pour nos tests.

i. Lignée cellulaire K562

Les cellules K562 sont des cellules hématopoïétiques hautement indifférenciées, pouvant s'orienter vers l'une des trois lignées myéloïdes : érythroïde, granulocytaire, monocyttaire (Figure 2). A l'origine, elles ont été prélevées de l'épanchement pleural d'une patiente atteinte de leucémie myéloïde chronique en phase aigüe⁹⁰. Leur caryotype est caractérisé par la présence du chromosome Philadelphie responsable de l'expression de la protéine chimérique BCR-ABL (Cf. Chapitre 1, Paragraphe 1.5.1). L'ensemble de nos molécules a été testé sur cette lignée de LMC afin d'élaborer une étude structure-activité et de sélectionner le meilleur candidat pour des études approfondies de bio-activité.

ii. XTT- Technique de mesure de métabolisme cellulaire

Largement utilisé en biologie cellulaire, le test XTT ⁹¹ est un dosage colorimétrique qui repose sur une réaction chimique transformant le sel de tétrazolium (couleur jaune) en formazan (couleur orange) (Figure 45). Comme cette réaction se produit par l'action de la déshydrogénase NADH mitochondriale, le changement de coloration ne peut être observé que pour les cellules dotées d'un métabolisme fonctionnel, c'est-à-dire viables. Ainsi, une incubation cellulaire avec le composé d'intérêt suivie d'une injection du réactif XTT et d'une lecture de densité optique permet d'évaluer le taux de cellules viables et par conséquent l'activité antiproliférative dudit composé. Dans le cadre de nos tests, les composés ont été dissous dans une solution de DMSO avant d'être injectés au milieu de culture cellulaire et incubés pendant 48h à 37 °C.

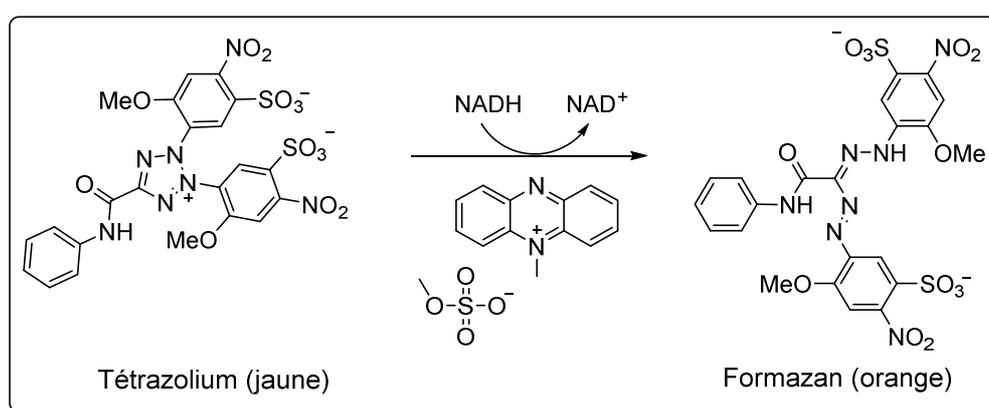


Figure 45 : Réaction colorimétrique du XTT

iii. Résultats des tests de viabilité cellulaire

Les activités antiprolifératives des différents composés de la famille **I** sont présentées sous forme de CI_{50} (Tableau 11). Il s'agit de la concentration requise pour atteindre 50% de l'inhibition maximale pouvant être exercée par un composé actif donné. Les expériences ont été réalisées en triplicata en utilisant 6 à 10 concentrations.

Nous remarquons que les CI_{50} de la famille **I** s'échelonnent de 0,2 à 0,8 μM . Ces valeurs étant du même ordre de grandeur, nous en déduisons que l'influence des groupements protecteurs sur l'activité antiproliférative n'est pas prépondérante. Néanmoins, on peut constater que la présence d'un groupement hydrophobe encombré au niveau du céfal est légèrement plus favorable à une bonne activité. Ainsi, **18** et **19** présentent des CI_{50} légèrement plus efficaces

que les autres composés (en dehors de **5**). Remarquons qu'en comparaison avec l'activité de ces nouveaux produits, les activités antiprolifératives des composés *lead* initiaux **4** et **5**, restent intéressantes et que l'ensemble des produits de la famille **I** présente une activité 1500 à 5000 fois supérieure à celle de l'ACA.

Tableau 11 : Activités antiprolifératives des composés de la famille I

Produit final	4	5	17	18	19	20	21	22	ACA
CI ₅₀ (μM)	0,7	0,4	0,5	0,2	0,4	0,6	0,8	0,5	1000

3.2.2. Famille II- Modification de la stéréochimie

Après avoir évalué l'impact de la fonctionnalisation des groupements hydroxyles sur l'activité antiproliférative, nous avons voulu étudier l'influence de la stéréochimie du saccharide. L'un des éléments les plus importants pour l'affinité ligand-récepteur, est en effet l'agencement spatial du ligand. Dans ce contexte, nous avons synthétisé les énantiomères des deux produits *lead* **4** et **5**. Nous avons également substitué le noyau ribofuranose par son épimère xylofuranose. Comme pour la famille **I**, la synthèse des produits composant la famille **II** est présentée préalablement à l'évaluation de leur bio-activité *in vitro*.

3.2.2.1. Préparation des azotures de la famille II

i. Stéréochimie L

Pour synthétiser les énantiomères de **4** et **5**, nous avons suivi la même séquence réactionnelle établie pour **7** et **11** mais en partant du β-L-tétra-O-acétylribofuranose (**23**, Figure 46). Les azotures **24** et **25** ont ainsi été obtenus (Figure 46).

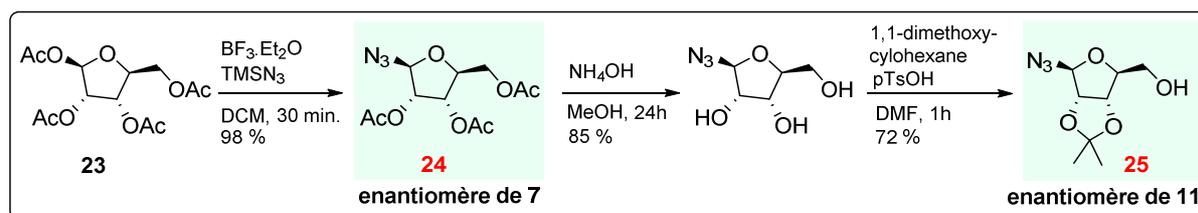


Figure 46 : Préparation des azotures de stéréochimie inversée

ii. Xylofuranose

Pour la synthèse du 1-désoxy-1-azido-2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-xylofuranose (composé **26**, Figure 47), nous avons utilisé le D-xylose comme substrat de départ. La première partie de la synthèse consistait en la préparation de l'intermédiaire tétra-*O*-acetyl-D-xylofuranose (**25**). Celle-ci s'est déroulée en 3 étapes, sans purification intermédiaire. Tout d'abord, le D-xylose a été cyclisé sous la forme du méthyl-D-xylofuranoside par glycosylation de Fischer. Ensuite, les hydroxyles en positions 2, 3 et 5 ont été acétylés. Enfin, la position anomère a été déprotégée en milieu acide puis acétylée. Ainsi, le tétra-*O*-acetyl-D-xylofuranose (**26**) a été obtenu au terme de ces 3 étapes et d'une seule purification avec un rendement de 47%. Ce dérivé en main, nous avons procédé à l'azidation décrite plus haut (Figure 38) en position 1 *via* l'action de l'azoture de triméthylsilyle sous une catalyse acide. Le produit **27** a ainsi été obtenu avec un rendement de 47% (Figure 47).

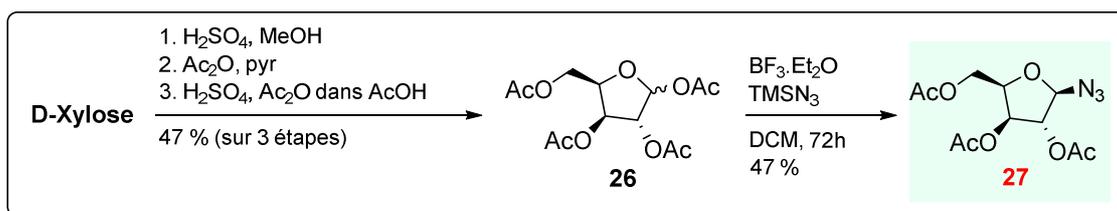


Figure 47 : Schéma réactionnel général pour le dérivé xylofuranose

Comme dans le cas de **7** et **11**, la configuration absolue du centre anomère a été fixée *via* l'assistance anchimérique. Par ailleurs, nous remarquons, pour la formation de l'épimère **27**, un rendement deux fois inférieur et un temps de réaction beaucoup plus long que dans le cas du ribosyle (47% *vs.* 95% et 72h *vs.* 30 min.). Ceci peut être expliqué par la présence de l'hydroxyle acétylé 3' au niveau du plan *exo*, ce qui gêne très probablement l'attaque nucléophile de l'azoture.

iii. Glucopyranose et 2-désoxyribose

Afin d'étendre davantage la diversification structurale du motif saccharidique, nous avons choisi d'ajouter à cette catégorie deux composés : le glucopyranose et le 2-désoxyribose. Le premier fournira une forme cyclique totalement différente qui enrichira la relation structure-activité et le deuxième permettra d'évaluer l'importance de l'hydroxyle en position 2'.

1-azido-1-désoxy-β-D-glucopyranose (29) : est obtenu à partir du penta-*O*-acetyl-D-glucopyranose (**28**, Figure 48) *via* la substitution préalablement décrite de l'acétyle en position anomère par un azoture. Notons que la configuration est à nouveau fixée grâce à la présence du groupement participant en position 2.

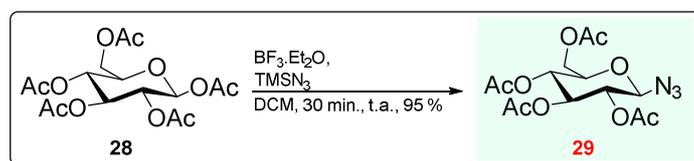


Figure 48 : Préparation de l'azoture "glycopyranose"

β-D-2-désoxy ribofuranose (30) : est préparé en cinq étapes à partir du 2-désoxyribose (Figure 49). Les deux premières permettent de protéger les hydroxyles de façon orthogonale *via* 1/ une glycosilation de Fischer, dans le méthanol en présence d'une quantité catalytique de HCl 2/ une acylation des hydroxyles 3 et 5 par le chlorure de toluoyle dans la pyridine. Le composé **II** donne ensuite le chlorosucrose correspondant (**III**) par traitement avec du HCl gazeux dans l'acide acétique comme solvant. Remarquons que le chlorosucrose **III** est exclusivement de configuration α en raison de l'effet anomère. Il est collecté par simple filtration car il précipite dans l'acide acétique. Il est ensuite mis en réaction avec de l'azoture de sodium pour générer l'azidosaccharide **IV** (anomère β majoritaire) par substitution nucléophile. Enfin, la déprotection des hydroxyles de **IV** conduit à l'azoture **30** avec un rendement global de 41%.

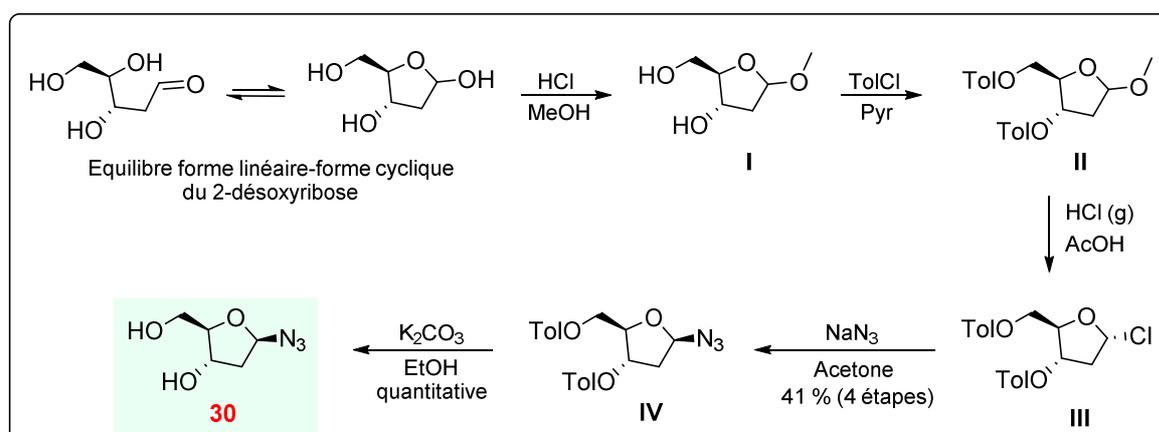


Figure 49 : Préparation de l'azoture désoxyribofuranose 30

3.2.2.2. Réaction Tandem Cycloaddition-Couplage oxydatif appliquée à la famille II

Comme pour la famille I, les azotures synthétisés (**24**, **25**, **27** et **29**) ont servi de substrats pour la formation des 1,2,3-triazoles 1,4,5-trisubstitués à travers la réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif. Par contre, pour obtenir le produit final portant le motif 3',5'-*O*-acétyl-2'-désoxyribofuranose, on passe par deux étapes : **1**) la réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif sur l'azoture **30**. **2**) Acétylation des groupements hydroxyles de **35** (Figure 50). Le rendement global de ces deux étapes est de 13% (rendement non optimisé). Les rendements obtenus pour les autres produits de la famille II s'échelonnent de 33 à 72% et les puretés HPLC de l'ensemble de ces nouveaux analogues ont été satisfaisantes pour une évaluation *in cellulo* (>95%) (Figure 50).

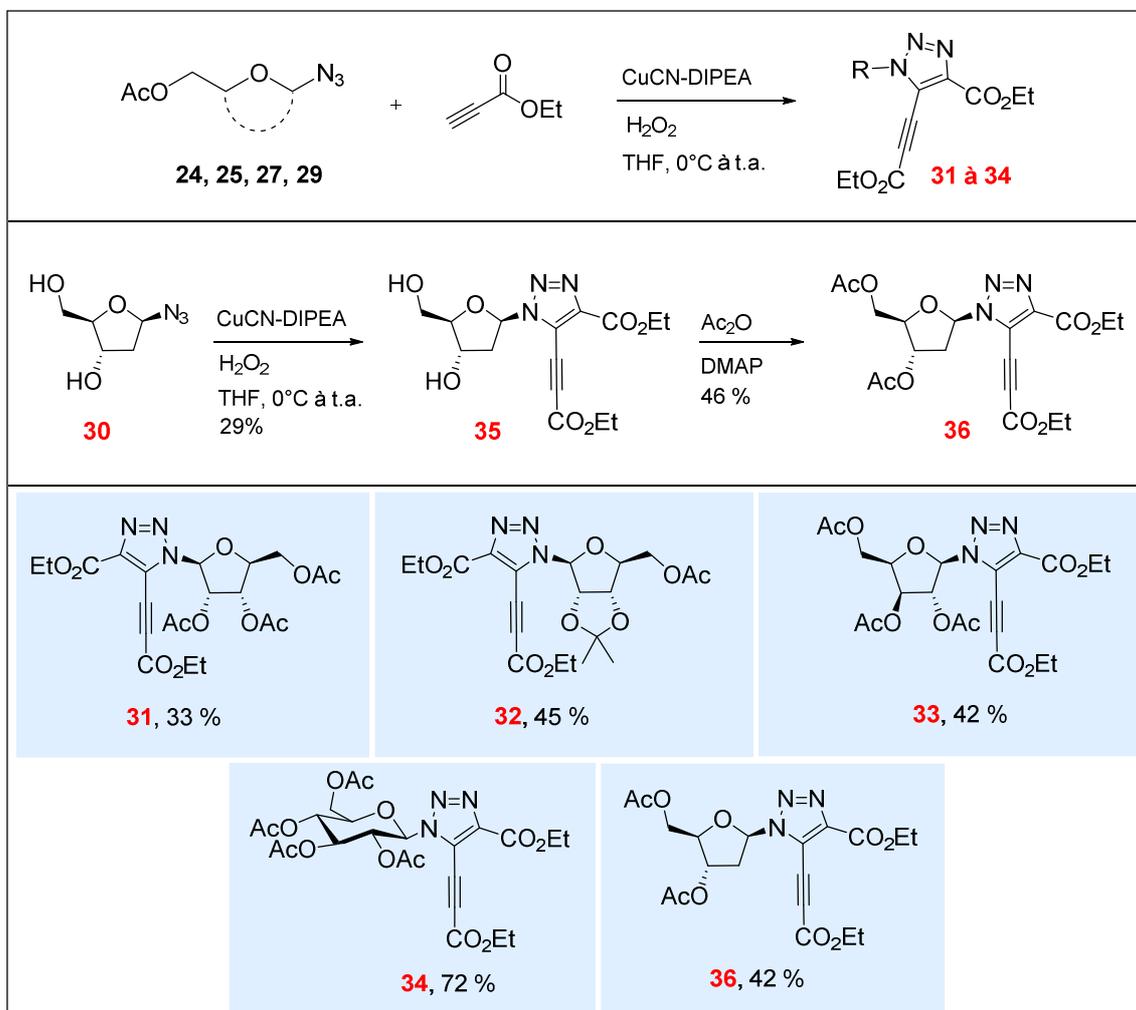


Figure 50 : Formation des produits finaux de la famille I

3.2.2.3. Evaluation biologique des produits finaux de la famille II

Les composés de la famille **II** ont été testés en suivant le protocole décrit pour la famille **I**. Les résultats sont présentés dans le Tableau 12. A titre de comparaison, l'activité de l'ACA y est également rappelée. Nous observons que les composés **31** et **32** présentent des activités proches de celles de leurs énantiomères respectifs **4** et **5** (CI_{50} (**31**) = 0,5 μ M et CI_{50} (**32**) = 0,6 μ M vs. CI_{50} (**4**) = 0,7 μ M et CI_{50} (**5**) = 0,4 μ M). De même, nous observons pour les composés **33** et **36** des activités satisfaisantes (CI_{50} (**33**) = 0,2 μ M et CI_{50} (**36**) = 0,2 μ M). Ceci semble indiquer que la stéréochimie des composés *lead* **4** et **5**, ainsi que l'hydroxyle qu'ils portent en position 2' n'est pas indispensable à une bonne activité. Enfin, le glucopyranoside **34** présente une CI_{50} aussi intéressante que celle de son analogue ribofuranoside (0,7 μ M dans les deux cas). Nous pouvons déduire de ces résultats que les modifications structurales au niveau du motif saccharidique influencent peu l'activité biologique.

Tableau 12 : Activités antiprolifératives des composés de la famille II

Produit final	31	32	33	34	36	ACA
CI_{50} (μ M)	0,5	0,6	0,2	0,7	0,2	1000

3.2.3. Famille III- Modification des groupements en positions 4 et 5 du triazole

Les modifications chimiques antérieures réalisées par l'équipe (Tableau 10) montrent que les positions 4 et 5 du 1,2,3-triazole ont une influence significative sur l'activité antiproliférative. Nous pouvons notamment remarquer la différence d'activité entre le composé *lead* **4** et ses analogues **A** et **B** (Figure 51) qui ne diffèrent, d'un point de vue structural, que par les positions 4 et 5 du triazole. En outre, les composés **4** et **A** présentent le même substituant en position 4 du triazole. Leur différence d'activité révélerait donc l'importance de l'alcyne position 5. Pourtant, le composé **B** qui est doté d'un alcyne en position 5 ne présente pas une meilleure activité que **A**.

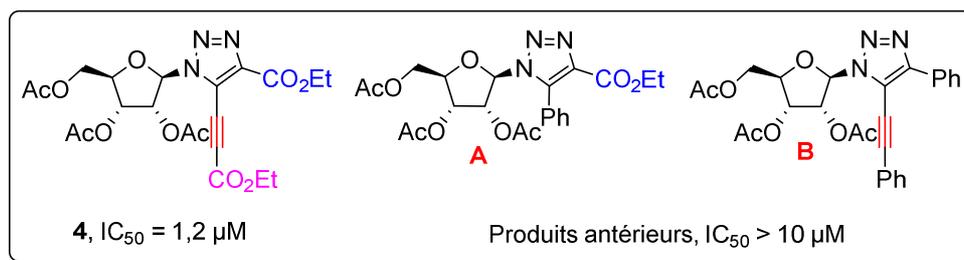


Figure 51 : Différence d'activité entre 4 et ses analogues

Suite à ces observations, deux hypothèses peuvent être émises : **a)** La position 5 du triazole doit comporter un groupement ethynylester. **b)** Les motifs ester et ethynylester doivent tous les deux être présents en positions 4 et 5, respectivement. Afin d'étudier ces hypothèses, nous avons décidé de maintenir un ester éthylique en position 4 du triazole et de modifier le groupement R_2 à l'extrémité de la fonction ethynyle en position 5 (Figure 52).

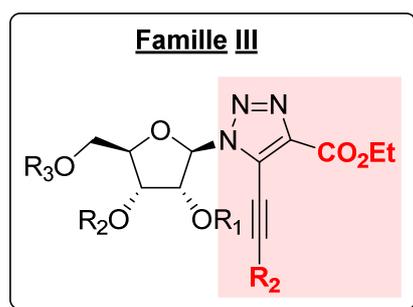


Figure 52 : Structure générale des analogues de la famille III

3.2.3.1. Préparation des azotures de la famille III

Pour la synthèse de l'ensemble de la famille III, nous avons utilisé les azotures **7** et **11** dont la formation a été décrite dans la section précédente (Figures 38 et 40).

3.2.3.2. Formation des 1,2,3-triazoles 1,4,5-trisubstitués de la famille III

Les triazoles de la famille III ont été obtenus *via* deux étapes successives.

Première étape : La première étape consistait en une séquence de cycloaddition de type CuAAC, azoture-propiolate d'éthyle, suivie d'un piégeage électrophile afin d'obtenir le 5-iodo-1,2,3-triazole, comme décrit précédemment (chapitre 2, paragraphe 3.1). Les composés

37 et **38** ont ainsi pu être obtenus à partir des azotures **7** et **11** avec des rendements respectifs de 40 et 32%.

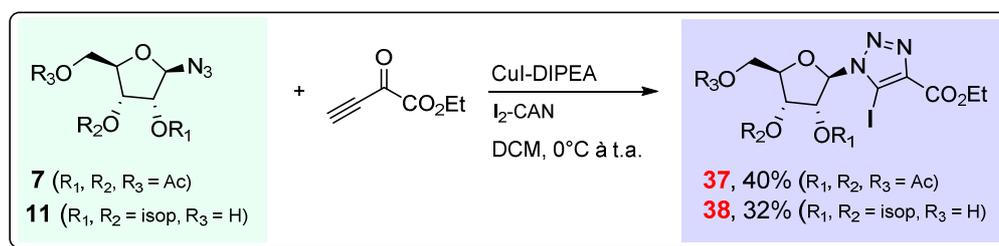


Figure 53 : Synthèse des 5-iodo-triazoles

Deuxième étape : La deuxième étape s’est appuyée sur la fonction 5-iodo tout juste introduite pour coupler une variété d’alcynes vrais par couplage de Sonogashira.

Les conditions de couplage appliquées aux 5-iodotriazoles **37** et **38**, sont celles qui sont couramment employées dans la littérature⁹² et font appel à un catalyseur de palladium $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ et un co-catalyseur de cuivre (CuI) en présence de triéthylamine comme base. Comme ces conditions n’ont pas été optimisées, elles ont donné des rendements faibles mais ont tout de même permis d’obtenir les produits **39-45** (Figure 54). Ces derniers portent différents types de groupements R_2 en position terminale de l’alcyne (phényle, tolyle, 4-fluorophényle, *n*-héphyle et triméthylsilyle). Remarquons que le produit **46** est obtenu *via* la déprotection de l’intermédiaire silylé correspondant, par action du fluorure de tétra-*n*-butylammonium.

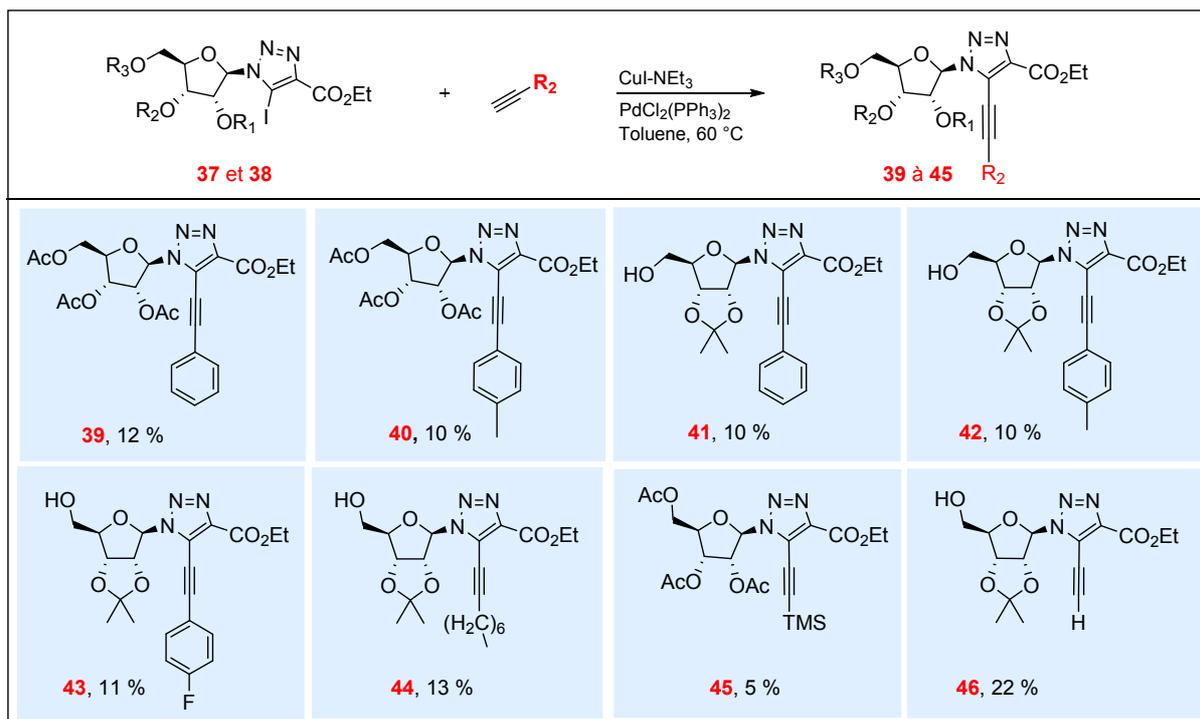


Figure 54 : Formation des produits finaux de la famille III par couplage croisé

3.2.3.3. Evaluation biologique des produits finaux de la famille III

Le protocole suivi pour les évaluations biologiques est décrit dans le paragraphe 2.1.3. Les résultats sont présentés dans le tableau 13 sous forme de CI_{50} . Nous avons décidé d'ajouter à la liste des composés à tester les produits intermédiaires **37** et **38**. L'activité de l'ACA est également rappelée à titre de comparaison.

De façon intéressante, nous observons pour l'ensemble des produits de la famille III des CI_{50} supérieures à 10 μM sauf pour le composé **45** dont la CI_{50} est de 8 μM . Les activités de cette famille sont donc faibles en comparaison aux activités des composés *lead* **4** et **5**. Ce résultat permet d'affirmer l'influence prépondérante du groupement terminal de l'alcyne (R_2 , Figure 52) sur l'activité du produit. Nous observons ainsi qu'un groupement hydrophobe, qu'il soit aromatique (phényle, tolyle, 4-fluorophényle), aliphatique (*n*-héptyle) ou bien même silylé (triméthylsilylé), est nuisible à l'activité antiproliférative. De plus, nous constatons une faible activité pour le composé **46**, ce qui prouve la nécessité de fonctionnaliser la position terminale de l'alcyne par un ester. Enfin, les composés **37** et **38** confirment l'influence prédominante du groupement en position 5 du triazole.

Tableau 13 : Activités antiprolifératives des composés de la famille III

Produit final	39	40	41	42	43	44	45	46	37	38	ACA
CI ₅₀ (μM)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	8	>10	>10	>10	1000

3.2.4. Famille IV- Modification des groupements esters et réduction de la triple liaison

La famille d'analogues **III** montre que la nature du groupement inséré en position terminale de l'alcyne est d'une importance capitale. Pour optimiser la bio-activité, ce dernier doit donc être choisi judicieusement. Par ailleurs, la famille **I** indique qu'un ester éthylique placé en cette position et en position 4 du triazole est compatible avec une bonne activité antiproliférative. Afin d'évaluer plus en détail l'importance de cette fonction, nous l'avons substituée par deux autres esters : un ester moins volumineux (l'ester méthylique) et un autre présentant, à l'inverse, un fort encombrement stérique (l'ester *tert*-butylique). Nous avons aussi effectué le remplacement de cet ester par une fonction carboxamide. Ces changements ont donné le sous-groupe **IV-1**. En parallèle, nous avons cherché à évaluer l'importance de la géométrie de l'alcyne en position 5 du triazole *via* un deuxième sous-groupe **IV-2**. Ainsi, en partant de **5**, nous avons uniquement modifié l'état d'hybridation des atomes de carbone formant cette liaison. Les chemins réactionnels suivis pour la synthèse de ces deux sous-groupes de produits sont présentés séparément : sous-familles **IV-1** et **IV-2**.

3.2.4.1. Synthèse des produits de la famille IV

i. Préparation des produits de la sous-famille IV-1

Pour la synthèse des produits finaux de la sous-famille **IV-1**, nous avons utilisé les azotures **7**, **11** et **14** dont la formation a été décrite précédemment (Paragraphe 2.1.1). Les triazoles de cette sous famille ont été obtenus *via* deux chemins réactionnels différents :

a) Remplacement de l'ester éthylique par les esters méthylique et *tert*-butylique (Produits IV-1-1)

Pour modifier la nature de l'ester en positions 4 et 5, nous avons appliqué la réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif (chapitre 2, paragraphe 3.2.2) en utilisant les propiolates de méthyle et de *tert*-butyle au lieu du propiolate d'éthyle (composés **47-50**, Figure 55). Notons

que les rendements des réactions varient entre 21 à 45% et que l'utilisation de l'alcyne encombré (propiolate de *tert*-butyle) a engendré un produit secondaire portant un groupement *cyano* en position 5. Cette observation a été discutée au chapitre 2 (paragraphe 3.2.2).

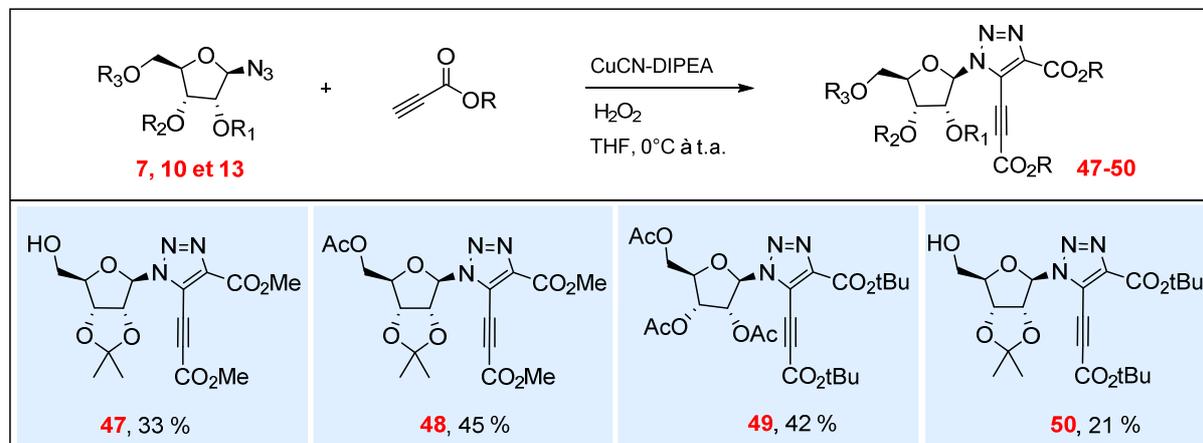


Figure 55 : Formation des produits finaux IV-1-1

b) Substitution de l'ester éthylique par une fonction amide (Produits IV-1-2)

Comme **5** porte deux groupements esters éthyliques (en positions 4 et 5), nous avons souhaité synthétiser deux analogues différents **51** et **52** (Figure 56) en remplaçant, respectivement, un ou deux de ses esters par un amide. D'un point de vue réactionnel, les deux produits sont obtenus de façon séquentielle en faisant buller de l'ammoniac gazeux dans une solution de **5** dans l'éthanol (Figure 56). Remarquons que la structure du composé **52** n'a malheureusement pas été conforme à la structure désirée. Nous avons, en effet, observé une hétéro-cyclisation spontanée de type 5-endo-dig (selon les règles de Baldwin).

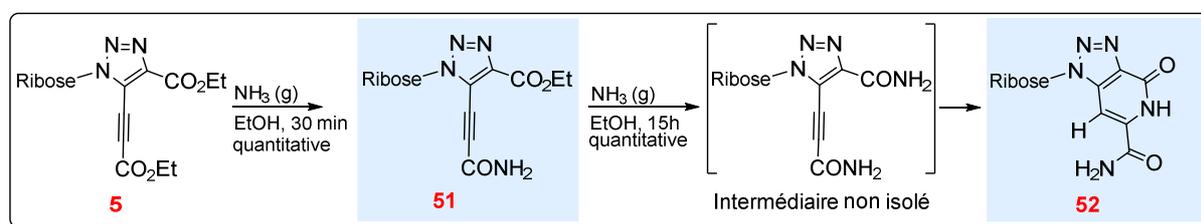


Figure 56 : Formation des produits finaux IV-1-2

ii. Préparation des produits IV-2

Pour évaluer l'importance particulière de la géométrie de l'alcyne, nous avons souhaité obtenir deux analogues du composé **5** où l'alcyne est réduit, respectivement, en alcène **53** (Figure 57) et en alkyle **54**. Ces composés forment la sous-famille **IV-2**.

Le produit **54** a été obtenu par réduction de **5** sous atmosphère d'hydrogène en présence de palladium sur charbon, avec un rendement quantitatif. Le produit **53** a quant à lui été isolé, de façon surprenante, suite à une réaction de couplage de type Sonogashira appliquée au substrat **38**. Pour expliquer la formation inattendue de ce produit, nous pouvons supposer que le couplage croisé a donné le composé **5** et que ce dernier a été réduit *in situ*, de façon subséquente.

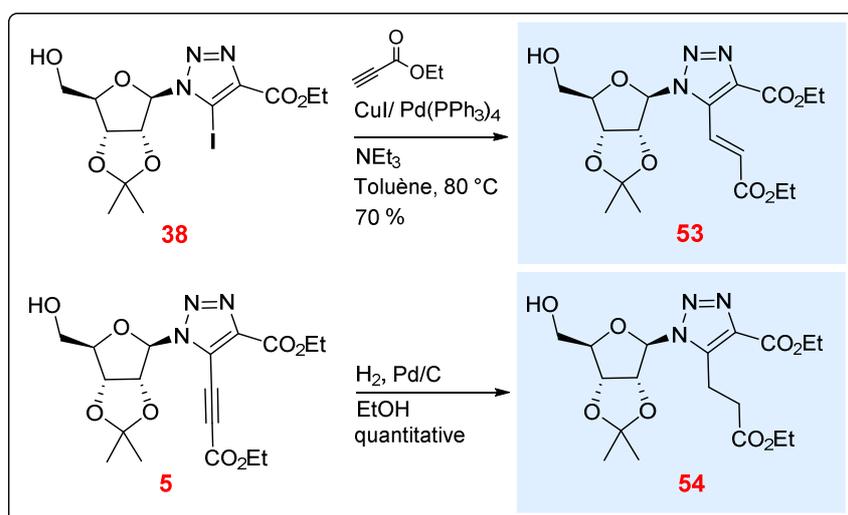


Figure 57 : Formation des produits finaux de la sous-famille IV-2

3.2.4.2. *Evaluation biologique des produits finaux de la famille IV*

Les activités biologiques des produits de la famille **IV** dont les puretés HPLC se sont montrées satisfaisantes (>95%), ont été testées par la méthode XTT (décrite au paragraphe 2.1.3). Les résultats sont présentés ci-dessous (Tableau 14).

Nous constatons que la nature de l'ester inséré en position 4 du triazole et en position terminale de l'alcyne n'influence que légèrement l'activité des produits. Ainsi les CI_{50} de **47** et **48** qui portent un ester méthylique sont comparables aux CI_{50} de **49** et **50** qui portent un ester *tert*-butylique (1,4 et 1,0 μM vs. 1,7 et 1,1 μM , respectivement). En revanche, nous

remarquons une différence majeure entre l'activité de **50** et celle de **41** ($CI_{50} = 1,1 \mu\text{M}$ vs. $CI_{50} > 10 \mu\text{M}$, respectivement). Ces observations permettent de conclure que l'encombrement stérique de cette position n'est pas un facteur discriminatoire, à l'inverse de ses propriétés électroniques.

Nous remarquons pour les produits **52**, **53** et **54** des activités faibles par rapport à celle du composé *lead* **5** ($CI_{50} > 10 \mu\text{M}$ vs. $CI_{50} = 0,4 \mu\text{M}$). L'inefficacité de **52** valide la nécessité de l'alcyne en position 5 et l'inefficacité de **53** et **54** montre l'importance de sa linéarité. Associés aux observations précédentes, ces éléments permettent de conclure que l'enchaînement conjugué alcyne-ester joue un rôle prépondérant dans l'induction de l'activité antiproliférative. D'un point de vue réactionnel, ce motif correspond à un accepteur de Michael, il réagit donc très probablement comme un électrophile. Cependant, le composé **53** qui est également un accepteur de Michael présente une faible activité. L'électrophilie et la conjugaison de ce système ne sont donc pas les seuls éléments importants. La linéarité de la triple liaison semble aussi fondamentale.

Tableau 14 : Activités antiprolifératives des composés de la famille IV

Produit final	47	48	49	50	51	52	53	54	ACA
CI_{50} (μM)	1,4	1,0	1,7	1,1	n.d.	>10	>10	>10	1000

3.2.5. Récapitulatif de l'étude structure-activité

L'étude de la relation structure-activité pour chacune des quatre familles (**I** à **IV**) a permis d'évaluer l'influence de chaque groupement sur l'activité antiproliférative (Figure 58). Ainsi, nous avons établi la nécessité de l'enchaînement alcyne-ester en position 5 pour la bio-activité. A l'inverse, nous avons remarqué que la partie glycone avait une importance limitée ; différents types de saccharides et différents groupements introduits au niveau des hydroxyles sont tolérés. Par ailleurs, l'insertion d'un ester en position 4 et la substitution de l'imidazole par un triazole se sont montrées compatibles avec une bonne activité.

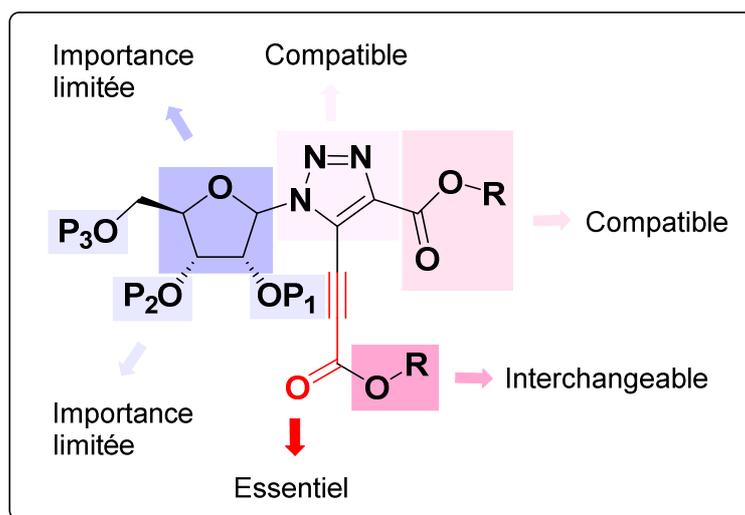


Figure 58 : Récapitulatif Structure-Activité

Afin de sélectionner le meilleur candidat parmi les analogues les plus actifs, nous avons eu recours à plusieurs considérations. Les composés **4** et **22** ont été abandonnés car ils portent des acétyles respectivement en positions 2', 3' et 5' et en position 5', ce qui constitue une source d'instabilité à ajouter aux groupements esters en position 4 et 5 du triazole (la stabilité du composé **4** sera détaillée dans le paragraphe 4.3.1). Les composés **17**, **20**, **21**, **31** et **32**, légèrement moins efficaces que la moyenne, ont aussi été éliminés. Inversement, les composés **5**, **18** et **19**, se sont tous montrés intéressants, tant pour leurs activités antiprolifératives que pour le nombre minimal de sites de métabolisation qu'ils présentent. Cependant, les produits **18** et **19** sont susceptibles d'induire des problèmes d'hydro-solubilité en raison des groupements hydrophobes insérés au niveau de leurs hydroxyles saccharidiques. Pour cette raison, le composé **5** a été sélectionné comme *lead*-optimisé pour des évaluations biologiques approfondies.

Le composé **5** a été sélectionné suite aux tests d'activités préliminaires réalisés sur la lignée cellulaire de LMC K562 *via* la technique XTT. L'objectif de cette thèse étant le développement de composés actifs à la fois contre les lignées sensibles et résistantes des deux hémopathies malignes LMC et SMD, il était primordial de tester l'activité de **5** contre ces pathologies.

3.2.6. Tests de Cytométrie en Flux sur la lignée K562

Avant de passer aux lignées cellulaires sensibles et résistantes de LMC et SMD, nous avons souhaité confirmer l'activité de **5** sur la lignée K562 en utilisant une technique différente du

dosage colorimétrique XTT. La cytométrie en flux (CMF) a ainsi été sélectionnée pour quantifier la mort cellulaire induite par **5**. Remarquons ici que ces deux techniques (XTT et CMF) sont utilisées pour mesurer deux entités différentes, le métabolisme et la mort cellulaire, respectivement.

Cytométrie en flux (CMF ou FACS)

La cytométrie en flux est une technique permettant d'analyser des cellules en suspension, à la fois quantitativement et qualitativement. Son principe repose sur des passages individuels et successifs des cellules devant une source lumineuse, d'où la notion de flux. La diffusion de lumière qui en résulte (réfraction, diffraction et réflexion) donne accès à différentes propriétés de chaque cellule (morphologie, taille, granularité).

Le but étant ici de mesurer le taux de mort cellulaire, le marqueur d'ADN, 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), a été utilisé ; ce dernier traverse uniquement les membranes des cellules mortes permettant ainsi de les distinguer et les quantifier. Nous avons, pour le composé **5**, testé trois concentrations différentes (0,25, 0,50 et 1,00 μM) en plus d'un contrôle négatif. Les taux de mort cellulaire ont été mesurés après 48h d'incubation en présence de **5**. Le résultat de cette expérience est présenté ci-dessous (Figure 59). Nous observons, pour une concentration de 0,5 μM , une mort cellulaire de 48%. Et à 1,0 μM la mort cellulaire s'élève à 81%. La dose létale (DL_{50}) du composé *lead 5* est donc d'environ 0,5 μM . Ce résultat valide l'efficacité de **5** sur la lignée K562, déjà mise en évidence par dosage colorimétrique XTT ($CI_{50} = 0,4 \mu\text{M}$).

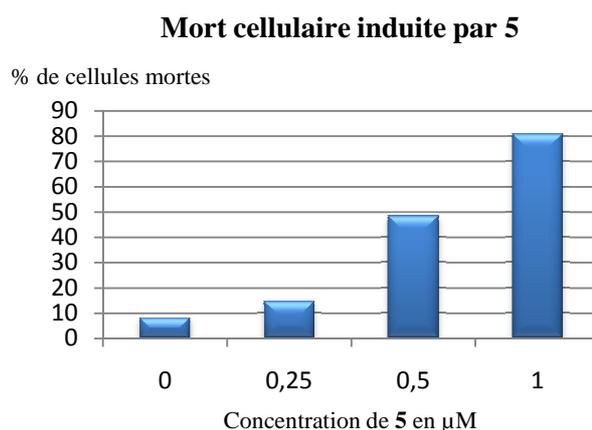


Figure 59 : Activité du composé *lead 5* mesurée par cytométrie en flux (CMF)

3.2.7. Tests XTT sur lignée résistante de LMC et lignées de SMD

Après avoir confirmé l'activité de **5** par CMF, nous l'avons testé sur la lignée résistante de LMC, ainsi que les lignées sensible et résistante de SMD, respectivement SKM1-S et SKM1-R.

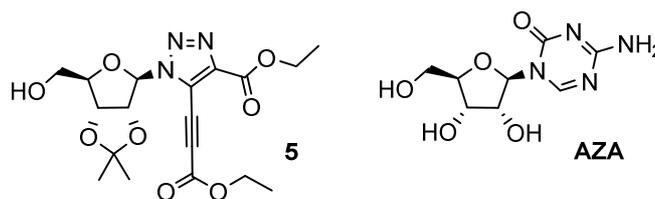
- a) **La lignée K562-R** : est une lignée cellulaire résistante à l'IM. Elle a été générée à partir de la lignée sensible K562 (décrite dans le paragraphe 2.1.3. de ce chapitre) en la traitant avec des concentrations croissantes d'IM⁹³.
- b) **La lignée cellulaire SKM1-S** : est composée de cellules myéloïdes prélevées du sang périphérique d'un patient atteint de SMD⁹⁴. Selon les critères FAB, il s'agissait, précisément, d'une anémie réfractaire avec excès de blastes, en transformation (AREB-t). Etant sensible au traitement de référence, à savoir l'Azacytidine ($CI_{50} = 1,0 \mu\text{M}$), cette lignée est connue sous l'abréviation SKM1-S.
- c) **La lignée SKM1-R** : est une lignée de SMD résistante au traitement de référence (AZA). Elle a été générée par nos collaborateurs biologistes⁹⁵ en cultivant des cellules SKM1-S sous pression croissante en AZA (Concentration initiale $0,1 \mu\text{M}$, doublée tous les 15 jours pendant 6 mois).

Résultat des tests XTT

Les tests d'activité ont été réalisés par XTT (technique décrite au paragraphe 2.1.3 de ce chapitre). Les CI_{50} de **5** sur les lignées K562-R, SKM1-S et SKM1-R sont présentées dans le tableau 15. Notons que pour les lignées SKM1-S et SKM1-R nous avons présenté la CI_{50} du composé référence AZA afin de comparer son activité à celle de **5**.

Nous remarquons que **5** est actif sur la lignée cellulaire K562-R résistante à l'IM. Sur la lignée K562-S, nous observons que le composé **5** est deux fois plus actif que l'AZA ($0,5$ vs. $1,0 \mu\text{M}$). Sur la lignée SKM1-R, le résultat est encore plus intéressant puisque l'activité de **5** est conservée tandis que celle de l'AZA s'effondre. Le composé *lead* sélectionné ne souffre donc pas des mécanismes de résistances développés par K562-R contre l'IM et par SKM1-R contre l'AZA, ce qui est très prometteur pour la suite du projet.

Tableau 15 : Activités de 5 sur les lignées K562-R, SKM1-S et SKM1-R



	K562-R	SKM1-S	SKM1-R
CI ₅₀ de 5	0,3 μM	0,5 μM	0,5 μM
CI ₅₀ de l'AZA	-	1,0 μM	>10 μM

Valeurs des CI₅₀ mesurées *via* le dosage colorimétrique XTT

3.2.8. Tests sur un large panel de cancers

Les résultats des tests sur les lignées cellulaires sensibles et résistantes de LMC et SMD ont permis de mettre en évidence l'activité intéressante du composé 5. Afin d'analyser de façon plus approfondie cette activité biologique, nous avons réalisé des tests sur un large panel de lignées cellulaires tumorales humaines. Dans ce contexte, nous avons eu recours au criblage proposé par le NCI (*National Cancer Institute*)⁹⁶ qui rassemble une soixantaine de lignées cellulaires s'apparentant aux cancers suivants : leucémie, mélanome, cancer du colon, poumon, cancer du système nerveux central, ovaires, sein, prostate, rein. Les résultats sont présentés ci-dessous (Tableau 16), sous forme de GI₅₀ (inhibition de croissance tumorale).

Tableau 16 : Inhibition de croissance tumorale induite par 5 sur un large panel de lignées cellulaires tumorales

Panel/ lignée cellulaire	GI ₅₀ (μM)	Panel/ lignée cellulaire	GI ₅₀ (μM)
Leucémie		Mélanome	
CCRF-CEM	1,33	LOX IMVI	1,71
HL-60 (TB)	2,07	MALME-3M	2,39
K562	1,28	M14	3,11
MOLT-4	3,07	MDA-MB-435	2,03
RPMI-8226	2,23	SK-MEL-2	12,20

SR	1,22	SK-MEL-28	3,25
Cancer du poumon non à petites cellules		SK-MEL-5	16,60
A549/ATCC	20,50	UACC-257	3,78
HOP-62	17,10	UACC-62	3,32
HOP-92	1,79	Cancer de l'ovaire	
NCI-H226	39,90	IGROV1	19,40
NCI-H23	16,10	OVCAR-3	1,32
NCI-H322M	42,20	OVCAR-4	1,94
NCI-H460	16,90	OVCAR-5	3,90
NCI-H522	1,67	OVCAR-8	13,50
Cancer du colon		NCI/ADR-RES	20,10
COLO 205	1,77	SK-OV-3	18,30
HCC-2998	19,00	Cancer rénal	
HCT-15	1,74	786-0	1,74
HT29	2,04	A498	16,60
KM12	13,9	ACHN	1,93
SW620	1,63	CAKI-1	1,66
Cancer du système nerveux central		RXF 393	1,80
SF-268	13,90	SN12C	14,70
SF-295	21,80	TK-10	1,66
SF-539	3,07	UO-31	1,80
SNB-19	16,00	Cancer de la prostate	
SNB-75	5,22	PC-3	15,20
U251	16,80	DU-145	3,45

Cancer du sein	
MCF7	1,77
HS 578T	15,50
BT-549	3,96
MDA-MB-468	1,66

Nous constatons que l'activité du composé **5** est satisfaisante sur plusieurs types de lignées cellulaires, particulièrement, celles impliquées dans les cancers suivants : leucémies, cancers coliques et cancers rénaux. Ainsi, le composé actif **5** présente une relative sélectivité. Ceci peut nous servir pour orienter nos recherches concernant l'utilisation et le développement de **5** en oncologie.

3.2.9. Tests sur des lymphomes B humains

Comme **5** s'est montré actif sur différents types de cancers et que nous nous intéressons dans le cadre de cette thèse aux hémopathies malignes, nous avons décidé de tester son activité sur des lignées de lymphomes B humains. Les tests d'activités ont été réalisés par dosage colorimétrique XTT (Cf. 3.2.1.3, chapitre 3). Les résultats sont présentés sous forme de CI_{50} (Tableau 17). De façon intéressante, le composé **5** s'est montré actif sur l'ensemble des lymphomes étudiés et a présenté des CI_{50} sub-micromolaires pour quatre lignées (DOHH2, JEKO, SU-DHL1 et MEC-1). Ceci confirme l'intérêt de ce produit et conforte sa sélection en tant qu'agent antiprolifératif dans les hémopathies malignes.

Tableau 17 : Activités de 5 sur différentes lignées de lymphomes B

Type de lymphome B (Lignée cellulaire)	CI ₅₀ (μM)	Type de lymphome B (Lignée cellulaire)	CI ₅₀ (μM)
Lymphome folliculaire (DOHH2)	0,2	Lymphomes de Burkitt (Raji)	1,5
Lymphome du manteau (MINO)	1,5	Lymphomes de Burkitt (Daudi)	2,0
Lymphome du manteau (SP53)	2,0	Lymphome B diffus à grande cellules (SU-DHL1)	0,6
Lymphome du manteau (JEKO)	0,8	Leucémie lymphocytaire chronique B (MEC-1)	0,7
Lymphome anaplasique B à grandes cellules ALK+ (Karpas)	1,4		

3.3. Etude pharmacologique du candidat sélectionné 5

En dépit de l'efficacité remarquable de **5** contre une multitude de lignées cellulaires tumorales, on ne peut entreprendre l'étape suivante, à savoir les tests *in vivo*, sans étudier son profil pharmacologique. L'importance de cette étude est expliquée par le concept de *drug-likeness*, présenté dans ce qui suit. Les propriétés pharmacologiques de **5** seront également exposées.

3.3.1. Concept de drug-likeness

Une fois administré, un composé actif suit quatre étapes pharmacocinétiques avant d'atteindre le compartiment ciblé : l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'élimination, l'ensemble étant connu sous l'acronyme ADME. Pour pouvoir interagir avec sa cible avec une concentration suffisante, le composé d'intérêt doit dépasser plusieurs obstacles caractéristiques de ce processus pharmacocinétique : l'acidité du tube digestif, la perméabilité gastro-intestinale, les biotransformations hépatiques (enzymes microsomales), l'action des enzymes plasmatiques... Il est donc important qu'un composé actif puisse franchir ces barrières pour être un candidat médicament satisfaisant. Afin d'évaluer cette potentialité, plusieurs tests sont mis en place. Ils permettent d'établir ce que l'on appelle le profil *drug likeness*⁹⁷. Les propriétés étudiées, dans ce contexte, sont de différents types :

- a) Structurales : ex. liaisons hydrogènes, lipophilie, pKa...
- b) Physicochimiques : ex. solubilité, perméabilité, stabilité chimique
- c) Biochimiques : ex. métabolisme phase I et II, efflux...
- d) pharmacocinétiques : ex. biodisponibilité, clairance...

En plus des caractéristiques citées plus haut, la toxicité (CL₅₀ ou DL₅₀) du composé doit également être évaluée. Pour désigner l'ensemble de ces éléments, on parle de propriétés ADME/Tox.

Règles de Lipinski et Veber

En analysant 2200 composés ayant fait l'objet d'essais cliniques de phase I avec succès, Lipinski ⁹⁸ a réussi à dégager certaines tendances qu'il a retranscrites sous forme de règles. L'objectif de ses travaux était de fournir une approche préliminaire du profil *drug-likeness* en s'appuyant simplement sur la structure du composé actif. Ces règles, communément appelées « règles de Lipinski », stipulent que l'absorption et la perméabilité d'un composé actif sont susceptibles d'être inefficaces si :

- ✓ Son poids moléculaire est supérieur à 500 g.mol⁻¹.
- ✓ Son nombre d'accepteurs de liaison-H est supérieur à 10.
- ✓ Son nombre de donneurs de liaison-H est supérieur à 5.
- ✓ Son coefficient de partage eau/octanol, mesuré en log décimal et noté logP, est supérieur à 5.

Lipinski précise que ces règles ne sont pas valables pour les composés qui sont substrats des transporteurs membranaires. Par ailleurs, les travaux de Veber ⁹⁹ ont permis d'ajouter deux règles pour l'obtention d'une bonne biodisponibilité.

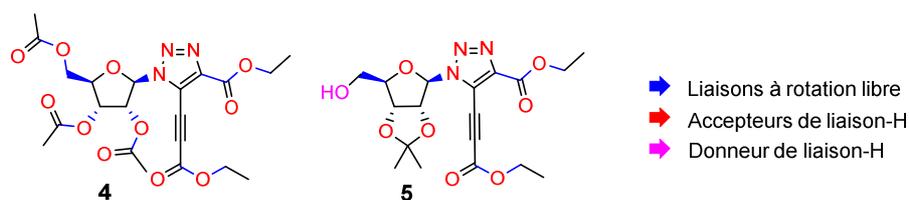
- ✓ Le nombre de liaisons à rotation libre doit être inférieur ou égal à 10.
- ✓ La surface polaire doit être inférieure à 140 Å² ou le nombre de liaisons hydrogènes total (accepteurs et donneurs) doit être inférieur à 12.

Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes intéressés au profil *drug-likeness* du composé actif **5** en vérifiant s'il satisfaisait aux règles de Lipinski et Veber. Nous avons également étudié sa stabilité chimique et métabolique ainsi que sa solubilité et sa toxicité.

3.3.2. Profil Lipinski-Weber du composé 5

Les propriétés structurales du composé **5** sont exposées dans le tableau 18. Nous observons qu'elles sont en accord avec les conditions définies par Lipinski et Veber. Ainsi le poids moléculaire (PM) est inférieur à 500 g.mol⁻¹. Le nombre de liaisons-H, donneurs (DLH) et accepteurs (ALH) confondus, est inférieur à 12. Le coefficient de partage eau/octanol et le nombre de liaisons à rotation libre (LRL) sont également satisfaisants. A titre comparatif, nous avons présenté le profil Lipinski-Weber du composé **4** (Tableau 18). Nous remarquons que son nombre d'accepteurs de liaison-H est largement supérieur à la valeur définie par Lipinski (14 vs. 5). L'ensemble des donneurs et accepteurs de liaison-H dépasse également la limite indiquée par Veber (14 vs. 12). Enfin, le degré de liberté de **4** est excessivement haut ; le nombre de ses liaisons à rotation libre n'obéit pas à la règle de Veber (7 vs. 5). Ces éléments, confortent la sélection de **5** car ils semblent montrer que **4** n'aurait probablement pas réussi à franchir la phase clinique I.

Tableau 18 : Profils Lipinski-Weber des composés 4 et 5



Produit lead	PM	ALH	DLH	logP ^a	LRL ^b
4	495,4	14	0	2,26 +/- 1,41	13
5	409,1	11	1	2,31 +/- 1,40	7

^alogP a été calculé *via* le logiciel ChemSketch. ^bLe nombre de LRL a été calculé suivant la définition de Veber : « une liaison à rotation libre est une liaison simple n'appartenant pas à un cycle et liant des atomes à la fois non terminaux et différents d'un atome d'hydrogène⁹⁹ ».

3.3.3. Tests de stabilité du composé 5

En raison des esters éthyliques présentés par les positions 4 et 5 du triazole, le composé **5** est susceptible d'être instable en milieu biologique. Une hydrolyse conduisant à des fonctions acides carboxyliques est très probable. Avant de tester son activité *in vivo*, nous avons donc souhaité étudier sa stabilité chimique et métabolique.

3.3.3.1. Stabilité chimique et solubilité

Comme la stabilité de **5** est étudiée en vue de préparer les tests *in vivo*, nous avons décidé d'utiliser des solutions pouvant servir de véhicules pour les injections chez les animaux. Les résultats de ces tests permettront ainsi à la fois d'évaluer la stabilité chimique de **5** et de mettre au point des conditions expérimentales adaptées à notre composé pour son étude *in vivo*.

i. Stabilité chimique de 5

Pour obtenir une évaluation préliminaire de la stabilité chimique de **5**, nous l'avons solubilisé dans des solutions composées de PBS (tampon phosphate salin) et de DMA (*N,N*-diméthylacétamide) : 2,44 mM de **5** dans (PBS/DMA : 97/3). Nous avons ensuite analysé son profil de dégradation, en fonction du temps, par suivi HPLC. Les résultats sont présentés par le diagramme qui suit (Figure 60). Nous remarquons que le temps de demi-vie de **5** dans cette solution est de 3 jours. Notons que le même test a été effectué en protégeant le milieu de la lumière et qu'aucun changement n'a été observé au niveau du profil de dégradation ; la lumière n'induit donc pas d'effet particulier. Comme pour le profil Lipinski-Veber, nous avons souhaité étudier la stabilité de **4**, à titre comparatif (Figure 60). Nous observons qu'il se dégrade plus rapidement que **5** ($t_{1/2} = 2$ jours *vs.* 3 jours). De plus, après cinq jours, la quantité restante de **4** est d'environ 5% tandis qu'elle est de 25% pour **5**. Notons, par ailleurs, que cette dégradation ne se produit pas en milieu organique (100% DMSO).

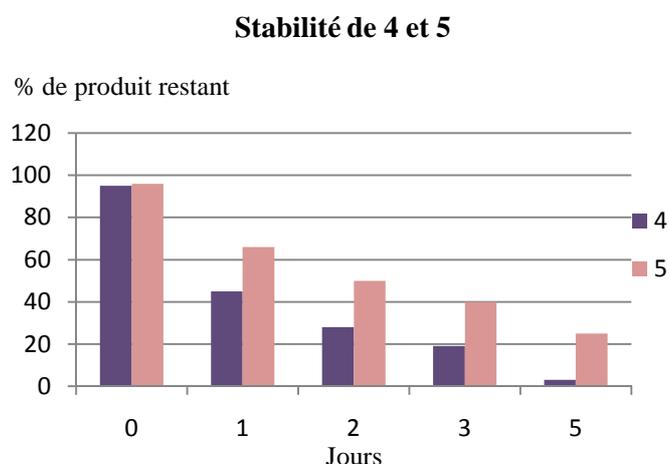


Figure 60 : Stabilité chimique de 4 et 5 dans une solution PBS/DMA : 97/3

Nous avons ensuite testé un deuxième véhicule potentiel. Ainsi, **5** a été solubilisé dans une solution de (PBS/DMA : 85/15) à 2,44 mM. Sa dégradation en fonction du temps a été suivie par HPLC. Ceci n'a pas montré d'amélioration au niveau de la stabilité chimique. Le temps de demi-vie de **5** obtenu pour cette nouvelle solution est en effet identique à celui observé pour le premier véhicule ($t_{1/2} = 3$ jours). Nous en déduisons que le composé *lead 5* devra être mis en solution juste avant d'être utilisé pour les tests *in vivo*.

ii. Solubilité aqueuse limitée de 5

Nous avons réalisé des tests de solubilité pour **5** avec différentes combinaisons de PBS/DMA afin de définir un véhicule pour les injections intraveineuses. Idéalement, il faudrait pouvoir injecter à la souris jusqu'à 250 mg/kg soit une concentration de la solution injectable de 62,5 mg/ml de produit. Seulement, nous avons eu des difficultés à concevoir un véhicule qui puisse solubiliser 62 mg/mL du composé **5** sans être toxique. Nous avons donc dû nous limiter à 16 mg/mL. Le véhicule sélectionné pour solubiliser cette quantité est PBS/DMA : 55/45.

3.3.3.2. Stabilité métabolique

La métabolisation d'un composé consiste à le transformer dans le but de faciliter son excrétion. Cette biotransformation se fait suivant deux phases ; la première permet de changer les groupements portés par le composé *via* des réactions d'oxydations, réductions, hydrolyses, etc. La deuxième phase consiste en l'addition de groupements généralement polaires à la structure du composé en question (ex : acide glucuronique, glutathion, etc.). Ce processus pharmacocinétique constitue un obstacle que le composé actif doit franchir pour pouvoir atteindre sa cible en concentration suffisante. Il est donc primordial d'évaluer la stabilité métabolique d'un candidat médicament avant de passer aux études *in vivo*. Pour simuler cette métabolisation *in vitro*, les microsomes de foie sont parmi les modèles les plus communément utilisés car ils présentent un large panel d'enzymes.

Nous avons étudié la stabilité métabolique de **5** en utilisant des microsomes de foie de souris avec le co-facteur NADPH (forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate).

Résultats

Le pourcentage de produit restant en fonction du temps a été mesuré par HPLC-MS (Figure 61). Nous observons que **5** est rapidement métabolisé et qu'il disparaît totalement à $t = 30$ min. Le temps de demi-vie a également été mesuré : $t_{1/2} = 1$ min.

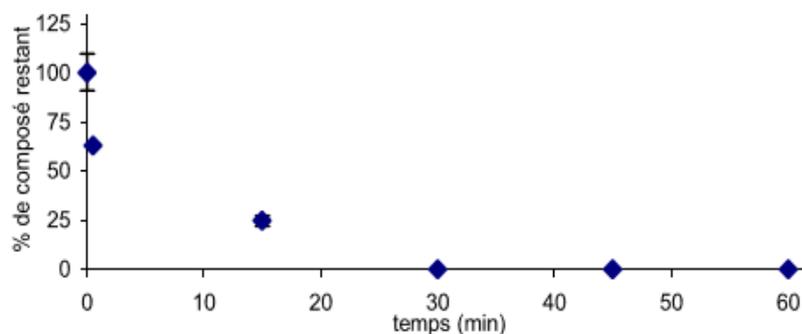


Figure 61 : Cinétique de la métabolisation de **5** dans les microsomes de foie de souris

Une expérience complémentaire en absence de NADPH a par ailleurs montré que la métabolisation ne dépend pas de ce co-facteur. Ceci peut être interprété de deux façons différentes : soit **5** présente une instabilité chimique indépendante des actions enzymatiques, soit sa métabolisation est bien enzymatique mais n'implique pas le Cytochrome P450.

3.3.3.3. *Elucidation des métabolites de 5*

Les tests de stabilité chimique et métabolique montrent que **5** se décompose très rapidement. Ceci pourrait signifier que son activité provient d'un dérivé généré suite à une ou plusieurs transformations. Auquel cas, **5** pourrait être considéré comme une pro-drogue.

i. Concept de pro-drogue

L'approche pro-drogue répond à la nécessité d'améliorer les propriétés pharmacologiques de certains composés actifs qui se montrent très peu efficaces *in vivo*¹⁰⁰. Elle consiste à greffer des groupements labiles permettant de contourner les problèmes de solubilité, perméabilité, biodisponibilité, etc. Ces groupements sont ensuite éliminés par biotransformation pour générer la forme active. Un exemple d'application de cette stratégie est l'amélioration de la perméabilité par masquage de certaines fonctions chimiques (ex : les acides carboxyliques ou les alcools sont masqués par des esters ou des amides).

Parmi les pro-drogues commercialisées, le groupement ester éthylique est largement utilisé comme groupement labile. On peut citer les exemples de l'Oseltamivir et du Benazepril dont la perméabilité est améliorée grâce au masquage de la fonction acide carboxylique (Figure 62)¹⁰¹. Un autre exemple est présenté par la Docarpamine dont les fonctions phénols sont masquées par des esters éthyliques afin d'optimiser la stabilité métabolique¹⁰¹ (Figure 62).

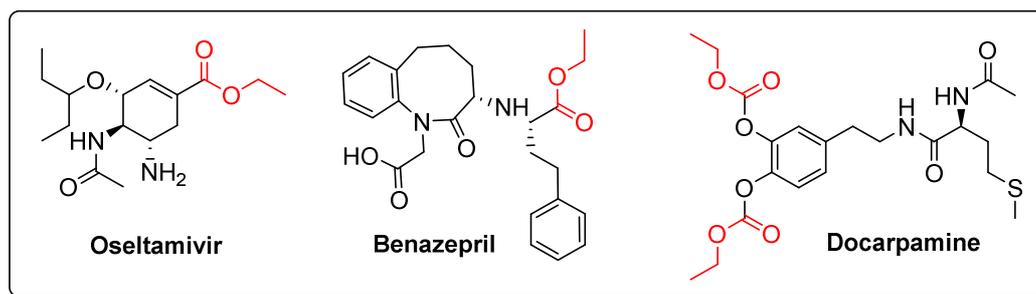


Figure 62 : Exemples de pro-drogues portant des esters éthyliques comme groupements labiles

En nous référant à cette approche, on peut suggérer que le composé **5** agit comme une pro-drogue et que ses esters éthyliques sont des groupements labiles servant à masquer des fonctions acides carboxyliques. Etant donné que **5** n'est pas stable dans les microsomes, on peut supposer que ces groupements labiles interviennent en amont des processus métaboliques. Ils pourraient ainsi donner une meilleure perméabilité. Pour étudier cette possibilité, nous avons identifié les métabolites potentiels de **5** par spectrométrie de masse. Nous les avons ensuite synthétisés et avons testé leurs activités antiprolifératives *in vitro*.

ii. Caractérisation de la décomposition de **5** par LC/MS

L'étude de la stabilité chimique (décrite dans le paragraphe 4.3.1.) a révélé la dégradation de **5** en plusieurs dérivés. Nous nous sommes proposé d'identifier les structures de ces derniers par LC/MS. L'analyse par HPLC a présenté quatre signaux. Une étude analytique de ces derniers a mis en évidence la présence du substrat **5** et de trois autres produits : le composé **55** qui résulte de l'hydrolyse de l'ester éthylique en position 5, le composé **46** qui provient de la décarboxylation de **55** et le composé **56** dont seul l'ester en position 4 est hydrolysé (Tableau 19).

Tableau 19 : Analyse du chromatogramme obtenu suite à la dégradation de 5

Composé	t _r (min)	Aire du pic	m/z	Structure
5	10,29	3,9%	[M+H] ⁺	
55	5,50	87,0%	[M-28] ⁺	
46	5,09	2,1%	[M-72] ⁺	
56	4,85	2,6%	[M-28] ⁺	

iii. Synthèse des dérivés de 5

La synthèse des dérivés de **5** identifiés par l'étude LC/MS a ensuite été entreprise. Nous y avons additionné un quatrième dérivé potentiel **57** où les deux esters sont remplacés par des acides carboxyliques. Notons ici que le dérivé comportant un alcyne vrai **46** a déjà été synthétisé. Il appartient à la famille d'analogues **III** (Cf. paragraphe 3.2.3).

Synthèse des composés 55 et 57

L'hydrolyse de **5** avec la base inorganique faible NaHCO₃ a permis de saponifier l'ester éthylique porté par l'alcyne tout en conservant intact celui en position 4 du triazole. Ainsi le mono-acide carboxylique **55** a pu être préparé avec un rendement de 62% (Figure 63). La saponification des deux esters éthyliques de **5** a quant à elle été réalisée par traitement de ce dernier avec de la soude dans un mélange eau/dioxane. Le diacide correspondant (**57**) a alors pu être isolé avec un rendement quantitatif.

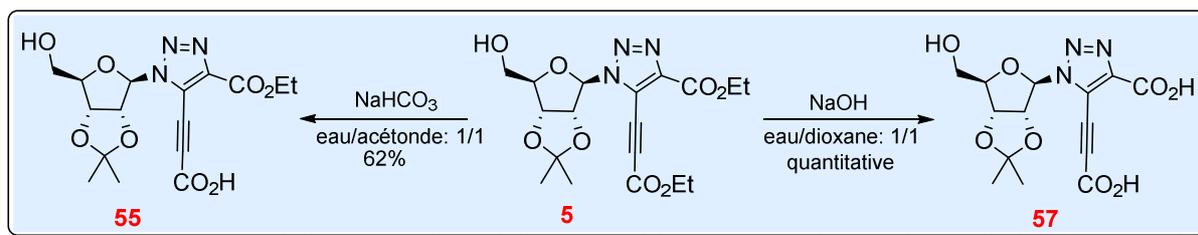


Figure 63 : Obtention de 55 et 57 par hydrolyse de 5

Remarquons que l'ester éthylique en position 4 du 1,2,3-triazole s'est montré plus stable que celui en position 5, en milieu basique ; le dérivé mono-acide (**57**, Tableau 19) n'a donc pas pu être isolé.

iv. Evaluation de l'activité des dérivés de 5

Après leur synthèse, les dérivés **55** et **57** ont été testés pour leurs activités antiprolifératives sur la lignée de LMC K562 en utilisant la technique XTT. Les résultats de ces tests sont présentés sous forme de CI_{50} (Tableau 20). L'activité de **46**, présentée au niveau du paragraphe 3.2.3.3, est représentée ici. Nous observons une activité faible pour chacun des trois dérivés. Ce résultat donne lieu à deux hypothèses différentes : soit aucun de ces produits ne présente la forme active de **5**, soit l'un d'eux est bien la forme active mais est doté d'une perméabilité membranaire médiocre.

Tableau 20 : Activités antiprolifératives des métabolites potentiels de 5

Produit final	46	55	57
CI_{50} (μM)	>10	>10	>10

3.3.4. Toxicité

En parallèle à ces tests de solubilité et de stabilité (chimique et métabolique), la toxicité du composé **5** a été étudiée sur des modèles murins. Ainsi, ce composé *lead*-optimisé a été solubilisé à 8 mg/ml et 16 mg/ml dans le véhicule défini ci-dessus (Cf. paragraphe 3.3.3.1) ; PBS/DMA : 55/45. Ensuite, il a été injecté par voie intraveineuse. Ces tests ont permis d'établir que la dose toxique de **5** est de 50 mg/kg et que sa dose efficace est de 10 mg/kg.

3.3.5. Récapitulatif de l'étude pharmacologique

Les études de stabilité chimique et métabolique indiquent que le composé *lead 5* se dégrade rapidement ($t_{1/2} = 3$ jours dans une solution tampon et $t_{1/2} = 1$ min dans les microsomes de foie de souris). Ces résultats suggèrent que **5** pourrait agir comme une pro-drogue. Afin d'explorer cette potentialité, nous avons analysé le profil de dégradation de **5** par spectrométrie de masse et synthétisé les composés identifiés. Ces derniers ont ensuite été évalués pour leurs activités antiprolifératives sur la lignée cellulaire K562. Mais aucun de ces dérivés ne s'est montré actif. Néanmoins, le composé *lead 5* demeure intéressant au vu de ses activités sur différentes lignées tumorales hématopoïétiques, en particulier, sur les lignées de LMC (K562 et K562-R) et de SMD (SKM1-R et SKM1-S). En plus de la mise en évidence de cette activité antiproliférative prometteuse, nous avons réussi à mettre au point un véhicule satisfaisant grâce aux tests de solubilité réalisés sur **5**. Ces résultats nous ont incités à étudier l'efficacité de ce composé *lead in vivo*. En raison de l'absence de traitement efficace pour le SMD de risque intermédiaire 2 et élevé de l'IPSS classique, que nous appellerons SMD/LAM dans ce qui suit, nous avons décidé de centrer notre étude sur cette hémopathie maligne.

3.4. Etude de l'activité du candidat **5** *in vivo*

Nos collaborateurs biologistes ont réalisé une étude approfondie autour de l'activité de **5** sur le SMD/LAM *in vivo*. Nous présenterons ici seulement une partie des résultats obtenus.

Pour étudier l'activité de **5** *in vivo*, nos collaborateurs ont réalisé des xénogreffes sur des souris *athymiques nudes* en leur injectant par voie intra-péritonéale un million de cellules de la lignée SKM1-R résistante à l'Azacytidine (décrite dans le paragraphe 3.2.7). Ces souris ont été subdivisées en quatre groupes afin d'être traitées différemment. Ainsi, le premier groupe, composé de dix souris, a servi de contrôle et n'a donc pas été traité. Le deuxième groupe, composé de neuf souris, a été traité avec 2,5 mg/kg de **5** par injection intra-péritonéale. Le troisième groupe, également composé de neuf souris, a été traité avec 5,0 mg/kg de **5**. Enfin, le quatrième groupe, contenant neuf souris aussi, a été traité avec 1 mg/kg d'AZA, suivant le même mode d'administration. Le véhicule utilisé pour l'ensemble des tests a été le suivant : DMA/TWEEN80/PBS : 2/5/93 (v/v/v). Les traitements ont été administrés 5j/7 pendant 35 jours. L'analyse des volumes tumoraux pour chaque souris des quatre groupes est présentée ci-dessous.

La mesure de la croissance tumorale moyenne chez les différents groupes montre que le composé **5** freine la progression tumorale avec une efficacité statistiquement significative à **5,0 mg/kg** (Figure 64). De plus, nous constatons que les volumes tumoraux sont plus faibles pour **5** que pour l'AZA.

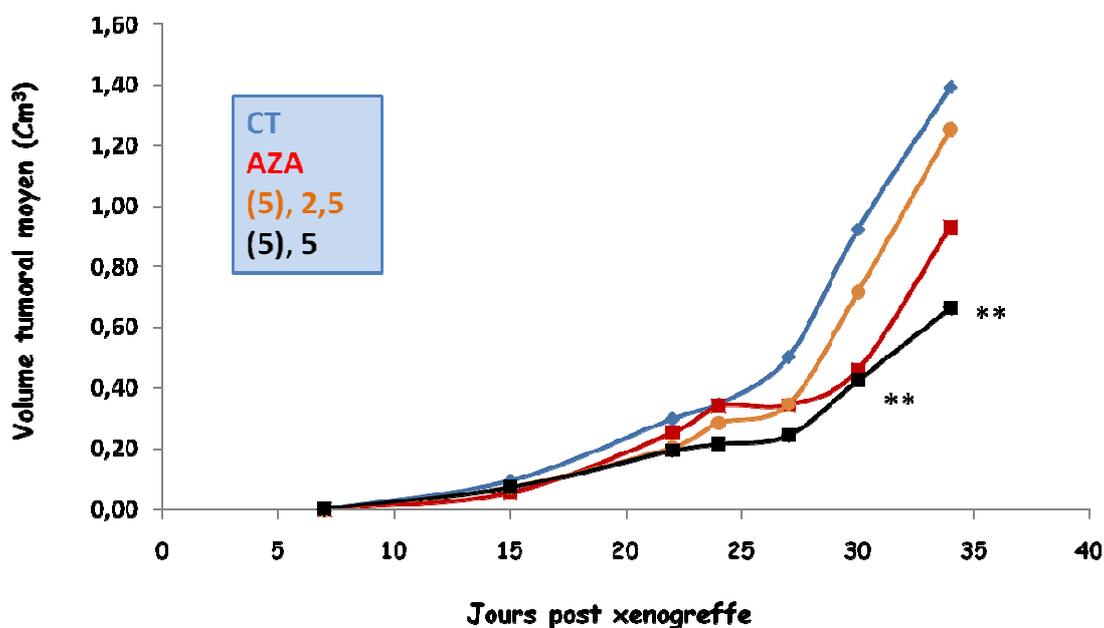


Figure 64 : Mesure du développement tumoral moyen pour les différents traitements

Afin de s'assurer de la sélectivité de **5**, nos collaborateurs l'ont injecté à des souris saines (sans xéno greffe préalable) et surveillé le poids de ces dernières (Figure 65). Cette expérience ne montre pas de perte significative de poids chez les animaux traités. Nous pouvons donc en déduire que le composé *lead 5* n'induit *a priori* pas de problèmes de toxicité aiguë apparente aux doses de 2,5 et 5,0 mg/kg (5j/7j pendant 35j). Sachant que la lignée SKM1-R est extrêmement agressive, les résultats présentés ci-dessus montrent l'intérêt et le grand potentiel de cette famille de molécules à contrecarrer les résistances non seulement pour le SMD mais également pour d'autres pathologies.

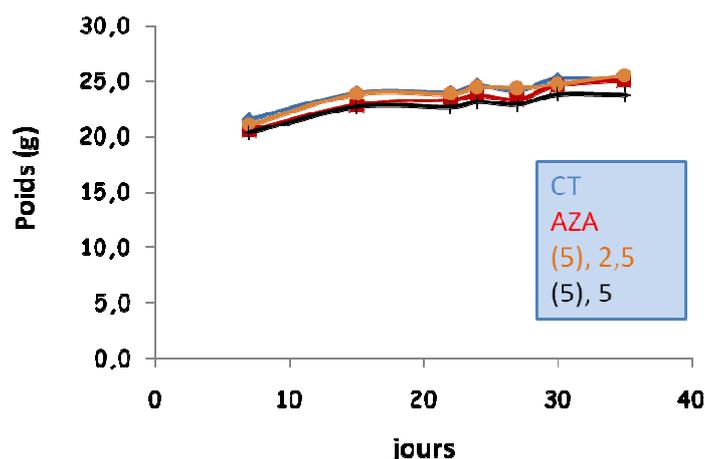


Figure 65 : Evolution du poids en présence des différents traitements

3.5. Mode d'action de 5

Parallèlement aux études *in vivo*, nous nous sommes intéressés au mode d'action de 5. Rappelons ici que cette thèse avait pour objectifs a) L'optimisation de l'activité de l'ACA contre les hémopathies myéloïdes LMC et SMD. b) La conservation de son mode d'action original : induction de la mort autophagique. En se penchant sur le mode d'action, nos collaborateurs se sont ainsi intéressés prioritairement au type de mort cellulaire induite. Ils ont réalisé de nombreux tests à cette fin. Nous présentons ici les résultats les plus importants.

3.5.1. Tests enzymatiques

Les protéases sont des enzymes qui hydrolysent la liaison peptidique. Suivant leur mécanisme catalytique, elles sont subdivisées en six familles : protéases aspartiques, à cystéine, glutamiques, métallo, à sérine, à thréonine (Figure 66). La famille la plus importante est constituée par les protéases à cystéine qui incluent les caspases. Ces dernières étant impliquées dans la régulation et l'exécution de l'apoptose, sont largement utilisées dans les tests de biologie cellulaire pour mettre en évidence un mode d'action apoptotique. Parmi les protéases à cystéine, nous comptons également certaines cathepsines (ex : cathepsines B, C, L...) qui interviennent aussi dans l'étude des mécanismes apoptotiques. Précisons que les cathepsines sont des enzymes protéolytiques lysosomales qui diffèrent par leurs domaines catalytiques et qu'il en existe par conséquent différents types : cathepsines à cystéine (déjà citées), cathepsines à sérine (A et G) cathepsines aspartiques (D et E).

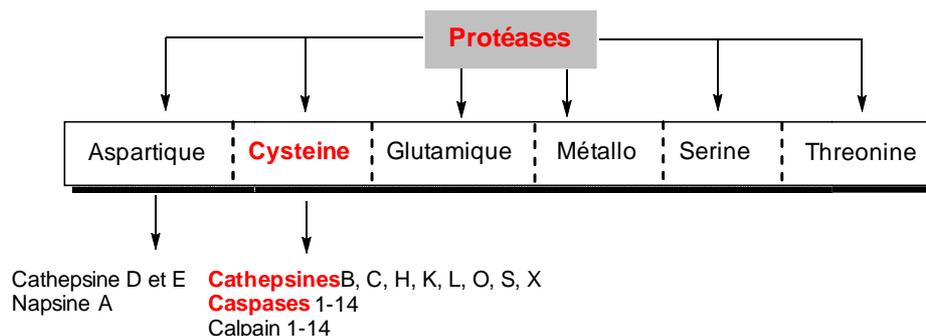


Figure 66 : Classification des protéases ¹⁰²

Résultats des tests :

Afin d'identifier le type de mort cellulaire induite par **5**, les activités de certaines protéases (Cathepsines B et L et caspases 3 et 9) impliquées dans le processus apoptotique ont été mesurées après stimulation de cellules K562 avec ce composé et incubation pendant 48h. Les quatre expériences réalisées pour ces enzymes montrent qu'elles sont toutes activées en présence du composé **5** (Figure 67). Ce résultat semble indiquer que la mort cellulaire induite par **5** repose, au moins partiellement, sur un mécanisme apoptotique.

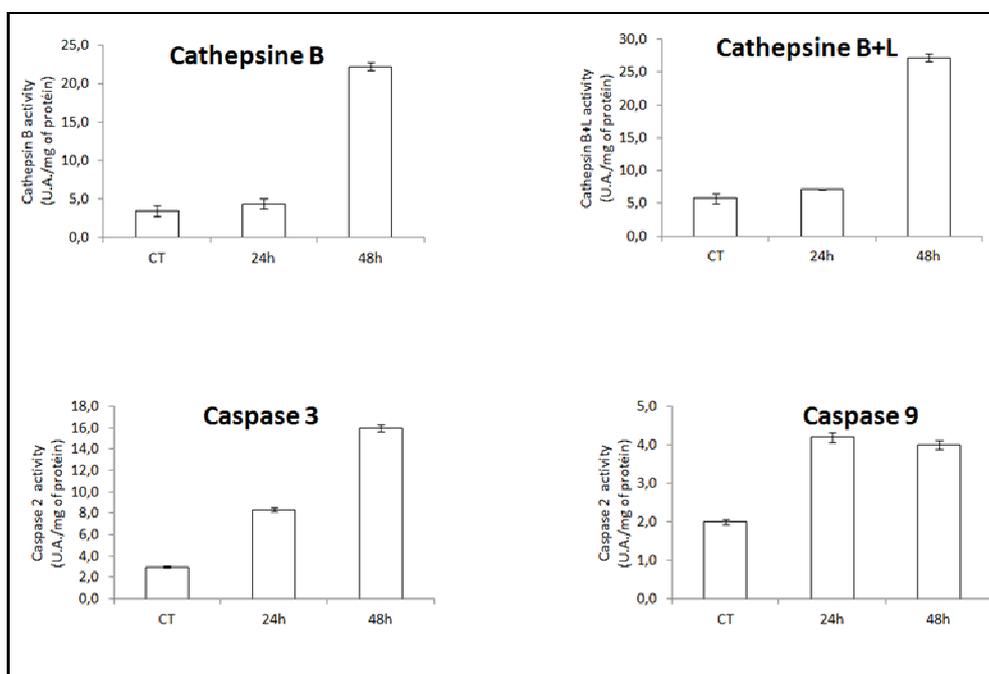


Figure 67 : Mesure de l'activité de certaines protéases « apoptotiques » en présence de **5**

3.5.2. Etude par électrophorèse

Afin d'explorer davantage le mode d'action de **5**, nos collaborateurs ont étudié *via* des expériences de western-blot l'influence de ce composé *lead*-optimisé sur l'expression de trois marqueurs de mort cellulaire.

3.5.2.1. Protéines étudiées

LC3- Marqueur d'autophagie : La protéine LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*, Atg8 chez la levure) est considérée comme un marqueur autophagique. Cette dernière peut se présenter sous deux formes distinctes : LC3-I et LC3-II. Le passage de la forme précurseur LC3-I à la forme activée LC3-II se produit suite au déclenchement de l'autophagie, afin d'assurer la formation de l'autophagosome.

PARP- Marqueur d'apoptose : La protéine PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase) est une enzyme nucléaire qui catalyse la formation d'un polymère d'ADP-ribose en réponse aux cassures de l'ADN. Elle est substrat de la caspase 3. Cette dernière étant un effecteur de l'apoptose, l'observation du statut de PARP est considérée comme un marqueur apoptotique.

HSP60- Marqueur de nécrose : En plus de l'apoptose et de l'autophagie, il existe un troisième type de mort cellulaire : la nécrose. Contrairement aux deux premiers processus qui sont génétiquement codés pour se déclencher dans certaines conditions, la nécrose est une mort cellulaire accidentelle. Elle survient notamment pour les cellules lésées à la suite d'une infection. Afin de déclencher une réponse inflammatoire, ce processus libère des protéines endogènes telles que la protéine de choc thermique HSP60, d'où l'utilisation de cette dernière comme marqueur de la nécrose.

3.5.2.2. Résultats du test

L'observation du statut de chaque marqueur a été effectué avec : un contrôle (DMSO seul), le composé **5** après 24 et 48h d'incubation à la dose de 1 μ M (Figure 68). Nous remarquons pour le marqueur autophagique (LC3) et le marqueur apoptotique (PARP) que leurs expressions s'intensifient entre 24 et 48h en présence de **5**. A l'inverse, nous n'observons pas de changement d'expression pour la protéine de choc thermique HSP60 entre le contrôle et les

échantillons stimulés par le composé *lead*. Ces résultats semblent indiquer que la mort cellulaire induite par **5** implique à la fois les mécanismes d'apoptose et d'autophagie mais qu'elle n'inclut pas la nécrose.

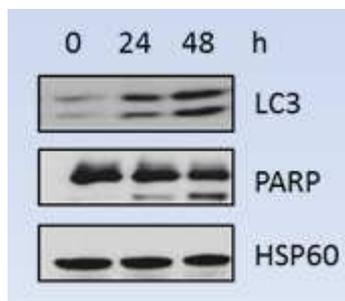


Figure 68 : Etude de la mort cellulaire induite par **5** par électrophorèse

3.6. Conclusion et perspectives du chapitre 3

Afin d'optimiser l'activité de l'ACA contre la leucémie myéloïde chronique, nous avons développé quatre familles d'analogues en étudiant l'influence de chaque groupement porté par cette molécule de départ. Ces travaux ont permis de sélectionner un composé *lead*-optimisé **5** qui s'est montré 2500 fois plus actif que l'ACA : $CI_{50} = 0,4 \mu\text{M}$ vs. 1 mM sur K562. En plus de son activité sur cette lignée cellulaire de LMC sensible au traitement de référence (l'IM), le composé **5** a montré son efficacité sur la lignée cellulaire de LMC résistante à l'IM : CI_{50} sur K562-R = $0,3 \mu\text{M}$. Les travaux de cette thèse étant centrés à la fois sur la LMC et le SMD, nous avons étudié l'activité biologique du composé **5** sur les lignées de SMD sensible et résistante à l'AZA. Ceci a donné des résultats prometteurs : CI_{50} sur SKM1-S = $0,5 \mu\text{M}$ et CI_{50} sur SKM1-R = $0,5 \mu\text{M}$ et nous a incités à approfondir l'étude biologique de ce composé. D'autres lignées tumorales ont ainsi été testées et des activités intéressantes ont été mises en évidence particulièrement contre les leucémies, cancers coliques et cancers rénaux. Le profil pharmacologique d'un composé actif étant important, nous avons étudié la *drug likeness* de **5** via les règles de Lipinski et Veber, sa solubilité, sa toxicité, sa stabilité chimique et sa stabilité métabolique. Le profil de *drug likeness* s'est montré appréciable : le composé **5** obéit à l'ensemble des règles de Lipinski-Veber. Un véhicule satisfaisant pour les études *in vivo* a été défini : 16 mg/mL dans une solution de PBS/DMA : 55/45. La dose efficace s'est révélée suffisamment inférieure à la dose toxique (10 mg/kg vs. 50 mg/kg). Les études de stabilité chimique et métabolique suggèrent que le composé *lead*-optimisé **5** pourrait agir comme une pro-drogue.

A la suite de cette étude pharmacologique, nous avons testé l'activité de **5** *in vivo*, par xéno greffe de cellules SKM1-R sur des modèles murins. Le résultat obtenu a été prometteur : progression tumorale atténuée de façon statistiquement significative par rapport au contrôle et à l'AZA à 10 mg/kg. Des analyses par Western-blot ont enfin été réalisées pour élucider le mode d'action de **5**. Elles ont montré que la mort cellulaire induite par ce produit reposait à la fois sur un mécanisme autophagique et apoptotique.

Perspectives

Une étude plus approfondie autour du mode d'action de **5** est à prévoir. Elle pourrait permettre de mieux saisir l'implication du processus autophagique dans les mécanismes anti-tumoraux. L'évaluation des stabilités chimique et métabolique ont soulevé la potentialité pour **5** d'agir comme une pro-drogue : mais sa forme active n'a pas pu être identifiée. Celle-ci reste donc à élucider. La relation structure-activité a prouvé la nécessité du motif ethynyl-ester, ce qui laisse penser que la réactivité biologique de ce composé *lead* repose sur son caractère accepteur de Michael. Cela pourrait donc nous guider dans la recherche de(s) cible(s).

4. Chapitre 4

Synthèse et évaluation biologique d'analogues non nucléosidiques de l'acadésine

L'étude structure-activité, réalisée pour la série d'analogues nucléosidiques (Chapitre 3, paragraphe 3.2.5), a montré que la partie glycone avait une influence nettement moins importante que celle des autres groupements. Nous avons souhaité tirer avantage de cette observation en développant une deuxième série d'analogues où le ribofuranosyle est remplacé par des motifs non saccharidiques (Figure 69). Nous ambitionnons à travers cette nouvelle famille de produits de : **a)** mettre au point de nouveaux composés *lead*. **b)** vérifier certains des résultats obtenus pour la première série tels que la nécessité de l'alcyne et du groupement ester qui lui est attaché. **c)** Etudier l'influence de la différence structurale entre les deux séries sur le mode d'action.

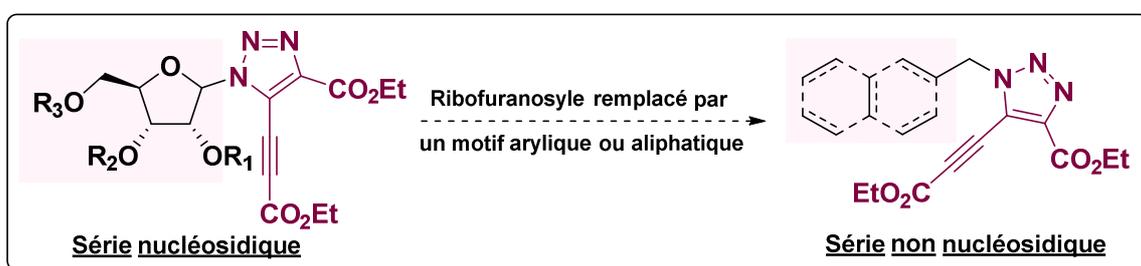


Figure 69 : Structures générales des séries nucléosidique et non nucléosidique

Dans ce contexte, nous avons décidé de synthétiser trois familles d'analogues en apportant différentes modifications structurales (Figure 70). Nous avons souhaité vérifier, en premier lieu, l'importance de l'alcyne pour cette nouvelle série. Ainsi, pour la famille **I'**, la position 5 du triazole a été fonctionnalisée avec différents motifs, en excluant les dérivés d'alcynes. Pour la famille **II'**, nous nous sommes focalisés sur la position 1 que nous avons fonctionnalisée avec différents groupements aryles et alkyles. Enfin, pour la famille **III'**, nous avons modifié les positions 4 et 5 du triazole dans le but d'étudier l'influence particulière des groupements esters.

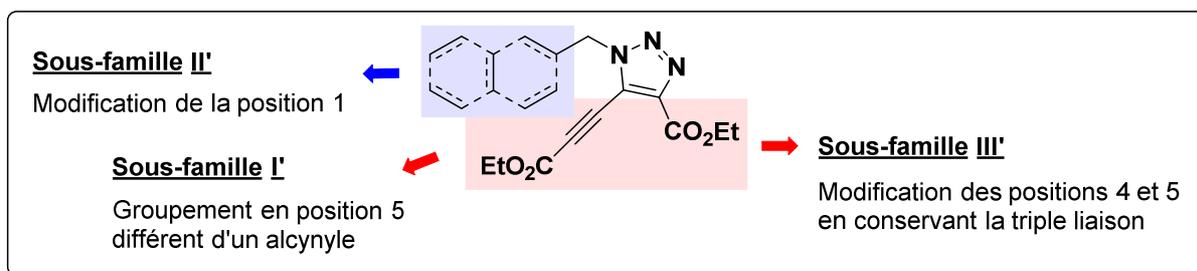


Figure 70 : Modifications envisagées pour la série non nucléosidique

4.1. Synthèse et évaluation de l'activité antiproliférative des analogues non nucléosidiques de l'ACA

Pour chaque famille de produits, nous présenterons les étapes de synthèse (préparation de l'azoture et formation du triazole) suivies de l'évaluation biologique des différents composés.

4.1.1. Famille I' - Modification de la position 5 du triazole

La relation structure-activité réalisée pour les analogues nucléosidiques nous a permis de mettre en évidence l'importance prépondérante de l'alcyne en position 5 (Cf. Chapitre 3, paragraphe 3.2.5). En synthétisant cette nouvelle série d'analogues, nous avons souhaité valider prioritairement ce résultat. Une première famille de produits a donc été synthétisée en fonctionnalisant la position 5 du triazole par des groupements autres que des alcynes. En plus des modifications centrées sur cette position, la famille I' a permis d'effectuer un criblage préliminaire de la position 1 du triazole *via* plusieurs motifs aryliques et non aryliques.

4.1.1.1. Préparation des azotures

Les azotures utilisés pour la famille I' ont été obtenus *via* une substitution nucléophile de type SN₂ en partant des substrats bromés correspondants (Figure 71). Les rendements obtenus pour les différents produits ont été quantitatifs. Nous présentons les structures des azotures synthétisés ci-dessous (Figure 71). Trois synthons de type arylique ont été préparés. Le premier présente un motif 2-méthyl-naphthyle (**1**), tandis que le deuxième et le troisième présentent des noyaux benzyles *para*-substitués par un méthyle (**58**) et un méthoxy (**59**). Les deux derniers azotures sont aliphatiques, respectivement, sous forme cyclique et linéaire **60** et **61**. Notons par ailleurs que l'ensemble de ces composés sont des azotures primaires.

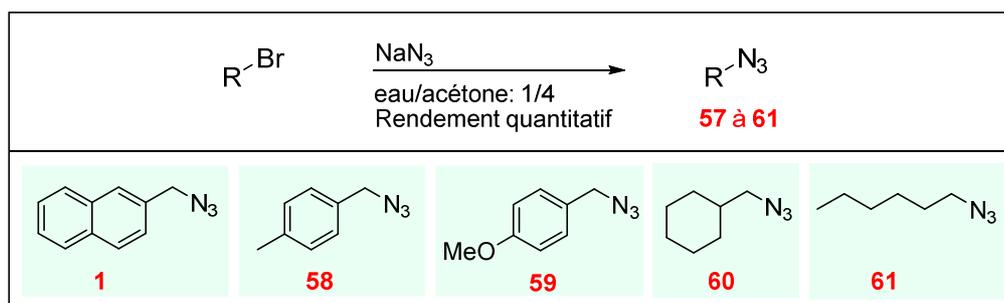


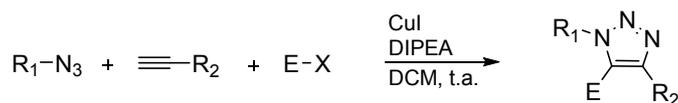
Figure 71 : Obtention des azotures de la famille I'

4.1.1.2. Réaction Tandem Cycloaddition-Piégeage électrophile appliquée à la famille I'

Pour obtenir les 1,2,3-triazoles tri-substitués de la famille **I'**, la réaction tandem cycloaddition-piégeage électrophile (Cf. Chapitre 2, paragraphe 2.3.1) a été appliquée en recourant à plusieurs types d'électrophiles (Tableau 21). Ainsi les produits **62-66** ont été formés en utilisant les chlorures de thionyle ou de furyle. Les iodo-triazoles **67** à **69** ont été synthétisés en employant le diiode et l'ammonium cérium nitrate. Enfin les composés **70** et **71** ont été obtenus en utilisant le *N*-bromosuccinimide et au bromure d'allyle, respectivement.

Les structures des produits finaux de la famille **I'** ainsi que les rendements des différentes réactions tandems cycloaddition-piégeage électrophile (20 à 96%) sont présentés ci-dessous (Figure 73). Pour les composés **62**, **63**, **67**, **68** et **71**, nous avons fixé la position 1 avec un 2-méthylnaphtyle et avons fait varier le groupement en position 5 (-C(O)-furyle, -C(O)-thionyle, iode et allyle). Remarquons que les composés **63** et **68** diffèrent des autres produits par la substitution de l'ester en position 4 par un phényle. Les produits **65** et **66** portent tous les deux un (-C(O)-thionyle) en position 5 mais diffèrent par le groupement en position 1 : hexyle cyclique ou linéaire. Enfin, **69** et **70** diffèrent seulement par la nature de l'halogène placé en position 5.

Tableau 21 : Formation des produits finaux de la famille I'



Entrée	R ₁	R ₂	E	Yield ^f (%)
1 ^a	2-(naphthalene)-CH ₂ -	-CO ₂ Et	-CO-furyl	62 , 76
2 ^b	2-(naphthalene)-CH ₂ -	-Ph	-CO-thienyl	63 , 54
3 ^b	4-MeO-Bn-	-CO ₂ Et	-CO-thienyl	64 , 20
4 ^b	<i>c</i> Hexyl-CH ₂ -	-CO ₂ Et	-CO-thienyl	65 , 96
5 ^b	<i>n</i> Hexyl-	-CO ₂ Et	-CO-thienyl	66 , 76
6 ^c	2-(naphthalene)-CH ₂ -	-CO ₂ Et	-I	67 , 97
7 ^c	2-(naphthalene)-CH ₂ -	-Ph	-I	68 , 50
8 ^c	4-MeO-Bn-	-CO ₂ Et	-I	69 , 20
9 ^d	4-MeO-Bn-	-CO ₂ Et	-Br	70 , 22
10 ^e	2-(naphthalene)-CH ₂ -	-CO ₂ Et	Allyl	71 , 46

^aChlorure de furyle, ^bChlorure de thionyle, ^cI₂/CAN, ^dCuBr et NBS, ^eBromure d'allyle.
^fCes rendements n'ont pas été optimisés.

4.1.1.3. Evaluation biologique des produits finaux de la famille I'

De la même façon que pour les analogues nucléosidiques, nous avons décidé de tester l'activité antiproliférative de ces nouveaux produits sur la lignée K562 (*cf.* chapitre 3, paragraphe 3.2.1.3). Ceci permettra d'étudier la relation structure-activité et de sélectionner les meilleurs composés pour une étude biologique plus approfondie.

Après vérification des puretés HPLC (>95%), les tests ont été réalisés en stimulant les cellules à une concentration de 10 μM de chaque composé. Après 48h d'incubation à 37 °C, les pourcentages de viabilité cellulaire ont été mesurés (Tableau 22) en utilisant le dosage colorimétrique XTT (*cf.* chapitre 3, paragraphe 3.2.1.3). Nous observons des pourcentages dépassant largement 50% pour la majorité des produits testés. Ce qui signifie que leurs CI₅₀ sont supérieures à 10 μM. Les composés **67**, **69** et **71** sont légèrement plus actifs : leurs pourcentages de viabilité cellulaire s'échelonnent entre 36 à 48%. Néanmoins, même en tenant compte de ces derniers composés, les activités affichées pour cette famille **I'** restent

globalement faibles. Ce résultat est cohérent avec les observations faites au chapitre 3 quant à la nature des groupements à introduire en position 5.

Tableau 22 : Activités antiprolifératives des composés de la famille I'

Produit final	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
% Viabilité à 10 μ M	100	100	58	70	66	36	65	48	76	46

4.1.2. Famille II'- Modification de la position 1 du triazole

Le développement de cette nouvelle série d'analogues s'appuie sur le remplacement du ribofuranosyle, en position 1 du triazole, par un groupement non saccharidique. Nous avons donc souhaité préparer une famille de produits pour cerner le rôle de cette position. Différents paramètres ont ainsi été étudiés : l'aromaticité *via* des produits aryliques et aliphatiques, la géométrie *via* des composés cycliques et linéaires et les effets électroniques *via* des groupements électro-donneurs et électro-attracteurs. En positions 4 et 5, nous avons inséré, respectivement, un ester éthylique et un ethynyle-ester éthylique pour l'ensemble des analogues de cette famille.

4.1.2.1. Préparation des azotures de la famille II'

Pour synthétiser les composés de la famille II', nous avons utilisé les azotures de la famille I' **1** et **58-61** plus cinq nouveaux composés **72-76** (Figure 74) préparés par substitution nucléophile (Cf. Figure 71). L'ensemble des azotures de cette famille est présenté ci-dessous (Figure 75). Parmi les composés nouvellement synthétisés, quatre sont aryliques : **72** possède un noyau benzyle non substitué. **73**, **74** et **75** possèdent des noyaux benzyles *para*-substitués avec des groupements électro-attracteurs (trifluorométhyle, *nitro* et *cyano*). Enfin, le cinquième nouveau composé **76** présente une chaîne butyle.

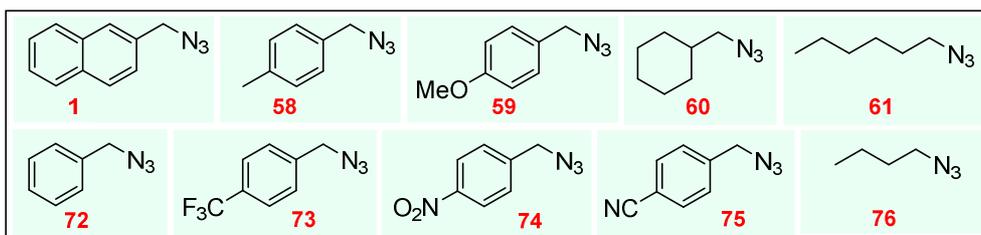


Figure 75 : Azotures de la famille II'

4.1.2.2. Réaction Tandem Cycloaddition-couplage oxydant appliquée à la famille II'

Pour obtenir les produits finaux de la famille II', nous avons appliqué la réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif (Cf. Chapitre 2, Paragraphe 2.3.2.2) aux azotures préparés (**1**, **58-61** et **72-76**). Afin d'insérer l'ester éthylique et l'éthynyle-ester éthylique en positions 4 et 5, le propiolate d'éthyle a été utilisé (Figure 76). Les triazoles ont ainsi été obtenus avec des rendements allant de 21 à 84%. Leurs structures sont présentées ci-dessous (Figure 76). Une majorité de composés benzyliques a été obtenue, avec des effets électroniques différents. Ainsi, les composés aryliques **77** et **78** se caractérisent par un effet électro-donneur, tandis que **79**, **80** et **81** se caractérisent par un effet électro-attracteur. Le noyau benzyle du composé **82** ne porte, quant à lui, pas de substituant. Les composés **84** et **85** présentent des chaînes alkyles de longueurs différentes et le composé **83** présente une forme cyclique non aromatique.

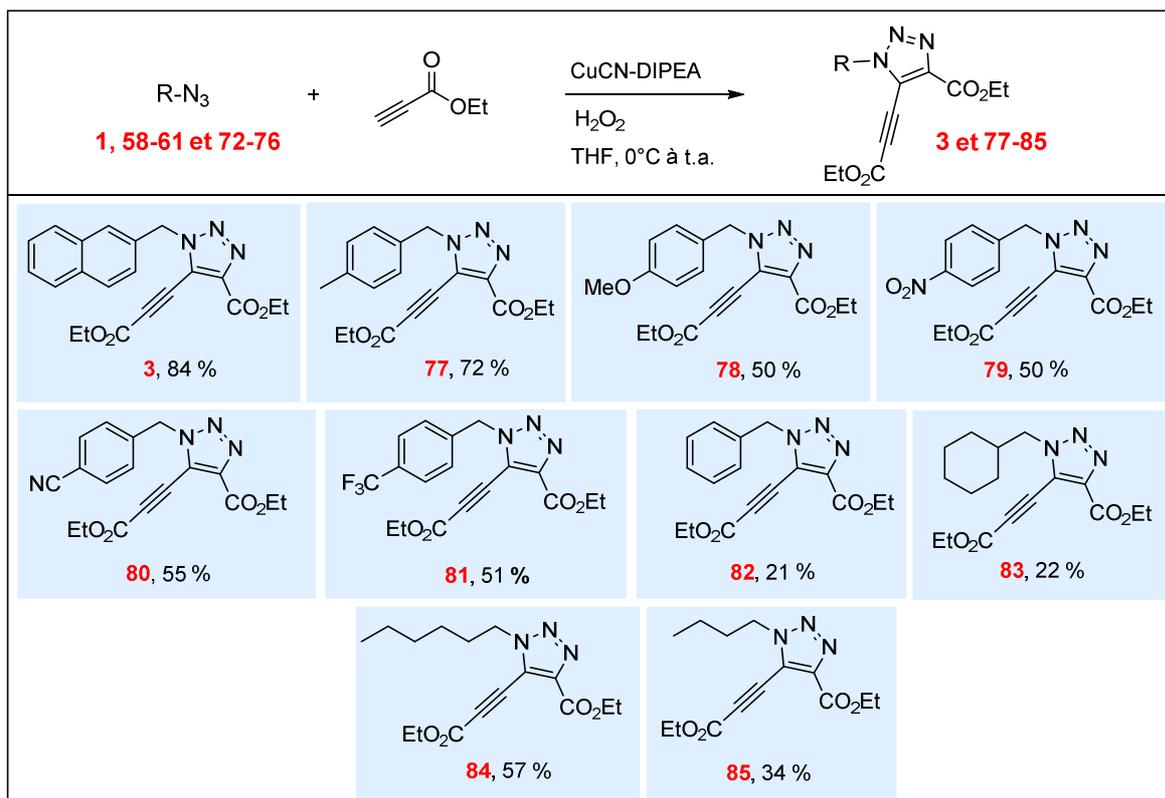


Figure 76 : Formation des produits finaux de la famille II'

4.1.2.3. Evaluation biologique des produits finaux de la famille II'

Suite à l'obtention de puretés HPLC satisfaisantes (>95%), nous avons testé les activités antiprolifératives des produits de la famille II'. Ainsi, des cellules K562 ont été stimulées avec 10 μM de chaque composé. Les pourcentages de viabilité cellulaire ont été mesurés par XTT (Tableau 23). Nous constatons pour la majorité des produits une inhibition efficace du métabolisme cellulaire. Les pourcentages sont en effet inférieurs à 10% pour six composés **77-81** et **84** et entre 10 et 20% pour deux autres composés **3** et **83**. En revanche, les composés **82** et **85**, se sont révélés insatisfaisants. La comparaison de ces résultats à ceux obtenus pour les composés de la famille I' valide la nécessité de l'alcyne. Par ailleurs, nous remarquons que le noyau benzyle *para*-substitué donne les meilleurs résultats indépendamment de son effet électronique. Ainsi **78** et **79** qui présentent des effets, respectivement électro-donneur et électro-attracteur, donnent le même pourcentage de viabilité cellulaire (4%). A l'inverse, le composé **82** dont le noyau benzyle n'est pas substitué possède une faible activité. La géométrie du benzyle *para*-substitué semble donc adaptée à une bonne interaction ligand-cible. Les composés non aryliques présentent de bonnes activités dans le cas de l'hexyle, qu'il

soit linéaire ou cyclique (**83** et **84**). A l'inverse, le butyle **85** donne une faible inhibition du métabolisme cellulaire (76% de pourcentage de viabilité).

En conclusion, nous pouvons dire qu'une variété de groupements peut être tolérée en position 1. Le noyau benzyle *para*-substitué semble cependant être le motif le plus favorable à une activité antiproliférative satisfaisante. De plus, la nature de ce groupement (inséré en position *para* du benzyle) semble être sans influence sur la bio-activité.

Tableau 23 : Activités antiprolifératives des composés de la famille II'

Produit final	3	77	78	79	80	81	82	83	84	85
% Viabilité à 10 μ M	19	8	4	4	10	5	76	11	8	86

4.1.3. Famille III'- Modification des positions 4 et 5 du triazole (en conservant la fonction alcyne)

Afin d'approfondir cette étude structure-activité, nous avons décidé d'apporter quelques modifications ciblées aux positions 4 et 5 du triazole. Ceci permettra d'évaluer les différentes propriétés géométriques, électroniques et réactionnelles, de l'ester éthylique.

4.1.3.1. Synthèse des produits finaux de la famille III'

i. Préparation des azotures

Pour synthétiser les composés de la famille III', nous avons réutilisé certains azotures provenant des familles I' et II' (**1**, **58-59** et **74-75**) (Figure 75). Nous y avons additionné deux nouveaux composés (**86-87**) préparés par substitution nucléophile (réaction détaillée sur la Figure 71). Les azotures nouvellement synthétisés présentent un noyau benzyle portant un atome de fluor en positions *ortho* et *para* (Figure 77).

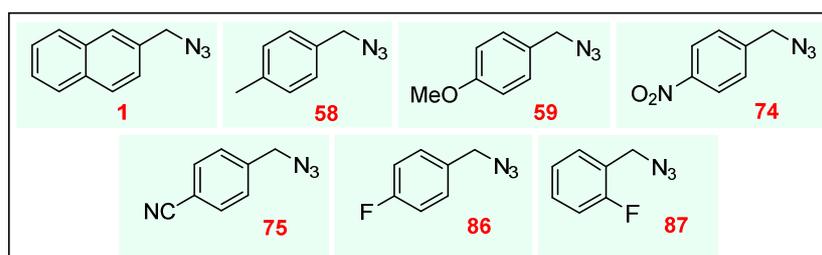


Figure 77 : Synthèse des azotures de la famille III'

ii. Obtention des produits finaux de la famille III'

Pour obtenir les 1,2,3-triazoles trisubstitués de la famille **III'**, nous avons appliqué la réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif aux azotures préparés en utilisant différents alcynes (Figure 78). Ainsi, nous avons utilisé le phénylacétylène pour les composés **88** et **89**, le 3-méthoxypropyne pour **90**, le propiolate de méthyle pour **91** et **92** et le propiolate de *tert*-butyle pour **93-97**. Les 1,2,3-triazoles sont obtenus avec des rendements variant entre 10 et 58% (rendements non optimisés). Leurs structures sont présentées ci-dessous (Figure 78). Les deux premiers produits **88** et **89** présentent un groupement phényle en position 4 du triazole et en position terminale de l'alcyne. Sur les mêmes positions, le composé **90** présente un groupement (-CH₂-OMe), les composés **93** et **94** des esters méthyliques et les composés **93-97** des esters *tert*-butyliques.

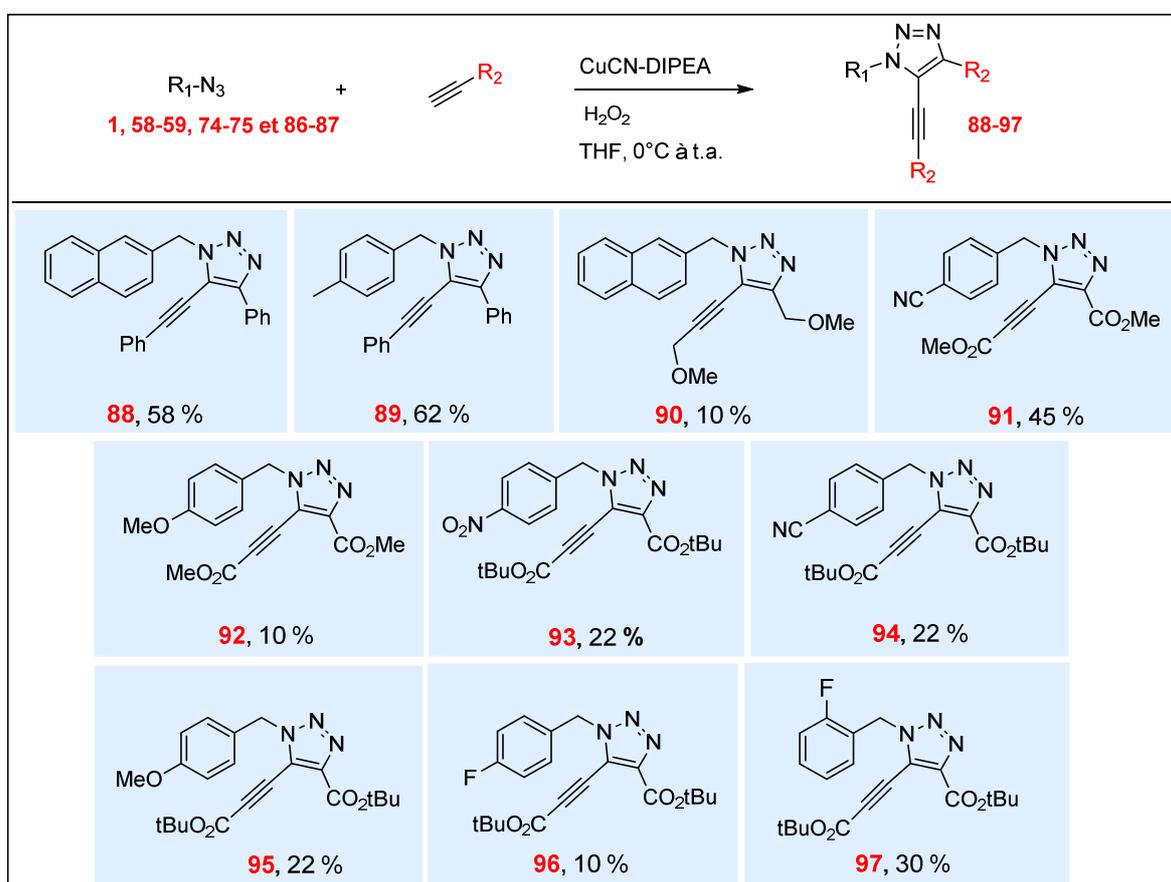


Figure 78 : Structures des produits finaux de la famille **III'**

4.1.3.2. Evaluation biologique des produits finaux de la famille III'

Après vérification des puretés HPLC (>95%), nous avons évalué l'activité antiproliférative des produits de la famille III', suivant le test réalisé pour les familles I' et II'. Des cellules K562 ont donc été stimulées avec 10 µM de chaque composé. Les pourcentages de viabilité cellulaire ont été mesurés par XTT (Tableau 24). Nous observons pour les composés 88 et 89 des pourcentages de viabilité cellulaires très hauts (76 et 90%). Ce qui traduit une faible activité. Ce résultat confirme la nécessité de l'enchaînement alcyne-ester qui a été mise en évidence par l'étude structure-activité réalisée pour les analogues nucléosidiques (Cf. chapitre 3, paragraphe 3.2.5). Le composé 90 qui porte un groupement (-CH₂-OMe), présente un pourcentage de viabilité de 35%, tandis que les composés 91 et 92 qui présentent un ester méthylique (-C(O)-OMe) donnent respectivement 6% et 8% de viabilité cellulaire. Cette comparaison est très intéressante car elle met en évidence le rôle prépondérant du carbonyle α,β-insaturé. L'évaluation de l'activité des produits restants 93-97 est en cours. Précisons néanmoins que les analogues portant l'ester *tert*-butylique ont été synthétisés dans l'objectif d'avoir une plus grande stabilité chimique par rapport à l'ester éthylique : le *tert*-butyle présente un encombrement stérique accru par rapport à l'ester éthylique, il est donc potentiellement moins sensible à l'hydrolyse. Par ailleurs, les analogues portant un atome de fluor sur le noyau benzyle ont pour but de fournir une meilleure stabilité métabolique. Cet atome est en effet communément utilisé pour bloquer les sites de métabolisation (phase I) ¹⁰³.

Tableau 24 : Activités antiprolifératives des composés de la famille III'

Produit final	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97
% Viabilité à 10 µM	76	90	35	6	8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Suite à cette étude structure-activité, nous avons choisi les sept composés les plus actifs (77-79, 81, 83, 84 et 91) pour déterminer une gamme de leurs CI₅₀. Ainsi, pour chacun de ces composés, nous avons mesuré les viabilités cellulaires pour six concentrations différentes (0,10 ; 0,25 ; 0,50 ; 1,00 ; 2,50 et 5,00 µM).

Les résultats sont présentés ci-dessous (Tableau 25). Nous remarquons que les composés 83 et 84, caractérisés par un groupement héxyle cyclique et linéaire respectivement, possèdent des CI₅₀ supérieures à 1 µM. A l'inverse, pour l'ensemble des analogues aryliques, nous

observons des CI_{50} sont sub-micromolaires. Parmi ces analogues aryliques, les composés **78**, **79** et **91** se sont montrés particulièrement efficaces ($CI_{50} < 0,5 \mu M$). Etant donné que le groupement *nitro* est connu pour induire une toxicité partielle ¹⁰⁴, nous avons décidé de l'écarter. Les produits sélectionnés ont donc été **78** et **91**. Leurs CI_{50} ont ensuite été mesurées avec précision et ont donné des valeurs de $0,1 \mu M$ pour **78** et $0,2 \mu M$ pour **91**. En comparaison avec les activités de l'ACA ($CI_{50} = 1 \text{ mM}$) et du composé *lead* nucléosidique **5** ($CI_{50} = 0,4 \mu M$), ces composés *lead* non nucléosidiques sont respectivement 10^4 fois et 2 à 4 fois plus actifs.

Tableau 25 : Gammes CI_{50} des meilleurs analogues de cette série

Produit final	Structure	CI_{50}	Produit final	Structure	CI_{50}
77		0,5-1,0	83		2,5-5,0
78		0,0-0,5	84		1,0-2,5
79		0,0-0,5	91		0,0-0,5
81		0,5-1,0			

4.1.4. Récapitulatif de l'étude structure-activité

L'évaluation biologique des analogues non nucléosidiques, sur la lignée cellulaire K562, a permis d'étudier l'influence de chaque groupement et d'aboutir à un pharmacophore (Figure 79). Ainsi, les résultats relatifs à la famille **I'** nous ont permis de souligner la nécessité de l'alcyne pour l'activité antiproliférative. Ceux relatifs à la famille **II'** révèlent qu'une variété de motifs peut être tolérée en position 1 du triazole mais qu'un benzyle *para*-substitué est plus favorable à une bonne activité. De plus, l'effet électronique et la géométrie du substituant

porté par le benzyle se sont montrés sans influence pour l'activité. Enfin, l'étude de bio-activité de la famille **III'** a permis de confirmer la grande importance de l'enchaînement alcyne-ester en position 5 du triazole.

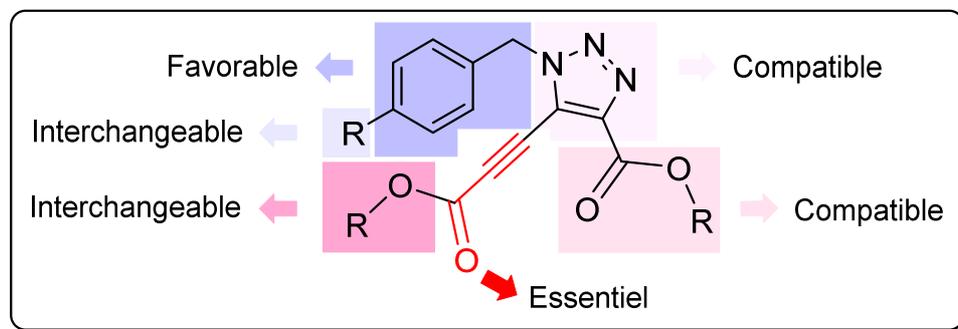


Figure 79 : Récapitulatif Structure-Activité

Le développement de cette nouvelle série d'analogues a permis d'identifier deux nouveaux composés *lead* **78** et **91** dont les activités sont légèrement meilleures que celle du composé *lead* nucléosidique **5**. Ces résultats prometteurs nous ont incités à sélectionner les molécules **78** et **91** pour des études biologiques approfondies.

4.1.5. Tests de Cytométrie en Flux sur la lignée K562

Les activités antiprolifératives des composés **78** et **91** sur la lignée K562 ont été mesurées par dosage colorimétrique et se sont montrées prometteuses : $CI_{50} = 0,1$ et $0,2 \mu\text{M}$ respectivement. Afin de confirmer leur efficacité, nous avons testé leurs activités par cytométrie en flux (CMF) (Cf. Chapitre 3, paragraphe 3.2.6). A la différence du dosage XTT qui mesure la viabilité cellulaire, la CMF mesure le taux de mort cellulaire en utilisant le marqueur d'ADN, 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI).

Pour les deux composés **78** et **91**, nous avons testé trois concentrations différentes ($0,25$; $0,5$ et $1,0 \mu\text{M}$) en plus d'un contrôle. Les taux de mort cellulaire ont été mesurés après 48h d'incubation à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en présence de **78** et **91**. Le résultat de cette expérience est présenté ci-dessous (Figure 80). Nous observons qu'à $0,5 \mu\text{M}$, le composé **91** induit 44% de mort cellulaire, tandis que ce taux est de 10% pour le composé **78**. Et à $1,0 \mu\text{M}$, la mort cellulaire s'élève à plus de 92% pour **91** alors qu'elle est de 45% pour **78**. Les doses létales de **78** et **91** sont donc d'environ $1,0 \mu\text{M}$ et $0,5 \mu\text{M}$, respectivement. Ce résultat confirme l'efficacité de

ces composés *lead* sur la lignée K562 et souligne une légère supériorité de **91** en termes d'activité.

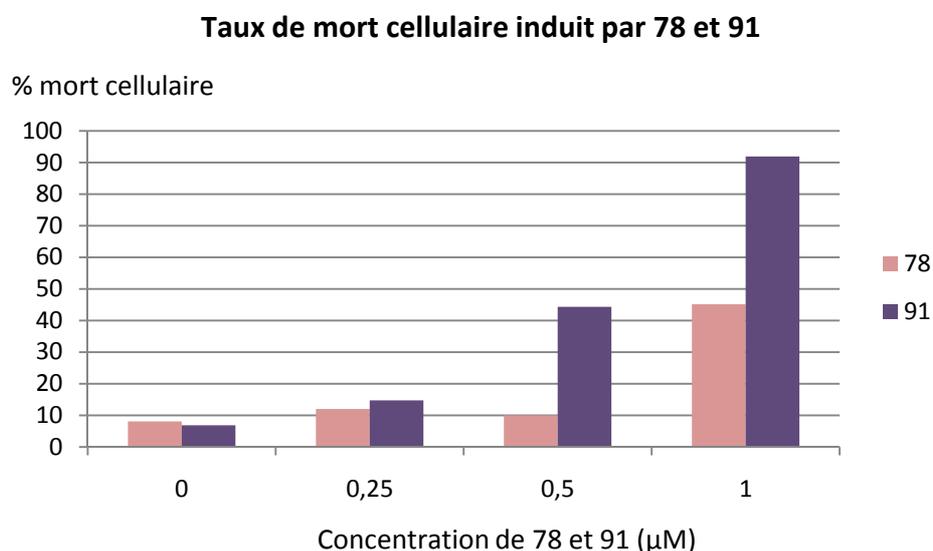


Figure 80 : Mesure de la mort cellulaire induite par 78 et 91

4.1.6. Evaluation des activités de 78 et 91 sur d'autres lignées cellulaires

Après avoir mis en évidence l'efficacité des composés **78** et **91** sur la lignée K562 par dosage colorimétrique (XTT) et cytométrie en flux (CMF), nous avons testé leurs activités sur d'autres lignées tumorales. Comme nous avons décidé de centrer notre projet sur le SMD/LAM, nous avons sélectionné les lignées cellulaires suivantes : SKM1-S et SKM1-R (Cf. Chapitre 3, paragraphe 3.2.7), MOLM13 et MOLM14, OCI-AML2 et OCI-AML3.

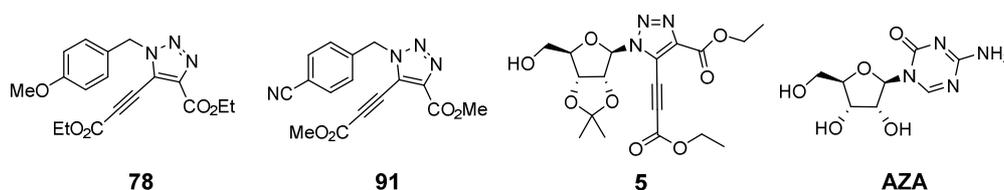
MOLM13 et MOLM14 : sont deux lignées établies à partir du sang périphérique d'un patient atteint d'une LAM résultant de l'évolution d'un SMD¹⁰⁵. Elles diffèrent par l'expression de certains antigènes.

OCI-AML2 et OCI-AML3 : sont deux lignées établies à partir du sang périphérique de patients atteints d'une LAM apparue *de novo*.

Les tests ont été réalisés en utilisant le dosage colorimétrique XTT. Les résultats sont présentés sous forme de CI₅₀ (Tableau 26). Nous observons des activités intéressantes sur les six lignées, pour chacun des deux composés **78** et **91**. A titre de comparaison, nous avons rappelé les CI₅₀ de l'AZA et du composé *lead* nucléosidique **5** sur les lignées SKM1-S et -R.

Nous constatons, pour les lignées SKM1-S et -R, que les meilleures activités sont obtenues pour **5** et **78** dont les CI_{50} sont submicromolaires. Le composé **91** est légèrement moins actif ; il présente des CI_{50} de 1,2 et 1,4 μM respectivement sur SKM1-S et SKM1-R. Le résultat sur la lignée résistante SKM1-R est particulièrement intéressant car il souligne l'intérêt de ces deux composés *lead* en comparaison à la faible activité de l'AZA ($CI_{50} = 0,8$ et 1,4 μM vs. $CI_{50} >10$ μM). Sur les trois lignées MOLM-13,-14 et OCI-AML2, nous observons des activités submicromolaires et similaires pour les deux analogues **78** et **91**. Enfin, le test sur la lignée OCI-AML3 montre également de bonnes activités pour les composés **78** et **91** avec une légère supériorité pour **78** (CI_{50} (**78**) = 0,7 μM et CI_{50} (**91**) = 1,4, respectivement). Ces résultats confirment l'intérêt des composés *lead* non nucléosidiques et indiquent leur efficacité sur l'hémopathie maligne ciblée, à savoir SMD/LAM.

Tableau 26 : Activités de 78 et 91 sur différentes lignées de SMD/LAM



	CI_{50}^a de 78	CI_{50}^a de 91	CI_{50}^a de 5	CI_{50}^a de l'AZA
SKM1-S	0,8	1,2	0,5	1,0
SKM1-R	0,8	1,4	0,5	>10
MOLM-13	0,7	0,8	-	-
MOLM-14	0,6	0,6	-	-
OCI-AML2	0,9	0,7	-	-
OCI-AML3	0,7	1,4	-	-

^aValeurs des CI_{50} présentées en μM .

Récapitulatif des tests XTT et CMF

Les résultats des tests présentés ci-dessus montrent l'intérêt de chacun des deux composés *lead* **78** et **91**. Ainsi, sur la lignée K562, nous avons observé une inhibition de métabolisme cellulaire (XTT) et un taux de mort cellulaire (CMF) prometteurs : $CI_{50} = 0,1$ et 0,2 μM / $DL_{50} = 1,0$ et 0,5 μM , respectivement pour **78** et **91**. Nous avons également évalué avec succès

l'efficacité de ces deux produits sur les lignées de SMD et LAM. Un résultat particulièrement intéressant a été la hausse d'activité présentée par ces composés en comparaison au traitement de référence (AZA) sur la lignée résistante de SMD, SKM1-R : CI_{50} (**78**) = 0,8 μ M et CI_{50} (**91**) = 1,4 μ M vs. CI_{50} >10 μ M. Par ailleurs, nous avons noté des CI_{50} submicromolaires pour ces deux analogues non nucléosidiques sur les lignées de SMD/LAM MOLM-13,-14 et OCI-AML2,-3 sauf pour **91** sur OCI-AML3 CI_{50} = 1,4 μ M). Au vu de ces activités prometteuses, les composés *lead* **78** et **91** ont tous deux été sélectionnés pour une étude biologique approfondie.

4.2. Etude pharmacologique des composés *lead* **78** et **91**

Après avoir mis en évidence l'efficacité des composés *lead* **78** et **91** sur la lignée de LMC (K562) et les lignées de SMD/LAM (SKM1-S, SKMA-R, MOLM-13,-14 et OCI-AML2,3), nous nous sommes intéressés à leurs propriétés pharmacologiques. Nous avons ainsi vérifié s'ils satisfaisaient aux règles de Lipinski et Veber (Cf. Chapitre 3, paragraphe 3.3.1). Nous avons également évalué leur stabilité chimique, hydro-solubilité et toxicité.

4.2.1. Profils Lipinski et Veber des composés **78** et **91**

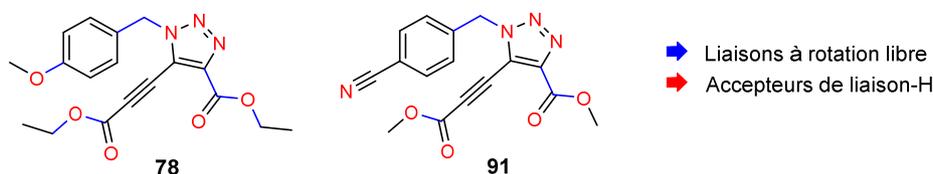
Les règles mises en place par Lipinski et Veber donnent une approche préliminaire du profil *drug-likeness* en s'appuyant sur la structure du composé actif (Cf. chapitre 3, paragraphe 3.3.1). Nous les avons donc appliquées aux produits **78** et **91**, comme nous l'avons fait pour le composé *lead* de la série nucléosidique.

Résultats de l'étude

Les propriétés de **78** et **91** sont présentées ci-dessous (Tableau 27). Nous remarquons qu'ils satisfont tous deux aux différentes règles Lipinski-Veber. **1**) les poids moléculaires de **78** et **91** sont tous deux inférieurs à 500 $g \cdot mol^{-1}$ (357,4 et 324,3 $g \cdot mol^{-1}$, respectivement). **2**) Leurs accepteurs de liaison-H sont au nombre de 8, ce qui est en dessous de la limite indiquée (10). **3**) Ils ne possèdent pas de donneur de liaison-H, ce qui donne une somme donneur + accepteur inférieure au nombre imposé par Veber (12). **4**) Le nombre de leurs LRL ne dépasse pas la valeur seuil de 10 définie par Veber (8 et 5, respectivement pour **78** et **91**). **5**) leurs coefficients de partage sont tous deux inférieurs à 5 (2,25 \pm 1,32 pour **78** et 2,84 \pm 1,33 pour **91**).

L'ensemble de ces critères indique que les deux composés **78** et **91** sont potentiellement de bons candidats pour des tests cliniques de phase I.

Tableau 27 : Application des règles Lipinski-Weber aux composés 78 et 91



Produit lead	PM	ALH	DLH	clogP ^a	LRL ^b
78	357,4	8	0	2,25±1,32	8
91	324,3	8	0	2,84±1,33	5

^alogP a été calculé *via* le logiciel ChemSketch. ^bLe nombre de LRL a été calculé suivant la définition de Weber : « une liaison à rotation libre est une liaison simple n'appartenant pas à un cycle et liant des atomes à la fois non terminaux et différents d'un atome d'hydrogène »⁹⁹.

4.2.2. Tests de solubilité et stabilité chimique

Pour l'étude stabilité-solubilité, nous avons décidé de sélectionner le composé **91** comme référence. En effet, ce composé est plus susceptible de se dégrader en raison de son groupement nitrile. Par ailleurs, le but d'une étude pharmacologique étant d'anticiper les complications pouvant survenir lors des expériences *in vivo*, nous avons décidé d'utiliser, pour nos tests de solubilité et de stabilité, des solutions pouvant servir de véhicules pour les injections chez les animaux. Les résultats de ces tests permettront ainsi à la fois d'évaluer la solubilité/stabilité chimique de **91** (et par extension celle de **78**) et d'évaluer la faisabilité des tests *in vivo* pour ce composé.

i. Solubilité

Nous avons étudié la solubilité de **91** en utilisant plusieurs combinaisons de DMSO et de PBS (tampon phosphate salin). Ces essais ont donné pour **91** une concentration soluble maximale de 0,85 mM dans une solution PBS/DMSO : 36/64. Ce résultat indique une faible hydro-solubilité. Des modifications structurales sont donc à prévoir pour l'optimiser.

ii. Stabilité chimique

Pour étudier la stabilité chimique de **91**, nous nous sommes référés au résultat obtenu ci-dessus. Ainsi, une solution de **91** à 0,85 mM dans un mélange de PBS/DMSO : 36/64 a été préparée puis stockée à température ambiante. Nous avons ensuite analysé son profil de dégradation, en fonction du temps, par suivi HPLC (Figure 81).

Nous remarquons qu'après 7 jours, le composé **91** est encore présent à 82%. Au 14^{ème} jour, 73% de **91** est détecté et à 20 et 39 jours, ce pourcentage est de 66 et 58, respectivement. Ces résultats semblent indiquer une bonne stabilité chimique dans cette solution, sachant qu'à 39 jours le temps de $\frac{1}{2}$ n'a toujours pas été atteint.

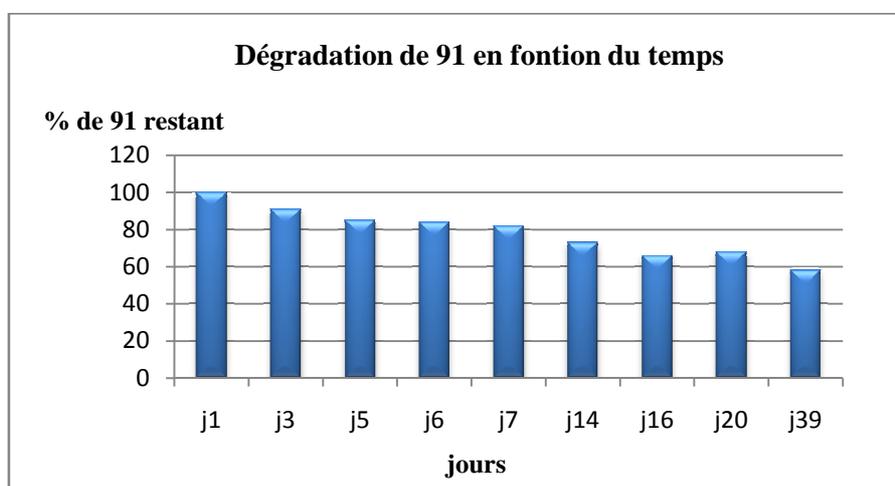


Figure 81 : Stabilité chimique de 91 en fonction du temps

4.2.3. Toxicité de 78 et 91

La toxicité des composés *lead* **78** et **91** a été étudiée *via* des cellules mononucléaires du sang périphérique : PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*). Ces dernières ont été traitées avec des concentrations de **78** et **91** s'échelonnant entre 0,25 μ M et 50,00 μ M. Pour chaque concentration, le taux de mort cellulaire a été mesuré par CMF. Notons qu'un échantillon de cellules non traitées a servi de contrôle négatif.

Les résultats de ces tests ont mis en évidence la non toxicité de **78** et **91** pour des concentrations inférieures à 10 μ M (taux de mort cellulaire < 10%). A l'inverse, ils ont montré que pour des concentrations de 25 et 50 μ M, le taux de mort cellulaire grimpait jusqu'à 40% pour chacun des deux composés *lead*.

Nous pouvons déduire de ces résultats que la toxicité de **79** et **91** est limitée : la concentration seuil de toxicité (10 μM) équivaut à 100 et 50 fois leurs CI_{50} , respectivement (CI_{50} (**78**) = 0,1 μM et CI_{50} (**91**) = 0,2 μM).

4.3. Mode d'action de 78 et 91

L'étude de la stabilité et solubilité de **91** montre qu'il faut apporter certaines modifications structurales à nos composés *lead* avant de pouvoir envisager des tests *in vivo*. Néanmoins, leurs activités prometteuses sur les différentes lignées d'hémopathies myéloïdes testées, LMC, SMD et LAM, nous ont incités à étudier leurs modes d'action. Ceci permettra notamment d'étudier l'influence des différences structurales sur le mode d'action, par comparaison aux résultats obtenus pour le composé *lead* nucléosidique **5**.

4.3.1. Etude de la mort cellulaire induite par 78 et 91

L'un des objectifs de cette thèse étant de conserver le mode d'action de l'ACA, il fallait étudier, de façon prioritaire, le type de mort cellulaire induite par **78** et **91**. Dans ce contexte, nos collaborateurs ont réalisé des tests enzymatiques en utilisant le Zvad-fmk -Z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorométhylcétone- (Figure 82). Il s'agit d'une molécule permettant de bloquer le processus apoptotique par inhibition des caspases (chapitre 3, paragraphe 6.1). Sa présence annule, par conséquent, l'activité des composés induisant ce type de mort cellulaire.

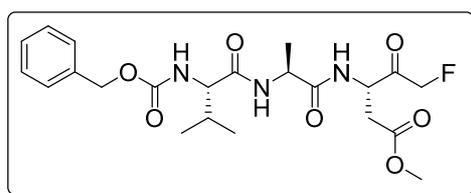


Figure 82 : Structure du Zvad-fmk

Nos collaborateurs ont réalisé ce test pour chacun des deux composés **78** et **91** *via* quatre expériences différentes effectuées sur la lignée cellulaire K562 (Figure 83). La première présente un contrôle visant à valider l'ensemble des résultats. La deuxième et la troisième étudient, respectivement, l'effet de Zvad-fmk et l'effet du composé d'intérêt **78/91**, sur le métabolisme cellulaire. Enfin, la quatrième expérience donne accès à l'effet de Zvad-fmk sur

l'activité de ces composés *lead* (une concentration de 0,5 μ M a été utilisée pour chacun des deux composés **78** et **91**).

Nous observons, pour les deux premières expériences, des pourcentages de métabolisme cellulaire de 100, ce qui confirme la validité des résultats et montre que Zvad-fmk n'affecte pas le métabolisme cellulaire. Sans surprise, la troisième expérience indique que **78** et **91** sont tous deux actifs sur cette lignée. La quatrième expérience est la plus importante. Elle montre qu'en présence de Zvad-fmk, **78** et **91** conservent leurs activités. Leurs modes d'action ne dépendent donc pas des caspases. Par conséquent, les morts cellulaires qu'ils induisent ne seraient pas de type I. Ce résultat est très prometteur car il traduit la possibilité pour les composés *lead* non nucléosidiques de conserver le mécanisme autophagique de l'ACA et d'atteindre ainsi l'un des objectifs de cette thèse.

Rappelons que les tests enzymatiques et les analyses par western-blot du composé *lead* nucléosidique **5** (Chapitre 3, paragraphe 6) avaient mis en évidence une mort cellulaire impliquant à la fois la voie apoptotique et autophagique. Le changement structural entre les deux séries développées induit donc clairement des différences au niveau du mode d'action.

Ces résultats intéressants restent à confirmer par d'autres expériences. Nous envisageons prioritairement de réaliser des analyses par western-blot ciblant le marqueur autophagique LC3 (Chapitre 3, paragraphe 6.2.1) afin de mettre en évidence le mécanisme autophagique potentiellement induit par ces nouveaux composés *lead*.

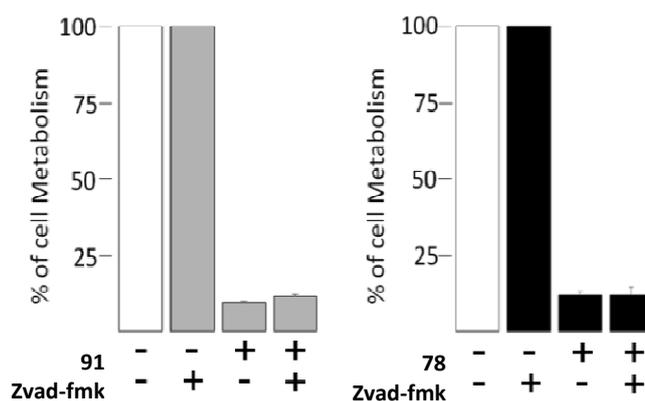


Figure 83 : Effet de l'inhibiteur pan-caspase Zvad-fmk sur l'activité de 78 et 91

4.3.2. Localisation intracellulaires des composés *lead 78* et *91*

Les fluorophores sont des molécules capables d'émettre un signal de fluorescence suite à l'absorption d'un photon. En biologie cellulaire, ce signal est communément étudié par microscopie de fluorescence afin de définir la localisation d'un composé donné dans la cellule. Il existe deux classes de fluorophores : intrinsèques et extrinsèque. La première classe désigne les molécules qui portent naturellement un motif fluorescent. A l'inverse, la deuxième classe est obtenue par addition d'un motif fluorescent, tel que la fluorescéine et ses dérivés, le chlorure de dansyle ou le BODIPY, à une molécule initialement non fluorescente.

Dans le but d'élucider le comportement des composés *lead 78* et *91* dans la cellule, nous avons recouru à la méthode de fluorophores extrinsèques *via* deux sondes de faible taille : le dansyle et le 7-nitrobenzofurazanyle.

4.3.2.1. Synthèse des composés fluorescents

L'étude structure-activité réalisée pour la série non nucléosidique (paragraphe 1.4) a montré que la position *para* du benzyle était la plus modulable et la moins influente sur l'activité antiproliférative. Nous l'avons donc choisie pour l'addition des fragments fluorescents (Figure 84). Précisons qu'un court bras *espaceur* a été inséré entre le pharmacophore et les fluorophores (dansyle ou le 7-nitrobenzofuranzanyle).

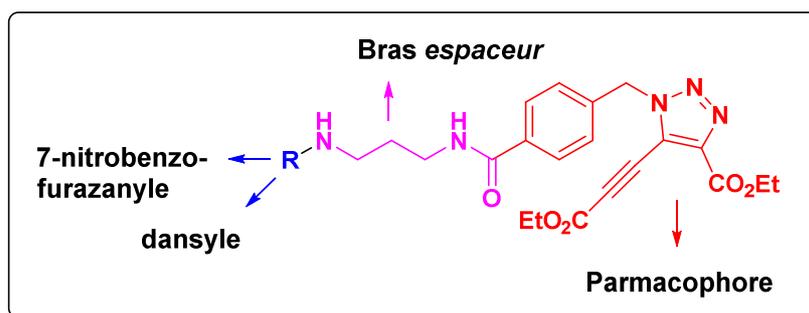


Figure 84 : Structure générale des composés fluorescents

i. Synthèse du composé fluorescent portant le dansyle

Pour synthétiser le composé fluorescent portant le dansyle, nous avons suivi le chemin réactionnel décrit ci-dessous (Figure 85). Le 1,3-diaminopropane est d'abord protégé à l'aide du dicarbonate de di-*tert*-butyle pour conduire au composé 98 où seule une fonction amine

reste libre. Celle-ci est ensuite couplée au chlorure de dansyle pour donner l'intermédiaire 99 avec un rendement de 86%. Une dé-protection du groupement *tert*-butyl-carbamate à l'acide trifluoroacétique fournit l'intermédiaire 100 avec un rendement de 78%. Parallèlement à cette séquence, le synthon 101 est préparé à partir de l'acide (bromométhyl)-4-benzoïque *via* la substitution du groupement bromure par un azoture, avec un rendement de 76%.

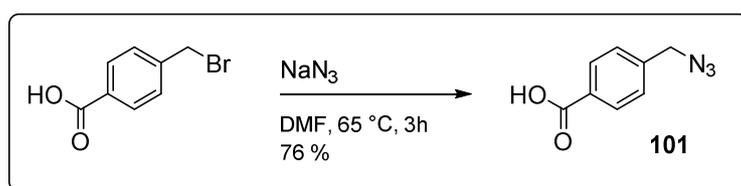


Figure 85 : Obtention du synthon 101

S'ensuit un couplage peptidique entre ce dernier et le composé 100 conduisant à l'intermédiaire 102 avec un rendement de 63%. Enfin, une réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif donne le produit fluorescent final 103 avec 14% de rendement (rendement non optimisé).

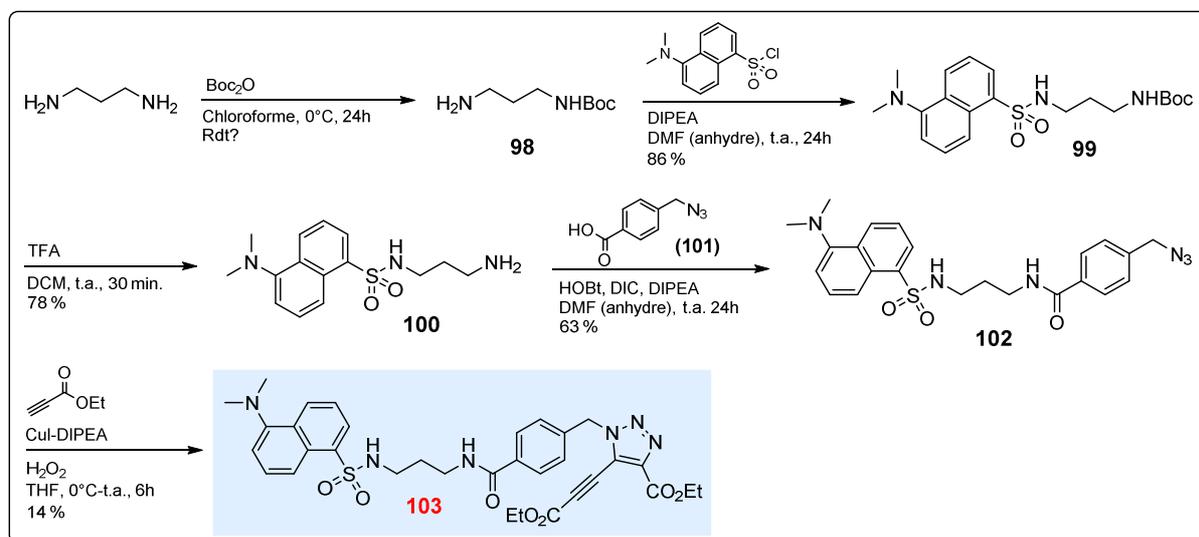


Figure 85 : Synthèse du produit fluorescent 103 portant le motif dansyle

ii. Synthèse du composé fluorescent portant le 7-nitrobenzofurazanyle

Pour synthétiser le composé fluorescent portant le 7-nitrobenzofurazanyle, nous avons suivi le chemin réactionnel décrit ci-dessous (Figure 86). La première étape est une substitution nucléophile aromatique entre le diaminopropane mono-*N*-protégé 98 et le 4-chloro-7-nitrobenzofurazan. Ceci donne l'intermédiaire 104 avec un rendement de 37%. La fonction

amine masquée par un carbamate est alors libérée par l'action de l'acide trifluoroacétique pour former **105** avec un rendement de 78%. L'étape suivante est un couplage type peptidique, entre le composé **105** et le composé **101** précédemment décrit (Figure 85), donnant l'intermédiaire **106** avec un rendement de 45%. Enfin, l'application de la réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif donne le produit fluorescent final **107** avec un rendement non optimisé de 10%.

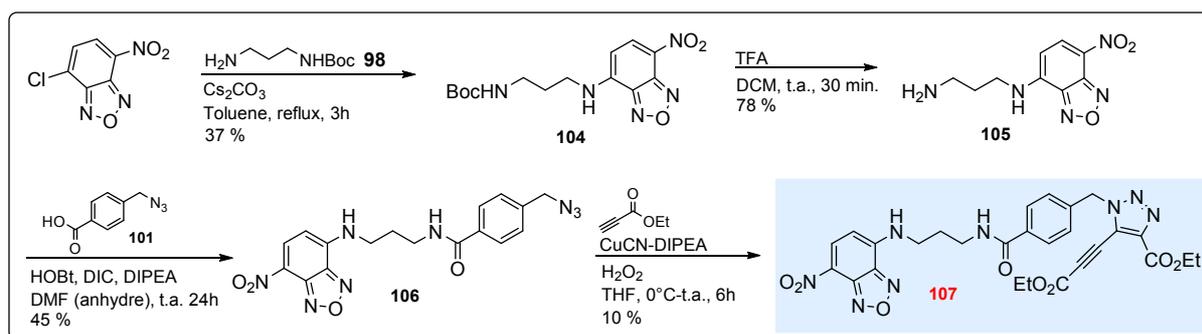
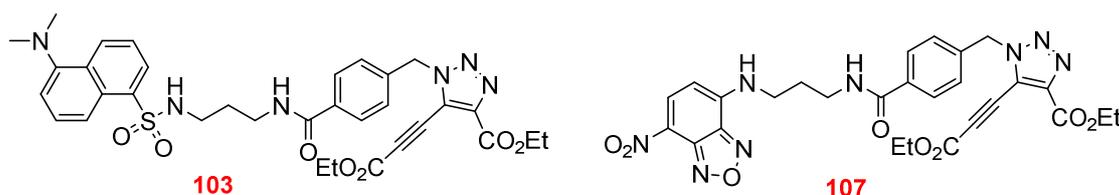


Figure 86 : Synthèse du produit fluorescent **107** portant le motif 7-nitrobenzofurazanyle

4.3.2.2. Propriétés physiques des composés **103** et **107**

Les composés fluorescents sont caractérisés par plusieurs grandeurs physiques dont la mesure permet d'évaluer la qualité du signal fluorescent. Ces grandeurs comprennent les longueurs d'onde d'absorption (λ_{abs}) et d'émission (λ_{emi}), le coefficient d'extinction (ϵ) et le rendement quantique (ϕ) qui décrit le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés par le composé. Nous avons donc mesuré les valeurs de ces grandeurs pour les composés **103** et **107** (Tableau 28). Nous remarquons pour le composé **103** un rendement quantique très faible (1%) tandis que pour le composé **107** nous obtenons un rendement quantique satisfaisant (43%). De plus, à l'inverse de **103** qui absorbe dans la région UV (343 nm), le composé **107** présente l'avantage d'absorber dans le visible (477 nm), ce qui est compatible avec le laser d'excitation communément utilisé en biologie cellulaire (laser argon 488 nm). De surcroît, cette longueur d'onde fortement décalée vers le rouge permet de soustraire l'absorption cellulaire.

Tableau 28 : Propriétés physiques de 103 et 107



	λ_{abs} (nm)	λ_{ex} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	ϕ^{a}
103	343	527	4300	1%
107	477	540	25500	43%

^aLa p-diméthylaminoflavone (dMAF) a été utilisée comme référence (λ_{ex} (nm) = 404, ϕ = 0,27).

4.3.2.3. Etude de la fluorescence de 103 et 107 dans les cellules

Pour étudier le comportement de nos composés fluorescents dans les cellules, nous avons utilisé deux types de microscopes : le microscope à fluorescence et le microscope confocal.

- ✓ **Microscope à champ large** : Equipé de filtres et de miroirs dichroïques, ce microscope permet d'illuminer l'échantillon, sélectivement, à sa longueur d'onde d'excitation et de détecter uniquement l'émission de longueurs d'onde plus élevées.
- ✓ **Microscope confocal** : Grâce à un faisceau laser mince, ce microscope permet de focaliser l'excitation lumineuse sur un plan défini de l'échantillon. Ce qui donne des clichés de grande résolution.

Tests sur les composés 103 et 107

Préparation des échantillons : L'observation au microscope peut se faire sur des cellules en suspension ou fixées. Remarquons que les résultats sont généralement meilleurs après fixation car cela permet d'immobiliser les constituants cellulaires. Toutefois, nos collaborateurs ont constaté que ce procédé pouvait, dans certains cas, altérer la fluorescence des produits. Nous avons donc effectué des tests préliminaires afin de définir les meilleures conditions pour nos composés. Ainsi, nous avons préparé deux types d'échantillons : **a**) Cellules K562 vivantes, **b**) Cellules K562 fixées par l'action du *para*-formaldéhyde (PFA). Ces échantillons ont ensuite été stimulés avec des solutions de **103** et **107** à 1 μM . Après 1h d'incubation à 37 °C,

les cellules non fixées ont été immédiatement imagées, tandis que le deuxième type d'échantillon a été traité au PFA pendant 20 minutes avant observation au microscope.

Microscopie à champ large : Les échantillons décrits ci-dessus ont été imagés par le microscope à champ large. Nous avons observé la même qualité de signal pour les produits fixés et les produits en suspension. Nous pouvons donc affirmer que la fixation n'affecte pas la fluorescence de nos produits. Par contre, nous avons observé une fluorescence extrêmement faible pour le composé **103** et ce indépendamment de l'échantillon testé. Ce résultat est expliqué par le rendement quantique faible de ce produit (1%), ce qui induit une brillance médiocre. Pour les tests suivants, nous nous sommes donc focalisés sur le composé **107**.

Microscopie confocale : Après ces tests préliminaires réalisés à l'aide du microscope à champ large, nous avons recouru à la microscopie confocale afin d'observer le comportement intracellulaire du composé **107** avec une meilleure résolution. La concentration d'1 μM s'étant révélée excessivement forte lors des expériences précédentes, nous avons décidé de stimuler les cellules K562 avec trois concentrations différentes : 250 nM, 100 nM, 50 nM. Après une incubation d'1h à 37 °C, les cellules ont été traitées au PFA puis fixées sur un support. Après séchage, les échantillons ont été imagés en microscopie confocale mais les résultats ont été décevants. La distribution du produit s'est en effet montrée homogène ce qui indique une saturation potentielle des cellules.

Dans le but d'obtenir de meilleurs résultats, nous avons réalisé un deuxième test en utilisant des cellules HeLa, connues pour leur adhérence. Ces dernières ont été stimulées par six concentrations différentes de **107** : 250,0 ; 125,0 ; 62,5 ; 31,2 ; 15,6 ; 7,8 nM. Après incubation (1h, 37 °C), les cellules ont été imagées en suspension. Les résultats ont été meilleurs que pour les cellules K562. Sachant qu'ils sont préliminaires, ces résultats doivent être contrôlés par des tests de co-marquage. Il serait néanmoins intéressant de noter qu'ils semblent révéler une zone de concentration de **107**, pouvant correspondre au peroxysome.

Notons que des tests complémentaires de fluorescence sur le composé **107** sont actuellement en cours.

4.3.3. Elucidation de la cible moléculaire

La biotine est une molécule de petite taille (244,31 g.mol⁻¹) connue pour sa forte interaction avec la streptavidine, un homotétramère de 56 kDa. En plus de sa très haute affinité (constante d'association : $k_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$), le complexe streptavidine-biotine est caractérisé par sa spécificité et sa résistance à différentes conditions expérimentales (agents dénaturants, dégradation enzymatique, PH extrêmes) ^{106,107}. Pour ces raisons, il est largement utilisé en biochimie et biologie moléculaire.

Identifier une cible moléculaire par utilisation du système biotine-streptavidine

Parmi les applications de ce système, on trouve l'isolement et la purification de macromolécules d'intérêt ¹⁰⁶. Ainsi, pour identifier la cible d'un composé actif donné, on peut greffer à sa structure une molécule de biotine, avant de l'injecter au milieu biologique. L'échantillon est ensuite purifié *via* un support chromatographique portant la streptavidine. La grande affinité et spécificité biotine-streptavidine, permet d'éliminer par lavages toutes les protéines, excepté celle liée au composé biotynilé. Le complexe protéique est ensuite dissocié et la protéine-cible est isolée afin d'être identifiée.

Synthèse du composé biotynilé

Pour élucider la (les) cible(s) moléculaire(s) de nos composés *lead* **78** et **91**, nous avons eu recours à ce système biotine-streptavidine, en synthétisant un dérivé conjugué **biotine-78**. Nous avons décidé d'ancrer le motif biotine au pharmacophore en position *para* du noyau benzyle, comme pour la formation des composés fluorescents (Figure 87).

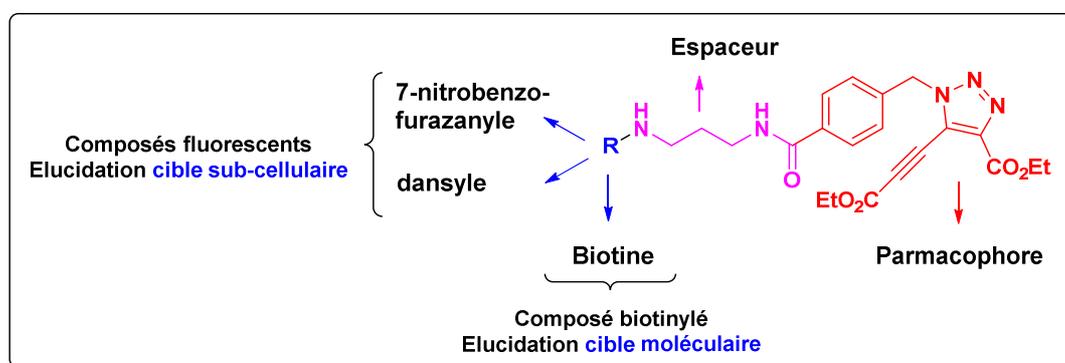


Figure 87 : Structure générale composé biotynilé/ composés fluorescents

4.3.3.1. Première approche visant à former le composé biotinylé

Pour obtenir le composé biotinylé, nous avons utilisé une première approche rétro-synthétique en déconnectant la biotine du fragment bras *espaceur*- pharmacophore (Figure 88).

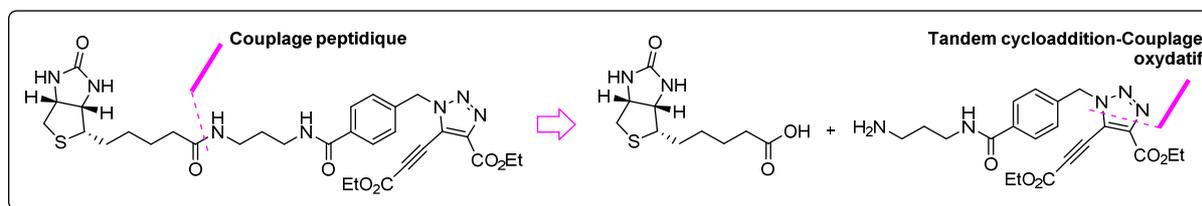


Figure 88 : Première approche rétro-synthétique visant à former le produit biotinylé

Ainsi, nous avons suivi le chemin réactionnel décrit ci-dessous (Figure 89). Une première étape consiste à coupler l'acide carboxylique porté par le composé **101** à l'amine libre du composé **98**. Ce couplage peptidique a donné un très bon rendement (92%) grâce à l'activation préalable de l'acide carboxylique en chlorure d'acyle. La déprotection du *tert*-butylcarbamate de l'intermédiaire **108** donne le produit **109** qui suit une réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif. Malheureusement, ceci ne donne pas le produit désiré ; une dégradation de **109** est en effet observée. Ce résultat peut être expliqué par une chélation potentielle exercée par l'amine libre sur le complexe cuivreux.

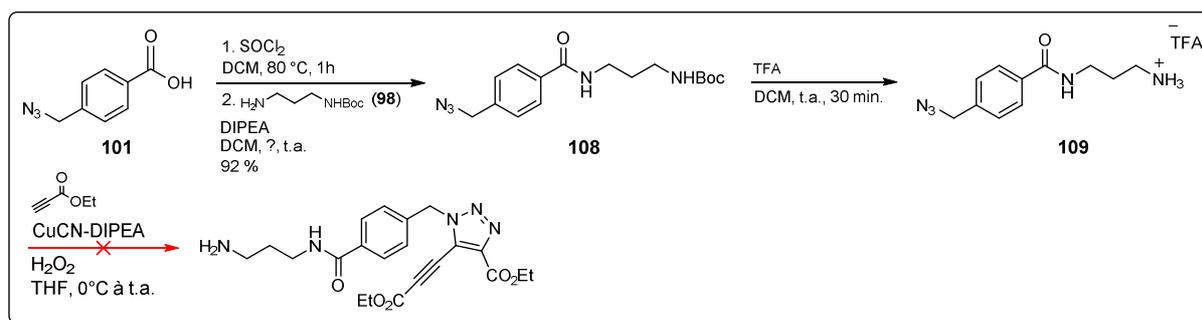


Figure 79 : Première approche synthétique visant à former le produit biotinylé

4.3.3.2. Deuxième approche visant à former le composé biotinylé

La première approche ayant échoué à former le produit biotinylé, nous avons essayé une deuxième stratégie rétro-synthétique (Figure 90). Comme la réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif s'est montrée sensible aux groupements pouvant jouer le rôle de ligands, nous nous sommes proposé de l'effectuer en dernier. Nous avons donc envisagé de coupler le

bras *espaceur* à la biotine et au pharmacophore avant de former le triazole, de sorte à ce qu'il n'y ait pas d'amine libre lors de la réaction tandem.

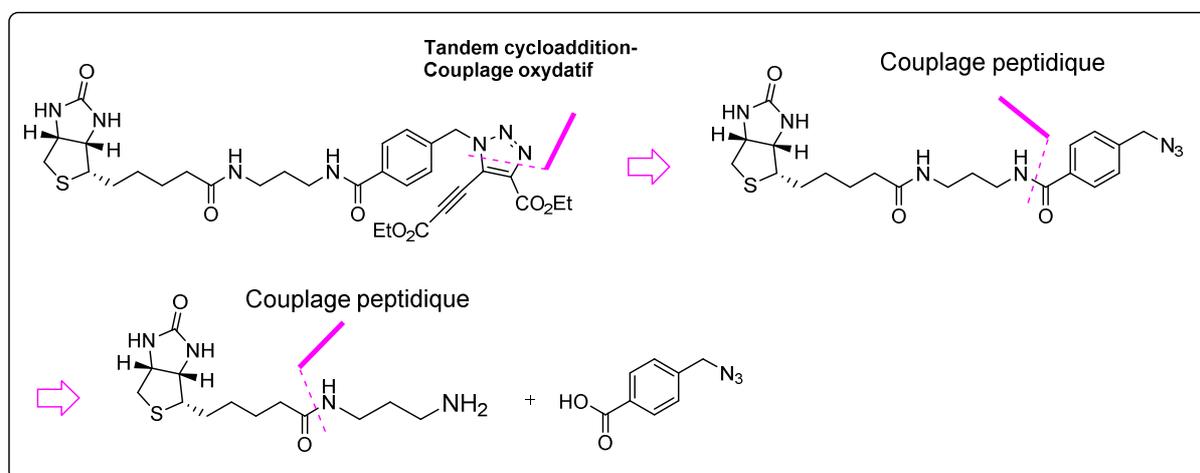


Figure 90 : Deuxième approche rétro-synthétique visant à former le produit biotinylé

Pour appliquer cette stratégie, nous avons suivi le chemin réactionnel décrit ci-dessous (Figure 91). Nous commençons par un couplage type peptidique entre la biotine et le 1,3-diaminopropane mono-*N*-protégé **98**, ce qui donne l'intermédiaire **110** avec un rendement de 34%. Ce dernier est ensuite déprotégé à l'aide de l'acide trifluoroacétique pour donner le composé **111**, avec un rendement quantitatif. Un couplage peptidique entre l'intermédiaire **111** et le synthon **101** est subséquemment suivi mais le produit attendu n'est malheureusement pas formé.

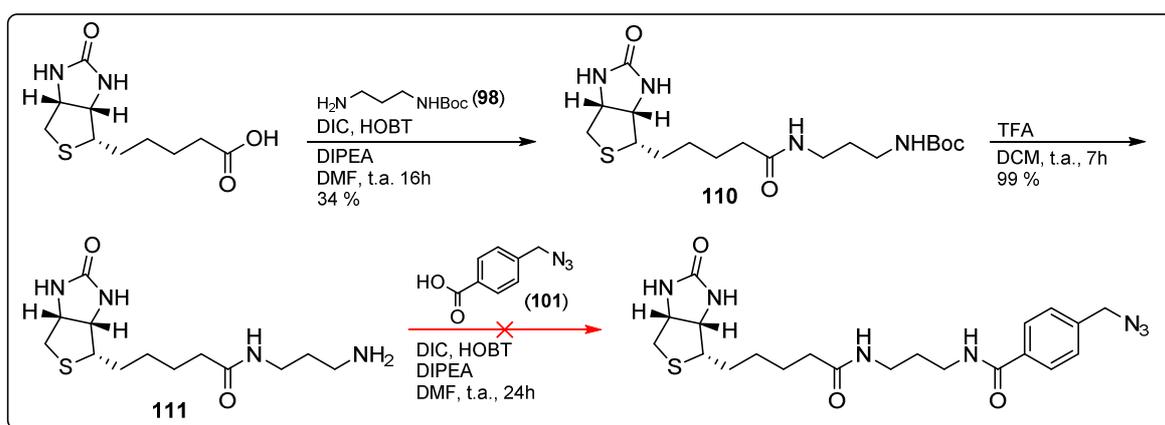


Figure 91 : Deuxième approche synthétique visant la formation du composé biotinylé

4.3.3.3. Troisième approche visant à former le composé biotinylé

Comme ces approches linéaires n'ont pas permis de former le produit biotinylé, nous avons décidé de suivre une stratégie rétro-synthétique convergente. Ainsi, nous avons choisi la liaison peptidique entre le bras *espaceur* et le pharmacophore comme point de déconnexion. Les deux synthons obtenus (synthons 1 et 2, Figure 92) devaient donc être préparés séparément et couplés lors de la dernière étape de synthèse.

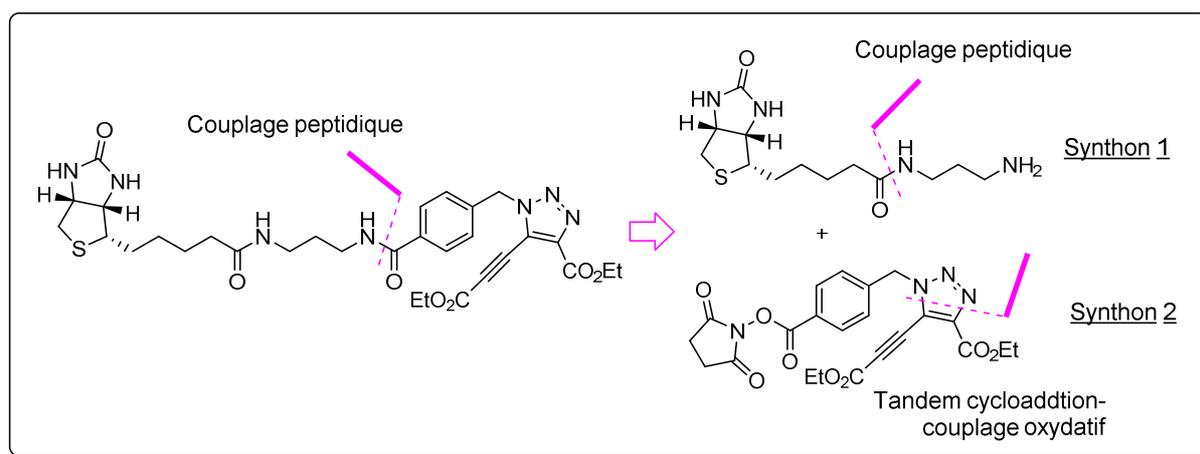


Figure 92 : Rétro-synthèse convergente pour la formation du composé biotinylé

Préparation du synthon (1)

Le couplage de la biotine au 1,3-diaminopropane mono-*N*-protégé **98**, effectué dans le cadre de la deuxième stratégie de synthèse (paragraphe 3.3.2), a donné un rendement assez faible (34%). Pour la préparation du synthon (1), nous avons donc décidé de pré-activer l'acide carboxylique porté par la biotine avant de passer au couplage. Le *N*-hydroxysuccinimide a donc été inséré (Figure 93). Ceci a donné l'intermédiaire **112** avec un rendement de 95%. L'ester porté par **112** est ensuite déplacé par l'amine libre 1,3-diaminopropane mono-*N*-protégé **98**, donnant le composé **113** avec un rendement de 78%. Enfin, **113** a été déprotégé par l'action de l'acide trifluoroacétique pour donner le synthon (1).

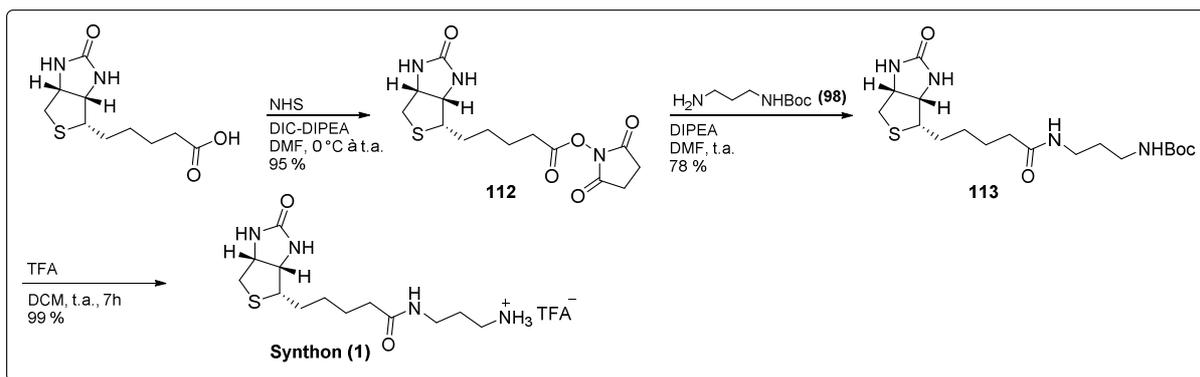


Figure 93 : Préparation du synthon 1

Préparation du synthon (2)

L'acide carboxylique du composé **101** a été activé par l'addition du *N*-hydroxy-succinimide, en vue du couplage peptidique avec le synthon (**1**). Le composé **114** a ainsi été formé avec un rendement de 95%. Ce dernier a ensuite suivi la réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif pour obtenir le synthon (**2**) avec un rendement non optimisé de 10%.

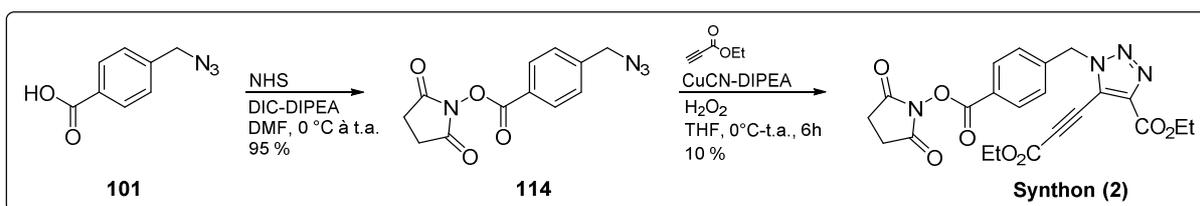


Figure 94 : Préparation du synthon (2)

Couplage des synthons (1) et (2)

Le couplage entre l'amine du synthon (**1**) et l'acide activé du synthon (**2**) (Figure 95) a donné un résultat préliminaire encourageant : l'analyse du brut réactionnel par LC-MS a permis de mettre en évidence la présence du composé biotinylé **115**. Comme cette méthodologie convergente s'est montrée viable, elle sera réutilisée avec des quantités plus importantes des synthons (**1**) et (**2**). Ceci permettra d'isoler le composé **115**, de le caractériser et de l'utiliser afin d'élucider la (les) cible(s) moléculaire(s) des composés *lead* non nucléosidiques **78** et **91**.

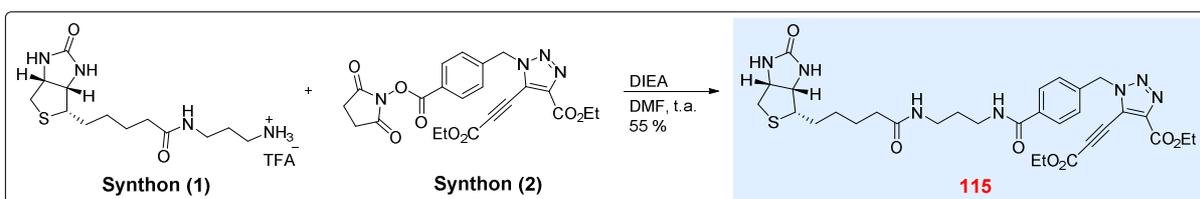


Figure 95 : Couplage des synthons 1 et 2 pour la formation du composé biotinylé

4.3.4. La cible des composés *lead* 78 et 91 est elle une enzyme à cystéine ?

L'étude structure-activité réalisée pour les deux séries développées, nucléosidique (Cf. Chapitre 3, paragraphe 3.2.5) et non nucléosidique (Cf. Chapitre 4, paragraphe 4.1.4), a révélé la nécessité du système conjugué alcynyl-ester pour l'activité antiproliférative. L'importance particulière du groupement carbonyle porté par l'ester a de surcroît été soulignée. Nous allons nous intéresser ici à la réactivité biologique des carbonyles α , β -insaturés.

i. Réactivité biologique du carbonyle α , β -insaturé

Dans le monde du vivant, les carbonyles α , β -insaturés interagissent prioritairement avec les protéines portant des groupements thiols, en raison de leur caractère mou¹⁰⁸. Par conséquent, les enzymes possédant des résidus cystéines dans leurs domaines catalytiques, présentent des cibles privilégiées pour ces espèces réactives. Plusieurs groupes ont tiré avantage de cette observation. En s'appuyant sur des accepteurs de Michael, ils ont développé des composés actifs agissant comme inhibiteurs d'enzyme(s) à cystéine. Nous en citons un seul à titre d'exemple : l'AG-7088¹⁰⁹ mais bien d'autres sont décrits dans la littérature^{110,111,112}.

Rupintrivir (développé par le groupe pharmaceutique Agouron) :

Le Rupintrivir ou AG7088 (Figure 96) est un vinyl-ester qui inhibe de façon irréversible et sélective la protéase à cystéine 3C. Comme cette enzyme est impliquée dans la réplication virale des rhinovirus humains, le Rupintrivir a été sélectionné comme candidat pour un traitement antiviral¹⁰⁹. Son développement a été conduit jusqu'en phase clinique II/III.

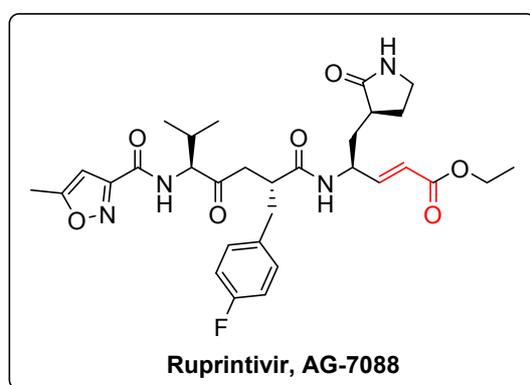


Figure 96 : Structure de l'AG7088/ Rupintrivir

ii. Cas des Composés 78 et 91

En nous référant à la réactivité qui caractérise les accepteurs de Michael (décrite ci-dessus), nous avons émis l'hypothèse, pour nos composés *lead*, d'un mode d'action reposant sur une interaction avec une (des) enzyme(s) à cystéine. Notons ici que des analogues de l'ACA sont connus pour être substrats de l'IMPDH (une enzyme à cystéine). Nos molécules étant également dérivées de l'ACA, cet élément conforte l'hypothèse énoncée ci-dessus. Afin d'étudier cette potentialité, nous avons souhaité tester leur réactivité chimique en présence d'une cystéine protégée au niveau de ses fonctions amine et acide carboxylique.

Ainsi, nous avons mis en présence le composé **91** et la *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-cystéine methyl ester, dans l'acétonitrile et à température ambiante. Nous avons observé une consommation totale du substrat après 3h de réaction. L'analyse du brut réactionnel a révélé trois produits différents que nous n'avons malheureusement pas réussi à isoler. Ce résultat nous a incités à réaliser la même expérience avec un composé modèle **79**. Pour ce deuxième test, nous avons à nouveau observé la formation de trois produits : un majoritaire et deux minoritaires dans un rapport de 0,50/0,25/0,25. Le produit majoritaire a pu être isolé (**116-a**, Figure 97). Il résulte de l'addition conjuguée *trans* du thiol sur le carbonyle α,β -insaturé.

Nous n'avons pas réussi à isoler les deux produits minoritaires mais nous suspectons qu'il s'agit d'une part d'un produit d'addition conjuguée *cis*, isomère Z (**116-b**, Figure 97) du produit majoritaire qui présente une configuration géométrique E, et d'autre part d'un produit d'addition en position 3 de l'accepteur de Michael (**116-c**, Figure 97). Les structures seraient celles présentées ci-dessous (Figure 97).

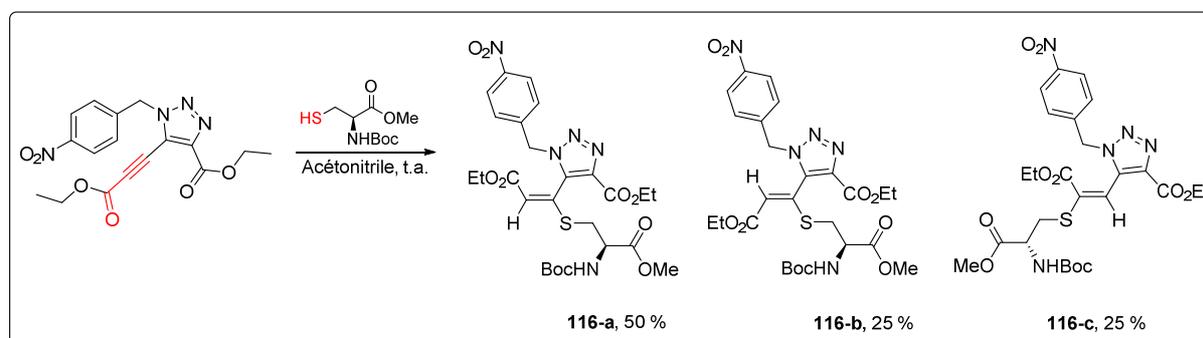


Figure 97 : Structures proposées pour les trois produits formés par addition du thiol sur le composé **79**

Remplacement de l'ester par une cétone

L'expérience décrite ci-dessus montre que nos composés *lead* réagissent bien en présence de nucléophiles de type thiol. Une interaction avec une ou des enzymes à cystéine pourrait donc être à l'origine de leur activité biologique. Ce résultat laisse penser que la fonction ester portée par l'alcyne est importante uniquement pour son groupement carbonyle. Elle pourrait donc être substituée par une cétone permettant à la fois de conserver le carbonyle α,β -insaturé et d'accroître la stabilité hydrolytique du composé. Pour étudier cette possibilité, nous avons synthétisé le produit **117** en utilisant le 3-butyn-2-one pour la réaction tandem cycloaddition-couplage oxydatif (Figure 98).

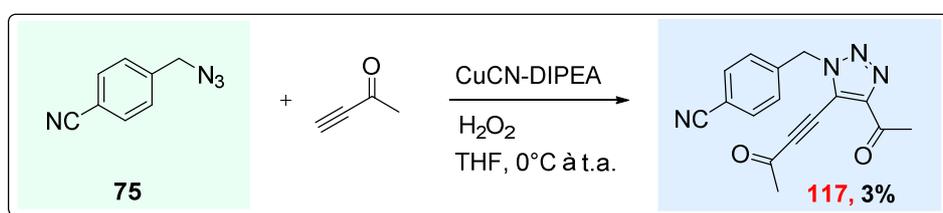


Figure 98 : Formation du produit **117**

L'activité antiproliférative de ce composé a été testée sur la lignée cellulaire K562 *via* le dosage colorimétrique XTT. A une concentration de 10 μ M, il a donné une viabilité cellulaire de 5,5%. Ce résultat est très proche de la viabilité cellulaire mesurée pour le composé *lead* **91** à même concentration (10 μ M) : 5.8%. Ainsi, l'importance de l'enchaînement alcyne-ester, mise en évidence par les études structure-activité, semble être due à l'accepteur de Michael formé par le groupement alcyne-carbonyle.

Ce résultat est très prometteur car il révèle la possibilité d'éliminer les sources d'instabilité que représentent les groupements esters portés par les positions 4 et 5 du triazole. Par ailleurs, ce résultat indique que l'étude de métabolisation peut être reprise en prenant en compte la réactivité d'accepteur de Michael que présentent nos composés *lead*.

4.4. Conclusion du chapitre 4 et perspectives

L'étude structure-activité réalisée pour la série nucléosidique a montré que le noyau saccharidique possédait une influence limitée. Afin de tirer avantage de cette observation, nous avons développé une deuxième série non nucléosidique à travers trois familles de produits (**I'**, **II'**, **III'**). Ceci a permis d'identifier deux nouveaux composés *lead* **78** et **91** dont

l'activité a été étudiée sur la lignée cellulaire K562 *via* le dosage colorimétrique XTT ($CI_{50} = 0,1$ et $0,2 \mu\text{M}$, respectivement) et la CMF ($DL_{50} = 1,0$ et $0,5 \mu\text{M}$, respectivement). Comme ce projet est centré non seulement sur la LMC mais également sur le SMD, les activités de **78** et **91** ont été testées sur six lignées cellulaires de SMD/LAM : SKM1-S et -R (correspondant au SMD), MOLM-13 et MOLM-14 (correspondant à une LAM s'étant développée à partir d'un SMD) et OCI-AML2 et OCI-AML3 (correspondant à une LAM s'étant développée *de novo*). Les deux nouveaux composés *lead* ont donné une activité antiproliférative efficace contre toutes ces lignées (CI_{50} (**78**) = $0,6-0,9 \mu\text{M}$; CI_{50} (**91**) = $0,6-1,4 \mu\text{M}$). Ces résultats prometteurs nous ont incités à étudier le profil pharmacologique de ces produits *via* les règles de Lipinski et Veber, la solubilité, la stabilité chimique et la toxicité. Ceci a donné un résultat satisfaisant pour le profil Lipinski-Veber, la stabilité chimique et la toxicité, tandis que l'hydro-solubilité de **78** et **91** s'est montrée limitée. Par ailleurs, des analyses par Western-blot ont été réalisées pour élucider le mode d'action de ces nouveaux composés *lead*. Elles ont montré que la mort cellulaire induite par **78** et **91** reposait uniquement sur un mécanisme autophagique. Ce résultat est très prometteur pour la suite du projet car il répond à l'objectif initial, à savoir conserver le mode d'action autophagique de l'ACA. Pour étudier le parcours intracellulaire de ces composés *lead* non nucléosidiques, deux composés fluorescents ont été synthétisés : **103** et **107**. Ils portent respectivement un noyau dansyle et un noyau 7-nitrobenzofurazanyle. La mesure des propriétés physiques de ces composés ainsi que des tests préliminaires de leur fluorescence en microscopie à champ large et confocale ont montré que **107** était plus efficace. Des études approfondies de fluorescence sont actuellement en cours. Afin d'élucider la (les) cible(s) moléculaire(s) de **78** et **91**, la synthèse d'un composé biotinylé a été envisagée à travers différentes stratégies. Un schéma réactionnel convergent s'est montré efficace et le dérivé biotinylé **115** a pu être identifié. Une étude s'appuyant sur le système biotine-streptavidine et sur l'analyse protéomique autour de ce composé est prévue. La relation structure-activité a validé la nécessité du motif ethynyl-ester déjà mise en évidence à travers la série nucléosidique. Ceci indique la potentialité pour nos composés *lead* d'agir comme des accepteurs de Michael. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une réaction chimique entre le substrat modèle **79** et une cystéine protégée au niveau de ses fonctions amine et acide carboxylique. Cette expérience a montré que l'activité des composés *lead* pouvait effectivement provenir de ce caractère accepteur de Michael. En nous appuyant sur ce résultat, nous avons synthétisé un dérivé de **78** en remplaçant l'ester éthylique par une cétone (composé **117**). L'évaluation biologique de ce produit a montré son efficacité, ce qui conforte davantage une réactivité de type accepteur de Michael pour nos composés *lead*.

Perspectives

Une étude plus approfondie autour du mode d'action de **78** et **91** est à prévoir. Sa comparaison au mode d'action de **5** pourrait permettre de mieux appréhender l'interconnexion apoptose-autophagie impliquée dans les processus tumoraux. L'hydro-solubilité limitée de **78** et **91** appelle une optimisation structurale de ces composés *lead*. Enfin, au vu de la potentialité de nos composés *lead* de réagir en tant qu'accepteurs de Michael, une reprise de l'étude de métabolisation de **5** est à envisager.

Conclusion générale

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse avaient pour objectif le développement de molécules bioactives contre des formes résistantes de LMC et SMD. Le point de départ de ce projet a été l'ACA ; une molécule endogène efficace contre les lignées résistantes de LMC et SMD grâce à un mode d'action original (induction de mort cellulaire par autophagique), mais dont l'activité s'est montrée bien trop faible ($IC_{50} = 1 \text{ mM}$)^{28,113}.

La stratégie adoptée dans le cadre de cette thèse consistait à développer des analogues de l'ACA visant à optimiser son activité biologique contre les formes résistantes de LMC et SMD, tout en conservant son mode d'action. Pour la synthèse de ces analogues, nous avons choisi de remplacer le noyau imidazole de l'ACA par un noyau 1,2,3-triazole 1,4,5-trisubstitué, en raison de l'accessibilité de la chimie des 1,2,3-triazoles (Figure 99).

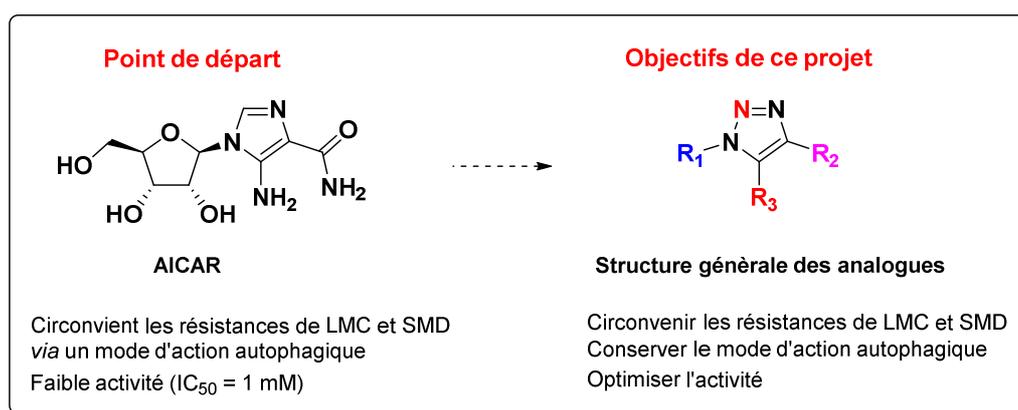


Figure 99: Objectifs et stratégie de ces travaux de thèse

Dans ce contexte, nous avons consacré la première partie de nos travaux au développement d'une nouvelle méthodologie monotope donnant accès à des 1,2,3-triazoles 1,4,5-trisubstitués. Ainsi, à travers un substrat modèle, nous avons mis au point des conditions réactionnelles permettant de transformer un azoture en un 5-alcynyl-1,2,3-triazole en une étape. Nous avons également discuté le mécanisme de cette réaction tandem, en nous référant à la littérature et en exposant différentes observations relatives à nos travaux. Cette nouvelle méthodologie ainsi qu'une deuxième méthodologie développée au laboratoire⁵⁷ ont été utilisées pour la synthèse de l'ensemble de nos produits.

Après avoir mis au point cet accès rapide et modulaire aux 1,2,3-triazoles tri-substitués, nous avons synthétisé une première famille d'analogues de l'ACA (série nucléosidique). La structure générale de cette série est composée de deux motifs : un motif glycone et un noyau 1,2,3-triazole. En variant les groupements R_1 , R_2 et R_3 (Figure 99) et en testant l'activité antiproliférative des produits obtenus sur la lignée de LMC K562, nous avons étudié de manière approfondie la relation structure-activité. Ceci a permis, d'une part, d'identifier un produit *lead* (**5**) (Figure 100), et d'autre part de mettre en évidence la nécessité du motif ethynyl-ester éthylique en position 5 du triazole. L'activité biologique du composé **5** a ensuite été investiguée davantage *via* des tests sur différentes lignées tumorales dont les lignées résistantes de LMC et SMD, respectivement, K562-R et SKM1-R. Ceci ayant donné des résultats prometteurs, nous avons étudié le profil pharmacologique de **5**. Nous avons montré que ce composé possédait un bon profil Lipinski-Veber, une solubilité satisfaisante et une faible toxicité. Par ailleurs, sa stabilité chimique et métabolique ont montré sa potentialité d'agir comme une pro-drogue. Le profil intéressant de **5** nous a incités à évaluer son activité *in vivo*. Ainsi, des tests sur des modèles murins ont été réalisés *via* une xénogreffe de cellules SKM1-R. Le résultat a été prometteur : la progression tumorale a en effet été atténuée de façon significative par rapport au contrôle et à l'AZA. Enfin, nous avons investigué le mode d'action de **5** *via* des analyses de type Western-blot. Ceci a mis en évidence que ce composé actif induisait à la fois une mort cellulaire apoptotique et autophagique.

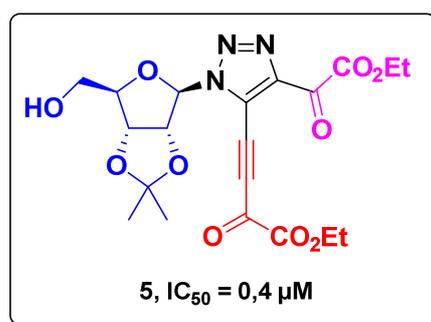


Figure 100: Structure du composé *lead* nucléosidique (**5**)

La relation structure-activité réalisée pour la série nucléosidique a montré que le groupement porté par la position 1 du triazole avait une influence fortement limitée sur la bio-activité. En nous appuyant sur cette observation, nous avons synthétisé une deuxième série d'analogues de l'ACA. Sa structure générale est composée de deux motifs : un noyau 1,2,3-triazole et un noyau benzylique ou aliphatique (série non nucléosidique). Une relation structure-activité a de nouveau été établie. Elle a confirmé la nécessité du motif ethynyl-ester éthylique en position 5

du triazole. Elle a également abouti à deux nouveaux composés *lead* **78** et **91** (Figure 101). L'activité biologique de ces derniers a été approfondie montrant leur efficacité sur les lignées résistantes de LMC et SMD, respectivement, K562-R et SKM1-R. De plus, ces composés se sont montrés actifs sur les lignées cellulaires MOLM-13 et MOLM-14 (correspondant à une LAM s'étant développée à partir d'un SMD) et OCI-AML2 et OCI-AML3 (correspondant à une LAM s'étant développée *de novo*). Suite à ces résultats intéressants, nous avons étudié les profils pharmacologiques de **78** et **91**. Leur hydro-solubilité s'est montrée limitée tandis que leurs profils Lipinski-Veber, stabilité et toxicité ont été satisfaisants. Par ailleurs, des analyses de type Western-blot ont été réalisées pour élucider le mode d'action de ces nouveaux composés *lead*. Elles ont montré que la mort cellulaire induite par **78** et **91** reposait uniquement sur un mécanisme autophagique. Ce résultat est très prometteur pour la suite du projet car il répond à l'objectif de conserver le mode d'action autophagique de l'ACA. Par ailleurs, nous avons souhaité étudier le parcours intra-cellulaire de ces composés *lead* non nucléosidiques. Dans cet objectif, nous avons synthétisé deux composés fluorescents (**103** et **107**) et avons testé leurs fluorescences de façon préliminaire. Ceci nous a conduits à sélectionner **107** pour une étude approfondie de fluorescence (étude en cours). Nous avons également voulu élucider la (les) cible(s) moléculaire(s) de **78** et **91**. Nous avons ainsi mis au point une stratégie de synthèse donnant accès au dérivé biotinylé de **78**. Ce dérivé permettra d'identifier les protéines interagissant avec nos composés *lead* à travers le système biotine-streptavidine et l'analyse protéomique.

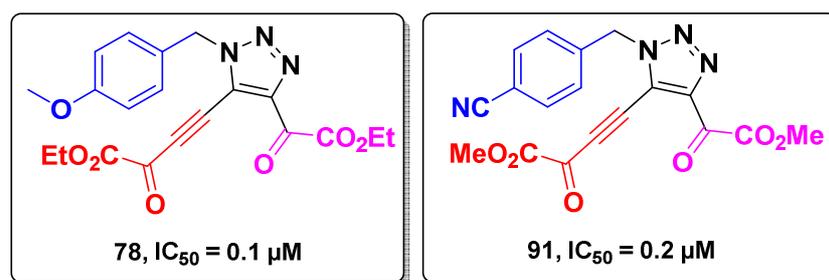


Figure 101: Structures des composés *lead* non nucléosidiques (**78** et **91**)

Lors de l'étude des relations structure-activité pour chacune des deux séries (nucléosidique et non nucléosidique), nous avons montré la nécessité du motif ethynyl-ester éthylique au niveau de la position 5 du triazole (Figure 102). Suite à cette observation, nous avons envisagé pour nos composés *lead* une réactivité de type accepteur de Michael. Nous avons pu valider cette hypothèse *via* deux expériences. 1) Nous avons réussi à faire réagir le substrat modèle **79** avec

une cystéine protégée au niveau de ses fonctions amine et acide carboxylique et avons isolé le produit majoritaire de cette réaction. Ce dernier résulte d'une addition conjuguée sur le carbonyle α,β -insaturé. 2) Nous avons synthétisé un dérivé de **91** en remplaçant l'ester éthylique par une cétone (**117**) et avons mis en évidence son activité antiproliférative contre la lignée cellulaire de LMC K562.

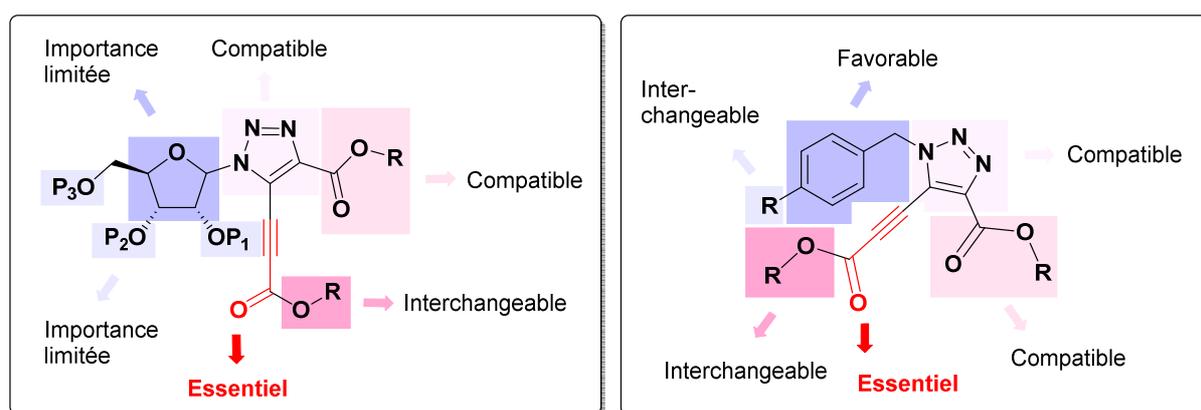


Figure 102: Relations structure-activité des deux séries nucléosidique et non nucléosidique/Nécessité de l'éthynyl-ester éthylique

Pour conclure, nous pouvons dire que ces travaux de thèse ont permis d'atteindre les objectifs fixés : 1) Trois composés *lead* ont été mis au point et ont donné des activités de 2500 à 10000 fois supérieures à celle de l'ACA sur la lignée de LMC K562. 2) Ces composés *lead* ont permis de circonvenir les résistances développées contre les traitements de référence de LMC (IM) et de SMD (AZA). 3) Le mode d'action autophagique de l'ACA a partiellement été conservé par le composé *lead* nucléosidique **5** et a entièrement été conservé par les composés *lead* non nucléosidiques **78** et **91**.

En perspectives, nous envisageons de : 1) Investiguer plus en détail la potentialité de **5** d'agir comme une pro-drogue et élucider sa forme active. 2) Optimiser l'hydro-solubilité de **78** et **91**. 3) Déterminer la localisation intracellulaire des composés *lead* non nucléosidiques. 4) Identifier la (les) cible(s) moléculaire(s) de ces composés *lead* non nucléosidiques *via* une étude protéomique. 5) Mieux appréhender l'interconnexion apoptose-autophagie en étudiant de façon plus approfondie la différence de mode d'action entre le composé *lead* nucléosidique (**5**) et les composés *lead* non nucléosidiques (**78** et **91**). 6) Etudier la métabolisation de nos différents composés *lead* (**5**, **78** et **91**) en nous appuyant sur leur réactivité de type accepteur de Michael.

Bibliographie

- (1) McCulloch, E. A.; Till, J. E. *Radiat. Res.* **1960**, *13* (1), 115.
- (2) Homberg, J.-C. *Immunologie fondamentale: 2e cycle des études de médecine, de pharmacie et d'odontologie*; De Boeck Secundair, 1999.
- (3) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*; International Agency for Research on Cancer, 2008.
- (4) Balmain, A. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1* (1), 77–82.
- (5) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674.
- (6) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100* (1), 57–70.
- (7) Hoerni, B. *Cancérologie et hématologie*; Elsevier Masson, 2001.
- (8) Nowell, P. C. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117* (8), 2033–2035.
- (9) ROWLEY, J. D. *Nature* **1973**, *243* (5405), 290–293.
- (10) Groffen, J.; Stephenson, J. R.; Heisterkamp, N.; de Klein, A.; Bartram, C. R.; Grosveld, G. *Cell* **1984**, *36* (1), 93–99.
- (11) Bartram, C. R.; de Klein, A.; Hagemeijer, A.; van Agthoven, T.; van Kessel, A. G.; Bootsma, D.; Grosveld, G.; Ferguson-Smith, M. A.; Davies, T.; Stone, M.; Heisterkamp, N.; Stephenson, J. R.; Groffen, J. *Nature* **1983**, *306* (5940), 277–280.
- (12) Lugo, T. G.; Pendergast, A. M.; Muller, A. J.; Witte, O. N. *Science* **1990**, *247* (4946), 1079–1082.
- (13) Daley, G.; Van Etten, R.; Baltimore, D. *Science* **1990**, *247* (4944), 824–830.
- (14) Deininger, M. W.; Goldman, J. M.; Melo, J. V. *Blood* **2000**, *96* (10), 3343–3356.
- (15) Fabbro, D. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8* (3), 228–229.
- (16) O'Hare, T.; Deininger, M. W. N.; Eide, C. A.; Clackson, T.; Druker, B. J. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17* (2), 212–221.
- (17) Marley, S. B.; Gordon, M. Y. *Clin. Sci. (Lond)*. **2005**, *109* (1), 13–25.
- (18) Samanta, A.; Perazzona, B.; Chakraborty, S.; Sun, X.; Modi, H.; Bhatia, R.; Priebe, W.; Arlinghaus, R. *Leukemia* **2010**, *25* (3), 463–472.
- (19) Druker, B. J.; Talpaz, M.; Resta, D. J.; Peng, B.; Buchdunger, E.; Ford, J. M.; Lydon, N. B.; Kantarjian, H.; Capdeville, R.; Ohno-Jones, S.; Sawyers, C. L. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344* (14), 1031–1037.
- (20) Capdeville, R.; Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Matter, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (7), 493–502.
- (21) Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Mett, H.; Meyer, T.; Müller, M.; Druker, B. J.; Lydon, N. B. *Cancer Res.* **1996**, *56* (1), 100–104.
- (22) Zimmermann, J.; Furet, P.; Buchdunger, E. *ACS symposium series* **2001**, 796, Chap. 15, 245–

- (23) Schindler, T. *Science* **2000**, 289 (5486), 1938–1942.
- (24) Hughes, T. P.; Hochhaus, A.; Branford, S.; Müller, M. C.; S. Kaeda, J.; Foroni, L.; Druker, B. J.; Guilhot, F.; Larson, R. A.; O'Brien, S. G.; Rudoltz, M. S.; Mone, M.; Wehrle, E.; Modur, V.; Goldman, J. M.; Radich, J. P. *Blood* **2010**, 116 (19), 3758–3765.
- (25) Jabbour, E.; Kantarjian, H. *Am. J. Hematol.* **2016**, 91 (2), 252–265.
- (26) Kimura, S.; Ando, T.; Kojima, K. *Int. J. Clin. Oncol.* **2014**, 19 (1), 3–9.
- (27) Campàs, C.; Lopez, J. M.; Santidrián, A. F.; Barragán, M.; Bellosillo, B.; Colomer, D.; Gil, J. *Blood* **2003**, 101 (9), 3674–3680.
- (28) Robert, G.; Ben Sahra, I.; Puissant, A.; Colosetti, P.; Belhacene, N.; Gounon, P.; Hofman, P.; Bost, F.; Cassuto, J.-P.; Auberger, P. *PLoS One* **2009**, 4 (11), e7889.
- (29) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40 (11), 2004–2021.
- (30) Huisgen, R. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1968**, 7 (5), 321–328.
- (31) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36 (8), 1249–1262.
- (32) Huisgen, R. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1963**, 2 (10), 565–598.
- (33) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67 (9), 3057–3064.
- (34) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41 (14), 2596–2599.
- (35) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (1), 210–216.
- (36) Hein, J. E.; Fokin, V. V. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (4), 1302.
- (37) Nolte, C.; Mayer, P.; Straub, B. F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, 46 (12), 2101–2103.
- (38) Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44 (15), 2210–2215.
- (39) Ahlquist, M.; Fokin, V. V. *Organometallics* **2007**, 26 (18), 4389–4391.
- (40) Straub, B. F. *Chem. Commun.* **2007**, No. 37, 3868.
- (41) Worrell, B. T.; Malik, J. a; Fokin, V. V. *Science* **2013**, 340 (6131), 457–460.
- (42) Wu, Y.-M.; Deng, J.; Fang, X.; Chen, Q.-Y. *J. Fluor. Chem.* **2004**, 125 (10), 1415–1423.
- (43) Tiwari, V. K.; Mishra, B. B.; Mishra, K. B.; Mishra, N.; Singh, A. S.; Chen, X. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (5), 3086–3240.
- (44) Hong, V.; Steinmetz, N. F.; Manchester, M.; Finn, M. G. **2010**.
- (45) Rondelez, Y.; Bertho, G.; Reinaud, O. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41 (6), 1044–1046.
- (46) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, 6 (17), 2853–2855.
- (47) Goyard, D.; Chajistamatiou, A. S.; Sotiropoulou, A. I.; Chrysina, E. D.; Praly, J. P.; Vidal, S.

- Chemistry* **2014**, *20* (18), 5423–5432.
- (48) Buckley, B. R.; Dann, S. E.; Heaney, H. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (21), 6278–6284.
- (49) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (11), 3192–3193.
- (50) Bock, V. D.; Perciaccante, R.; Jansen, T. P.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Org. Lett.* **2006**, *8* (5), 919–922.
- (51) Pérez-Castro, I.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García, M. D.; López, C.; De Clercq, E. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (23), 3805–3813.
- (52) Wu, Y.-M.; Deng, J.; Li, Y.; Chen, Q.-Y. *Synthesis* **2005**, *2005* (8), 1314–1318.
- (53) Li, L.; Zhang, G.; Zhu, A.; Zhang, L. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (9), 3630–3633.
- (54) Smith, N. W.; Polenz, B. P.; Johnson, S. B.; Dzyuba, S. V. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (3), 550–553.
- (55) Brotherton, W. S.; Clark, R. J.; Zhu, L. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (15), 6443–6455.
- (56) Barsoum, D.; Brassard, C.; Deeb, J.; Okashah, N.; Sreenath, K.; Simmons, J.; Zhu, L. *Synthesis (Stuttg.)* **2013**, *45* (17), 2372–2386.
- (57) Malnuit, V.; Duca, M.; Manout, A.; Bougrin, K.; Benhida, R. *Synlett* **2009**, No. 13, 2123–2128.
- (58) Kuijpers, B. H.; Dijkmans, G. C.; Groothuys, S.; Quaedflieg, P. J.; Blaauw, R. H.; van Delft, F. L.; Rutjes, F. P. *Synlett* **2005**, *2005* (20), 3059–3062.
- (59) Hein, J. E.; Tripp, J. C.; Krasnova, L. B.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48* (43), 8018–8021.
- (60) García-Álvarez, J.; Díez, J.; Gimeno, J. *Green Chem.* **2010**, *12* (12), 2127.
- (61) Wang, B.; Zhang, J.; Wang, X.; Liu, N.; Chen, W.; Hu, Y. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (20), 10519–10523.
- (62) Krasinski, A.; Fokin, Valery V.; Sharpless, K. B. *Org. Lett.* **2004**, *6* (8), 1237–1240.
- (63) Deng, J.; Wu, Y. M.; Chen, Q. Y. *Synthesis* **2005**, *16*, 2730–2738.
- (64) Yan, R.; Sander, K.; Galante, E.; Rajkumar, V.; Badar, A.; Robson, M.; El-Emir, E.; Lythgoe, M. F.; Pedley, R. B.; Årstad, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (2), 703–709.
- (65) Barsoum, D. N.; Okashah, N.; Zhang, X.; Zhu, L. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (19), 9542–9551.
- (66) Gerard, B.; Ryan, J.; Beeler, A. B.; Porco, J. A. *Tetrahedron* **2006**, *62* (26), 6405–6411.
- (67) Alonso, F.; Moglie, Y.; Radivoy, G.; Yus, M. *Synlett* **2012**, *23* (15), 2179–2182.
- (68) Li, L.; Fan, X.; Zhang, Y.; Zhu, A.; Zhang, G. *Tetrahedron* **2013**, *69* (47), 9939–9946.
- (69) Li, L.-J.; Zhang, Y.-Q.; Zhang, Y.; Zhu, A.-L.; Zhang, G.-S. *Chinese Chem. Lett.* **2014**, *25* (8), 1161–1164.
- (70) Domnin, I. N.; Remizova, L. A.; Starova, G. L.; Rominger, F. *Russ. J. Org. Chem.* **2009**, *45* (11), 1678–1682.
- (71) Casitas, A.; King, A. E.; Parella, T.; Costas, M.; Stahl, S. S.; Ribas, X. *Chem. Sci.* **2010**, *1* (3),

- (72) Hay, A. S. *J. Org. Chem.* **1962**, *27* (9), 3320–3321.
- (73) Pham, A. N.; Xing, G.; Miller, C. J.; Waite, T. D. *J. Catal.* **2013**, *301*, 54–64.
- (74) Zhang, G.; Yi, H.; Zhang, G.; Deng, Y.; Bai, R.; Zhang, H.; Miller, J. T.; Kropf, A. J.; Bunel, E. E.; Lei, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (3), 924–926.
- (75) Klionsky, D. J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8* (11), 931–937.
- (76) White, E. J. *Clin. Invest.* **2015**, *125* (1), 42–46.
- (77) Liu, E. Y.; Ryan, K. M. *J. Cell Sci.* **2012**, *125* (Pt 10), 2349–2358.
- (78) Levine, B. *Nature* **2007**, *446* (7137), 745–747.
- (79) Lorin, S.; Codogno, P.; Djavaheri-Mergny, M. *Bull. Cancer* **2008**, *95* (1), 43–50.
- (80) Liang, X. H.; Jackson, S.; Seaman, M.; Brown, K.; Kempkes, B.; Hibshoosh, H.; Levine, B. *Nature* **1999**, *402* (6762), 672–676.
- (81) Aita, V. M.; Liang, X. H.; Murty, V. V.; Pincus, D. L.; Yu, W.; Cayanis, E.; Kalachikov, S.; Gilliam, T. C.; Levine, B. *Genomics* **1999**, *59* (1), 59–65.
- (82) Pattingre, S.; Levine, B. *Cancer Res.* **2006**, *66* (6), 2885–2888.
- (83) Cluzeau, T.; Robert, G.; Puissant, A.; Jacquel, A.; Luciano, F.; Auberger, P. *Hématologie* **2015**, *21* (2), 107–116.
- (84) Kanzawa, T.; Germano, I. M.; Komata, T.; Ito, H.; Kondo, Y.; Kondo, S. *Cell Death Differ.* **2004**, *11* (4), 448–457.
- (85) Bellodi, C.; Lidonnici, M. R.; Hamilton, A.; Helgason, G. V.; Soliera, A. R.; Ronchetti, M.; Galavotti, S.; Young, K. W.; Selmi, T.; Yacobi, R.; Van Etten, R. A.; Donato, N.; Hunter, A.; Dinsdale, D.; Tirrò, E.; Vigneri, P.; Nicotera, P.; Dyer, M. J.; Holyoake, T.; Salomoni, P.; Calabretta, B. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119* (5), 1109–1123.
- (86) Mariño, G.; Niso-Santano, M.; Baehrecke, E. H.; Kroemer, G. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15* (2), 81–94.
- (87) Maiuri, M. C.; Zalckvar, E.; Kimchi, A.; Kroemer, G. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8* (9), 741–752.
- (88) Logue, M. W.; Han, B. H. *Carbohydr. Res.* **1983**, *121*, 287–297.
- (89) Babu Kumar, A.; Manetsch, R. *European J. Org. Chem.* **2014**, *2014* (17), 3551–3555.
- (90) Lozzio, C. B.; Lozzio, B. B. *Blood* **1975**, *45* (3), 321–334.
- (91) Scudiero, D. A.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T. H.; Currens, M. J.; Seniff, D.; Boyd, M. R. *Cancer Res.* **1988**, *48* (17), 4827–4833.
- (92) Chinchilla, R.; Nájera, C. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (3), 874–922.
- (93) Qi, J.; Peng, H.; Gu, Z.-L.; Liang, Z.-Q.; Yang, C.-Z. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* **2004**, *25* (6), 337–341.
- (94) Nakagawa, T.; Matozaki, S. *Leuk. Lymphoma* **1995**, *17* (3-4), 335–339.

- (95) Cluzeau, T.; Robert, G.; Puissant, A.; Jean-Michel, K.; Cassuto, J.-P.; Raynaud, S.; Auberger, P. *Cell Cycle* **2011**, *10* (14), 2339–2343.
- (96) Shoemaker, R. H. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (10), 813–823.
- (97) Di, L.; Kerns, E. H. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*; Academic Press, 2010.
- (98) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23* (1-3), 3–25.
- (99) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (12), 2615–2623.
- (100) Kerns, E. H.; Di, L.; Kerns, E. H.; Di, L. In *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*; 2008; pp 426–438.
- (101) Ettmayer, P.; Amidon, G. L.; Clement, B.; Testa, B. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (10), 2393–2404.
- (102) Chwieralski, C. E.; Welte, T.; Bühling, F. *Apoptosis* **2006**, *11* (2), 143–149.
- (103) Kerns, E. H.; Di, L.; Kerns, E. H.; Di, L. In *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*; 2008; pp 137 – II.
- (104) Walsh, J. S.; Miwa, G. T. *Pharmacology and Toxicology* **2011**, *51*, 145–167.
- (105) Matsuo, Y.; MacLeod, R. A. F.; Uphoff, C. C.; Drexler, H. G.; Nishizaki, C.; Katayama, Y.; Kimura, G.; Fujii, N.; Omoto, E.; Harada, M.; Orita, K. *Leukemia* **1997**, *11* (9), 1469–1477.
- (106) Diamandis, E. P.; Christopoulos, T. K. *Clin. Chem.* **1991**, *37* (5), 625–636.
- (107) Dundas, C. M.; Demonte, D.; Park, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (21), 9343–9353.
- (108) H. Johansson, M. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2012**, *12* (13), 1330–1344.
- (109) Tan, J.; George, S.; Kusov, Y.; Perbandt, M.; Anemüller, S.; Mesters, J. R.; Norder, H.; Coutard, B.; Lacroix, C.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Hilgenfeld, R. *J. Virol.* **2013**, *87* (8), 4339–4351.
- (110) Santos, M.; Moreira, R. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2007**, *7* (10), 1040–1050.
- (111) Sicard, J.; Rey, J.-B.; Scotté, F.; Mortier, L. *Actual. Pharm.* **2015**, *54* (546), 42–45.
- (112) Dougé, A.; Ravinet, A.; Bay, J.-O.; Tournilhac, O.; Guièze, R.; Lemal, R. *Bull. Cancer* **2016**, *103* (2), 127–137.
- (113) Robert, G.; Karsenti, J. M.; Luciano, F.; Mounier, N.; Cassuto, J. P.; Ades, L.; Raynaud, S.; Fenaux, P.; Auberger, P. *Blood* **2013**, *122* (21), 1568.

Partie expérimentale

Note : pour des raisons pratiques, nous avons décidé de décrire la partie expérimentale de nos travaux en anglais.

All chemical reagents were obtained from commercial sources (Sigma-Aldrich or Alfa Aesar) and were used as supplied. Anhydrous solvents were obtained according to standard procedures¹¹⁴. The reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC, Merck silica gel 60 F254 plates) and visualized both by UV radiation (254, 315 & 365 nm). Column chromatography¹¹⁵ was performed with flash silica gel (40–63 mm). All NMR spectra (¹H, ¹³C, ²D) were recorded on 200 or 500 Bruker Advance Spectrometers (200 MHz). ¹H NMR (200 MHz), ¹³C NMR (50 MHz, recorded with complete proton decoupling). Spectra were obtained with samples dissolved in deuterated solvents, used as internal references: CDCl₃, MeOD, DMSO-d₆, Acetone-d₆ with solvent signals at: 7.26, 3.31, 2.50, 2.05 ppm for ¹H NMR experiments and 77.16, 49.00, 39.52, 29.84 ppm for ¹³C NMR experiments, respectively¹¹⁶. Chemical shifts (δ) are given in ppm to the nearest 0.01 (¹H) or 0.1 ppm (¹³C). The coupling constants (*J*) are given in Hertz (Hz). The signals are reported as follows: (s=singlet, d=doublet, t=triplet, m=multiplet, br=broad). Assignments of ¹H and ¹³C NMR signals were achieved with the help of COSY, HSQC, HMBC experiments. Regular mass spectra (MS) were recorded on an Esquire 3000 Plus apparatus with ESI in both positive and negative mode. High resolution mass spectra HRMS were recorded on ESI-LTQOrbitrapU3000 RSLC spectrometer. HPLC analysis was performed on Waters™ 600 Controller with Waters™ 996 Photodiode Array Detector and Jasco LC-Net II /ADC apparatus using phenomenex columns following two different control methods : **1)** Nucleosidic compounds: 1.0 mL/min, gradient system 75% A / 25% B –(7min)→ 0% A / 100% B –(3 min)→ 75% A / 25% B –(3 min) with A= MilliQ® water and B= CH₃CN. **2)** Non nucleosidic compounds: 1.0 mL/min, gradient system 50% A / 50% B –(7min)→ 0 % A / 100% B –(3 min)→ 50% A / 50% B –(3 min) with A= MilliQ® water and B= CH₃CN. The methods were monitored at 213, 228, 260 and 280 nm. The absorption and fluorescence experiments were realized in triplicate in DMSO. The absorption spectra were recorded on a Cary 300 Scan spectrophotometer (Varian) using 1cm quartz cells at 20 °C. The fluorescence spectra were recorded on a FluoroMax 4.0 spectrofluorometer (Jobin Yvon, Horiba) by using excitation and emission slits of 2 nm and were corrected at excitation and emission. They

were taken with absorbance of about 0.05 at 20 °C at the excitation wavelength mentioned in the corresponding experiments. The quantum yields were corrected according to the variation of the refractive index of the different solvents. Quantum yields were determined by using as standard reference p-dimethylaminoflavone (dMAF) in EtOH ($\lambda_{ex} = 404 \text{ nm}$, $\Phi = 0.27$).

General procedure A

To a solution of corresponding bromide (1.0 mmol) in DMF (3.0 mL) was added sodium azide (2.0 mmol) at r.t. The reaction mixture was allowed to react until complete consumption of the starting material (overnight). Then, it was extracted with Et₂O/H₂O and the organic layer was dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure, and the azide was sufficiently pure to use without further work up.

General procedure B

To a solution of azide (1.0 mmol) in THF (10.0 mL) at 0 °C 10 min, were added successively the corresponding alkyne (4.0 mmol), CuCN (1.2 mmol), H₂O₂ (5.0 mmol) and DIPEA (2.0 mmol). The reaction mixture was allowed to react at r.t until complete consumption of the starting material (3-7h). The reaction mixture was then filtered on calcite and the solvent was removed under vacuum. The crude material was purified over a silica gel column eluted with cyclohexane/ethyl acetate: 9/1 to 7/3 to yield the desired product.

General procedure C

To a solution of azide (1.0 mmol) in THF or DCM (10.0 mL), were added successively the corresponding alkyne (2.0 mmol), CuI (1.2 mmol), acyl chloride (3.0 mmol) and DIPEA (1.5 mmol). The reaction mixture was allowed to react at r.t. until complete consumption of the starting material (3-5h). Then, it was filtered on calcite and the solvent was removed under vacuum. The crude material was purified over a silica gel column eluted with cyclohexane/ethyl acetate: 9/1 to 8/2 to yield the desired product.

General procedure D

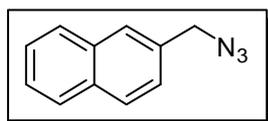
To a solution of azide (1.0 mmol) in THF or DCM (10.0 mL), were added successively the corresponding alkyne (2.0 mmol), CuI (1.2 mmol), I₂ (2.0 mmol), cerium ammonium nitrate (CAN) (1.0 mmol) and DIPEA (5.0 mmol). The reaction mixture was allowed to react at r.t.

until complete consumption of the starting material (0.5-1h). Then, it was filtered on calcite and the solvent was removed under vacuum. The crude material was purified over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate: 9/1 to 8/2) to yield the desired product.

General procedure E

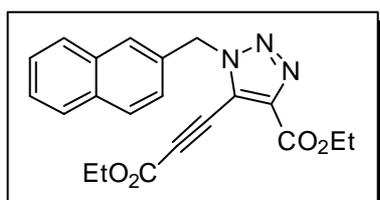
To a solution of 5-iodo-triazole (1.0 mmol) in anhydrous toluene at 60 °C were added the corresponding alkyne (5.0 mmol), triethylamine (1.0 mmol), CuI (0.05 mmol) and PdCl₂(PPh₃)₂ (0.05 mmol). The reaction mixture was allowed to react until complete consumption of the starting material (overnight). The reaction mixture was then filtered on calcite and the solvent was removed under vacuum. The crude material was purified over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate: 9/1 to 7/3) to yield the desired product.

2-(Azidomethyl)naphthalene (Compound 1)



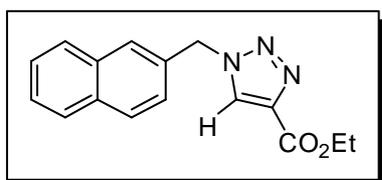
The title compound was obtained according to the general procedure **A** as a white powder in a quantitative yield (1.6 g). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.87 (s, 2H, CH₂), 7.16 (s, 1H, H_{Ar}), 7.37 (m, 2H, H_{Ar}), 7.72 (m, 4H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 54.9, 126.9, 127.5, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 128.7, 130.5, 131.8, 133.0; MS (ES) *m/z* = 206.1 [M+Na]⁺; 389.2 [2M+Na]⁺.

Ethyl 5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(naphthalen-2-ylmethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 3)



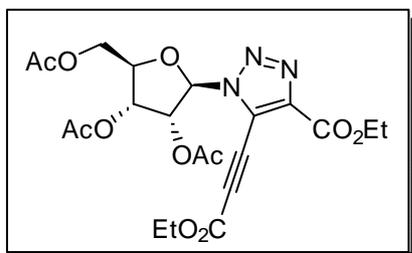
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **1** (97 mg, 0.5 mmol), as a white powder in a yield of 67% (317 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.35 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.40 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 4.33 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.42 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 5.80 (s, 2H, N-CH₂), 7.41-7.54 (m, 3H, H_{Ar}), 7.80-7.87 (m, 4H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 13.9, 14.0, 54.0, 61.8, 62.8, 68.8, 93.8, 121.4, 125.2, 126.6, 126.8, 127.7, 128.0, 128.2, 129.1, 130.4, 133.0, 133.2, 142.9, 152.3, 159.2; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₂₁H₂₀O₄N₃, 378.1448, found 378.1451; HPLC (λ₂₅₄) >99% purity.

Ethyl 1-(naphthalen-2-ylmethyl)-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 3')



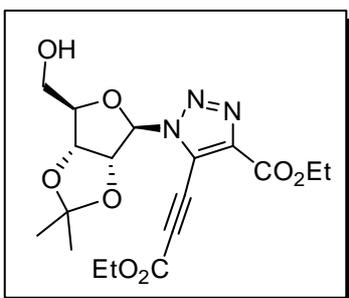
The title compound is a byproduct of the reaction described above. It was obtained as a white powder in a yield of 23% (81 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.36 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.37 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.72 (s, 2H, N- CH_2), 7.34 (dd, J 8.5 and 1.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.46-7.60 (m, 2H, H_{Ar}), 7.72-7.92 (m, 4H, H_{Ar}), 8.00 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazole}}$); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.9, 55.3, 61.9, 125.9, 127.5, 127.6, 128.1, 128.4, 128.5, 128.6, 130.1, 131.7, 133.8, 133.9, 141.3, 161.3; MS (ES) m/z = 304.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 585.2 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

1-Deoxy-1-(5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(ethoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose (Compound 4)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from 1-deoxy-1-azido-2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose (3.0 g, 9.8 mmol), as a white powder in a yield of 63% (3.1 g). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.36 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.42 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 2.04 (s, 3H, CH_3_{Ac}), 2.13 (s, 6H, 2CH_3_{Ac}), 4.14 (dd, J 12.3 and 4.2 Hz, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 4.29-4.50 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ and $\text{H}_{4',5'/5''}$), 5.72 (t, J 5.5 Hz, 1H, $\text{H}_{3'}$), 6.05 (dd, J 5.5 and 3.5 Hz, 1H, $\text{H}_{2'}$), 6.21 (d, J 3.45 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 3.9, 14.0, 20.4, 20.5, 20.6, 62.0, 62.4, 63.1, 67.6, 70.7, 73.7, 81.6, 89.1, 94.0, 122.2, 143.0, 152.3, 158.9, 169.1, 169.4, 170.5; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_{11}\text{N}_3$, 496,1561, found 496.1564; HPLC (λ_{254}) 100% purity.

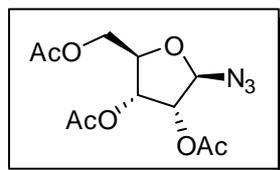
1-Deoxy-1-(5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(ethoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-*O*-isopropylidene-D-ribofuranose (Compound 5)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from 1-deoxy-1-azido-2,3-*O*-isopropylidene- β -D-ribofuranose (1.0 g, 4.6 mmol), as a brown powder in a yield of 64% (1.0 g). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.32-1.46 (m, 9H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$ and $\text{CH}_3_{\text{isop}}$), 1.61 (s, 3H, $\text{CH}_3_{\text{isop}}$), 2.86 (br, 1H, OH), 3.66 (dd, J 12.4 and 4.7 Hz, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 3.80 (dd, J 12.4 and 3.6 Hz, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 4.34 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.45 (q, J

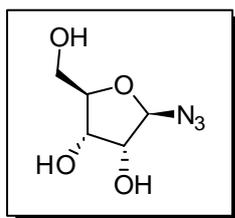
7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.52-4.57 (m, 1H, H_4), 5.04 (dd, J 5.9 and 1.8 Hz, 1H, H_3), 5.34 (dd, J 5.8 and 2.2 Hz, 1H, H_2), 6.29 (d, J 2.2 Hz, 1H, H_1); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 13.9, 14.0, 25.1, 26.9, 62.1, 63.0, 67.5, 81.8, 85.1, 89.4, 93.8, 94.0, 114.1, 122.0, 142.7, 152.2, 158.7, 158.9; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_8\text{N}_3$, 410.1557, found 410.1558; HPLC (λ_{254}) 100% purity.

1-Deoxy-1-azido-2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose (Compound 7)



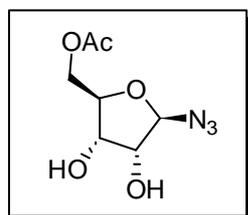
To a solution of 1,2,3,5-tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose (3.2 g, 10.0 mmol) in DCM (100.0 mL) were added successively trimethylsilyl azide (2.7 mL, 20.0 mmol) and boron trifluoride diethyl etherate (1.3 mL, 10.0 mmol), dropwise. The reaction mixture was allowed to react at r.t. until complete consumption of the starting material (90 min). Then, it was washed with NaHCO_3 . The organic layer was dried over MgSO_4 and the solvent was removed under vacuum giving desired product as a colorless oil in a quantitative yield (3.0 g). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 2.01 (s, 3H, CH_3Ac), 2.06 (s, 6H, $2\text{CH}_3\text{Ac}$), 4.00-4.13 (m, 1H, $\text{H}_{5/5'}$), 4.26-4.39 (m, 2H, $\text{H}_{5/5'}$ and H_4), 5.07 (dd, J 4.8 and 2.0 Hz, 1H, H_2), 5.24-5.30 (m, 1H, H_3), 5.31 (d, J 1.9 Hz, 1H, H_1); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 20.2, 20.3, 20.5, 62.8, 70.2, 74.3, 79.2, 92.4, 169.2, 169.4, 170.4; MS (ES) m/z = 324.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 625.2 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$.

1-Deoxy-1-azido- β -D-ribofuranose (Compound 8)



To a solution of compound 7 (200 mg, 0.6 mmol) in MeOH (15.0 mL) was added aqueous ammonia (30%) (5.0 mL, excess). The reaction mixture was allowed to react at r.t. for 90 min. After evaporation under pressure, product 8 was obtained as a pure yellow oil in a quantitative yield. ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 3.6 (dd, J 12.0 and 5.4 Hz, 1H, $\text{H}_{5/5'}$), 3.74 (d, J 3 Hz, 1H, $\text{H}_{5/5'}$), 3.81 (dd, J 1.9 and 4.4 Hz, 1H, H_2), 3.94-4.08 (m, 2H, H_3 and H_4), 5.20 (d, J 1.7, 1H, H_1); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 63.8, 72.0, 76.5, 85.5, 96.5.

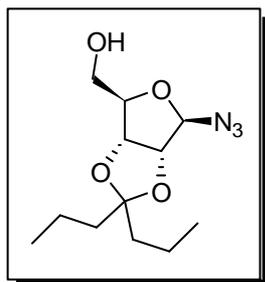
1-Deoxy-1-azido-5-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose (Compound 9)



To a solution of compound 7 (200 mg, 0.6 mmol) in MeOH (15.0 mL) was added aqueous ammonia (30%) (5.0 mL, excess). The reaction mixture was allowed to react 10 min at r.t. Then, it was concentrated

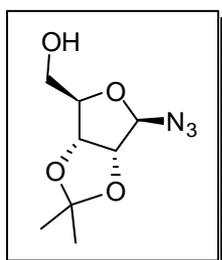
under vacuum at 0 °C and purified over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2 to 4/6) giving product **9** as a yellow oil in a yield of 60% (78 mg). The purity of this compound was confirmed by proton NMR. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.13 (s, 3H, CH_{3Ac}), 2.57 (br, 2H, OH), 3.96 (dd, *J* 1.2 and 4.5 Hz, 1H, H₂), 4.12-4.29 (m, 3H, H₃, H_{5,5'}), 4.37-4.46 (m, 1H, H₄), 5.30 (d, *J* 1.1 Hz, 1H, H₁).

1-Deoxy-1-azido-2,3-*O*-(hept-4-ylidene)-β-D-ribofuranose (Compound 10)



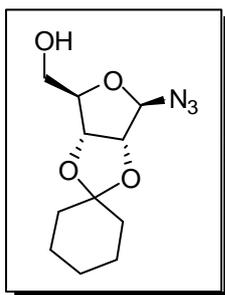
To a solution of compound **8** (400 mg, 2.3 mmol) in DMF (6.0 mL), 4-heptanone (1.2 mL, 9.2 mmol), triethyl orthoformate (1.1 mL, 6.9 mmol) and HCl (1M) in dioxane (3.2 mL) were added. The reaction mixture was stirred under vacuum until complete consumption of the starting material (24h). It was washed with a saturated solution of NaHCO₃ (100.0 mL), then extracted with DCM (100.0 mL). The organic layer was then washed with 10% solution of LiCl (25.0 mL) and dried over MgSO₄. The solvents were removed under vacuum and the crude material was purified over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate: 10/0 to 8/2) to yield product **10** as a yellow oil (393 mg, 63%). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 0.86-0.96 (m, 6H, 2CH₃), 1.25-1.56 (m, 8H, 4CH₂), 2.29-2.36 (m, 1H, OH), 3.60-3.83 (m, 2H, H_{5,5'}), 4.40-4.44 (m, 1H, H₄), 4.52 (d, *J* 6.0 Hz, 1H, H₃), 4.76 (d, *J* 6.0 Hz, 1H, H₂), 5.55 (s, 1H, H₁); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.2, 14.3, 16.4, 17.4, 38.8, 39.1, 63.7, 81.8, 86.1, 88.8, 98.2, 116.7.

1-Deoxy-1-azido-2,3-*O*-isopropylidene-β-D-ribofuranose (Compound 11)



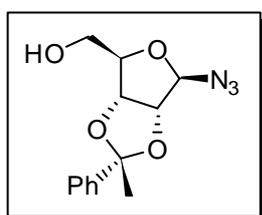
To a solution of compound **8** (430 mg, 2.4 mmol) in acetone (10.0 mL), dimethoxypropane (1.2 mL, 9.6 mmol) and boron trifluoride diethyl etherate (0.3 mL, 0.2 mmol) were added. The reaction mixture was allowed to react at r.t. until complete consumption of the starting material (1h). Then, it was washed with triethylamine. After evaporation under reduced pressure, the crude material was purified over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate: 9/1 to 8/2) to yield product **11** as a yellow oil (382 mg, 74%). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.28 (s, 3H, CH_{3isop}), 1.46 (s, 3H, CH_{3isop}), 2.67 (br, 1H, OH), 3.58-3.75 (m, 2H, H_{5,5'}), 4.34-4.39 (m, 1H, H₄), 4.48 (d, *J* 5.9 Hz, 1H, H₃), 4.72 (dd, *J* 5.9 and 0.7 Hz, 1H, H₂), 5.51 (s, 1H, H₁); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 25.0, 26.6, 63.7, 81.7, 86.0, 88.7, 98.1, 113.2.

1-Azido-2,3-*O*-cyclohexylidene- β -D-ribofuranose (Compound 12)



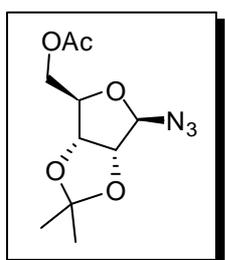
To a solution of 1-deoxy-1-azido- β -D-ribofuranose (435 mg, 2.4 mmol) in DMF (2.2 mL), dimethoxycyclohexane (1.5 mL, 9.6 mmol) and *p*-TsOH (21 mg, 0.1 mmol) were added. The reaction mixture was stirred under vacuum until complete consumption of the starting material (1h). Then, it was washed with triethylamine, cooled into a solution of LiCl (10%) and extracted with ethyl acetate. The solvents were removed under vacuum and the crude material was purified over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate: 10/0 to 8.5/1.5) to yield product **12** as a yellow oil (416 mg, 68%). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.39-1.73 (m, 10H, $5\text{CH}_{2\text{cyclohexyl}}$), 3.68 (dd, J 12.3 and 5.0 Hz, 1H, $\text{H}_{5/5'}$), 3.79 (dd, J 12.3 and 3.7 Hz, 1H, $\text{H}_{5/5'}$), 4.42 (ddd, J 0.8, 3.5 and 4.8 Hz, 1H, H_4), 4.53 (d, J 5.9 Hz, 1H, H_2), 4.76 (dd, J 5.9 and 0.8 Hz, 1H, H_3), 5.55 (s, 1H, H_1); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 23.7, 23.9, 24.9, 34.4, 36.2, 63.6, 81.2, 85.5, 88.7, 98.2, 113.8.

((2R,3aR,4R,6R,6aR)-6-Azido-2-methyl-2-phenyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methanol (Compound 13)



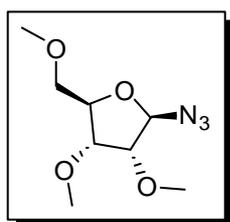
The title compound was obtained according to the procedure above starting from compound **8** (400 mg, 2.2 mmol) and (1,1-dimethoxy)benzene (1.4 mL, 8.8 mmol), as a colorless oil (616 mg, 85%). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.63 (s, 3H, CH_3), 2.27 (t, J 6.5 Hz, 1H, OH), 3.65-3.73 (m, 2H, $\text{H}_{5/5'}$), 4.31-4.36 (m, 1H, H_4), 4.69 (d, J 6.0 Hz, 1H, H_3), 4.94 (dd, J 6.0 and 1.1 Hz, 1H, H_2), 5.46 (s, 1H, H_1), 7.33-7.39 (m, 3H, H_{Ar}), 7.49-7.54 (m, 2H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 27.5, 63.6, 82.1, 86.3, 87.8, 97.2, 113.1, 125.0, 128.1, 128.4, 142.4.

1-Deoxy-1-azido-2,3-*O*-isopropylidene-5-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose (Compound 14)



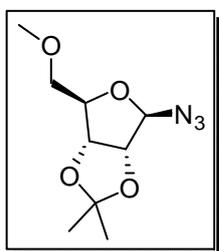
The title compound was obtained following the procedure above from 1-deoxy-1-azido-5-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose (7.4 g, 34.1 mmol) as a yellow oil (6.3 g, 72%). The product was purified and reacted with the commercial clickable anchor *via* general procedure **B** providing the full characterization of the final product (*Cf.* compound **22**).

1-Azido-2,3,5-tri-*O*-methyl- β -D-ribofuranose (Compound 15)



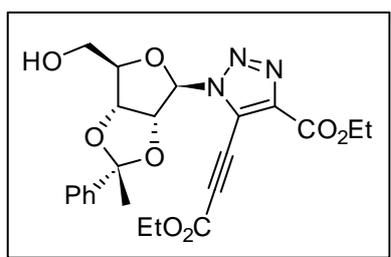
To a stirred solution of compound **8** (250 mg, 1.5 mmol) in DMF (10.0 mL), NaH (225 mg, 6.2 mmol) was added under argon at 0 °C. The reaction mixture was maintained at 0 °C until H₂ (g) was completely evacuated. MeI (0.9 mL, 15.5 mmol) was then added and the mixture was allowed to react overnight at r.t. The excess of MeI was neutralized by adding MeOH. Then, the solvent was removed under vacuum. The crude material was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with a solution of LiCl (10%) and dried over MgSO₄. The crude material was purified over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate: 9/1 to 6/4) to yield product **15** as a colorless oil (282 mg, 77%).
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.41 (s, 3H, O-CH₃), 3.42 (s, 3H, O-CH₃), 3.49 (s, 3H, O-CH₃), 3.52–3.58 (m, 2H, H_{5,5'}), 3.64 (dd, *J* 2.0 and 4.6 Hz, 1H, H₂), 3.86 (dd, *J* 4.6 and 6.7 Hz, 1H, H₃), 4.18 (ddd, *J* 6.7, 4.8 and 3.4 Hz, 1 H, H₄), 5.32 (d, *J* 1.9 Hz, 1H, H₁); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 58.4, 58.5, 59.6, 73.1, 79.6, 81.2, 82.5, 92.3.

1-Azido-2,3-*O*-isopropylidene-5-*O*-methyl- β -D-ribofuranose (Compound 16)



The title compound was obtained according to the procedure above starting from compound **11** (527 mg, 2.4 mmol) as a colorless oil (534 mg, 96%).
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.30 (s, 3H, CH_{3isop}), 1.48 (s, 3H, CH_{3isop}), 3.40 (s, 3H, O-CH₃), 3.51–4.47 (m, 2H, H_{5,5'}), 4.40 (m, 1H, H₄), 4.47 (d, *J* 6.0 Hz, 1H, H₂), 4.69 (dd, *J* 6.0 and 1.1 Hz, 1H, H₃), 5.49 (s, 1H, H₁); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 25.2, 26.7, 59.5, 72.9, 82.3, 85.6, 86.1, 96.8, 113.2.

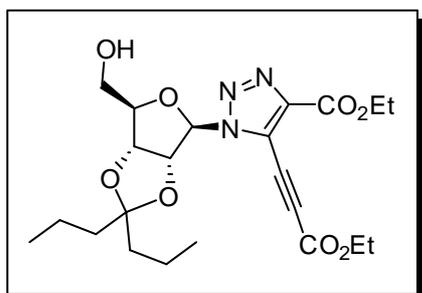
Ethyl 5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-((2*R*,3*aR*,4*R*,6*R*,6*aR*)-6-(hydroxymethyl)-2-methyl-2-phenyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 17)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **13** (529 mg, 1.8 mmol) as a white powder in a yield of 47% (402 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.35–1.46 (m, 6H, 2CH₂-CH₃), 1.68 (s, 3H, CH₃), 2.95–3.02 (m, 1H, OH), 3.62–3.85 (m, 2H, H_{5,5'}), 4.31–4.50 (m, 5H, 2CH₂-CH₃ and H₄), 5.22 (dd, *J* 6.0 and 2.0 Hz, 1H, H₃), 5.44 (dd, *J* 6.0 and 2.4 Hz, 1H, H₂), 6.15 (d, *J* 2.4 Hz, 1H, H₁), 7.34–7.45 (m, 3H, H_{Ar}), 7.57–7.62 (m, 2H,

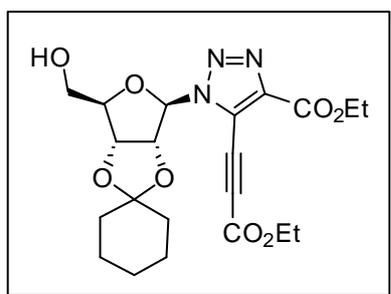
H_Ar); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 13.9, 14.0, 28.2, 62.1, 63.0, 63.2, 67.4, 82.3, 86.1, 88.8, 93.0, 94.0, 114.2, 121.9, 124.9, 128.4, 128.5, 142.5, 152.1, 158.9; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₂₃H₂₆O₈N₃, 472.1714, found 410.1716; HPLC (λ₂₅₄) 98.4% purity.

1-Deoxy-1-(5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(ethoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-O-(hept-4-ylidene)-D-ribofuranose (Compound 18)



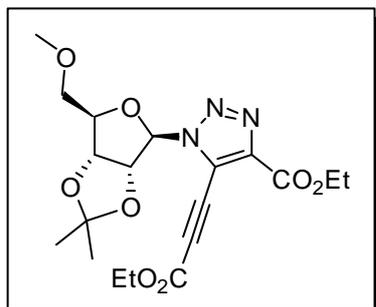
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **10** (366 mg, 1.3 mmol) as a white powder in a yield of 48% (620 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 0.87-1.01 (m, 6H, 2CH₃_{propyle}), 1.32-1.81 (m, 14H, 2CH₂-CH₃ and 4CH₂_{propyle}), 2.87 (m, 1H, OH), 3.60-3.84 (m, 2H, H_{5',5''}), 4.29-4.51 (m, 4H, 2CH₂-CH₃), 4.56 (br, 1H, H_{4'}), 5.04 (d, *J* 6.0 Hz, 1H, H_{3'}), 5.31-5.33 (m, 1H, H_{2'}), 6.31 (br, 1H, H_{1'}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.0, 14.0, 14.3, 16.7, 17.5, 39.0, 39.1, 62.1, 63.1, 63.2, 67.5, 81.9, 85.5, 89.7, 94.0, 117.9, 122.1, 142.7, 152.2, 158.9; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₂₂H₃₂O₈N₃, 466.2184, found 466.2185; HPLC (λ₂₅₄) 100% purity.

1-Deoxy-1-(5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(ethoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-O-cyclohexylidene-β-D-ribofuranose (Compound 19)



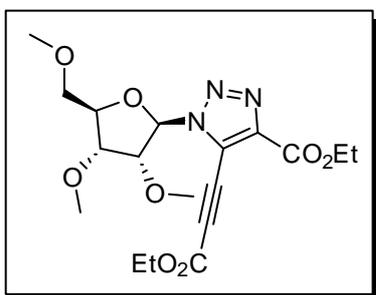
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **12** (301 mg, 1.2 mmol) as a brown powder in a yield of 42% (610 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.33-1.47 (m, 6H, 2CH₂-CH₃), 1.91-1.53-1.91 (m, 10H, 5 CH₂_{cyclohexyl}), 3.68 (dd, *J* 12.6 and 4.7 Hz, 1H, H_{5',5''}), 3.83 (dd, *J* 12.4 and 3.3 Hz, 1H, H_{5',5''}), 4.35 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.47 (q, *J* 7.2 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.57 (s, 1H, H_{4'}), 5.03 (dd, *J* 5.8 and 1.6 Hz, 1H, H_{3'}), 5.32 (dd, *J* 5.8 and 2.2 Hz, 1H, H_{2'}), 6.31 (d, *J* 2.1 Hz, 1H, H_{1'}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 13.9, 14.0, 23.6, 23.9, 24.8, 34.6, 36.8, 62.1, 63.1, 63.2, 67.6, 81.4, 84.9, 89.6, 94.1, 115.0, 122.0, 142.8, 152.2, 158.9; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₂₁H₂₇O₈N₃, 450.1871, found 410.1872; HPLC (λ₂₅₄) 100% purity.

1-Deoxy-1-(5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(ethoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-O-isopropylidene--5-O-methyl-β-D-ribofuranose (Compound 20)



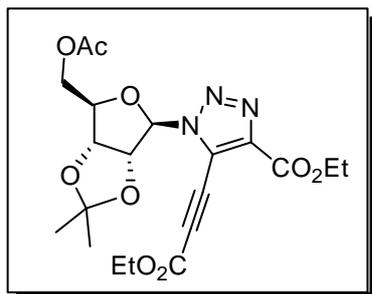
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **16** (456 mg, 1.9 mmol) as a brown powder in a yield of 49% (396 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.33-1.46 (m, 9H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$ and $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.60 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 3.22 (s, 3H, O- CH_3), 3.39-3.33 (m, 2H, $\text{H}_{5',5''}$), 4.34 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.40-4.53 (m, 3H, H_4' and $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.98 (dd, J 6.0 and 2.4 Hz, 1H, H_3'), 5.55 (dd, J 6.0 and 0.9 Hz, 1H, H_2'), 6.27-6.34 (m, 1H, H_1'); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 13.9, 14.0, 25.1, 59.2, 63.0, 68.0, 72.2, 82.3, 84.2, 87.9, 92.9, 93.9, 114.1, 122.0, 143.0, 152.3, 159.1; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{N}_3$, 424.1714, found 424.1717; HPLC (λ_{254}) 100% purity.

Ethyl 1-(2,3,5-tri-O-methyl-D-ribofuranosyl)-5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 21)



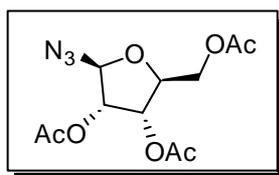
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **15** (217 mg, 1.0 mmol) as a brown powder in a yield of 40% (160 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.35 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.41 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 3.31 (s, 3H, O- CH_3), 3.49 (s, 3H, O- CH_3), 3.50 (s, 3H, O- CH_3), 3.53 (d, J 2.2 Hz, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 3.55 (d, J 1.2 Hz, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 4.21 (t, J 5.2 Hz, 1H, H_3'), 4.27-4.50 (m, 5H, H_4' and $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.63 (dd, J 4.9 and 3.6 Hz, 1H, H_2'), 6.17 (d, J 3.6 Hz, 1H, H_1'); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 13.9, 14.0, 58.4, 58.9, 59.4, 61.9, 63.0, 68.0, 72.5, 79.4, 82.1, 82.7, 89.6, 93.8, 122.2, 142.8, 152.2, 159.1; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{N}_3$, 412.1714, found 412.1715; HPLC (λ_{254}) 99.4% purity.

1-Deoxy-1-(5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(ethoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-O-isopropylidene-5-O-acetyl-β-D-ribofuranose (Compound 22)



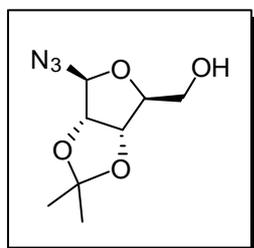
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **14** (3.0 g, 11.7 mmol) as a yellow oil in a yield of 63% (3.3 g). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.26-1.39 (m, 9H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$ and $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 1.53 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 1.93 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{Ac}}$), 3.91-4.07 (m, 2H, $\text{H}_{5',5''}$), 4.22-4.51 (m, 5H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$ and $\text{H}_{4'}$), 4.96 (dd, J 5.89 and 2.4 Hz, 1H, $\text{H}_{3'}$), 5.57-5.45 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$), 6.25 (s, 1H, $\text{H}_{1'}$); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 13.8, 13.8, 20.4, 26.6, 61.8, 62.8, 63.2, 67.6, 81.7, 83.9, 86.7, 92.2, 93.7, 114.1, 122.0, 142.8, 152.0, 158.8, 170.1; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_9\text{N}_3$, 452.1664, found 452.1666; HPLC (λ_{254}) 100% purity.

1-Deoxy-1-azido-2,3,5-tri-O-acetyl-β-L-ribofuranose (Compound 24)



To a solution of 1,2,3,5-tetra-*O*-acetyl-β-*L*-ribofuranose (1.0 g, 3.3 mmol) in DCM (30.0 mL) were added successively trimethylsilyl azide (0.9 mL, 6.7 mmol) and boron trifluoride diethyl etherate (0.4 mL, 3.3 mmol) dropwise. The reaction mixture was allowed to react at r.t. until complete consumption of the starting material (90 min). Then, it was washed with NaHCO_3 . The organic layer was dried over MgSO_4 and the solvent was removed under vacuum giving desired product as a colorless oil in a yield of 97% (914 mg). ^1H and ^{13}C NMR profiles are the same as for its enantiomer: compound **7**.

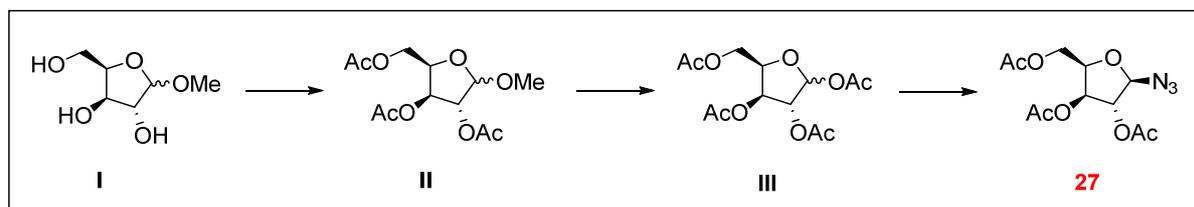
1-Deoxy-1-azido-2,3-O-isopropylidene-β-L-ribofuranose (Compound 25)



To a solution of 1-Deoxy-1-azido-β-*L*-ribofuranose (430 mg, 2.4 mmol) in acetone (10.0 mL), dimethoxypropane (1.2 mL, 9.6 mmol) and boron trifluoride diethyl etherate (0.3 mL, 0.2 mmol) were added. The reaction mixture was allowed to react at r.t. until complete consumption of the starting material (1h). Then, it was washed with triethylamine. The solvent was removed under vacuum and the crude material was purified over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate: 9/1 to 8/2) to yield product **25** as a yellow oil (352 mg, 67%). ^1H and ^{13}C NMR profiles are the same as for its enantiomer: compound **11**.

1-Deoxy-1-azido-2,3,5-*O*-tri-acetyl- β -D-xylofuranose (Compound 27)

Compound **27** was obtained following the synthetic pathway described below:



To a stirred solution of D-xylose (2.5 g, 16.5 mmol) in MeOH (50.0 mL) at 0 °C, concentrated sulfuric acid (0.5 mL, excess) was added dropwise. The reaction mixture was allowed to react at r.t. until complete consumption of the starting material (overnight). Then, it was cooled at 0 °C and pyridine (2.5 mL) was added. The mixture was evaporated under vacuum and pyridine (15.0 mL) was added for the second time, stirred and evaporated under vacuum giving a colorless oil (intermediate **I**, Cf. scheme above).

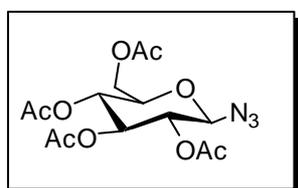
Then, to a solution of **I** in pyridine (25.0 mL) at 0 °C, Ac₂O (8.0 mL, 83.0 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred at r.t. for 2h then poured into cold water. The product was extracted with DCM (3x 100.0 mL). The combined extracts were washed with HCl (2%) and a saturated solution of NaCl (50.0 mL). The organic layer was then dried over MgSO₄ and the solvent was removed under vacuum to afford pale yellow oil **II**.

To a stirred solution of **II** in cold AcOH (25.0 mL) and Ac₂O (8.0 mL, 83.0 mmol), H₂SO₄ 2M (1.0 mL) was added dropwise. The reaction mixture was allowed to react until completion of the starting material (45 min). Then, it was poured in cold water and extracted with DCM (3x 100.0 mL). The combined extracts were washed with a saturated solution of sodium bicarbonate and brine, dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under vacuum. The crude material was filtered over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate: 7/3 to 6/4) to yield product **III** as a pale yellow oil.

Finally, to a solution of **III** (500 mg, 1.6 mmol) in DCM (15.0 mL) were added successively trimethylsilyl azide (0.4 mL, 3.2 mmol) and boron trifluoride diethyl etherate (0.2 mL, 1.6 mmol) dropwise. The reaction mixture was allowed to react 90 min at r.t. Then, it was washed with NaHCO₃. The organic layer was dried over MgSO₄ and the solvent was removed under vacuum. The crude material was purified over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate: 10/0 to 7.5/2.5) to yield product **27** as a pale yellow oil (221 mg, 47%). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2,09 (s, 3H, CH_{3Ac}), 2,12 (s, 3H, CH_{3Ac}), 2,14 (s, 3H, CH_{3Ac}), 4,24 (dd, *J* 11.8 and 7.1 Hz, 1H, H_{5/5'}), 4,36 (dd, *J* 11.8 and 4.8 Hz, 1H, H_{5/5'}), 4,58 (m, 1H, H₄), 5,03 (s, 1H, H₂), 5,18

(s, 1 H, H₁), 5.32 (dd, *J* 4.6, 1.4 Hz, 1H, H₃); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 20.7, 20.8, 20.9, 62.0, 74.3, 79.7, 80.5, 93.5, 169.3, 169.6, 170.7.

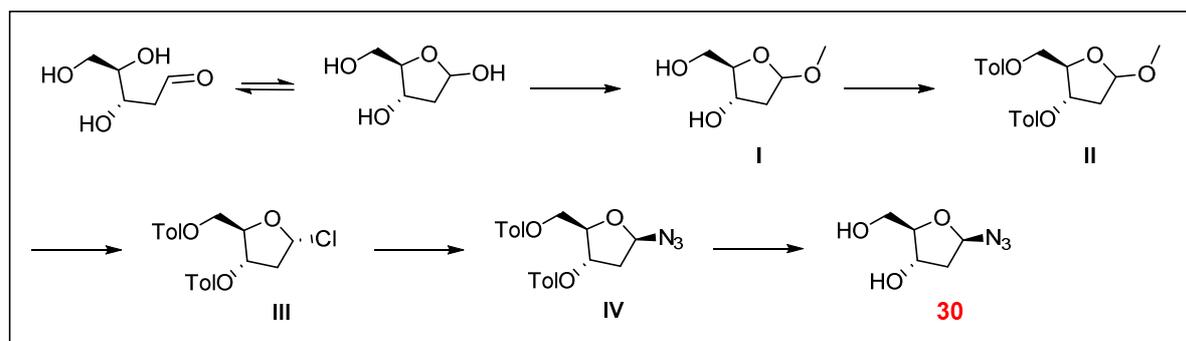
1-Deoxy-1-azido-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranose (Compound 29)



To a solution of 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-D-glucopyranose (**28**) (2.0 g, 5.1 mmol) in DCM (50.0 mL) were added successively trimethylsilyl azide (1.4 mL, 10.2 mmol) and boron trifluoride diethyl etherate (0.6 mL, 5.1 mmol) dropwise. The reaction mixture was allowed to react at r.t. until complete consumption of the starting material (2h). Then, it was washed with NaHCO₃. The organic layer was dried over MgSO₄ and the solvent was removed under vacuum giving product **29** as a white powder (1.8 g, 92%). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.01 (s, 3H, CH_{3Ac}), 2.03 (s, 3H, CH_{3Ac}), 2.08 (s, 3H, CH_{3Ac}), 2.10 (s, 3H, CH_{3Ac}), 3.79 (ddd, *J* 9.7, 4.6 and 2.4 Hz, 1H, H₅), 4.16 (dd, *J* 12.5 and 2.3 Hz, 1H, H_{6/6'}), 4.28 (dd, *J* 12.5 and 4.7 Hz, 1H, H_{6/6'}), 4.65 (d, *J* 8.8 Hz, 1H, H₁), 4.95 (t, *J* 9.1 Hz, 1H, H₂), 5.04-5.28 (m, 2H, H₃ and H₄); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 20.6, 61.8, 68.0, 70.7, 72.7, 74.1, 88.0, 169.3, 169.4, 170.2, 170.7.

1-β-Azido-2-deoxy-D-ribose (Compound 30)

Compound **30** was obtained following the synthetic pathway described below:



To a solution of 2-deoxy-D-ribosein (6.5 g, 48.0 mmol) in MeOH (150.0 mL) was added hydrogen chloride 1.6 N in acetonitrile (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at r.t. overnight. Pyridine (3.0 mL) was then added and the solvents were removed under reduced pressure. This gave a yellow oil (intermediate **I**) which was re-dissolved in anhydrous pyridine (100.0 mL) at 0 °C. Next, *p*-toluoylchloride (16.0 mL, 121.0 mmol) was added dropwise and the mixture was allowed to react at r.t. until complete consumption of the intermediate **I** (3h). The reaction mixture was diluted with cold water (80.0 mL) and extracted with ethyl acetate (3x). The combined organic layers were washed with a saturated aqueous

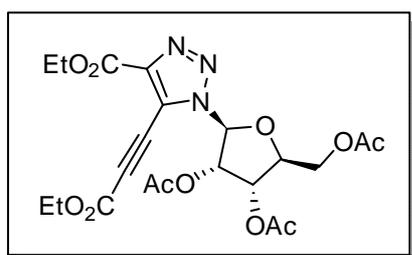
solution of NaHCO₃ (2x) and brine (1x), dried on MgSO₄, and concentrated¹¹⁷.

The resulting colored sirup (intermediate **II**) was dissolved in acetic acid (20.0 mL) at 0 °C. Then, HCl (g) was added. After the formation of a yellowish precipitate, 50.0 mL of cyclohexane was added and the solid was filtered off, washed with cold dry diethyl ether and dried in a vacuum dessicator. This gave intermediate **III** (4.6 g).

To a solution of α -chlorosugar **III** (4.5 g, 11.6 mmol) in acetone (150.0 mL), NaN₃ (1.2 g, 18.0 mmol) was added. The mixture was allowed to react at r.t for 4h. After completion of the reaction, ethyl acetate (100.0 mL) was added to the mixture. The organic layer was washed with water, brine, and dried (over anhydrous MgSO₄). Evaporation under reduced pressure afforded the crude product mixture. The β sugar **IV** was eluted as the first fraction (2.47 g, 55%).

To a solution of β sugar **IV** (1g, 2.5 mmol) in MeOH (60.0 mL), potassium carbonate (1.0 g, 7.6 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at r.t. for 1h and monitored by TLC. The residue was purified over a silica gel column, and the desired product (**30**) was isolated when eluted with cyclohexane/ethyl acetate: 2/8, in a quantitative yield (400 mg). ¹H NMR (Acetone-d₆, 200 MHz) δ 2.03 (m, 2H, H₂), 3.60 (m, 2H, H₅), 3.89 (q, *J* 5.0 Hz, 1H, H₄), 4.33 (q, *J* 5.0 Hz, 1H, H₃), 5.44 (dd, *J* 4.0 and 5.5 Hz, 1H, H₁); ¹³C NMR (Acetone-d₆, 50 MHz) δ 41.7, 63.7, 72.0, 88.8, 92.7.

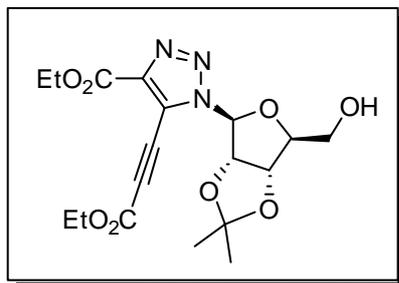
1-Deoxy-1-(5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(ethoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3,5-tri-O-acetyl- β -L-ribofuranose (Compound 31)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **24** (940 mg, 3.0 mmol) as a white powder in a yield of 33% (479 mg). ¹H and ¹³C NMR profiles are the same as for its enantiomer: compound **4**; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺

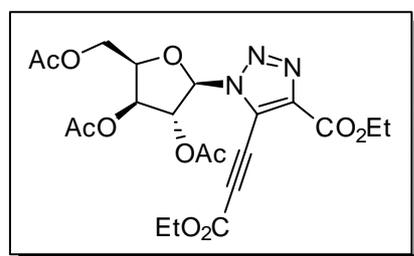
C₂₁H₂₆O₁₁N₃, 496,1561, found 496.1564; HPLC (λ_{254}) 98.9% purity.

1-Deoxy-1-(5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(ethoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-O-isopropylidene-β-L-ribofuranose (Compound 32)



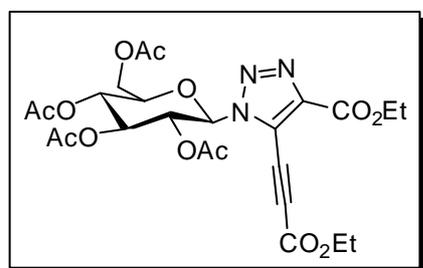
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **25** (306 mg, 0.7 mmol) as a brown powder in a yield of 45% (251 mg). ^1H and ^{13}C NMR profiles are the same as for its enantiomer: compound **5**; HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_8\text{N}_3$, 410,1557, found 410.1558; HPLC (λ_{254}) 99.8% purity.

1-Deoxy-1-(5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(ethoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3,5-tri-O-acetyl-D-xylofuranose (Compound 33)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **27** (222 mg, 0.7 mmol) as a white powder in a yield of 42% (145 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.37 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.43 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 2.08 (s, 3H, CH_3Ac), 2.14 (s, 3H, CH_3Ac), 2.16 (s, 3H, CH_3Ac), 4.26-4.51 (m, 6H, $\text{H}_{5',5''}$ and $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.70 (td, J 6.6 and 4.7 Hz, 1H, H_4'), 5.42 (dd, J 4.7 and 1.9 Hz, 1H, H_3'), 5.99 (t, J 2.1 Hz, 1H, H_2'), 6.08 (d, J 2.3 Hz, 1H, H_1'); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.0, 14.1, 20.5, 20.6, 20.7, 61.3, 62.0, 63.0, 68.0, 74.5, 79.2, 79.9, 90.6, 94.0, 122.2, 143.0, 152.4, 159.0, 169.3, 170.0, 170.4; HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_{11}\text{N}_3$, 496,1562, found 496.1563; HPLC (λ_{254}) 97.4% purity.

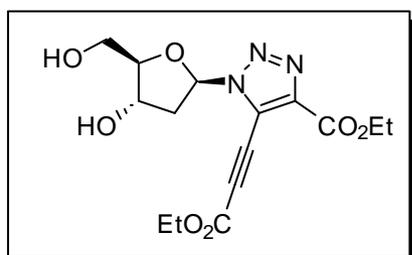
1-Deoxy-1-(5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(ethoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranose (Compound 34)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **29** (300 mg, 0.8 mmol) as a brown powder in a yield of 72% (326 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.33-1.44 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.85 (s, 3H, CH_3Ac), 2.01-2.04 (m, 9H, $3\text{CH}_3\text{Ac}$), 4.01 (ddd, J 9.7, 4.7 and 2.4 Hz, 1H, H_5') 4.13-4.27 (m, 3H, $\text{H}_{6',6''}$), 4.30-4.48 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.27 (t, J 9.7 Hz, 1H, H_4'), 5.41 (t, J 9.2 Hz, 1H, H_3'), 5.78-5.94 (m, 2H, H_1' and H_2'); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 13.9, 13.9, 20.0, 20.4, 26.8,

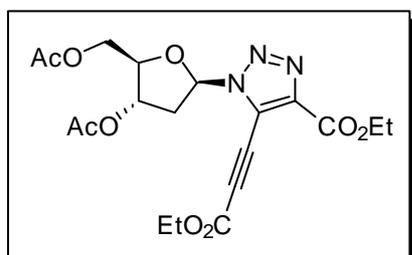
30.0, 61.4, 62.0, 63.0, 67.3, 67.8, 69.2, 72.5, 75.2, 85.8, 94.3, 121.8, 143.2, 152.1, 158.8, 168.5, 169.0, 169.9, 170.4; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₂₄H₃₀O₁₃N₃, 568.1773, found 568.1774; HPLC (λ₂₅₄) 99.8% purity.

Ethyl 5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-((2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 35)



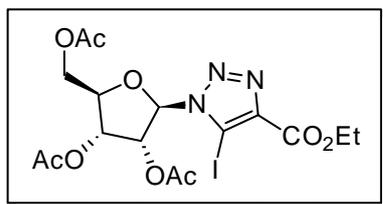
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **30** (404 mg, 2.5 mmol), as a brown oil in a yield of 28% (250 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.37 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.43 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.53-1.88 (br, 2H, 2OH), 2.56-2.71 (m, 1H, H_{2'/2''}), 2.96-3.12 (m, 1H, H_{2'/2''}), 3.68-3.94 (m, 2H, H_{5',5''}), 4.16-4.25 (m, 1H, H_{4'}), 4.28-4.53 (m, 4H, 2CH₂-CH₃), 4.85-4.98 (m, 1H, H_{3'}), 6.52 (dd, *J* 6.9 and 4.9 Hz, 1H, H_{1'}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 13.8, 13.9, 40.1, 62.0, 62.2, 63.0, 68.0, 71.0, 88.0, 88.6, 93.6, 121.5, 142.5, 152.3, 159.1.

Ethyl 1-((2R,4S,5R)-4-acetoxy-5-(acetoxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 36)



To a solution of compound **35** (32 mg, 0.1 mmol) in Ac₂O (1.5 mL), was added DMAP (2 mg, cat.). The mixture reaction was stirred at r.t. After 3 min, the starting material was consumed and the solvent was removed under vacuum. Then, the crude material was diluted in ethyl acetate and washed with NH₄Cl (2x), NaHCO₃ (3x) and NaCl. The organic layer was dried over MgSO₄ and ethyl acetate was removed under vacuum. Column purification (cyclohexane/ethyl acetate: 9.5/0.5 to 4/6) gave compound **36** as a brown oil in a yield of 46% (20 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.31-1.44 (m, 6H, 2CH₂-CH₃), 2.03 (s, 3H, CH_{3Ac}), 2.12 (s, 3H, CH_{3Ac}), 2.57-2.69 (m, 1H, H_{2'/2''}), 3.38-3.51 (m, 1H, H_{2'/2''}), 4.07-4.14 (m, 1H, H_{5',5''}), 4.28-4.49 (m, 6H, CH₂-CH₃), 5.53 (s, 1H, H_{3'}), 6.45 (t, *J* 6.2 Hz, 1H, H_{1'}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 13.9, 14.0, 20.6, 20.8, 36.5, 61.9, 63.0, 63.1, 68.1, 74.2, 84.0, 87.6, 93.7, 122.0, 143.1, 152.3, 159.1, 170.2, 170.4; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₉H₂₄O₉N₃, 438.1507, found 438.1508; HPLC (λ₂₅₄) 100 % purity.

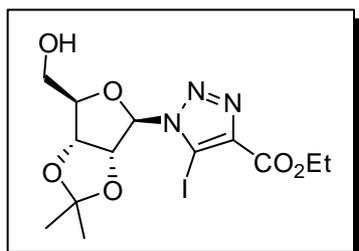
1-Deoxy-1-(5-iodo-4-(ethoxycarbonyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose (Compound 37)



The title compound was obtained according to the general procedure **C** starting from compound **7** (1.1 g, 3.7 mmol) as a brown powder in a yield of 40% (780 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.39 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 2.00 (s, 3H, CH_3Ac), 2.10 (s, 6H, $2\text{CH}_3\text{Ac}$), 4.09 (dd, J 12.3 and 4.0 Hz,

1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 4.33-4.46 (m, 4H, $\text{H}_{4'}$, $\text{H}_{5'/5''}$ and $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.74 (t, J 5.4 Hz, 1H, $\text{H}_{3'}$), 6.07-6.15 (m, 2H, $\text{H}_{1'}$ and $\text{H}_{2'}$); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.1, 20.3, 20.4, 20.5, 61.6, 62.4, 70.8, 73.9, 81.4, 85.7, 90.2, 142.1, 159.8, 169.1, 169.3, 170.4; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_9\text{N}_3\text{I}$, 526.0317, found 526.0319; HPLC (λ_{254}) 96.9% purity.

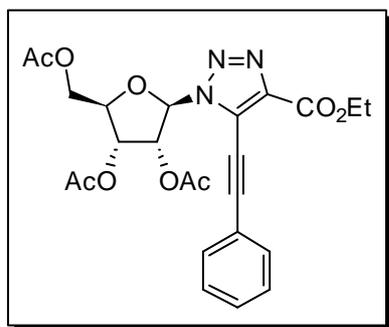
1-Deoxy-1-(5-iodo-4-(*tert*-ethoxycarbonyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-*O*-isopropylidene-D-ribofuranose (Compound 38)



The title compound was obtained according to the general procedure **C** starting from compound **11** (6.0 g, 28.0 mmol) as a brown powder in a yield of 32% (4.0 g). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.38-1.46 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ and $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 1.62 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 3.04 (br, 1H, OH), 3.58-3.64 (m, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 3.73-3.81 (m, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 4.45 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.52-4.57 (m,

1H, $\text{H}_{4'}$), 5.06 (dd, J 5.8 and 1.7 Hz, 1H, $\text{H}_{3'}$), 5.38 (dd, J 5.8 and 1.9 Hz, 1H, $\text{H}_{2'}$), 6.27 (d, J 1.9 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.2, 25.1, 27.0, 61.8, 63.2, 82.0, 85.3, 89.6, 95.2, 113.9, 142.0, 156.7, 159.9; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_3\text{I}$, 440.0313, found 440.0314; HPLC (λ_{254}) 96.6% purity.

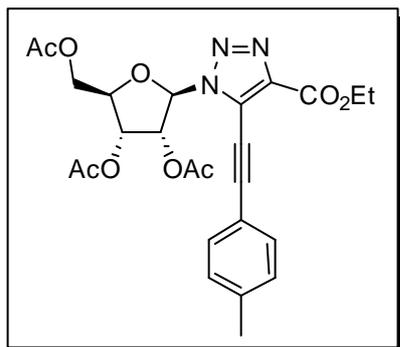
Ethyl 1-(2,3,5-*O*-tri-acetyl-D-ribofuranosyl)-5-(phenylethynyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 39)



The title compound was obtained according to the general procedure **D** starting from compound **37** (300 mg, 0.6 mmol) as a brown oil in a yield of 12% (30 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.42 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 2.05 (s, 3H, CH_3Ac), 2.12-2.15 (m, 6H, $2\text{CH}_3\text{Ac}$), 4.09-4.23 (m, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 4.57-4.37 (m, 4H, $\text{H}_{4'}$, $\text{H}_{5'/5''}$ and $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.79 (t, J 5.6 Hz, 1H, $\text{H}_{3'}$), 6.06 (dd, J 5.3 and 3.2 Hz, 1H, $\text{H}_{4'}$), 6.28 (d, J 3.2

Hz, 1H, H₁), 7.38-7.50 (m, 3H, H_{Ar}), 7.58-7.66 (m, 2H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.3, 20.4, 20.5, 20.7, 29.6, 61.5, 62.5, 67.0, 70.8, 72.4, 73.9, 81.2, 88.6, 104.9, 120.6, 125.2, 128.6, 130.4, 132.0, 140.5, 159.8, 169.2, 169.4, 170.6; MS (ES) *m/z* = 522.7 [M+Na]⁺, 1022.7 [2M+Na]⁺.

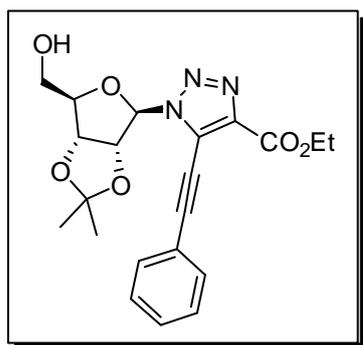
Ethyl 1-(2,3,5-*O*-tri-acetyl-d-ribofuranosyl)-5-(*p*-tolylethynyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 40)



The title compound was obtained according to the general procedure **D** starting from compound **37** (164 mg, 0.3 mmol) as a brown oil in a yield of 10% (16 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 1.42 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 2.06 (s, 3H, CH_{3Ac}), 2.14 (s, 6H, 2CH_{3Ac}), 2.41 (s, 3H, CH₃), 4.17 (dd, *J* 12.2 and 4.4 Hz, H_{5'/5''}), 4.44-4.49 (m, 4H, CH₂-CH₃, H_{4'}, 5'/5''), 5.80 (t, *J* 5.6 Hz, 1H, H_{3'}), 6.06 (dd, *J* 4.8 and 3.3

Hz, 1H, H_{2'}), 6.28 (d, *J* 2.9 Hz, 1H, H_{1'}), 7.23 (d, *J* 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.52 (d, *J* 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 14.7, 20.9, 21.0, 21.1, 22.2, 61.9, 63.0, 71.3, 74.4, 81.7, 89.0, 105.8, 118.0, 125.9, 129.9, 132.4, 140.8, 141.4, 160.3, 169.6, 169.8, 171.1; MS (ES) *m/z* = 536.7 [M+Na]⁺, 1050.7 [2M+Na]⁺.

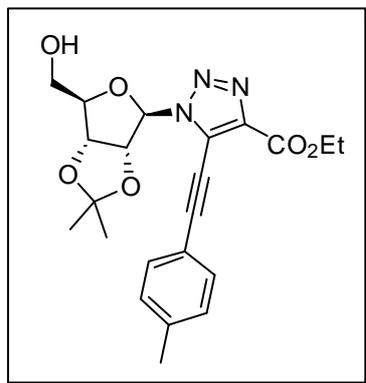
Ethyl 1-(2,3-*O*-isopropylidene-D-ribofuranosyl)-5-(phenylethynyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 41)



The title compound was obtained according to the general procedure **D** starting from compound **38** (110 mg, 0.2 mmol) as a brown oil in a yield of 10% (9 mg). ¹H NMR (MeOD, 200 MHz) δ 1.37-1.46 (m, 6H, 2CH_{3isop}), 1.59 (s, 3H, CH₂-CH₃), 3.45-3.52 (m, 2H, H_{5',5''}), 4.32-4.51 (m, 3H, CH₂-CH₃, and H_{4'}), 5.03 (dd, *J* 5.9 and 2.0 Hz, 1H, H_{3'}), 5.61 (dd, *J* 5.9 and 1.0 Hz, 1H, H_{2'}), 6.39 (s, 1H, H_{1'}), 7.44-7.54 (m, 3H,

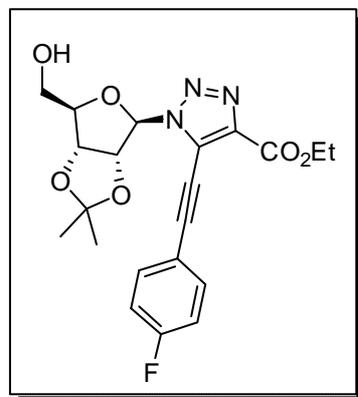
H_{Ar}), 7.61-7.70 (m, 2H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (MeOD, 50 MHz) δ 14.2, 25.1, 27.0, 29.6, 61.6, 63.3, 72.4, 82.0, 85.5, 89.5, 93.6, 105.2, 113.8, 120.5, 128.6, 130.4, 132.0, 159.7; MS (ES) *m/z* = 436.6 [M+Na]⁺, 850.5 [2M+Na]⁺.

Ethyl 1-(2,3-*O*-isopropylidene-D-ribofuranosyl)-5-(*p*-tolylethynyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 42)



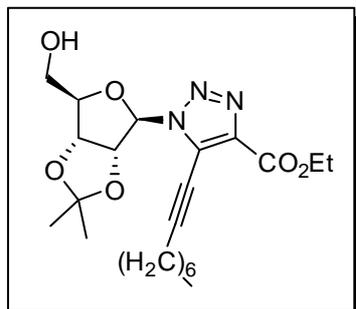
The title compound was obtained according to the general procedure **D** starting from compound **38** (100 mg, 0.5 mmol) as a brown oil in a yield of 10% (20 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.40-1.47 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ and $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 1.63 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 2.40 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{tolyl}}$), 3.37 (br, 1H, OH), 3.66-3.74 (m, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 3.87 (dd, J 12.6 and 3.1 Hz, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 4.47 (q, J 7.1 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.54-4.64 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 5.08 (dd, J 5.8 and 1.4 Hz, 1H, $\text{H}_{3'}$), 5.31 (dd, J 5.8 and 2.0 Hz, 1H, $\text{H}_{2'}$), 6.39 (d, J 2.0 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 7.22 (d, J 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.51 (d, J 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.3, 21.7, 25.1, 27.1, 28.4, 61.6, 63.4, 71.9, 82.0, 85.6, 89.5, 93.7, 105.7, 113.8, 117.5, 129.4, 132.0, 141.0, 159.8; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{N}_3$, 428.1816, found 426.1819.

Ethyl 5-((4-fluorophenyl)ethynyl)-1-(2,3-*O*-isopropylidene-D-ribofuranosyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 43)



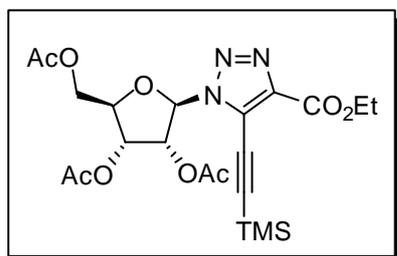
The title compound was obtained according to the general procedure **D** starting from compound **38** (200 mg, 0.5 mmol) as a brown oil in a yield of 11% (23 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.38 -1.46 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ and $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 1.61 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 3.25 (br, 1H, OH), 3.64-3.72 (m, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 3.81-3.87 (m, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 4.45 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.52-4.61 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 5.06 (dd, J 5.8 and 1.36 Hz, 1H, $\text{H}_{3'}$), 5.32 (dd, J 5.8 and 1.8 Hz, 1H, $\text{H}_{2'}$), 6.35 (d, J 1.8 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 7.06-7.15 (m, 2H, H_{Ar}), 7.57-7.10 (m, 2H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.3, 25.1, 27.0, 61.6, 63.3, 82.0, 85.5, 89.6, 93.6, 104.1, 113.8, 116.2 (d, J 22.4 Hz), 116.7 (d, J 3.6 Hz), 124.9, 134.2 (d, J 8.8 Hz), 134.3, 140.2, 159.7, 163.7 (d, J 253.3 Hz); HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{N}_3\text{F}$, 432.1565, found 432.1566.

Ethyl 1-(2,3-*O*-isopropylidene-D-ribofuranosyl)-5-(non-1-yn-1-yl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 44)



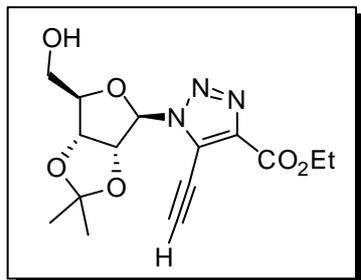
The title compound was obtained according to the general procedure **D** starting from compound **38** (200 mg, 0.5 mmol) as a brown oil in a yield of 13% (28 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 0.89 (t, J 6.5 Hz, 3H, $\text{CH}_{3\text{heptyl}}$), 1.25-1.45 (m, 14H, $4\text{CH}_{2\text{heptyl}}$, $\text{CH}_{3\text{isop}}$ and $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.61-1.75 (m, 5H, $\text{CH}_{2\text{heptyl}}$ and $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 2.57 (t, J 7.0 Hz, 2H, $\text{CH}_{2\text{heptyl}}$), 3.76-3.60 (m, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 3.84 (dd, J 12.6 and 3.1 Hz, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 4.44 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.51-4.59 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 5.06 (dd, J 5.8 and 1.5 Hz, 1H, $\text{H}_{3'}$), 5.27 (dd, J 5.8 and 2.0 Hz, 1H, $\text{H}_{2'}$), 6.28 (d, J 2.0 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.1, 14.2, 19.9, 22.6, 25.1, 27.0, 27.9, 28.7, 28.8, 31.6, 61.5, 63.4, 64.4, 82.0, 85.6, 89.5, 93.4, 108.4, 113.7, 125.6, 139.8, 159.9; HRMS (ESI $^+$): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{N}_3$, 436.2442, found 436.2444.

1-Deoxy-1-(4-(ethoxycarbonyl)-5-((trimethylsilyl)ethynyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-*O*-isopropylidene-D-ribofuranose (Compound 45)



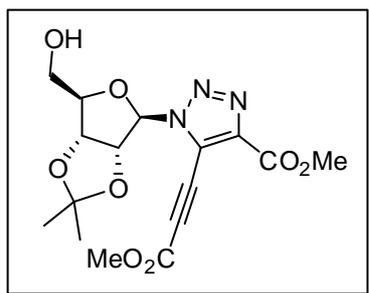
The title compound was obtained according to the general procedure **D** starting from compound **37** (110 mg, 0.2 mmol) as a brown oil in a yield of 5% (23 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0.31 (s, 9H, $t\text{Bu}$), 1.41 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 2.06 (s, 3H, CH_3Ac), 2.13-2.14 (m, 6H, $2\text{CH}_3\text{Ac}$), 4.16 (dd, J 12.0 and 4.5 Hz, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 4.41-4.51 (m, 4H, $\text{H}_{4'}$, $\text{H}_{5'/5''}$ and $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.77 (t, J 5.7 Hz, 1H, $\text{H}_{3'}$), 5.94 (dd, J 5.2 and 2.8 Hz, 1H, $\text{H}_{2'}$), 6.20 (d, J 2.8 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 0.0, 15.0, 21.2, 21.2, 21.5, 62.3, 63.3, 71.5, 74.8, 81.8, 87.6, 89.4, 114.3, 125.3, 141.4, 160.4, 170.0, 170.1, 171.4; HPLC (λ_{254}) 99.6% purity; MS (ES) m/z = 518.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1014.7 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

Ethyl 5-ethynyl-1-(2,3-O-isopropylidene-D-ribofuranosyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 46)



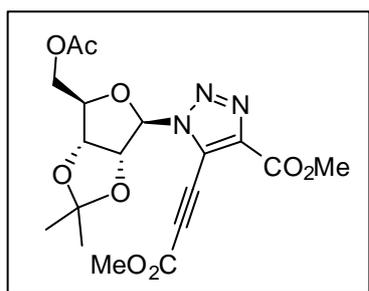
The title compound was obtained *via* general procedure **D** by successively using trimethylacetylene (as alkyne reagent) and deprotecting silyl substituant as a brown oil in a yield of 22% (23 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 1.39 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 1.44 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.63 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 3.63 (dd, J 12.5 and 4.8 Hz, $\text{H}_{5'/5''}$), 3.78 (dd, J 12.5 and 3.6 Hz, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 4.46 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.53-4.59 (m, 1H, H_4'), 5.07 (dd, J 5.8 and 1.5 Hz, 1H, H_3'), 5.38 (dd, J 5.8 and 1.9 Hz, 1H, H_2'), 6.28 (d, J 1.9 Hz, 1H, H_1'); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 14.2, 25.1, 27.0, 61.8, 63.2, 82.0, 85.4, 89.6, 95.3, 113.9, 142.0, 159.9; HRMS (ESI $^+$): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_3$, 338.1347, found 338.1347.

1-Deoxy-1-(5-(3-methoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(methoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-O-isopropylidene- β -D-ribofuranose (Compound 47)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **11** (231 mg, 1.1 mmol) as a brown powder in a yield of 31% (127 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.35 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 1.58 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 2.87 (br, 1H, OH), 3.61 (dd, J 12.3 and 4.8 Hz, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 3.74 (dd, J 12.3 and 3.9 Hz, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 3.86 (s, 3H, O- CH_3), 3.96 (s, 3H, O- CH_3), 4.50 (br, 3H, H_4'), 5.01 (d, J 5.9 Hz, 1H, H_3'), 5.36 (d, J 5.9 Hz, 1H, H_2'), 6.25 (br, 1H, H_1'); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 25.0, 26.8, 52.7, 53.4, 62.7, 67.8, 81.7, 84.8, 89.4, 93.7, 114.0, 122.0, 142.4, 152.5, 159.2; HRMS (ESI $^+$): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{N}_3$, 382.1245, found 382.1245; HPLC (λ_{254}) 96.1% purity.

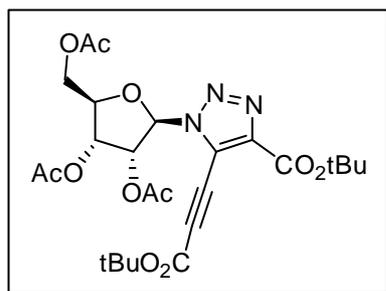
1-Deoxy-1-(5-(3-methoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(methoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-O-isopropylidene-5-O-acetyl-beta-D-ribofuranose (Compound 48)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **14** (3.0 g, 11.7 mmol) as an orange oil in a yield of 45% (2.2 g). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.31 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 1.50 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 1.91 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{Ac}}$), 3.80 (s, 3H, O- CH_3), 3.90 (s, 3H, O- CH_3), 3.95-3.98

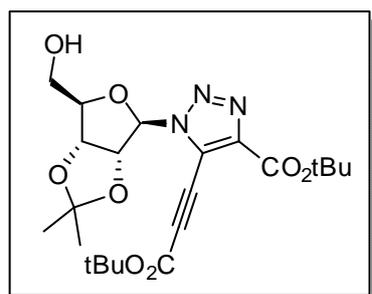
(m, 2H, H_{5',5''}), 4.46 (dt, *J* 5.8, 5.7 and 2.4 Hz, 1H, H_{4'}), 4.93 (dd, *J* 5.9 and 2.4 Hz, 1H, H_{3'}), 5.50-5.53 (m, 1H, H_{2'}), 6.22 (s, 1H, H_{1'}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 20.4, 24.9, 26.8, 52.5, 63.1, 67.9, 81.6, 83.8, 86.7, 92.3, 93.4, 114.0, 122.0, 142.5, 152.4, 159.2, 170.0; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₈H₂₂O₉N₃, 424.1351, found 424.1352; HPLC (λ₂₅₄) 100% purity.

1-Deoxy-1-(5-(3-*tert*-butoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(*tert*-butoxycarbonyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3,5-*O*-tri-acetyl-D-ribofuranose (Compound 49)



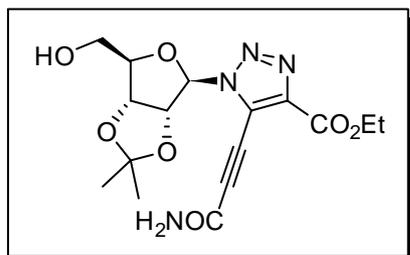
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **7** (679 mg, 13.3 mmol) as a pale violet powder in a yield of 21% (264 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.51 (s, 9H, *t*Bu), 1.59 (s, 9H, *t*Bu), 2.02 (s, 3H, CH_{3Ac}), 2.11 (s, 6H, 2CH_{3Ac}), 4.06-4.16 (m, 1H, H_{5',5''}), 4.35-4.46 (m, 2H, H_{4'}, H_{5',5''}), 5.70 (t, *J* 5.5 Hz, 1H, H_{3'}), 5.99-6.03 (m, 1H, H_{2'}), 6.18 (d, *J* 3.0 Hz, 1H, H_{1'}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 20.3, 20.4, 20.6, 27.8, 28.0, 62.4, 66.0, 70.6, 73.7, 81.4, 83.4, 85.2, 89.0, 94.7, 121.7, 143.7, 151.2, 157.8, 169.1, 169.3, 170.4; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₂₅H₃₄O₁₁N₃, 552.2188, found 552.2189; HPLC (λ₂₅₄) 98.4% purity.

1-Deoxy-1-(5-(3-*tert*-butoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-4-(*tert*-butoxycarbonyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-*O*-isopropylidene-β-D-ribofuranose (Compound 50)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **11** (500 mg, 2.3 mmol) as a violet powder in a yield of 60% (600 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.39 (s, 3H, CH_{3isop}), 1.54 (s, 9H, *t*Bu), 1.62 (s, 12H, CH_{3isop} and *t*Bu), 2.87 (br, 1H, OH), 3.67-3.85 (m, 2H, H_{5',5''}), 4.52-4.57 (m, 1H, H_{4'}), 5.04 (dd, *J* 5.8 and 1.8 Hz, 1H, H_{3'}), 5.28-5.32 (m, 1H, H_{2'}), 6.29 (d, *J* 2.2 Hz, 1H, H_{1'}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 25.2, 27.0, 27.9, 28.0, 63.1, 65.9, 81.8, 83.6, 85.2, 85.3, 89.3, 93.7, 94.9, 114.0, 121.7, 143.6, 151.2, 157.9; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₂₂H₃₂O₈N₃, 466.2184, found 466.2186; HPLC (λ₂₅₄) 100% purity.

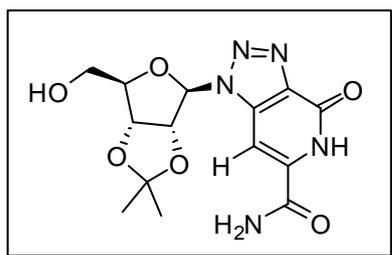
Ethyl 5-(3-amino-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(2,3-*O*-isopropylidene-D-ribofuranosyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 51)



The title compound was obtained by adding NH_3 (g) to a solution of **5** (130 mg, 0.3 mmol) in EtOH (10.0 mL). The reaction was allowed to react for 30 min. After evaporation under pressure, a column filtration (DCM/MeOH: 9/1) gave the product as a yellow oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.38-1.47 (m, 6H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.61 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$),

3.23 (br, 1H, OH), 3.60-3.71 (m, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 3.79-3.85 (m, 1H, $\text{H}_{5'/5''}$), 4.38-4.53 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ and H_4), 5.02 (dd, J 6.0 and 2.1 Hz, 1H, H_3), 5.36 (dd, J 6.0 and 1.9 Hz, 1H, H_2), 6.14 (br, 1H, NH), 6.32 (d, J 1.9 Hz, 1H, H_1), 7.04 (br, 1H, NH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.1, 25.1, 27.0, 62.2, 62.8, 67.7, 81.4, 84.9, 89.3, 93.8, 96.4, 114.4, 122.4, 142.4, 152.7, 159.4; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_7\text{N}_4$, 381.1405, found 381.1406; HPLC (λ_{254}) 98.4% purity.

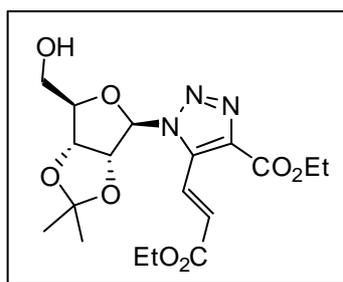
1-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(Hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-4-oxo-4,5-dihydro-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-c]pyridine-6-carboxamide (Compound 52)



To a solution of **5** (327 mg, 0.8 mmol) in EtOH (30.0 mL) NH_3 (g) was added and the reaction mixture was allowed to react overnight. After evaporation under pressure and crystallization in EtOH/Et₂O, the compound **52** was obtained as a white powder in a quantitative yield (275 mg). ^1H NMR

(MeOD, 200 MHz) δ 1.42 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 1.59 (s, 1H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$), 3.73-3.50 (m, 2H, $\text{H}_{5',5''}$), 4.38-4.43 (m, 1H, H_4), 5.01-5.04 (m, 1H, H_3), 5.82 (d, J 5.9 Hz, 1H, H_2), 6.45 (s, 1H, H_1), 7.58 (s, 1H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (MeOD, 50 MHz) δ 25.4, 27.2, 62.8, 83.3, 85.4, 90.6, 94.2, 94.6, 114.9, 138.0, 139.4, 140.8, 158.2, 164.4; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_5$, 352.1252, found 352.1252; HPLC (λ_{254}) 98.4% purity.

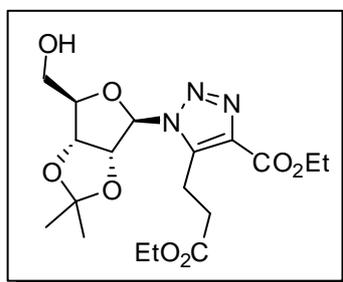
Ethyl 5-((E)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-1-(2,3-O-isopropylidene-D-ribofuranosyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 53)



Sonogashira cross coupling was carried out between compound **38** and ethyl propiolate. Surprisingly, the sole outcome of this reaction was the expected adduct further subjected to a reduction of its triple bond (compound **53**). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.23 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.35-1.42 (m, 6H, $\text{CH}_{3\text{isop}}$ and

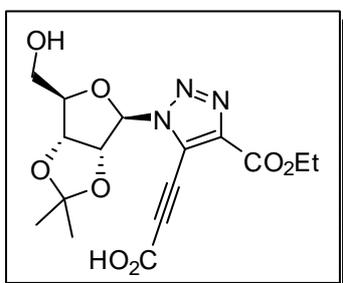
CH₂-CH₃), 1.58 (s, 3H, CH_{3isop}), 3.79 (dd, *J* 10.8 and 5.4 Hz, 1H, H_{5'/5''}), 3.90 (dd, *J* 10.8 and 5.2 Hz, 1H, H_{5'/5''}), 4.11 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.40 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.61 (dt, *J* 5.2, 5.2 and 2.1 Hz, 1H, H_{4'}), 4.97 (dd, *J* 5.9 and 2.1 Hz, 1H, H_{3'}), 5.10 (d, *J* 12.6 Hz, 1H, CH=C), 5.48-5.51 (m, 1H, H_{2'}), 6.18 (s, 1H, H_{1'}), 7.35 (d, *J* 12.6 Hz, 1H, CH=C); ¹³C{¹H} NMR (MeOD, 50 MHz) δ 14.2, 25.0, 26.7, 59.9, 61.4, 69.9, 81.7, 84.6, 86.3, 94.1, 97.9, 114.2, 127.2, 140.5, 160.3, 160.8, 167.0; MS (ES) *m/z* = 434.7 [M+Na]⁺, 845.8 [2M+Na]⁺.

Ethyl 5-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1-(2,3-O-isopropylidene-D-ribofuranosyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 54)



The title compound was obtained *via* a reduction of **5** (68 mg, 0.2 mmol) by the system (H₂, Pd/C) and a column filtration (cyclohexane/ethyl acetate), in a quantitative yield as an orange oil (65 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.22 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.38-1.45 (m, 6H, CH₂-CH₃ and CH_{3isop}), 1.61 (s, 3H, CH_{3isop}), 2.76 (t, *J* 7.3 Hz, 2H, CH₂), 3.19-3.46 (m, 2H, OH and CH₂), 3.49-3.61 (m, 1H, H_{5'/5''}), 3.70-3.76 (m, 1H, H_{5'/5''}), 4.11 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.42 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.50-4.55 (m, 1H, H_{4'}), 5.05 (dd, *J* 5.8 and 1.6 Hz, 1H, H_{3'}), 5.43 (dd, *J* 5.8 and 1.8 Hz, 1H, H_{2'}), 6.24 (d, *J* 1.8 Hz, 1H, H_{1'}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.0, 14.2, 18.5, 25.1, 26.9, 32.7, 61.0, 61.3, 63.1, 81.9, 84.9, 89.5, 92.3, 113.7, 141.7, 161.1, 171.7; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₈H₂₈O₈N₃, 414.1871, found 414.1871.

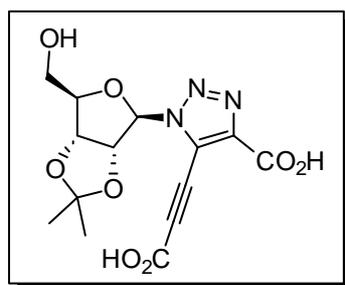
3-(4-(ethoxycarbonyl)-1(2,3-O-isopropylidene-D-ribofuranosyl)-1H-1,2,3-triazol-5-yl)propionic acid (compound 55)



The title compound was obtained by adding NaHCO₃ (25 mg, 0.3 mmol) to a solution of **5** (120 mg, 0.3 mmol) in acetone/water: 1/1 (v/v) (2.0 mL). Neutralization and extraction with ethyl acetate followed by filtration over a silica gel column (DCM/MeOH: 9/1) gave the product **55** as a colorless foam in a yield of 62% (72 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.39-1.46

(m, 6H, CH_{3isop} and CH₂-CH₃), 1.61 (s, 3H, CH_{3isop}), 3.61-3.71 (m, 1H, H_{5'/5''}), 3.80-3.88 (m, 1H, H_{5'/5''}), 4.46 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.53-4.58 (m, 1H, H_{4'}), 5.06 (dd, *J* 5.8 and 1.7 Hz, 1H, H_{3'}), 5.32 (dd, *J* 5.9 and 2.1 Hz, 1H, H_{2'}), 6.31 (d, *J* 2.1 Hz, 1H, H_{1'}).

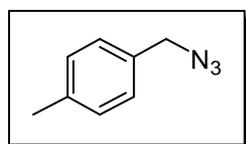
5-(Carboxyethyl)-1-(2,3-O-isopropylidene-D-ribofuranosyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylic acid (Compound 57)



The title compound was obtained by adding NaOH (34 mg, 0.8 mmol) to a solution of **5** (138 mg, 0.3 mmol) in dioxane/water: 1/1 (v/v) (2.0 mL). Neutralization and extraction with ethyl acetate followed by crystallization (Et₂O/pentane) gave the product **57** as a white powder in a quantitative yield (110 mg).

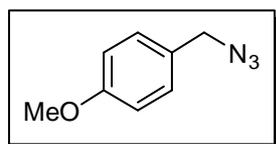
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.41 (s, 3H, CH_{3isop}), 1.59 (s, 3H, CH_{3isop}), 3.35 (s, 1H, OH), 3.48 (d, *J* 6.4 Hz, 2H, H_{5'/5''}), 4.37 (dt, *J* 6.4, 6.3 and 2.1 Hz, 1H, H_{4'}), 5.03 (d, *J* 2.1 Hz, 1H, H_{3'}), 5.58-5.68 (m, 1H, H_{2'}), 6.35 (s, 1H, H_{1'}); MS (ESI⁺) *m/z* = 354.5 [M+H]⁺.

1-(Azidomethyl)-4-methylbenzene (Compound 58)



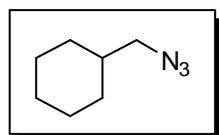
The title compound was obtained according to the general procedure **A** as a yellow oil in a quantitative yield (4.0 g). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.37 (s, 3H, CH₃), 4.29 (s, 2H, CH₂), 7.21 (s, 4H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 21.1, 54.5, 128.2, 129.4, 132.2, 138.1.

1-(Azidomethyl)-4-methoxybenzene (Compound 59)



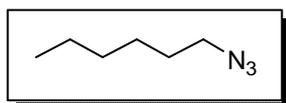
The title compound was obtained according to the general procedure **A** as a colorless oil in a quantitative yield (4.9 g) with spectroscopic data in accordance with the literature¹¹⁸. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.73 (s, 1H, CH₃), 4.18 (s, 2H, CH₂), 6.79-6.86 (m, 2H, H_{Ar}), 7.13-7.20 (m, 2H, H_{Ar}).

(Azidomethyl)cyclohexane (Compound 60)



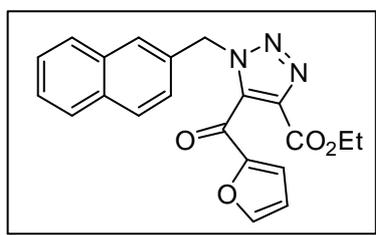
The title compound was obtained according to the general procedure **A** as a colorless oil in a quantitative yield (700 mg). The azido product was purified and taken to further step.

1-Azidohexane (Compound 61)



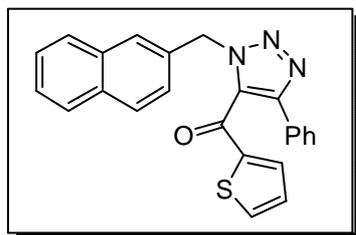
The title compound was obtained according to the general procedure **A** as a colorless oil in a quantitative yield (500 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 0.82 (t, J 7.0 Hz, 3H, CH_3), 1.36–1.09 (m, 6H, 3CH_2), 1.52 (q, J 7.0 Hz, 2H, CH_2), 3.18 (t, J 7.0 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 13.89, 22.30, 26.20, 28.62, 31.15, 51.25.

Ethyl 5-(furan-2-carbonyl)-1-(naphthalen-2-ylmethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 62)



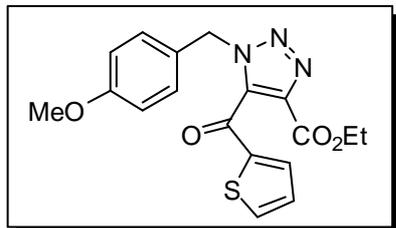
The title compound was obtained according to the general procedure **E** starting from compound **1** (183 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 76% (285 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.06 (t, J 7.1 Hz, 3H, CH_3), 4.17 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.75 (s, 2H, N-CH_2), 6.25 (dd, J 3.7 and 1.6 Hz, 1H, H_{furan}), 6.86 (d, J 3.5 Hz, 1H, H_{furan}), 7.23 (dd, J 8.5 and 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.34-7.43 (m, 3H, H_{furan} and 2H_{Ar}), 7.55 (s, 1H, H_{Ar}), 7.49-7.66 (m, 4H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 13.6, 53.4, 61.3, 112.8, 120.9, 125.0, 126.3, 126.5, 127.3, 127.7, 127.8, 128.6, 130.6, 132.6, 132.8, 135.5, 139.1, 148.1, 151.5, 159.6, 172.4; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}_3$, 376.1292, found 376.1291; HPLC (λ_{254}) 96% purity.

1-(Naphthalen-2-ylmethyl)-4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-5-yl)(thiophen-2-yl)methanone (Compound 63)



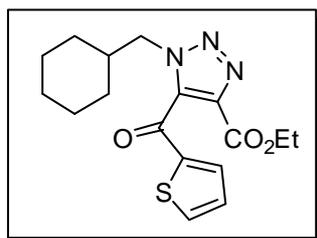
The title compound was obtained according to the general procedure **E** starting from compound **1** (183 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 54% (214 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 5.84 (s, 2H, CH_2), 6.57 (dd, J 4.9 and 3.9 Hz, 1H, $\text{H}_{\text{thiophene}}$), 6.92 (dd, J 3.9 and 1.1 Hz, 1H, $\text{H}_{\text{thiophene}}$), 7.21-7.24 (m, 3H, $\text{H}_{\text{thiophene}}$ and 2H_{Ar}), 7.30-7.44 (m, 5H, H_{Ar}), 7.51-7.56 (m, 2H, H_{Ar}), 7.64-7.70 (m, 4H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 53.5, 125.4, 126.3, 126.4, 127.5, 127.9, 128.1, 128.1, 128.5, 128.7, 129.6, 131.7, 132.9, 136.0, 136.4, 142.2, 179.4; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{OS}$, 396.1165, found 396.1163; HPLC (λ_{254}) 99% purity.

Ethyl 1-(4-methoxybenzyl)-5-(thiophene-2-carbonyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 64)



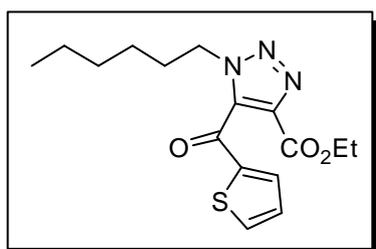
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **59** (163 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 20% (74 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.06 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 3.67 (s, 3H, O-CH₃), 4.18 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 5.54 (s, 2H, CH₂), 6.57-6.74 (m, 2H, H_{Ar}), 6.97 (dd, *J* 4.8 and 3.9 Hz, 1H, H_{thiophene}), 7.03-7.14 (m, 2H, H_{Ar}), 7.73 (dd, *J* 4.8 and 1.1 Hz, H_{thiophene}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 13.6, 53.1, 55.2, 61.4, 114.1, 125.4, 128.4, 130.1, 135.8, 136.3, 136.6, 138.7, 142.9, 159.7, 159.8, 178.1; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₈H₁₈O₄N₃S, 372.1012, found 372.1009; HPLC (λ₂₅₄) 95% purity.

Ethyl 1-(cyclohexylmethyl)-5-(thiophene-2-carbonyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 65)



The title compound was obtained according to the general procedure **E** starting from compound **60** (139 mg, 1.0 mmol), as a colorless crystal (by crystallization in diethyl ether/pentane) in a yield of 22% (76 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 0.86-1.09 (m, 8H, 4CH₂-cyclohexyl), 1.46-1.61 (m, 5H, CH₂-cyclohexyl and CH₂-CH₃), 1.78-1.96 (m, 1H, CH_{cyclohexyl}), 4.24-4.11 (m, 4H, CH₂-CH₃ and N-CH₂), 7.15 (dd, *J* 4.9 and 3.9 Hz, 1H, H_{thiophene}), 7.44 (dd, *J* 3.9 and 1.1 Hz, 1H, H_{thiophene}), 7.85 (dd, *J* 4.9 and 1.1 Hz, 1H, H_{thiophene}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 13.6, 25.2, 25.8, 30.1, 38.3, 55.4, 61.4, 128.7, 135.7, 136.6, 137.0, 138.2, 143.2, 159.8, 177.9; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₇H₂₂O₃N₃S, 348.1376, found 348.1375; HPLC (λ₂₅₄) >99% purity.

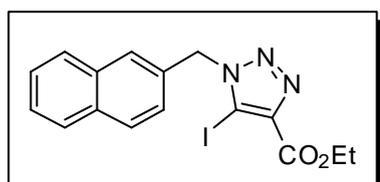
Ethyl 1-hexyl-5-(thiophene-2-carbonyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 66)



The title compound was obtained according to the general procedure **E** starting from compound **61** (127 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 46% (154 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 0.80 (t, *J* 6.5 Hz, 3H, CH₃hexyl), 1.09 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.21 (br, 6H, 3CH₂hexyl), 1.95-1.76 (m, 2H, CH₂hexyl), 4.21 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.39 (t, *J* 7.3 Hz, 2H, CH₂hexyl), 7.16 (dd, *J* 4.8

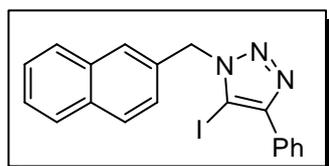
and 3.9 Hz, 1H, H_{thiophene}), 7.46 (dd, *J* 3.9 and 1.1 Hz, 1H, H_{thiophene}), 7.86 (dd, *J* 4.8 and 1.1 Hz, 1H, H_{thiophene}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 13.7, 13.8, 22.2, 25.9, 30.1, 30.9, 49.8, 61.5, 128.8, 135.8, 137.1, 143.1, 159.8, 177.9 HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₆H₂₂O₃N₃S, 336.1376, found 366.1379; HPLC (λ₂₅₄) 97% purity.

Ethyl 5-iodo-1-(naphthalen-2-ylmethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 67)



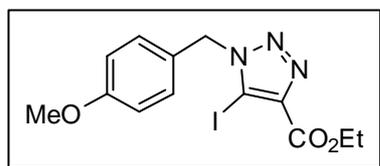
The title compound was obtained according to the general procedure C starting from compound 1 (183 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 89% (362 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.43 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₃), 4.44 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 5.82 (s, 2H, N-CH₂), 7.35-7.39 (m, 1H, H_{Ar}), 7.45-7.53 (m, 2H, H_{Ar}), 7.69 (s, 1H, H_{Ar}), 7.77-7.84 (m, 3H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.2, 54.7, 61.6, 84.7, 124.9, 126.7, 127.2, 127.8, 128.0, 129.0, 130.9, 133.1, 133.1, 142.4, 160.3; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₆H₁₅O₂N₃I, 408.0203, found 408.0199; HPLC (λ₂₅₄) 96% purity.

5-Iodo-1-(naphthalene-2-ylmethyl)-4-phenyl-1H-1,2,3-triazole (Compound 68)



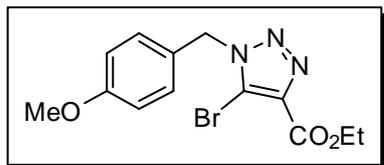
The title compound was obtained according to the general procedure C starting from compound 1 (183 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 55% (226 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 5.91 (s, 2H, CH₂), 7.37-7.56 (m, 6H, H_{Ar}), 7.77 (s, 1H, H_{Ar}), 7.88-7.96 (m, 5H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 53.7, 81.7, 125.1, 126.4, 126.5, 126.9, 127.6, 127.7, 128.3, 128.5, 128.6, 130.4, 132.4, 132.6, 132.8, 148.9; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₉H₁₅N₃I, 412.0305, found 412.0304; HPLC (λ₂₅₄) 99% purity.

Ethyl 5-iodo-1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 69)



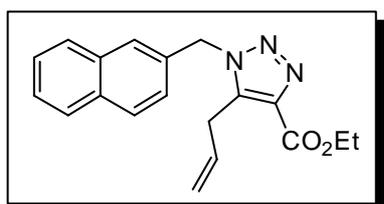
The title compound was obtained according to the general procedure B starting from compound 59 (163 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 50% (194 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.43 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 3.79 (s, 3H, O-CH₃), 4.44 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 5.60 (s, 2H, N-CH₂), 6.86 (d, *J* 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.26 (d, *J* 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.2, 54.0, 55.2, 61.4, 84.3, 114.2, 125.6, 129.4, 142.1, 159.7, 160.2; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₃H₁₅O₃N₃I, 388.0153, found 388.0155; HPLC (λ₂₅₄) 97% purity.

Ethyl 5-bromo-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 70)



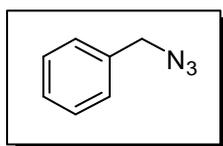
To a solution of azide (1 mmol) in THF (10.0 mL) were added successively ethylpropiolate (2.0 mmol), CuBr (1.2 mmol), *N*-bromosuccinimide (3.0 mmol) and DIPEA (1.2 mmol). The reaction mixture was allowed to stir at r.t. until complete consumption of the starting material (12h). The reaction mixture was then filtered on calcite and the solvent was removed under vacuum. The crude material was purified over a silica gel column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate: 9/1 to 8/2), to yield the desired product as a white powder in a 50% yield (170 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.36 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 3.73 (s, 3H, O-CH₃), 4.38 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 5.49 (s, 2H, N-CH₂), 6.81 (m, 2H, H_{Ar}), 7.22 (m, 2H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.1, 52.5, 55.1, 61.3, 114.1, 115.7, 125.1, 129.3, 129.9, 137.6, 159.7, 159.7; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₃H₁₅O₃N₃Br, 340.0291, found 340.0288; HPLC (λ₂₅₄) 95% purity.

Ethyl 5-allyl-1-(naphthalen-2-ylmethyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 71)



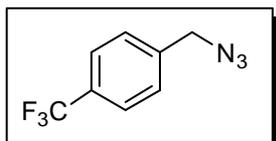
To a solution of compound 1 (122 mg, 0.7 mmol), in DCM (10.0 mL), were added successively ethylpropiolate (0.1 mL, 1.4 mmol), CuI (150 mg, 0.8 mmol), allyl bromide (0.1 mL, 1.4 mmol) and DIPEA (0.2 mL, 1.0 mmol). The reaction mixture was allowed to stir at r.t. until complete consumption of the starting material (0.5-1h). The reaction mixture was then filtered on calcite and the solvent was removed under vacuum. The crude residue was purified over a silica gel column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate: 9/1 to 8/2) to yield the desired product as a colorless oil in a 96% yield (308 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.38 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₃), 3.66 (d, *J* 5.5 Hz, 2H, CH₂CH=CH₂), 4.39 (q, *J* 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 4.90 (dd, *J* 17.1 and 0.1 Hz, 1H, CH₂CH=CH₂), 5.03 (dd, *J* 10.1 and 0.1 Hz, 1H, CH₂CH=CH₂), 5.59-5.79 (m, 3H, CH₂CH=CH₂ and N-CH₂), 7.24 (dd, *J* 8.6 and 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.39-7.51 (m, 2H, H_{Ar}), 7.54 (s, 1H, H_{Ar}), 7.71-7.80 (m, 3H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.1, 27.0, 52.0, 60.9, 117.7, 124.3, 126.1, 126.4, 126.6, 127.6, 127.7, 128.9, 131.2, 131.4, 132.8, 132.9, 161.3; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₉H₂₀O₂N₃, 322.1550, found 322.1555; HPLC (λ₂₅₄) 98% purity.

Benzyl azide (Compound 72)



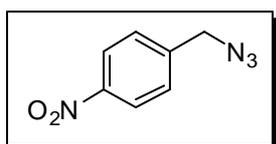
The title compound was obtained according to the general procedure **A** as a colorless oil in a quantitative yield (1.0 g) with spectroscopic data in accordance with the literature ¹¹⁹. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 4.34 (s, 2H, CH₂), 7.24-7.43 (m, 5H, H_{Ar}).

1-(Azidomethyl)-4-(trifluoromethyl)benzene (Compound 73)



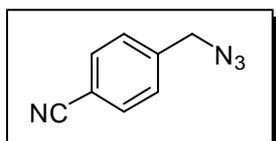
The title compound was obtained according to the general procedure **A** as a yellow oil in a quantitative yield (1.0 g) with spectroscopic data in accordance with the literature ¹¹⁸. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 4.41 (s, 2H, N-CH₂), 7.41 (d, *J* 8.0 Hz, H_{Ar}), 7.61 (d, *J* 8.0 Hz, H_{Ar}).

1-(Azidomethyl)-4-nitrobenzene (Compound 74)



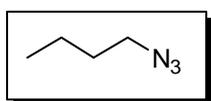
The title compound was obtained according to the general procedure **A** as a yellow oil in a quantitative yield (3.0 g). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 4.50 (s, 2H, CH₂), 7.47-7.51 (m, 2H, H_{Ar}), 8.20-8.25 (m, 2H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 53.6, 123.9, 128.5, 142.7.

4-(Azidomethyl)benzonitrile (Compound 75)



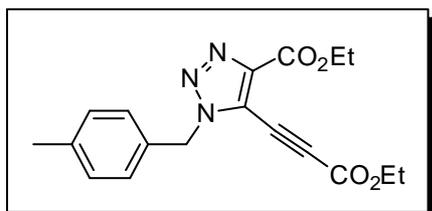
The title compound was obtained according to the general procedure **A** as a colorless oil in a quantitative yield (1.0 g) with spectroscopic data in accordance with the literature ¹²⁰. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 4.43 (s, 2H, CH₂), 7.42 (d, *J* 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.66 (d, *J* 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}).

Butyl azide (Compound 76)



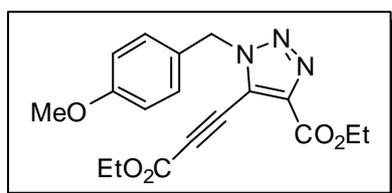
The title compound was obtained according to the general procedure **A** as a colorless oil in a quantitative yield (0.9 g) with spectroscopic data in accordance with the literature ¹²¹. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 0.87 (t, *J* 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.24-1.59 (m, 4H, 2CH₂), 3.19 (t, *J* 6.8 Hz, 2H, CH₂-N₃).

Ethyl 5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(4-methylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 77)



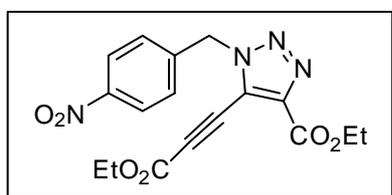
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **58** (147 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 76% (259 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.33-1.43 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 2.31 (s, 3H, CH_3 tolyl), 4.33 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.42 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.59 (s, 2H, N- CH_2), 7.14 (d, J 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.27 (d, J 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 13.9, 14.0, 21.1, 53.6, 61.7, 62.8, 68.9, 93.6, 121.2, 128.4, 129.6, 130.2, 139.0, 142.9, 152.4, 159.2; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{N}_3$, 342.1448, found 342.1451; HPLC (λ_{254}) >99% purity.

Ethyl 5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 78)



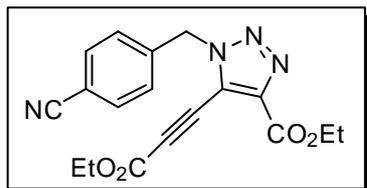
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **59** (147 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 50% (178 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.36 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.39 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 3.77 (s, 3H, O- CH_3), 4.28-4.47 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.57 (s, 2H, N- CH_2), 6.81-6.89 (m, 2H, H_{Ar}), 7.29-7.35 (m, 2H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 13.9, 14.0, 53.4, 55.2, 61.7, 62.8, 68.9, 93.6, 114.3, 121.1, 125.2, 130.0, 142.9, 152.4, 159.2, 160.0; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_3$, 358.1397, found 358.1399; HPLC (λ_{254}) 99% purity.

Ethyl 5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 79)



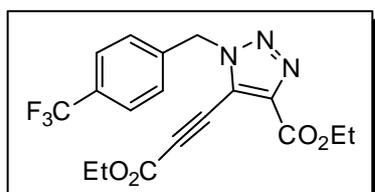
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **74** (178 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 50% (186 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.36 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.41 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.28-4.49 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.76 (s, 2H, N- CH_2), 7.50-7.57 (m, 2H, H_{Ar}), 8.20-8.26 (m, 2H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 13.9, 14.0, 52.6, 62.0, 63.1, 68.2, 94.1, 121.6, 124.3, 129.3, 139.7, 143.1, 148.3, 152.1, 159.0; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{N}_4$, 373.1143, found 373.1143; HPLC (λ_{254}) 99% purity.

Ethyl 1-(4-cyanobenzyl)-5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 80)



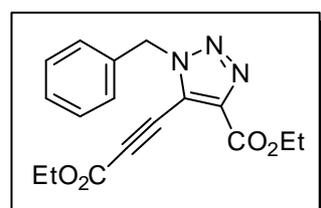
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **75** (158 mg, 1.0 mmol), as a brown powder in a yield of 55% (194 mg). It was crystallized in diethyl ether/pentane to yield a white solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.37 (t, J 7.19 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.41 (t, J 7.16 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.26-4.52 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.70 (s, 2H, N- CH_2), 7.47 (d, J 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.68 (d, J 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.0, 14.0, 53.0, 62.0, 63.1, 68.3, 94.1, 113.3, 117.9, 121.6, 129.0, 132.9, 137.9, 143.1, 152.2, 159.0; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}_4$, 353.1244, found 353.1244; HPLC (λ_{254}) 95% purity.

Ethyl 5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 81)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **73** (201 mg, 1.0 mmol) as a brown powder in a yield of 51% (201 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.36 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.41 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.34 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.44 (q, J 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.71 (s, 2H, N- CH_2), 7.49 (d, J 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.63 (d, J 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 13.8, 13.9, 52.9, 61.8, 62.9, 68.3, 93.8, 121.4, 123.6 (q, J 272.4 Hz), 126.0 (q, J 3.7 Hz), 128.7, 131.1 (q, J 32.7 Hz), 136.9, 142.9, 152.1, 159.0; HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}_3\text{F}_3$, 396.1166, found 396.1159; HPLC (λ_{254}) 99% purity.

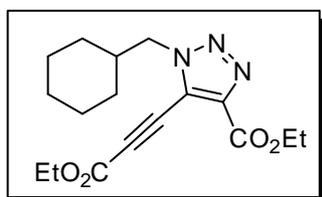
Ethyl 1-benzyl-5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 82)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from **72** (133 mg, 1 mmol), as a white powder in a yield of 21% (68 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.33-1.44 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.34 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.44 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.65 (s, 2H, N- CH_2), 7.33-7.40 (m, 5H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.0, 14.01, 53.8, 61.9, 62.9, 68.8, 93.7, 121.4, 128.4, 129.1, 133.2,

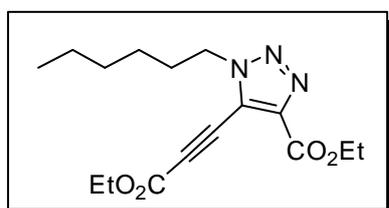
142.9, 152.4, 159.3; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₇H₁₈O₄N₃, 328.1292, found 322.1292; HPLC (λ₂₅₄) 99% purity.

Ethyl 1-(cyclohexylmethyl)-5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 83)



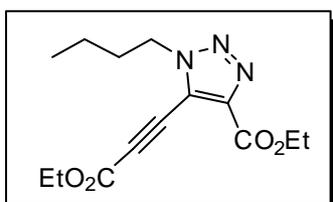
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **60** (140 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 22% (73 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.00-1.46 (m, 12H, 3CH₂-cyclohexyl and 2CH₂-CH₃), 1.57-1.77 (m, 4H, 2CH₂-cyclohexyl), 1.90-2.11 (m, 1H, H_{cyclohexyl}), 4.28-4.50 (m, 6H, 2CH₂-CH₃ and N-CH₂); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 13.9, 14.0, 25.3, 25.8, 30.3, 38.6, 55.8, 58.7, 61.8, 62.9, 69.0, 83.1, 93.1, 121.9, 142.3, 152.4, 159.4; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₇H₂₄O₄N₃, 334.1731, found 334.1768; HPLC (λ₂₅₄) >99% purity.

Ethyl 5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-hexyl-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 84)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **60** (127 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 57% (183 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 0.83-0.90 (m, 3H, CH₃-hexyl), 1.31-1.46 (m, 12H, 2CH₂-CH₃ and 3CH₂-hexyl), 1.88-2.02 (m, 2H, CH₂-hexyl), 4.28-4.51 (m, 6H, N-CH₂ and 2CH₂-CH₃); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 13.9, 13.9, 14.1, 22.3, 25.9, 29.7, 30.9, 50.1, 61.8, 62.9, 68.8, 93.2, 121.4, 142.6, 152.5, 159.4; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₆H₂₄O₄N₃, 322.1761, found 322.1765; HPLC (λ₂₅₄) 99% purity.

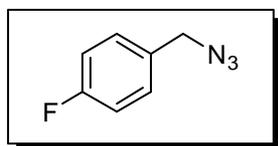
Ethyl 1-butyl-5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 85)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **76** (100 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 34% (100 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 0.96 (t, *J* 7.3 Hz, 3H, CH₃-butyl), 1.30-1.47 (m, 8H, CH₂-butyl and 2CH₂-CH₃), 1.88-2.02 (m, 2H, CH₂-butyl), 4.29-4.52 (m, 6H, N-CH₂ and 2CH₂-CH₃); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 13.3, 14.0, 19.5, 29.7, 30.3,

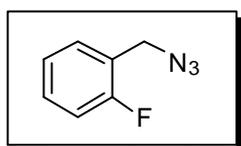
31.7, 49.8, 61.8, 62.9, 68.8, 93.2, 121.5, 142.6, 152.5, 159.4; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₄H₂₀O₄N₃, 294.1448, found 294.1446; HPLC (λ₂₅₄) >99% purity.

1-(Azidomethyl)-4-fluorobenzene (Compound 86)



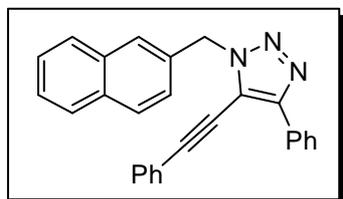
The title compound was obtained according to the general procedure **A**, as a pale yellow oil in a yield of 80% (1.2 g) with spectroscopic data in accordance with the literature¹¹⁹. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 4.22 (s, 2H, CH₂), 6.92-7.04 (m, 2H, H_{Ar}), 7.17-7.24 (m, 2H, H_{Ar}).

1-(Azidomethyl)-3-fluorobenzene (Compound 87)



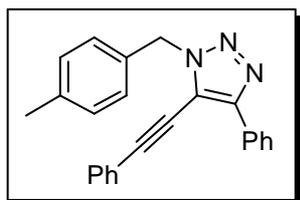
The title compound was obtained according to the general procedure **A**, as a pale yellow oil in a yield of 82% (1.2 g). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 4.28 (s, 2H, CH₂), 6.94-7.04 (m, 3H, H_{Ar}), 7.19-7.34 (m, 1H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 48.4 (d, *J* 3.3 Hz), 115.6 (d, *J* 21.2 Hz), 122.6 (d, *J* 15.3 Hz), 124.4 (d, *J* 3.7 Hz), 130.3 (d, *J* 13.0 Hz), 130.3, 160.83 (d, *J* 247.8 Hz).

1-(Naphthalen-2-ylmethyl)-4-phenyl-5-(phenylethynyl)-1*H*-1,2,3-triazole (Compound 88)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **1** (183 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 58% (223 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 5.84 (s, 2H, CH₂), 7.37-7.55 (m, 11H, H_{Ar}), 7.76-7.87 (m, 4H, H_{Ar}), 8.18-8.23 (m, 2H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 53.2, 75.6, 102.5, 121.4, 125.4, 126.2, 126.5, 126.6, 127.5, 127.7, 127.9, 128.6, 128.6, 128.8, 129.7, 130.2, 131.6, 132.0, 133.1, 133.1; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₂₇H₂₀N₃, 386.1650, found 386.1652; HPLC (λ₂₅₄) 97% purity.

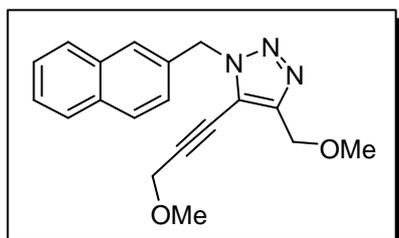
1-(4-Methylbenzyl)-4-phenyl-5-(phenylethynyl)-1*H*-1,2,3-triazole (Compound 89)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **58** (147 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 62% (217 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.15 (s, 3H, CH₃), 5.44 (s, 2H, CH₂), 6.99 (d, *J* 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.16 (d, *J* 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.14-7.39 (m, 10H, H_{Ar}), 8.03-8.08 (m, 2H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 21.0, 52.6, 75.5, 102.4, 117.2, 121.3, 126.0, 127.0, 128.4, 128.5, 129.3,

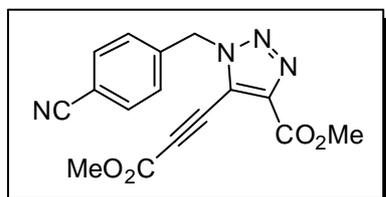
129.5, 130.2, 131.4, 129.6, 129.7, 129.9, 130.4, 131.6, 131.8, 138.4, 148.1; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₂₄H₂₀N₃, 350.1652, found 350.1650; HPLC (λ₂₅₄) 99% purity.

4-(Methoxymethyl)5-(3-methoxyprop-1-yn-1-yl)-1-(naphthalen-2-ylmethyl)-1H-1,2,3-triazole (Compound 90)



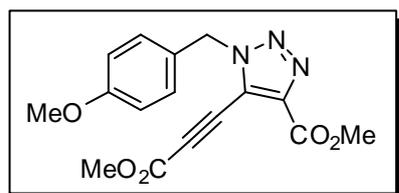
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **1** (183 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 10% (32 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.32 (s, 3H, O-CH₃), 3.40 (s, 3H, O-CH₃), 4.33 (s, 2H, O-CH₂), 4.57 (s, 2H, O-CH₂), 5.72 (s, 2H, N-CH₂), 7.41 (dd, *J* 8.5 and 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.47-7.50 (m, 2H, H_{Ar}), 7.77-7.82 (m, 4H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 53.1, 57.8, 58.3, 60.1, 64.7, 71.0, 98.6, 199.9, 125.2, 126.5, 127.3, 127.6, 127.8, 128.7, 131.7, 133.0, 133.1, 147.1; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₉H₂₀O₂N₃, 322.1550, found 322.1548; HPLC (λ₂₅₄) 95% purity.

Methyl 1-(4-cyanobenzyl)-5-(3-methoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 91)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **75** (158 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 45% (146 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.88 (s, 3H, O-CH₃), 3.97 (s, 3H, O-CH₃), 5.70 (s, 2H, N-CH₂), 7.44-7.48 (m, 2H, H_{Ar}), 7.64-7.70 (m, 2H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 52.7, 52.9, 53.5, 68.5, 93.8, 113.2, 117.9, 121.6, 129.0, 132.9, 137.8, 142.8, 152.5, 159.4; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₁₆H₁₃O₄N₄, 325.0931, found 325.0933; HPLC (λ₂₅₄) 99% purity.

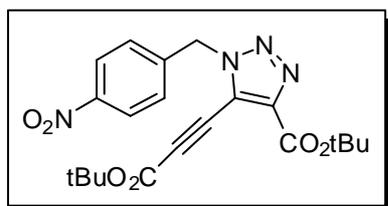
Methyl 5-(3-methoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 92)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **59** (163 mg, 1.0 mmol), as a white powder in a yield of 10% (33 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.68 (s, 3H, O-CH₃), 3.80 (s, 3H, O-CH₃), 3.86 (s, 3H, O-CH₃), 5.49 (s, 2H, N-CH₂), 6.73-6.80 (m, 2H, H_{Ar}), 7.20-7.27 (m, 2H,

H_{Ar}); $^{13}C\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) δ 52.4, 53.3, 55.1, 69.1, 93.2, 114.2, 121.0, 125.1, 129.9, 142.5, 152.7, 159.5, 159.9; HRMS (ESI^+): calcd for $[M+H]^+$ $C_{16}H_{16}O_5N_3$, 330.1084, found 330.1091; HPLC (λ_{254}) 98% purity.

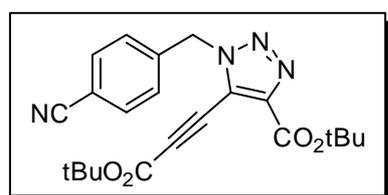
***tert*-Butyl 5-(3-(*tert*-butoxy)-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(4-nitrobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 93)**



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **74** (2.8 g, 15.6 mmol), as a white powder in a yield of 22% (1.47 g). 1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) δ 1.54 (s, 9H, *t*Bu), 1.60 (s, 9H, *t*Bu), 5.73 (s, 2H, CH_2), 7.54 (m, 2H, H_{Ar}), 8.23 (m, 2H, H_{Ar});

$^{13}C\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) δ 27.8, 27.9, 52.5, 66.6, 83.4, 85.3, 94.9, 121.2, 124.2, 129.3, 140.0, 143.8, 148.1, 151.1, 157.9; HRMS (ESI^+): calcd for $[M+H]^+$ $C_{21}H_{25}O_6N_4$, 429.1769, found 429.1769.

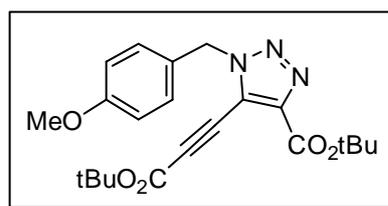
***tert*-Butyl 5-(3-(*tert*-butoxy)-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(4-cyanobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 94)**



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **75** (2.6 g, 16.7 mmol), as a white powder in a yield of 22% (1.5 g). 1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) δ 1.54 (s, 9H, *t*Bu), 1.60 (s, 9H, *t*Bu), 5.73 (s, 2H, CH_2), 7.54 (m, 2H, H_{Ar}), 8.23 (m, 2H, H_{Ar}); $^{13}C\{^1H\}$

NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) δ 27.9, 28.0, 52.8, 66.7, 83.4, 85.3, 94.9, 113.1, 118.0, 121.2, 129.1, 132.8, 138.1, 143.9, 151.2, 157.9; HRMS (ESI^+): calcd for $[M+H]^+$ $C_{22}H_{25}O_4N_4$, 409.1870, found 409.1871.

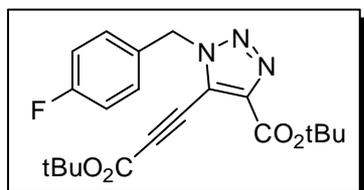
***tert*-Butyl 5-(3-butoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 95)**



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **59** (370 mg, 2.3 mmol), as a brown powder in a yield of 22% (206 mg). The purity of this compound was verified by proton NMR. 1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) δ 1.55 (s, 9H, *t*Bu), 1.59 (s, 9H,

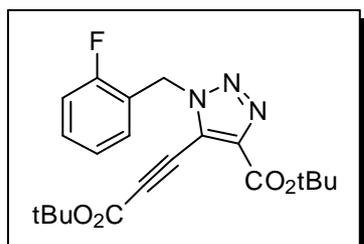
*t*Bu), 3.78 (s, 3H, O-CH₃), 5.56 (s, 2H, N-CH₂), 6.84-6.88 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33-7.38 (m, 2H, H_{Ar}).

***tert*-Butyl 5-(3-(*tert*-butoxy)-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 96)**



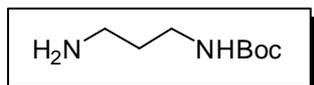
The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **86** (1.0 g, 6.9 mmol), as a white powder in a yield of 10% (277 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.54 (s, 9H, *t*Bu), 1.59 (s, 9H, *t*Bu), 5.59 (s, 2H, CH₂), 7.04 (t, *J* 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.39 (dd, *J* 7.8 and 5.5 Hz, 2H, H_{Ar}); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 27.9, 28.0, 52.9, 67.2, 83.2, 85.1, 94.6, 116.0 (d, *J* 21.9 Hz), 120.9, 129.2 (d, *J* 3.3 Hz), 130.5 (d, *J* 8.5 Hz), 151.3, 158.1, 160.5, 165.4.

***tert*-Butyl 5-(3-(*tert*-butoxy)-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(2-fluorobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 97)**



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **87** (1.2 g, 7.9 mmol), as a white powder in a yield of 30% (952 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.56 (s, 9H, *t*Bu), 1.63 (s, 9H, *t*Bu), 5.72 (s, 2H, CH₂), 7.07-7.18 (m, 2H, H_{Ar}), 7.26-7.42 (m, 2H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 27.9, 28.0, 46.9, 47.0, 66.7, 83.1, 84.9, 94.6, 115.6, 116.0, 120.4, 120.7, 121.3, 124.6 (d, *J* 3.8 Hz), 130.3 (d, *J* 2.9 Hz), 131.0 (d, *J* 8.1 Hz), 143.5, 151.2, 157.9, 158.1, 162.8; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₂₁H₂₅O₄N₃F, 402.1824, found 402.1824.

***tert*-Butyl(3-aminopropyl)carbamate (Compound 98)**

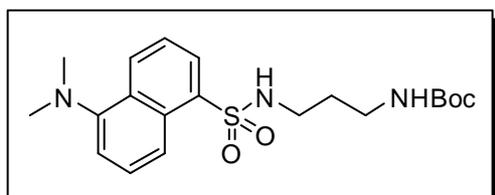


To a solution of diaminopropane (10.0 mL, 118.8 mmol) in chloroform (200.0 mL) at 0 °C was added *tert*-butyl dicarbonate (5.0 mL, 21.7 mmol) dropwise over 2h. The reaction mixture was allowed to react at r.t until complete consumption of the starting material (overnight). Chloroform was then removed under vacuum, water (150.0 mL) was added and the insoluble bis-substituted product was removed by filtration. The filtrate was extracted with DCM (3 × 100.0 mL), and the organic layers were combined, washed with brine (100.0 mL), and dried over MgSO₄. Finally, the solvent was removed in vacuum to afford compound **98** as a colorless oil (2.3 g, 11 %) with

spectroscopic data in accordance with the literature ¹²² ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.38 (s, 9H, *t*Bu), 1.56 (q, *J* 6.7 Hz, 2H, CH₂), 2.70 (t, *J* 6.7 Hz, 2H, CH₂), 3.15 (dd, *J* 12.7 and 6.4 Hz, 2H, CH₂), 5.02 (br, 1H, -NHBoc).

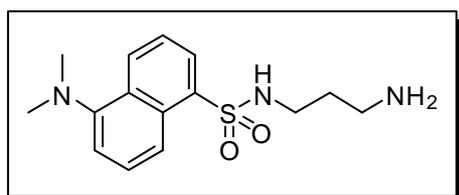
***tert*-Butyl (3-((6-(dimethylamino)naphthalene)-2-sulfonamido)propyl)carbamate**

(Compound 99)



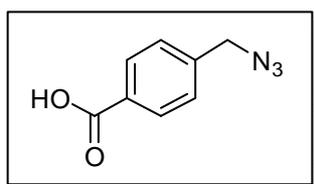
To a solution of *tert*-butyl(3-aminopropyl)carbamate (100.0 mg, 0.6 mL) in DMF (5.0 mL), DIPEA (110 μl, 0.6 mmol) and dansylchloride (154 mg, 0.6 mmol) were added under argon. The reaction mixture was allowed to react at r.t until complete consumption of the starting material (2h). DMF was then removed and the crude material was purified over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate). Product **99** was obtained as a yellow powder in a yield of 86% (200 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.33 (s, 9H, *t*Bu), 1.47-1.53 (m, 2H, CH₂), 2.87-2.98 (m, 8H, CH₂ and 2 N-CH₃), 3.09 (dd, *J* 12.2 and 6.3 Hz, 2H, CH₂), 4.58-4.63 (br, 1H, NH), 5.80-5.86 (br, 1H, NH), 7.17 (d, *J* 7.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.46-7.60 (m, 2H, H_{Ar}), 8.20-8.23 (m, 1H, H_{Ar}), 8.33 (d, *J* 8.57 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.52 (d, *J* 8.6 Hz, 1H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (MeOD, 50 MHz) δ 28.8, 31.2, 38.4, 41.4, 45.8, 80.0, 116.5, 120.5, 124.3, 129.2, 130.2, 130.9, 131.2, 131.2, 136.9, 153.2.

N-(3-aminopropyl)-6-(dimethylamino)naphthalene-2-sulfonamide (Compound 100)



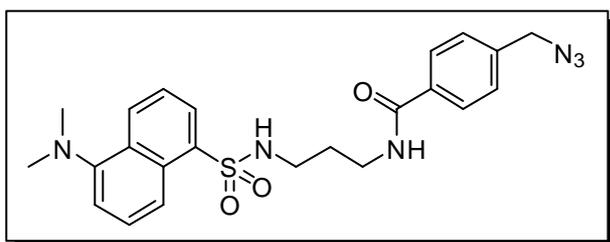
To a solution of compound **99** (1.9 g, 4.7 mmol) in DCM (25.0 mL), TFA (4.0 mL, excess) was added. The reaction mixture was allowed to react at r.t until complete consumption of the starting material (4h). The solvent was then removed and crude material was extracted in DCM/NaHCO₃. The product was obtained as a pure yellow powder (1.1 g, 78%). ¹H NMR (MeOD, 200 MHz) δ 1.70-1.84 (m, 2H, CH₂), 2.87-2.95 (m, 10H, 2CH₃ and 2CH₂), 7.27 (d, *J* 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.54-7.63 (m, 2H, H_{Ar}), 8.20 (dd, *J* 7.3 and 1.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.32 (d, *J* 8.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.57 (d, *J* 8.6 Hz, 1H, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (MeOD, 50 MHz) δ 29.4, 38.4, 40.9, 45.8, 49.0, 116.5, 120.3, 124.4, 129.3, 130.3, 130.9, 131.3, 131.4, 136.6, 153.3.

4-(Azidomethyl)benzoic acid (compound 101)



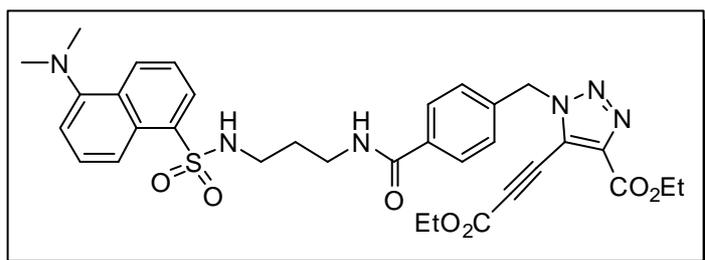
The title compound was obtained according to the general procedure **A**, starting from 4-(bromomethyl)benzoic acid (6.0 g, 28.0 mmol) as a white powder in a yield of 56% (2.8 g). ^1H NMR (MeOD, 200 MHz) δ 4.45 (s, 2H), 7.42-7.46 (m, 2H, H_{Ar}), 8.01-8.05 (m, 2H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (MeOD, 50 MHz) δ 55.1, 129.2, 131.2, 131.8, 142.4, 169.5.

4-(Azidomethyl)-N-(3-((6-(dimethylamino)naphthalene)-2-sulfonamido)propyl)benzamide (Compound 102)



To a solution of 4-(azidomethyl)benzoic acid (480 mg, 2.7 mmol) in DMF (20.0 mL) were added successively HOBT (540 mg, 4.0 mmol), DIC (409 mg, 3.2 mmol) and DIPEA (700 mg, 5.4 mmol). The reaction mixture was allowed to react at r.t for 30 min to form a pre-activated ester moiety. Then, the amino substrate **100** was added. After an overnight stirring, DMF was removed and the crude material was extracted in $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$. Then, it was purified over a silica gel column (petroleum ether/ethyl acetate). Product **102** was obtained as a yellow powder in a yield of 63% (950 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.61-1.73 (m, 2H, CH_2), 2.87 (s, 6H, 2 CH_3), 2.96 (dd, J 12.1 and 6.4 Hz, 2H, CH_2), 3.51 (dd, J 12.1 and 6.2 Hz, 2H, CH_2), 4.38 (s, 2H, N- CH_2), 5.85 (t, J 6.5 Hz, 1H, NH), 6.76 (t, J 5.8 Hz, 1H, NH), 7.17 (d, J 7.6 Hz, 1H, H_{dansyl}), 7.32-7.36 (m, 2H, H_{Ar}), 7.52 (ddd, J 13.3, 8.5 and 7.6 Hz, 2H, H_{dansyl}), 7.71-7.64 (m, 2H, H_{Ar}), 8.20 (dd, J 7.3 and 1.1 Hz, 1H, H_{dansyl}), 8.33 (d, J 8.6 Hz, 1H, H_{dansyl}), 8.51 (d, J 8.6 Hz, 1H, H_{dansyl}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 29.5, 36.3, 40.0, 45.3, 54.2, 115.2, 118.8, 123.1, 127.5, 128.1, 128.4, 129.2, 129.5, 129.8, 130.4, 133.9, 135.0, 138.8, 151.9, 167.4.

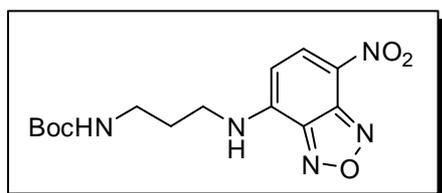
Ethyl 1-(4-((3-((6-(dimethylamino)naphthalene)-2-sulfonamido)propyl)carbamoyl)benzyl)-5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 104)



The title compound was obtained according to the general procedure **B**, starting from compound **102** (900 mg, 1.9 mmol) as a brown foam in a yield of 14% (180 mg). ^1H NMR

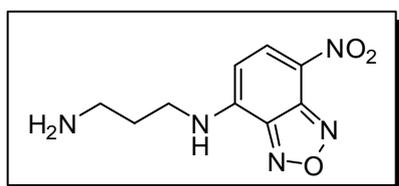
(CDCl₃, 200 MHz) δ 1.30 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.36 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.50-1.74 (m, 2H, CH₂), 2.82-2.92 (s, 8H, 2CH₃-N and CH₂), 3.28-3.55 (m, 2H, CH₂), 4.23-4.43 (m, 4H, 2CH₂-CH₃), 5.63 (s, 2H, CH₂-N), 6.19 (t, *J* 6.1 Hz, 1H, NH), 7.09-7.12 (m, 2H, NH and H_{dansyl}), 7.30 (d, *J* 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.44 (dt, *J* 8.2, 8.0 and 3.3 Hz, 2H, H_{dansyl}), 7.71 (d, *J* 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.13 (d, *J* 7.2 Hz, 1H, H_{dansyl}), 8.28 (d, *J* 8.6 Hz, 1H, H_{dansyl}), 8.46 (d, *J* 8.6 Hz, 1H, H_{dansyl}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 13.8, 13.9, 29.2, 36.3, 39.9, 45.2, 53.1, 61.8, 62.9, 68.3, 93.8, 115.1, 118.8, 121.4, 123.1, 127.8, 128.3, 128.9, 129.6, 130.2, 134.7, 134.9, 136.2, 142.7, 151.6, 152.1, 159.0, 167.0; HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺ C₃₃H₃₇O₇N₆S, 661.2439, found 661.2441.

***tert*-Butyl (3-((7-nitrobenzo[*c*][1,2,3]oxadiazol-4-yl)amino)propyl)carbamate (Compound 104)**



To a solution of *tert*-butyl(3-aminopropyl)carbamate (2.5 g, 14.3 mmol) in Toluene (70.0 mL) under reflux, cesium carbonate (2.8 g, 8.6 mmol) and 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (2.8 g, 14.3 mmol) [in Toluene] were added successively. After a 3h stirring, toluene was removed and the crude material was purified over a silica gel column (petroleum ether/ethyl acetate). The product **104** was obtained as a brown powder (2 mg, 37%). The purity of this compound was confirmed by proton NMR. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.46 (s, 9H, *t*Bu), 1.92 (td, *J* 12.2 and 6.3 Hz, 2H, CH₂), 3.31 (dd, *J* 12.4 and 6.4 Hz, 2H, CH₂), 3.60 (dd, *J* 11.3 and 5.4 Hz, 2H, CH₂), 4.87 (t, *J* 6.2 Hz, 1H, NH-CH₂), 6.16 (d, *J* 8.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.54 (br, 1H, NH), 8.45 (d, *J* 8.7 Hz, 1H, H_{Ar}).

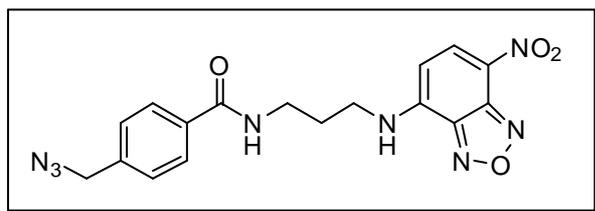
***N*-(7-Nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-yl)propane-1,3-diamine (Compound 105)**



To a solution of compound **104** (1.2 g, 3.5 mmol) in DCM (20.0 mL) was added TFA (2.8 mL, excess) at r.t. After 30 min stirring, neutralization and extraction, the deprotected intermediate **105** was obtained in a quantitative yield as a red powder. The crude was taken to the next step without further purification.

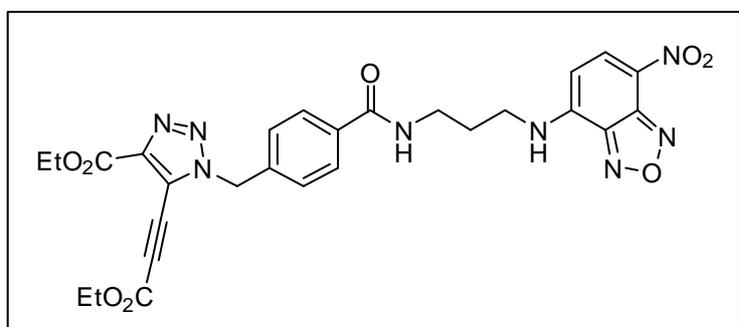
4-(Azidomethyl)-*N*-(3-((7-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)propyl)benzamide

(Compound 106)



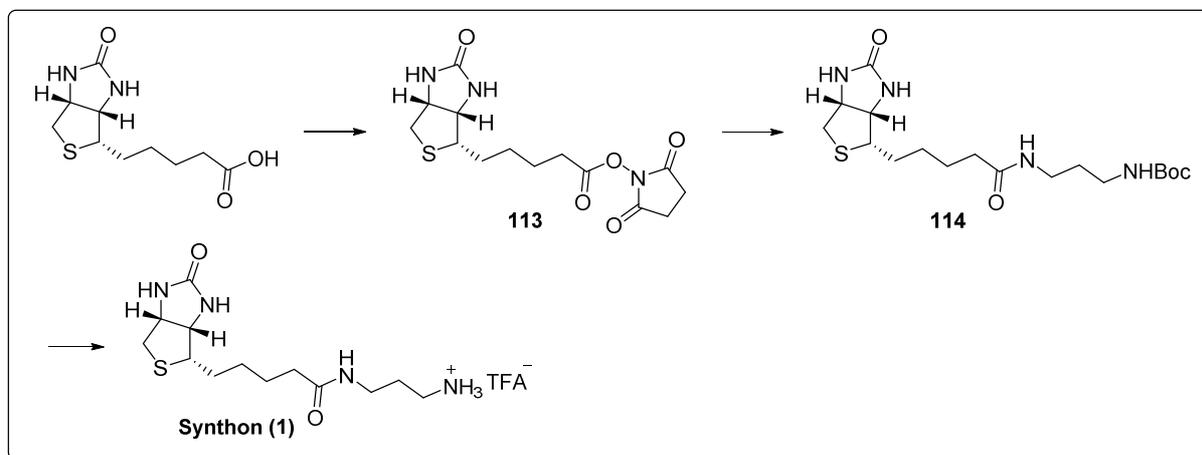
To a solution of compound **101** (645 mg, 3.6 mmol) in DMF (30.0 mL) were added successively HOBt (725 mg, 5.5 mmol), DIC (674 μ l, 4.4 mmol) and DIPEA (1.2 mL, 7.3 mmol). Reaction mixture was allowed to react at r.t for 30 min to form a pre-activated ester moiety. Then, intermediate **105** was added. After an overnight stirring, DMF was removed and the crude material was extracted in ethyl acetate/water then purified over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate). The product **106** was obtained as a yellow powder (650 mg, 45%). The purity of this compound was confirmed by proton NMR. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ 1.89-2.02 (m, 2H, CH_2), 3.33-3.44 (m, 2H, CH_2), 3.52-3.65 (m, 2H, CH_2), 4.52 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 6.42 (d, J 9.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.45 (d, J 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.85 (d, J 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.50 (d, J 9.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.58 (t, J 5.7 Hz, 1H, NH-CH_2), 9.77-9.25 (m, 1H, NH-CO).

Ethyl 5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(4-((3-((7-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)propyl)carbamoyl)benzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Compound 107)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from compound **106** (600 mg, 1.5 mmol) as an orange powder in a yield of 8% (70 mg). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 1.27 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.31 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.94 (p, J 6.8 Hz, 2H, CH_2propyl), 3.36-3.40 (m, 2H, CH_2propyl), 3.50-3.57 (m, 2H, CH_2propyl), 4.29 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.34 (q, J 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.84 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 6.41 (d, J 8.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.39 (d, J 8.2 Hz, 2H, H_{Ph}), 7.83 (d, J 8.2 Hz, 2H, H_{Ph}), 8.50 (d, J 8.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.56 (t, J 5.6 Hz, 1H, NH), 9.50 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 15.0, 15.0, 28.7, 38.0, 42.4, 53.2, 62.1, 63.6, 99.9, 122.2, 128.7, 128.9, 129.3, 137.6, 138.5, 146.5, 152.5, 159.0, 166.7, ; HRMS (ESI $^+$): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{O}_8\text{N}_8$, 591.1946, found 591.1949.

***N*-(3-Aminopropyl)-5-(2-oxo-hexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]-imidazol-4-yl)pentanamide
(Synthon 1)**

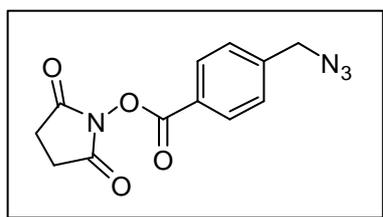


To a solution of biotin (300 mg, 1.2 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (153 mg, 1.3 mmol) in DMF (15.0 mL) was added DIC (230 μ L, 1.4 mmol). The mixture was stirred for 18 h at r.t. After evaporation under pressure, the resulting residue (white solid) was washed several times with MeOH (4.0 mL). Then, the solvent was removed under vacuum giving compound **113** without further purification (220 mg, 83%)¹²³.

To a solution of *N*-hydroxysuccinimido biotin (**113**) (112 mg, 0.3 mmol) in DMF (5.0 mL) were added *tert*-butyl(3-aminopropyl)carbamate (**98**) (69 mg, 0.4 mmol) and DIPEA (114 μ L, 0.6 mmol). The mixture was allowed to react overnight at r.t. Then it was concentrated under vacuum and purified over a silica gel column (eluted with DCM/MeOH: 10/0 to 8.5/1.5) giving product **114** without further purification (104 mg, 87%).

To a solution of intermediate **114** (104 mg, 0.26 mmol) in DCM (2.0 mL) was added TFA (2.0 mL, excess). Mixture was stirred for 1 h at r.t. Then, it was concentrated under vacuum giving **synthon (1)** as a TFA salt adduct (orange oil) in a quantitative yield and taken to the next step without further purification¹²⁴.

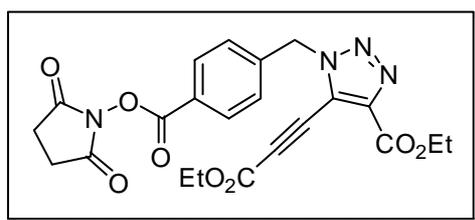
2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 4-(azidomethyl)benzoate (Compound 114)



Compound **101** (235 mg, 1.33 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (5.0 mL). *N*-hydroxysuccinimide (230 mg, 2.0 mmol), DIPEA (520 μ L, 3.0 mmol) and DIC (232 μ L, 1.5 mmol) were added successively, and the mixture was stirred

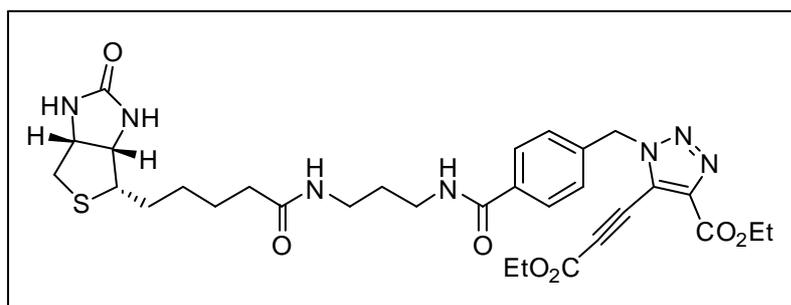
at room temperature for 15 min and monitored by TLC (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4). After completion, the solvent was evaporated and the crude product was purified to give product **114** (310 mg, 88%) as a white solid with spectroscopic data in accordance with the literature¹²⁵. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 4.47 (s, 2H, N-CH₂), 7.47 (d, *J* 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.15 (d, *J* 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 2.92 (s, 4H, 2CH₂).

Ethyl 1-(4-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)benzyl)-5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (Synthon 2)



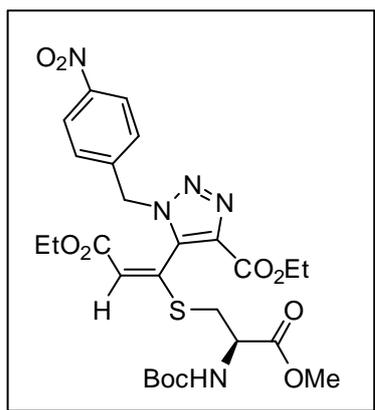
The title compound was obtained from compound **114** (290 mg, 1.0 mmol) according to the general procedure **B** as a white powder in a yield of 8% (36 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.35 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.41 (t, *J* 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 2.90 (s, 4H, 2CH₂), 4.33 (q, *J* 7.3 Hz, CH₂-CH₃), 4.44 (q, *J* 7.3 Hz, CH₂-CH₃), 5.74 (s, 2H, N-CH₂), 7.48 (d, *J* 8.2 Hz, H_{Ar}), 8.10 (d, *J* 8.2 Hz, H_{Ar}); ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.1, 14.2, 25.8, 53.2, 62.1, 63.2, 68.4, 94.2, 121.8, 126.0, 128.8, 131.5, 140.0, 143.2, 152.3, 159.2, 161.3, 169.2; MS (ESI⁺) *m/z* = 469.0 [M+H]⁺.

Ethyl 5-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-yn-1-yl)-1-(4-((3-(5-(((3*a*S,4*S*,6*a*R)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)propyl)carbamoyl)benzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (compound 115)



To a solution of **synthon (1)** (31 mg, 0.07 mmol) in DMF (3.0 mL) were added **synthon (2)** (27 mg, 0.07 mmol) and DIPEA (34 μL, 0.19 mmol). The mixture was allowed to react for 24h at r.t. After evaporation under vacuum, crude residue was purified over a silica gel column (DCM/MeOH: 10.0 to 8/2). This product was prepared as a proof of concept. Its mass was in accordance with the expected value: MS (ESI⁺) *m/z* = 672.3 [M+H₂O+H]⁺.

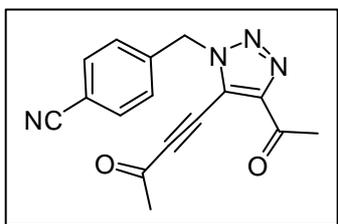
Ethyl (R,E)-5-(6-(methoxycarbonyl)-2,2-dimethyl-4,11-dioxo-3,12-dioxa-8-thia-5-azatetradec-9-en-9-yl)-1-(4-nitrobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (compound 116-a)



To a solution of compound 79 (230 mg, 0.6 mmol) in acetonitrile (5.0 mL) was added *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-cysteine methyl ester (145 mg, 0.6 mmol). The mixture was allowed to react at r.t. until complete consumption of the starting material (10h). The solvent was then removed under vacuum and the crude material was purified over a silica gel column (cyclohexane/ethyl acetate: 9/1 to 4/6) giving product 116 in a yield of 40 % (140 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz)

δ 1.10 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.36 (t, J 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.42 (s, 9H, *t*Bu), 3.07 (dd, J 14.2 and 6.0 Hz, 1H, S- CH_2), 3.23 (dd, J 14.2 and 5.6 Hz, 1H, S- CH_2), 3.74 (s, 3H, O- CH_3), 4.04 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.30-4.48 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ and N-CH), 5.32 (d, J 8.0 Hz, 1H, NH), 5.70 (s, 2H, N- CH_2), 6.61 (s, 1H, H_{vinyl}), 7.40-7.44 (m, 2H, H_{Ar}), 8.18-8.22 (m, 2H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 13.6, 14.1, 28.2, 34.5, 51.4, 52.4, 52.9, 61.3, 62.3, 80.6, 116.8, 124.1, 128.5, 136.7, 137.0, 139.3, 141.1, 147.9, 155.0, 160.6, 162.6, 170.6.

4-((4-Acetyl-5-(3-oxobut-1-yn-1-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)benzonitrile (Compound 117)



The title compound was obtained according to the general procedure **B** starting from **75** (1.8 g, 11.4 mmol), as a yellow solid in a yield of 3% (90 mg). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 2.48 (s, 3H, CH_3), 2.68 (s, 3H, CH_3), 5.67 (s, 2H, CH_2), 7.43-7.47 (m, 2H, H_{Ar}), 7.64-7.69 (m, 2H, H_{Ar}); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR

(DMSO-d_6 , 50 MHz) δ 27.4, 32.4, 52.6, 72.0, 99.5, 113.2, 117.9, 119.7, 129.0, 132.9, 137.9, 149.4, 182.9, 191.1; HRMS (ESI $^+$): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}_4$, 293.1033, found 293.1034.

Bibliographie de la partie expérimentale

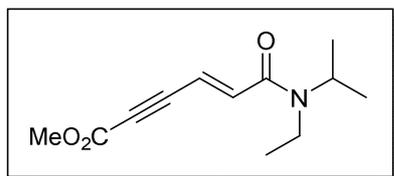
- (114) Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of laboratory chemicals*; Butterworth-Heinemann, **2013**.
- (115) Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (14), 2923-2925.
- (116) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. *Organometallics* **2010**, *29* (9), 2176-2179.

- (117) Rolland, V.; Kotera, M.; Lhomme, J. *Synth. Commun.* **2006**, *27* (20), 3505-3511.
- (118) Pérez, J. M.; Crosbie, P.; Lal, S.; Díez-González, S. *ChemCatChem* **2016**, *8* (13), 2222–2226.
- (119) Campbell-Verduyn, L.; Elsinga, P. H.; Mirfeizi, L.; Dierckx, R. A.; Feringa, B. L.; Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C.; Sharpless, K. B.; Breinbauer, R.; Köhn, M.; Bock, V. D.; Hiemstra, H.; Maarseveen, J. H. van; Sharpless, K. B.; Manetsch, R.; Moses, J. E.; Moorhouse, A. D.; Struthers, H.; Spingler, B.; Mindt, T. L.; Schibli, R.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R.; Li, Z.; Seo, T. S.; Ju, J.; Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R.; Pérez, D.; Guitián, E.; Castedo, L.; Peña, D.; Escudero, S.; Pérez, D.; Guitián, E.; Castedo, L.; Yoshikawa, E.; Radhakrishnan, K. V.; Yamamoto, Y.; Reinecke, M. G.; Mazza, D. D.; Obeng, M.; Yoshida, H.; Fukushima, H.; Ohshita, J.; Kunai, A.; Yoshida, H.; Fukushima, H.; Ohshita, J.; Kunai, A.; Yoshida, H.; Watanabe, M.; Fukushima, H.; Ohshita, J.; Kunai, A.; Jeganmohan, M.; Cheng, C.-H.; Yoshida, H.; Fukushima, H.; Ohshita, J.; Kunai, A.; Jin, T.; Yamamoto, Y.; Huisgen, R.; Knorr, R.; Reynolds, G. A.; Cambie, R. C.; Higgs, P. I.; Rutledge, P. S.; Woodgate, P. D.; Kitamura, T.; Yamane, M.; Kitamura, T.; Fukatsu, N.; Fujiwara, Y.; Kitamura, T.; Aoki, Y.; Isshiki, S.; Wasai, K.; Fujiwara, Y.; Chen, Y.-L.; Sun, J.-Q.; Wei, X.; Wong, W.-Y.; Lee, A. W. M.; Wotiz, J. H.; Huba, F.; Himeshima, Y.; Sonoda, T.; Kobayashi, H. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (19), 3461.
- (120) Ankati, H.; Biehl, E. *Microwave-assisted benzyne-click chemistry: preparation of 1H-benzof[d][1,2,3]triazoles*, **2009**, Vol. 50.
- (121) Nguyen, D. M.; Frazer, A.; Rodriguez, L.; Belfield, K. D. *Chem. Mat.* **2010**, *22* (11), 3472-3481.
- (122) Oves-Costales, D.; Kadi, N.; J. Fogg, M.; Song, L.; Wilson, K. S. and; Challis, G. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (27), 8416-8417.
- (123) He, B.; Velaparthi, S.; Pieffet, G.; Pennington, C.; Mahesh, A.; Holzle, D. L.; Brunsteiner, M.; Breemen, R. van; Blond, S. Y.; Petukhov, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *52* (22), 7003-7013.
- (124) Bourguet, E.; Brazhnik, K.; Sukhanova, A.; Moroy, G.; Brassart-Pasco, S.; Martin, A.-P.; Villena, I.; Bellon, G.; Sapi, J.; Nabiev, I. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (4), 1067-1081.
- (125) Gopin, A.; Ebner, S.; Attali, B.; Shabat D. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17* (6), 1432-1440.

Annexes

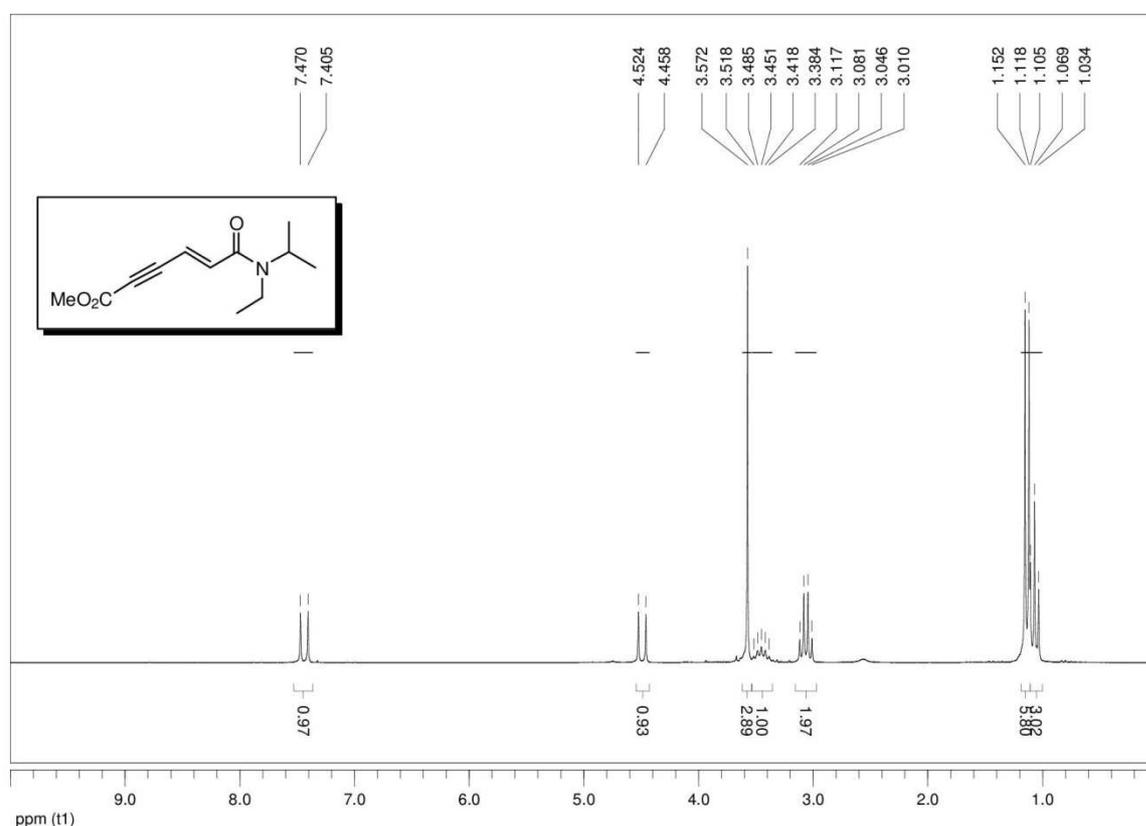
Caractérisation des produits décrits au niveau de la conclusion du Chapitre 2

methyl (E)-6-(ethyl(isopropyl)amino)-6-oxohex-4-en-2-ynoate

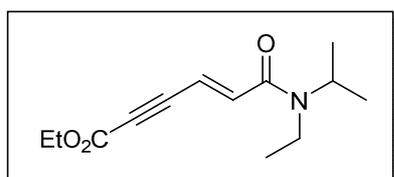


$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.07 (t, J 7.2 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.12 (s, 3H, $\text{CH}_3_{\text{isop}}$), 1.15 (s, 3H, $\text{CH}_3_{\text{isop}}$), 3.06 (q, J 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 3.45 (m, 1H, H_{isop}), 3.57 (s, 3H, O-CH_3), 4.49 (d, J 13.1 Hz, 1H, H_{vinyl}), 7.44 (d, J 13.1 Hz, 1H,

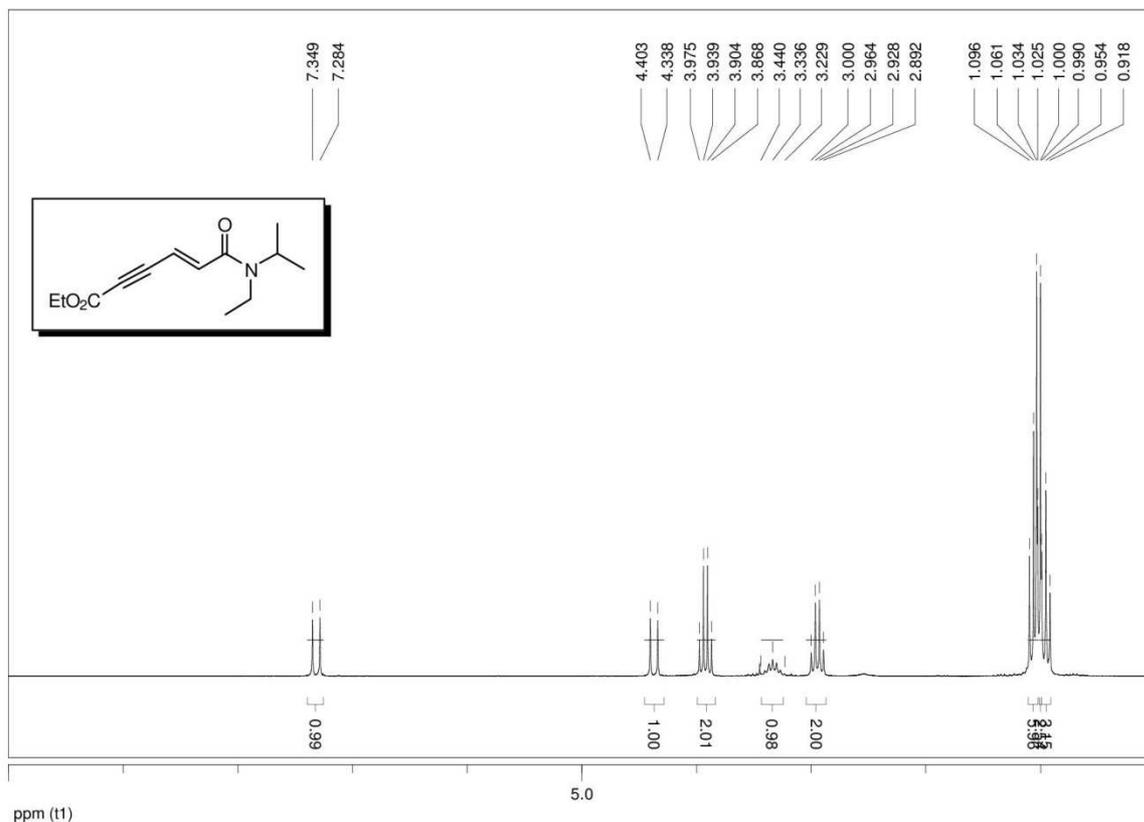
H_{vinyl}).



Ethyl (E)-6-(ethyl(isopropyl)amino)-6-oxohex-4-en-2-ynoate



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ 0.95 (t, J 7.2 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.00 (s, 3H, $\text{CH}_3_{\text{isop}}$), 1.02-1.10 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ and $\text{CH}_3_{\text{isop}}$), 2.95 (q, J 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 3.23-3.44 (m, 1H, H_{isop}), 3.92 (q, J 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.37 (d, J 13.1 Hz, 1H, H_{vinyl}), 7.32 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H, H_{vinyl}).



Publications

Durant ces années passées au sein de l'équipe "molécules bioactives" (stages de Master 1 et 2 et thèse), j'ai eu la chance de participer à différents projets de recherche.

- ✓ Projet de Master 1 : Synthèse et évaluation biologique de nouveaux composés anti-mélanome, en collaboration avec l'équipe du Dr. Stéphane ROCCHI INSERM, Hôpital l'Archet, Nice.
- ✓ Projet de Master 2 : Conception et Synthèse d'Inhibiteurs des Métalloprotéases Gélatinolytiques en collaboration, avec OriBasePharma-Montpellier IRD, Faculté de Pharmacie-Université Montpellier I.
- ✓ Projet de thèse : Synthèse et étude de nouveaux analogues de l'acadésine pour circonvenir les résistances dans les hémopathies malignes, en collaboration avec l'équipe du Dr. Patrick Auberger INSERM, Hôpital l'Archet, Nice et CleveXel Pharma.

Ces différents travaux ont donné lieu à deux publications :

- ✓ **Compounds Triggering ER Stress Exert Anti-Melanoma Effects and Overcome BRAF Inhibitor Resistance** (Cancer Cell 29, 1–15, June 13, 2016, [doi:10.1016/j.ccell.2016.04.013](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.04.013)).
- ✓ **Efficient and selective azidation of per-*O*-acetylated sugars using ultrasound activation: application to the one-pot synthesis of 1,2,3-triazole glycosides** (*New J. Chem.*, 2015,39, 5437-5444, [doi: 10.1039/C5NJ00624D](https://doi.org/10.1039/C5NJ00624D)).

