



HAL
open science

Synthèse de prodrogues bispécifiques activables en milieu hypoxique : application au traitement du chondrosarcome et nouvelles perspectives dans le cadre du cancer de la prostate

Yvain Gerard

► **To cite this version:**

Yvain Gerard. Synthèse de prodrogues bispécifiques activables en milieu hypoxique : application au traitement du chondrosarcome et nouvelles perspectives dans le cadre du cancer de la prostate. Chimie organique. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC092 . tel-02316014

HAL Id: tel-02316014

<https://theses.hal.science/tel-02316014>

Submitted on 15 Oct 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 CLERMONT AUVERGNE

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Chimie Organique et Thérapeutique

Par Yvain GERARD

Synthèse de prodrogues bispécifiques activables en milieu hypoxique : application au traitement du chondrosarcome et nouvelles perspectives dans le cadre du cancer de la prostate

Soutenue publiquement le « 18 décembre 2018 », devant la commission d'examen.

Président du jury :

Pr. Clotilde FERROUD, Equipe Chimie Moléculaire Laboratoire CMGPCE EA 7341, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris

Rapporteurs :

Pr. Sébastien PAPOT, Institut de Chimie des Milieux et des Matériaux de Poitiers UMR-CNRS 7285, Université de Poitiers

Dr. Thomas CAILLY, Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie EA 4258 - FR CNRS 3038 INC3M, Université Caen Normandie

Examineurs :

Pr. Jean-Michel CHEZAL, UMR 1240 IMoST INSERM/Université Clermont Auvergne, Directeur de thèse
Dr. Valérie WEBER, UMR 1240 IMoST INSERM/Université Clermont Auvergne, Co-directeur de thèse
Dr. Elisabeth MIOT-NOIRAUT, UMR 1240 IMoST INSERM/Université Clermont Auvergne

*« Il n'y a point de génie sans un grain de folie »
Aristote*

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

*« Se réunir est un début ; rester ensemble est un progrès ; travailler ensemble est la réussite »
Henry Ford*

*« Happiness can be found even in the darkest of times if one only remembers to turn on the light »
« Words are, in my not-so-humble opinion, our most inexhaustable form of magic »
Albus Perceval Wulfric Bryan Dumbledore*

A Mamie Noëlle

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Pr. Sébastien Papot et le Dr. Thomas Cailly de l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux de thèse et d'avoir pris du temps pour juger ce travail.

Je souhaite ensuite remercier mes directeurs de thèse le Pr. Jean-Michel Chezal et le Dr. Valérie Weber pour m'avoir encadré durant ces trois années de thèse. J'ai énormément appris à vos côtés à tout point de vue. Vous m'avez transmis un savoir scientifique, ainsi qu'une rigueur de travail allant de pair avec un recul sur les résultats obtenus. Soyez en infiniment remerciés.

Je souhaite ensuite remercier le Pr. Clotilde Ferroud et le Dr. Elisabeth Miot-Noirault pour l'honneur que vous me faite d'avoir accepté d'être membre du jury et d'apporter un regard critique à ce travail.

Je souhaite ensuite remercier le Dr. Aurélien Voissière et Mme Elise Maubert pour avoir eu la gentillesse de réaliser les tests de cytotoxicité sur les molécules synthétisées. Je souhaite également remercier les autres membres de l'équipe de ce projet à savoir le Dr. Elisabeth Miot-Noirault, le Dr. Caroline Peyrode, le Dr. Leslie Mazuel ainsi que toutes les autres personnes qui ont participé de près ou de loin à l'avancement de ce projet.

Je souhaite aussi adresser mes remerciements au Dr. Marie-Josèphe Galmier, au Dr. Mercedes Quintana et à M. Sébastien Tarit pour avoir apporté votre expertise sur la partie chimie analytique de ce projet et pour avoir réalisé les expériences de résonance plasmonique de surface.

Je me dois également de remercier le Dr. Magali Vivier et M. Fernand Léal pour les multiples expériences de RMN que vous m'avez aidé à réaliser et au temps que vous y avez consacré. Un second merci à toi Fernand pour les nombreuses acquisitions d'infrarouges réalisées.

J'adresse mes remerciements au Pr. Vincent Gaumet pour les analyses de cristallographie.

Un grand merci à M. Damien Canitrot et à Mme Ariane Baufond pour avoir apporté votre contribution à la production en quantité de certains produits, matières premières indispensables pour la réalisation des synthèses.

Merci à Mme Sophie Besse pour avoir réalisé et également m'avoir initié aux tests de compétition in vitro avec un radioligand.

Un grand merci à M. Laurent Audin pour s'être toujours occupé des multiples problèmes techniques rencontrés et surtout de les avoir résolus.

Je souhaite remercier également Mme Mélanie Rieumaiol et Mme Mouniati Colo, secrétaires gestionnaires de cet établissement d'avoir contribué en partie au bon déroulement de cette thèse.

Je remercie également les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer qui ont tous participer à ce travail de thèse.

Je souhaite enfin remercier l'ensemble du personnel du laboratoire et mes collègues doctorants, pour leur bonne humeur et leur soutien tout au long de ces trois années.

Je souhaite maintenant remercier avec une touche d'originalité les personnes à qui je dois beaucoup en leur offrant un atome particulier :

A toi Valérie, j'offre un atome d'azote pour ta présence et ta disponibilité à chaque instant de cette thèse comme l'est le diazote toujours présent dans l'air, et dans toutes les molécules que j'ai synthétisées. Tu as toujours été là, pour répondre à mes (multiples) interrogations, et même lorsque ça n'allait pas. L'azote est aussi présent de façon quasi-ubiquitaire dans les molécules thérapeutiques, donc en proportions égales à ton savoir dans ce domaine. Tu as su m'en transmettre une grosse partie et je t'en remercie. J'ai aussi choisi l'azote car on peut faire de la RMN avec, et par-dessus tout : de l'infrarouge s'il est lié avec d'autres atomes ! Tes talents en analyse structurale organique resteront pour moi une référence inégalable. Tu m'as également appris en termes de RMN justement (à trouver les dddd pas toujours visibles), d'organisation, de chimie, de management, mais surtout en termes de rédaction. Tu m'as énormément apporté à tout point de vue scientifique comme humain, et je garderais cela comme modèle pour avancer. Sois assuré de mon éternelle reconnaissance et mon profond respect.

A toi Jean-Michel, j'offre un atome d'iode pour le savoir tant chimique, physique ou historique que tu détiens aussi vaste qu'il existe de « radionucléides » de l'iode et de formes stables ou encore de réactions possibles avec cet atome. Je l'ai également choisi car tu m'as définitivement réconcilié avec la radiochimie grâce à lui ! Je te remercie d'avoir été toujours présent durant ces trois années, et ce, même durant les hauts et les bas. Merci également pour ta bonne humeur et pour les diverses discussions sur la mécanistique des réactions tout comme les discussions sur les grands moments de l'Histoire. Ta connaissance, ta façon de travailler et tes qualités humaines sont un modèle que je garderais par la suite. Sois assuré également de mon éternelle gratitude et de mon profond respect.

Vous avez fait de moi le chimiste que je suis, je ne vous oublierai pas c'est une certitude.

A toi Elisabeth je j'offre un atome de technétium 99m. Quoi de mieux pour toi qu'un atome permettant de faire de l'imagerie nucléaire. Je te remercie de m'avoir fait partager ta passion pour la biologie et de m'avoir permis d'assister aux manipulations. Merci également pour toutes ces discussions culinaires, et notamment sur la meilleure façon de faire une tarte au citron.

Pour vous Marie-Jo, un atome de zirconium qui se trouve à côté de l'yttrium « Y », disposition rappelant celle du bureau. Merci pour votre bonne humeur et votre positivisme ainsi que pour votre expertise d'analyste, qui se monnaie aisément avec une sorte particulière de biscuit à l'orange...

Pour toi Sébastien T., un atome d'Osmium qui est le plus dense de la classification, en corrélation des analyses de masse que tu as faite : c'était du lourd ! Merci également pour toutes les discussions autour de ces spectres qui vont de pair avec les cheveux perdus à la gloire des spectres de fragmentation...

Pour vous Vincent et Philippe, un atome de plomb. Un élément lourd qui diffracte bien mieux aux rayons X que le bore, et qui peut être émetteur alpha s'il est numéroté 220. Merci à vous deux d'avoir répondu à mes nombreuses questions respectivement sur la cristallographie et la physique nucléaire.

A toi Laurent, j'offre un atome de germanium, qui a été utilisé pour les premiers transistors pour avoir toujours répondu présent face à mes sollicitations répétées pour des questions techniques et /ou informatiques. Merci d'avoir toujours tout réparé.

A toi Aurélien, j'offre un atome d'or. Le fait que le symbole soit les deux premières lettres de ton prénom y est aussi pour quelque chose. Tu fais parti des amis qui me sont chers et dont l'amitié ne s'oxydéra pas au cours du temps. Tu m'as appris la quasi-totalité de ce que je connais en biologie.

Merci de m'avoir montré chaque type de manipulation que tu faisais et d'avoir pris le temps de m'expliquer. Ton rire si familier et les soirées foot / rugby + canard vont me manquer c'est certain.

A toi Aurélie, j'offre un atome d'oxygène. Et oui sans ta présence indispensable durant ces trois années je n'y serais jamais arrivé. J'ai été ravi de partager cette aventure avec toi. Je pense qu'Harry peut s'aligner côté problèmes, face à ce qu'on a épongé à tour de rôle chez l'un et l'autre. Merci pour ces bons moments passés « Au bureau », durant les parties de badminton endiablées, mais aussi durant ces soirées inoubliables passées ça et là, et notamment la soirée indienne... Je pense qu'on n'oubliera pas cette expérience de sitôt qui sera de surcroît à l'origine de l'amitié qui nous lie.

A toi Elodie, j'offre un atome de fluor et plus spécifiquement un fluor 18. Aussi énergétique que son rayonnement, avec toi tout file droit comme la direction des rayons gamma d'annihilation du positon et de l'électron. Merci pour toutes ces discussions pleines d'idées fabuleuses dont tu as le secret et qu'il faut que tu continues à avoir ! Merci pour ta gentillesse, d'avoir été mon binôme au conseil de labo. Merci pour le réconfort que tu as su m'apporter pendant des périodes troublées. Chère amie, bon courage pour la suite.

Pour toi Ludivine se sera un atome de cuivre qui est un des seuls éléments à posséder un reflet rose de classification périodique. Merci d'avoir été là pendant la période de rédaction et tout le reste. Je passe l'éponge sur le coup du chat et du « Vix » car les petites soirées du vendredi, et la coupe du monde de football ont été d'un grand support psychologique. Je te souhaite bon courage pour la suite et n'hésite pas à appeler, les amis c'est fait pour ça.

A toi Audrey, je ne pouvais qu'offrir un atome d'étain, toi qui l'as manipulé si souvent. Merci d'avoir été comme l'étain sur les colonnes, toujours présente mais contrairement à lui, de façon positive !

A toi Jean-Jacques, j'offre un atome de palladium, qui a souvent été l'atome solution des différentes discussions de chimie constructives que nous avons eu durant ton passage au laboratoire et que j'ai apprécié !

A toi Jianrong, j'offre un atome de Francium, un petit morceau de France pour garder un souvenir depuis la Chine. Je voulais te remercier des bons moments que j'ai passé durant ma première année grâce à toi, qui a apporté une touche asiatique inoubliable à cette aventure.

Pour toi Donia, je voudrais offrir un atome de scandium, se trouvant à côté de l'yttrium, comme nos sorbones au labo. Merci pour ces discussions philosophiques à refaire le monde pendant les colonnes, ta gentillesse, mais aussi pour les pâtisseries de Tunisie dont tu m'as fait cadeau et qui sont exquises !

A toi Tiffany, un atome de lithium, qui est certes de petite taille mais tout aussi important pour les réactions chimiques. Merci pour ces nombreux barbecues qui m'ont franchement remonté le moral.

A tous mes professeurs de l'IUT et plus particulièrement à Gilles André, Jean-Marie Melot et Fabrice Lallemand je souhaiterais offrir un atome de Copernicium découvert en 2012 quand j'étais à Besançon. Merci d'avoir posé des bases solides de chimie organique qui m'ont permis de poursuivre mes études.

A mes professeur de l'école de chimie, et plus particulièrement à Isabelle Ripoché, Pierre Chalard, Yves Troin et Jean-Philippe Roblin ainsi que le reste des enseignants de la COFI, je vous offre un atome d'argon. Vous m'avez permis d'approfondir l'apprentissage de la matière qui me passionne : la chimie organique. A l'instar de l'argon qui a sa couche électronique pleine, vous avez complété mon savoir pour que je puisse aborder cette thèse avec des bases solides. Mention spéciale pour toi Isa qui a toujours été là pour me remonter le moral !

Je souhaiterais offrir un atome d'Oganesson qui est le dernier élément du tableau, et le plus gros, à partager avec tous les gens que j'ai rencontré durant mes stages et sans qui je n'aurais pas pu atteindre cet objectif : la thèse. Vous m'avez tant appris, à tous les niveaux, faisant partie intégrante de ma formation qui une fois de plus m'a permis d'aborder cette thèse avec des connaissances diverses. Merci à Richard D., Maryline B., Yann B., Sandrine P., Ross W. B., Francesca B., Lauren T., Cinzia S., Hugette S., Louis A., Guy E., Bernard G., Mikäël L. M., Jean-Robert L., Pierre P., Alain D., Myriam C., Richard C., Emma D., Gérardine R., et le reste du service SDSP qui se reconnaîtront.

Je voudrais offrir à mes amis que je n'ai pas encore cité, un atome d'hydrogène. Le plus petit certes mais le plus indispensable. Tout comme lui avec ces liaisons du même nom qui maintiennent des structures moléculaires en ordre, si vous n'aviez pas été là, je n'y serais pas arrivé. A vous mes amis d'enfance : Amélie M., Arnaud et Emilie ; à vous que j'ai rencontré à l'IUT : Romain M., Guillaume et Aymeric ; et à vous que j'ai rencontré à l'école : Amélie H., Marion K., Quentin, Greg, Maxence, Vassili, Thomas S., Thomas P. et Marion G. (maintenant P.G.), Romain J., Laure V, et ceux que je n'ai pas cité : MERCI ! Remonter le moral, danser, voyager, « s'hydrater », délirer et j'en passe mais surtout partager : voilà ce que nous avons fait durant ces années. Votre soutien durant ces trois ans n'a pas de prix. Vous serez toujours « là », entre le ventricule gauche et l'oreillette droite !

Une petite mention spéciale, à vous Thomas et Marion à qui, en plus d'un atome d'hydrogène, j'offre la variante plus énergétique : un atome de tritium. Heureusement que vous étiez là ce « soir-là » avec un bon pain d'épice au chocolat et une infusion à la cannelle, qui n'ont eu et n'auront pas de prix à mes yeux. Merci également pour ces nombreuses invitations qui m'ont donné une bouffée d'air dans les moments difficiles.

Un soutien qui n'a pas de prix aussi est celui de la famille. Je tiens à remercier la famille Paul dans son entier : Céline, Wyatt, Vincent, Jérémy et Maëlys à qui j'offre un atome d'hélium. Et oui isolé dans un coin du tableau, votre foyer aura été un petit coin de paradis précieux durant ses six dernières années. Tout comme l'hélium est un gaz de faible densité, on se sent plus léger en votre compagnie. Je ne sais pas s'il existe un mot assez fort pour exprimer ce que vous m'avez apporté mais soyez sur que vous serez toujours « là ».

Dans le jeu des sept familles reste mes grands-parents et mes parents. Je voulais remercier mes grands-parents d'avoir été là, et de m'avoir transmis leur amour et leur savoir-faire. Tous habiles de leurs mains dans un domaine qui leur est propre, je vous suis infiniment reconnaissant de m'avoir donné cette capacité, qui est obligatoire dans le métier de chimiste. Je vous aime et vous offre un atome de bore qui a été une des clés de ma thèse.

Et enfin j'offre un atome de rhodium à mes parents. Ce métal, le plus cher de la classification périodique qui ne s'oxyde jamais à l'air, est pour vous. Je vous suis infiniment reconnaissant de m'avoir élevé avec des valeurs et avec l'amour de deux parents. Vous m'avez transmis également ce « gène manuel » dont vous avez hérité de vos parents. Vous m'avez soutenu dans absolument toutes, et j'ai bien dit toutes les circonstances, et particulièrement durant ces trois ans de thèse. Je ne pourrais jamais assez vous remercier de votre présence bienveillante si ce n'est pas vous dire ô combien je vous aime.

Je n'ai pas oublié. Je ne t'ai pas oublié, ni oublié la promesse que je t'avais faite. Il reste un atome : le phosphore. Pilier central de cette thèse, il est pour toi mamie Noëlle. Tout comme toi, il est toujours sur son 31. Tu m'avais dit d'aller au bout et de ne rien lâcher. Ce ne fut pas sans mal mais je sais que tu étais et que tu seras toujours là pour veiller sur moi et me soutenir. Tu es malheureusement partie tôt. Mais pas de hasard : tu es partie un 18, je soutiens un 18, la boucle est bouclée et ma promesse sera finalement tenue. Cette thèse est pour toi, je te la dédie et sache que je t'aimerais toujours « ma mamie d'amour ».

Soutiens

Cette thèse a bénéficié d'un financement ministériel par le biais d'une allocation doctorale sur la période 2015-2018.

Ces travaux ont bénéficié du soutien de la ligue nationale contre le cancer, région auvergne : « Développement d'une méthode d'imagerie innovante contrastant les caractéristiques du micro-environnement du chondrosarcome : diagnostic et suivi de nouvelles prodrogues bispécifiques » pour la période 2016/2019 (R1614CC/RAB16025CCA).

Ce travail bénéficie également d'un soutien *via* un projet de recherche translationnel PRT-K : INCa-DGOS, D-TECT ; « Towards an innovative Diagnostic and Therapeutic approach of Chondrosarcoma by Targeting proteoglycans » pour la période 2015-2018.

Une partie des travaux de cette thèse ont été soutenus par l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP) : « Développement de prodrogues bispécifiques ciblant le PSMA pour le traitement ciblé du cancer de la prostate » sur la période 2018-2019

Liste des publications

Aurélien Voissière, Valérie Weber, **Yvain Gérard**, Françoise Rédini, Florian Raes, Jean-Michel Chezal, Françoise Degoul, Caroline Peyrode, Elisabeth Miot-Noirault, « Proteoglycan-Targeting Applied to Hypoxia-Activated Prodrug Therapy in Chondrosarcoma: First Proof-of-Concept », *Oncotarget*, **2017**, 8 (56)

Donia Ghedira, Aurélien Voissière, Caroline Peyrode, Jamil Kraiem, **Yvain Gérard**, Elise Maubert, Magali Vivier, Elisabeth Miot-Noirault, Jean-Michel Chezal, Farhat Farhat, Valérie Weber, « Structure-Activity Relationship Study of Hypoxia-Activated Prodrugs for Proteoglycan-Targeted Chemotherapy in Chondrosarcoma », *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 158, 51–67.

Liste des communications

Communications orales

Yvain GERARD, Aurélien VOISSIERE, Françoise REDINI, Caroline PEYRODE, Françoise DEGOUL, Jean-Michel CHEZAL, Elisabeth MIOT-NOIRAUT, Valérie WEBER, Targeted hypoxia-activated phosphoramidate mustards toward tumor proteoglycans in chondrosarcoma, **26^{èmes} GP2A (Group of Medicinal Chemists of the Atlantic Arc) et 32^{èmes} JFB (Journées franco-belges de chimie thérapeutiques)**, Asnelles sur mer, du 06-08 Juin **2018**

Aurélien VOISSIERE, Valérie WEBER, **Yvain GERARD**, Marie FORTANIER, Donia GHEDIRA, Françoise DEGOUL, Jean-Michel CHEZAL, Françoise REDINI, Caroline PEYRODE, Elisabeth MIOT-NOIRAUT, Intérêt d'une approche thérapeutique associant chimiothérapie et radiothérapie dans la prise en charge du chondrosarcome, **19^{èmes} Journées de l'école doctorale EDSVSAE**, Clermont Ferrand, 1^{er}-2 Juin **2016**

Communications affichées

Yvain GERARD, Aurélien VOISSIERE, Françoise REDINI, Caroline PEYRODE, Françoise DEGOUL, Jean-Michel CHEZAL, Elisabeth MIOT-NOIRAUT, Valérie WEBER, Targeted hypoxia-activated phosphoramidate mustards toward tumor proteoglycans in chondrosarcoma, **26^{èmes} GP2A (Group of**

Medicinal Chemists of the Atlantic Arc) et 32^{èmes} JFB (journées franco-belges de chimie thérapeutiques), Asnelles sur mer, du 06-08 Juin 2018

Elise MAUBERT, Aurélien VOISSIERE, Emmanuel CHAUTARD, Véronique DEDIEU, **Yvain GERARD**, Valérie WEBER, Elisabeth MIOT-NOIRAUULT, Intérêt d'une approche thérapeutique associant chimiothérapie et radiothérapie dans la prise en charge du chondrosarcome, **21^{èmes} Journées de l'école doctorale EDSVSAE, Clermont Ferrand, 14-15 Juin 2018**

Elise MAUBERT, Aurélien VOISSIERE, Flora PONELLE CHACHUAT, Yannick BIDET, Sandrine VIALA, Caroline PEYRODE, Valérie WEBER, **Yvain GERARD**, Jean-Michel CHEZAL, Françoise DEGOUL, Elisabeth MIOT-NOIRAUULT, Intérêt d'une approche thérapeutique ciblant la matrice extra-cellulaire et l'hypoxie pour la prise en charge du chondrosarcome, **13^{ème} Forum de la recherche en cancérologie du CLARA, 3-4 Avril 2018**

Leslie MAZUEL, Roxane AUTISSIER, Elise MAUBERT, Aurélien VOISSIERE, Valérie WEBER, **Yvain GERARD**, Sophie BESSE, Jean-Marie BONNY, Elisabeth MIOT-NOIRAUULT, Caroline PEYRODE, Guilhem PAGES, CEST MRI to contrast chondrosarcoma tumors: two contrasts in one acquisition, **European Molecular Imaging Meeting 2018, 20-23 Mars 2018**

Valérie WEBER, Aurélien VOISSIERE, Fernand LEAL, **Yvain GERARD**, Françoise DEGOUL, Jean-Michel CHEZAL, Caroline PEYRODE, Elisabeth MIOT-NOIRAUULT, A new promising therapeutic strategy for chondrosarcoma: *Targeted hypoxia-activated phosphoramidate mustards toward tumor proteoglycans*, **53^{èmes} Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutiques (RICT), Toulouse, 05-07 Juillet 2017**

Valérie WEBER, Aurélien VOISSIERE, Fernand LEAL, **Yvain GERARD**, Françoise DEGOUL, Jean-Michel CHEZAL, Caroline PEYRODE, Elisabeth MIOT-NOIRAUULT, A new promising therapeutic strategy for chondrosarcoma: *Targeted hypoxia-activated phosphoramidate mustards toward tumor proteoglycans*, **SyCOCAL X, Clermont-Ferrand, 29-31 août 2016**

Encadrements de stages

Amélie HODASAVA et Florian KERSAUDY : 3^{ème} année école d'ingénieur chimiste SIGMA Clermont (3 semaines), *Synthèse de nouvelles molécules pour le développement d'une thérapeutique innovante du chondrosarcome, cancer du cartilage, 2016*

Nadia TAFOUKT : 2^{ème} année IUT chimie de Besançon (10 semaines), *Synthèse de prodrogues bispécifiques exploitant le microenvironnement du cartilage dans le cadre du développement d'une thérapie anticancéreuse, 2016*

Lysa COURTIAL : 3^{ème} année de pharmacie, Université d'Auvergne (2 mois), *Synthèse de prodrogues anticancéreuses réduites en milieu hypoxique possédant une fonction ammonium quaternaire dans le cadre d'une chimiothérapie vectorisée vers le chondrosarcome, 2016*

Maxence HOLTZRITTER et Vassili PRUDHOMME : 3^{ème} année école d'ingénieur chimiste SIGMA Clermont (3 semaines) : *Utilisation de ligands de PSMA dans une approche thérapeutique de prodrogues activables en milieu hypoxique dans le cas du cancer de la prostate, 2017*

Chérubin N'GOUALI : Master 2 Science du médicament, Université Clermont Auvergne (5 mois), *Synthèse de prodrogues activables en milieu hypoxique dans le cadre d'une approche thérapeutique bispécifique en cancérologie, 2017*

Sommaire

Introduction générale	1
-----------------------------	---

Introduction bibliographique	3
------------------------------------	---

I. Le chondrosarcome : généralités, diagnostic et traitements.....	3
A. Epidémiologie de la pathologie.....	3
B. Classification des chondrosarcomes	4
1. Classification histologique	5
a. Les chondrosarcomes conventionnels	5
b. Les chondrosarcomes non conventionnels	6
2. Classification anatomique	7
3. Classification primaire <i>versus</i> secondaire	8
C. Microenvironnement du chondrosarcome : protéoglycanes et hypoxie	8
1. Les protéoglycanes	8
2. L'hypoxie tumorale.....	11
D. Diagnostic de la pathologie.....	15
E. Traitements pour la prise en charge du chondrosarcome	16
II. Le concept de prodrogue	20
A. Intérêt des prodrogues	22
1. Formulation et administration : importance de l'hydrosolubilité.....	22
2. Absorption	24
3. Métabolisme et distribution.....	27
4. Toxicité	30
B. Les prodrogues vectorisées en cancérologie	31
1. Les différents espaceurs.....	32
a. Espaceurs basés sur une élimination par délocalisation électronique.....	33
b. Espaceurs basés sur la cyclisation	35
c. Espaceurs mixtes.....	36
2. Les différentes méthodes d'activation : « les gâchettes »	37
a. Une catalyse enzymatique.....	37
b. Le pH acide	38
c. Les espèces réactives de l'oxygène.....	41

d. Le glutathion.....	43
e. L'hypoxie.....	44
3. Les différents vecteurs	44
a. Vectorisation passive vers les cellules cancéreuses	45
b. Vectorisation active vers les cellules cancéreuses	47
i. Des ligands de bas poids moléculaire.....	47
(1) Les ligands des récepteurs à l'acide folique.....	47
(2) Les ligands des transporteurs du glucose	49
(3) Les ligands du PSMA.....	49
ii. Des ligands de haut poids moléculaire : les anticorps.....	53
III. Les prodrogues activables en situation d'hypoxie	55
A. Les quinones.....	57
B. Les <i>N</i> -oxydes.....	59
1. Les <i>N</i> -oxydes aromatiques	59
2. Les <i>N</i> -oxydes aliphatiques	60
C. Les nitro-aromatiques	61
1. PR-104	62
2. TH-302	64
D. Nouvelles HAP libérant des effecteurs autres que des agents responsables de dommages à l'ADN.....	65
1. HAP basées sur des chimiothérapies classiques autres qu'alkylantes.....	65
2. HAP basées sur des inhibiteurs de kinases.....	67
3. HAP vectorisée.....	68

Objectifs 69

Résultats et discussion 77

I. Approche rétrosynthétique pour l'obtention des prodrogues activables en hypoxie et ciblant les protéoglycanes.....	77
A. Méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour l'obtention de dérivés <i>N,N</i> -bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate (type cyclophosphamide).....	79
B. Méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour l'obtention de dérivés de type <i>N,N,N',N'</i> -tétrakis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate	80
C. Méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour l'obtention de dérivés <i>N,N'</i> -bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate (type ifosfamide).....	81
II. Synthèse des moutardes organophosphorées.....	84

A. Synthèse du dichlorure de l'acide <i>N,N</i> -bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique 1	85
B. Synthèse de chlorure de l'acide <i>N,N,N',N'</i> -tétrakis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidique 2	86
C. Synthèse l'acide <i>N,N'</i> -bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidique 3	88
1. Hydrolyse d'un chlorure d'acide phosphorodiamidique (méthode 8).....	88
2. Hydrogénation d'un ester phosphorodiamidate (méthode 9).....	90
III. Voies d'accès envisagées pour l'obtention de dérivés de type 1-alkyl-5-hydroxyméthyl-2-nitroimidazoles : synthèse des composés 12 et 22	92
1. Fonctionnalisation en position 5 d'un imidazole disubstitué en 1,2 (voie A)	93
2. Fonctionnalisation en position 2 d'un imidazole disubstitué en 1,5 (voie B)	93
3. Fonctionnalisation en position 1 d'un imidazole disubstitué en 2 et 5 (voie C)	94
4. Synthèse <i>de novo</i> du cycle imidazole (voie D).....	95
IV. Synthèse du précurseur 12	98
A. Estérification de la sarcosine.....	98
B. <i>N</i> -Formylation, <i>C</i> -formylation, <i>N</i> -déformylation et cyclisation de Marckwald à partir du composé 8-HCl.....	98
C. Nitration par diazotation du composé 9	103
D. Réduction de l'ester 11 en alcool 12.....	104
1. Réduction avec le borohydrure de sodium (voie A).....	105
2. Réduction avec le borohydrure de lithium (voie B)	105
3. Réduction via le passage par l'acide carboxylique (voie C).....	107
V. Synthèse de l'alcool 22	108
A. Synthèse du précurseur <i>N</i> -[3-(<i>N,N'</i> -diméthylamino)propyl]glycinate d'éthyle 16.....	108
B. <i>N</i> -formylation de l'amine secondaire 16.....	109
C. Obtention de l'imidazole 20 par cyclisation de Marckwald	109
D. Introduction du groupement nitro sur l'aminimidazole 20 par diazotation	110
E. Réduction de l'ester 21.....	110
VI. Synthèse des prodrogues avec le vecteur en position <i>N</i> -1 de l'imidazole.....	118
A. Synthèse du phosphorodiamidate 26	118
B. Synthèse du phosphorodiamidate 27	120
C. Synthèse du phosphorodiamidate 29	124
D. Éléments de déterminations structurales.....	130
E. Dissociation des complexes de bore des phosphorodiamidates et quaternisation.....	131
VII. Synthèse des prodrogues avec le vecteur en position <i>C</i> -4 de l'imidazole	137
A. Synthèse de l'alcool 42.....	137
1. Réaction de bromation électrophile du composé 12.....	137

2. Réaction de couplage de Stille avec le composé 36.....	138
3. Protection de l'alcool 36.....	140
4. Réaction de couplage de Stille avec le composé 39.....	141
5. Obtention du dérivé 42.....	142
a. Voie 1 : déprotection du composé 40 puis réduction.....	142
b. Voie 2 : réduction du composé 40 puis déprotection.....	144
B. Réactions de phosphorylation et de quaternisation.....	146
1. Synthèse des ammoniums quaternaires 44 et 46 à partir des alcools 38 et 42.....	146
2. Caractérisation structurale des composés 43 et 45.....	147
3. Synthèse de l'ammonium quaternaire 48.....	151
4. Synthèse de l'ammonium quaternaire 50.....	152
VIII. Etudes de stabilité et de clivage des prodrogues synthétisées, de leur d'affinité <i>in tubo</i> pour l'aggrécane et de leur cytotoxicité <i>in vitro</i>	155
A. Etude de la stabilité et du clivage des prodrogues par réduction chimique monitorée par RMN ³¹ P.....	155
B. Etude de l'affinité des prodrogues pour l'aggrécane par SPR.....	159
C. Etude de l'activité cytotoxique des prodrogues.....	162
D. Etude de stabilité et du clivage des prodrogues par réduction enzymatique.....	164
IX. Application du concept de HAP vectorisées pour le cancer de la prostate.....	165
A. Rappel bibliographique sur le cancer de la prostate.....	165
B. Objectifs.....	169
C. Synthèse des molécules envisagées.....	173
1. Synthèses de la molécule 58.....	173
2. Synthèse des molécules possédant un espaceur triazolique.....	178
3. Synthèse de la molécule 66.....	179
4. Synthèse de la molécule 67.....	181
D. Etude de stabilité et de clivage de la prodrogue 66 par réduction enzymatique.....	183
E. Etude de l'affinité de la prodrogue 66 pour le PSMA.....	183
F. Etude de l'activité cytotoxique de la prodrogue 66.....	185

Conclusion et perspectives 187

I. HAP vectorisées vers la matrice extracellulaire du chondrosarcome.....	187
II. HAP vectorisées vers le PSMA surexprimé dans l'adénocarcinome prostatique.....	189

Partie expérimentale..... 191

I. Synthèse chimique	191
II. Etude de stabilité et de clivage chimique des prodrogues par RMN ³¹ P.....	266
III. Etude du clivage enzymatique des prodrogues	267
IV. Etude de cytotoxicité des prodrogues	268
A. Culture des cellules tumorales.....	268
B. Protocole de l'étude de cytotoxicité des prodrogues	268
V. Protocole de l'étude de compétition des prodrogues pour l'antigène PSMA.....	269

Références bibliographiques..... 271

Liste des figures

Figure 1: Incidence des tumeurs osseuses par rapport à l'âge (données pour le Royaume Uni)	3
Figure 2: Localisation des principaux chondrosarcomes conventionnels	4
Figure 3: Caractéristiques histologiques des chondrosarcomes conventionnels en fonction des différents degrés de malignité (adapté de Kim <i>et al.</i>).....	5
Figure 4: Courbe de survie globale de patients atteint de chondrosarcome de grade I, II, ou III (adapté de Angelini <i>et al.</i>).....	6
Figure 5: Coupes histologiques de chondrosarcomes non conventionnels : (A) dédifférenciés ; (B) mésoenchymateux ; (C) à cellules claires ; (D) du périoste (adapté de Kim <i>et al.</i> et de Cleven <i>et al.</i>)	7
Figure 6: Coupes d'os atteints d'un chondrosarcome conventionnel central ou périphérique (adapté de Rozeman <i>et al.</i>).....	8
Figure 7 : Image de microscopie électronique et représentation schématique de l'aggrécane (adapté de Fox <i>et al.</i> et de Jerosch J.).....	10
Figure 8 : Coupes histologiques de différentes tumeurs du cartilage après coloration au bleu de toluidine des GAGs (A-C) ou révélation par immunohistochimie de l'aggrécane (D-F) (adapté de Aigner <i>et al.</i>)	11
Figure 9: Hypoxie chronique ou aiguë et influence sur la pression en oxygène dans les tissus (adapté de Horsman <i>et al.</i>).....	12
Figure 10: Représentation des différentes zones d'oxygénation d'une tumeur (adapté de Yeom <i>et al.</i>)	12
Figure 11 : Voie de signalisation du facteur de transcription HIF-1 dans une cellule en normoxie ou en hypoxie	13
Figure 12 : Effets provoqués ou régulés par HIF-1 dans les tumeurs en hypoxie	14
Figure 13 : Courbe de Kaplan-Meier de survie des patients atteints de chondrosarcome selon l'expression de HIF-1 α dans les tumeurs	14
Figure 14 : Imagerie d'un chondrosarcome central de faible grade (adapté de Douis et Saifuddin) ...	15
Figure 15 : Ensemble des barrières rencontrées par une substance active après son administration au sein d'un organisme (adapté de Kerns <i>et al.</i>).....	20
Figure 16 : Illustration simplifiée du concept de prodrogue.....	21
Figure 17 : Activation de la méthénamine dans les urines en milieu acide	21
Figure 18 : Principales voies de transports membranaires des substances actives.....	24
Figure 19 : Ensemble des fonctions chimiques de la substance active (vert) généralement modifiées pour concevoir une prodrogue (jaune) (adapté de Rautio <i>et al.</i>)	25
Figure 20 : Structures de prodrogues conçues pour pallier à des problèmes de métabolisation, de distribution et de durée d'action de la substance active	29
Figure 21 : La capecitabine, un exemple de prodrogue utilisée en oncologie afin de diminuer la toxicité de l'agent cytotoxique.....	30
Figure 22 : Site d'action des principaux agents anticancéreux utilisés en clinique.....	31

Figure 23 : Structures de prodrogues utilisant deux espaceurs clivables combinés.....	36
Figure 24 : Structures de prodrogues substrats d'enzymes surexprimées au sein de la tumeur	38
Figure 25 : Structures de prodrogues possédant une liaison hydrazone clivable en milieu acide	40
Figure 26 : Structures de prodrogues possédant une fonction acétal, dithiocarbamate ou dérivée de l'acide maléique clivables en milieu acide	41
Figure 27 : Structures de prodrogues possédant un ester d'acide boronique clivées par les ROS.....	42
Figure 28 : Mécanisme proposé d'activation des prodrogues d'oxazolidinone par le peroxyde d'hydrogène	43
Figure 29 : Structures de prodrogues possédant un pont disulfure activées par le GSH	43
Figure 30 : Structures de prodrogues possédant un motif diazénium diolate activées par le GSH.....	44
Figure 31 : Principe de l'effet EPR assurant un enrichissement passif de nano-objets au niveau tumoral (adapté de Loureiro <i>et al.</i>).....	45
Figure 32 : Structures de prodrogues utilisant l'effet EPR	46
Figure 33 : Structures de prodrogues conjuguées à l'acide folique ayant fait l'objet d'études cliniques ou précliniques	48
Figure 34 : Structures de prodrogues glycoconjuguées dans une stratégie de vectorisation utilisant les transporteurs GLUT-1.....	49
Figure 35 : Site actif du récepteur PSMA contenant un ligand de type urée	50
Figure 36 : Structure du NAAG et identification du pharmacophore.....	50
Figure 37 : Structure de ligands phosphorés du PSMA (valeurs de K_i et Cl_{50} mesurées par inhibition de l'enzyme PSMA purifiée)	51
Figure 38 : Structures de ligands thiolés du PSMA.....	51
Figure 39 : Structures de ligands de type urée du PSMA	52
Figure 40 : Structures de prodrogues vectorisées utilisant un ligand du PSMA	53
Figure 41 : Structures de prodrogues liées à un anticorps (ADC) commercialisées.....	54
Figure 42 : Mécanismes d'activation mono ou di électronique des HAP (adapté de Wardman)	56
Figure 43: Mécanismes de bioréduction des quinones (adapté de Chen <i>et al.</i>).....	57
Figure 44: Mécanisme d'alkylation de l'ADN par bioréduction des dérivés de la Mitomycine C (d'après Colucci <i>et al.</i>)	58
Figure 45: Structure de la porphiriomycine et de l'apaziquone (EO9).....	58
Figure 46: Mécanisme d'activation de la TPZ par réduction mono-électronique (adapté de Chen <i>et al.</i>)	59
Figure 47: Structures de la TPZ et de deux de ses dérivés : SN-30000 et SN-29751.....	60
Figure 48: Mécanisme d'activation de AQ4N.....	61
Figure 49 : Structure de la molécule OCT1002.....	61
Figure 50: Processus de déclenchement d'une prodrogue après réduction utilisant un groupement nitro-(hétéro)aromatique comme activateur	62

Figure 51: Intermédiaires obtenus après réduction à 1 ou 2 électrons de dérivés nitro-aromatiques (adapté de Patterson <i>et al.</i>)	62
Figure 52: Mécanisme d'activation de PR-104 (adapté de Phillips).....	63
Figure 53: Mécanisme d'activation de TH-302.....	64
Figure 54 : Colocalisation de la radioactivité issu du [¹⁴ C]-TH-302 et des traceurs de l'hypoxie.....	64
Figure 55 : Structure de HAP de SN-38 utilisant le 2-nitroimidazole comme gâchette	66
Figure 56 : Utilisation de la gâchette 2-nitroimidazole pour une libération contrôlée via un mécanisme de cyclisation intramoléculaire	66
Figure 57 : Structures de HAP de la gemcitabine et de la doxorubicine utilisant le 2-nitroimidazole comme gâchette via un mécanisme de cyclisation intramoléculaire	66
Figure 58 : Structures de prodrogues du paclitaxel ou du SN-38 utilisant le 2-nitroimidazole comme gâchette par cyclisation intramoléculaire	67
Figure 59: Mécanisme d'activation de la prodrogue TH-4000.....	67
Figure 60 : HAP d'inhibiteurs de protéine kinases	68
Figure 61 : Structure d'une HAP vectorisée	68
Figure 62 : Suivi par imagerie nucléaire de rats porteurs de chondrosarcome (SWARM) après injection par voie intraveineuse de la molécule ^{99m} Tc-15-5 ou ^{99m} Tc-NTP 15-5 (adapté de Peyrode <i>et al.</i>).....	70
Figure 63 : A : Structure du melphalan et du melphalan ammonium quaternaire ; Analyse de l'étude de thérapie après traitement avec le melphalan ou le melphalan ammonium quaternaire de rats porteurs d'un chondrosarcome SWARM	71
Figure 64 : Résultats de l'étude de biodistribution des dérivés melphalan et melphalan ammonium quaternaire marqués au tritium.....	71
Figure 65 : CI ₅₀ des molécules <u>ICF05016</u> , <u>ICF05017</u> et <u>ICF05014</u> réalisées sur cultures 2D de cellules H-EMC-SS en condition de normoxie et d'hypoxie	73
Figure 66 : Résultats de l'étude in vivo des molécules <u>ICF05016</u> , <u>ICF05017</u> et <u>ICF05014</u> sur modèle murin de xénogreffe de cellule H-EMC-SS	74
Figure 67 : Analyse anatomopathologique du cartilage sain de l'articulation du genou chez la souris, 24 heures après la dernière dose de <u>ICF05016</u>	75
Figure 68 : Projet de pharmacomodulation de la molécule hit <u>ICF05016</u> et positionnement des objectifs de thèse dans ce contexte	76
Figure 69 : Rétrosynthèse envisagée pour l'obtention des prodrogues <u>33</u> , <u>34</u> , <u>35</u> , <u>46</u> , <u>48</u> et <u>50</u>	78
Figure 70 : Rétrosynthèse générale des moutardes organophosphorées <u>1</u> , <u>2</u> et <u>3</u>	85
Figure 71 : Suivi cinétique par RMN ³¹ P de la formation du dérivé phosphorodiamidique <u>2</u>	87
Figure 72 : Conditions réalisées au laboratoire pour la synthèse du composé <u>2</u> à partir du composé <u>1</u> ou de l'oxychlorure de phosphore	87
Figure 73 : Suivi cinétique par RMN ³¹ P de la formation de l'intermédiaire chloré et de son hydrolyse pour donner le composé <u>3</u>	89

Figure 74 : Conditions de la littérature permettant l'accès au composé 12 (d'après de Figueiredo <i>et al.</i> et Jin <i>et al.</i>)	97
Figure 75 : Spectre RMN ¹ H d'un mélange d'esters méthylique et éthylique dénités, sous-produits de la réduction du composé 11	106
Figure 76 : Structure du composé 23 issu de la dégradation spontanée du dérivé 21 dans le milieu de réduction	111
Figure 77 : Spectre ¹ H- ¹³ C HSQC du composé 23	112
Figure 78 : Spectres RMN ¹ H de l'ester 21 et des deux autres produits isolés après réduction.....	113
Figure 79 : Spectre de masse de la fraction apolaire	114
Figure 80 : Structure cristallographique du composé 22-BH₃	115
Figure 81 : Suivi cinétique par RMN ³¹ P de la réaction de couplage pour l'obtention du phosphorodiamidate 26	119
Figure 82 : Suivi cinétique par RMN ³¹ P de la réaction de couplage pour l'obtention du phosphorodiamidate 26-BH₃	120
Figure 83 : Suivi cinétique par RMN ³¹ P de la réaction de phosphorylation donnant accès au phosphorodiamidate 27	121
Figure 84 : Extrait du spectre de masse du produit obtenu après purification du composé 27	122
Figure 85 : Suivi cinétique par RMN ³¹ P de la réaction de phosphorylation du complexe 22-BH₃ à partir du composé 2	123
Figure 86 : Comparaison des spectres RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 126 MHz) de l'alcool 22-BH₃ et de son dérivé chloré.....	128
Figure 87 : Structure cristallographique du complexe DMAP-BH₃	128
Figure 88 : Structure proposée du sous-produit phosphoré 32 obtenu lors de la phosphorylation par l'oxychlorure de phosphore du composé 29-BH₃	129
Figure 89 : Caractéristiques spectrales en RMN ¹ H, ¹³ C et ³¹ P des composés de la série <i>N</i> -1.....	131
Figure 90 : Suivi cinétique par RMN ³¹ P de la réaction de déprotection du composé 27-BH₃ dans l'éthanol à 50 °C.....	132
Figure 91 : Spectre RMN ³¹ P après dissociation en milieu acide du complexe 27-BH₃	133
Figure 92 : Spectre RMN ¹ H du brut réactionnel résultant de l'hydrolyse acide du composé 26-BH₃	134
Figure 93 : Agrandissements des spectres RMN ¹ H du composé 37 pour l'isomère (<i>Z</i>), l'isomère (<i>E</i>) et le mélange (<i>Z</i>) et (<i>E</i>)	139
Figure 94 : Agrandissement du spectre RMN ³¹ C du composé (E)-37	140
Figure 95 : Suivi cinétique par RMN ³¹ P de la réaction de phosphorylation pour l'obtention du phosphorodiamidate 43	147
Figure 96 : Caractéristiques spectrales RMN ¹ H, ¹³ C et ³¹ P des composés 43 et 45	148
Figure 97 : Structure cristallographique du composé 42-BH₃	150
Figure 98 : Stabilité et cinétique de clivage monitorées par RMN ³¹ P du composé 46	156

Figure 99 : Evolution du pourcentage de prodrogue en fonction du temps en présence de dithionite de sodium (3,0 éq.) dans du tampon cacodylate à pH = 7,4, à 37 °C.....	157
Figure 100 : Structure des prodrogues des trois moutardes phosphorodiamidiques avec une gâchette de type 4-nitrobenzyle	158
Figure 101 : Evolution du pourcentage des prodrogues 35 et 57 en fonction du temps en présence de dithionite de sodium (3,0 éq.) dans du tampon cacodylate à pH = 7,4, à 37 °C.....	158
Figure 102 : Cinétique de clivage monitorées par RMN ³¹ P des composés 35 et 57 et spectre de l'acide 3 de référence	159
Figure 103 : Principe de la résonance plasmonique de surface.....	160
Figure 104 : Allure d'un sensorgramme typique obtenue avec une analyse SPR (adapté de Cooper) ³⁶³	161
Figure 105 : Sensorgramme des différentes prodrogues évaluées par SPR vis à vis de l'aggrécane..	161
Figure 106 : Sensorgrammes obtenus suite à l'analyse SPR de l'ammonium quaternaire 48 à différentes concentrations	162
Figure 107 : Cl ₅₀ des prodrogues ICF05016 , 33 , 34 , 35 , 44 , 46 , 48 et 50 en normoxie et en hypoxie sur cellules H-EMC-SS en 2D.....	163
Figure 108 : Evolution du pourcentage de prodrogue en fonction du temps en présence de nitroréductase et de NADPH à 37 °C dans le PBS.....	164
Figure 109 : Représentation de l'architecture tissulaire, et coupes histologiques associées aux différents grades de Gleason (adapté de Harnden <i>et al.</i>).....	166
Figure 110 : Arbre décisionnaire général (non exhaustif) pour la prise en charge de patient atteint d'un cancer de la prostate en fonction du stade et de la survie envisagée du patient (extrait du Vidal)	167
Figure 111 : A : Cl ₅₀ de la molécule ICF05017 sur culture 2D ou 3D de cellules LNCaP en conditions de normoxie et d'hypoxie ; B : Microscopie optique de sphéroïde 24 heures sans, ou après traitement avec la molécule ICF05017 (x100).....	170
Figure 112 : Structure de la première prodrogue vectorisée envisagée 58 et des précurseurs de synthèse	171
Figure 113 : Structure du PSMA-617 et sa représentation dans la poche du site actif (adapté de Kopka <i>et al.</i>).....	172
Figure 114 : Structure de la deuxième prodrogue vectorisée envisagée 60 et des précurseurs de synthèse	173
Figure 115 : Suivi cinétique par RMN ³¹ P de la réaction de couplage pour l'obtention du phosphorodiamidate 65	176
Figure 116 : Eléments de détermination structurale issus de l'analyse des spectres RMN ¹ H, ¹³ C et ³¹ P pour la caractérisation du composé 65	177
Figure 117 : Structures des deux nouvelles HAP vectorisées vers le PSMA envisagées 66 et 67	178
Figure 118 : Evolution du pourcentage des prodrogues ICF05017 et 66 en fonction du temps en présence de nitroréductase et de NADPH à 37 °C dans le PBS.....	183
Figure 119 : Radiosynthèse et contrôle qualité par UV-radio-HPLC du ligand [¹²⁵ I]- ICF01305	184

Figure 120 : Affinité relative pour le PSMA de la prodrogue 66 ou du PMPA en présence du radioligand [¹²⁵ I]- ICF01305	185
Figure 121 : CI ₅₀ des composés ICF05017 et 66 sur les cellules LNCaP-Luc et PC3-Luc	186

Liste des schémas

Schéma 1 : Structures de l'ifosfamide et du cyclophosphamide	72
Schéma 2 : Structures des molécules ICF05016 , clivable en hypoxie et vectorisée vers les protéoglycanes, ICF05017 , clivable non vectorisée et ICF05014 , non clivable vectorisée	73
Schéma 3 : Voies d'accès envisagées pour l'obtention des phosphorodiamidates 26 , 27 , 29 , 45 , 47 et 49	84
Schéma 4 : Synthèse du dichlorure de l'acide phosphoramidique 1 en présence de pyridine	85
Schéma 5 : Synthèse du dichlorure de l'acide phosphoramidique 1 en présence de TEA	86
Schéma 6 : Conditions décrites dans la littérature pour la synthèse du composé 2 à partir du composé 1 ou de l'oxychlorure de phosphore	86
Schéma 7 : Voies d'accès à l'acide phosphorodiamidique 3 décrites dans la littérature.....	88
Schéma 8 : Structure des trois précurseurs (imidazol-5-yl)méthanol, nécessaires pour l'obtention des phosphorodiamidates 26 , 45 , 27 , 47 , 29 et 49	92
Schéma 10 : Produits de nitration obtenus en utilisant un mélange sulfonitrique ou le tétrafluoroborate de nitronium sur le 1- <i>N</i> -méthylimidazole.....	93
Schéma 11 : Introduction du groupement nitro par voie électrophile en position C-2 sur l'imidazole protégé en position N-1	94
Schéma 12 : Isomérisation par tautomérie d'un imidazole substitué en position C-4 ou C-5.....	94
Schéma 13 : <i>N</i> -alkylation du 2-nitro-4(5)-méthyl-1 <i>H</i> -imidazole donnant les deux isomères substitués en position C-4 et en C-5	94
Schéma 14 : Conversion d'un mélange d'iodoimidazoles substitués en C-4 ou C-5 en isomère substitué en position 4 par chauffage en présence de l'agent alkylant.....	95
Schéma 15 : <i>N</i> -alkylation du 4-cyanoimidazole donnant l'isomère substitué en position C-5.....	95
Schéma 16 : Principales voies d'accès au cycle imidazole polyfonctionnalisé.....	96
Schéma 17 : Voie de synthèse utilisée pour accéder au composé 12	98
Schéma 18 : Estérification de la sarcosine	98
Schéma 19 : Conditions d'accès au composé 9 décrites par Matteucci <i>et al.</i>	99
Schéma 20 : Conditions optimisées par O'Connor <i>et al.</i> pour l'obtention du composé 9 à partir du composé 8-HCl	100
Schéma 21 : Mécanisme proposé pour l'obtention du composé 9 par cyclisation de Marckwald	102
Schéma 22 : Voies de synthèse réalisées au laboratoire pour l'obtention du 2-aminoimidazole 9 à partir du composé 8-HCl	103
Schéma 23 : Conditions 2 retenues pour la diazotation du composé 9	104
Schéma 24 : Voies d'accès à l'alcool 12 décrites dans la littérature à partir de l'ester 11	105
Schéma 25 : Conditions utilisées au laboratoire pour la réduction de l'ester 11 par le borohydrure de lithium	106
Schéma 26 : Conditions utilisées au laboratoire pour la synthèse et la réduction de l'acide 13	107

Schéma 27 : Séquence réactionnelle globale mise en œuvre pour l'obtention du composé 12 depuis la sarcosine	108
Schéma 28 : Voie d'accès envisagée pour le composé 22	108
Schéma 29 : Synthèse du composé 16	108
Schéma 30 : N-formylation du composé 16	109
Schéma 31 : Synthèse du composé 20 à partir du glycinate 17	110
Schéma 32 : Réaction de diazotation du composé 20	110
Schéma 33 : Réaction de réduction envisagée pour accéder au composé 21	111
Schéma 34 : Produits obtenus lors de la réaction de réduction de l'ester 21	115
Schéma 35 : Séquence réactionnelle globale mise en œuvre pour l'obtention du composé 22 depuis la 3-(N,N-diméthylamino)propylamine	117
Schéma 36 : Réaction de phosphorylation de l'alcool 12 pour obtenir les phosphorodiamidates ICF05017 et 24 (précurseur du hit ICF05016)	118
Schéma 37 : Réaction de phosphorylation de l'alcool 22 pour obtenir le phosphorodiamidate 26 ..	118
Schéma 38 : Synthèse du phosphorodiamidate 26-BH₃ à partir du complexe de bore 22-BH₃	119
Schéma 39 : Réaction de phosphorylation de l'alcool 22 en phosphorodiamidate 27	120
Schéma 40 : Réaction de phosphorylation de l'alcool 22-BH₃ en phosphorodiamidate 27-BH₃	123
Schéma 41 : Réaction de Mitsunobu envisagée entre l'alcool 22 et l'acide 3 pour l'obtention du phosphorodiamidate 29	124
Schéma 42 : Mécanisme de la réaction de Mitsunobu	124
Schéma 43 : Conditions utilisées au laboratoire pour la formation du phosphorodiamidate 30 par la réaction de Mitsunobu à partir de l'acide 3	125
Schéma 44 : Réaction de Mitsunobu envisagée entre l'alcool 22-BH₃ et l'acide 3 pour conduire au phosphorodiamidate 29-BH₃	125
Schéma 45 : Synthèse du TH-302 par la méthode de phosphorylation à l'oxychlorure de phosphore	129
Schéma 46 : Séquence réactionnelle globale mise en œuvre pour l'obtention des phosphorodiamidates 26-BH₃ , 27-BH₃ et 29-BH₃	130
Schéma 47 : Essai de dissociation du complexe 27-BH₃ en milieu acide	132
Schéma 48 : Structure proposée des produits de dégradation issus de l'hydrolyse acide du composé 26-BH₃	134
Schéma 49 : Transchélation et quaternisation des composés 26-BH₃ , 27-BH₃ et 29-BH₃ pour conduire respectivement aux produits finaux 33 , 34 et 35	135
Schéma 50 : Structure générale des composés 33 , 34 et 35	136
Schéma 51 : Rétrosynthèse envisagée pour accéder aux prodrogues fonctionnalisées en position C-4 de l'imidazole	137
Schéma 52 : Bromation du composé 12	138

Schéma 53 : Couplages de Stille mettant en jeu le composé 36	138
Schéma 54 : Synthèse de l'organostannane 37	139
Schéma 55 : Voie de synthèse utilisée pour la silylation de l'alcool 36	140
Schéma 56 : Réaction de couplage de Stille entre le dérivé bromé 39 et l'organostannane (E)- 37 ...	141
Schéma 57 : Voies d'accès envisagées pour l'obtention du composé 42 à partir du composé 40	142
Schéma 58 : Réaction de déprotection du composé 40	142
Schéma 59 : Bilan des voies d'accès au composé 38 à partir des composés 36 et 37	143
Schéma 60 : Conditions décrites dans la littérature pour l'hydrogénation d'alcènes portés par des nitroimidazoles.....	143
Schéma 61 : Mécanisme de cycloaddition du diimide sur une double liaison.....	144
Schéma 62 : Conditions évaluées pour la réduction de la double liaison du composé 38	144
Schéma 63 : Comparaison des deux voies d'accès au composé 42 à partir du composé 40	145
Schéma 64 : Voie de synthèse récapitulative du composé 42	145
Schéma 65 : Synthèse des composés 44 et 46 selon une séquence réactionnelle en deux étapes distinctes (phosphorylation puis quaternisation) (voie A).....	146
Schéma 66 : Synthèse des composés 44 et 46 sans isoler l'intermédiaire issu de la phosphorylation (voie B).....	149
Schéma 67 : Synthèse du composé 46 selon une séquence réactionnelle en quatre étapes via la protection de l'amine tertiaire sous forme de complexe de borane (voie C).....	150
Schéma 68 : Réaction de phosphorylation de l'alcool 42-BH₃ pour donner le phosphorodiamidate 47-BH₃	151
Schéma 69 : Synthèse du composé 48 selon une séquence réactionnelle en quatre étapes via le complexe 42-BH₃	152
Schéma 70 : Synthèse du composé 50 selon une séquence réactionnelle en quatre étapes via le complexe 42-BH₃	153
Schéma 71 : Structure générale des composés 44 , 46 , 48 et 50	154
Schéma 72 : Structures des esters benzyliques 53 , 54 et 5 utilisés pour la synthèse des moutardes phosphorodiamidiques par hydrogénation.....	157
Schéma 73 : Synthèse du composé 59 réalisée au laboratoire, à partir du chlorhydrate du diester tert-butyle de l'acide (S)-glutamique et du carbamate de benzyle du chlorhydrate de (S)-lysine.....	175
Schéma 74 : Synthèse du composé 65 par phosphorylation du composé 12	176
Schéma 75 : Tentative de déprotection du composé 65 en présence de TFA.....	178
Schéma 76 : Synthèse du précurseur alcyne 68	179
Schéma 77 : Voie d'accès au composé 70 à partir du composé 59	180
Schéma 78 : Réaction de chimie click entre les composés 70 et 68 pour la synthèse du composé 66	181
Schéma 79 : Synthèse du composé 67 à partir de la (S)-(napht-2-yl)méthylglycine.....	182

Schéma 80 : Récapitulatif des voies de synthèse des sept prodrogues développées pour le chondrosarcome	187
--	-----

Liste des tableaux

Tableau 1: Les différents types de chondrosarcomes.....	4
Tableau 2 : Classification histologique des chondrosarcomes avec leur fréquence d'apparition, le nombre de stades métastatiques et le taux de survie associé	5
Tableau 3 : Structures des disaccharides composant les glycosaminoglycanes, motifs de base dans les protéoglycanes	9
Tableau 4 : Essais cliniques en cours ciblant différentes voies de signalisation du chondrosarcome pour la prise en charge thérapeutique des patients.....	19
Tableau 5 : Structures de prodrogues conçues pour augmenter l'hydrosolubilité de la substance active	23
Tableau 6 : Classification biopharmaceutique des substances actives en fonction de la solubilité et de la perméabilité conditionnant leur absorption par voie orale (adapté de Khadka <i>et al.</i>)	24
Tableau 7 : Structures de prodrogues conçues pour augmenter la lipophilie et donc la résorption par voie orale de la substance active	26
Tableau 8 : Différents types d'espaceurs clivables.....	33
Tableau 9 : Structures de prodrogues d'agents de chimiothérapie possédant un espaceur clivable par délocalisation électronique	34
Tableau 10 : Structures de prodrogues d'agents de chimiothérapie possédant un espaceur clivable par cyclisation intramoléculaire	35
Tableau 11 : Principales réductases intervenant dans l'activation des HAP	55
Tableau 12 : Méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour l'obtention de dérivés de type cyclophosphamide à partir du dichlorure de l'acide <i>N,N</i> -bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique	79
Tableau 13 : Méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour l'obtention de dérivés <i>N,N,N',N'</i> -tétrakis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate à partir du trichlorure de phosphore ou de chlorure d'acide bis(dialkylamino)phosphorodiamidique	81
Tableau 14 : Méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour l'obtention de dérivés de type ifosfamide à partir du trichlorure de phosphore, de l'oxychlorure de phosphore ou de l'acide <i>N,N'</i> -bis(2-halogénoéthyl)phosphorodiamidique.....	82
Tableau 15 : Conditions décrites dans la littérature pour la formation du composé 1	85
Tableau 16 : Conditions et rendements décrits dans la littérature pour la synthèse du composé 3 ou de son analogue bromé.....	88
Tableau 17 : Conditions de synthèse décrites dans la littérature pour accéder à l'acide 3 par la méthode 2	91
Tableau 18 : Conditions opératoires issues de la littérature ou réalisées au laboratoire pour l'obtention de l'aminoimidazole 9	101
Tableau 19 : Conditions opératoires décrites dans la littérature pour réaliser la diazotation du composé 9	103
Tableau 20 : Conditions testées pour dissocier le complexe 22-BH₃	116

Tableau 21 : Récapitulatif des différentes conditions de phosphorylation évaluées pour l'obtention du composé 29-BH₃	127
Tableau 22 : Proportions d'alcool 42-BH₃ récupéré et rendement de la synthèse du composé 49-BH₃	153
Tableau 23 : Caractérisation des composés 51 , 52 et 3 par spectrométrie de masse et RMN ³¹ P.....	157
Tableau 24 : Critères utilisés pour réaliser une classification TNM dans le cas du cancer de la prostate (adapté de Parker <i>et al.</i>).....	165
Tableau 25 : Radionucléides complexés par le PSMA-617 et rayonnements associés pour un usage diagnostique ou thérapeutique.....	171
Tableau 26 : Méthodes de synthèse issues de littérature du ligand du PSMA de type Glu-urée-Lys protégé.....	174

Liste des abréviations

15-5	1,4,10,13-pentaazacyclopentadécane
5-FU	5-fluorouracile
ADC	« antibody drug conjugate »
ADME	absorption, distribution, métabolisme, excrétion
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AINS	anti-inflammatoire non stéroïdien
AKR1C3	aldocétoréductase 1C3
Akt ou PKB	protéine kinase B
AMM	autorisation de mise sur le marché
ATP	adénosine triphosphate
ATU	autorisation temporaire d'utilisation
CCM	chromatographie sur couche mince
CDI	carbonyldiimidazole
Chk1	« checkpoint kinase 1 »
CI ₅₀	concentration inhibitrice 50
CLL	leucémie lymphoïde chronique
COSY	« correlation spectroscopy »
CYP2C19	cytochrome P450 2C19
CYP3A4	cytochrome P450 3A4
CYP450	cytochrome P450
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DCI	dénomination commune internationale
DCM	dichlorométhane
DIAD	azodicarboxylate de diisopropyle
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMAP	4-(<i>N,N</i> -diméthylamino)pyridine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DOTA	acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
EC	espaceur clivable
EGFR	« epidermal growth factor receptor »
EMA	« european medicines agency »
EPR	« enhanced permeation and retention »
FDA	« food and drug administration »
FDG	2-fluoro-2-désoxyglucose
FMISO	1-(3-fluoro-2-hydroxypropyl)-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazole ou fluoromisonidazole
FOXRED2	« flavine adenine dinucleotide dependent oxydoreductase domain containing 2 »
GAG	glycosaminoglycane

GSH	glutathion
HAP	« hypoxia activated prodrug »
HBTU	hexafluorophosphate de benzotriazole-tétraméthyluronium
HCR	« hypoxia cytotoxic ratio »
HER	« hypoxia response element »
HIF	« hypoxia inductible factor »
HMDP	hydroxyméthylènediphosphonate
HOBt	hydroxybenzotriazole
HRMS	spéctrométrie de masse haute résolution
HSQC	« heteronuclear single quantum coherence »
IDH	isocitrate déshydrogénase
IHH	Indian Hedgehog
iNOS	« inductible nitric oxyde synthase »
IR	infrarouge
IRM	imagerie par résonance magnétique
LH-RH	hormone de libération de la lutéinostimuline
LiHMDS	bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
<i>m</i> CPBA	acide <i>mé</i> ta-chloroperbenzoïque
MDP	méthylènediphosphonate
MDR	« multi drug resistance »
MMAE	monométhylauristatine E
MMP	métalloprotéinase matricielle
MOMCl	chlorure de méthoxyméthyle
m-TOR	« mammalian target of rapamicin »
NAAG	acide <i>N</i> -acétyl- <i>L</i> -aspartyl- <i>L</i> -glutamique
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP(H)	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBP	4-(4'-nitrobenzyl)pyridine
NDOR1	« NADPH-dependent diflavin oxidoreductase 1 »
NODAGA	acide 1,4,7-triazacyclononane-1-glutarique-4,7-diacétique
NQO1	DT-diaphorase ou NAD(P)H quinone oxydoréductase 1
NTP 15-5	chlorure de 3-(1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécane-1- <i>N'</i> -yl)- <i>N,N,N</i> -triéthylpropan-1-aminium
ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
P450R	cytochrome P450 oxydoréductase NADH dépendant
PADA	azodicarboxylate de potassium
PAP	phosphatase acide prostatique
PCNA	« proliferating cell nuclear antigen »
PD-1	« programmed cell death-1 »
PD-L1	« programmed cell death ligand-1 »
PEG	polyéthylène glycol

PG	protéoglycane
P-gp	glycoprotéine P
PHD	prolyl-4-hydroxylase
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PMPA	acide 2-phosphonométhyl pentanedioïque
PSA	antigène spécifique prostatique sérique
PSMA	« prostate specific membrane antigen »
PTHrP	« parathyroïd hormone-related protein »
qRT-QPCR	« quantitative reverse transcription polymerase chain reaction »
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RSA	relation structure-activité
RU	« response unit »
SA	substance active
SEMCI	chlorure de 2-(triméthylsilyl)éthoxyméthyle
SIB	iodobenzoate de <i>N</i> -hydroxysuccinimidyle
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SPR	résonance plasmonique de surface
t.a.	température ambiante
TBAF	fluorure de tétrabutylammonium
TBTA	tris(benzyltriazolylméthyl)amine
TEA	triéthylamine
TEMP	tomographie par émission monophotonique
TEP	tomographie par émission de positons
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
THPTA	tris{(1-hydroxy-propyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)méthyl}amine
TIS	triisopropylsilane
TMA	triméthylamine
TMP	2,2,6,6-tétraméthylpipéridine
TNM	« tumor, node, metastasis »
TPP	triphénylphosphine
TPPO	oxyde de triphénylphosphine
TPZ	tirapazamine
UV	ultraviolet
VEGF	« vascular endothelial growth factor »
VEGFR	« vascular endothelial growth factor receptor »
VHL	von Hippel-Lindau
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
αKG	alpha-cétoglutarate

Introduction générale

Le chondrosarcome, tumeur du cartilage, est l'une des pathologies cancéreuses les plus chimio et radio-résistante. Cette résistance est principalement liée à la nature de son microenvironnement tumoral composé d'une matrice extracellulaire chondrogénique très dense et faiblement vascularisée, siège d'hypoxie limitant de fait la pénétration et l'efficacité des principes actifs. A l'heure actuelle, le seul traitement efficace pour cette pathologie est l'exérèse chirurgicale, pratiquée avec des marges importantes afin d'éviter toute récurrence, mais pouvant être particulièrement invalidante pour le patient. Le développement de nouveaux traitements adjuvants voir néo-adjuvants serait donc une réelle avancée pour la prise en charge de ce cancer.

Afin de répondre à cet écueil thérapeutique et de proposer une chimiothérapie efficace, l'UMR 1240 IMoST développe une approche de prodrogues bispécifiques exploitant deux caractéristiques du chondrosarcome, à savoir : la forte densité en protéoglycanes (PGs) retrouvée au sein de la matrice extracellulaire tumorale, ainsi que le caractère fortement hypoxique de ce cancer. Ce projet a fait émerger une molécule hit nommée **ICF05016**, dotée d'une affinité pour les PGs, d'une cytotoxicité amplifiée en conditions d'hypoxie, et d'une efficacité antitumorale *in vivo* sur modèles murins.

C'est dans la continuité de cette étude que s'inscrivent les travaux de cette thèse intitulée « Synthèse de prodrogues bispécifiques activables en milieu hypoxique : applications au traitement du chondrosarcome et nouvelles perspectives dans le cadre du cancer de la prostate », qui visent à optimiser la structure de ce hit.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre grandes parties et débute par une étude bibliographique, présentant la pathologie cancéreuse du cartilage en abordant notamment les deux caractéristiques majeures du microenvironnement de ce cancer à savoir la composition de la matrice extracellulaire et l'hypoxie tumorale, bases du concept de la bispécificité des prodrogues vectorisées développées au sein du laboratoire IMOST. Le concept des prodrogues et leurs applications en cancérologie sont également introduits et plus particulièrement les prodrogues activables en situation d'hypoxie.

Le second chapitre rapporte les résultats expérimentaux incluant d'une part la description et la discussion des synthèses organiques des prodrogues envisagées et d'autre part leurs évaluations biologiques tant en termes d'affinité pour l'aggrécane, qu'en termes d'activation en milieu réducteur et de cytotoxicité sur cellules de chondrosarcome humain. Une dernière partie est consacrée à une nouvelle perspective de cette approche de prodrogues bispécifiques dans le cadre du cancer de la prostate. Après une rapide introduction bibliographique, la synthèse et l'évaluation des nouvelles molécules seront exposées.

Enfin, après une conclusion générale de l'ensemble de ces travaux, les protocoles expérimentaux de synthèses organiques associés aux caractérisations structurales des molécules, et d'évaluations biologiques viennent conclure ce manuscrit.

Introduction bibliographique

I. Le chondrosarcome : généralités, diagnostic et traitements

A. Epidémiologie de la pathologie

Le terme « chondrosarcome » englobe l'ensemble des tumeurs malignes issues des cellules composant le cartilage. Il s'agit du 2^{ème} cancer osseux le plus fréquent chez l'Homme après l'ostéosarcome, passant même au premier rang chez l'adulte entre 30 et 70 ans¹ (Figure 1). Avec une incidence de 0,2/100 000/an², soit une centaine de nouveaux cas par an en France, cette pathologie est considérée comme une maladie orpheline.

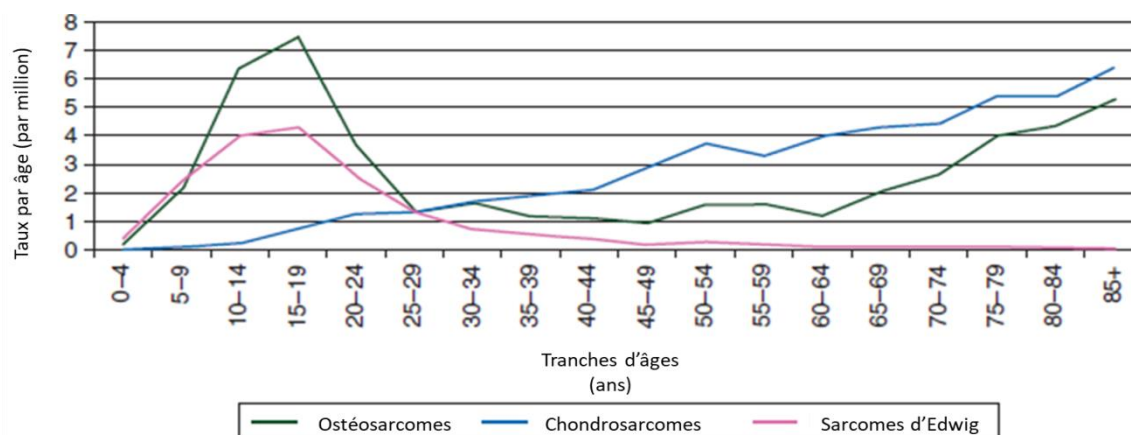


Figure 1: Incidence des tumeurs osseuses par rapport à l'âge (données pour le Royaume Uni)³

Les cellules de chondrosarcome présentent une faible activité mitotique et sont caractérisées, notamment pour les tumeurs de bas grades, par la présence d'une matrice extracellulaire de nature chondrogénique. Les tissus tumoraux sont quant à eux faiblement vascularisés et soumis à des phénomènes d'hypoxie. Ces caractéristiques font des chondrosarcomes des tumeurs particulièrement radio et chimio-résistantes expliquant que le seul traitement efficace à ce jour demeure l'exérèse chirurgicale avec de larges marges d'excision^{4,5}.

Même si tous les cartilages des os peuvent être affectés, les chondrosarcomes conventionnels (voir paragraphe suivant), sont principalement localisés sur les extrémités des os longs (Figure 2) tels que le fémur proximal (27%) et distal (6%), l'humérus proximal (9%) ainsi que le pelvis (38%)⁶. Les os des pieds, de la colonne vertébrale et du sternum sont quant à eux beaucoup plus rarement touchés (entre 1 et 4% tous cas confondus)⁷.

Introduction bibliographique

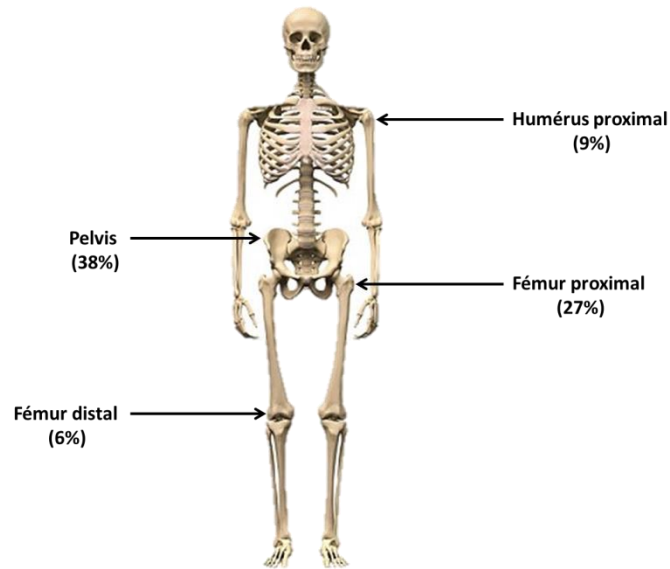


Figure 2: Localisation des principaux chondrosarcomes conventionnels⁶

B. Classification des chondrosarcomes

Les chondrosarcomes peuvent être répartis selon trois grandes classifications : la classification anatomique, la classification primaire ou secondaire et enfin la classification histologique (Tableau 1)⁸.

<u>Classification histologique</u>
Chondrosarcomes conventionnels
Grade I
Grade II
Grade III
Chondrosarcomes non conventionnels
Chondrosarcomes dédifférenciés
Chondrosarcomes mésenchymateux
Chondrosarcomes à cellules claires
Chondrosarcomes du périoste

<u>Classification anatomique</u>
Chondrosarcomes centraux
Chondrosarcomes périphériques

<u>Classification primaire ou secondaire</u>
Chondrosarcomes primaires apparition de la tumeur <i>de novo</i>
Chondrosarcomes secondaires apparition de la tumeur suite à une lésion préexistante

Tableau 1: Les différents types de chondrosarcomes⁷⁻¹⁰

Introduction bibliographique

1. Classification histologique

Cette classification histologique permet de discriminer les chondrosarcomes « conventionnels » représentant 85% des cas, des chondrosarcomes dits « non conventionnels » (Tableau 2).

Type de chondrosarcome	Fréquence d'apparition	Stade métastatique	Taux de survie
Chondrosarcomes conventionnels (85 %) ⁸			
Grade I	85%	1% [†]	79-100% [†]
Grade II		15% [†]	53-90% [†]
Grade III		32% [†]	29-55% [†]
Chondrosarcomes non conventionnels (15 %)			
Dédifférenciés	10%	90% ¹¹	10-28% ^{†7,12}
Mésenchymateux	1-13%	25% ¹³	27-43% ^{†7,14}
A cellules claires	1-2%	25% (métastases ou récurrence) ⁷	92% ¹⁵
Du périoste	1%	5-12% ¹⁶	83% ¹⁷

Tableau 2 : Classification histologique des chondrosarcomes avec leur fréquence d'apparition, le nombre de stades métastatiques et le taux de survie associé
†taux observé à 10 ans ; ‡taux observé à 5 ans

a. Les chondrosarcomes conventionnels

Les chondrosarcomes conventionnels sont répartis en trois grades histologiques, selon la classification décrite en 1977 par Evans *et al.*, allant du grade I le plus bénin, au grade III le plus malin¹⁸. Cette gradation s'appuie sur des caractéristiques histologiques telles que la densité cellulaire, l'organisation de la matrice extracellulaire, le degré d'atypie nucléaire ou encore le nombre de cellules en mitoses ou en nécrose (Figure 3)⁷ :

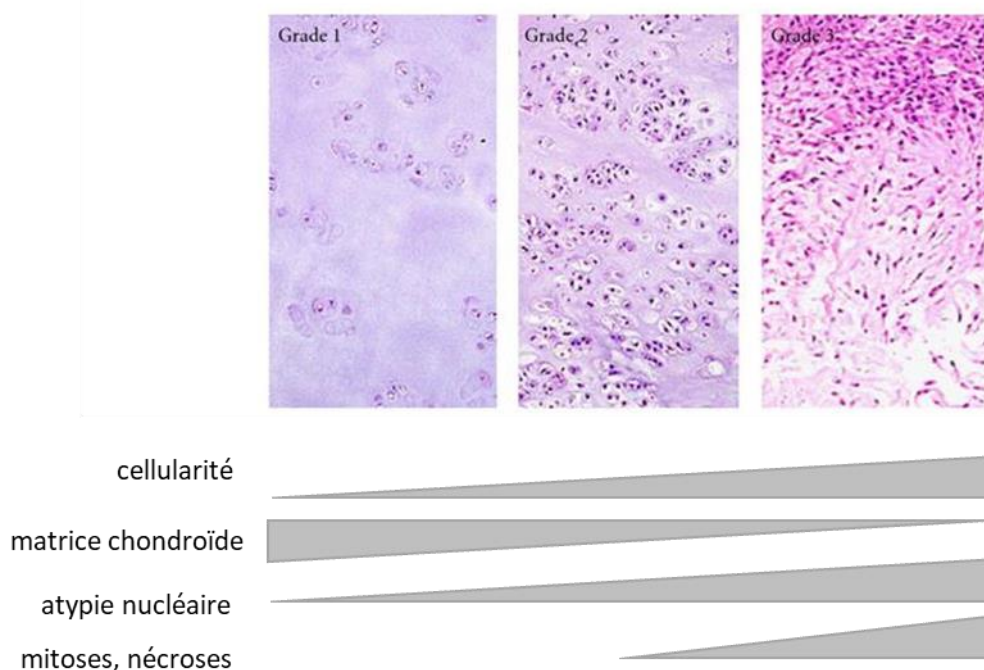


Figure 3: Caractéristiques histologiques des chondrosarcomes conventionnels en fonction des différents degrés de malignité (adapté de Kim *et al.*)⁷

Introduction bibliographique

- Le chondrosarcome de grade I possède un faible degré de malignité. Peu de cellules sont présentes dans une abondante matrice extracellulaire ayant une composition proche de celle du cartilage sain (type chondroïde).
- Le chondrosarcome de grade II présente un changement dans la composition de la matrice extracellulaire avec une diminution de la matrice chondroïde au profit d'une matrice myxoïde. La cellularité se trouve augmentée.
- Le chondrosarcomes de grade III représente les chondrosarcomes de plus haut grade de malignité avec un fort pouvoir métastatique (invasion métastatique chez 32 % des patients)⁸. L'activité mitotique des cellules se trouve augmentée ainsi que le nombre d'atypies nucléaires visibles, alors que la matrice chondroïde disparaît de plus en plus au profit de la matrice myxoïde.

Le taux de survie des patients atteints de chondrosarcome est fortement corrélé avec le degré de malignité et donc avec les grades précédemment définis (Figure 4).

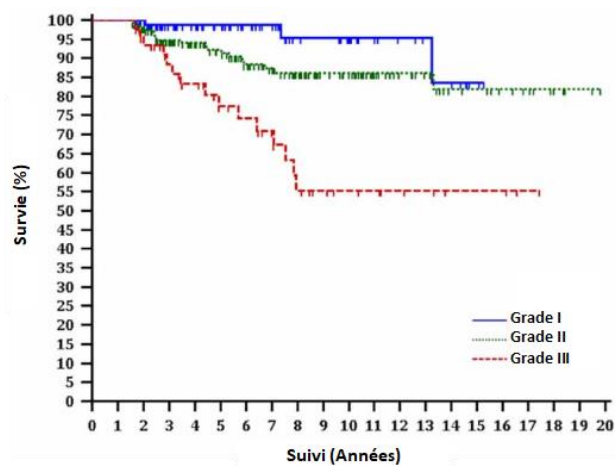


Figure 4: Courbe de survie globale de patients atteints de chondrosarcome de grade I, II, ou III (adapté de Angelini et al.)⁸

b. Les chondrosarcomes non conventionnels

Les chondrosarcomes non conventionnels représentent 15% de l'ensemble des chondrosarcomes, et englobent les chondrosarcomes dédifférenciés, les chondrosarcomes mésenchymateux, les chondrosarcomes à cellules claires et les chondrosarcomes du périoste (Figure 5).

Introduction bibliographique

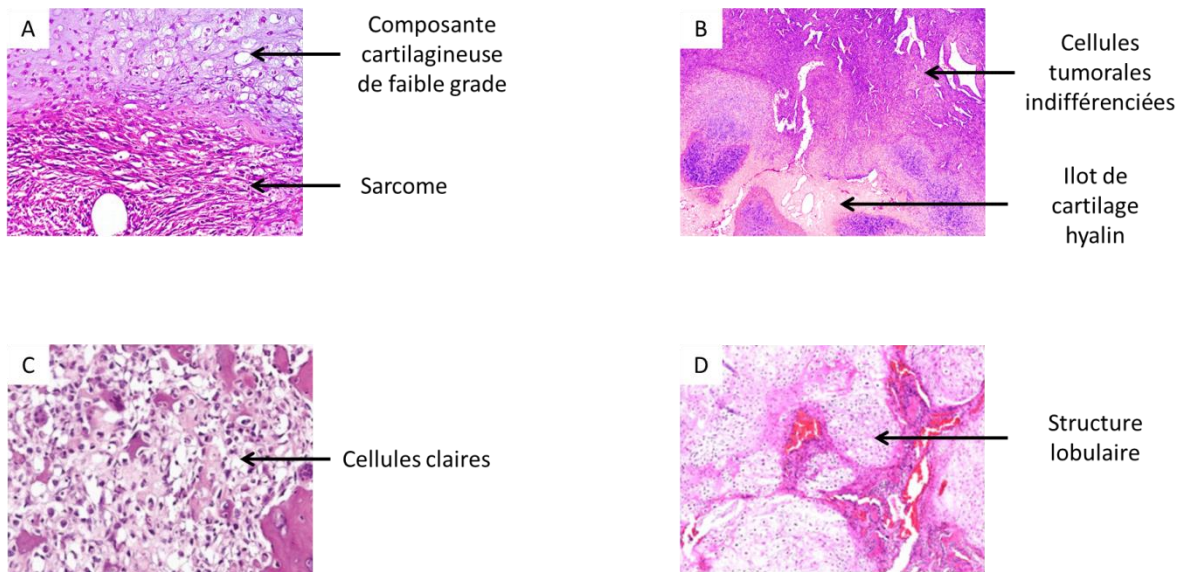


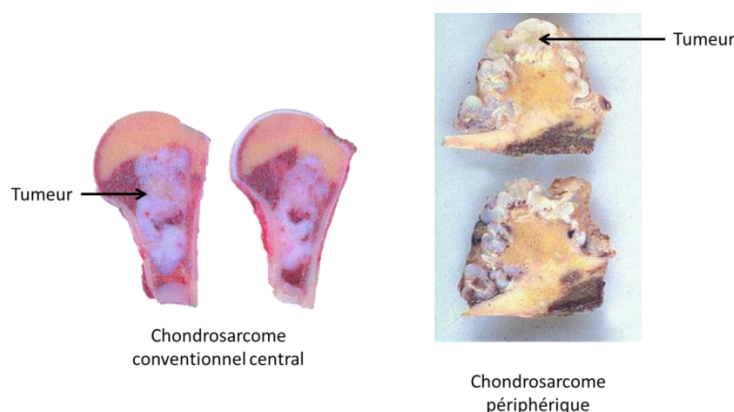
Figure 5: Coupes histologiques de chondrosarcomes non conventionnels : (A) dédifférenciés ; (B) mésoenchymateux ; (C) à cellules claires ; (D) du périoste (adapté de Kim et al. et de Cleven et al.)^{7,16}

- Le chondrosarcome dédifférencié survient majoritairement chez l'adulte entre 50 et 60 ans. Les os les plus souvent touchés sont le pelvis et le fémur. La tumeur est composée d'une juxtaposition de deux types de tissus avec une zone de transition abrupte : une tumeur cartilagineuse bénigne (enchondrome) ou de bas grade de malignité (chondrosarcome de grade I) et un sarcome non cartilagineux de haut grade comme l'ostéosarcome (Figure 5A). C'est une tumeur de haut grade de malignité (apparition de métastases chez 90% des patients) avec un pronostic (10-28% à 5 ans) très péjoratif.
- Le chondrosarcome mésoenchymateux est une tumeur d'incidence rare (1-13%) qui possède néanmoins un fort grade de malignité et peut survenir à n'importe quel âge. Ses principales caractéristiques histologiques reposent sur la présence de zones riches en cellules indifférenciées et d'îlots de cartilage hyalin (Figure 5B).
- Le chondrosarcome à cellules claires est une forme rare de chondrosarcome (prévalence 1-2 %) avec un faible degré de malignité. Il est caractérisé par la présence de cellules cancéreuses avec un cytoplasme clair (Figure 5C).
- Le chondrosarcome du périoste figure également parmi les formes rares de chondrosarcome (1%). Il possède une structure globulaire composée de cellules tumorales qui se trouvent dispersées de façon irrégulières dans une matrice de type myxoïde (Figure 5D).

2. Classification anatomique

La tumeur peut être localisée au centre de l'os ou à sa périphérie (Figure 6). Concernant les chondrosarcomes conventionnels (voir paragraphe I.B.1.a), 75% d'entre eux sont des chondrosarcomes centraux et 10 % d'entre eux sont des chondrosarcomes périphériques secondaires⁸.

Introduction bibliographique



3. Classification primaire versus secondaire

Les chondrosarcomes primaires surviennent de manière spontanée⁸. Les chondrosarcomes secondaires font quant à eux suite à une lésion préexistante de type enchondrome ou ostéenchondrome qui sont des tumeurs bénignes du cartilage⁹. Elles se déclarent respectivement au niveau de la cavité médullaire ou à la périphérie de l'os et peuvent devenir malignes.

Le risque de transformation maligne de ces chondromes bénins reste exceptionnel (<1%)^{20,21} en dehors de la maladie d'Ollier (enchondromatose*) (environ 25-30%)^{20,22} et du syndrome de Maffucci qui est une enchondromatose associée à des angiomatoses cutanées (environ 100%)²².

C. Microenvironnement du chondrosarcome : protéoglycanes et hypoxie

Bien que certaines caractéristiques du microenvironnement du chondrosarcome restent mal connues, sa teneur importante en protéoglycanes et sa nature hypoxique comparativement aux cartilages et aux tumeurs bénignes du cartilage sont bien établies^{23,24}.

1. Les protéoglycanes

A l'instar des chondrocytes sains, les chondrocytes tumoraux synthétisent une matrice extracellulaire de nature chondrogénique essentiellement composée d'un réseau de fibres de collagène, d'acide hyaluronique et de protéoglycanes (PGs)²⁵.

Les PGs sont des macromolécules pouvant être localisées de façon intra-, extracellulaire ou à la surface de la cellule. On ne dénombre pas moins de 47 types de PGs différents dans le corps humain comme notamment l'aggrécane dans le cartilage mais aussi le versicane dans la paroi des vaisseaux sanguins ou encore le lumécane dans la cornée^{26,27}. Ils possèdent de nombreuses fonctions biologiques en participant notamment : i) à l'organisation structurelle des tissus et des matrices extracellulaires²⁸ et ii) aux processus cellulaires d'adhésion, de prolifération ou de migration²⁹ en lien avec les facteurs de croissance³⁰ ou les cytokines³¹.

Les PGs sont constitués d'une protéine de structure centrale sur laquelle sont liées des chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs). Ces GAGs sont composés d'unités disaccharidiques pouvant

* L'enchondromatose se caractérise par la présence d'enchondromes multiples

Introduction bibliographique

être de quatre types : chondroïtine-6(ou 4)-sulfate, dermatane sulfate, kératane sulfate ou héparane sulfate³² (Tableau 3).

Structure	Nom
	chondroïtine-6-sulfate
	chondroïtine-4-sulfate
	dermatane sulfate
	kératane sulfate
	héparane sulfate

Tableau 3 : Structures des disaccharides composant les glycosaminoglycane, motifs de base dans les protéoglycane

Le PGs le plus abondant dans la matrice extracellulaire cartilagineuse est l'aggrécane qui possède des GAGs de type chondroïtine sulfate et kératane sulfate²⁷. Il tire son nom de sa capacité à s'agréger à l'acide hyaluronique *via* les domaines globulaires présents sur sa protéine de structure pour former des complexes supramoléculaires (> 200 MDa). Sur la protéine de structure (220 kDa) d'un monomère d'aggrécane sont fixés les GAGs (100-200 chaînes, 10 à 30 kDa) qui représentent environ 90% de la masse totale du monomère²⁶ (Figure 7).

Introduction bibliographique

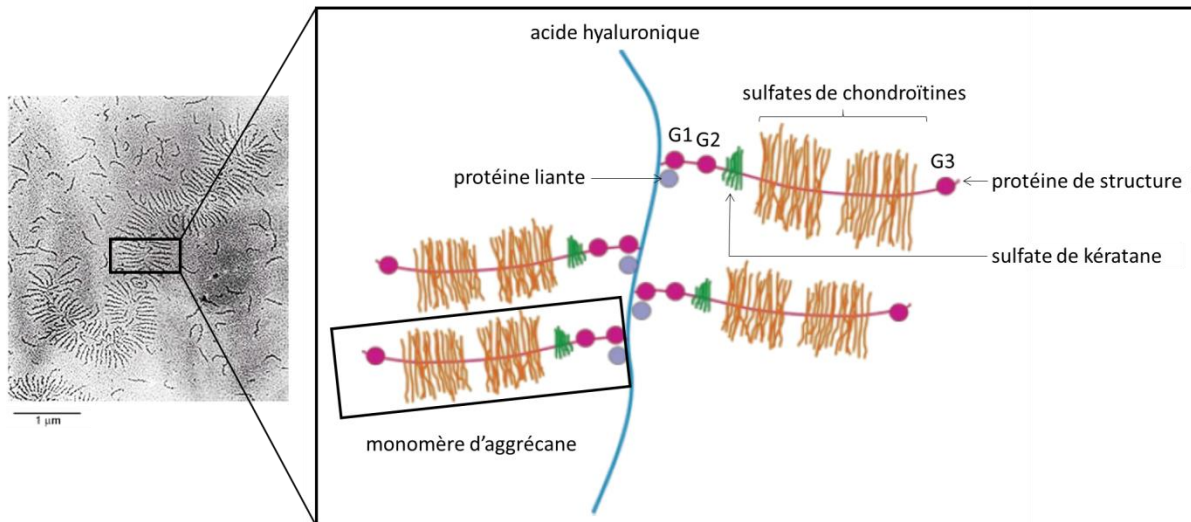


Figure 7 : Image de microscopie électronique et représentation schématique de l'aggrécane (adapté de Fox et al. et de Jerosch J.)^{33,34}
G1, G2, G3 : partie globulaire

Les monomères de GAGs sont tous constitués d'un ose et d'une glycosamine. Des fonctions carboxylates ou sulfates sont présentes sur ces unités saccharidiques. A pH physiologique, les fonctions acides carboxyliques (pK_a (CO_2H/CO_2^-) entre 4,0 et 5,0) et sulfates (pK_a (HSO_4^-/SO_4^{2-}) = 2,0) des GAGs sont sous forme base, conférant à la matrice cartilagineuse une forte densité de charges négatives. Ces longues chaînes anioniques vont permettre d'attirer les cations comme le sodium, le potassium ou encore le calcium par effet Donnan. La pression osmotique générée par le gradient de concentration assure une forte teneur en eau au sein du cartilage articulaire. Cette pression osmotique combinée à la présence de collagène et de PGs confère au tissu cartilagineux des propriétés mécaniques remarquables (résistance à la compression, flexibilité...).

Tout comme n'importe quel tissu, le cartilage a besoin d'être alimenté en nutriment et d'évacuer les métabolites produits en son sein. Le tissu cartilagineux étant avasculaire, les échanges se font principalement entre le cartilage et le liquide synovial, soit par diffusion, soit par convection. La diffusion est le moyen de transport des petits solutés par le biais d'un gradient de concentration. La convection est l'utilisation de la mécanique des fluides pour le transport des autres solutés. L'eau étant le fluide constituant majeur de ce tissu, les mouvements de l'articulation contribuent aux déplacements des plus grosses molécules. En effet, lorsqu'une pression est exercée sur le cartilage, la compression du tissu expulse une partie de l'eau de la matrice et ses constituants, vers l'extérieur. Au relâchement de la pression, de l'eau chargée de nouveaux éléments pénètre dans la matrice, assurant l'approvisionnement des cellules du cartilage³⁵. Ces méthodes de transports sont les principales voies d'accès qu'emprunteront les molécules de chimiothérapie.

Constituant majeur du cartilage, l'aggrécane est également présent au niveau de la matrice extracellulaire tumorale et son expression diminue quand le grade histologique de la tumeur augmente (Figure 8)²⁴. Cette diminution du taux d'aggrécane a été notamment mise en évidence au sein de biopsies par des méthodes histochimiques (e.g. coloration au bleu de toluidine, molécule chargée positivement affine pour les charges négatives des GAGs) ou immunohistochimie (e.g. utilisation d'un anticorps anti-aggrécane couplé à un chromophore).

Introduction bibliographique

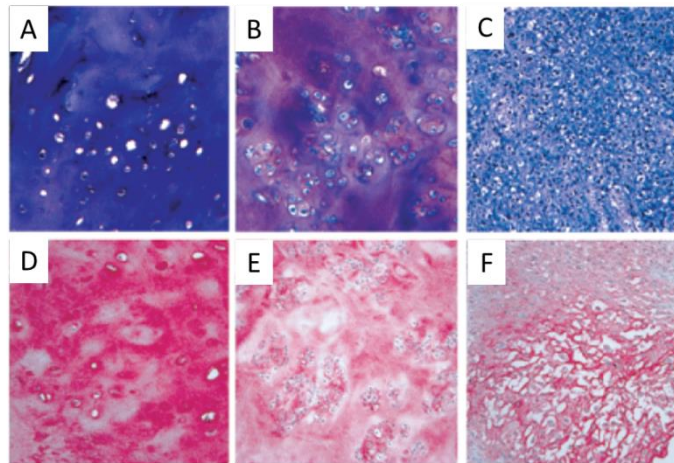


Figure 8 : Coupes histologiques de différentes tumeurs du cartilage après coloration au bleu de toluidine des GAGs (A-C) ou révélation par immunohistochimie de l'aggrécane (D-F) (adapté de Aigner et al.)²⁴
Un enchondrome (tumeur bénigne) (A,D) ; un chondrosarcome de bas grade (B,E) ; un chondrosarcome de haut grade (C,F)

2. L'hypoxie tumorale

L'hypoxie se caractérise par la présence d'un faible taux d'oxygène au sein du tissu (entre 0,3% et 4,2 %) ³⁶. Ce phénomène peut se manifester de deux manières différentes : l'hypoxie chronique et l'hypoxie aigüe.

L'hypoxie chronique est liée à la limite de diffusion (*i.e.* 150-200 μm) de l'oxygène apporté par les vaisseaux sanguins à travers les tissus irrigués. Ce phénomène crée un véritable gradient de concentration en oxygène entre les cellules proches du vaisseau, fortement oxygénées, et les cellules plus éloignées en situation d'hypoxie (Figure 9) ³⁷. Au sein d'une tumeur, ce phénomène est exacerbé en raison de la prolifération cellulaire très importante créant une distorsion entre le réseau vasculaire tumorale et la quantité de cellules à irriguer.

Introduction bibliographique

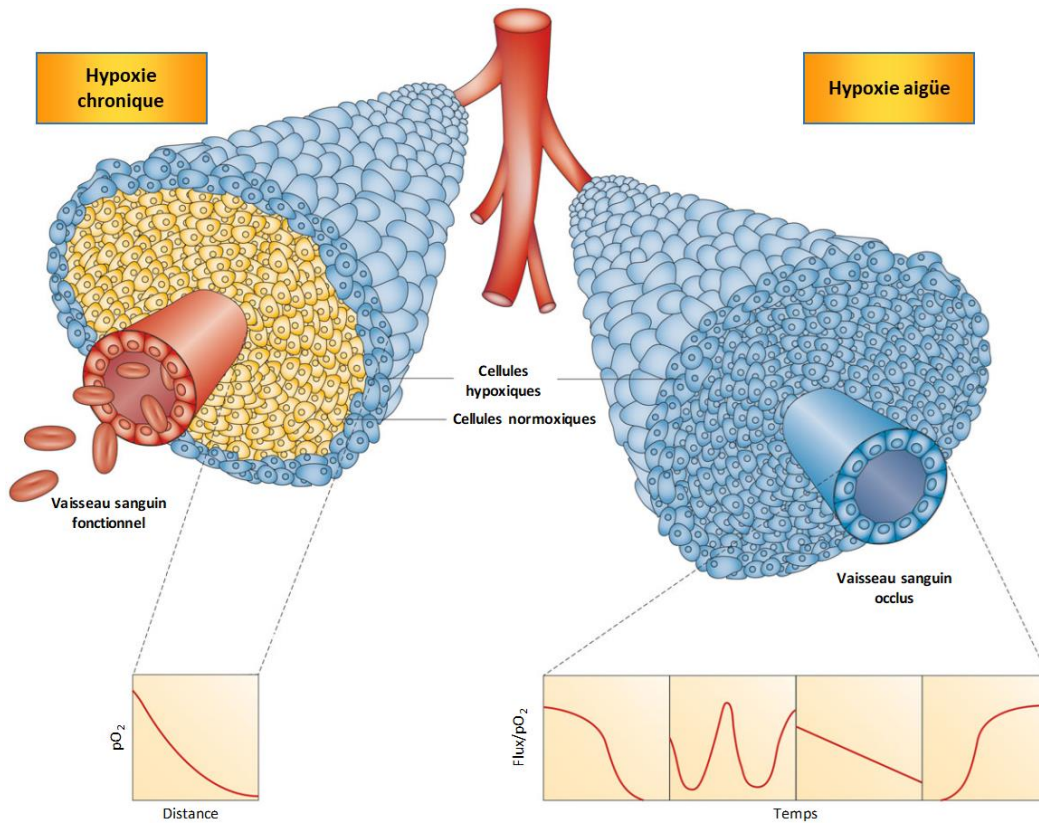


Figure 9: Hypoxie chronique ou aiguë et influence sur la pression en oxygène dans les tissus (adapté de Horsman et al.)³⁷

Ce phénomène d'hypoxie chronique est amplifié au sein d'une tumeur par une hypoxie dite « aiguë ». Elle se caractérise par une variation aléatoire de la quantité d'oxygène en raison d'une fluctuation de l'irrigation tumorale perturbée par des réductions ponctuelles de flux sanguin dû à des phénomènes de compression, d'occlusion, de dilatation des vaisseaux sanguins et des phénomènes de « cul de sac » (Figure 10). En fonction de sa taille et de sa vascularisation anarchique, une tumeur pourra donc être constituée de zones en situation de normoxie, où le taux d'oxygène est quasiment égal à celui du sang, de zone en hypoxie, où le taux d'oxygène est réduit, et de zones en anoxie, où l'oxygène est totalement absent et où les cellules présentes sont en nécrose^{36,38}.

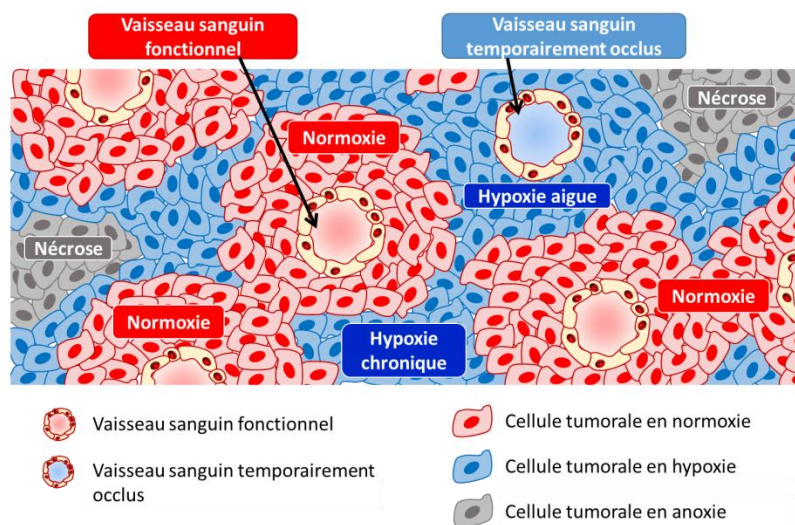


Figure 10: Représentation des différentes zones d'oxygénation d'une tumeur (adapté de Yeom et al.)³⁸

Introduction bibliographique

Afin de faire face à ce manque d'oxygène dans les zones hypoxiques, une réponse cellulaire s'organise notamment avec la production du facteur de transcription appelé HIF-1 (« hypoxia-inductible factor »). HIF-1 est l'élément clé de la réponse cellulaire aux faibles concentrations en oxygène et est composé de deux sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β (Figure 11).

En **normoxie**, la sous-unité HIF-1 α est hydroxylée par les protéines PHD (prolyl-4-hydroxylases), puis polyubiquitinylée *via* la protéine suppresseur de tumeur VHL (von Hippel-Lindau), ce qui empêche l'hétérodimérisation avec HIF-1 β et l'oriente vers une voie de dégradation par le protéasome³⁹. En **hypoxie**, la sous-unité HIF-1 α n'est pas hydroxylée par les PHD, qui a besoin d'oxygène pour réaliser cette bioréaction, mais est transloquée au niveau nucléaire où elle se dimérise avec la sous-unité HIF-1 β , formant le facteur de transcription HIF-1. Ce dernier va induire la transcription des gènes cibles impliqués dans la réponse de la cellule tumorale à l'hypoxie.

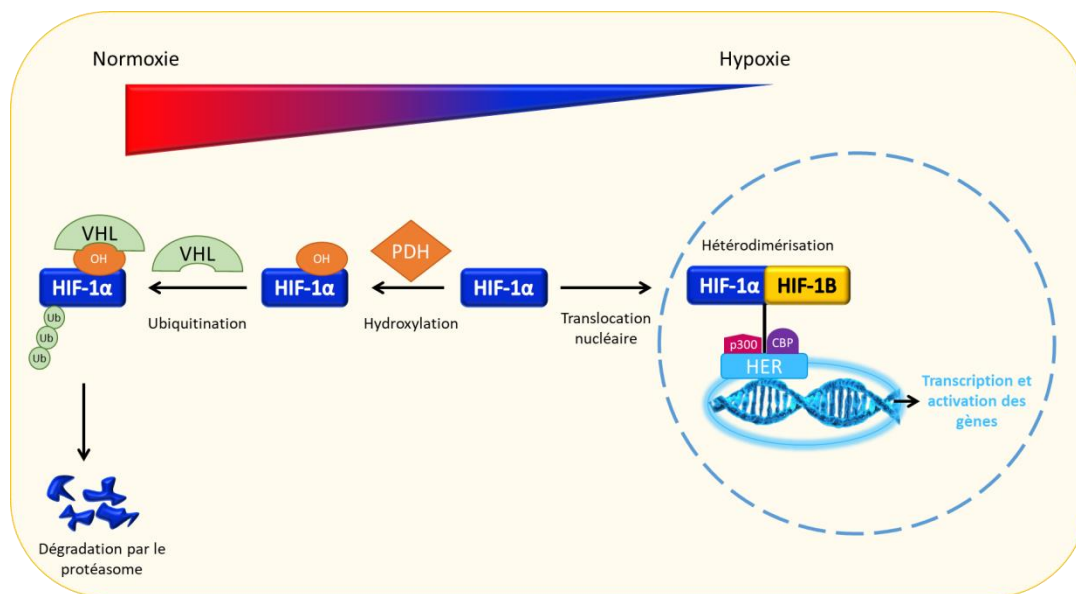


Figure 11 : Voie de signalisation du facteur de transcription HIF-1 dans une cellule en normoxie ou en hypoxie
HIF : « Hypoxia-Inductible Factor » ; PHD : prolyl-4-hydroxylases ; VHL : von Hippel-Lindau ; HER « Hypoxia-Response Element »

Une pléthore de gènes sont alors activés et conduisent à de multiples réponses (Figure 12) parmi lesquelles est retrouvé^{40,41} :

- Le déclenchement de l'angiogenèse grâce à la production du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).
- La résistance au traitement avec : l'activation du gène « Multi Drug Resistance 1 » (MDR-1) qui code notamment pour l'expression des P-gp[†] à la surface de la cellule.
- L'acquisition d'un phénotype invasif avec l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse.
- Le changement du métabolisme glucidique de la cellule vers une glycolyse anaérobie (effet Warburg)⁴². Le glucose est transformé en pyruvate puis en lactate conduisant entre autre à une diminution du pH intracellulaire.

[†] La glycoprotéine P est un transporteur d'efflux transmembranaire, ATP dépendant, permettant entre autre le rejet de molécules exogènes des cellules.

Introduction bibliographique

- La survie cellulaire grâce à la baisse de la prolifération cellulaire et une diminution de l'apoptose.

La résistance à la radiothérapie est par ailleurs accrue par la diminution de la quantité de ROS (espèces réactives de l'oxygène) produite, conséquence directe de la baisse du niveau d'oxygénation des cellules tumorales.

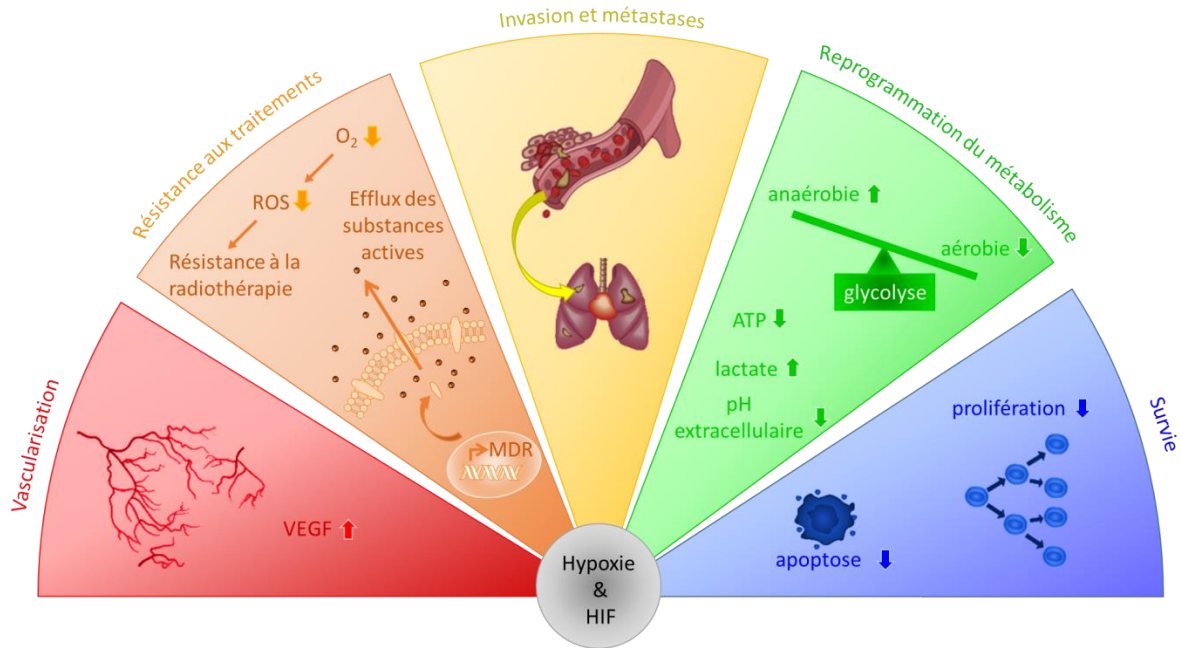


Figure 12 : Effets provoqués ou régulés par HIF-1 dans les tumeurs en hypoxie⁴³

Le facteur de transcription HIF-1 a été retrouvé dans un panel de biopsies de chondrosarcome, son taux d'expression étant même corrélé avec le grade histologique de la tumeur⁴⁴ et la survie des patients⁴⁵ (Figure 13). Ce facteur de transcription aurait donc un rôle important dans l'agressivité du chondrosarcome et pourrait être un marqueur de mauvais pronostic.

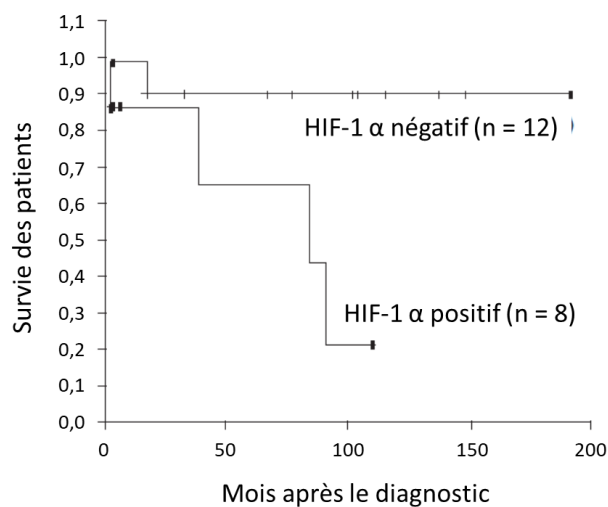


Figure 13 : Courbe de Kaplan-Meier de survie des patients atteints de chondrosarcome selon l'expression de HIF-1 α dans les tumeurs⁴⁵

Introduction bibliographique

Une méta-analyse publiée en 2016 sur des études cliniques portant chez des patients atteints de sarcomes osseux (ostéosarcome et chondrosarcome) confirme ces résultats : l'expression de HIF-1 α est significativement corrélée avec un fort taux de métastases, une diminution de la survie globale et une augmentation des récidives⁴⁶.

D. Diagnostic de la pathologie

Les chondrosarcomes évoluent généralement de façon lente et insidieuse sans symptomatologie clinique spécifique. Les premiers symptômes peuvent être une douleur osseuse, accompagnée ou non de gonflement/tuméfaction local, et parfois de fractures spontanées.

Le diagnostic initial du chondrosarcome est en général évoqué sur un examen radiologique, qui sera ensuite complété par une tomodensitométrie (scanner) et par une imagerie par résonance magnétique (IRM) afin d'établir le bilan d'extension locorégional de la tumeur. Ces imageries sont inévitablement associées à une biopsie qui reste indispensable pour poser un diagnostic précis en termes de type et de grade de la tumeur. De la précision de ce diagnostic, va dépendre la qualité de la prise en charge thérapeutique du patient.

Un des enjeux diagnostiques est de pouvoir différencier une tumeur bénigne telle qu'un enchondrome d'une tumeur maligne cartilagineuse ou encore d'une tumeur osseuse de type ostéosarcome. Certains signes radiographiques sont évocateurs du grade de la tumeur (Figure 14A). La radiographie permet en effet la visualisation de la destruction osseuse avec des zones de calcifications qui sont typiquement annulaires, arciformes ou en « pop-corn » (une forte abondance de ces zones serait plutôt en faveur d'un chondrome)⁷. Dans les lésions de plus haut grade, l'ostéolyse est plus agressive avec une atteinte de la corticale osseuse, l'apparition de larges zones non calcifiées ou de calcifications irrégulières et l'envahissement des parties molles⁴⁷.

Le scanner quant à lui permet une meilleure appréciation de la taille de la tumeur, de la lyse corticale, de la minéralisation de la matrice, et de l'extension vers les parties molles, cette dernière étant toutefois mieux appréciée par IRM (hypersignal en pondération T2 des tumeurs cartilagineuses) (Figure 14B et C).

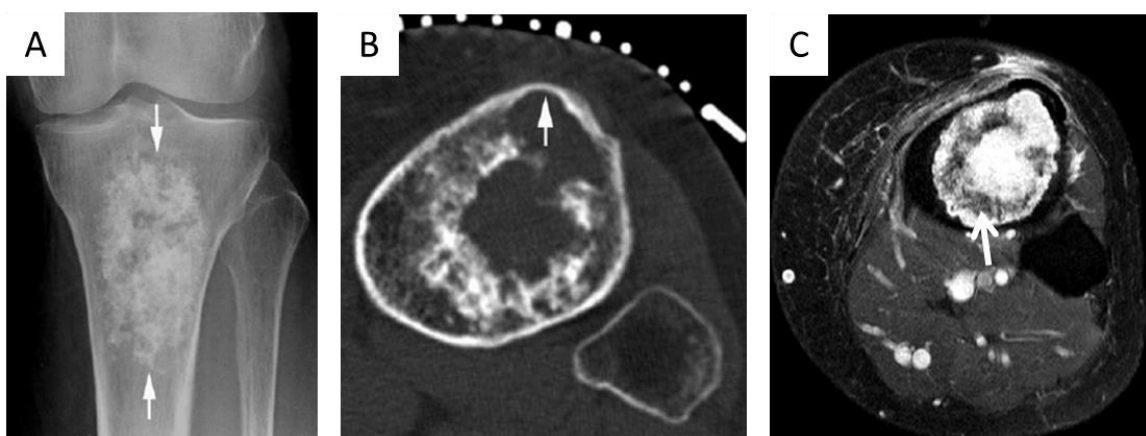


Figure 14 : Imagerie d'un chondrosarcome central de faible grade (adapté de Douis et Saifuddin)⁴⁸
(A : radiographie du genou montrant la lésion entre les deux flèches ; B : scanner en coupe axiale permettant d'observer la lyse endo-corticale non visible sur la radiographie (flèche) ; C : IRM en coupe axiale pondérée en T₂, hypersignal de la matrice chondroïde. La calcification de la matrice apparaît en hyposignal (flèche)

Introduction bibliographique

Le bilan d'extension locorégional de la tumeur lors du bilan pré-thérapeutique est donc basé sur un scanner pour l'atteinte osseuse et une IRM qui précise l'extension aux parties molles afin de définir la stratégie opératoire. Le scanner est également utilisé pour le bilan d'extension à distance, notamment au niveau pulmonaire, localisation habituelle des métastases du chondrosarcome et est complétée par une scintigraphie osseuse standard avec des radiopharmaceutiques au technétium 99m (^{99m}Tc ($t_{1/2} = 6,02$ heures, E_{γ} max. = 141 keV)) tels que le méthylènediphosphonate (MDP) ou l'hydroxyméthylènediphosphonate (HMDP).

Bien que ces diverses techniques permettent d'évoquer un diagnostic, l'analyse histologique de la tumeur s'avère essentielle afin de mettre en place un protocole thérapeutique adapté au degré d'agressivité de la tumeur. Il faut toutefois prendre en considération l'hétérogénéité des tumeurs : le prélèvement peut parfois ne pas être représentatif de l'agressivité réelle de la tumeur.

E. Traitements pour la prise en charge du chondrosarcome

À ce jour, les outils thérapeutiques disponibles pour la prise en charge des patients atteints de chondrosarcomes sont très limités. La chirurgie est toujours considérée comme le pilier du traitement et est le seul recommandé pour le chondrosarcome non métastatique, et ce quel que soit le grade ou le sous-type de chondrosarcome. Pour un chondrosarcome de grade I, un simple curetage peut être réalisé alors que pour les tumeurs de haut grade, une résection chirurgicale avec des marges d'excision larges dans les tissus sains environnants est préconisée. Une chirurgie bien conduite, c'est à dire ayant permis une exérèse complète des tissus tumoraux est associée à de faibles taux de récives locales avec une survie globale augmentée. Toutefois, une excision large de la tumeur n'est pas toujours réalisable compte tenu de la localisation anatomique (colonne vertébrale ou crâne) ou serait associée à une morbidité considérable pour le patient.

Aussi, le chondrosarcome souffre encore d'une prise en charge thérapeutique insatisfaisante, notamment dans le cas de chondrosarcomes récidivants, métastatiques ou inopérables.

En ce qui concerne la radiothérapie et la chimiothérapie conventionnelle, le chondrosarcome est connu comme une lésion résistante, et ce en raison de plusieurs facteurs :

- **La présence d'une matrice extracellulaire dense et faiblement vascularisée.** Cette dernière limite l'accès des principes actifs jusqu'aux cellules cancéreuses¹².
- **La faible division cellulaire des chondrocytes.** La plupart des agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie cytostatiques agissant sur le cycle cellulaire, les chondrocytes tumoraux y sont faiblement sensibles dû à une faible capacité à se diviser³⁹.
- **La présence de la P-glycoprotéine (P-gp), codée par le gène MDR-1.** La P-gp est en effet largement exprimée par les chondrocytes tumoraux. Une étude a démontré que 90% des biopsies de patients atteints de tumeur du cartilage bénigne ou maligne exprimaient la P-gp⁴⁹. Cette dernière joue un rôle majeur dans l'efflux hors de la cellule de petites molécules hydrophobes comme celles fréquemment utilisées en chimiothérapie⁵.
- **Un environnement hypoxique.** Caractérisé par une faible teneur en oxygène, cet environnement entrave notamment l'efficacité de la radiothérapie. En effet, la cytotoxicité de la radiothérapie est due pour une large part, à la formation d'espèces radicalaires (ROS) issues de l'ionisation par les rayonnements de l'oxygène environnant³⁹.

Ainsi, aucune chimiothérapie classique n'a conduit à ce jour à une amélioration globale de la survie des patients, comparativement à la chirurgie^{10,50-52} et ceci malgré divers essais cliniques avec par exemple la doxorubicine, le cisplatine, le cyclophosphamide, l'ifosfamide ou le méthotrexate,

Introduction bibliographique

utilisés seuls ou parfois en association, en traitement adjuvant ou néoadjuvant. Ces essais se sont parfois montrés contradictoires, peut-être en raison du faible nombre de patients pouvant être inclus dans les études. En effet le chondrosarcome est une maladie orpheline présentant de surcroît peu de cas non opérables ou de stade métastatique.

Récemment, et en lien avec l'amélioration des connaissances de la physiopathologie de ce cancer, de nouvelles thérapies ciblant différentes voies de signalisation cellulaires ont été évaluées dans le cadre d'études précliniques voire cliniques. Parmi ces nouvelles cibles thérapeutiques nous pouvons citer :

- **L'isocitrate deshydrogénase (IDH)** qui catalyse la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate (α KG) dans le cycle de Krebs. Cette réaction peut être réalisée par les trois isoformes de l'enzyme IDH1, IDH2 et IDH3. Des mutations sur les gènes codant pour l'expression des enzymes IDH1 et IDH2 ont été retrouvées dans les chondrosarcomes centraux ainsi que dans les chondrosarcomes dédifférenciés et du périoste⁵³, mais également dans les enchondromatoses (maladie d'Ollier et syndrome de Maffucci)^{54,55}. Les enzymes mutées acquièrent la capacité de convertir l' α KG en delta-2-hydroxyglutarate, un oncométabolite. Ce dernier perturbe les réactions enzymatiques dépendantes de l' α KG et conduit *in fine* la cellule, par modification de son métabolisme et régulation épigénétique, à évoluer vers un phénotype tumoral⁵⁶. Deux études portant sur un inhibiteur spécifique de IDH-1 muté (AGI-5198) montrent des résultats contradictoires quant à l'effet de cet inhibiteur sur la viabilité, la prolifération et la migration cellulaire dans le cadre du chondrosarcome^{57,58}. Deux autres inhibiteurs de IDH-1 muté sont actuellement en cours d'essai clinique de phase I ou I/II pour cette pathologie (Tableau 4).
- **La voie Hedgehog** est une voie constitutive de la régulation de la croissance et de la différenciation des cellules durant l'embryogenèse ainsi que du maintien de l'homéostasie tissulaire post-embryonnaire. Les glycoprotéines Hedgehog se lient à des récepteurs transmembranaires homologues de Patched (PTCH), ce qui va entraîner la libération d'une protéine transmembranaire SMO (*smoothened*) et lui permettre d'induire une cascade d'évènements moléculaires, conduisant *in fine* à l'expression de gènes impliqués dans la croissance et la division cellulaire. Une dérégulation de la voie Hedgehog IHH/PTHrP (Indian Hedgehog/Parathyroïd hormone-related protein) a été démontrée dans plusieurs tumeurs bénignes ou malignes du cartilage, conduisant au maintien des chondrocytes tumoraux dans un état de prolifération⁵⁹. Des études précliniques menées chez la souris avec un inhibiteur de cette voie de signalisation IPI-926 (saridegib) ont montré une réduction du volume tumoral comparativement au groupe contrôle⁶⁰. Une étude clinique de phase II avec un autre inhibiteur de la voie Hedgehog (GDC-0449 ou vismodegib) a été menée chez des patients atteints de chondrosarcomes de stades avancés, sans toutefois permettre de montrer un réel bénéfice clinique au bout de six mois de traitement (stabilisation de la maladie uniquement pour 25% des patients)¹⁰. Un autre essai clinique de phase II chez des patients atteints de chondrosarcome est actuellement en cours avec cet inhibiteur (Tableau 4).
- **m-TOR dans la voie PI3K-Akt-mTOR.** Cette voie est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la croissance et la survie. Dans les cancers solides, l'activation de mTOR (mammalian target of rapamycin) est liée aux propriétés invasives et métastatiques des tumeurs solides⁶¹. L'activation de cette voie de signalisation a été mise en évidence dans les chondrosarcomes conventionnels et dédifférenciés⁶². Une étude préclinique sur un modèle de rat porteur de chondrosarcome de grade II a montré, après traitement adjuvant avec un inhibiteur de mTOR (évérolimus), un ralentissement de la croissance

Introduction bibliographique

tumorale comparativement au groupe contrôle⁶³. Une étude clinique de phase I/II a été réalisée avec le temsirolimus (prodrogue de la rapamycine) en combinaison avec de la doxorubicine lyosomale, chez des patients atteints de sarcomes, dont deux étaient porteurs de chondrosarcomes, afin de déterminer la dose optimale de la combinaison des deux agents de chimiothérapie pour un traitement. Il semblerait que le temsirolimus agirait plus comme un sensibilisant à la chimiothérapie à la doxorubicine qu'en tant qu'agent antinéoplasique⁶⁴.

D'autres études de phases cliniques sont actuellement en cours en combinaison avec la chimiothérapie ou l'immunothérapie avec des dérivés de la rapamycine chez des patients atteints de chondrosarcomes (Tableau 4).

- **Les protéines kinases** sont d'importants médiateurs impliqués notamment dans la prolifération, l'angiogenèse, la survie, ou encore la migration cellulaire, en réponse à des stimulations intra ou extracellulaires par le biais de protéines kinases. Une surexpression de ces dernières telles que (1) les Src, qui sont une famille de kinases jouant un rôle de régulation de la transduction des signaux cellulaires originalement envoyés depuis la surface de la cellule, (2) le VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) ou bien encore (3) le PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), tous deux impliqués dans l'angiogenèse, a été retrouvée dans le cas du chondrosarcome⁶⁵⁻⁶⁷.

L'imatinib, inhibant entre autre le PDGFR dans le cadre d'un essai de phase II, n'a conduit à aucun bénéfice clinique significatif, une stabilisation de la progression de la maladie à 4 mois n'a été observé que pour 8 patients sur les 26 de l'étude⁶⁸.

Lors d'un essai clinique de phase I/II, un autre inhibiteur de VEGFR et PDGFR, le pazopanib, a conduit à une stabilisation de la maladie (entre 5 et 26 mois)⁶⁹ pour cinq des sept patients traités dont six étaient atteints de chondrosarcome au stade métastatique.

Face à ces résultats prometteurs, d'autres inhibiteurs de kinases sont en cours d'évaluation cliniques pour le traitement du chondrosarcome.

- **L'immunothérapie** vise, parmi les diverses approches englobées dans ce terme, à restaurer la réponse immunitaire notamment face aux cellules cancéreuses. Parmi la pléthore de cibles en oncologie utilisant ce type de stratégie, on peut citer le système PD-1 (programmed cell death-1) / PD-L1 (programmed cell death ligand-1). La protéine PD-L1 exprimée par les cellules cancéreuses se lie au récepteur PD-1 des lymphocytes T inhibant la réponse immunitaire et permettant à la cellule cancéreuse d'échapper à la mort cellulaire. Des études ont été réalisées sur des biopsies de patients atteints de chondrosarcome (types non précisés) et ont montré une surexpression de l'antigène PD-1 par les lymphocytes T du stroma tumoral, environ dix fois plus importante que dans les tissus osseux sains pris comme contrôle⁷⁰. L'antigène PD-L1 a quant à lui été retrouvé exclusivement dans les cas de chondrosarcomes dédifférenciés⁷¹. Un anticorps monoclonal anti-PD-1, le pembrolizumab, a été utilisé dans le cadre d'un essai clinique de phase II sur les sarcomes des tissus mous et des os (SARC028 ou NCT02301039)⁷². Parmi les cinq patients atteints de chondrosarcomes dédifférenciés, seules une réponse partielle et une stabilisation, suite au traitement avec le pembrolizumab, ont pu être observées.

Une autre étude clinique de phase II est actuellement en cours pour le traitement des chondrosarcomes mettant en jeu une combinaison d'immunothérapies (*i.e.* anti-CTLA4/anti-PD-1) (Tableau 4).

- **Les histones désacétylases** sont une clé du mécanisme de la régulation de l'expression des gènes. Une étude préclinique a montré que le traitement avec la romidepsine, inhibiteur des histones désacétylases, entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose des cellules de chondrosarcome, ainsi qu'un ralentissement significatif de la croissance tumorale sur modèle

Introduction bibliographique

murin de xénotransplante de chondrosarcome⁷³. Cette molécule fait l'objet d'un essai clinique de phase II chez des patients atteints de chondrosarcomes (Tableau 4).

Cible	Molécule utilisée	Mécanisme d'action	Essai clinique
IDH	AG-120	inhibiteur des mutants IDH1	NCT02073994 phase I
	AG-221	inhibiteur des mutants IDH2	NCT02273739 phase I/II
voie Hedgehog	vismodegib	inhibiteur de la voie Hedgehog	NCT01267955 phase II
mTOR	sirolimus + cyclophosphamide	inhibiteur de mTOR + chimiothérapie	NCT02821507 phase II
	nab-rapamicyne + nivolumab	inhibiteur de mTOR + immunothérapie	NCT03190174 phase I/II
inhibiteurs de kinases	pazopanib	inhibiteur mixte de protéines kinases (VEGFR 1, 2, 3, PDGFR α , β et c-KIT)	NCT01330966 phase II
	pazopanib + radiothérapie		NCT02180867 phase II/III
	regorafenib	inhibiteur mixte de protéines kinases (VEGFR 1, 2, 3, TIE2, KIT, RET, RAF-1, BRAF, PDGFR et FGFR)	NCT02389244 phase II
	imatinib	inhibiteur puissant de BCR-ABL ainsi que d'autres protéines kinases	NCT00928525 phase II
histones désacétylases	romidepsine	inhibiteur d'histone désacétylase	NCT00112463 phase II
immunothérapie	ipilimumab + nivolumab	inhibition de l'antigène (CTLA-4) (activation de la réponse immunitaire) + anti PD-1	NCT02982486 phase II

Tableau 4 : Essais cliniques en cours ciblant différentes voies de signalisation du chondrosarcome pour la prise en charge thérapeutique des patients

Toutes ces stratégies thérapeutiques et bien d'autres encore, cette liste n'étant pas exhaustive, ne sont qu'à l'état d'essais cliniques ne dépassant pas la phase II. Aucune n'a actuellement été approuvée par les autorités de santé dans le cadre du chondrosarcome. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques reste donc encore un enjeu majeur pour la prise en charge de cette pathologie.

Bien que dotés d'une meilleure spécificité que les traitements classiques en s'appuyant sur une distinction entre tissus tumoraux et tissus sains, les thérapies ciblées ne sont toutefois pas dépourvues d'effets indésirables pour le patient. Parallèlement, le microenvironnement tumoral ou stroma qui entourent les cellules malignes apparaît depuis plusieurs années comme une cible pertinente pour le développement de nouvelles thérapies.

Dans le cadre du chondrosarcome, l'hypoxie et la forte teneur en protéoglycanes du microenvironnement nous apparaissent pertinentes pour développer une thérapie plus spécifique en combinant deux stratégies :

- les **prodrogues** : molécules inactives jusqu'au site tumoral puis activées *in situ* pour libérer une entité cytotoxique, par le biais d'une « gâchette », c'est à dire un groupement chimique qui s'active au niveau de la tumeur par un mécanisme spécifique,
- les **thérapies vectorisées « Drug Delivery »** : technique utilisant un ligand spécifique d'un tissu tumoral pour contrôler la distribution d'un principe actif, en augmentant sa délivrance au niveau du site tumoral tout en limitant sa diffusion au niveau des tissus sains.

II. Le concept de prodrogue

Une fois administré dans l'organisme, un médicament doit surmonter un certain nombre d'obstacles avant d'atteindre sa cible biologique, à savoir des barrières biopharmaceutiques (désintégration, dissolution, stabilité), pharmacocinétiques (absorption, distribution, métabolisme et excrétion - ADME) et pharmacodynamiques (Figure 15). Par exemple, des problèmes de solubilité et/ou de stabilité de la substance active peuvent restreindre les modes et voies d'administration, de même que les doses administrables. Egalement, après absorption, la substance active va subir des réactions métaboliques principalement au niveau hépatique en vue de son élimination, limitant la dose disponible au niveau de la cible biologique visée. Certaines structures voient également leur utilisation limitée par leur toxicité pouvant être liée à un profil pharmacocinétique inadapté (e.g. accumulation dans un organe ou tissu non cible, surdosage après administration répétée en raison d'une demi-vie plasmatique trop importante, etc...).

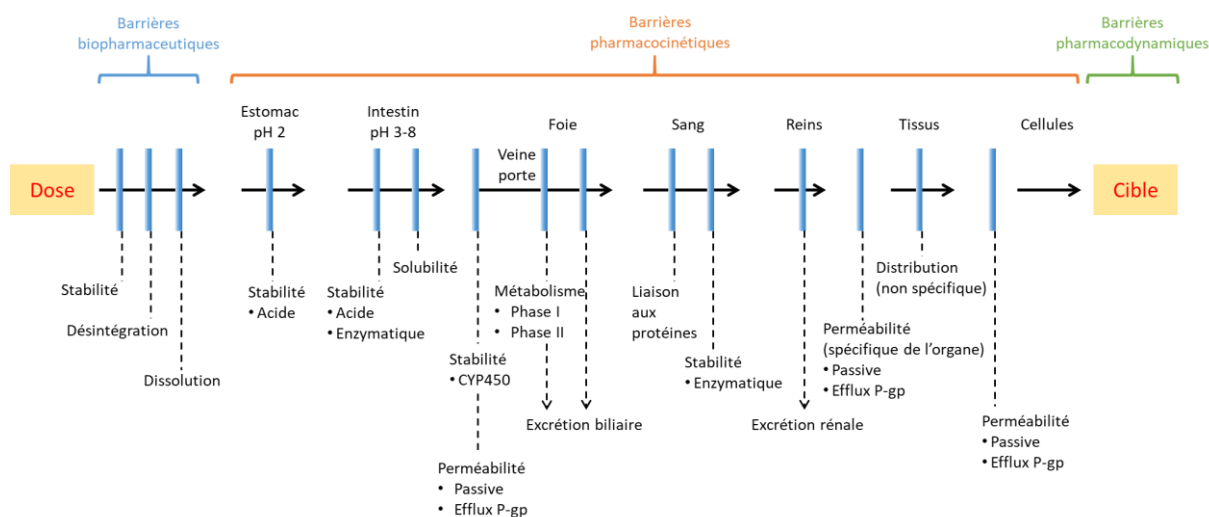


Figure 15 : Ensemble des barrières rencontrées par une substance active après son administration au sein d'un organisme (adapté de Kerns et al.)⁷⁷

Afin de surmonter ces différents obstacles, il s'avère judicieux de pharmacomoduler la substance active afin de la doter des propriétés physico-chimiques associées au meilleur profil pharmacologique, c'est ce que l'on retrouve dans la littérature sous le terme de « drug-like properties ». C'est dans ce contexte que le concept de prodrogue prend tout son intérêt. En effet, les **prodrogues** sont des molécules qui, une fois transformées *in vivo* grâce à une réaction enzymatique et/ou chimique, permettent de libérer une substance active (Figure 16)⁷⁸. Sans activité pharmacologique propre, les prodrogues modifient temporairement les propriétés physico-chimiques d'une substance active lui permettant ainsi de franchir certaines des barrières biopharmaceutiques et/ou pharmacocinétiques évoquées précédemment.

Introduction bibliographique

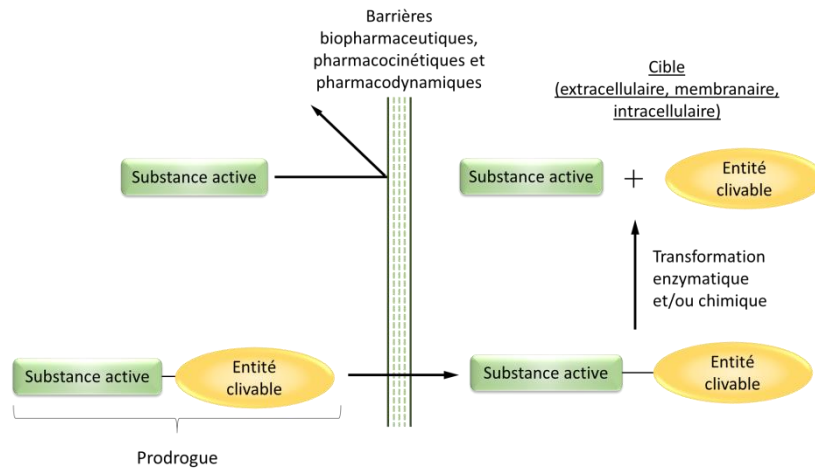


Figure 16 : Illustration simplifiée du concept de prodrogue⁷⁸

Le concept de prodrogue a été introduit en thérapeutique en 1899 par Schering avec la méthénamine (ou hexamine) qui a disposé d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) comme antiseptique pour le traitement des troubles de l'appareil urinaire. La méthénamine seule ne possède pas de propriétés antibactériennes. Cependant, lorsqu'elle se trouve dans les urines en condition acide, elle réagit avec l'eau pour donner entre autres six équivalents de formaldéhyde doté de propriétés antibactériennes (Figure 17).

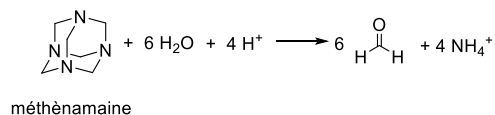


Figure 17 : Activation de la méthénamine dans les urines en milieu acide

Toutefois, le terme prodrogue n'est apparu qu'en 1958 lors d'une publication d'Albert⁷⁹, où il fit état de substances qui franchissent les barrières physiologiques, puis subissent une biotransformation, libérant un métabolite plus efficace que la molécule administrée. Quelques années plus tard, il s'excusera dans son livre « Selective toxicity : the physico-chemical basis of therapy⁸⁰ » en ajoutant que le terme de « pré-drogue » aurait été préférable pour décrire ce qu'il voulait exposer. Le mot "pro-drogue" étant tombé dans le langage commun, le terme de "pré-drogue" ne put le supplanter.

C'est à partir des années 70 que le nombre de publications sur les prodrogues augmente de manière significative. A ce jour, les prodrogues, en constant développement, représentent environ 10% des molécules sur le marché comme par exemple l'oméprazole, le ténofovir alafénamide, le valaciclovir ou l'oseltamivir. En cancérologie, nous pouvons par exemple citer l'estramustine phosphate, l'irinotecan, la mitomycine C, le cyclophosphamide ou la capécitabine.

Actuellement, la conception de prodrogues est réalisée pour répondre à trois obstacles majeurs rencontrés lors du développement de nouvelles substances actives, à savoir des problèmes liés à:

Introduction bibliographique

- la formulation et/ou l'administration (stabilité, solubilité dans l'eau, ...),
- l'absorption, la biodistribution et le métabolisme (perméabilité membranaire, balance hydrophilie/lipophilie, durée d'action, ...),
- la toxicité et les effets secondaires nuisant à l'index thérapeutique de la substance active.

Dans ce cadre, la structure de base de la substance active va être modifiée afin de tenter d'aboutir *in fine* à une prodrogue « idéale », dotée des caractéristiques suivantes :

- bonne stabilité lors de la phase d'absorption,
- bonne solubilité en milieu aqueux,
- bonne perméabilité membranaire,
- bonne cinétique de libération de la substance active.
- faible voire absence d'activité pharmacologique de la prodrogue,
- absence de toxicité des fragments libérés conjointement à la substance active.

Dans ce chapitre, nous allons détailler ces différents points, en nous appuyant sur quelques exemples de la littérature et notamment de prodrogues développées dans le cadre de la cancérologie. Le dernier point concernant la toxicité sera plus largement développé car ayant plus attrait à notre problématique.

A. Intérêt des prodrogues

Le choix de la voie d'administration d'un médicament s'appuie sur divers paramètres pharmacologiques comme le type de pathologie, la vitesse et/ou la durée d'action recherchée, etc, mais est largement conditionnée par les caractéristiques physico-chimiques du composé (stabilité, solubilité dans l'eau, lipophilie, ...).

1. Formulation et administration : importance de l'hydrosolubilité

L'hydrosolubilité d'une substance active est un facteur déterminant de sa biodistribution, nécessitant le développement de formulations adaptées à son utilisation par voie orale ou injectable. Prenons comme exemple, la voie orale : après administration d'une forme pharmaceutique *per os*, la substance active doit être libérée puis avoir une bonne solubilité en phase aqueuse, indispensable à sa résorption au niveau des parois du tractus gastro-intestinal. Il en va de même lors d'une administration par voie intraveineuse, utilisable uniquement pour des produits hydrosolubles.

Afin d'augmenter transitoirement l'hydrosolubilité d'une substance active, une entité hydrophile peut lui être liée par l'intermédiaire d'une liaison covalente « réversible ». Ces entités hydrophiles peuvent être des groupements ionisables (*e.g.* phosphates, amines, acides, ...), des groupements polaires (sucres, acides aminés, ...) ou encore des polymères comme les polyéthylènes glycols (PEG) illustrés dans les exemples suivant (Tableau 5) avec des gains de solubilité dans l'eau allant de 10 à 50000.

Introduction bibliographique

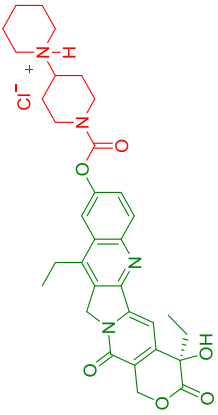
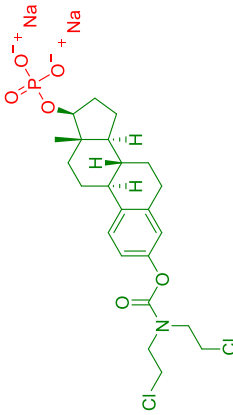
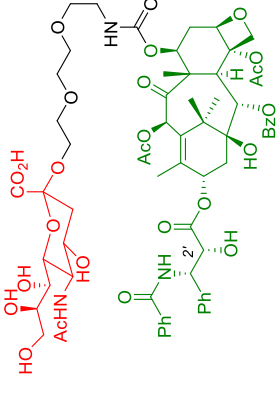
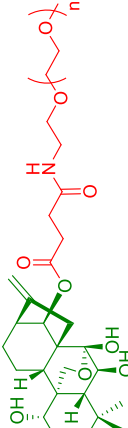
Prodrogue	Structure	Entité hydrophile introduite	Substance active	Biotransformation	Utilisation	Hydrosolubilité (facteur d'augmentation de la solubilité)
Utilisation d'un groupement ionisable						
irinotecan (Campto®)		chlorhydrate d'amine tertiaire	SN-38	hydrolyse du carbamate dans le plasma ou le foie	traitement des cancers colorectaux ⁸⁸	20 mg.mL ⁻¹ à pH = 3-4 versus 2-3 µg.mL ⁻¹ (10000) ^{78,81}
estramustine phosphate (Estracyt®)		phosphate	estramustine	déphosphorylation dans le tube digestif	traitement du cancer de la prostate hormono-résistant ⁸⁹	50 mg.mL ⁻¹ versus 1 µg.mL ⁻¹ (50000) ^{82,83}
Utilisation d'un groupement hautement polaire						
paclitaxel conjugué à l'acide sialique		acide sialique	paclitaxel (Taxol®)	non déterminé	traitement des cancers (sein, ovaire, broncho-pulmonaire non à petites cellules, sarcomes de Kaposi associés au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)) ⁹⁰	28 mg.mL ⁻¹ versus < 0,3 mg.mL ⁻¹ (100) ^{84,85}
oridonine conjuguée à un PEG		PEG (5 kDa)	oridonine	non déterminé	traitement des leucémies myéloïdes aiguës ⁹¹	74 mg.mL ⁻¹ versus 1 mg.mL ⁻¹ (70) ^{86,87}

Tableau 5 : Structures de prodrogues conçues pour augmenter l'hydrosolubilité de la substance active

2. Absorption

L'utilisation de prodrogues pour augmenter l'absorption d'une substance active est principalement documentée dans le cas d'une administration par voie orale, les problèmes étant de posséder une bonne stabilité à pH acide et de traverser les barrières phospholipidiques du tractus gastro-intestinal pour atteindre la circulation systémique. Le passage des barrières épithéliales se fait essentiellement par diffusion passive mais également grâce à des transporteurs d'influx. Cette absorption peut être contrecarrée par des transporteurs d'efflux comme la P-gp, conduisant à une baisse de l'efficacité de la substance active (Figure 18).

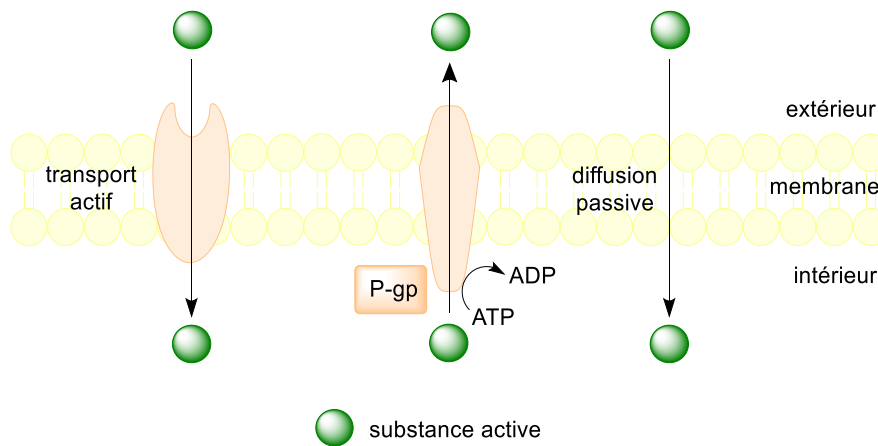


Figure 18 : Principales voies de transports membranaires des substances actives

La résorption passive d'une substance active est principalement conditionnée par sa lipophilie qui est quantifiée par le coefficient de partage ou de distribution. Si l'hydrosolubilité est importante pour la phase biopharmaceutique, la lipophilie est tout aussi importante pour la phase d'absorption : l'enjeu pour une substance active est donc d'afficher un bon équilibre hydrophilie/lipophilie, c'est-à-dire un bon compromis entre solubilité et perméabilité. Compte tenu de ces propriétés, les substances actives peuvent être classées en quatre grandes catégories biopharmaceutiques telles que décrites ci-après dans le Tableau 6.

Classe	Solubilité	Perméabilité	Conséquence sur l'absorption
I	Haute	Haute	Bien absorbé
II	Basse	Haute	Bien absorbé
III	Haute	Basse	Variable
IV	Basse	Basse	Faiblement absorbé

Tableau 6 : Classification biopharmaceutique des substances actives en fonction de la solubilité et de la perméabilité conditionnant leur absorption par voie orale (adapté de Khadka et al.)⁹²

Introduction bibliographique

Les molécules de classes III et IV possèdent une absorption limitée en lien avec leur faible perméabilité. Une des solutions pour améliorer ce paramètre consiste à augmenter leur lipophilie *via* par exemple la diminution du caractère polaire de certaines des fonctions chimiques présentes (Figure 19). Ainsi, une substance active possédant une ou plusieurs fonctions acide carboxyliques peut être mal résorbée au niveau du tractus intestinal en raison de la formation d'ions carboxylates. Dans ce cadre, il apparaît judicieux de convertir ces dernières, par exemple en fonctions esters afin de réduire transitoirement leur caractère polaire, sachant que ces dernières pourront ultérieurement être hydrolysées par des estérases. Les esters méthyliques sont néanmoins proscrits de cette liste car libérant du méthanol, toxique pour l'organisme, après hydrolyse. Suivant une stratégie similaire, la polarité des fonctions alcools, amines, phosphates ou phosphonates peut également être modérée *via* leur conversion par exemple en fonctions esters, pour les alcools ou dérivés phosphorés, ou amides, pour les amines. Cette stratégie est toutefois limitée aux groupements permettant de retrouver après absorption et métabolisation la fonction initialement modifiée. Cette fonction doit se trouver dans la mesure du possible sur le pharmacophore de la molécule afin que sa fonctionnalisation entraîne une inhibition réversible d'activité. La connaissance du pharmacophore de la substance active et ses relations structure-activité (RSA) sont donc un prérequis nécessaire pour la conception d'une prodrogue.

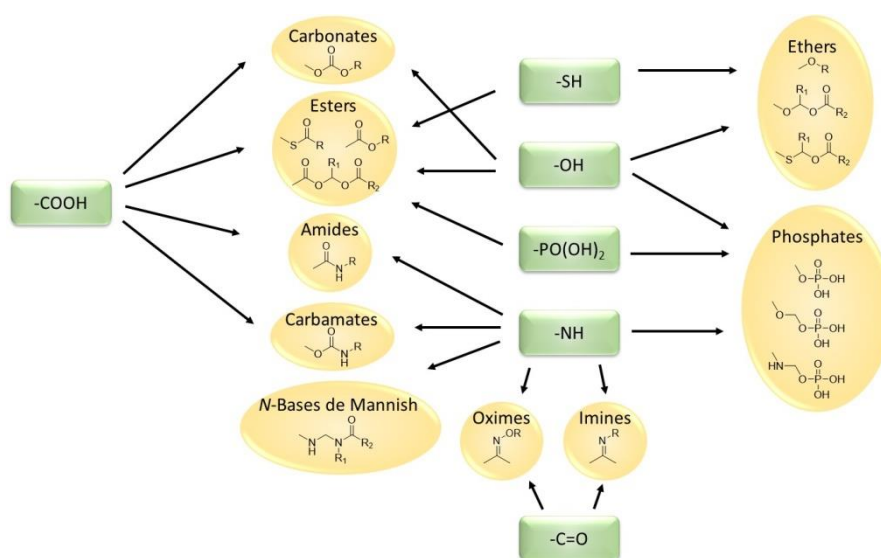


Figure 19 : Ensemble des fonctions chimiques de la substance active (vert) généralement modifiées pour concevoir une prodrogue (jaune) (adapté de Rautio et al.)⁷⁸

De nombreux principes actifs utilisés en thérapeutique ont ainsi été commercialisés sous la forme de prodrogues pour disposer d'une lipophilie adaptée à une administration par voie orale. Parmi les exemples pléthoriques de la littérature, nous pouvons notamment citer le valaciclovir, l'oseltamivir, l'olmesartan medoxomil, le dabigatran etexilate, la cefpodoxime proxétel ou encore le ténofovir disoproxyl fumarate (Tableau 7):

Introduction bibliographique

DCI de la prodrogue et nom de spécialité (usage thérapeutique)	Structure	Lieu de clivage	Résultats en termes de biodisponibilité de la substance active
Valaciclovir (Zelitrex®) <i>Prodrogue de l'aciclovir</i> (antiviral, virus de l'herpès)		Foie	Biodisponibilité de 54% versus 15-30% ⁹³
Oseltamivir (Tamiflu®) (antiviral, virus de la grippe)		Foie	Biodisponibilité de 75 % ⁹⁴ (Données non disponibles pour la substance active seule)
Olmesartan medoxomil (Alteis®) (hypertension)		Tractus intestinal	Biodisponibilité de 26 % ⁹⁵ (Données non disponibles pour la substance active seule)
Dabigatran etexilate (Pradaxa®) (anticoagulant)		Plasma	Biodisponibilité de 7 % ^{96,97} (Données non disponibles pour la substance active seule)
Cefpodoxime proxétil (Orelox®) (antibiotique)		Tractus intestinal	Biodisponibilité de 50 % ⁸¹ (Données non disponibles pour la substance active seule)
Ténofovir disoproxil fumarate (Viread®) (antiviral, virus d'immunodéficience humaine (VIH))		Plasma	Biodisponibilité de 25 % ⁹⁸ (Données non disponibles pour la substance active seule)

Tableau 7 : Structures de prodrogues conçues pour augmenter la lipophilie et donc la résorption par voie orale de la substance active

3. Métabolisme et distribution

Après son administration et son absorption, la biodisponibilité de la molécule sera encore dépendante de l'effet de premier passage hépatique. En effet, les réactions de métabolisations hépatiques peuvent conduire à une diminution importante de la concentration en substance active au niveau de la circulation sanguine, voie d'acheminement principale vers les tissus cibles. L'accès du principe actif à la cible cellulaire peut être également entravé par d'autres barrières telles que la fixation aux protéines plasmatiques, la stabilité plasmatique, la perméabilité (organe, cellules) ou encore leur profil pharmacocinétique (e.g. accumulation dans des tissus ou organes non-cibles) (Figure 15). Ce dernier point sera plus amplement développé ultérieurement car pouvant être à l'origine de toxicités. Ainsi métabolisme et distribution se répercutent sur l'efficacité, la toxicité et donc l'index thérapeutique de la substance active.

Dans la littérature, nous retrouvons là encore des exemples de prodrogues conçues pour contourner ce type de barrières dont à titre d'exemple (Figure 20) :

- Le ténofovir alafénamide fumarate (Descovy®), un antiviral inhibiteur de la transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH)-1 et de la polymérase du virus de l'hépatite B., est une prodrogue du ténofovir sous forme d'un phosphonamide. Après pénétration passive dans les cellules infectées, l'ester est clivé par la cathepsine A. Après cyclisation intramoléculaire et libération de phénol, l'acide phosphonamidique est hydrolysé. Ce dernier métabolite, le ténofovir, est diphosphorylé pour devenir actif. Contrairement au ténofovir disoproxil fumarate, le ténofovir alafénamide fumarate est plus stable au niveau plasmatique ce qui permet d'augmenter la dose délivrée au niveau des cellules infectées donc, son efficacité et de diminuer sa toxicité rénale⁹⁹.
- Le bambuterol (Oxéol®), est une prodrogue obtenue par fonctionnalisation des groupements phénoliques de la terbutaline. Cette molécule est un bronchodilatateur par effet agoniste spécifique des récepteurs β_2 -adrénergiques, sans effet relaxant propre. L'intérêt de cette prodrogue est multiple : (1) bonne stabilité métabolique, acquise par la présence des fonctions carbamates protégeant les fonctions phénols de l'oxydation lors du premier passage hépatique, (2) concentration accrue au niveau pulmonaire comparativement à d'autres organes comme le cœur, (3) conversion enzymatique *in situ* lente en terbutaline par des butyrylcholinestérases, (4) molécule très lipophile avec une absorption digestive lente. L'ensemble de ces caractéristiques pharmacocinétiques lui assure une durée d'action prolongée, tout en minimisant le taux de terbutaline circulante, source d'effets indésirables¹⁰⁰, et permet une administration orale en une dose quotidienne unique, contrairement à la terbutaline nécessitant 3 prises par jour¹⁰¹.
- L'antiagrégant plaquettaire, le clopidogrel (Plavix®), est un bioprécurseur*. Le mécanisme d'action implique la formation d'un pont disulfure entre les récepteurs de l'adénosine diphosphate (ADP) des plaquettes et un métabolite actif du clopidogrel obtenu après oxydation hépatique par les cytochromes P450 2C19 (CYP2C19), entraînant une inhibition irréversible de l'agrégation plaquettaire (Figure 20)¹⁰². Toutefois 85% de la dose absorbée de clopidogrel est hydrolysée par des estérases pour donner un métabolite acide carboxylique

* Certaines classifications font un distinguo entre les prodrogues et les bioprécurseurs, qui sont des prodrogues non conçues de façon rationnelle et dont le mécanisme d'action a été découvert à posteriori après identification d'un métabolite actif. Celui-ci n'est pas issu d'une simple réaction d'hydrolyse mais provient d'une réaction métabolique d'oxydation ou de réduction. La connaissance de la voie d'activation permet alors la conception, cette fois-ci rationnelle, de nouvelles prodrogues.

Introduction bibliographique

totalemment inactif. Ainsi, seul 15% du clopidogrel absorbé va être converti en métabolite actif¹⁰³, après oxydation par les cytochromes P450 sachant que cette dernière est sujette à d'importante variabilité inter-individuelle (polymorphisme génétique des CYP450).

Pour pallier à ce problème d'inactivation, deux modifications structurales majeures ont été introduites donnant naissance au prasugrel (Efient®). La première a consisté à remplacer la fonction ester méthylique du clopidogrel par une cétone ne pouvant plus être inactivée par les estérases. La seconde a permis, *via* l'introduction d'une fonction hydroxyle en position 2 du thiophène, d'éviter l'étape d'oxydation hépatique rendant ainsi l'efficacité du prasugrel moins dépendante de la variabilité génétique.

Introduction bibliographique

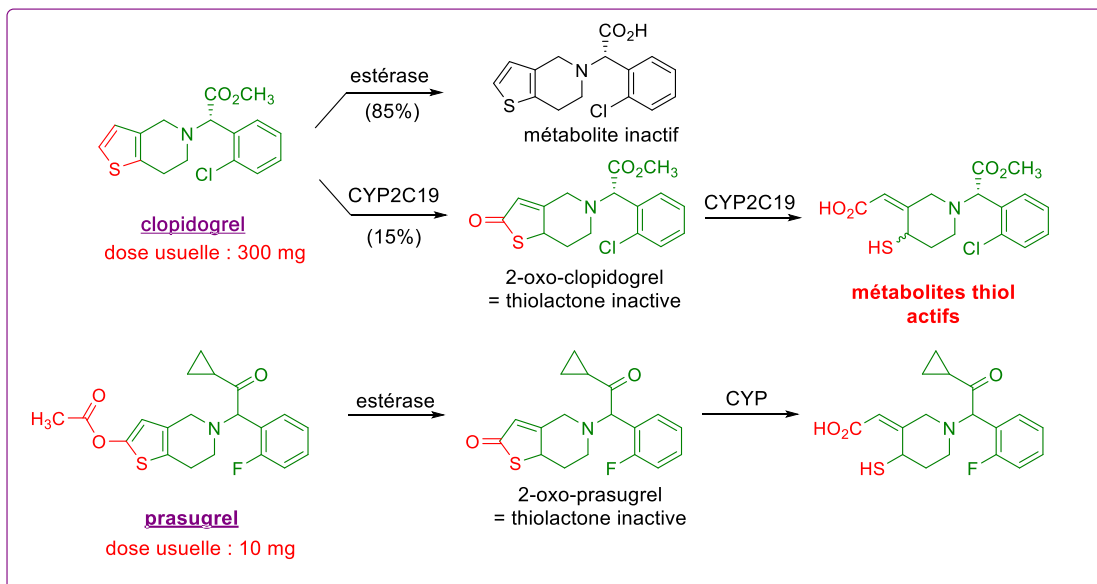
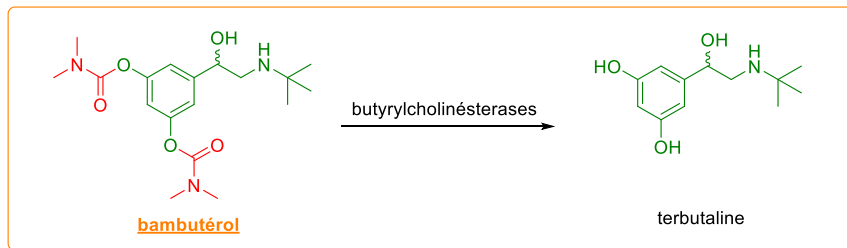
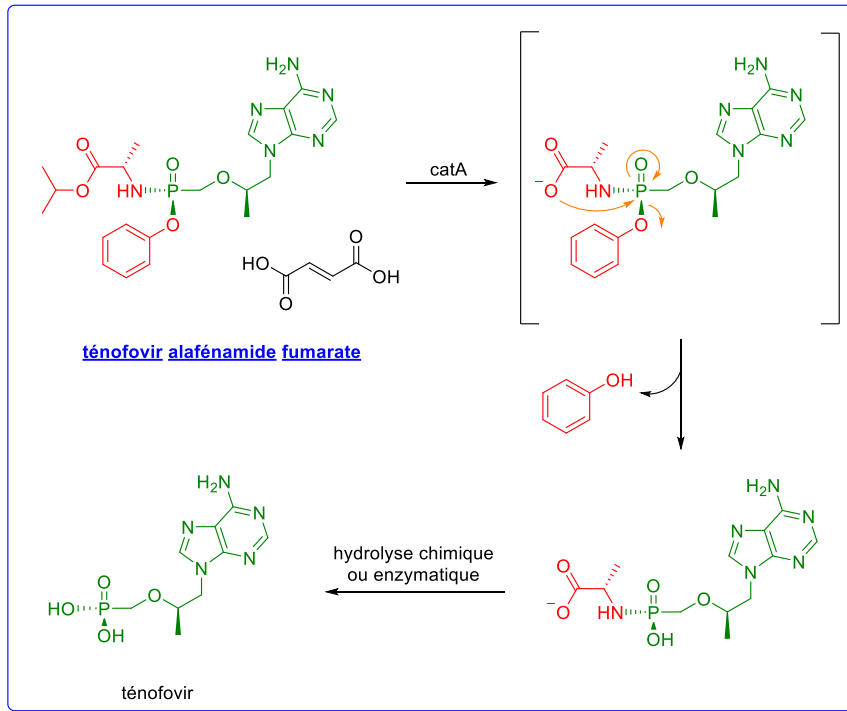


Figure 20 : Structures de prodrogues conçues pour pallier à des problèmes de métabolisation, de distribution et de durée d'action de la substance active^{102,104,105}

4. Toxicité

Pour reprendre les mots de Paracelse « Tout est poison et rien n'est sans poison; la dose seule fait que quelque chose n'est pas un poison ». La toxicité d'une substance active est d'abord une question de dose à laquelle elle est administrée. Est considérée comme toxique toute substance capable de perturber le fonctionnement normal d'un organisme vivant. La toxicité liée à une substance peut prendre plusieurs formes : la toxicité locale qui survient au point de contact ; la toxicité systémique qui survient dans un tissu ou un organe éloigné du point de contact ; la toxicité chronique qui survient après une exposition prolongée ; la toxicité aigüe qui intervient dans un temps court après l'exposition.

En médecine, la toxicité d'une substance active peut être liée à plusieurs facteurs. On peut citer par exemple :

- Un manque de spécificité conduisant à l'action de la substance active sur différentes cibles autres que la cible souhaitée.
- Une transformation de la molécule en un métabolite plus toxique.
- Une accumulation dans des organes non cible.
- L'engendrement de plusieurs actions par le biais d'une seule molécule.
- Une allergie.
- Une photosensibilité de la molécule.

L'utilisation de prodrogues peut être une solution pour remédier à ces problèmes de toxicité. La capecitabine (Xeloda®) est le témoin du succès de cette approche de prodrogues en cancérologie (Figure 21). La capecitabine est une prodrogue du 5-fluorouracile (5-FU) (appartenant à la famille des anti-métabolites) et est utilisée en chimiothérapie anticancéreuse dans la prise en charge des cancers colorectaux, du sein et de l'estomac¹⁰⁶. La capecitabine est en fait une triple prodrogue, c'est-à-dire qu'elle a besoin de trois activations successives par des enzymes différentes pour libérer le 5-FU. La première biotransformation est réalisée dans le foie alors que la dernière impliquant la thymidine-phosphorylase est réalisée essentiellement au sein de la tumeur, cette enzyme étant surexprimée dans les tissus tumoraux. Ces biotransformations permettent ainsi de diminuer la toxicité du 5-FU en augmentant sa concentration au sein de la tumeur comparativement aux organes sains¹⁰⁷.

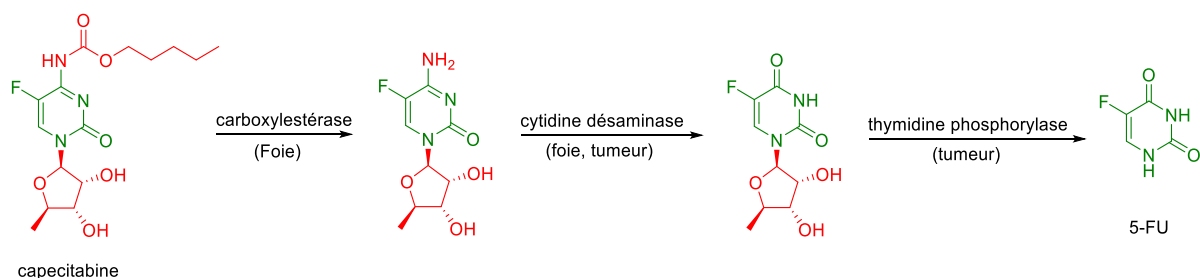


Figure 21 : La capecitabine, un exemple de prodrogue utilisée en oncologie afin de diminuer la toxicité de l'agent cytotoxique

En oncologie, la toxicité des substances actives est un des problèmes majeurs limitant leur utilisation. Pour les agents cytotoxiques par exemple, elle est inhérente à une distribution non contrôlée de la substance active dans l'organisme. Une des stratégies pouvant être utilisée afin d'améliorer leur profil pharmacocinétique et réduire leurs effets secondaires, consiste à adresser

Introduction bibliographique

sélectivement l'agent anticancéreux vers les différents foyers tumoraux comme par exemple via l'utilisation d'une libération contrôlée d'un principe actif ou bien encore le développement de thérapies vectorisées.

B. Les prodrogues vectorisées en cancérologie

Dans l'arsenal thérapeutique du clinicien se trouve principalement huit grandes familles d'agents antinéoplasiques (Figure 22) :

- Les antimétabolites (5-FU, methotrexate)
- Les agents mono ou di alkylants de l'ADN (cyclophosphamide, *cis*-platine, mitomycine C, témozolomide)
- Les intercalant de l'ADN (doxorubicine, mitoxantrone)
- Les inhibiteurs de topoisomères I et II (irinotecan, etoposide)
- Les poisons du fuseau mitotique (vincristine, paclitaxel)
- Les thérapies ciblées qui mettent à profit une particularité de la tumeur et plus précisément une cible effectrice (récepteur, protéine, antigène, gène) impliquée dans le processus tumoral comme le font les agents d'hormonothérapie (nilutamide, létrozole), les anticorps monoclonaux (rituximab, cetuximab) ou les inhibiteurs de kinase (imatinib, sunitinib)

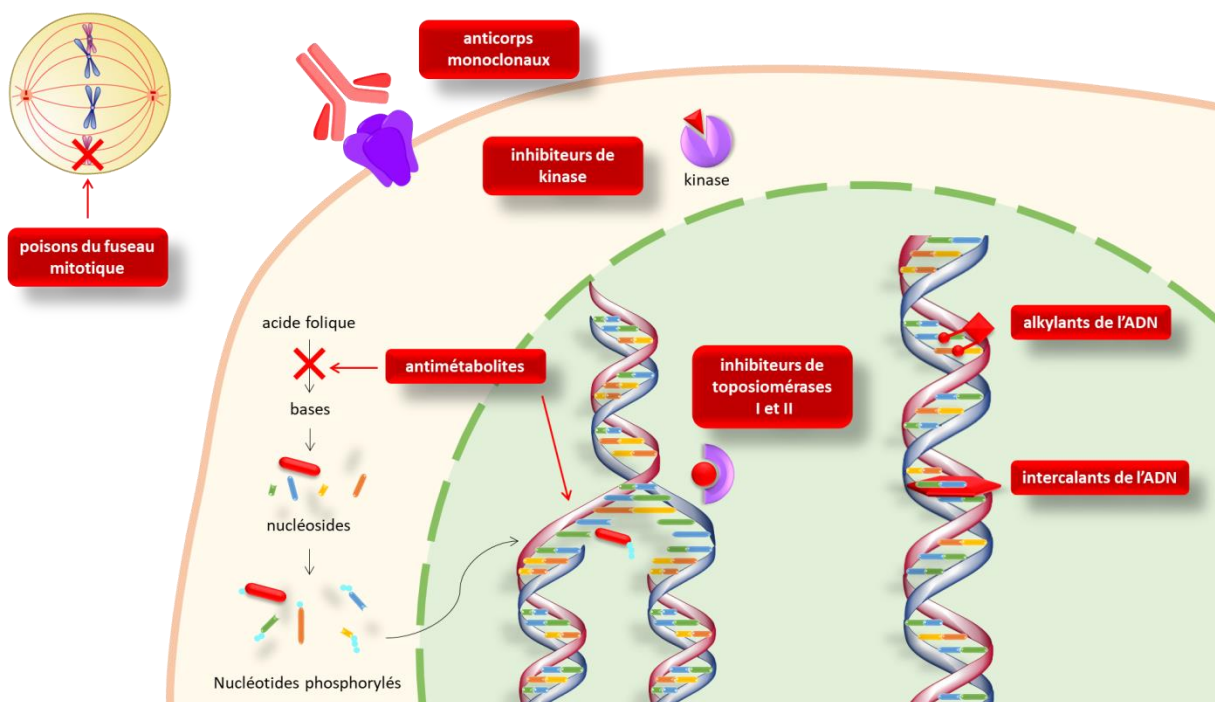


Figure 22 : Site d'action des principaux agents anticancéreux utilisés en clinique

Les cinq premières catégories ciblent les processus de division cellulaire. Bien que ces phénomènes soient plus fréquents chez les cellules cancéreuses comparativement aux cellules saines ils n'en demeurent pas moins vitaux pour le bon fonctionnement de l'organisme. Ainsi, la distribution ubiquitaire de ces substances actives engendre de nombreux effets indésirables chez les patients traités (nausées, vomissements, perte de cheveux, ...). L'utilisation de prodrogues est une des stratégies exploitées pour diminuer la toxicité de ces substances actives *via* un mécanisme de

Introduction bibliographique

libération contrôlée spécifique à la tumeur. Pour ce faire, une cible biologique tumorale (enzymes, pH, ...) est utilisée pour cliver une entité chimique présente sur la prodrogue, communément appelée « **trigger** » ou « **gâchette** », liée soit directement soit par le biais d'un **espaceur** à la substance active, permettant ainsi la libération de cette dernière.

Afin d'augmenter encore la spécificité de certaines substances actives, il est possible d'associer la libération contrôlée à des stratégies de vectorisation, ce que l'on retrouve dans la littérature sous le terme anglophone de « targeted drug delivery » ou thérapie vectorisée. Cette dernière consiste à cibler une particularité de la cellule cancéreuse ou de son microenvironnement, afin d'acheminer au plus près de sa cible moléculaire une substance active. Elle repose donc sur l'utilisation d'un **vecteur** qui cible une des caractéristiques du microenvironnement tumoral (protéine, récepteur, antigène, ...) et permet d'améliorer le profil de distribution de la molécule en augmentant la concentration de cette dernière au niveau du site tumoral grâce au tropisme que possède le vecteur pour la cible. Une fois adressée, la prodrogue est alors activée par libération contrôlée.

Ces vecteurs peuvent être de nature très variables, allant de molécules de petites tailles (peptides, sucres, ...) à des macromolécules (anticorps, nanoparticules, ...) assurant une vectorisation soit passive soit active. Les prodrogues vectorisées sont donc des structures hybrides composées d'un **vecteur** et d'une **gâchette** associées par le biais ou non d'**espaceurs** à une substance active.

La conception des prodrogues vectorisées combinant ces différents partenaires est un véritable challenge en termes d'optimisations structurales mais peut conduire en cas de succès à de réelles avancées dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancer.

1. Les différents espaceurs

La liaison du vecteur à la substance active peut se faire soit directement, soit plus généralement par le biais d'un espaceur. Sa structure peut être très variée et modulée pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du conjugué, alors que celle du vecteur et de la substance active sont figées pour répondre à un pharmacophore donné. L'intérêt d'un espaceur est multiple et sa conception est conditionnée par divers aspects. Ainsi, un espaceur hydrophile constitué de polysaccharides, d'acides aminés hydrophiles, de PEG améliore l'hydrophilie globale du conjugué et peut donc modifier la biodistribution (diminution des liaisons aux protéines plasmatiques et des affinités non spécifiques, augmentation de l'excrétion rénale), de même que la pénétration passive dans les cellules non cibles. L'espaceur est parfois conçu pour éviter une interaction ou une gêne stérique entre vecteur et substance active compromettant l'affinité du vecteur et / ou l'efficacité de la substance active et également pour mieux contrôler la cinétique de libération de cette dernière. Il permet également une fonctionnalisation des substances actives et des vecteurs permettant la création de conjugués plus variés.

Cet espaceur est généralement clivable et auto-immolable, car la libération de la substance active non modifiée est souvent requise pour bon nombre de classes. De tels espaceurs clivables doivent rester stables dans la circulation sanguine mais doivent se cliver rapidement après reconnaissance et internalisation dans la cellule maligne.

De manière générale, trois grandes catégories d'espaceurs sont retrouvées dans la littérature qui se distinguent par le type de réarrangement impliqué après clivage, à savoir : soit une délocalisation électronique, soit une cyclisation intramoléculaire, soit une combinaison des deux (Tableau 8).

Introduction bibliographique

Type d'espaceur	Etape d'activation spontanée de l'espaceur	Substances libérées
Libération par délocalisation électronique		
Libération par cyclisation		
Libération combinant les deux approches		

Tableau 8 : Différents types d'espaceurs clivables
 EC : entité clivable; SA : substance active ; X = N ou O^{108,109}

a. Espaceurs basés sur une élimination par délocalisation électronique

De manière générale, ce type d'espaceur est constitué d'un groupement benzylique substitué en ortho ou para par une fonction oxygénée ou azotée dont les doublets électroniques libres seront à l'origine de la délocalisation électronique, conduisant *in fine* à une élimination 1,4 ou 1,6 permettant de libérer la molécule d'intérêt.

Dans le cas d'un espaceur phénolique, la prodrogue présente une fonction carbonylée (carbamate, ester, ...) ou encore acide glucuronique (fonctionalisé *via* le carbone anomérique). Dans le cas des espaceurs azotés, la littérature fait état majoritairement de dérivés urées, carbamates, amides ou nitrés, précurseurs après clivage ou réduction de fonctions amines ou hydroxylamines. Dans le Tableau 9 sont regroupés quelques exemples de prodrogues issues de la littérature comportant un espaceur auto-immolable par délocalisation électronique.

Introduction bibliographique

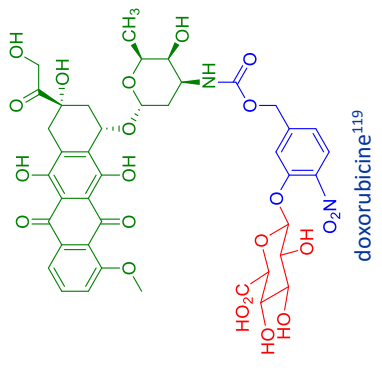
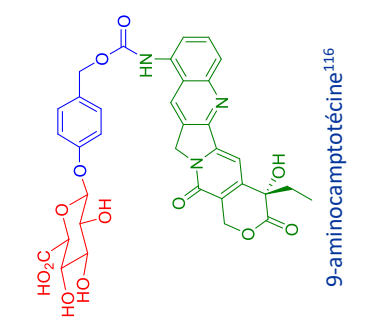
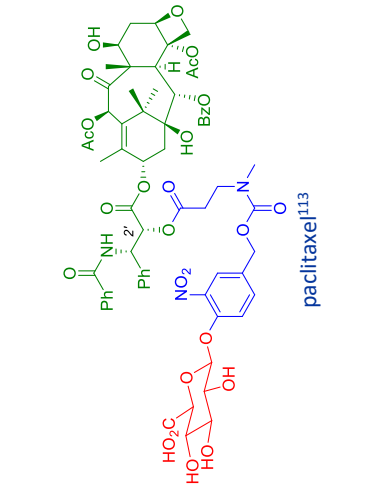
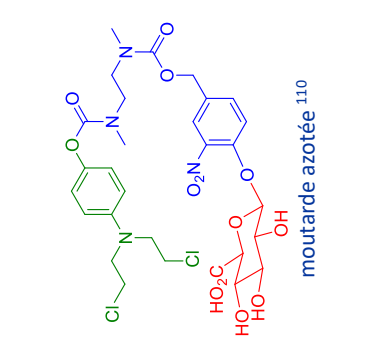
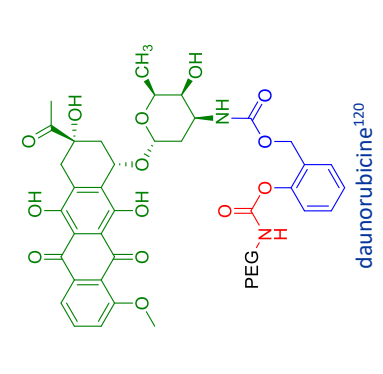
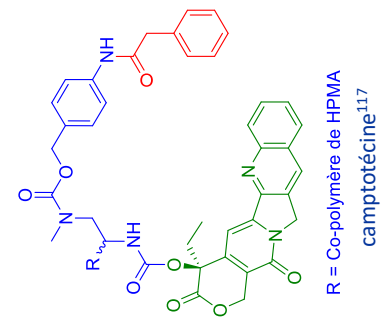
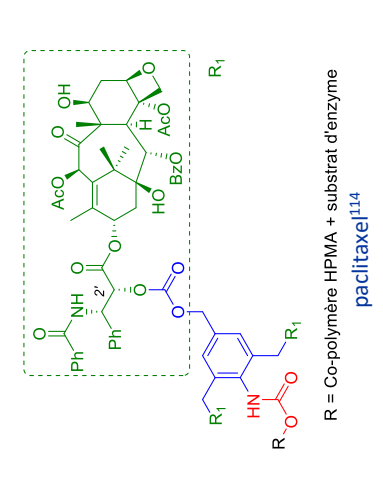
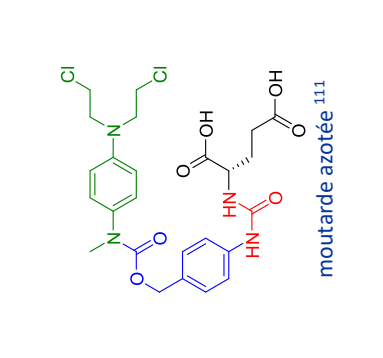
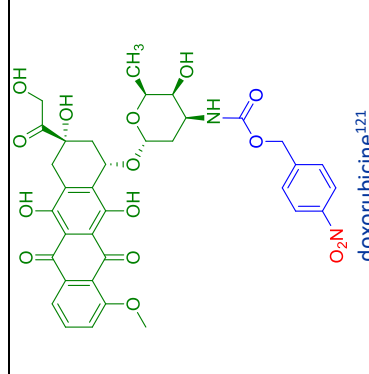
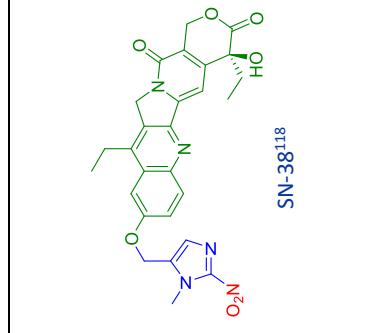
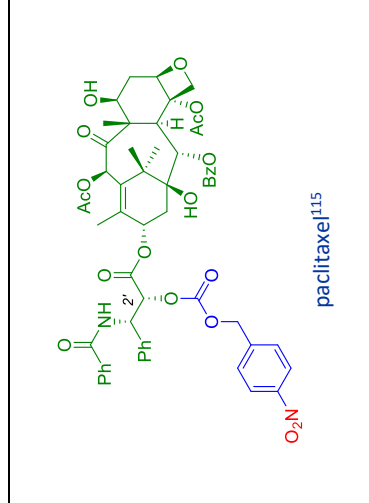
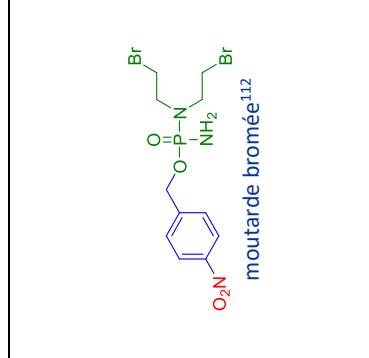
Entité clivable	Anthracycline	Dérivé de la camptotécine	Taxane	Agent alkylant
Acide glucuronique	 <p style="text-align: center;">doxorubicine¹¹⁹</p>	 <p style="text-align: center;">9-aminocamptotécine¹¹⁶</p>	 <p style="text-align: center;">paclitaxel¹¹³</p>	 <p style="text-align: center;">moutarde azotée¹¹⁰</p>
Fonction carbonyle	 <p style="text-align: center;">daunorubicine¹²⁰</p>	 <p style="text-align: center;">R = Co-polymère de HPMA camptotécine¹¹⁷</p>	 <p style="text-align: center;">R = Co-polymère HPMA + substrat d'enzyme paclitaxel¹¹⁴</p>	 <p style="text-align: center;">moutarde azotée¹¹¹</p>
Dérivé nitré	 <p style="text-align: center;">doxorubicine¹²¹</p>	 <p style="text-align: center;">SN-38¹¹⁸</p>	 <p style="text-align: center;">paclitaxel¹¹⁵</p>	 <p style="text-align: center;">moutarde bromée¹¹²</p>

Tableau 9 : Structures de prodrogues d'agents de chimiothérapie possédant un espaceur clivable par délocalisation électronique

Introduction bibliographique

b. Espaceurs basés sur la cyclisation

Dans le cas des espaceurs conduisant à une libération de la substance active après cyclisation intramoléculaire, des fonctions alcool, amine ou thiol peuvent être par exemple masquées respectivement sous la forme d'un phosphate, d'un groupement nitro, ou d'un pont disulfure. Lors de sa libération, elle ne conduit plus à une délocalisation électronique mais agit comme nucléophile pour induire une cyclisation intramoléculaire associée à une élimination.

Pour ce faire, l'espaceur doit posséder une fonction sensible à une attaque nucléophile comme un carbonyle qui peut être un carbamate, un amide ou un ester. Différents espaceurs sont retrouvés dans la littérature conduisant à des entités cycliques à 5 ou 6 chaînons carbonylées par exemple des lactones, indolinones, benzoxalidines ou oxathiolanones (Tableau 10).

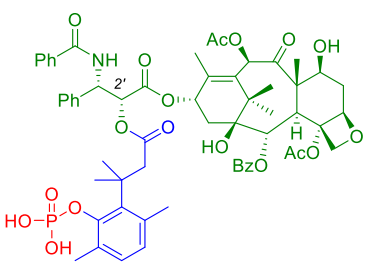
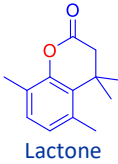
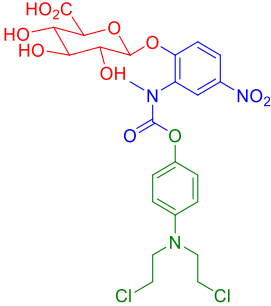
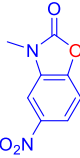
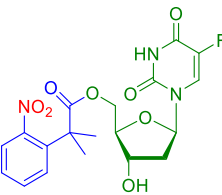
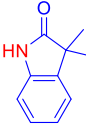
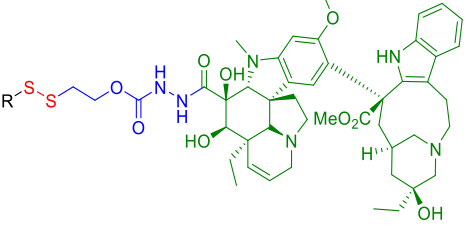
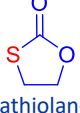
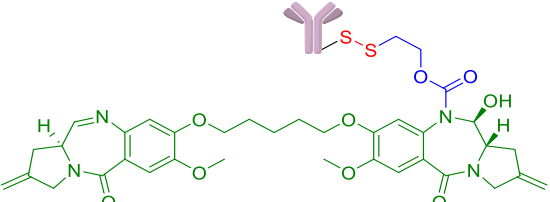
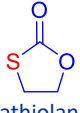
Prodrogue	Entité cyclique libérée	Substance active libérée
	 Lactone	paclitaxel ¹²²
	 N-méthyl-benzoxalidone	Moutarde azotée ¹²³
	 3,3-diméthylindolin-2-one	5-FU ¹²⁴
 <p>R = espaceur – acide folique (Vintafolide) (Figure 33)</p>	 1,3-oxathiolan-2-one	désacétylvinblastine hydrazide ¹²⁵
	 1,3-oxathiolan-2-one	Dérivé de la pyrrolobenzodiazépine ¹²⁶

Tableau 10 : Structures de prodrogues d'agents de chimiothérapie possédant un espaceur clivable par cyclisation intramoléculaire

Introduction bibliographique

c. Espaceurs mixtes

Deux espaceurs clivables ayant des cinétiques de libération différentes, peuvent également être combinés dans le but d'obtenir un meilleur contrôle de la libération de la substance active. Cette approche a été notamment utilisée avec des agents de chimiothérapie tels que le SN-38¹¹⁸ ou le paclitaxel¹¹⁴ (Figure 23).

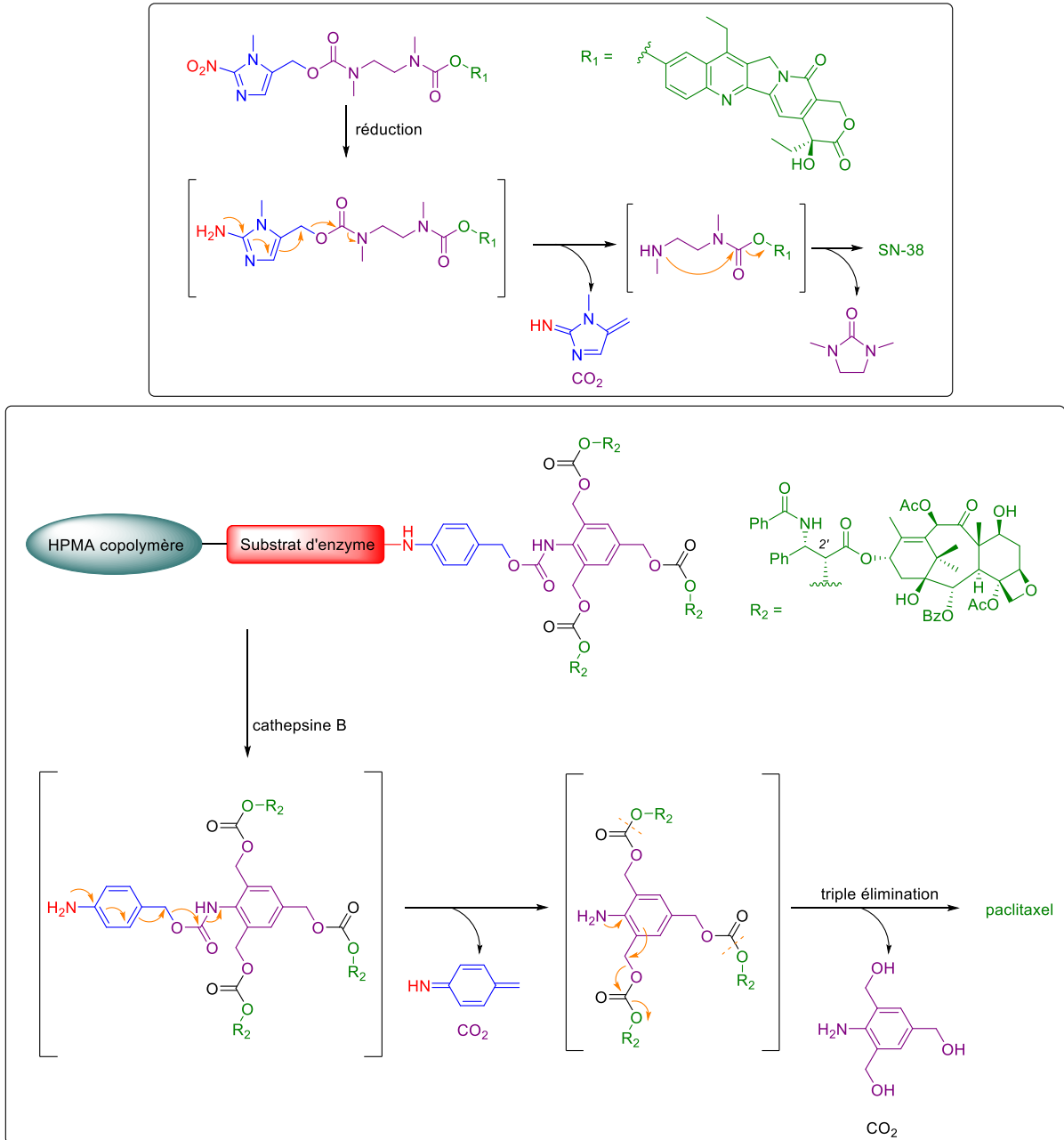


Figure 23 : Structures de prodrugs utilisant deux espaceurs clivables combinés^{114,118}

2. Les différentes méthodes d'activation : « les gâchettes »

Les différentes gâchettes mises au point pour la conception de prodrogues exploitent toutes un différentiel physiologique entre les tissus tumoraux et les tissus sains. Chaque type et sous types de cancers possède ses propres caractéristiques physiopathologiques, aussi seuls les différentiels les plus couramment rencontrés au niveau tumoral seront développés dans ce manuscrit : la surexpression de certaines enzymes, le changement de pH extra ou intracellulaire, la production plus élevée de ROS, l'augmentation du taux de glutathion ou encore l'environnement hypoxique.

a. Une catalyse enzymatique

La transformation néoplasique des cellules s'accompagne d'une modification de leur phénotype enzymatique, induisant la surexpression de certaines enzymes, comme les oxydoréductases et les hydrolases ou encore les enzymes impliquées dans le métabolisme glucidique. Cela conduit à un différentiel d'activité enzymatique entre tissus sains et tissus cancéreux qui peut être mis à profit pour la conception de prodrogues¹²⁷.

Parmi la multitude d'enzymes constituant des cibles potentielles, certaines sont des cibles récurrentes en oncologie (Figure 24):

- Les **métalloprotéinases matricielles** (MMPs) constituent une famille d'une vingtaine de protéases à zinc impliquées dans la dégradation de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Certaines sont surexprimées dans plusieurs étapes de la progression cancéreuse telles que la prolifération, l'angiogenèse ou la dissémination métastatique¹²⁸. Ainsi, cette famille enzymatique pourrait s'avérer pertinente pour assurer le clivage contrôlé de prodrogues¹²⁹. Cela a été démontré par exemple avec une prodrogue de doxorubicine dont un peptide, utilisé comme gâchette, est clivé par les MMP 2, 9 et 14 avec des cinétiques de libération différentes pour chacune des isoformes¹³⁰.
- Les **cathepsines** sont une famille d'enzymes protéolytiques. La cathepsine B est notamment impliquée dans le processus de progression et d'invasion tumorale, et est exprimée dans de nombreux cancers comme le cancer du sein, de la thyroïde, colorectal, de l'estomac, le mélanome et le chondrosarcome^{131,132}. Cette enzyme est normalement présente dans les lysosomes mais est également retrouvée au niveau de la surface membranaire des cellules cancéreuses. Sa spécificité de reconnaissance de certaines séquences peptidiques¹³³ permet d'assurer une libération sélective de l'agent de chimiothérapie au niveau de la tumeur. Cette stratégie a été démontré *in tubo* sur des dérivés de la doxorubicine en présence d'une solution de cathepsine B. Cette dernière reconnaît et clive l'enchaînement phénylalanine-leucine permettant, après réarrangement de l'espaceur par délocalisation électronique, de libérer la doxorubicine¹³⁴.
- Les **oxydoréductases** et notamment la NAD(P)H quinone oxydoréductase 1 (NQO1), aussi appelée DT-diaphorase, possèdent un haut niveau d'expression dans les cancers du côlon, du sein, du foie et des poumons¹³⁵. Cette enzyme réduit notamment les quinones en hydroquinones réactives, comme la mitomycine¹³⁶. A titre d'exemple, des études avec une prodrogue quinonique de la camptotécine ont montré que l'activité antinéoplasique était directement corrélée à l'expression cellulaire en NQO1 validant *in vitro* cette approche¹³⁷.
- Les **β -glucuronidases** capables de lyser une liaison glucosidique, sont surexprimées dans certains types de cancers comme les cancers du sein, du poumon, du tractus intestinal ou le mélanome¹³⁸. De nombreux glucuroconjugués, notamment d'anthracyclines ont été développés, toutefois leur clairance rénale très importante est un des principaux facteurs limitant de cette stratégie^{139,140}. Afin de pallier à ce problème, Legigan *et al.* ont modifié la structure de la prodrogue, et ajouté

Introduction bibliographique

une entité maléimide¹⁴¹. La réaction d'addition de Michaël des thiols de l'albumine plasmatique avec le maléimide permet une bioconjugaison entre la prodrogue et la protéine, limitant ainsi l'élimination rénale.

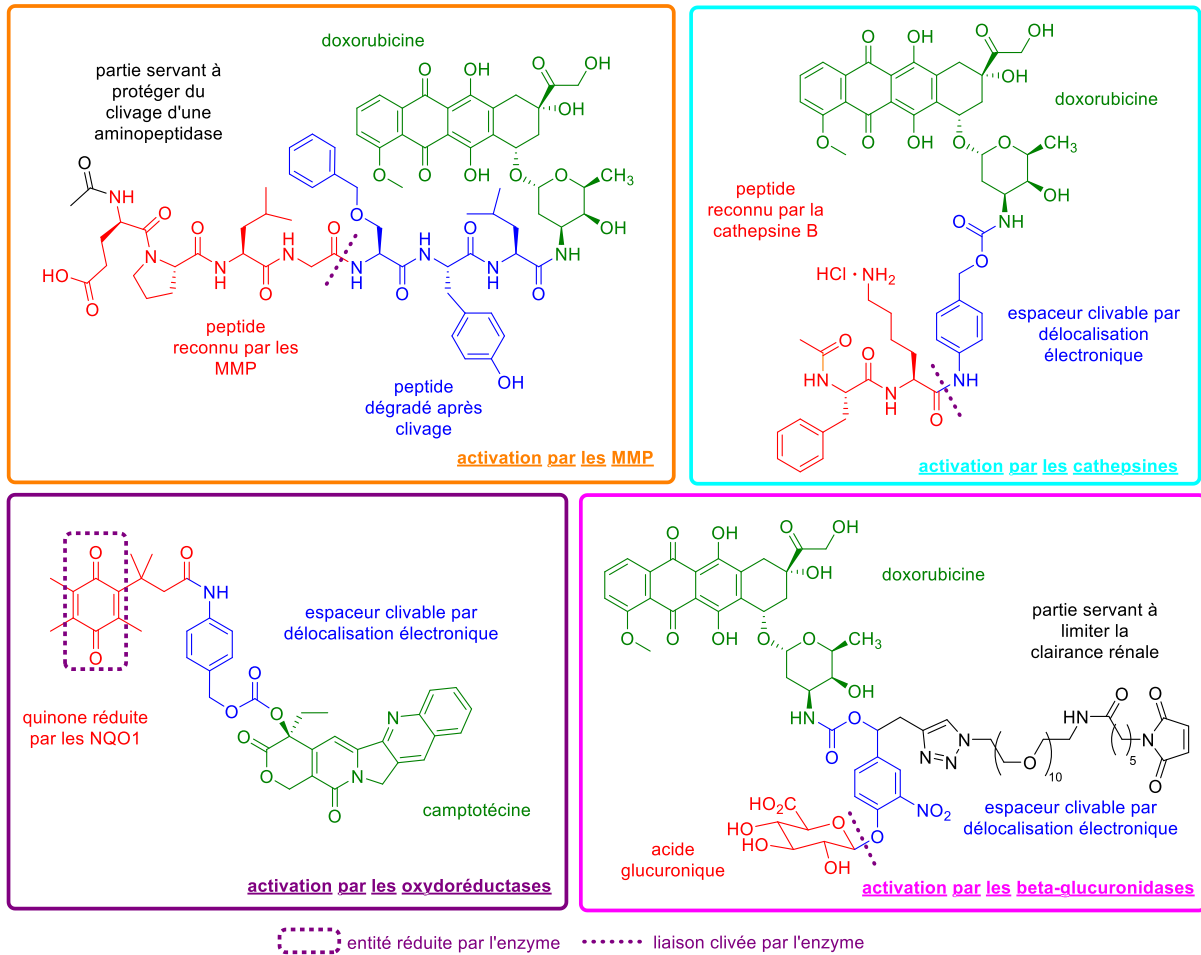


Figure 24 : Structures de prodrogues substrats d'enzymes surexprimées au sein de la tumeur^{130,134,137,141}

b. Le pH acide

Les cellules cancéreuses maintiennent une glycolyse accrue en privilégiant, contrairement aux cellules saines, la voie anaérobie, phénomène connu sous le nom d'effet Warburg¹⁴². Ce phénomène est d'autant plus important en absence d'oxygène. De cette dérégulation de la glycolyse découle une production importante de lactate et de protons ayant pour conséquence de créer un gradient de pH diminuant de l'intérieur de la cellule (7,1-7,4) vers le milieu extracellulaire (6,7-6,8)^{143,144}. L'environnement hypoxique conduit de plus par le biais du facteur HIF-1 à l'activation des anhydrases carboniques IX et XII. Ces enzymes catalysent la transformation du dioxyde de carbone en acide carbonique avec libération d'un proton¹⁴⁵, contribuant ainsi à renforcer l'acidification du microenvironnement tumoral. Un pH plus acide (pH ~ 5)¹⁴⁶ peut également être retrouvé dans les endosomes/lysosomes, vésicules responsables de l'internalisation des macromolécules et de leur libération en intracellulaire.

Introduction bibliographique

Fort de ce constat, des prodrogues présentant une activation pH-dépendante ont été développées. Différentes fonctions chimiques clivables en milieu acide par hydrolyse ou réarrangement ont ainsi été étudiées. C'est le cas notamment des fonctions acétals et hydrazones, ces dernières étant les plus documentées. Elles présentent en effet des propriétés physico-chimiques particulièrement bien adaptées à une telle application à savoir une excellente stabilité à pH physiologique associée à une acidolyse rapide dès pH 5. Des conjugués hydrazones pH-sensibles ont ainsi été développés pour la doxorubicine¹⁴⁷⁻¹⁵⁰, le paclitaxel^{151,152}, la camptothécine¹⁵³ ou encore la gemcitabine¹⁵⁴ (Figure 25) :

- L'aldoxorubicine (INNO-206)¹⁴⁷ est un dérivé 6-maléimidocaproylhydrazone de la doxorubicine. Cette molécule a été développée pour diminuer la cardiotoxicité de la doxorubicine et en modifier la pharmacocinétique en assurant une liaison à l'albumine (élimination rénale diminuée) et une libération contrôlée au niveau du tissu tumoral par hydrolyse acide de la fonction hydrazone. Cette molécule est actuellement en essai clinique dans divers protocoles de phase I/II/III¹⁵⁵. Une étude clinique de phase III est notamment en cours en France pour étudier l'efficacité et la tolérance de l'aldoxorubicine chez des patients développant un sarcome des tissus mous, métastasé, localement avancé ou inopérable (NCT02049905). Le statut de médicament orphelin lui a été octroyé aux États-Unis pour le traitement du sarcome des tissus mous, du glioblastome, du cancer du poumon à petites cellules et de l'adénocarcinome de l'ovaire.
- Le paclitaxel a été conjugué par le biais d'un espaceur et d'une liaison hydrazone à un polymère d'acide lactique fonctionnalisé. Lors de la mise en solution, ces macromolécules s'assemblent en micelle avec un arrangement de la chaîne pégylée latérale vers l'extérieur et de paclitaxel vers l'intérieur de la micelle. Cette prodrogue permet une meilleure solubilité en solution aqueuse et un meilleur contrôle de sa libération. La validation de la prodrogue a été démontrée par (1) la libération préférentielle du paclitaxel à pH acide (91% à pH = 5,0) comparativement au pH physiologique (22% à 7,4) ; (2) une cytotoxicité comparable à celle du paclitaxel seul *in vitro* sur cellules cancéreuses de poumon (A549) et de sein (MCF-7)¹⁵².
- Un dérivé de la 10-hydroxycamptothécine a été conjugué par le biais d'une liaison hydrazone à un PEG 2000, ce dernier permettant entre autre d'améliorer la solubilité de la substance active. Cette prodrogue permet elle aussi une libération contrôlée de la substance active en milieu acide. Une étude *in vivo* chez des souris porteuses de tumeur de cancer du sein (MCF-7) a montré un ralentissement de la croissance tumorale significatif comparativement au groupe traité avec la 10-hydroxycamptotécine seul¹⁵³.
- Le DK049, prodrogue de la gemcitabine possède, tout comme l'aldoxorubicine, une fonction maléimide permettant sa conjugaison *in vivo* avec les fonctions thiols de l'albumine. Cette molécule est considérée comme une prodrogue à plus d'un titre avec quatre étapes de métabolisation requises : clivage de la liaison hydrazone, hydrolyse de la liaison amide entre la base purique et l'aromatique, transformation de l'amine libérée en cétone par la cytidine désaminase pour libérer l'anti-métabolite qui doit être triphosphorylé pour devenir actif. Son efficacité a été démontrée sur des modèles précliniques de cancers des ovaires et des poumons non à petites cellules¹⁵⁴.

Introduction bibliographique

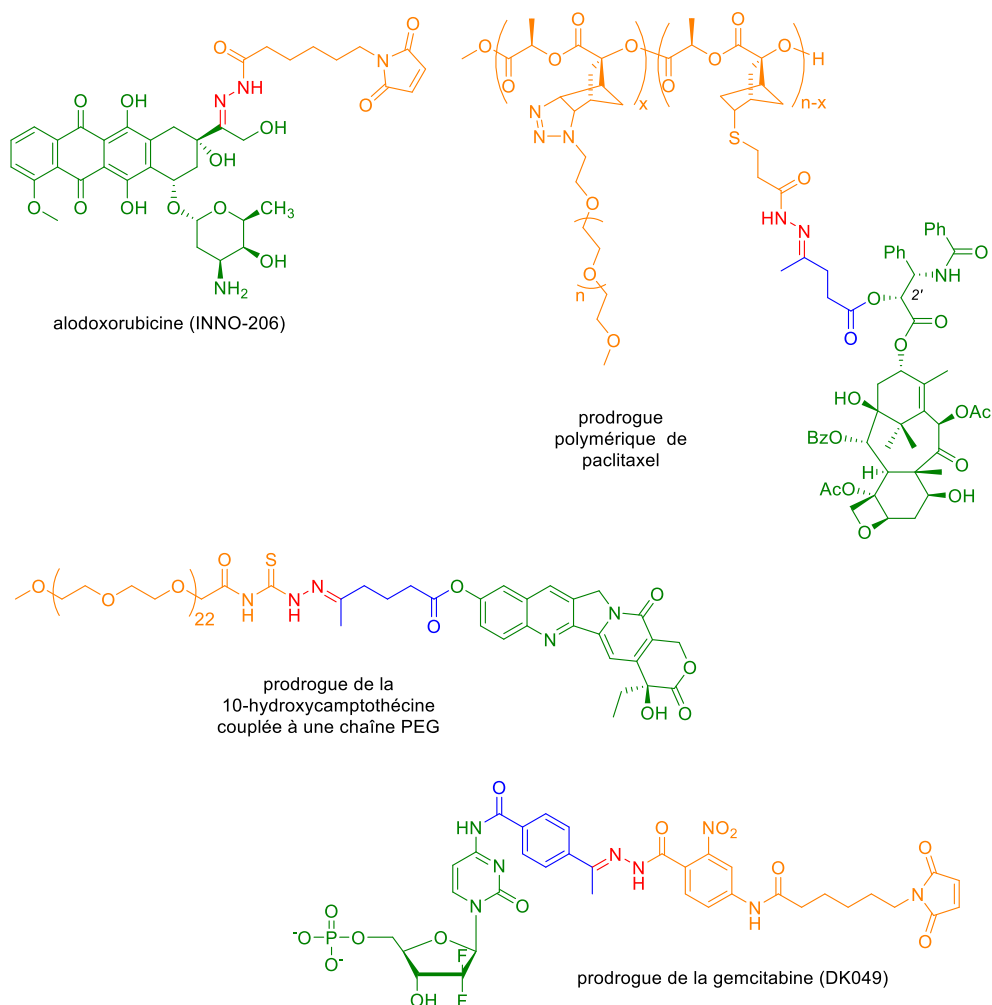
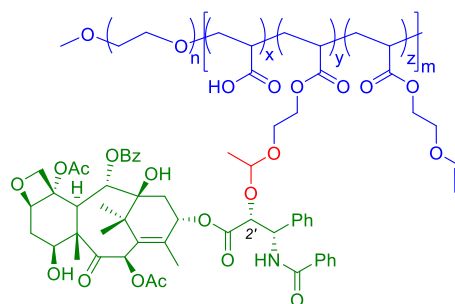


Figure 25 : Structures de prodrogues possédant une liaison hydrazone clivable en milieu acide

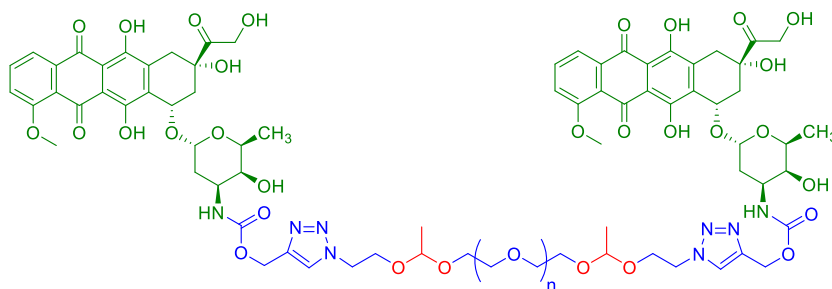
D'autres fonctions pH-sensibles peuvent également être utilisées, comme par exemples:

- La fonction acétal, connue pour être sensible en milieu acide et s'hydrolyser en alcool et aldéhyde ou cétone correspondants. Des structures polymériques ont ainsi été développées pour le paclitaxel¹⁵⁶, ou encore la doxorubicine¹⁵⁷ (Figure 26). En solution aqueuse, ces macromolécules s'arrangent en micelles qui, une fois internalisées dans la cellule, se délitent et conduisent par hydrolyse acide dans les endosomes/lysosomes à la libération de la substance active.
- Des prodrogues de l'émétine sont actuellement développées sur la position N-2' de cet alcaloïde dotée d'une forte toxicité. Outre ses propriétés émétisantes et amoebicides, sa capacité à inhiber la synthèse protéique lui valent un regain d'intérêt en oncologie¹⁵⁸. Ainsi, des prodrogues de l'émétine sensibles au pH ont été synthétisées : un analogue dithiocarbamate¹⁵⁹ ou des dérivés de l'acide maléique ou succinique¹⁶⁰ (Figure 26). Dans le premier cas, la protonation du dithiocarbamate provoque sa déthiocarboxylation libérant la substance active. Dans l'autre cas, une catalyse acide conduit à une cyclisation intramoléculaire¹⁶¹ libérant la fonction amine en N-2' de l'émétine et un anhydride¹⁶⁰.

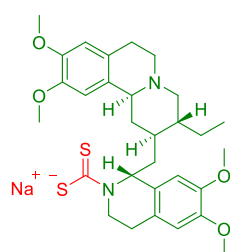
Introduction bibliographique



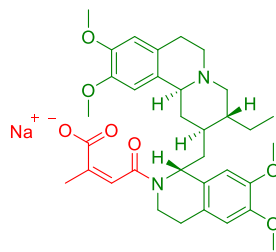
prodrogue polymérique paclitaxel avec acétal



prodrogue doxorubicine-PEG avec acétal



sel sodique de dithiocarbamate d'émétine



sel sodique dérivé de l'acide maléique d'émétine

Figure 26 : Structures de prodrogues possédant une fonction acétal, dithiocarbamate ou dérivée de l'acide maléique clivables en milieu acide

c. Les espèces réactives de l'oxygène

Les ROS telles que l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) résultent du métabolisme de l'oxygène et jouent un rôle clef notamment dans les mécanismes de signalisation cellulaire. Toutefois une trop grande concentration de ces ROS conduit à un stress oxydant pouvant entraîner des dommages irréversibles à la cellule et conduire à l'apoptose. La balance entre production et détoxification des ROS doit donc être très équilibrée pour maintenir l'intégrité cellulaire. Un stress oxydant important a été observé dans diverses tumeurs en raison de la surproduction de ROS. Celui-ci joue un rôle important dans plusieurs processus tumoraux, tels que l'invasion, l'apoptose, la prolifération et l'angiogenèse¹⁶².

La surproduction de peroxyde d'hydrogène au niveau des cellules cancéreuses peut être mise à profit pour assurer l'activation d'une prodrogue *via* notamment l'utilisation de fonctions spécifiques telles que des acides ou esters aryles boroniques. En effet, en présence de peroxyde d'hydrogène, la fonction aryle boronique est oxydée sur l'atome de bore, puis le groupement aryle migre du bore vers l'oxygène conduisant à la formation d'un borate qui s'hydrolyse de manière

Introduction bibliographique

spontanée en libérant un résidu phénolique ainsi que de l'acide borique. Quelques applications en oncologie de cette stratégie sont décrites ci-après :

- Un dérivé d'une moutarde azotée chlorée possédant une fonction acide boronique en position para du cycle benzénique a été synthétisé (Figure 27). Ce dernier, après oxydation et hydrolyse spontanée, libère une fonction phénol qui renforce la densité électronique sur l'atome d'azote de la moutarde par mésomérie et conduit à la formation d'un ion aziridinium électrophile, puissant alkylant de l'ADN. Ce composé montre *in vitro* une alkylation de l'ADN dépendante de la présence du peroxyde d'hydrogène et une cytotoxicité sélective vis-à-vis de lymphocytes cancéreux comparativement aux lymphocytes sains (GI_{50} (LLC) = 5-6 μ M alors que non déterminable sur les lymphocytes sains)¹⁶³.
- Le dérivé SN-38 de la camptothécine a été couplé à un fluorophore possédant un ester d'acide boronique. Ce conjugué peut être considéré comme un véritable outil théranostique au niveau pré-clinique (Figure 27). Lors de l'activation de la prodrogue en présence de peroxyde d'hydrogène, le phénol généré déclenche par élimination, la libération simultanée du SN-38 responsable d'un effet cytotoxique sur culture cellulaire (B16F10 et HeLa) et du fluorophore aisément détectable en microscopie confocale. Sur modèle murin de métastase pulmonaire, la prodrogue a permis d'inhiber la croissance tumorale et d'augmenter la médiane de survie des souris comparativement au groupe contrôle¹⁶⁴.

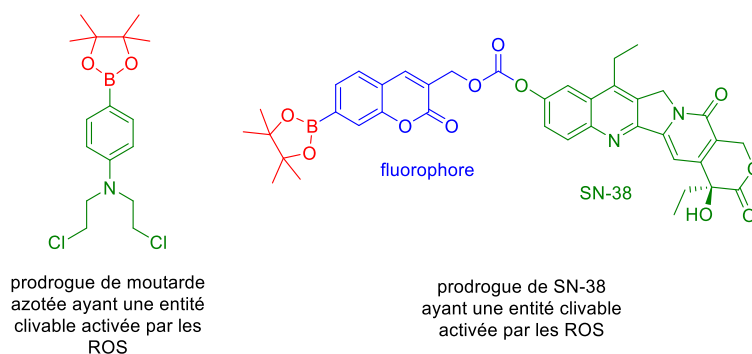


Figure 27 : Structures de prodrogues possédant un ester d'acide boronique clivées par les ROS

Cette stratégie bien que séduisante est restreinte à des substances actives possédant une fonction phénolique qui sera masquée sous forme d'acide boronique. Ainsi, d'autres études utilisant de nouveaux motifs sensibles à l'activation par le peroxyde d'hydrogène, comme les thiazolidinone sont en cours d'études. Le mécanisme proposé pour cette activation consiste en l'addition de l'ion hydroperoxyde sur le carbonyle adjacent à la thiazolidinone suivi de l'élimination de cette dernière, libérant un dérivé peracide de la substance active, ensuite hydrolysé en acide carboxylique (Figure 28)¹⁶⁵.

Introduction bibliographique

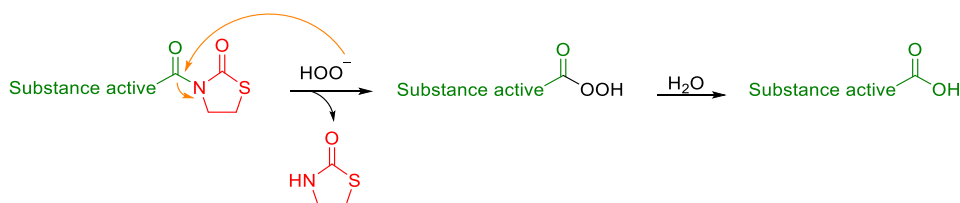


Figure 28 : Mécanisme proposé d'activation des prodrogues d'oxazolidinone par le peroxyde d'hydrogène¹⁶⁵

Les études sur ce motif n'en sont qu'aux prémices mais néanmoins prometteuses, ouvrant un accès à la fonctionnalisation de nouvelles substances actives, inaccessibles dans le cas des acides boroniques.

d. Le glutathion

Il est possible de mettre à profit la surproduction de glutathion (GSH) par les cellules cancéreuses pour l'activation de prodrogues, *via* notamment l'atome de soufre de cette molécule qui lui confère un fort caractère réducteur et nucléophile. Les disulfures se sont rapidement imposés comme fonction de choix pour la conception de tels prodrogues. Dans ce cadre, trois exemples illustrant cette stratégie sont présentés ci-après (Figure 29) :

- Pour répondre à un double objectif, le premier de sélectivité tumorale et le second de solubilité en vue d'une administration par voie orale, un dérivé du paclitaxel comportant un espaceur clivable lié à la thioéthanolamine *via* un pont disulfure a été synthétisé. La fonction amine primaire a été introduite pour augmenter l'hydrosolubilité de la prodrogue tandis que le pont disulfure est clivé par le GSH, libérant la fonction thiol et conduisant, après cyclisation intramoléculaire, à la libération du principe actif. Une absorption augmentée ainsi qu'une libération contrôlée ont été démontrées après administration par voie orale chez la souris. Cette molécule a également démontré une efficacité antinéoplasique similaire à celle du paclitaxel *in vitro* sur cellules de cancer du rein (ACHN), du colon (HCT116), ou du poumon (Calu1)¹⁶⁶.
- Afin de vectoriser puis libérer la doxorubicine au sein des cellules tumorales, cette molécule a été conjuguée à de l'acide folique par le biais d'un pont disulfure. Une fois internalisés grâce aux récepteurs à l'acide folique (voir paragraphe II.B.3.b.i(1)), de tels conjugués sont réduits par le GSH libérant la substance active. Ce mécanisme de libération a été prouvé *in tubo* en présence de GSH et la preuve indirecte de la libération a été réalisée *in vitro* où la prodrogue possède une cytotoxicité plus importante sur les lignées cellulaires exprimant les récepteurs à l'acide folique, comparativement à une lignée ne les exprimant pas¹⁶⁷.

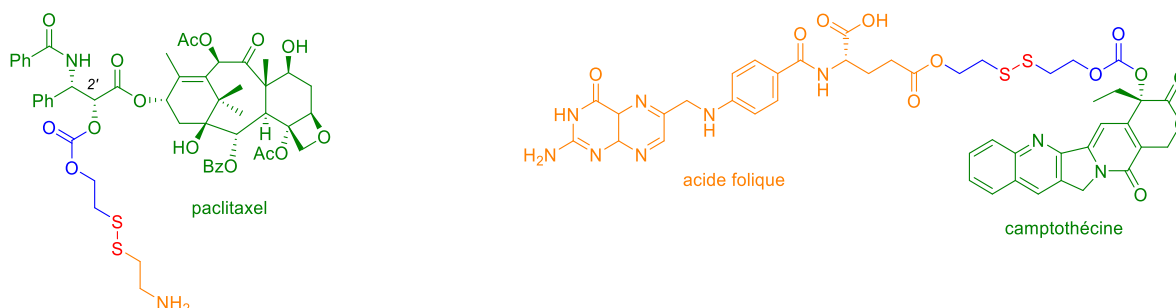


Figure 29 : Structures de prodrogues possédant un pont disulfure activées par le GSH

Introduction bibliographique

Les ponts disulfures ne sont pas les seules structures pouvant être activés par réaction avec le GSH. La molécule J-SK, possédant une fonction aryldiazénium diolate est également activée par attaque nucléophile du GSH (Figure 30)¹⁶⁸. Après réarrangement du complexe de Mesenheimer formé, l'ion diazénium diolate est libéré et se fragmente spontanément pour donner deux molécules de monoxyde d'azote. La liaison de J-SK au GSH crée un déséquilibre de la balance rédox de la cellule, augmentant le stress oxydant et conduisant *in fine* au déclenchement de l'apoptose¹⁶⁹.

Une récente optimisation de cette molécule a été réalisée avec addition d'une chalcone pyrazole ayant des propriétés d'inhibition de la P-gp (Figure 30). Cette molécule a notamment montré une activité cytotoxique *in vitro* mais également une restauration de la sensibilité à la doxorubicine de cellules de cancer du sein multirésistantes¹⁷⁰.

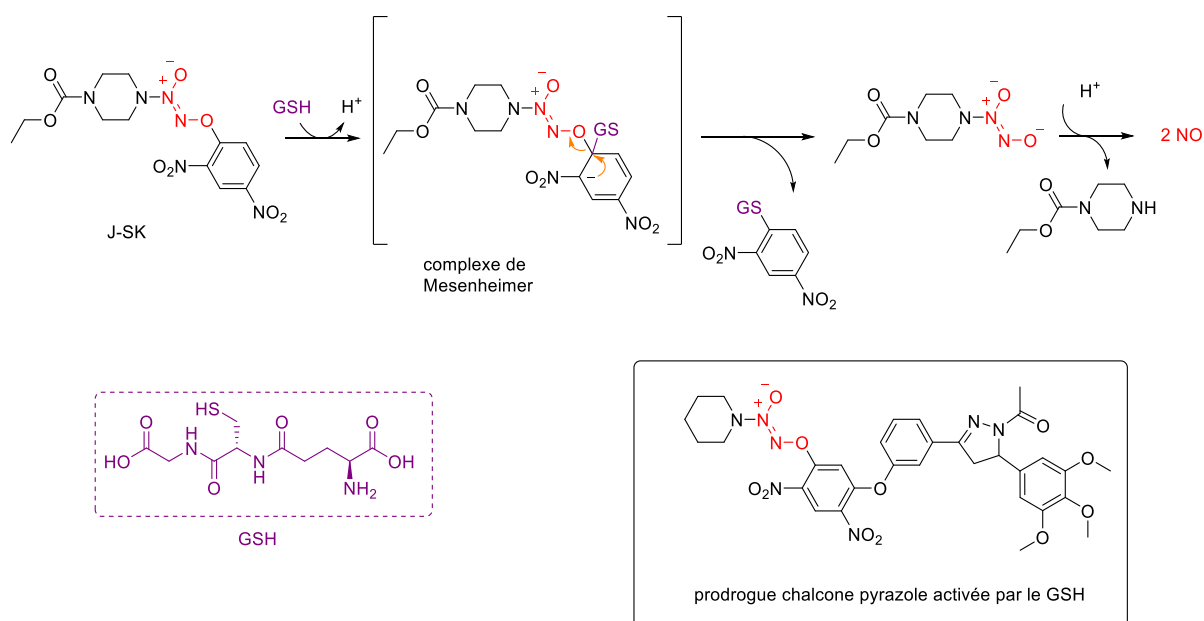


Figure 30 : Structures de prodrogues possédant un motif diazénium diolate activées par le GSH

e. L'hypoxie

L'hypoxie tumorale peut être mise à profit pour la conception de prodrogues sensibles à la réduction, appelées prodrogues activables en hypoxie ou HAP « Hypoxia Activated Prodrugs ». Etant l'objet de nos travaux, ce type de prodrogues sera abordé plus en détail dans le paragraphe suivant (paragraphe III).

3. Les différents vecteurs

La vectorisation vers les cellules cancéreuses peut se faire soit de manière passive, les propriétés physicochimiques propres du vecteur assurant un enrichissement passif du tissu tumoral, soit de manière active en utilisant un vecteur capable de reconnaître une cible particulière au niveau des cellules cancéreuses ou de leur microenvironnement.

Introduction bibliographique

a. Vectorisation passive vers les cellules cancéreuses

La vectorisation passive consiste à augmenter localement la concentration d'un agent chimique au niveau d'une tumeur solide en modulant sa biodistribution grâce à une caractéristique physiologique du tissu tumoral, à savoir la combinaison d'une perméabilité vasculaire faible et anarchique associée à une insuffisance du drainage lymphatique. Cette caractéristique est connue sous le nom d'effet EPR (« Enhanced Permeation and Retention »)¹⁷¹ (Figure 31). Au niveau des tissus sains, l'endothélium vasculaire est jointif, c'est-à-dire que les jonctions intercellulaires sont serrées, ne permettant pas aux nano-objets (5-100 nm) de pénétrer dans le tissu. Inversement, au niveau des tissus cancéreux, on note une augmentation de la perméabilité vasculaire, induite par un processus inflammatoire, permettant à des objets de faible taille (< 800 nm) de pénétrer et de se concentrer transitoirement dans le tissu cancéreux par diffusion.

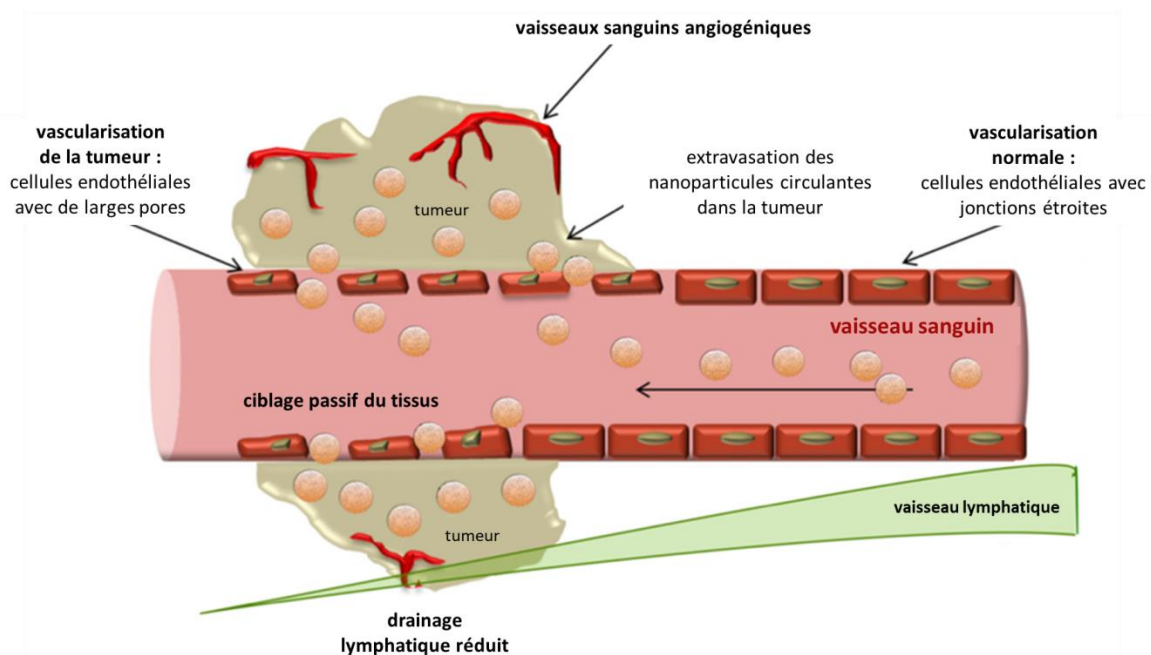


Figure 31 : Principe de l'effet EPR assurant un enrichissement passif de nano-objets au niveau tumoral (adapté de Loureiro et al.)¹⁷²

Ainsi, grâce à l'encapsulation ou à la séquestration de la molécule active au sein d'un nano-objet, sa biodistribution ainsi que son métabolisme s'en trouvent totalement modifiés. La liaison entre les deux entités étant bio-réversible, le nano-objet s'accumule par effet EPR dans le tissu tumoral puis libère de façon passive ou contrôlée la substance active. Ces objets submicroniques sont principalement des systèmes lipidiques, comme les liposomes¹⁷³, glucidiques, comme les cyclodextrines¹⁷⁴, ou encore polymériques, comme les polyacides¹⁷⁵. Deux exemples illustrant cette stratégie avec le paclitaxel¹⁵⁶ et la doxorubicine¹⁷⁶ sont décrits ci-après (Figure 32) :

Introduction bibliographique

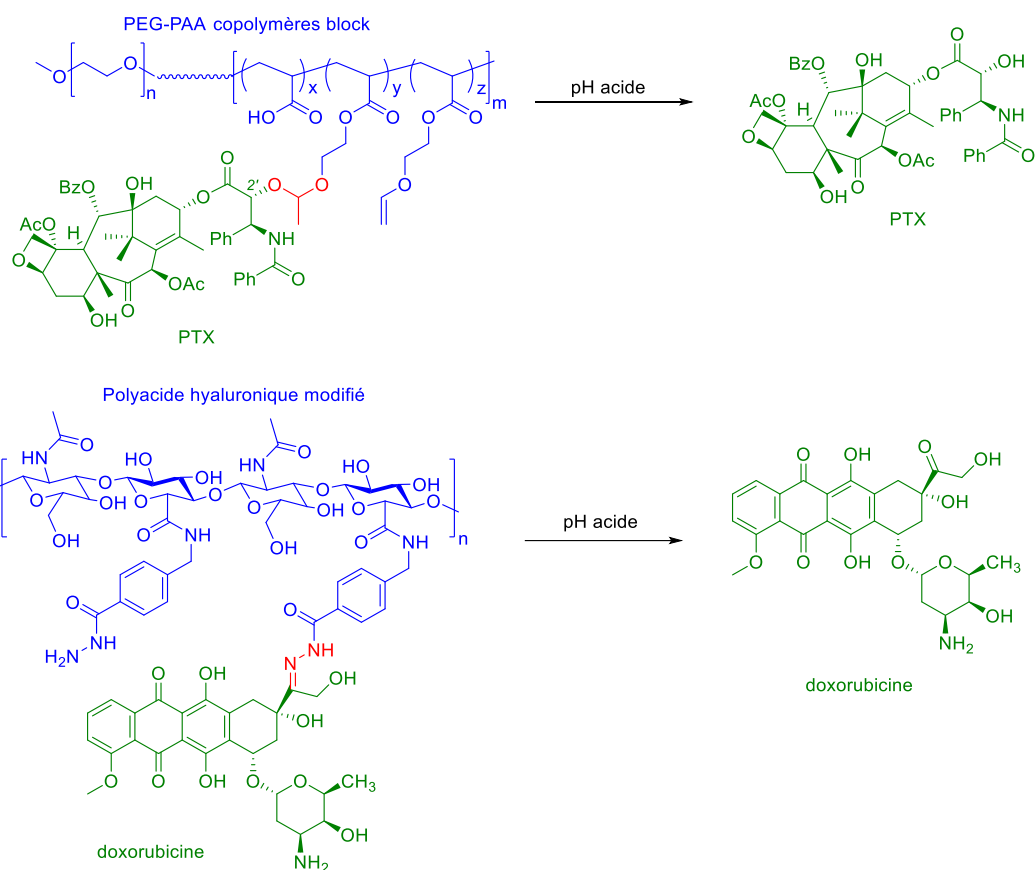


Figure 32 : Structures de prodrogues utilisant l'effet EPR^{156,176}

- Un co-polymère block de polyéthylène glycol (PEG) et de poly(acide acrylique) (PAA) permet de lier le paclitaxel en position 2' avec une fonction acide acrylique *via* une fonction acétal. En solution aqueuse, ces polymères s'assemblent en micelles formant des nano-objets s'accumulant par effet EPR dans l'environnement tumoral. Les micelles sont ensuite internalisées dans les cellules par les endosomes/lysosomes où le pH acide, permet le clivage de la liaison acétal et ainsi la libération du paclitaxel au plus près de la cellule cancéreuse. Des études préliminaires *in vitro* ont montré une toxicité égale à celle du paclitaxel sur cellules d'adénocarcinome de l'utérus (HeLa et KB), toxicité indépendante du polymère porteur de l'agent antinéoplasique. De plus, Gu *et al.* ont démontré que la libération du paclitaxel était bien liée au pH (*i.e.* 20% à pH = 7,4 *versus* 80% à pH = 5)¹⁵⁶.
- Pour la doxorubicine, Liao *et al.* ont conjugué la doxorubicine à un polymère d'acide hyaluronique par le biais d'une liaison hydrazone¹⁷⁶. En solution aqueuse, ces polymères s'assemblent en micelles avec la doxorubicine encapsulée dans le cœur hydrophobe. Après accumulation par effet EPR dans la tumeur, le nano-objet est internalisé. Le pH de l'endosome/lysosome étant acide (pH 4-5), la liaison hydrazone est rompue permettant de libérer la doxorubicine. La preuve d'une libération pH-dépendante a été démontrée *in tubo* par incubation du nano-objet, dans différents tampons. Une étude a montré une cytotoxicité plus importante sur cellules HeLa comparativement aux cellules saines L929.

Introduction bibliographique

b. Vectorisation active vers les cellules cancéreuses

La vectorisation active est basée sur l'utilisation d'une structure moléculaire/vecteur possédant une affinité pour une des caractéristiques du microenvironnement tumoral ou des cellules cancéreuses afin d'enrichir le tissu tumoral en substance active. Ces vecteurs sont classés en deux catégories : les ligands de bas poids moléculaire et les ligands de hauts poids moléculaire comme les anticorps. Le choix d'un vecteur s'appuie sur les caractéristiques propres des tumeurs à cibler et notamment sur la présence de certains récepteurs spécifiques. Un récepteur pertinent pour une stratégie de vectorisation doit répondre à divers critères : (1) être surexprimé sur les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales (ratio au moins égal à 3), (2) posséder un niveau d'expression et de recyclage/synthèse suffisant pour assurer une concentration cytotoxique de la substance active au niveau cellulaire, (3) être localisé à la surface de la cellule préférentiellement au cytoplasme ou au noyau.

Parmi les récepteurs répondant à ces critères et présents sur de nombreuses lignées cancéreuses, on peut notamment citer le récepteur de l'acide folique et le transporteur du glucose 1 (GLUT1), mais également de façon plus spécifique pour le cancer de la prostate, l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA). Pour ce dernier, son niveau d'expression peut atteindre plus d'un million de récepteurs par cellule, notamment pour la lignée cellulaire du cancer de la prostate LNCaP (PSMA +). Bien évidemment ces récepteurs ce ne sont pas les seuls répondant à ces trois critères mais sont sans doute les plus documentés dans la littérature.

i. Des ligands de bas poids moléculaire

(1) Les ligands des récepteurs à l'acide folique

Les récepteurs à l'acide folique sont surexprimés dans diverses cellules cancéreuses (ovaire, pancréas, col de l'utérus, sein, cerveau) par rapport aux cellules saines¹⁷⁷. Ainsi, de nombreux conjugués de l'acide folique ont été engagés dans des stratégies de vectorisation¹⁷⁸, *via* notamment leur conjugaison à la camptotécine¹⁷⁹, la doxorubicine¹⁸⁰ ou bien encore des poisons du fuseau mitotique (vinblastine¹²⁵, tubulysine¹⁸¹, épothilone¹⁸², ...) dont quelques exemples marquants sont donnés Figure 33 :

- le Vintafolide (EC145) (conjugué de la vinblastine) : il dispose d'une autorisation temporaire de mise sur le marché (ATU) dans le traitement du cancer de l'ovaire résistant aux sels de platines et surexprimant les récepteurs aux folates¹²⁵.
- l'EC0225¹⁸³ et l'EC0489¹⁸⁴ (conjugués de la vinblastine) : doté d'un espaceur polysaccharidique diminuant la clairance hépatique responsable d'effets secondaires (constipation). Seules des études de phase I pour le traitement des tumeurs solides réfractaires et métastatiques après épuisement des protocoles recommandés ont été réalisées sans autre évolution depuis 2012 (NCT00441870 et NCT00852189, respectivement).
- L'EC1456 (conjugué de la tubulysine B)¹⁸⁵ : en phase I depuis 2013 et 2017 pour les tumeurs solides et les cancers de l'ovaire respectivement (NCT01999738, NCT03011320).
- L'épofolate (BMS-753493)¹⁸² (conjugué de l'épothilone) : une étude de phase I/II pour le traitement des tumeurs solides réfractaires a montré un manque d'efficacité qui a conduit à l'arrêt des études (NCT00546247 et NCT00550017)
- Une prodrogue de la monométhyl auristatine E (MMAE) ayant comme gachette une entité galactose pouvant être activée par les β -galactosidases. Cette molécule a démontré, *in vitro*, un différentiel de cytotoxicité comparé à la MMAE, et ce, même sur lignées cellulaires ne surexprimant pas les récepteur à l'acide folique¹⁸⁶. Cette même prodrogue a été testée *in vivo* sur un modèle murin porteur de xénogreffe de cellule KB, surexprimant les récepteurs à l'acide

Introduction bibliographique

folique. Cependant, la courbe de suivi du volume tumoral suit celle des groupes contrôles démontrant que la prodrogue n'a pas d'effet anticancéreux¹⁸⁷.

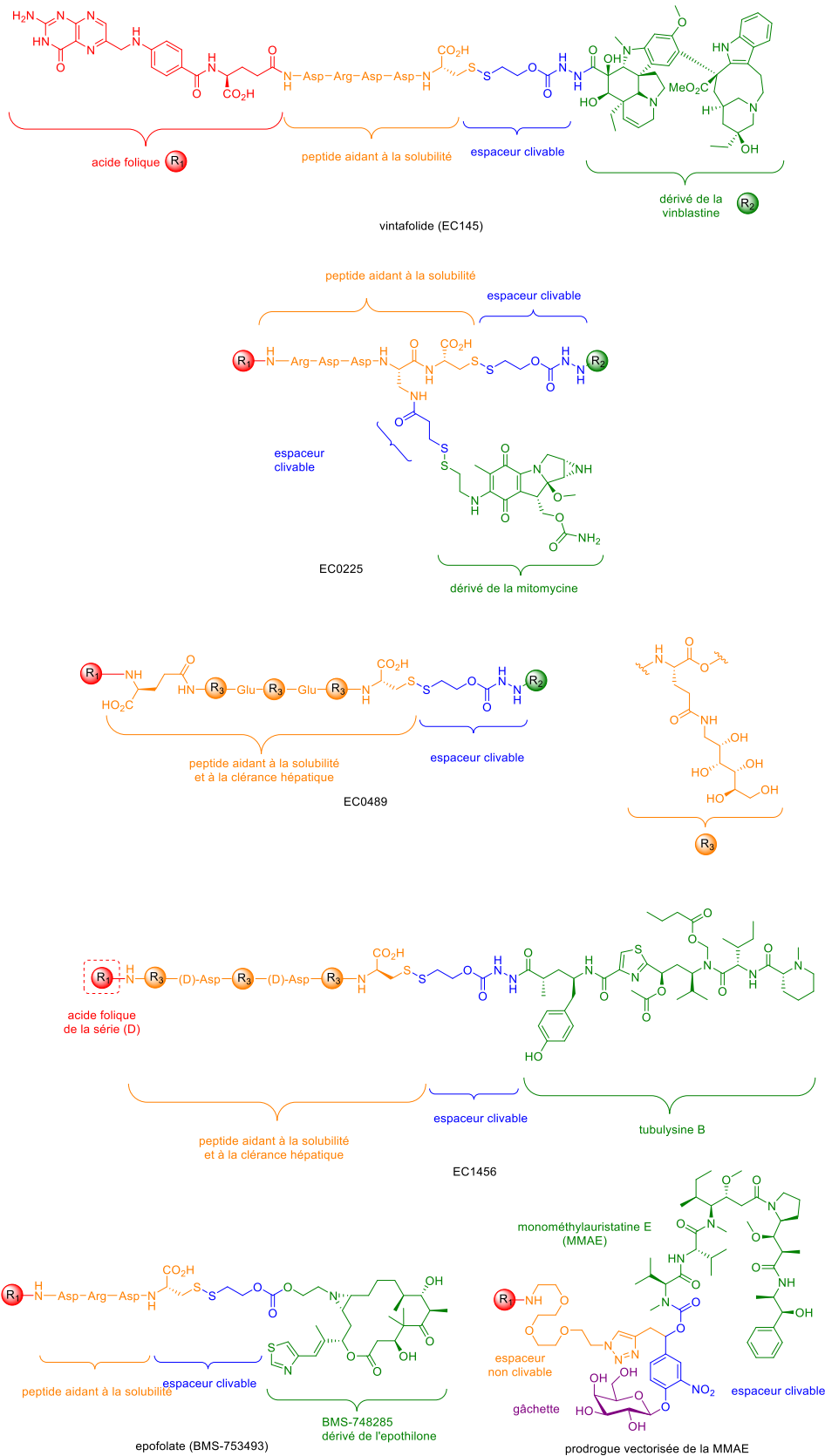


Figure 33 : Structures de prodrogues conjuguées à l'acide folique ayant fait l'objet d'études cliniques ou précliniques^{178,182-184,186,188}

Introduction bibliographique

(2) Les ligands des transporteurs du glucose

Un grand nombre de cellules cancéreuses présente un métabolisme du glucose exacerbé. Ce besoin en glucose se traduit par une surexpression des récepteurs GLUT-1, phénomène observé pour de nombreux cancers tels que les cancers colorectal, du foie, du sein, du cerveau, du pancréas, de la peau, des poumons et de l'oesophage¹⁸⁹. Cette particularité peut être mise à profit pour la vectorisation active de prodrogues *via* la formation de glycoconjugués¹⁹⁰.

Outre la reconnaissance et le transport du conjugué dans le milieu intracellulaire tumoral grâce au motif saccharidique, la glycoconjugaison permet également d'améliorer l'hydrosolubilité de la substance active. Le premier glycoconjugué développé pour cette stratégie et ayant atteint à l'heure actuelle le stade des études cliniques est un dérivé du cyclophosphamide, le glufosfamide (phase III pour le traitement du cancer de la prostate métastasé (NCT01954992))¹⁹¹ (Figure 34). Depuis l'introduction du glufosfamide, d'autres exemples de glycoconjugués en évaluation préclinique sont apparus dans la littérature : des dérivés du paclitaxel^{192,193}, de la doxorubicine¹⁹⁴, d'agents alkylants tels que le chlorambucil¹⁹⁵, le cyclophosphamide¹⁹⁶ ou encore les dérivés du platine¹⁹⁷.

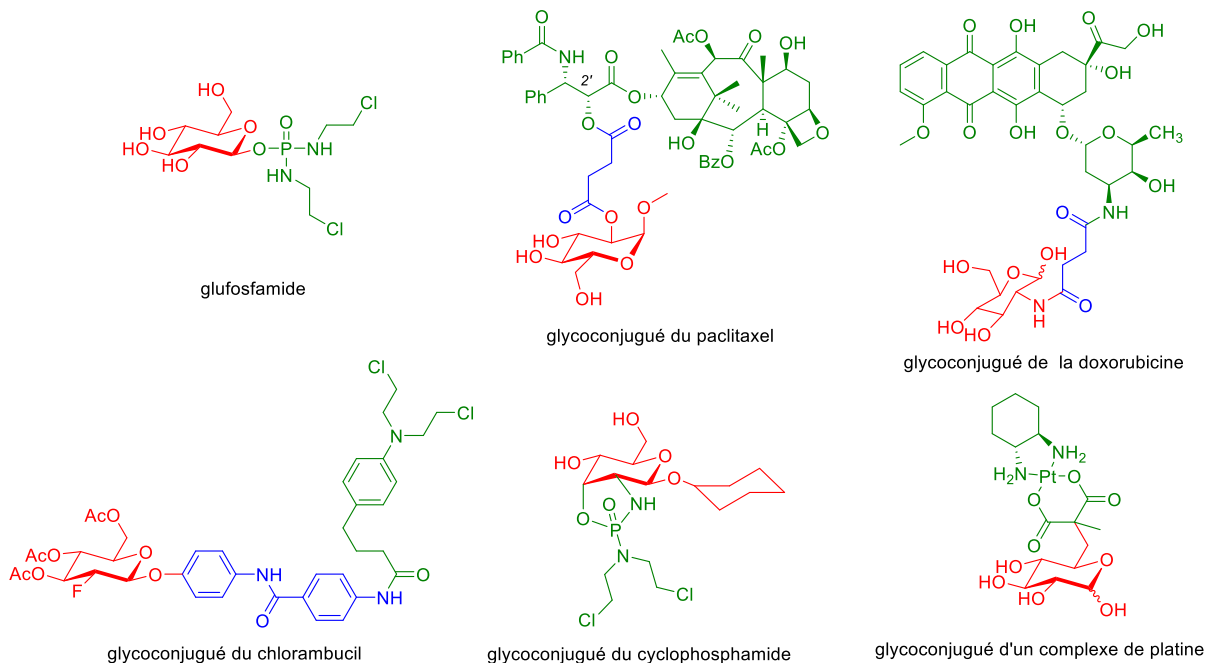


Figure 34 : Structures de prodrogues glycoconjuguées dans une stratégie de vectorisation utilisant les transporteurs GLUT-1^{191,192,194-197}

L'inconvénient majeur du ciblage des GLUT-1 vient du fait que de nombreux organes expriment également ces transporteurs ce qui *de facto* conduit à augmenter les risques de toxicité.

(3) Les ligands du PSMA

Certaines pathologies cancéreuses présentent une surexpression exacerbée d'antigènes dédiés. C'est le cas notamment du cancer de la prostate, et de son antigène membranaire spécifique PSMA. Son ciblage faisant l'objet d'une partie des travaux de cette thèse, cette stratégie va être abordée ici de façon plus détaillée.

Introduction bibliographique

Parmi les nombreux récepteurs extracellulaires exploitables pour la vectorisation active, le récepteur PSMA a émergé comme une cible pertinente dans le cancer de la prostate. Le PSMA est **surexprimé dans les carcinomes prostatiques (1)** et faiblement exprimé à la surface des cellules saines de ce même organe et dans les autres tissus sains excepté les glandes salivaires^{198,199}. Son expression est également corrélée avec le degré de malignité de la tumeur²⁰⁰.

Cette glycoprotéine transmembranaire²⁰¹ est composée de 750 acides aminés. Il s'agit d'un dimère dont chaque monomère comporte un ion zinc. L'enzyme PSMA permet l'hydrolyse d'un neurotransmetteur, l'acide *N*-acétyl-*L*-aspartyl-*L*-glutamique (NAAG)²⁰².

Des études cristallographiques ont pu permettre de déterminer la structure du récepteur et de modéliser les poches d'interactions (Figure 35). Deux cations zinc sont présents au niveau du site actif de l'enzyme. Deux poches adjacentes sont présentes pour accepter d'une part un motif acide glutamique et d'autre part une poche arginine acceptant la présence d'un acide carboxylique. Entre le site actif et l'extérieur de la protéine, une cavité haute de 20 Å est disponible ou sont présentes des poches lipophiles pouvant accueillir des structures hydrophobes comme des cycles aromatiques.

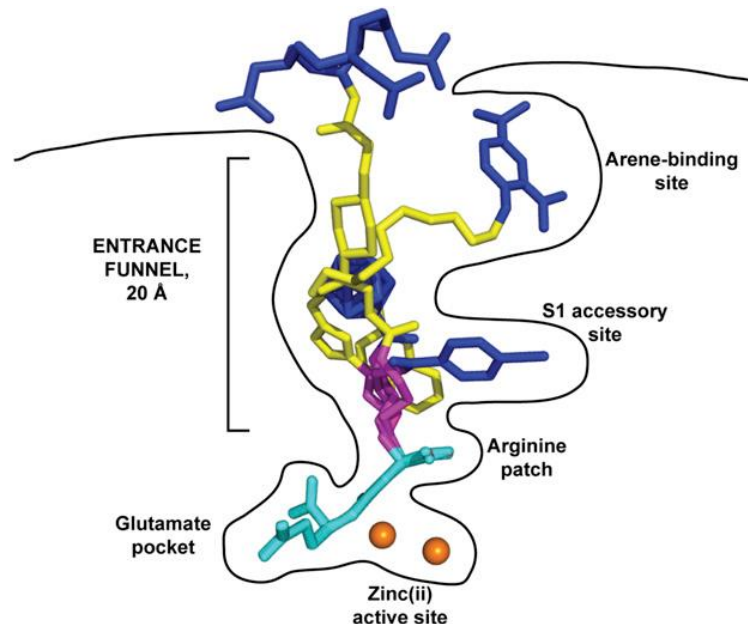


Figure 35 : Site actif du récepteur PSMA contenant un ligand de type urée²⁰³

Ces données associées à la structure du NAAG (Figure 36) ont permis de déterminer un pharmacophore idéal possédant une affinité optimale pour le PSMA. Ce dernier doit posséder :

- une partie acide glutamique avec les fonctions carboxylates se liant par liaison hydrogène avec la protéine,
- un chélatant de l'atome de zinc en alpha de la partie acide glutamique,
- une autre fonction acide carboxylique permettant l'interaction avec une poche comportant des arginines.

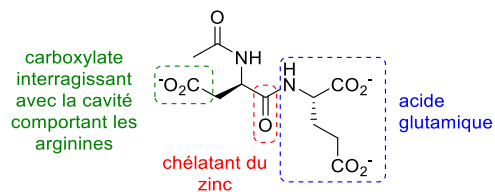


Figure 36 : Structure du NAAG et identification du pharmacophore

Introduction bibliographique

La capacité d'internalisation (2) de ce récepteur membranaire favorise le transfert des molécules vectorisées vers l'intérieur de la cellule²⁰⁴. Toutefois il a été démontré que 40% des récepteurs sont toujours présent à la surface de la cellule démontrant ainsi un équilibre de **recyclage du récepteur (3)** après internalisation²⁰⁴.

Ces trois atouts font donc du PSMA une cible potentielle pour le développement de stratégies de vectorisation active aussi bien à des fins diagnostiques que thérapeutiques. Dans ce cadre, de nombreux ligands synthétiques ont été développés, et peuvent être répartis en trois classes :

- Les **ligands phosphorés** (Figure 37). Ils comportent tous une partie acide semblable à celle de l'acide glutamique (acide pentanedioïque) associé à un acide phosphinique, phosphonique ou phosphoramidique chélatant du zinc^{205,206}. Dans cette famille se trouve la molécule inhibitrice de référence : l'acide 2-phosphonométhyl pentanedioïque (PMPA).
 $K_i = 0,3 \text{ nM}$

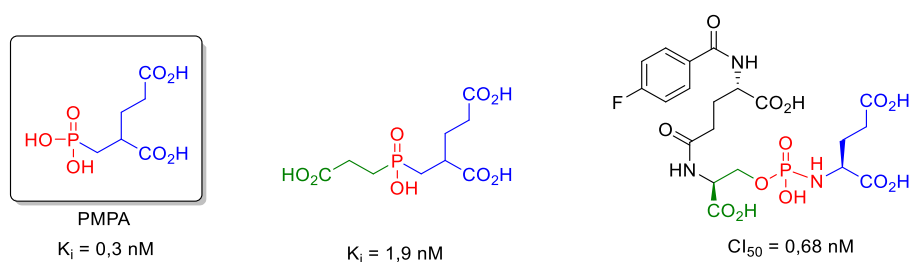


Figure 37 : Structure de ligands phosphorés du PSMA (valeurs de K_i et Cl_{50} mesurées par inhibition de l'enzyme PSMA purifiée)

- Les **ligands thiolés**. Ces derniers sont moins polaires que les ligands phosphorés, ce qui semble être un frein pour l'affinité avec le récepteur. L'atome de soufre joue le rôle de chélateur du zinc. L'analogue soufré du PMPA est moins affiné avec PSMA avec une Cl_{50} de $6 \mu\text{M}$ (Figure 38A)²⁰⁷ alors que l'allongement de la chaîne carbonée au niveau du thiol (Figure 38B), comme la rigidification de la structure (Figure 38C), permet de retrouver des Cl_{50} de l'ordre du nanomolaire²⁰⁸. Toutefois, les structures obtenues ne respectent plus le pharmacophore précédant. De plus, les thiols sont plus sensibles à des réactions de métabolisation que les ligands phosphorés. Des analogues sous forme de lactones (Figure 38D) ont été synthétisés pour pallier à ce problème, mais ont conduit à une perte de l'activité inhibitrice d'un facteur 20²⁰⁹.

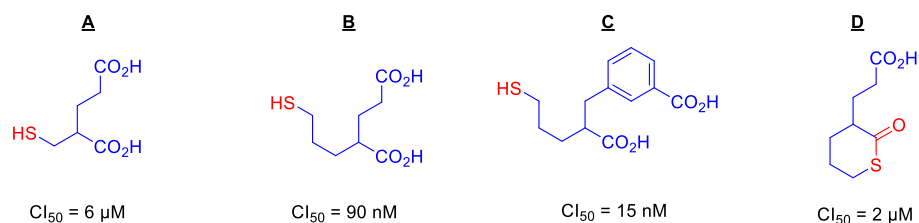


Figure 38 : Structures de ligands thiolés du PSMA

Introduction bibliographique

- Les **ligands à base d'urée**. Ce sont les plus développés dans la littérature. L'urée est synthétisée généralement à partir de l'acide glutamique et d'un autre acide aminé. Cela respecte parfaitement le pharmacophore nécessaire à la bonne interaction avec le PSMA. Le deuxième acide aminé le plus fréquemment associé à l'acide glutamique est lui-même (Figure 39A)²¹⁰, la lysine (Figure 39B,C)^{211,212} ou la cystéine (Figure 39D)²¹³. Outre l'obtention de CI_{50} de l'ordre du nanomolaire, le choix de ces derniers repose également sur la présence d'une fonction acide carboxylique, amine ou thiol disponible après conjugaison et permettant la conception de conjugués dédiés au diagnostic ou à la thérapie vectorisée.

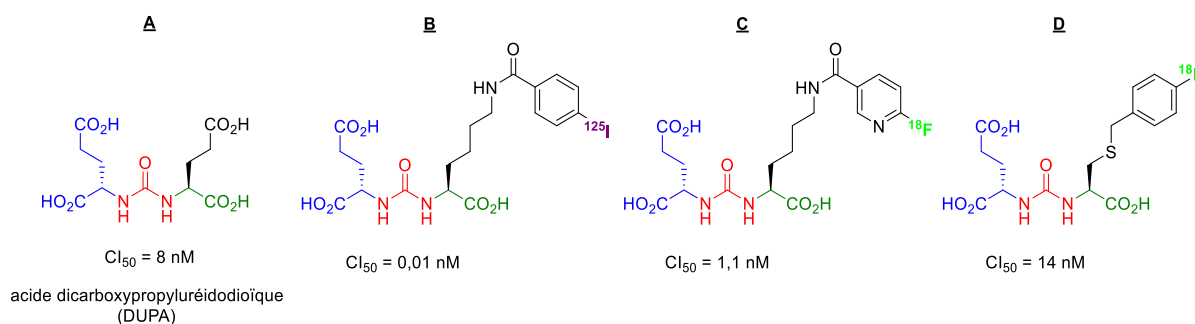


Figure 39 : Structures de ligands de type urée du PSMA

Suscitant un intérêt grandissant du fait de leur grande efficacité et spécificité de ciblage, ces ligands du PSMA de type urée ont été exploités pour la vectorisation de cytotoxiques sous la forme de prodrogues. Deux exemples notoires de la littérature peuvent être cités (Figure 40) :

- Kularatne *et al.* ont conçu une prodrogue vectorisée avec un ligand de type DUPA, un espaceur peptidique non clivable, un espaceur clivable possédant une gâchette pont disulfure, et un poison du fuseau mitotique : la tubulysine B. L'efficacité de cette molécule a été démontrée par une réduction du volume tumoral *in vivo* comparativement au groupe contrôle et au groupe co-traité par le PMPA afin de bloquer les récepteurs du PSMA. Ces résultats et l'absence de ciblage des cellules n'exprimant pas le PSMA valide la stratégie de vectorisation²¹⁴. Cette molécule (EC1169) est actuellement en cours d'essai clinique de phase I (NCT02202447).
- Kumar *et al.* ont décrit une molécule théranostique possédant un motif pégylé trifonctionnalisé permettant de réunir trois entités différentes²¹⁵ :
 - Un ligand du PSMA de type urée (Glu-urée-Lys) fonctionnalisé sur l'amine libre de la lysine, afin d'assurer la vectorisation.
 - Une cage chélatante de type NODAGA (acide 1,4,7-triazacyclononane-1-glutarique-4,7-diacétique) séquestrant du gallium 68 pour l'imagerie TEP.
 - Un agent cytotoxique : la mertansine, un puissant inhibiteur de la polymérisation de la tubuline. Elle est liée par le biais d'un espaceur à une gâchette pont disulfure activée après endocytose.

L'efficacité thérapeutique de cette molécule a été testée *in vitro* sur cellules LNCaP (PSMA positive) comparativement aux cellules PC3 (PSMA négative). La prodrogue est environ 3 fois plus toxique sur les cellules LNCaP comparativement aux cellules PC3, sans toutefois atteindre les valeurs de cytotoxicité de la mertansine seule. Des études ont été réalisées *in vivo* chez des souris porteuses de xénogreffes de cellules PC3-PIP (PSMA+) et de cellules PC3-Flu (PSMA-). Après injection de la molécule théranostique, l'imagerie nucléaire a montré une accumulation

Introduction bibliographique

préférentielle dans la tumeur PC3-PIP ($4,30 \pm 0,20\%$ dose injectée/g) comparativement à la tumeur PC3-Flu ($1,12 \pm 0,42\%$ dose injectée/g).

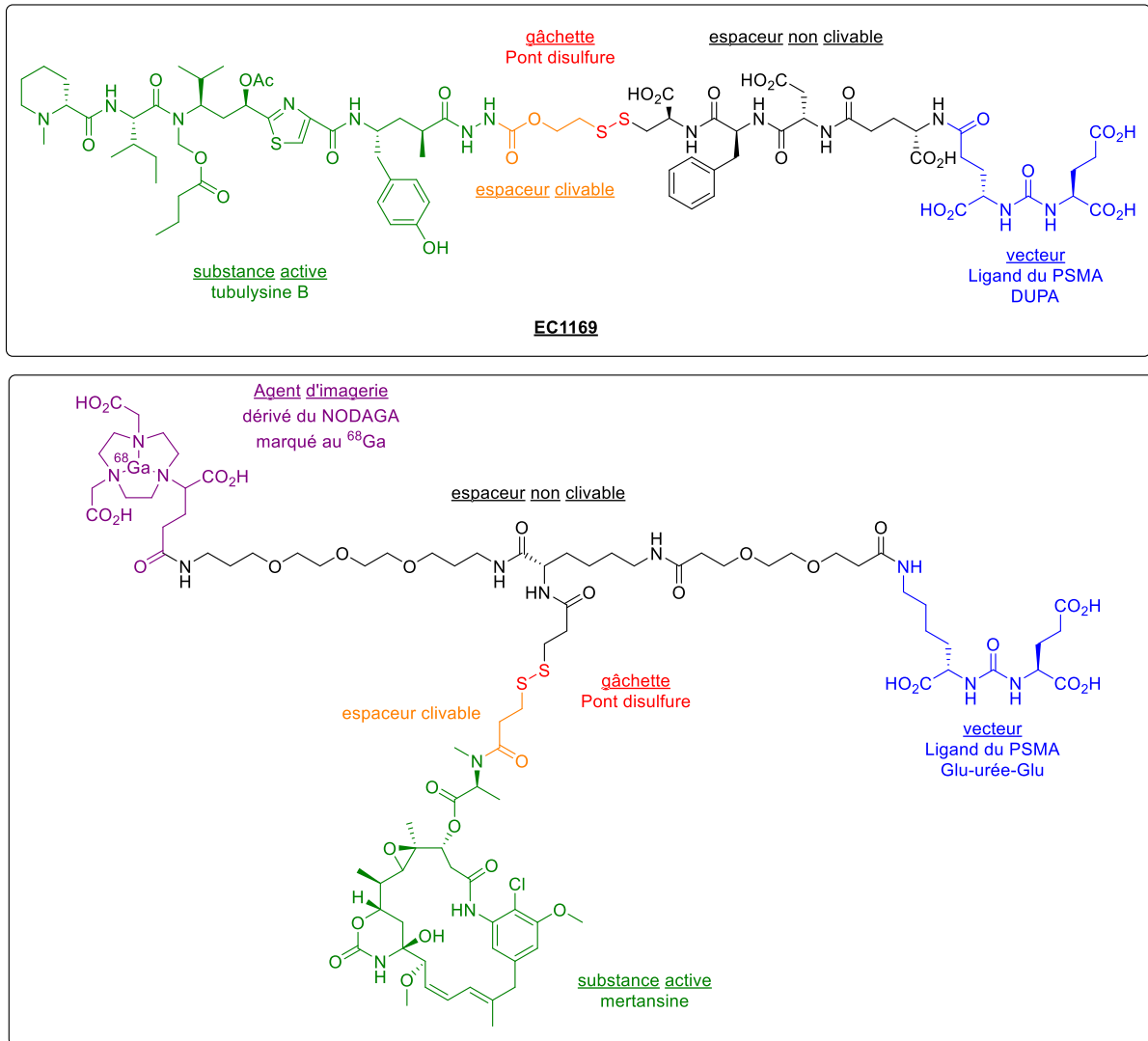
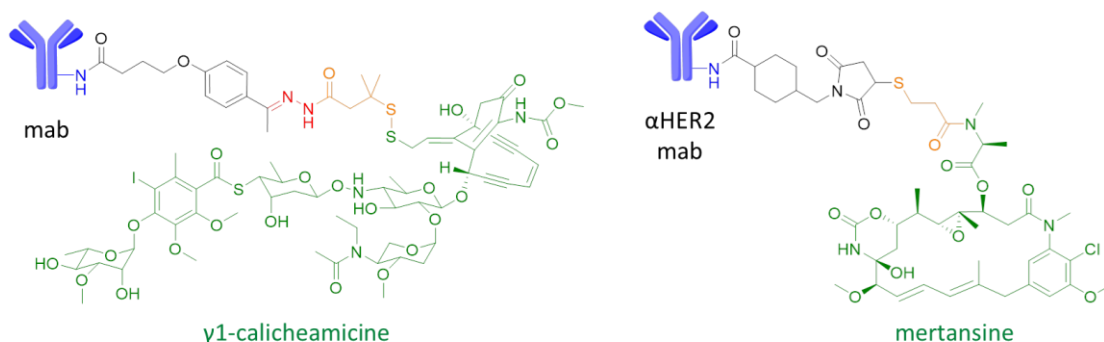


Figure 40 : Structures de prodrogues vectorisées utilisant un ligand du PSMA

ii. Des ligands de haut poids moléculaire : les anticorps

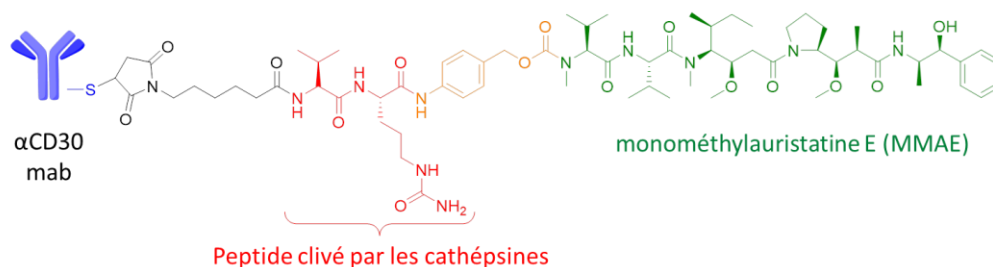
La reconnaissance anticorps/antigène possède une très grande spécificité. Une molécule peut ainsi être greffée chimiquement sur un anticorps servant de vecteur en veillant à limiter la fonctionnalisation de la partie immunoréactive de ce dernier, qui conduirait à une perte de reconnaissance de l'antigène. Ce type de prodrogues est communément retrouvé dans la littérature sous le concept de « antibody drug conjugate » (ADC)^{216,217}. Une fois injecté, l'ADC atteint sa cible membranaire, est internalisé, et la liaison anticorps-agent cytotoxique est rompue par voie enzymatique ou en raison du changement de pH au sein des lysosomes/endosomes, libérant au plus près de la cible plusieurs copies de la substance active. Quatre ADC ont déjà reçu l'approbation de la FDA (« food and drug administration ») et de l'EMA (« european medicines agency ») pour leur mise sur le marché²¹⁸ (Figure 41) :

Introduction bibliographique



mab α CD33 : Gemtuzumab ozogamicine (Mylotarg®) (2000)
 mab α CD22 : Inotuzumab ozogamicine (Besponsa®) (2017)

Trastuzumab emtansine (Kadcyla®) (2013)



Brentuximab vedotine (Adcetris®) (2011)

Figure 41 : Structures de prodrogues liées à un anticorps (ADC) commercialisées²¹⁷

- Le Mylotarg® a été approuvé en 2000 par la FDA puis retiré en 2010 et réintroduit en 2017 après modification du dosage. En France, il fait l'objet d'une ATU depuis 2015. Cette prodrogue est utilisée pour le traitement de la leucémie aigüe myéloblastique²¹⁹. Après internalisation et coupure de la liaison hydrazone, l'entité active dérivée de la γ 1-calicheamicine est libérée. Elle se réarrange *via* une cyclisation de Bergman intramoléculaire conduisant à la formation de radicaux libres entraînant des dommages à l'ADN. Le même espaceur et la même entité active sont utilisés avec l'ADC Besponsa®, approuvé en 2017 par la FDA, utilisant cependant un anticorps monoclonal différent (Inotuzumab) pour le traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique à précurseurs B, exprimant l'antigène CD22²²⁰.
- Le Kadcyla® a été approuvé en 2013 par la FDA, et est utilisé en seconde intention dans la prise en charge du cancer du sein HER2 (« Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 ») positif. Une fois internalisée par endocytose, la macromolécule est lysée par les lysosomes libérant la mertansine agissant par inhibition de la polymérisation de la tubuline²²¹.
- L'Adcetris® a été approuvé par la FDA en 2011 et est utilisé pour le traitement des lymphomes d'Hodgkin réfractaires CD30 positifs. Après avoir été reconnue et internalisée, la prodrogue est lysée par les cathépsines, déclenchant l'autoimmolation de l'espaceur et relarguant la monométhyl auristatine E (MMAE), qui est également un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline^{222,223}.

III. Les prodrogues activables en situation d'hypoxie

Comme évoqué précédemment, l'hypoxie tumorale peut être exploitée pour la conception de prodrogues nommées HAP (« hypoxia activated prodrugs ») qui ne s'activent que dans des conditions physiologiques où l'oxygène se raréfie. Les HAP doivent posséder les caractéristiques propres aux prodrogues, mais également des caractéristiques supplémentaires vis-à-vis de l'hypoxie :

- être activables préférentiellement dans les tissus où le taux d'oxygène est inférieur à la normale afin d'épargner les tissus non cible,
- diffuser aisément au sein des zones hypoxiques de la tumeur,
- toucher l'ensemble des cellules présentes en hypoxie même si ces dernières sont quiescentes,
- libérer leur substance active qui diffuse dans les zones normoxiques de la tumeur pour produire un effet cytotoxique sur les cellules à prolifération rapide. Cet effet est connu sous le nom d'effet Bystander^{*225}.

De manière générale, une HAP doit disposer d'un bon ratio de cytotoxicité normoxie *versus* hypoxie (en anglais « hypoxia cytotoxic ratio » (HCR)), preuve de sa sélectivité préférentielle pour les zones tumorales en hypoxie.

Les motifs moléculaires utilisés comme entités clivables sont tous sensibles à une bioréduction, principalement par voie enzymatique (*e.g.* réductases). Les plus fréquemment retrouvés dans la littérature sont de type *N*-oxyde, quinone, ou nitroaromatique. L'activation enzymatique par les réductases peut se faire par un processus mono- ou di-électronique selon l'enzyme mise en jeu (Tableau 11)²²⁶ :

Réductases intervenant dans un mécanisme à 1 électron	Réductases intervenant dans un mécanisme à 2 électrons
cytochrome P450 oxydoréductase NADH dépendant (P450R) Inductible nitric oxyde synthase (iNOS) FAD-dependent oxydoreductase domain containing 2 (FOXRED2) NADPH dependent diflavine oxydoréductase 1 (NDOR1)	DT diaphorase (NQO1) Aldocétoréductase 1C3 (AKR1C3)

Tableau 11 : Principales réductases intervenant dans l'activation des HAP

- L'activation des HAP par réduction mono électronique (Figure 42) produit un radical anionique de la prodrogue. Ce dernier peut évoluer alors suivant deux voies : i) en présence d'oxygène, cet intermédiaire peut être re-oxydé en composé de départ conduisant à un cycle rédox futile. Lors de cette réaction, l'anion superoxyde formé est détoxifié par les systèmes de défense tels que la superoxyde dismutase. La mauvaise détoxification de ce radical peut entraîner une toxicité indésirable au niveau des cellules en normoxie ; ii) en absence d'oxygène, l'intermédiaire va soit se fragmenter soit subir une seconde réduction, conduisant à la libération de la substance active.
- L'activation par réduction di-électronique (Figure 42) est quant à elle indépendante de l'oxygène. Cette réaction spontanée et irréversible ne sera donc guidée que par la présence au

*Ce terme a été initialement utilisé en radiothérapie. Il fait référence à l'apparition d'un effet thérapeutique sur des foyers tumoraux éloignés de la zone irradiée ²²⁴

Introduction bibliographique

sein des tissus et organes des réductases à deux électrons, indépendamment des conditions normoxiques ou hypoxiques.

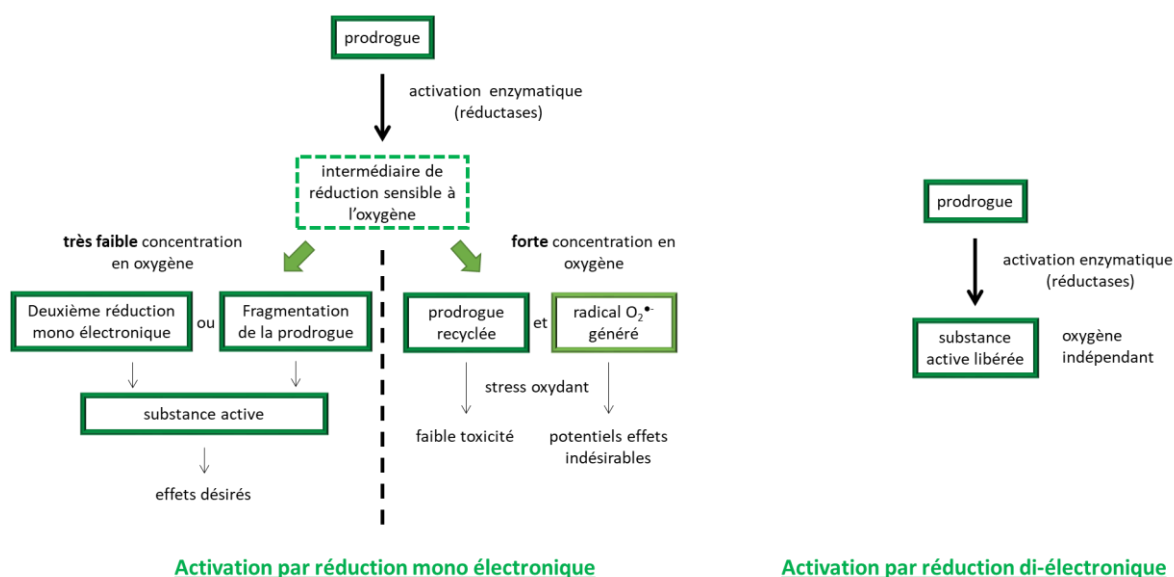


Figure 42 : Mécanismes d'activation mono ou di-électronique des HAP (adapté de Wardman)²²⁷

A partir de ces deux modes de réduction, il est possible de dresser une liste des caractéristiques « idéales » que doivent posséder les gâchettes pour assurer l'activation des HAP :

- N'être substrat que des réductases à un électron pour éviter toute activation en présence d'oxygène.
- Posséder un potentiel rédox approprié, c'est-à-dire compris entre -400 et -200 mV²²⁶. Il ne doit pas être trop faible ce qui compromettrait la réduction par les nitroréductases ($E = -220 \sim -310$ mV) et donc l'activation de la prodrogue, ni trop élevé sous peine d'avoir une cinétique de réduction très rapide empêchant la ré-oxydation par l'oxygène et annihilant alors toute spécificité pour les zones hypoxiques.

Dans la littérature, les HAP peuvent être classées en deux catégories²²⁸ :

- les HAP de classe I qui sont activées dans des conditions d'hypoxie modérée ($\%O_2 \leq 2\%$).
- les HAP de classe II qui sont activées en hypoxie sévère ($\%O_2 \leq 0,1\%$). De telles HAP permettent d'éviter une toxicité sur des organes sains physiologiquement hypoxiques tels que la moelle osseuse, la rétine, l'œsophage. Ces HAP disposent de potentiels rédox plutôt proches de -400 mV.

Le potentiel des HAP est souvent évalué en clinique en combinaison avec un autre traitement anticancéreux (chimiothérapie ou radiothérapie) permettant à la fois de toucher la fraction normoxique et hypoxique de la tumeur. Depuis les deux dernières décennies, de nombreuses HAP ont été documentées. Parmi elles, trois familles principales ont fait l'objet d'études approfondies allant jusqu'au stade clinique: les quinones, les *N*-oxydes et les nitro-aromatiques.

A. Les quinones

Les quinones sont historiquement les premiers dérivés utilisés comme entités bio-réductibles pour la synthèse de HAP. Elles peuvent être activées par des réductases mono ou di-électroniques. La mono-réduction sous l'action des P450R conduit à la formation d'un radical semi-quinone qui, en situation d'hypoxie se transforme en hydroquinone. La réduction à deux électrons peut quant-à-elle être réalisée par la DT-diaphorase, enzyme surexprimée dans de nombreuses tumeurs solides hypoxiques²²⁹. La force motrice de cette réaction est l'aromatization de la structure conduisant à la formation d'un motif 1,4-dihydroxybenzène (*i.e.* hydroquinone) (Figure 43).

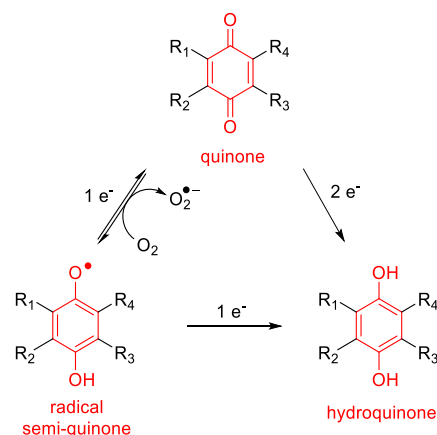


Figure 43: Mécanismes de bioréduction des quinones (adapté de Chen et al.)²²⁹

Le chef de file de cette famille est la mitomycine C (Amétycine®), substance alkylante d'origine naturelle, utilisée pour le traitement de divers cancers comme les cancers colorectaux, de l'estomac, du pancréas, du sein ou encore de la vessie²³⁰.

Son mécanisme d'action résulte d'une cascade d'événements initiée par la bioréduction (Figure 44). Une fois la quinone réduite en hydroquinone, l'hétérocycle dihydropyrrole adjacent va s'aromatiser après départ d'une molécule de méthanol, pour conduire à une structure indolique. S'en suit alors l'ouverture du cycle aziridine initiée par délocalisation électronique d'une des fonctions phénol. L'accepteur de Michael ainsi formé devient un puissant électrophile qui va être attaqué par les fonctions nucléophiles des bases de l'ADN. Une seconde délocalisation par mésomérie va alors avoir lieu grâce à l'atome d'azote de l'indole, permettant le départ d'une molécule d'acide carbamique. Un nouvel accepteur de Michael est ainsi créé permettant une seconde alkylation de l'ADN.

Introduction bibliographique

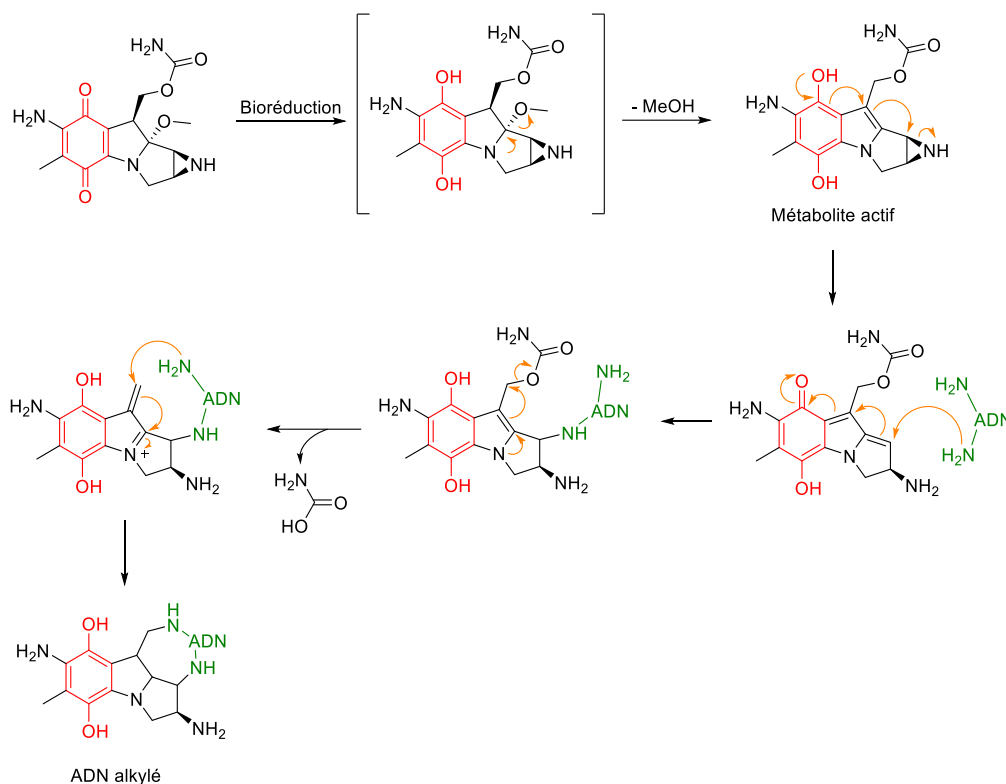


Figure 44: Mécanisme d'alkylation de l'ADN par bioréduction des dérivés de la Mitomycine C (d'après Colucci et al.)²³¹

La sélectivité de la mitomycine C pour les conditions hypoxiques est toutefois très faible : en effet cette dernière peut être activée, comme évoqué précédemment, par voie diélectronique mais également par catalyse acide²³².

Un analogue *N*-méthylé de la mitomycine C, la porphiromycine (Figure 45), a fait l'objet de phases cliniques III en combinaison avec la radiothérapie chez des patients atteints de carcinome épidermoïdes de la tête et du cou mais n'a pas montré d'augmentation de la médiane de survie comparé à l'utilisation de la mitomycine C en combinaison avec la radiothérapie²³³. Aucun autre essai clinique n'a été recensé à ce jour sur la porphiromycine.

L'apaziquone (EO9) (Figure 45) est la HAP quinonique la plus étudiée pour ces applications en cancérologie. Elle peut être activée, soit par les P450R soit par les DT-diaphorases²³⁴. Son mécanisme d'alkylation est analogue à celui de la mitomycine C.

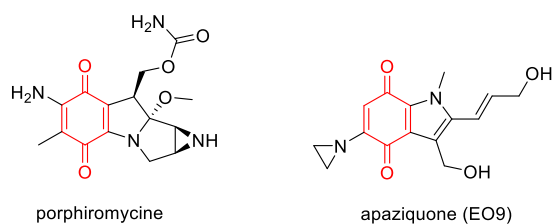


Figure 45: Structure de la porphiromycine et de l'apaziquone (EO9)

Introduction bibliographique

Du fait en partie de ses propriétés pharmacocinétiques défavorables comme une élimination trop rapide de la circulation sanguine (temps de $\frac{1}{2}$ vie < 10 min) et d'une mauvaise diffusion dans les tissus avasculaires²³⁵, les essais cliniques de phase II ont été décevants. L'apaziquone est actuellement en essai clinique de phase III pour le cancer de la vessie invasif après administration loco-régionale, en tant que traitement adjuvant à la chirurgie. Les premiers résultats ont montré une diminution du taux de récurrence des patients à deux ans significative comparativement au groupe ayant reçu un placebo, mais uniquement pour les patients ayant reçu l'apaziquone entre 30 et 90 minutes post-chirurgie et non lors des premières minutes. Ce manque d'efficacité lors d'une administration rapide de l'apaziquone suivant la chirurgie serait corrélée avec un fort apport sanguin (apport d'oxygène et/ou faible stabilité de la prodrogue dans le sang)²³⁶. D'autres essais cliniques de phases III sont actuellement en cours avec cette molécule pour le traitement de la vessie avec une ou deux doses administrées en locorégionale *versus* un placebo (NCT02563561), ou encore chez des patients atteints d'un cancer de la vessie non invasif sur le muscle avec une administration locorégionale après chirurgie (NCT03224182).

B. Les N-oxydes

Les HAP possédant une gâchette N-oxydes ont un mécanisme d'activation et un mode d'action qui diffèrent selon le type de N-oxyde utilisé (aliphatiques ou aromatiques). Même si leur sélectivité est reconnue pour l'hypoxie, seules quelques molécules ont atteint les phases cliniques.

1. Les N-oxydes aromatiques

La tirapazamine (TPZ) est la première molécule ayant émergé dans cette classe de N-oxydes aromatiques. Elle est essentiellement réduite par les P450R générant la TPZ radicalaire qui va ensuite se dégrader et former deux espèces radicalaires : un radical hydroxyle et, par fragmentation homolytique et après déshydratation, un radical 1-N-oxyde benzotriazinyle (Figure 46). Ces deux radicaux vont être à l'origine de l'activité cytotoxique de la molécule.

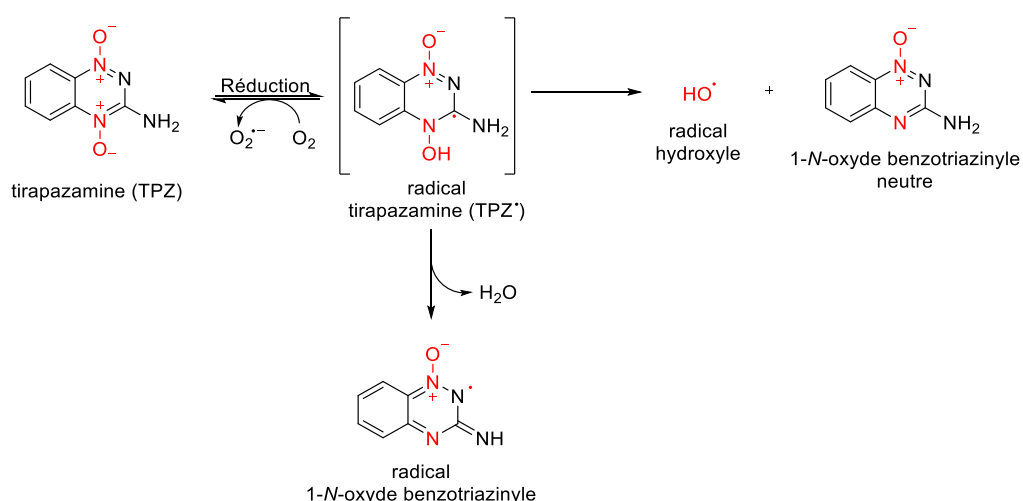


Figure 46: Mécanisme d'activation de la TPZ par réduction mono-électronique (adapté de Chen et al.)²²⁹

Suite aux très bons résultats *in vitro* (HCR entre 15 et 200)²³⁷ et *in vivo* obtenus, cette molécule a fait l'objet de plusieurs études cliniques de phase I, II et III en association avec des agents de

Introduction bibliographique

chimiothérapie anticancéreuse tels que le *cis*-platine et l'étoposide, ou encore avec la radiothérapie. Une potentialisation des effets de la radiothérapie pour le traitement des tumeurs de la tête et du cou et des tumeurs pulmonaires à petites cellules a bien été observée²³⁸. Cependant, aucun bénéfice de l'association TPZ / cisplatine en termes d'amélioration de la médiane de survie des patients n'a été obtenu dans le cadre d'un essai clinique de phase III pour le traitement du cancer du col de l'utérus²³⁹. Le même constat a été réalisé avec un essai clinique de phase III chez des patients atteints de cancers de la tête et du cou traités soit avec l'association TPZ / cisplatine / radiothérapie soit avec la combinaison cisplatine / radiothérapie²⁴⁰.

A ce jour, les études cliniques avec la tirapazamine n'ont pas montré de résultats concluants en termes d'activité en phase clinique III. De surcroît, de fortes toxicités hématologiques ont été observées. Ces échecs seraient en partie liés à une mauvaise diffusion de la molécule jusqu'aux cellules hypoxiques. Afin d'y remédier, des études de pharmacomodulation de cette molécule ont été réalisées. Deux molécules ont été retenues : SN-30000 et SN-29751 (Figure 47)²⁴¹.

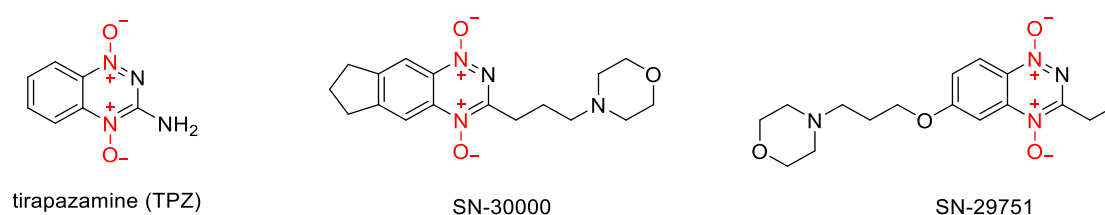


Figure 47: Structures de la TPZ et de deux de ses dérivés : SN-30000 et SN-29751²⁴¹

Ces deux analogues de la TPZ ont démontré des résultats similaires en termes de cytotoxicité *in vitro* et un HCR supérieur ou égal à celui de la TPZ, sur un panel de huit lignées tumorales exception faite des cellules de carcinome colorectal (HT-29) où la molécule SN-30000 a montré un HCR supérieur à la molécule SN-29751 (HCR = 123 *versus* 67)²⁴¹. Ce résultat a été l'un des critères pour abandonner la molécule SN-29751 au profit de SN-30000. Comparativement à la TPZ, le dérivé SN-30000 affiche une meilleure perméabilité au sein de la tumeur du fait de l'ajout de motifs plus lipophiles (cyclopentyle et alkylmorpholine) et du remplacement de la fonction amine. Cependant, cette molécule s'est révélée être instable photochimiquement en solution aqueuse²⁴². De surcroît elle présente un métabolisme par bioréduction non-tumoral responsable pour une large part d'une hypothermie chez la souris ($\sim 8^\circ\text{C}$ inférieur au groupe contrôle)²⁴³. Aucune information supplémentaire n'ont été communiquées sur la poursuite d'essais sur cette molécule.

2. Les N-oxydes aliphatiques

La fonction N-oxyde peut également être introduite sur une amine aliphatique. C'est le cas de la banoxantrone également appelée AQ4N. Après métabolisation par des cytochromes P450 (1A, 2B6 et 3A) ou la iNOS, la réduction mono ou di-électronique de la molécule libère les deux amines tertiaires de l'AQ4 qui est le métabolite actif de la molécule (Figure 48)²³⁴.

Introduction bibliographique

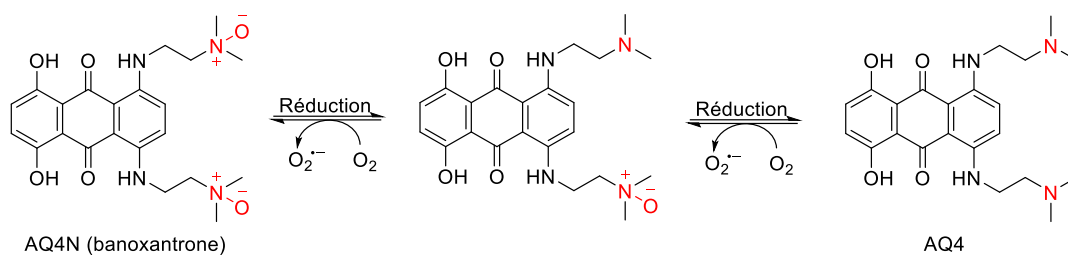


Figure 48: Mécanisme d'activation de AQ4N²³⁴

AQ4, avec sa structure tricyclique est un intercalant de l'ADN et un inhibiteur de topoisomérase de type II. L'AQ4N serait peut retenu dans les cellules (1%), tout comme l'AQ4 (26%) ce qui laisse présager d'un possible effet bystander sur les cellules voisines en normoxie²⁴⁴. En combinaison avec la radiothérapie ou la chimiothérapie (thiotépa, cyclophosphamide ou *cis*-platine), il potentialise leur effet en agissant sur les cellules hypoxiques qui, si elles n'étaient pas éradiquées, repeuplèrent la tumeur après élimination de la fraction normoxique²⁴⁴. Trois essais cliniques de phase I ont été réalisés pour différents cancers solides comme le glioblastome, le cancer du poumon ou encore le cancer de la prostate. Ces études ont permis de définir une dose limite de toxicité supérieure à celle des modèles animaux (768 mg/m² contre 200 mg/m²)^{245,246} et les concentrations en AQ4 retrouvées dans les tumeurs sont supérieures à celles obtenues dans les modèles précliniques²⁴⁶. Aucun autre essai clinique ne semble avoir été poursuivi à ce jour avec cette molécule.

Un nouvel analogue, OCT1002 est actuellement développé (Figure 49). La présence d'atomes de deutérium permet de limiter la métabolisation par les cytochromes P450 et une modification des interactions non covalentes²⁴⁷. Cette molécule a démontré, sur un modèle murin porteur d'une xélogreffe de carcinome prostatique (LNCaP), un ralentissement de la croissance tumorale en association avec le bicaludamide (antiandrogène non stéroïdien). Cette molécule est en cours de développement par la société OncoTherics.

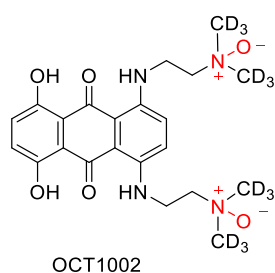


Figure 49 : Structure de la molécule OCT1002

C. Les nitro-aromatiques

L'atome d'azote d'un groupement nitro est, de manière générale, déficitaire en électrons et donc sensible à la réduction. Ce groupement peut donc être un excellent motif bioréductible utilisable pour la conception de prodrogues activables en hypoxie. Pour un dérivé nitro-aromatique, le doublet électronique regagné par l'azote après réduction, permet d'initier une délocalisation des électrons à travers le cycle aromatique, déclenchant ainsi la libération de l'entité active de la

prodrogue (Figure 50). Ce phénomène est retrouvé dans la littérature sous le terme « Electronic Switch ».

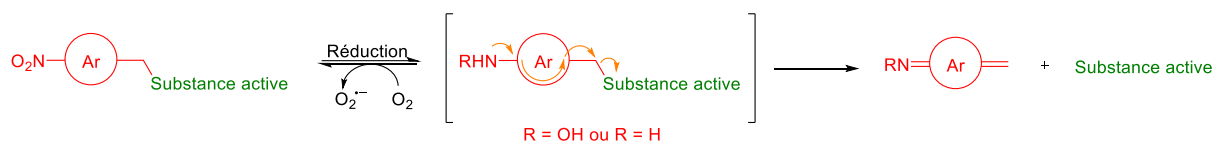


Figure 50: Processus de déclenchement d'une prodrogue après réduction utilisant un groupement nitro-(hétéro)aromatique comme activateur

La bioréduction du groupement nitro par voie mono- ou di-électronique, tout comme sa réduction chimique classique, conduit à un intermédiaire clef de type nitroso. Concernant la voie mono-électronique, la formation du composé nitroso est réalisée *via* une réaction de dismutation entre deux radicaux anioniques nitrés²⁴⁸. Cet intermédiaire est par la suite réduit en hydroxylamine puis en amine. L'atome d'azote ayant son doublet non liant dans les trois formes réduites, celles-ci peuvent toutes amorcer la libération de la substance active. Cependant, ce rôle est le plus souvent rempli par l'intermédiaire hydroxylamine²²⁹ (Figure 51).

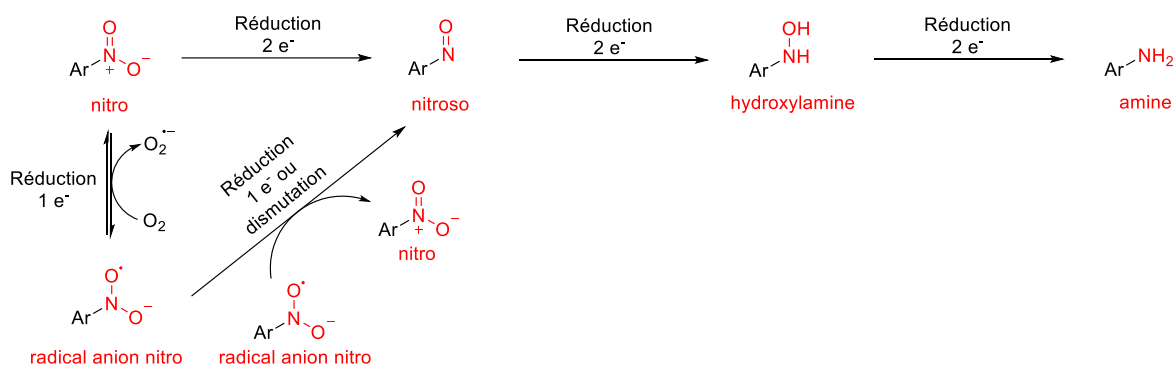


Figure 51: Intermédiaires obtenus après réduction à 1 ou 2 électrons de dérivés nitro-aromatiques (adapté de Patterson et al.)²⁴⁸

Deux prodrogues possédant une gâchette de type nitroaromatique ont atteint à ce jour les phases cliniques: le PR-104, qui est un polynitrophényle substitué, et le TH-302 (evofosfamide), qui est un 2-nitroimidazole substitué.

1. PR-104

Cette molécule possède un motif dinitroaryle comme entité activable substituée en position 5 par un groupement amide. Ces trois groupements électroattracteurs sont tous placés en *ortho* ou *para* de la moutarde azotée ce qui a pour effet de désactiver le doublet non liant de l'atome d'azote, privant ainsi l'agent alkylant d'activité cytotoxique sous cette forme. Le PR-104 est en réalité une « pré-prodrogue » (Figure 52). En effet la fonction hydroxyle du PR-104A sur sa chaîne latérale est masquée sous la forme d'un phosphate dichargé qui permet d'augmenter la solubilité de la molécule dans l'eau avant action des phosphatases *in vivo*. La fonction nitro en *para* de la moutarde azotée de PR-104A va être réduite pour donner le métabolite majeur, l'hydroxylamine PR-104H, mais aussi l'amine PR-104M correspondante. Il a été démontré que le clivage de cette HAP pouvait être réalisé par les P450R pour la réduction mono électronique et par la AKR1C3 pour la réduction di-

Introduction bibliographique

électronique²³⁴. Le PR-104 est une moutarde dite mixte. Elle possède deux groupements partant : un brome et un mésyle. Cette combinaison s'est révélée plus sélective en hypoxie que la moutarde dibromée correspondante²⁴⁹.

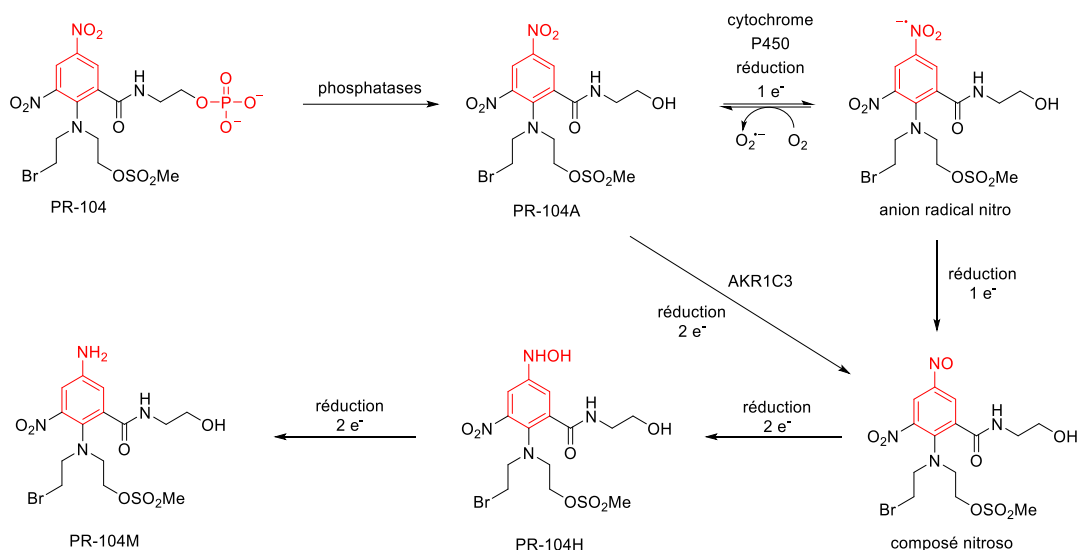


Figure 52: Mécanisme d'activation de PR-104 (adapté de Phillips)²³⁴

Cette molécule a montré une efficacité *in vitro* sur une dizaine de lignées cellulaires avec des HCR allant de 10, par exemple sur des cellules de cancer du poumon non à petites cellules (H460), à 100 sur des cellules de carcinome colorectal (HCT116). Les études *in vivo* ont également révélé une amélioration de la survie et une inhibition de la croissance tumorale sur animaux porteurs de xénogreffes de tumeur du poumon, du colon, du col de l'utérus, du pancréas et de l'ovaire²⁵⁰. Il a été aussi mis en évidence que l'activité antitumorale de PR-104 était liée à un effet bystander à hauteur de 50 %²⁵¹.

Cette molécule a atteint diverses études cliniques :

- de phase I dans le cadre de cancers solides, seule ou en association avec le docétaxel ou la gemcitabine (NCT01358227 et NCT00459836²⁵², respectivement),
- de phase clinique II sur le cancer des poumons à petites cellules, seule ou en association avec le docétaxel (NCT00544674 et NCT00862134 respectivement),
- de phase clinique I/II sur le cancer du foie en association avec le sorafenib (NCT00862082).

Une étude de phase I/II (NCT01037556) chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigue ou de leucémie lymphoblastique aigue a permis de démontrer une diminution des niches tumorales hypoxiques dans la moelle osseuse chez les patients atteints de ces pathologies²⁵³. Mais des résultats non significatifs en termes de survie et une faible tolérance (myélosuppression importante) semblent avoir pour le moment conduit à l'arrêt de ces études.

2. TH-302

Appelé également evofosfamide, le TH-302 a été découvert par la société Threshold Pharmaceutical et constitue actuellement la HAP de référence dans la littérature. Il est composé d'un 2-nitroimidazole comme entité clivable et d'une moutarde isophosphorodiamidate bromée. La réduction du nitroaromatique est réalisée par les cytochromes P450 réductases. En absence d'oxygène, le radical anionique généré subit une fragmentation permettant la libération de l'agent alkylant en dehors de tout apport électronique supplémentaire (Figure 53)²⁵⁴. De plus, s'agissant d'une HAP de classe II seule une hypoxie sévère permet son déclenchement rendant cette molécule très sélective.

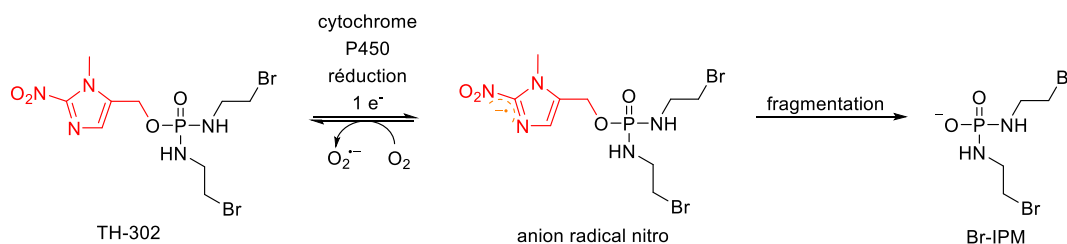


Figure 53: Mécanisme d'activation de TH-302²⁵⁴

In vitro, le TH-302 a montré une activité cytotoxique sur un panel de 32 lignées tumorales avec un HCR variant de 11 sur des cellules de glioblastomes (U87-MG) à 600 sur des cellules de mélanomes (SK-MEL-5). Sa capacité à agir par effet Bystander a également été mise en avant mais semble être remise en cause d'après de récents travaux de la littérature^{254,255}. Des études précliniques ont montré que les zones d'hypoxies tumorales sont bien ciblées par cette molécule. En effet, une co-localisation du marquage immunohistochimique au pimonidazole, de la radioactivité issue de l'injection de [¹⁸F]-fluoromisonidazole ([¹⁸F]-FMISO) (¹⁸F ($t_{1/2} = 1,83$ heures, $E_{\beta+}$ max. = 634 keV)), radiotraceur de l'hypoxie tumorale, et du TH-302 marqué au carbone 14 (¹⁴C ($t_{1/2} = 5730$ ans, $E_{\beta-}$ max. = 157 keV)) a pu être observée (Figure 54)²⁵⁶.

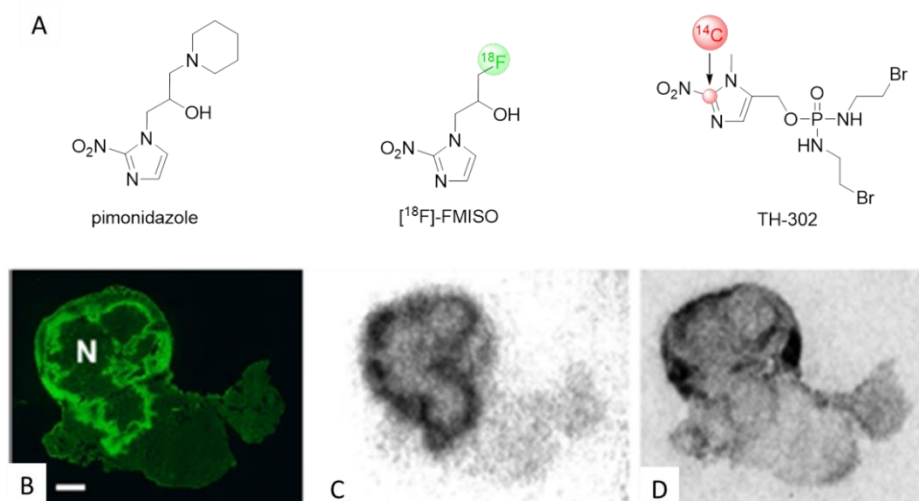


Figure 54 : Colocalisation de la radioactivité issue du [¹⁴C]-TH-302 et des traceurs de l'hypoxie

A: Structure du pimonidazole, du [¹⁸F]-FMISO et du [¹⁴C]-TH-302 marqué au carbone 14 au niveau de la gâchette sur le carbone 2 de l'imidazole ;

Coupes de tumeur du pancréas (cellules BxPC3 implantées en orthotopique chez la souris) 2 heures post-injection de pimonidazole, [¹⁸F]-FMISO et [¹⁴C]-TH-302, B : image de fluorescence suite au marquage immunohistochimique au pimonidazole ; images d'auto-radiographie : C : détection du [¹⁸F]-FMISO 2 heures après sacrifice, D : détection du [¹⁴C]-TH-302 24 heures après sacrifice (adapté de Grkovski et al.)²⁵⁶ ; N : normoxie

Introduction bibliographique

Avec 27 études cliniques de phase I à III, en cours ou terminées, il s'agit de la HAP la plus étudiée à ce jour.

En association avec la gemcitabine, le TH-302 a atteint le stade III des phases cliniques pour le traitement des cancers du pancréas non résecable métastatique ou localement avancé (étude MAESTRO, NCT01746979)^{257,258}. Toutefois, les résultats de cette étude n'ont pas permis de démontrer une amélioration significative de la survie comparativement au traitement de référence (*i.e.* gemcitabine)^{257,259}. Les résultats de la phase II (NCT01144455) semblaient prometteurs en démontrant une amélioration de la médiane de survie chez des patients atteints d'un cancer du pancréas de stade avancé ou métastatique traité par cette même association (gemcitabine/TH-302), comparativement à un traitement à la gemcitabine seule²⁵⁸. Un nouvel essai de phase II sur des tumeurs du pancréas en combinaison avec le sunitinib, un inhibiteur de protéine kinase est actuellement en cours (NCT02402062).

Un essai de phase III (NCT01440088) a également été réalisé en association avec la doxorubicine, chez des patients atteints de sarcomes des tissus mous, mais n'a montré aucune amélioration de la médiane de survie comparativement au traitement avec la doxorubicine seule²⁶⁰. Une hypothèse avancée pour expliquer l'échec de cette combinaison serait un mécanisme de transfert électronique entre la fonction quinone de la doxorubicine et l'anion radical nitré du TH-302, stoppant ainsi le mécanisme de déclenchement du TH-302²⁶¹.

En dehors des essais réalisés sur cancers solides, une étude clinique de phase I en monothérapie chez des patients atteints de leucémies avancées est actuellement en cours mais semble indiquer une faible efficacité du TH-302, toutefois les marqueurs d'hypoxie tels que HIF-1 voient leur expression diminuée après traitement²⁶².

Même si le résultat des premiers essais cliniques de phases III n'ont pas montré une amélioration significative de la médiane de survie des patients, de nombreux autres sont en cours, démontrant l'intérêt que cette molécule continue de susciter en tant que HAP. De plus, sa méthode d'activation par fragmentation et sa sensibilité corrélée aux faibles taux d'oxygène font du motif 2-nitroimidazole une gâchette pertinente pour la libération contrôlée et spécifique en condition hypoxique.

D. Nouvelles HAP libérant des effecteurs autres que des agents responsables de dommages à l'ADN

Bien que la plupart des HAP développées jusqu'ici comportent un agent alkylant comme substance active, de nouveaux agents anticancéreux tels que des inhibiteurs de protéine kinase, des intercalants de l'ADN ou des antimétabolites sont maintenant utilisés pour la conception de HAP. Quelques exemples sont donnés ci-après.

1. HAP basées sur des chimiothérapies classiques autres qu'alkylantes

Basé sur la même stratégie de libération que le TH-302, Jin *et al.* a décrit une prodrogue de SN-38 avec un espaceur clivable contenant une gâchette 2-nitroimidazole (Figure 55)¹¹⁸. Après incubation *in tubo* avec des microsomes hépatiques de souris à 37 °C, environ 90% de la prodrogue a été consommée. Cependant, le SN-38 n'a été détecté qu'à hauteur de 25% dans le milieu parmi les multiples autres sous-produits. Les tests de cytotoxicité avec cette molécule ont révélé un HCR proche de 1 démontrant une faible sélectivité de cette HAP pour les conditions hypoxiques.

Introduction bibliographique

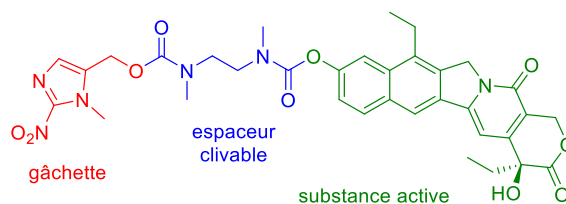


Figure 55 : Structure de HAP de SN-38 utilisant le 2-nitroimidazole comme gâchette

Le 2-nitroimidazole peut être également utilisé comme gâchette pour réaliser une cyclisation intramoléculaire entre l'amine, issue de la bioréduction du groupement nitro, et un carbamate ou carbonate judicieusement positionné (Figure 56).

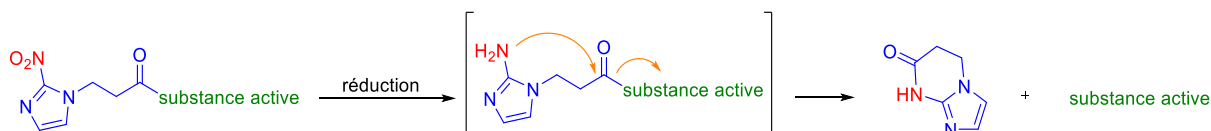


Figure 56 : Utilisation de la gâchette 2-nitroimidazole pour une libération contrôlée via un mécanisme de cyclisation intramoléculaire

Cette stratégie a été utilisée pour la conception de HAP de la doxorubicine ou de la gemcitabine (Figure 57) qui ont montré *in vitro* un différentiel de cytotoxicité hypoxie/normoxie sur cellules de carcinome pancréatique (MIA PaCa-2). Une évaluation *in vivo* chez la souris de la prodrogue de la doxorubicine indique un ralentissement significatif du volume tumoral comparativement au groupe contrôle mais non amélioré *versus* la doxorubicine seule. Une diminution des effets indésirables en termes de perte de poids est toutefois observée. La prodrogue augmente également la médiane de survie des souris par rapport au groupe traité par la doxorubicine seule et au groupe contrôle. Enfin, une colocalisation de la doxorubicine et des zones hypoxiques dans les tumeurs a été démontrée uniquement chez les souris traitées avec la prodrogue comparativement à celles ayant reçu la doxorubicine ²⁶³.

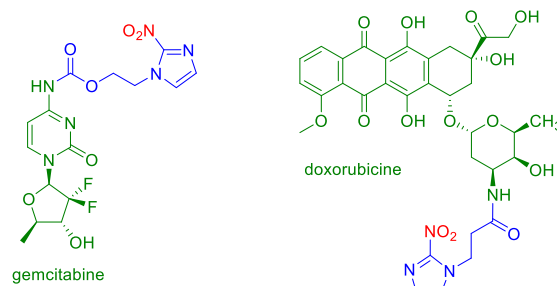


Figure 57 : Structures de HAP de la gemcitabine et de la doxorubicine utilisant le 2-nitroimidazole comme gâchette via un mécanisme de cyclisation intramoléculaire²⁶³

Cette même stratégie d'utilisation du 2-nitroimidazole comme gâchette par cyclisation intramoléculaire, a été utilisée par Jin *et al.* pour la conception de prodrogues de paclitaxel et de SN-38²⁶⁴. La longueur de la chaîne carbonée entre l'imidazole et la substance active a été modulée entre 2 et 3 atomes de carbone.

Introduction bibliographique

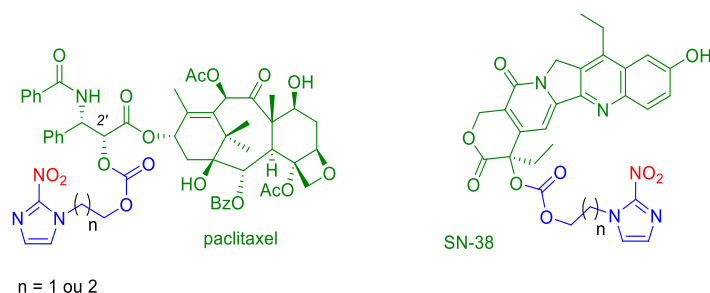


Figure 58 : Structures de prodrogues du paclitaxel ou du SN-38 utilisant le 2-nitroimidazole comme gâchette par cyclisation intramoléculaire²⁶⁴

Toutes les prodrogues étudiées sont réduites à plus de 90% par les nitroréductases après 20 minutes d'incubation, exception faite de la prodrogue de SN-38 possédant une chaîne à deux carbones qui n'est activée qu'à 50% pour ce même temps. Malgré cette excellente cinétique de bioréduction, la substance active n'est jamais libérée en totalité (entre 20 et 80%). Egalement, les études *in vitro* de ces molécules sur des lignées de cancer colorectal (HT-29) ou de cancer du poumon non à petites cellules (H460) ont montré un HCR très proche de 1 (maximum 3), preuve de leur très faible sélectivité vis-à-vis de l'hypoxie.

2. HAP basées sur des inhibiteurs de kinases

Le TH-4000 (tarloxotinib) est une prodrogue qui après réduction et élimination, libère un inhibiteur d'EGFR (« Epidermal Growth Factor Receptor ») intervenant dans la croissance cellulaire (Figure 59)²³⁴.

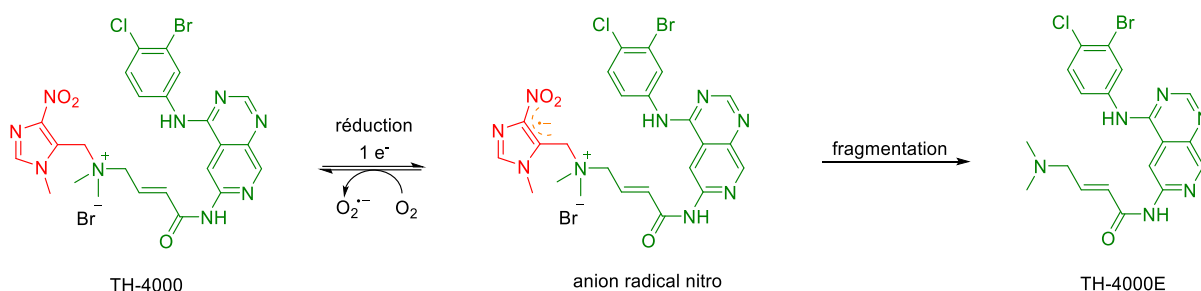


Figure 59 : Mécanisme d'activation de la prodrogue TH-4000²³⁴

Très peu d'informations précliniques sont disponibles sur cette molécule. Des résultats sous forme d'abstract ont été communiqués, dévoilant que la molécule est plus efficace que l'erlotinib sur un modèle de xénogreffe de cellules de cancer du poumon non à petite cellules mutantes au niveau du gène codant pour l'EGFR²⁶⁵. Des études cliniques de phase II ont été réalisées pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules (NCT02454842), des carcinomes épidermoïdes métastatiques de la tête et du cou, ou de la peau (NCT02449681) mais ont été stoppées en 2017 suite à un manque d'efficacité^{266,267}.

D'autres HAP inhibiteurs mixtes de kinases sont présents dans la littérature. On peut citer la molécule CH-01 qui est une prodrogue d'un inhibiteur des kinases « checkpoint 1 » (Chk1) et Aurora A impliquées toutes deux dans la progression et la régulation du cycle cellulaire (Figure 60). La preuve de concept a été réalisée en mettant en évidence une perte de viabilité des cellules cancéreuses en hypoxie, comme celle des cellules de cancer colorectal RKO, exposées à la molécule CH-01²⁶⁸. Egalement la molécule BCCA621C (Figure 60) qui contient une entité 2-nitroimidazole comme gâchette et un inhibiteur d'une protéine kinase ADN dépendante (DNA-pk) impliquée

Introduction bibliographique

notamment dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN. Ce conjugué a montré une activation sélective en condition d'hypoxie libérant l'inhibiteur et permettant, dans ces conditions, de radiosensibiliser les cellules de cancer du poumon non à petites cellules (NCI-H460)²⁶⁹. On peut citer également la HAP du sunitinib qui est un inhibiteur du VEGF contenant également une gâchette de type 2-nitroimidazole. Alors que le clivage de la prodrogue *in tubo* par une nitroréductase a été validé, les essais *in vitro* de cytotoxicité sur plusieurs lignées cellulaires telles que HCT116 (cancer colorectal) ou H1703 (cancer du poumon non à petites cellules) ce sont révélés décevants (HCR proche de 1 et activité cytotoxique équivalente à celle de l'inhibiteur seul²⁷⁰).

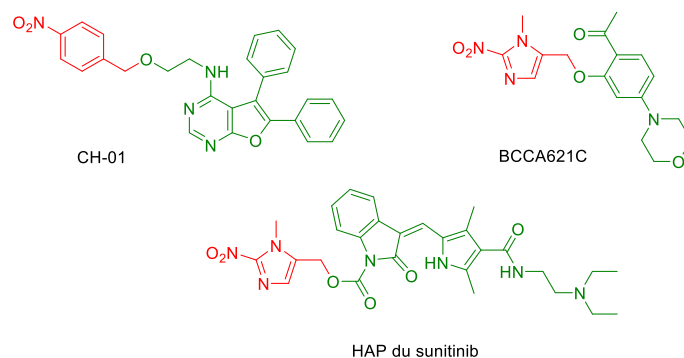


Figure 60 : HAP d'inhibiteurs de protéine kinases

3. HAP vectorisée

A notre connaissance, seule une HAP vectorisée a été décrite dans la littérature par Kumar *et al.*²⁷¹. Cette molécule dispose d'un espaceur tripartite clivable sur lequel sont présents : une gâchette de type nitrobenzyle, un inhibiteur de topoisomérase (SN-38), et une molécule de biotine (vitamine B8) permettant le ciblage des cellules surexprimant les protéines transmembranaires impliquées dans son transport (Figure 61)²⁷².

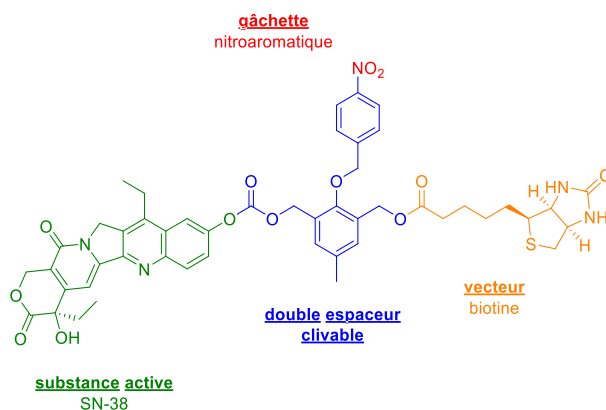


Figure 61 : Structure d'une HAP vectorisée

Une telle prodrogue est donc doublement spécifique des foyers tumoraux en combinant sa sélectivité pour les cellules surexprimant les transporteurs de la vitamine B8 à une libération contrôlée dans un environnement hypoxique. Sur cellules exprimant les récepteurs à la biotine (A549 et HeLa), elle présente une HCR d'environ 2,5 alors qu'elle ne semble avoir aucun effet sur les cellules n'exprimant pas ce récepteur (WI-38 et BJ). Une étude *in vivo* a permis de montrer une diminution du volume tumoral comparativement au groupe contrôle associée à une augmentation de la concentration en SN-38 dans les tumeurs comparativement aux organes sains, phénomène observé par imagerie optique grâce à la fluorescence du composé SN-38²⁷¹.

Objectifs

A l'heure actuelle, le pilier de la prise en charge thérapeutique du chondrosarcome, tumeur maligne du cartilage, demeure l'exérèse chirurgicale, pratiquée avec des marges importantes, allant parfois jusqu'à l'amputation, afin d'éviter toute récurrence. Cette chirurgie peut se révéler particulièrement invalidante pour les patients et n'est pas toujours praticable, car fonction de la localisation de la tumeur et de la morbidité associée. Pour les chondrosarcomes de bas grades, une chirurgie bien menée offre une chance de guérison aux patients avec des taux de survie à 10 ans de l'ordre de 90% ; par contre pour les cas de chondrosarcomes de hauts grades de malignité, qui sont souvent au stade métastatique, l'acte chirurgical n'est réalisé qu'au cas par cas en tenant compte du rapport bénéfice/risque. Pour ces stades avancés, des traitements de chimiothérapie palliatifs peuvent être proposés.

Concernant les traitements par radiothérapie, chimiothérapies conventionnelles ou thérapies ciblées, les chercheurs sont confrontés, pour cette pathologie, à des phénomènes de radio et chimiorésistances dus notamment à sa matrice tumorale chondrogénique très dense et faiblement vascularisée limitant de fait la pénétration et l'efficacité des principes actifs mais également l'approvisionnement des cellules en oxygène, qui survivent en condition d'hypoxie. Cette faible teneur en oxygène limite de manière considérable les effets de la radiothérapie et conduit à un phénotype plus agressif et résistant aux principales chimiothérapies actuelles.

Dans un tel contexte, le développement de nouveaux traitements adjuvants, néo-adjuvants voire de première ligne serait une réelle avancée pour la prise en charge de ce cancer et plus particulièrement pour ceux possédant un haut grade de malignité.

Revenons sur l'une des caractéristiques du tissu tumoral cartilagineux, fondement de notre stratégie: la forte densité de charges négatives de la matrice extracellulaire. En effet, la richesse en PGs de cette abondante matrice chondrogénique, et notamment en aggrécane (macromolécule polysaccharidique contenant de nombreuses fonctions carboxylates et/ou sulfates), confère à cette matrice une forte densité de charges négatives. A partir de ce constat, une stratégie de vectorisation basée sur l'interaction entre ces charges négatives et une entité chargée positivement a pu être élaborée. Une fonction ammonium quaternaire peut remplir parfaitement ce rôle de vecteur : sa charge positive posséderait, par le biais d'interaction électrostatique, une affinité pour les PGs.

Afin de valider la preuve de concept, quant à la capacité d'une fonction ammonium quaternaire d'agir comme vecteur vers la matrice extracellulaire, des études de biodistribution ont été réalisées sur modèle animal porteur d'un chondrosarcome avec une molécule développée pour l'approche diagnostique : la NTP 15-5. Cette molécule possède une cage chélatante de type 1,4,10,13-pentaazacyclopentadécane (15-5) fonctionnalisée sur un atome d'azote avec une entité 3-propyl-*N,N,N*-triéthyl-1-ammonium (NTP 15-5) (Figure 62A). Des radioisotopes comme le technétium $^{99m}_{27}\text{Tc}$ ou le cuivre $^{64}_{29}\text{Cu}$ ($t_{1/2} = 12,7$ heures, E_{β^+} max. = 578 keV) peuvent y être complexés, pour la tomographie d'émission monophotonique (TEMP) ou la tomographie d'émission de positons (TEP). Dans un modèle syngénique de chondrosarcome (SWARM) chez le rat, l'injection par voie intraveineuse de ^{99m}Tc -NTP 15-5 conduit à une accumulation préférentielle de la radioactivité dans les cartilages articulaires et dans la tumeur, significativement supérieure à celle retrouvée avec l'analogue non vectorisé ^{99m}Tc -15-5.

Objectifs

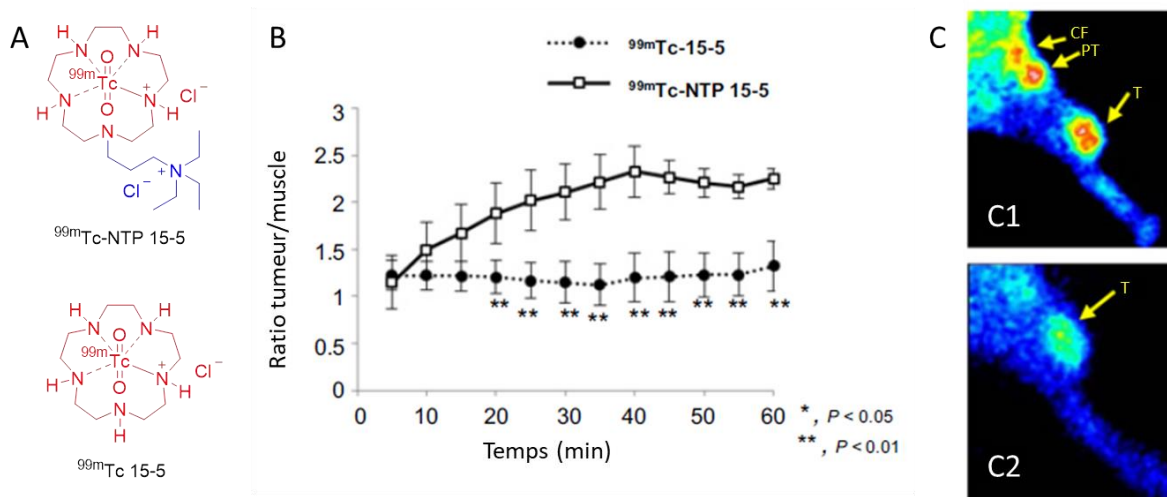


Figure 62 : Suivi par imagerie nucléaire de rats porteurs de chondrosarcome (SWARM) après injection par voie intraveineuse de la molécule $^{99m}\text{Tc-15-5}$ ou $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ (adapté de Peyrode et al.)²⁷⁵

A : Structures des molécules $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ et $^{99m}\text{Tc-15-5}$; B : Rapport d'activité tumeur versus muscle en fonction du temps ; C : Scintigraphie in vivo réalisée 1 heure post-injection de 25 MBq de $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ (C1) ou de $^{99m}\text{Tc-15-5}$ (C2), CF : condyle fémoral, PT : plateau tibial, T : tumeur

Cette expérience permet de conclure sur le fait que l'ammonium quaternaire possède une forte affinité pour la matrice extracellulaire du cartilage sain comme tumoral. L'intérêt de la molécule $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ comme radiotracer a été validé sur différents modèles animaux pour l'imagerie du cartilage sain et pathologique²⁷⁶⁻²⁷⁹ (arthrose, polyarthrite rhumatoïde, chondrosarcomes primitifs de grade II). Les potentialités de fixation de cette molécule au cartilage humain ont été évaluées et validées *ex vivo* par imagerie TEMP couplée à de l'imagerie tomодensimétrique après incubation de pièces chirurgicales de l'articulation tibio-fémorale avec la molécule $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ ²⁸⁰. De part ces résultats, cette molécule est actuellement en cours de transfert clinique chez l'Homme en tant que traceur compagnon des pathologies du cartilage.

La preuve de concept de l'intérêt d'une fonction ammonium quaternaire comme vecteur pour adresser sélectivement des composés aux matrices extracellulaires chondroïdes, ayant été réalisée dans une approche diagnostique, elle a été étendue à une utilisation en thérapeutique.

Le melphalan (Alkéran®), un agent de chimiothérapie utilisé en clinique de la famille des agents alkylants, a été conjugué avec un vecteur ammonium quaternaire (Figure 63A). Une étude d'efficacité antitumorale a été réalisée chez le rat porteur d'un chondrosarcome SWARM en orthotopique, afin de comparer les effets du melphalan ammonium quaternaire *versus* le melphalan. Les deux molécules entraînent une réduction du volume tumoral comparativement au groupe contrôle, mais le dérivé ammonium quaternaire affiche une efficacité moindre (Figure 63B). Son intérêt est cependant visible en termes de toxicité, les rats traités par le melphalan ammonium quaternaire supportant mieux le traitement que ceux traités au melphalan (état clinique général, pas perte de poids, toxicité hématologique moindre, ...) (Figure 63C-D). L'ajout d'un ammonium quaternaire a donc conduit à une diminution non significative de l'activité antitumorale, accompagnée d'une baisse significative de la toxicité menant à une amélioration de l'index thérapeutique, comparativement au melphalan.

Objectifs

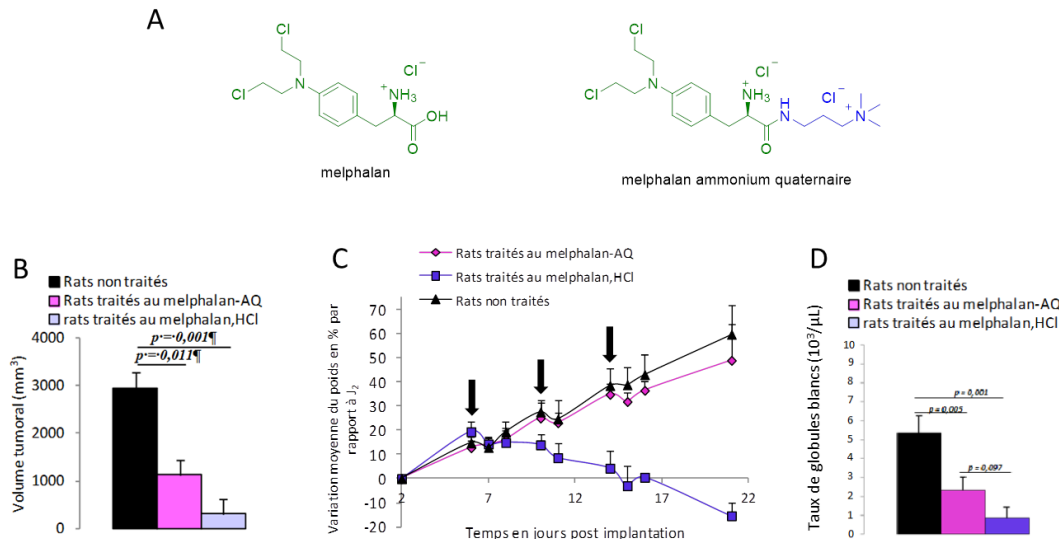


Figure 63 : A : Structure du melphalan et du melphalan ammonium quaternaire ; Analyse de l'étude de thérapie après traitement avec le melphalan ou le melphalan ammonium quaternaire de rats porteurs d'un chondrosarcome SWARM
 B : Variation du volume tumoral moyen au stade J-30 ; C : Variation du poids de rats ; D : Taux de globules blancs dans la formule sanguine (adapté de Peyrode et al.)²⁷⁵

Afin de pouvoir valider le rôle de vecteur de la fonction ammonium quaternaire, une étude de biodistribution a été réalisée sur le même modèle animal avec les molécules marquées au tritium (³H) ($t_{1/2} = 12,3$ ans, E_{β} max. = 19 keV)). Le marquage a été réalisé sur la partie responsable de l'activité alkylante de la molécule (Figure 64A). Cinq minutes post-injection, un ratio tumeur/muscle de $5,77 \pm 1,11$ a été observé pour le conjugué melphalan-ammonium quaternaire, soit 2,5 fois supérieures à l'analogue non vectorisé ($2,22 \pm 1,20$) (Figure 64B), puis diminue rapidement. Cette étude confirme l'efficacité du ciblage de la matrice extracellulaire tumorale par le vecteur ammonium quaternaire.

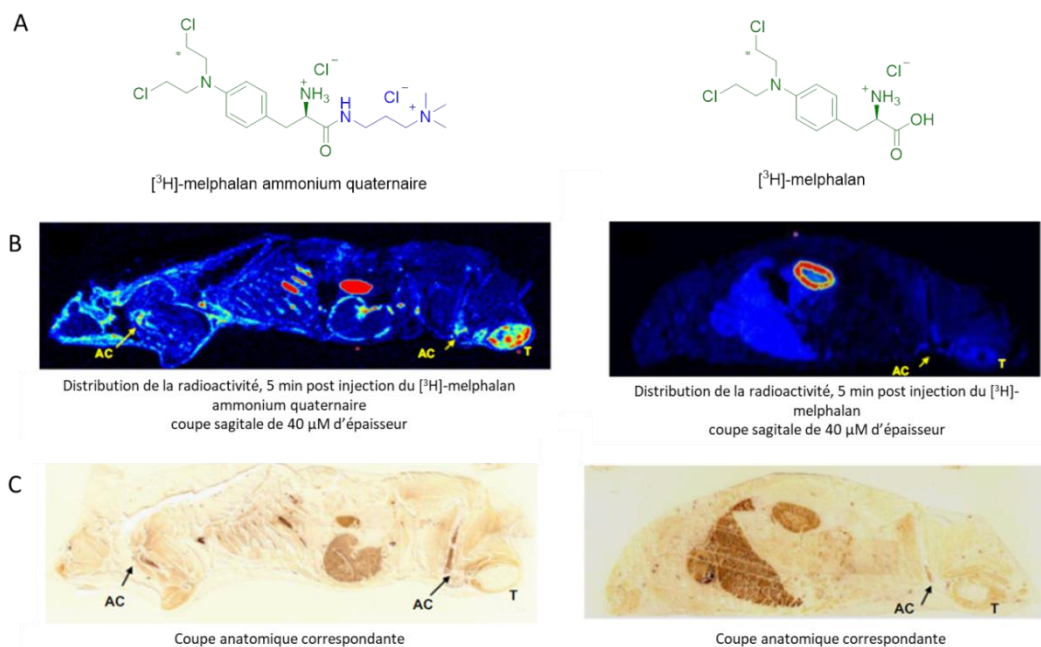


Figure 64 : Résultats de l'étude de biodistribution des dérivés melphalan et melphalan ammonium quaternaire marqués au tritium
 A : Structure du [³H]-melphalan ammonium quaternaire et du [³H]-melphalan ; B : Autoradiographie (coupes sagittales) montrant la distribution de la radioactivité sur modèle de rats porteurs de chondrosarcome SWARM, 5 minutes post injection intraveineuse de 2,5 MBq de [³H]-melphalan ammonium quaternaire (à gauche) ou de [³H]-melphalan (à droite) ; C : Coupes sagittales anatomiques correspondantes (adapté de Peyrode et al.)²⁷⁵ AC : cartilage articulaire, T : tumeur

Objectifs

Fort de ces résultats validant le concept de vectorisation vers les structures cartilagineuses, il a été envisagé d'améliorer la spécificité des principes actifs pour la tumeur en limitant leur action sur le cartilage sain. En effet, lors de cette étude de biodistribution, la présence de radioactivité a été détectée dans les cartilages sains tels que les cartilages intercostaux (Figure 64C), ce qui pourrait indiquer l'acheminement d'un agent alkylant au niveau de ces structures. Cette accumulation pourrait conduire à des phénomènes de toxicité, notamment lors d'une exposition répétée. Aussi les travaux se sont orientés vers une approche de double sélectivité pour la tumeur, associant la vectorisation par un ammonium quaternaire avec le concept de prodrogue. Nous avons opté pour une prodrogue activable en hypoxie, seconde caractéristique majeure du tissu tumoral cartilagineux.

L'hypoxie tumorale se caractérise par l'activation du facteur HIF-1, suivie de celle d'un grand nombre de gènes impliqués dans la tumorigenèse, l'angiogenèse, la glycolyse, la survie cellulaire, la croissance tumorale, l'invasion, la dissémination, les mécanismes de réparation de l'ADN et la résistance aux thérapies²⁸¹⁻²⁸³.

Cette stratégie de prodrogues activables en hypoxie (HAP) semble particulièrement adaptée à la prise en charge du chondrosarcome caractérisé par une surexpression du facteur HIF-1 observée au niveau des tumeurs malignes du cartilage, comparativement aux tumeurs bénignes de ce tissu^{44,45,284} ainsi qu'au cartilage sain. Cette activation par l'hypoxie a déjà été validée avec diverses structures dans la littérature^{285,286} et notamment avec le composé TH-302 actuellement en études préclinique et clinique pour de nombreuses pathologies cancéreuses en association avec : i) la chimiothérapie anticancéreuse (gemcitabine, doxorubicine, ...) ou ii) la radiothérapie. Quant au choix de la structure sensible à l'hypoxie, pouvant être de nature quinonique, *N*-oxyde ou nitroaromatique, il s'est porté sur le cycle 2-nitroimidazole apparaissant comme particulièrement pertinent pour assurer une spécificité dans les zones d'hypoxie sévères (HAP de classe II)²⁸⁷.

Ne disposant d'aucun traitement de chimiothérapie anticancéreuse de référence pour la prise en charge du chondrosarcome, l'intérêt s'est porté sur les molécules utilisées contre l'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing, avec notamment les phosphorodiamidates. Parmi celles-ci, l'ifosfamide (Schéma 1) peut être utilisé pour le traitement des patients atteints de cette pathologie en tant que thérapie adjuvante à la chirurgie ou dans les cas de récives²⁸⁸. Le cyclophosphamide (Schéma 1) peut également être employé, plus particulièrement pour le traitement des patients atteints du sarcome d'Ewing.

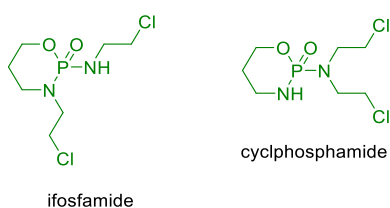


Schéma 1 : Structures de l'ifosfamide et du cyclophosphamide

Tenant compte de l'ensemble de ces considérations, une première prodrogue vectorisée vers les PGs du cartilage et activable en hypoxie, a été développée par l'UMR 1240. Nommée **ICF05016**, elle est constituée de trois entités : (1) un vecteur triméthylammonium (ciblages des PGs) ; (2) une entité alkylante de type cyclophosphamide (activité cytotoxique) ; (3) une gâchette de type 2-nitroimidazole (activation en condition hypoxique) (Schéma 2).

Objectifs

Afin de valider la double spécificité de cette molécule, deux analogues ont été synthétisés : une molécule vectorisée et non clivable qui possède un groupement benzyle en lieu et place de la gâchette : **ICF05014** ; une molécule non vectorisée dépourvue d'entité ammonium quaternaire et clivable, possédant la gâchette 2-nitroimidazole : **ICF05017**.

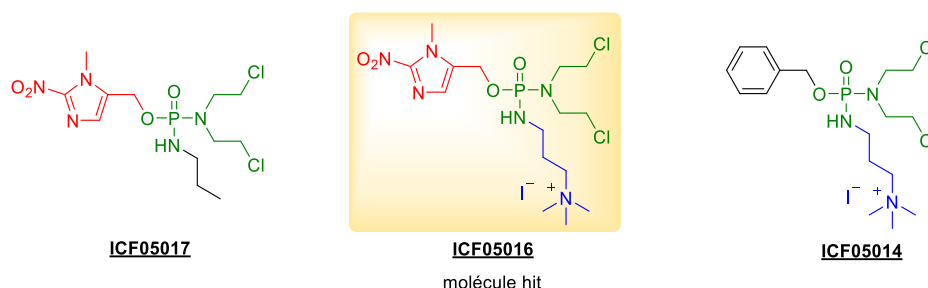


Schéma 2 : Structures des molécules **ICF05016**, clivable en hypoxie et vectorisée vers les protéoglycanes, **ICF05017**, clivable non vectorisée et **ICF05014**, non clivable vectorisée

(1) **Des études in vitro de cytotoxicité en normoxie et en hypoxie** ont été effectuées sur cultures cellulaires en monocouche de cellules de chondrosarcome humain myxoïde extra-squelettique H-EMC-SS, en conditions de normoxie et d'hypoxie (Figure 65). Les deux molécules possédant la gâchette 2-nitroimidazole sont cytotoxiques et ont démontré un HCR de 6,8 et 7,5 respectivement pour les composés **ICF05016** et **ICF05017**. La molécule non clivable **ICF05014** ne possède pas d'activité cytotoxique même à une concentration de 200 μM . Ces expériences ont permis de démontrer l'inactivation de la moutarde par un ester de type benzylique en condition de normoxie et une activation en hypoxie de la gâchette 2-nitroimidazole, validant le concept de HAP dans le modèle cellulaire H-EMC-SS.

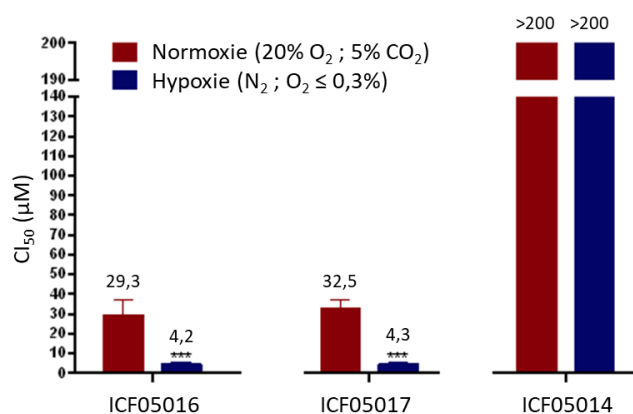


Figure 65 : Cl_{50} des molécules **ICF05016**, **ICF05017** et **ICF05014** réalisées sur cultures 2D de cellules H-EMC-SS en condition de normoxie et d'hypoxie

(2) **L'affinité de ces molécules vis-à-vis de l'aggrécane** a ensuite été évaluée par résonance plasmonique de surface (SPR). Seules les molécules **ICF05014** et **ICF05016**, possédant une fonction ammonium quaternaire sont affines pour l'aggrécane, avec des constantes de dissociation de l'ordre du mM.

(3) **Les trois molécules ont alors été évaluées in vivo en termes d'efficacité antitumorale** sur modèle murin de xéno greffes de cellules H-EMC-SS implantées en sous cutané. Chaque molécule a été injectée à dose équimolaire (47 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) à raison de six injections espacées de quatre jours. La molécule **ICF05016** produit un ralentissement de la croissance tumorale comparativement au groupe contrôle et aux groupes traités avec la molécule non vectorisée **ICF05017** ou la molécule non clivable

Objectifs

ICF05014, ces deux derniers composés ne possédant pas d'effet antitumoral sur ce modèle. Du point de vue de la toxicité hématologique liée au traitement (Figure 66), la molécule **ICF05016** entraîne une baisse non significative du nombre de leucocytes (10 à 20%) alors que l'analogue non vectorisé **ICF05017** conduit à une leucopénie significative (de l'ordre de 50%). Ce dernier résultat s'avère prometteur en termes d'index thérapeutique.

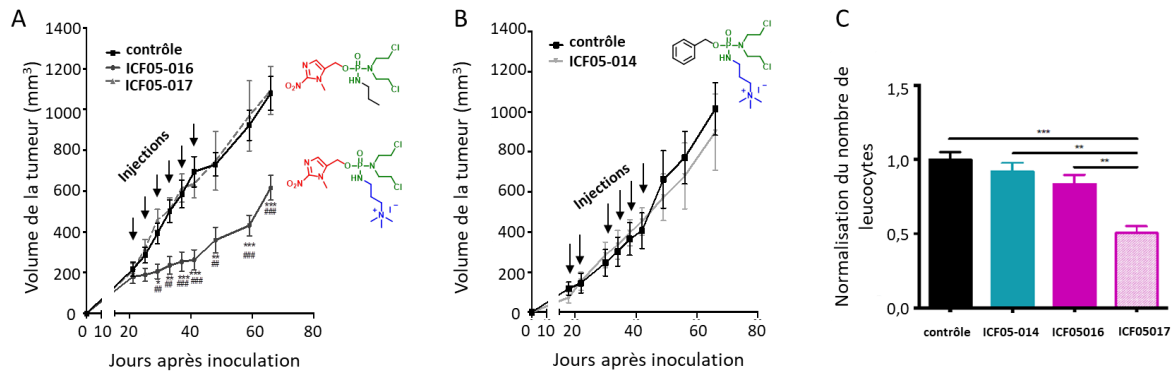


Figure 66 : Résultats de l'étude in vivo des molécules **ICF05016**, **ICF05017** et **ICF05014** sur modèle murin de xénogreffe de cellule H-EMC-SS

A : Suivi de l'efficacité antitumorale des molécules **ICF05016** et **ICF05017** ; B : Suivi de l'efficacité antitumorale de la molécule **ICF05014** ; C : Evaluation du nombre de leucocytes dans la formule sanguine des souris après traitement avec les molécules **ICF05016**, **ICF05017** ou **ICF05014**.

(4) **Des études mécanistiques** sur les tumeurs traitées par la molécule **ICF05016** ont permis de montrer une diminution de l'index mitotique, associée à une baisse de la prolifération cellulaire (diminution du marqueur PCNA « proliferating cell nuclear antigen » et augmentation significative de p53 phosphorylée (S15), suppresseur de tumeur impliqué dans l'apoptose). Le traitement avec **ICF05016** induit également une augmentation des dommages à l'ADN, visualisé en immunohistochimie par le marquage de γ H2AX, principalement dans les zones hypoxiques positives au pimonidazole, confirmant la libération de l'agent alkylant dans les zones hypoxiques de la tumeur. Une analyse anatomopathologique du cartilage des pattes des souris traitées avec **ICF05016**, par coloration au bleu de toluidine (fixation aux PGs) et au trichrome Masson (fixation au collagène), ne montre aucune dégradation des cartilages sains (bords lisses) (Figure 67).

Objectifs

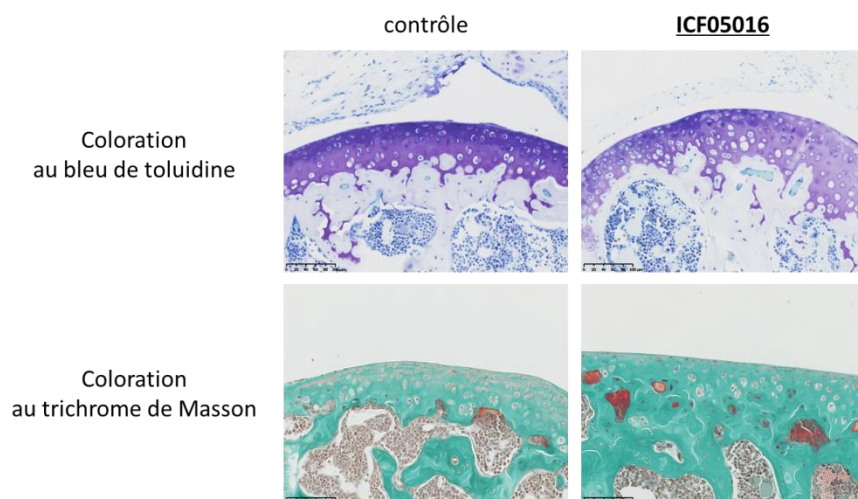


Figure 67 : Analyse anatomopathologique du cartilage sain de l'articulation du genou chez la souris, 24 heures après la dernière dose de **ICF05016**

Coloration au bleu de toluidine (coloration des PGs du cartilage) et au trichrome de Masson (coloration du collagène) (barre d'échelle 100 µm)

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats a permis de valider l'approche de prodrogues bispécifiques sur un modèle préclinique de chondrosarcome. La molécule **ICF05016** a dès lors, été considérée comme la molécule hit. Toutefois on peut noter un échappement tumoral après arrêt du traitement, et une certaine toxicité hématologique. Aussi afin d'aboutir à un meilleur index thérapeutique, le laboratoire a initié une étude de pharmacomodulation visant à déterminer l'impact des modifications structurales sur l'efficacité de la molécule. Ainsi plusieurs axes sont en cours d'étude :

- Axe 1 : modification de la nature de la fonction ammonium quaternaire et de l'espaceur alkyle, jusqu'ici de nature triméthylpropylammonium.
- Axe 2 : modification de la position du bras vecteur ; pour la molécule **ICF05016**, celui-ci était porté par la fonction alkylante.
- Axe 3 : modification de la moutarde *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidique.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans cette étude de pharmacomodulation et plus précisément dans les axes 2 et 3 (Figure 68). **Concernant l'axe 2**, deux familles de molécules ont été envisagées, la première fonctionnalisée par un bras vecteur en position *N*-1 du cycle imidazole et la seconde en position *C*-4. L'introduction du bras vecteur sur la gâchette devrait avoir notamment un impact sur l'efficacité et la pénétration cellulaire de l'agent alkylant libéré, identique à celui du cyclophosphamide, la fonction ammonium quaternaire étant perdue lors du clivage de la gâchette. Elle pourrait toutefois nuire à la bioréduction du 2-nitroimidazole et ainsi influencer sur la spécificité du clivage en hypoxie.

Concernant l'axe 3, les phosphorodiamidates utilisés en cliniques varient par la position des chaînes chloroéthyles présentes au niveau de la fonction phosphorodiamidate. Trois moutardes phosphorodiamidiques de type cyclophosphamide, ifosfamide ou tétrakis-*N,N,N',N'*-(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate ont été envisagées dans le cadre de ces travaux.

Objectifs

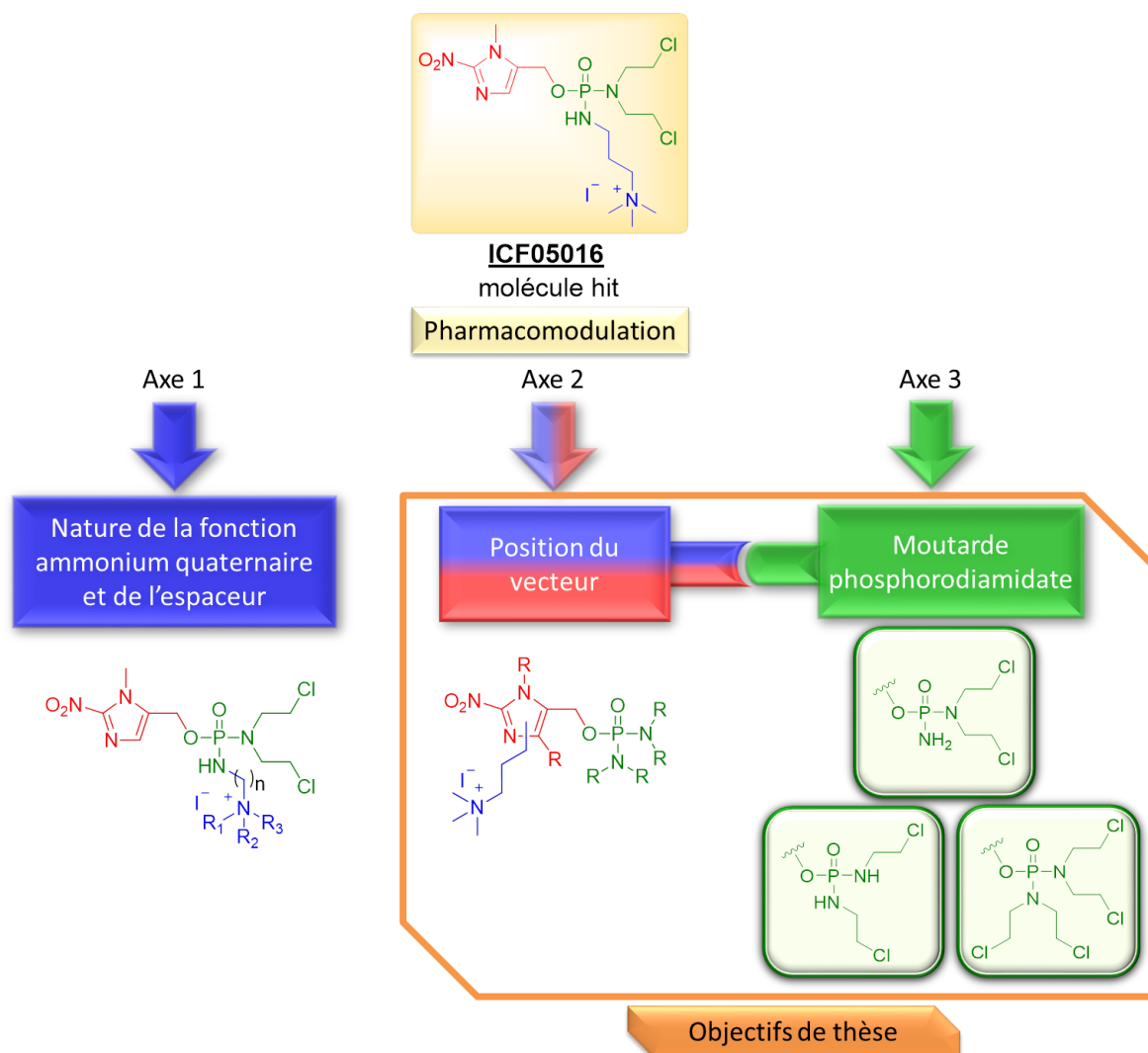


Figure 68 : Projet de pharmacomodulation de la molécule hit **ICF05016** et positionnement des objectifs de thèse dans ce contexte

Les objectifs de ces travaux de thèse sont la synthèse de six prodrogues vectorisées, leurs évaluations en termes d'affinité pour l'aggrécane, de stabilité, de clivage en milieu réducteur et de cytotoxicité en normoxie *versus* hypoxie afin de pouvoir établir des RSA et d'identifier un candidat pour une évaluation pré-clinique plus approfondie sur modèle animal. Ce travail vise, à terme, à répondre à un écueil thérapeutique dans les cas de chondrosarcomes non opérables ou aux stades métastasés, en proposant une nouvelle chimiothérapie anticancéreuse efficace pour permettre une meilleure prise en charge des patients atteints de cette pathologie orpheline.

Résultats et discussion

I. Approche rétrosynthétique pour l'obtention des prodrogues activables en hypoxie et ciblant les protéoglycanes

Dans le but de fonctionnaliser les prodrogues par un bras vecteur sur la partie clivable, quatre positions sont disponibles sur le motif 1*N*-alkyl-2-nitro-5-hydroxyméthylimidazole à savoir les positions 1, 3 et 4 de l'imidazole ainsi que le carbone du méthylène portant le phosphorodiamidate. La position *N*-1 doit toujours être alkylée pour assurer la délocalisation électronique entre les fonctions en position 2 et 5 et permettre le bon fonctionnement de la gâchette. La fonctionnalisation sur la position 3 n'est pas envisageable du fait de l'apparition d'une charge positive sur l'atome d'azote qui perturberait la délocalisation électronique lors de la libération de la prodrogue. La fonctionnalisation du méthylène conduirait quant à elle à l'introduction d'un centre asymétrique. Il serait alors nécessaire de synthétiser et tester l'efficacité des deux énantiomères séparément. Les positions imidazoliques 1 et 4 peuvent être fonctionnalisées sans changer l'enchaînement des substituants (position 2 et 5) ni, théoriquement, perturber la délocalisation électronique pour le déclenchement de la prodrogue. Ce sont donc ces deux dernières positions *N*-1 (molécules **33**, **34** et **35**) et *C*-4 (molécules **46**, **48** et **50**) qui ont été retenues pour la fonctionnalisation de la gâchette (Figure 69). L'ammonium quaternaire sera quant à lui introduit en dernière étape par quaternisation d'une amine tertiaire (molécules **26**, **45**, **27**, **47**, **29** et **49**) afin d'éviter un éventuel échange de contre-ion durant les différentes étapes de synthèse, et de limiter un maximum les étapes de purification en phase inverse. Les amines tertiaires seront obtenues par diverses réactions de phosphorylation mettant en jeu un précurseur alcool (composé **22** ou **42**), possédant comme squelette commun un cycle 2-nitro-5-hydroxyméthylimidazole substitué, et un précurseur organophosphoré correspondant aux moutardes azotées envisagées (composés **1** ; **2** ; **3**). Ceux-ci seront eux-mêmes synthétisés à partir de l'oxychlorure de phosphore. L'introduction de l'amine tertiaire sur la position *C*-4 de l'imidazole sera réalisée par couplage de Stille entre l'organostannane synthétique **37** et le dérivé bromé **36**. Ce dernier peut être obtenu à partir de l'alcool clé **12**, lui-même synthétisé à partir de la sarcosine commerciale d'après une séquence réactionnelle en 7 étapes, basée sur une synthèse de Marckwald. Cette même voie de synthèse sera adaptée pour l'obtention de l'alcool fonctionnalisé en *N*-1, au départ d'un précurseur amine secondaire (composé **16**) lui-même obtenu à partir de la 3-(*N,N*-diméthylamino)propylamine et du bromoacétate d'éthyle commerciaux.

Plusieurs voies d'accès existent dans la littérature pour la synthèse de phosphorodiamidates à partir d'arylméthanol et peuvent être appliquées pour l'obtention des phosphorodiamidates chlorés envisagés (**26**, **45**, **27**, **47**, **29** et **49**). La bibliographie est orientée le plus possible vers des réactions utilisant des 2-nitroimidazoles comme précurseurs.

Résultats et discussion

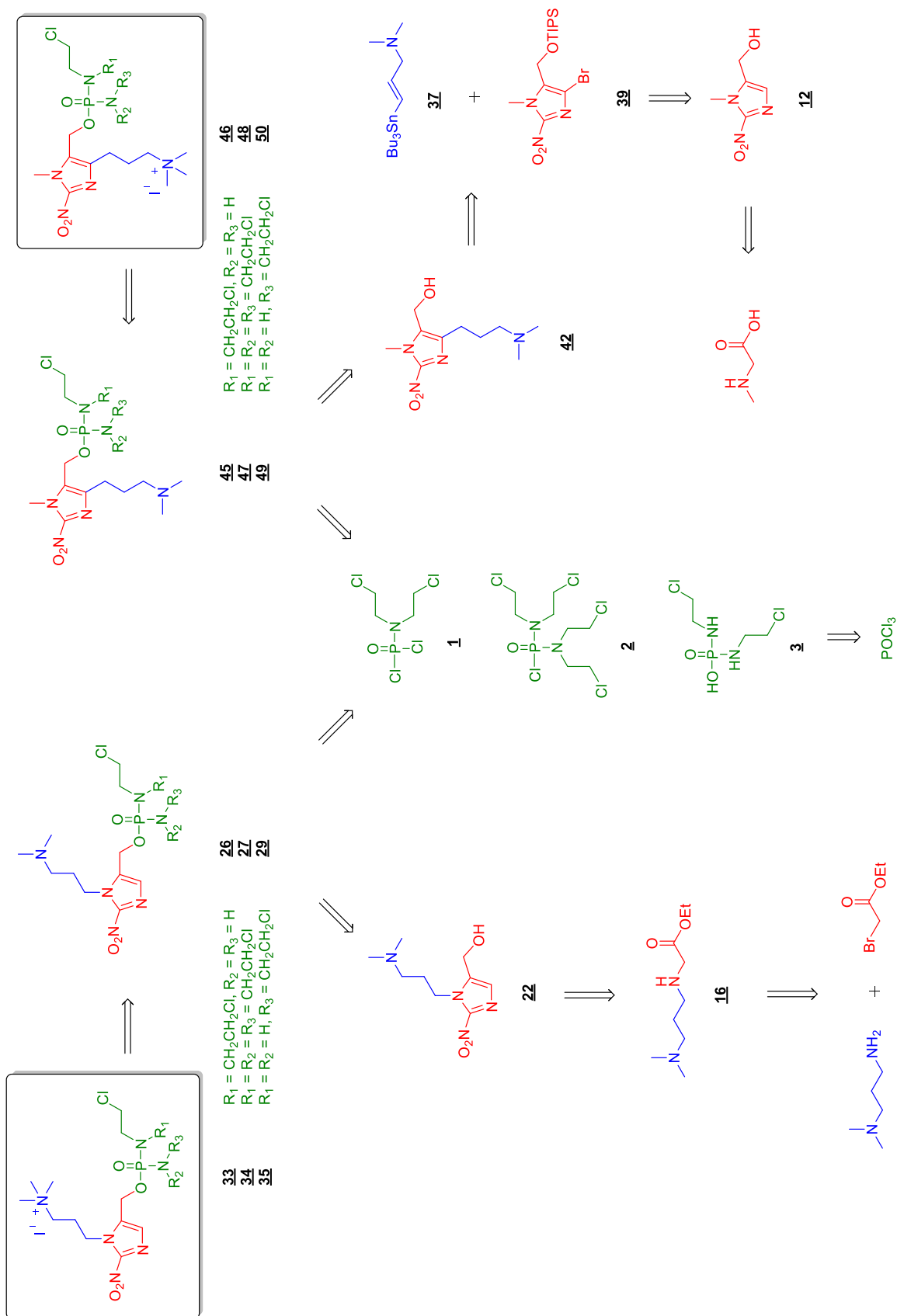


Figure 69 : Rétrosynthèse envisagée pour l'obtention des prodrugs **33**, **34**, **35**, **46**, **48** et **50**

Résultats et discussion

A. Méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour l'obtention de dérivés *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate (type cyclophosphamide)

Pour la synthèse de *N,N*-(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate d'alkyle, applicable pour les composés **26** et **45**, une seule voie d'accès est décrite dans la littérature. Elle consiste en l'addition à basse température du composé **1** sur l'alcoolate lithié choisi, suivie dans un deuxième temps, par l'addition d'un excès ammoniac. Cette réaction de phosphorylation est décrite avec l'imidazole **12** à -78 °C puis -20 °C²⁸⁹, avec l'alcool benzylique à -29 °C²⁹⁰ et avec l'alcool 4-nitrobenzylique à -78 °C^{291,292} avec des rendements respectivement de 28%, 55% et 53% (Tableau 12).

Méthode 1				
Auteurs	Précurseur alcool	Conditions	Produit formé	Rendement
Méthode 1.A Matteucci et al. ²⁸⁹		1) LiHMDS, THF, -78 °C, 5 min 2) THF, -78 °C, 30 min 3) NH ₃ , -20 °C, 5 min		28%
Méthode 1.B Springer et al. ²⁹⁰		1) THF, -29 °C, 45 min 2) NH ₃ , -29°C, 5 min		55%*
Méthode 1.C Hu et al. ^{291,292}		1) BuLi, -78 °C, 10 min 2) THF, -78 °C, 2 h 3) NH ₃ , -78 °C, 30 min		53%

Tableau 12 : Méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour l'obtention de dérivés de type cyclophosphamide à partir du dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique

*Synthèse du phosphorodiamidate benzylé marqué au phosphore 33 (³³P (*t*_{1/2} = 25,6 jours, *E*_β max. = 249 keV) et au tritium

Les voies de synthèses diffèrent principalement par les températures appliquées (entre -29 °C et -78 °C) et la nature de la base lithiée utilisée pour former l'alcoolate (butyllithium *versus* bis(triméthylsilyl)amidure de lithium (LiHMDS)). De manière générale, l'utilisation de noyaux aromatiques de type benzyles semblent conduire aux phosphorodiamidates correspondants avec de meilleurs rendements comparativement au 2-nitroimidazole. La méthode 1.A, utilisant un imidazole, est celle qui a été retenue pour la synthèse des composés **26** et **45**.

Résultats et discussion

B. Méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour l'obtention de dérivés de type *N,N,N',N'*-tétrakis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate

Pour l'obtention de phosphorodiamidates possédant quatre chaînes 2-chloroéthyles, plusieurs voies d'accès pourraient être envisagées d'après les données de la littérature (Tableau 13). L'une des méthodes (méthode 2) consiste en l'addition de deux équivalents d'amine sur le trichlorure de phosphore en présence de triéthylamine (TEA) suivie par l'addition d'un équivalent d'alcool également en présence de base. L'intermédiaire phosphorodiamidite obtenu est ensuite oxydé en phosphorodiamidate par l'acide *mé*ta-chloroperbenzoïque (mCPBA) ou par l'hydroperoxyde de *tert*-butyle avec des rendements allant de 7% à 67%²⁹³⁻²⁹⁶. L'autre méthode (méthode 3), proche de celle utilisée pour les moutardes de type cyclophosphamide, consiste à traiter un alcoolate lithié par un chlorure d'acide phosphorodiamidate, lui-même synthétisé par réaction entre l'oxychlorure de phosphore et deux équivalents d'amine secondaire²⁹⁴.

Méthode 2				
Auteurs	Produit de départ	Conditions	Produit formé	Rendement
Méthode 2.A Duan <i>et al.</i> ²⁹⁴		1) HN(CH ₂ CH ₂ Cl) ₂ · HCl TEA, DCM, t.a., 30 min 2) DCM, t.a., 30 min 3) <i>t</i> -BuOOH, -20°C puis t.a., 1 h 	20%	
Méthode 2.B Jain <i>et al.</i> ²⁹⁵		1) HN(CH ₂ CH ₂ Cl) ₂ · HCl TEA, DCM, 0°C 2) BnOH, DCM, 0°C, 45 min 3) <i>t</i> -BuOOH, -24°C -> t.a. 	67%	
Méthode 2.C Mulcahy <i>et al.</i> ²⁹⁶		1) HN(CH ₂ CH ₂ Cl) ₂ · HCl TEA, DCM, 0°C, 10 min 2) DCM, 0°C, 10 min 3) <i>t</i> -BuOOH, -20°C -> t.a. 	62%	
Méthode 2.D Zhang <i>et al.</i> ²⁹³		1) TEA, DCM, t.a., 1 h 2) TEA, DCM, t.a., 1 h 3) <i>t</i> -BuOOH, -20°C -> t.a., 1 h 	7%	

Résultats et discussion

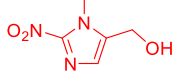
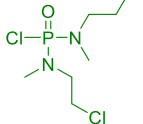
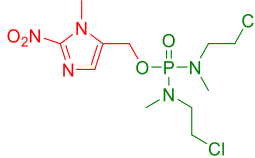
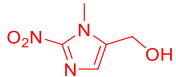

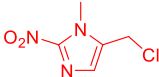

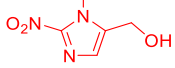
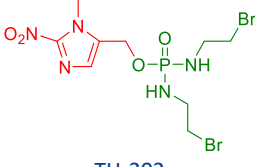
Méthode 3	$R'-OH \xrightarrow{\text{base}} [R'-O^- + Li^+] \xrightarrow{\begin{matrix} O \\ \\ Cl-P-N-R \\ \\ R'-N-R \end{matrix}} \begin{matrix} O \\ \\ R'-O-P-N-R \\ \\ R'-N-R \end{matrix}$			
Auteurs	Produit de départ	Conditions	Produit formé	Rendement
Méthode 3.A Duan <i>et al.</i> ²⁹⁴		1) LiHMDS, THF, -78°C, 5 min 2) THF, -78°C -> t.a. 		47%

Tableau 13 : Méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour l'obtention de dérivés *N,N,N',N'*-tétrakis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate à partir du trichlorure de phosphore ou de chlorure d'acide bis(dialkylamino)phosphorodiamidique

Si l'on considère la nature de l'arylméthanol engagé, la méthode 3.A semble plus efficace en termes de rendements lorsque des dérivés 2-nitroimidazoles sont utilisés (*i.e.* 47% versus 7%, 20%). C'est donc cette dernière qui a été retenue pour la synthèse des composés **47** et **29**.

C. Méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour l'obtention de dérivés *N,N'*-bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate (type ifosfamide)

Les composés **29** et **49** possèdent le motif moutarde phosphorodiamidique présent dans la structure du TH-302. Plusieurs voies de synthèses permettant l'accès à ce type d'organophosphorés sont décrites dans la littérature (Tableau 14).

Méthode 4	$R'-OH \xrightarrow{\begin{matrix} Cl \\ \\ Cl-P-Cl \\ \\ Cl \end{matrix}} [R'-O-P(=O)(Cl)_2] \xrightarrow{R-NH_2} [R'-O-P(=O)(NH-R)(HN-R)] \xrightarrow{\text{oxydant}} R'-O-P(=O)(NH-R)(HN-R)$			
Auteur	Produit de départ	Conditions	Produit formé	Rendement
Duan <i>et al.</i> ²⁹⁴		1) LiHMDS, THF, -78 °C 2)  3) H ₂ NCH ₂ CH ₂ Cl . HCl 4) <i>m</i> CPBA		Non donné
Méthode 5	$\begin{matrix} O \\ \\ Cl-P-Cl \\ \\ Cl \end{matrix} \xrightarrow{R-NH_2} \begin{matrix} O \\ \\ Cl-P-NH-R \\ \\ HN-R \end{matrix} \xrightarrow{R'-OH} R'-O-P(=O)(NH-R)(HN-R)$			
Auteur	Produit de départ	Conditions	Produit formé	Rendement
Zhang <i>et al.</i> ²⁹³		1) H ₂ NCH ₂ CH ₂ Br . HBr TEA, DCM, -15 °C 2) TEA, DCM, -10 °C, 2 h 	 TH-302	12%

Résultats et discussion

Auteur	Produit de départ	Conditions	Produit formé	Rendement	
Méthode 6.A Springer <i>et al.</i> ²⁹⁰		1) TEA, CHCl ₃ , -29 °C, 1 h 2) [³ H]-H ₂ NCH ₂ CH ₂ Cl . HCl TEA, CHCl ₃ , -15 °C 5 min puis t.a., 2 h		37%*	
Méthode 6.B Misiura <i>et al.</i> ²⁹⁷		1) TEA, CHCl ₃ , -20 °C, 30 min 2) H ₂ NCH ₂ CH ₂ Cl . HCl TEA, CHCl ₃ , -20 °C puis t.a., 1 h		45%	
Auteur	Produit de départ	Conditions	Produit formé	Rendement	
Méthode 7.A Matteucci <i>et al.</i> ²⁸⁹		PPh ₃ , DIAD, THF, 0 °C puis t.a.		47% [†]	
Méthode 7.A Duan <i>et al.</i> ²⁹⁴				2 h	48%
Méthode 7.A O'Connor <i>et al.</i> ²⁹⁸				2 h	62%
Méthode 7.A Jin <i>et al.</i> ¹¹⁸				3 h	52%
Méthode 7.B Duan <i>et al.</i> ²⁹⁴				18 h	63%
		PPh ₃ , DIAD, THF, 0 °C puis t.a.		63%	

Tableau 14 : Méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour l'obtention de dérivés de type ifosfamide à partir du trichlorure de phosphore, de l'oxychlorure de phosphore ou de l'acide *N,N'*-bis(2-halogénoéthyl)phosphorodiamique
*synthèse du phosphorodiamidate benzylé marqué au phosphore 33 et au tritium
[†]chaînes carbonées de la moutarde phosphorodiamidique per-déutérées

Pour la préparation des composés de type *N,N'*-bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate, la méthode de Duan *et al.* (Méthode 4) conduit principalement à la chloration de l'alcool 5-hydroxy-1-*N*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazole à partir du trichlorure de phosphore.

Contrairement aux méthodes précédemment choisies pour les composés **26**, **45** et **47**, **29**, passant par les dérivés stables **1** et **2**, la méthode de Zhang *et al.* (Méthode 5) pour les phosphorodiamidates de type *N,N'*-bis(2-halogénoéthyle) consiste à préparer extemporanément le chlorure d'acide phosphorodiamidique à partir d'oxychlorure de phosphore et de 2-bromoéthylamine, qui doit être utilisé sans purification pour l'étape suivante de substitution par l'alcool correspondant en milieu basique. C'est cette stratégie qui a été mise en œuvre pour l'obtention du TH-302 avec un rendement de 12%.

Résultats et discussion

Une synthèse alternative à partir de l'oxychlorure de phosphore peut également être envisagée en modulant l'ordre d'addition des réactifs. Ainsi, l'addition de l'alcool est réalisée dans un premier temps suivi par deux équivalents de 2-halogénoéthylamine. Cette synthèse n'a toutefois été décrite que pour l'alcool benzylique ou 4-nitrobenzylique avec des rendements respectifs de 37% et 45% (Méthode 6).

Une quatrième méthode décrite dans la littérature pour la synthèse du TH-302 ou de son analogue chloré, consiste en une réaction de Mitsunobu entre le composé (1-*N*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazo-5-yl)méthanol et l'acide phosphorodiamidique correspondant (Méthode 7). Cette voie de synthèse conduit à des rendements de l'ordre de 50-60% pour les analogues bromés et chlorés.

Cette dernière méthode basée sur une réaction de Mitsunobu, qui conduit aux meilleurs rendements (*i.e.* 47-63%), et qui apparaît utilisable avec les précurseurs imidazoles **22** et **42**, a donc été retenue pour la synthèse des phosphorodiamidates **29** et **49**.

Cette étude bibliographique nous a permis de retenir les voies de synthèse résumées Schéma 3, qui nous semblaient les plus pertinentes pour accéder aux précurseurs **26**, **45**, **27**, **47**, **29** et **49** des prodrogues envisagées.

Résultats et discussion

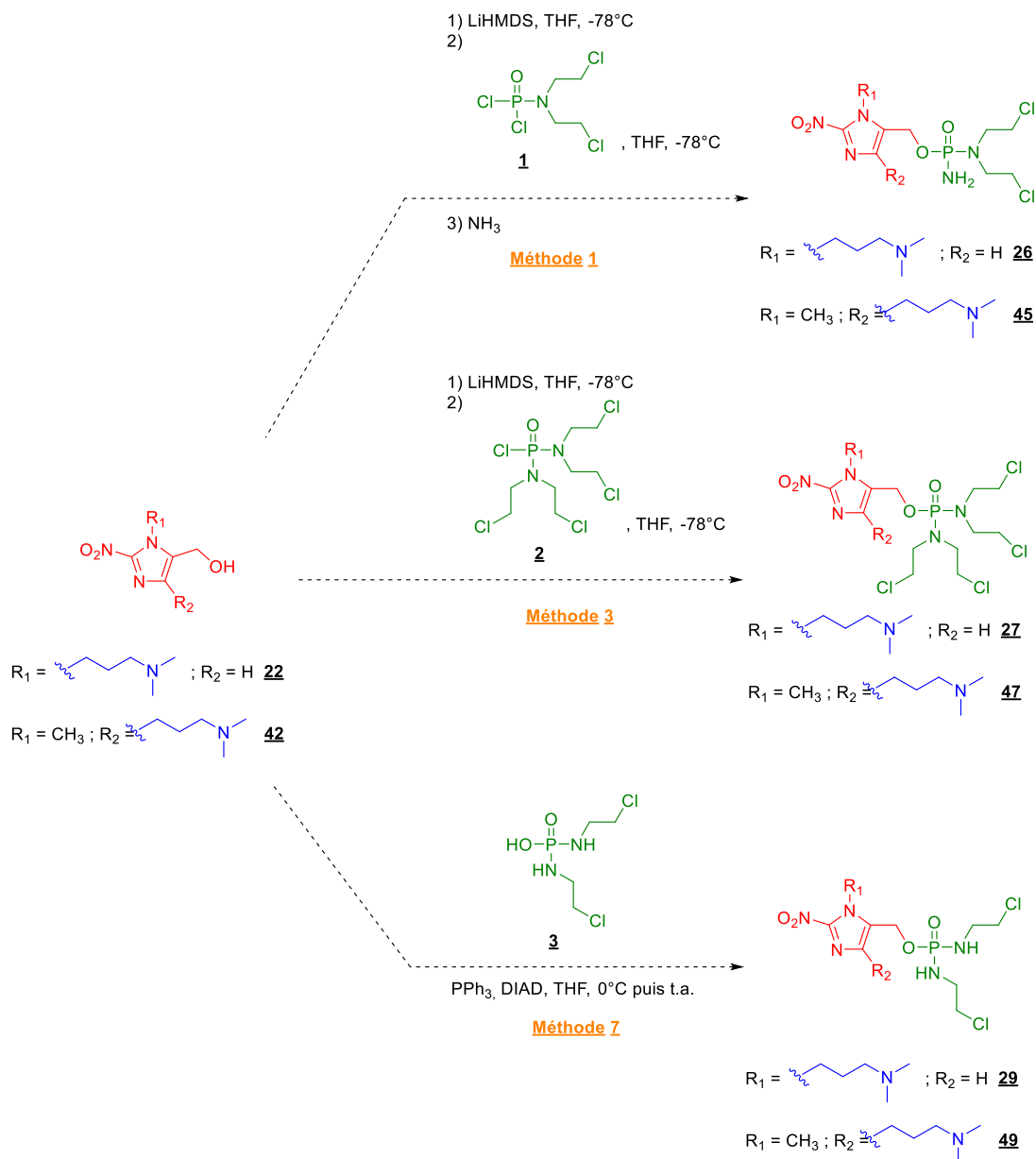


Schéma 3 : Voies d'accès envisagées pour l'obtention des phosphorodiamidates **26**, **27**, **29**, **45**, **47** et **49**

II. Synthèse des moutardes organophosphorées

Toutes les moutardes organophosphorées ont comme précurseur commun, l'oxychlorure de phosphore, qui est fonctionnalisé par réaction avec la bis(2-chloroéthyl)amine ou la 2-chloroéthylamine.

Résultats et discussion

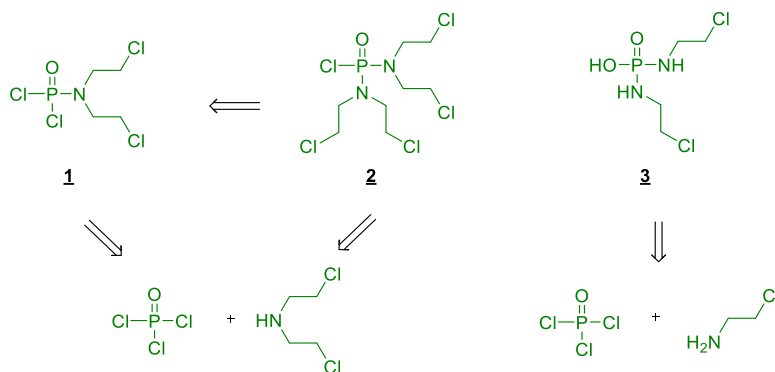


Figure 70 : Rétrosynthèse générale des moutardes organophosphorées **1**, **2** et **3**

A. Synthèse du dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique **1**

La moutarde azotée **1** est obtenue par addition de bis(2-chloroéthyl)amine sur l'oxychlorure de phosphore en condition équimolaire ou en excès. Plusieurs protocoles pour synthétiser ce produit sont décrits dans la littérature, variant par la nature des bases utilisées et par les températures de réaction (Tableau 15).

Conditions	Base	Solvant	Temps de réaction	Température	Rendement
1	aucune	POCl ₃	14-24 h	reflux	78% ^{299,300}
2	pyridine	DCM	une nuit	5 °C puis t.a.	27% ²⁹⁰
3	TEA	DCM	une nuit	-5 °C puis t.a.	non précisé ³⁰¹

Tableau 15 : Conditions décrites dans la littérature pour la formation du composé **1**

L'utilisation d'oxychlorure de phosphore à reflux (Condition 1) a déjà été mise en œuvre au laboratoire et conduit à des rendements de l'ordre de 55%³⁰² inférieurs à ceux décrits dans la littérature (*i.e.* 78%)^{299,300}. Compte tenu de la toxicité de ce réactif, nous avons décidé de nous orienter vers d'autres voies utilisant un seul équivalent de ce dernier. Dans ce but, nous nous sommes tournés dans un premier temps vers la méthode décrite par Springer *et al.*. Cette dernière consistait à faire réagir en conditions équimolaires, dans du DCM à 5 °C et en présence de pyridine, l'oxychlorure de phosphore et l'amine, sous forme de chlorhydrate (Condition 2). La réaction a ensuite été poursuivie une nuit à température ambiante. Cette méthode permet d'obtenir le dichlorure d'acide phosphoramidique **1** avec des rendements après purification de 37, 52 et 83% (*n* = 3), supérieurs donc aux 27% décrits dans la littérature²⁹⁰ (Schéma 4). Cependant, il semble que la montée en échelle soit une cause possible de la chute de rendement.

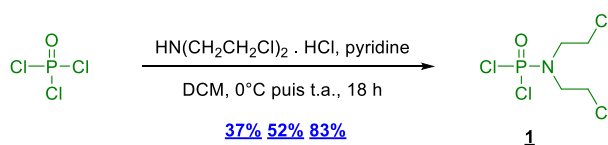


Schéma 4 : Synthèse du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** en présence de pyridine

Résultats et discussion

Le composé **1** devant être obtenu en quantité importante, l'emploi de la TEA a été préféré à celui de la pyridine (Tableau 15, Conditions 4) qui est plus difficile à éliminer en fin de réaction et qui peut gêner la séparation du produit lors de l'étape de purification par chromatographie sur colonne. Cette méthode permet d'obtenir le composé **1** avec un rendement de 67% (n = 1) sur une échelle de 50 grammes.

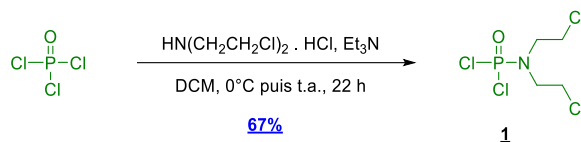
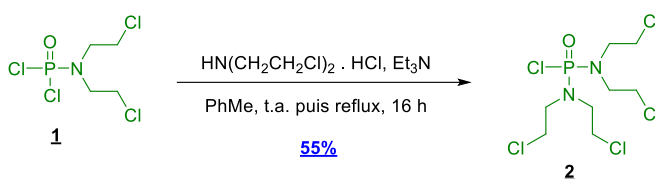


Schéma 5 : Synthèse du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** en présence de TEA

B. Synthèse de chlorure de l'acide *N,N,N',N'*-tétrakis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidique **2**

La synthèse de la moutarde phosphorodiamidique **2** comportant deux motif bis(2-chloroéthylamine) est décrite dans la littérature selon deux voies : soit à partir du dérivé précédent **1** avec un rendement de 55%³⁰³, soit à partir de l'oxychlorure de phosphore comme décrit par Herr *et al.*³⁰⁴ avec un rendement de 98% (Schéma 6). Aussi cette dernière a été initialement utilisée au laboratoire.

Méthode de Borch et Valente



Méthode de Herr *et al.*

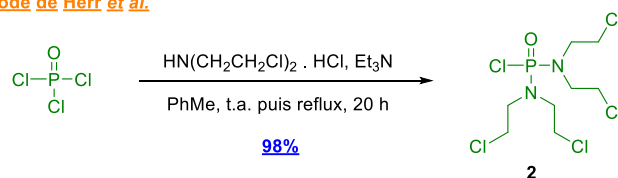


Schéma 6 : Conditions décrites dans la littérature pour la synthèse du composé **2** à partir du composé **1** ou de l'oxychlorure de phosphore

Alors que l'addition du premier équivalent de l'amine secondaire a été réalisée à température ambiante comme pour l'obtention du dérivé **1**, l'addition du deuxième équivalent nécessitait un apport d'énergie thermique, aussi un chauffage à reflux a été réalisé. La CCM montrait la formation du produit intermédiaire **1** puis sa disparition totale 44 heures après le début du chauffage à reflux. La cinétique de réaction semblait plus lente que ce qui est décrit dans la littérature. Le produit **2** a été isolé après purification par chromatographie avec un rendement de seulement 54%, contre 98% selon Herr *et al.*. Face à ce rendement bien inférieur à celui escompté, nous avons décidé d'utiliser la méthode de Borch et Valente à partir du composé **1** pour comparer ces deux voies d'accès au composé **2**.

Le composé **1** a été engagé en réaction comme décrit dans la littérature, et la cinétique de la réaction a été suivie par RMN ³¹P (Figure 71). Après un chauffage à reflux durant 19 heures 30, la conversion du produit de départ n'était pas totale, alors qu'un temps de réaction de 16 heures était donné par Borch *et al.*. Après 36 heures de reflux, la quasi-totalité du produit de départ a été converti (87%). Le chauffage a été cependant poursuivi jusqu'à 72 heures puis la réaction a été

Résultats et discussion

traitée et purifiée pour obtenir le composé **2** avec un rendement de 78%, supérieur de 20% comparativement à celui de la littérature.

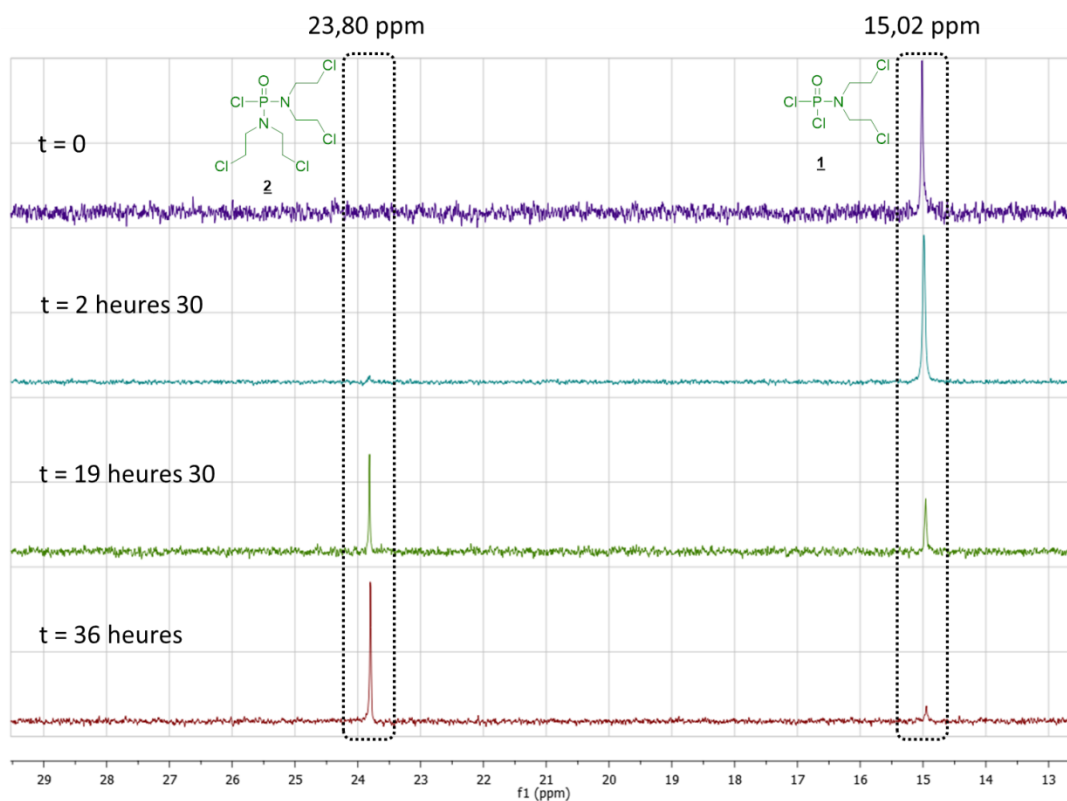


Figure 71 : Suivi cinétique par RMN ^{31}P de la formation du dérivé phosphorodiamidique **2** (Spectres réalisés à partir d'un prélèvement du milieu réactionnel dilué dans le toluène)

Si l'on compare les deux méthodes de synthèse, *i.e.* « one pot » ou en deux étapes distinctes avec purification de l'intermédiaire **1**, les rendements sont sensiblement identiques (de l'ordre de 50%), l'approche « one pot » permet toutefois de s'affranchir de l'étape de purification sur colonne (Figure 72).

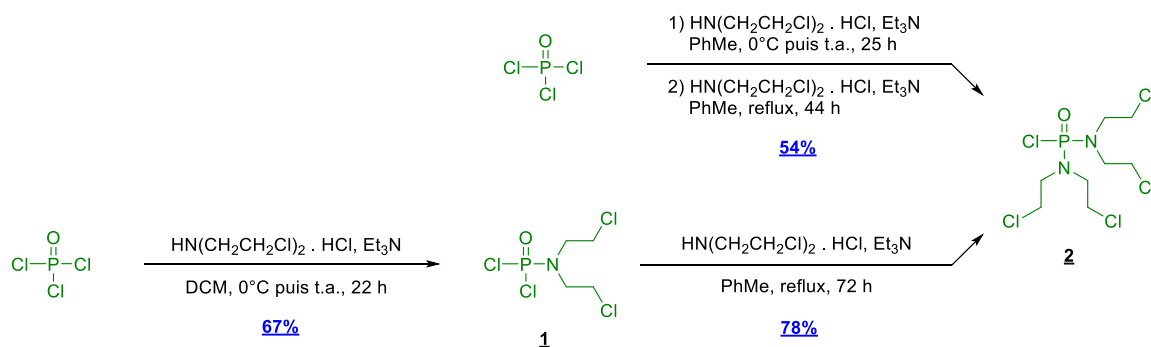


Figure 72 : Conditions réalisées au laboratoire pour la synthèse du composé **2** à partir du composé **1** ou de l'oxychlorure de phosphore

Résultats et discussion

C. Synthèse l'acide *N,N'*-bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidique **3**

L'acide phosphorodiamidique **3** peut être obtenu à partir de deux voies différentes (Schéma 7), à savoir : soit par hydrolyse d'un intermédiaire chlorure d'acide **4** instable^{294,298} (Méthode 8) soit par hydrogénation de l'ester benzylique **5**²⁹⁰ ou phénylique **6** correspondant³⁰⁵ (Méthode 9).

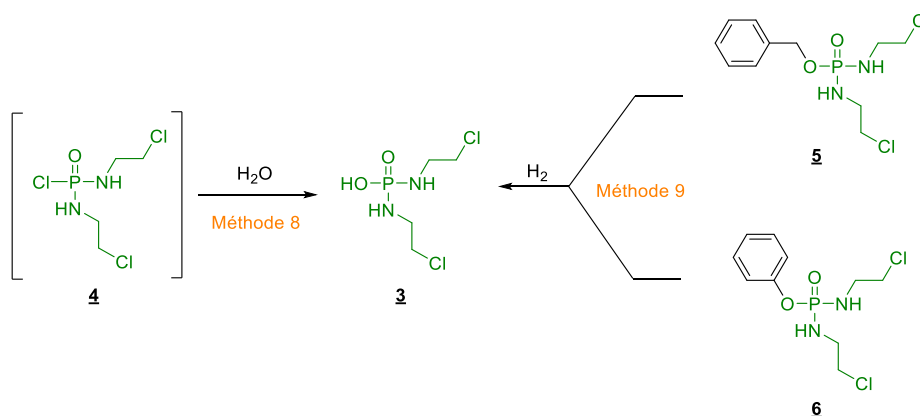


Schéma 7 : Voies d'accès à l'acide phosphorodiamidique **3** décrites dans la littérature

1. Hydrolyse d'un chlorure d'acide phosphorodiamidique (méthode 8)

Plusieurs auteurs décrivent suivant des protocoles similaires, l'obtention des acides phosphorodiamidiques chlorés ou bromés *via* l'hydrolyse du chlorure d'acide correspondant (Tableau 16). Ce dernier est formé à basse température, en milieu basique, à partir de la 2-chloroéthylamine ou 2-bromoéthylamine en présence d'oxychlorure de phosphore. Après filtration et évaporation, le brut est engagé dans la réaction d'hydrolyse dans un mélange eau / THF pour donner l'acide phosphorodiamidique. Après évaporation du THF, le produit est obtenu par cristallisation lente à froid durant 1 nuit puis récupéré par filtration.

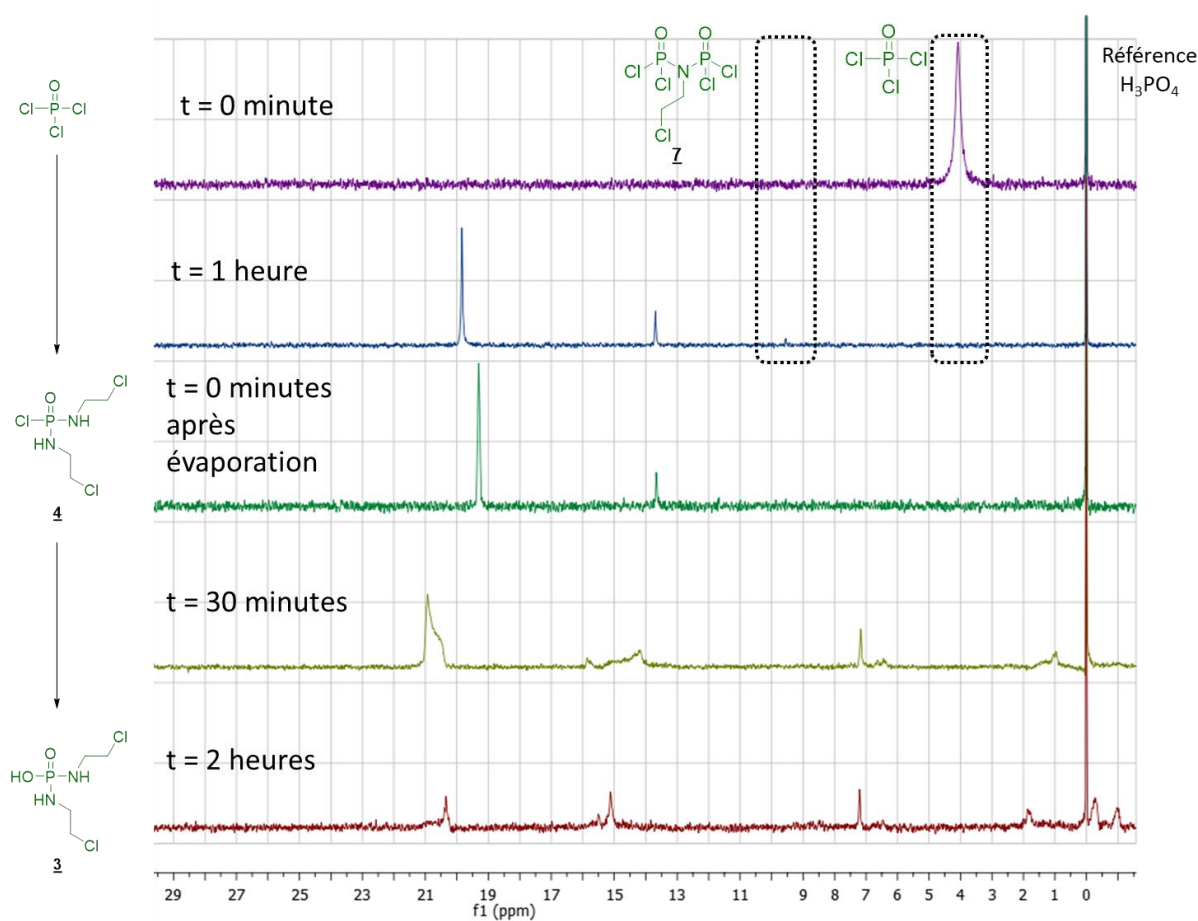
X	Temps pour la 1 ^{ère} étape	Temps pour la 2 ^{ème} étape	Rendement
Br	non donné	non donné	27% ²⁸⁹
Br	non donné	2 h	non précisé ²⁹⁸
Br	2 h	2 h	40% ²⁹⁴
Cl	2 h	2 h	46% ²⁹⁴

Tableau 16 : Conditions et rendements décrits dans la littérature pour la synthèse du composé **3** ou de son analogue bromé

Résultats et discussion

Ces conditions décrites dans la littérature ont été testées au laboratoire pour obtenir l'analogue chloré **3**. La cinétique de cette réaction a été suivie par RMN ^{31}P (Figure 73). Après une heure d'agitation, l'analyse du spectre RMN ^{31}P indique : i) l'absence d'un signal à 4 ppm prouve que l'oxychlorure de phosphore a été totalement consommé et ii) la présence de trois nouveaux signaux à 19 ppm, 13 ppm et 9 ppm qui pourraient correspondre respectivement au produit attendu **4**, au produit de mono addition de l'amine sur l'oxychlorure de phosphore et à un composé de type bisphosphoramidique **7**, issu de la double addition de l'oxychlorure de phosphore sur la 2-chloroéthylamine comme évoqué dans la littérature (9,44 ppm)²⁹³.

Le mélange réactionnel a alors été filtré pour retirer les sels de TEA et concentré à l'évaporateur rotatif sous pression réduite. Lors de cette étape, la température du bain-marie a été maintenue à une température inférieure à 25 °C, sous peine de dégradation du produit qui se traduisait par un brunissement de la solution. Un précipité correspondant à des sels de TEA a été une nouvelle fois éliminé par filtration. Le filtrat a alors été évaporé à sec et contrôlé par analyse RMN ^{31}P : le signal du produit à 19 ppm restait majoritaire. Le brut a alors été dissout dans un mélange THF/eau et agité pendant 2 heures afin d'hydrolyser le chlorure de phosphorodiamidyle **4** en acide phosphorodiamidique **3**. L'analyse du milieu par RMN ^{31}P (Figure 73) a révélé la présence de divers produits phosphorés dont un signal à 14 ppm pouvant, selon la littérature (14,17 ppm dans le DMSO- d_6)²⁹⁴, correspondre au dérivé désiré **3**. Toutefois ce dernier ne représentait que 20% de l'ensemble des espèces phosphorées présentes.

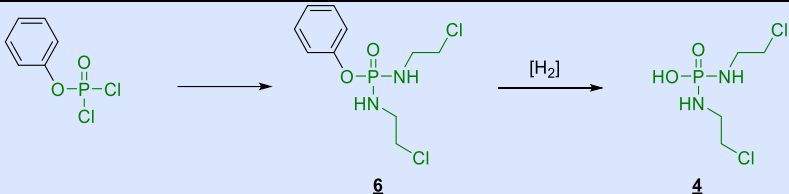


Résultats et discussion

Après évaporation du THF, le milieu a été placé une nuit à 4 °C en chambre froide dans le but de cristalliser le produit. Malheureusement, même après plusieurs tentatives, ces conditions opératoires ne nous ont pas permis d'isoler l'acide phosphorodiamidique **3** et nous ont conduits à envisager une nouvelle voie de synthèse.

2. Hydrogénation d'un ester phosphorodiamidate (méthode 9)

La deuxième méthode, dont les principales conditions décrites dans la littérature sont résumées dans le Tableau 17, consiste à synthétiser l'ester phénylique ou benzylique de l'acide phosphorodiamidique **3** et à déprotéger ce dernier par hydrogénation. La stratégie basée sur l'utilisation d'un l'ester phénylique **6** met en jeu le dichlorophosphate de phényle commercial comme produit de départ. Ce dernier est traité par la chloroéthylamine en présence de TEA à basse température pour conduire à l'ester correspondant avec des rendements de 82% ou 75%. Ce composé est ensuite hydrogéné en présence d'oxyde de platine comme catalyseur permettant d'accéder à l'acide **3** avec des rendements de 44% pour la méthode de Gale³⁰⁵ et de 70% pour la méthode de Lorenz *et al*³⁰⁶. La seconde méthode nécessite de synthétiser extemporanément le dichlorophosphate de benzyle intermédiaire en raison de son instabilité. Ce dernier, obtenu en traitant l'oxychlorure de phosphore par de l'alcool benzylique, réagit avec deux équivalents d'amines pour conduire à la formation de l'ester benzylique **5** avec un rendement de 37%²⁹⁰. L'ester est ensuite hydrogéné sur colonne de palladium sur charbon, en présence de cyclohexadiène comme source d'hydrogène, pour conduire à la moutarde chlorée **3** avec un rendement de 77%. Waligora et Amedio quant à eux, ne purifient pas l'ester intermédiaire obtenu, ce dernier étant engagé après filtration du milieu réactionnel, directement dans l'étape d'hydrogénation en présence de palladium sur charbon pour donner l'acide **3** avec un rendement de 74%.

Méthode	Synthèse du précurseur	Rendement	Conditions d'hydrogénation	Rendement	Rendement global
Méthode 9 utilisant un groupement phényle					
Gale¹⁹	H ₂ NCH ₂ CH ₂ Cl . HCl TEA, DCM, 0 °C, 18 h	82%	PtO ₂ , H ₂ , 50 PSI, EtOH	44%	36%
Lorenz et Weissler³⁰⁶	H ₂ NCH ₂ CH ₂ Cl . HCl TEA, PhMe, DCM, 0 °C puis t.a., 18 h	75%	PtO ₂ , H ₂ , <i>i</i> -PrOH	70%	53%

Résultats et discussion

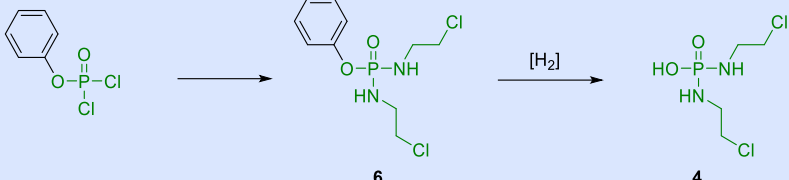
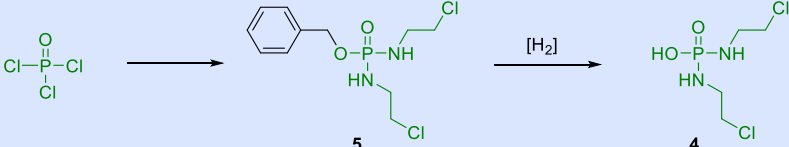
<p>Méthode 9 utilisant un groupement phényle</p>					
Méthode	Synthèse du précurseur	Rendement	Conditions d'hydrogénation	Rendement	Rendement global
Gale ¹⁹	H ₂ NCH ₂ CH ₂ Cl . HCl TEA, DCM, 0 °C, 18 h	82%	PtO ₂ , H ₂ , 50 PSI, EtOH	44%	36%
Lorenz et Weissler ³⁰⁶	H ₂ NCH ₂ CH ₂ Cl . HCl TEA, PhMe, DCM, 0 °C puis t.a., 18 h	75%	PtO ₂ , H ₂ , <i>i</i> -PrOH	70%	53%
<p>Méthode 9 utilisant un groupement benzyle</p>					
Méthode	Synthèse du précurseur	Rendement	Conditions d'hydrogénation	Rendement	Rendement global
Springer <i>et al.</i> ²⁹⁰	1) BnOH, TEA, CHCl ₃ , -29 °C, 1 h 2) H ₂ NCH ₂ CH ₂ Cl . HCl TEA, CHCl ₃ , -29 °C puis t.a., 2 h	37%	cyclohexadiène, Pd/C, EtOH	77%	28%
Waligora et Amedio ³⁰⁷	1) BnOH, TEA, ACN, -30°C, 1 h 2) H ₂ NCH ₂ CH ₂ Cl . HCl TEA, ACN, -30 °C puis t.a., 1 h	Non purifié	Pd/C, H ₂ , ACN 50 PSI, t.a., 15 h	74%	74%

Tableau 17 : Conditions de synthèse décrites dans la littérature pour accéder à l'acide **3** par la méthode 2

Le meilleur rendement global obtenu est relatif à la séquence sans purification intermédiaire au départ de l'alcool benzylique, décrite par Waligora et Amedio. Nous avons donc choisi cette méthode pour la synthèse du composé **3** : l'ester intermédiaire **5** a été obtenu par réaction de l'alcool benzylique avec l'oxychlorure de phosphore en présence de TEA dans le DCM à -78 °C suivi de l'addition de chlorhydrate de 2-chloroéthylamine et de 4,5 équivalents de TEA. Après retour lent à 5 °C durant 15 heures, le composé **5** est isolé après chromatographie avec un très bon rendement de 85%. Cet ester **5** est ensuite hydrogéné dans le méthanol pour donner l'acide phosphorodiamidique **3** correspondant, de façon quasi-quantitative (94%), après filtration et évaporation du milieu réactionnel. Le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc extrêmement hygroscopique. L'hydrogénation réalisée extemporanément, avant chaque utilisation de l'acide **3** afin de pallier à d'éventuels soucis de dégradation lors de sa conservation.

La formation de l'acide phosphorodiamidique a été confirmée par analyse de spectrométrie de masse (ESI) avec la présence des signaux correspondant à l'ion $[M+H]^+$, $m/z = 220,96$ (valeur théorique = 221,00) et à l'adduit sodé $[M+Na]^+$ $m/z = 242,91$ (valeur théorique = 242,98). Concernant les analyses RMN et du fait de la faible solubilité de l'acide **3** dans les solvants deutérés usuels, le spectre RMN du sel de TEA a été réalisé DMSO-*d*₆ et indique la présence d'un signal à 11,16 ppm, attribuable au composé **3** selon les données issues de la littérature (11,9 ppm pour l'analogue bromé)²⁹⁸.

Résultats et discussion

III. Voies d'accès envisagées pour l'obtention de dérivés de type 1-alkyl-5-hydroxyméthyl-2-nitroimidazoles : synthèse des composés **12** et **22**

Pour obtenir les prodrogues fonctionnalisées en position *N*-1 et *C*-4, il était nécessaire au préalable d'accéder aux précurseurs (imidazol-5-yl)méthanol correspondants **22** et **42** (Schéma 8). Pour ce dernier, l'introduction de la chaîne amine tertiaire pouvait être réalisée par couplage de Stille au départ du synthon **12**. Il était donc nécessaire de concevoir une séquence réactionnelle permettant de fonctionnaliser le cycle imidazole par un groupement nitro en position 2, une fonction 5-hydroxyméthyle en position 5 et un groupement alkyle en position 1.

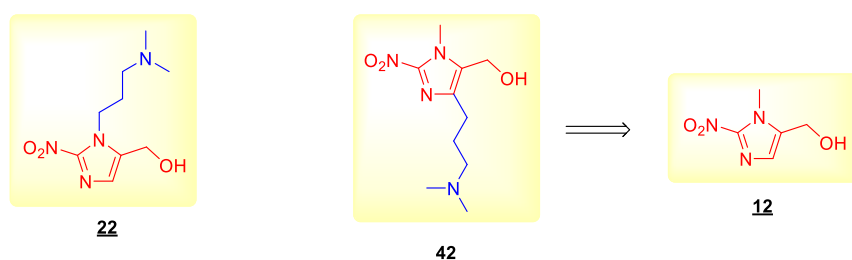


Schéma 8 : Structure des trois précurseurs (imidazol-5-yl)méthanol, nécessaires pour l'obtention des phosphorodiamidates **26**, **45**, **27**, **47**, **29** et **49**

Les deux dérivés imidazoliques **22** et **12** possèdent des substituants de nature et de position identiques. Quatre voies de rétrosynthèses sont possibles pour obtenir ce type de composé à partir d'un imidazole fonctionnalisé (Schéma 8):

- La voie A : requière une fonctionnalisation en *C*-5.
- La voie B : nécessite d'introduire une fonction nitrée en *C*-2.
- La voie C : met en œuvre une alkylation régiosélective en *N*-1.
- La voie D : aucune fonctionnalisation requise après création du cycle imidazolique.

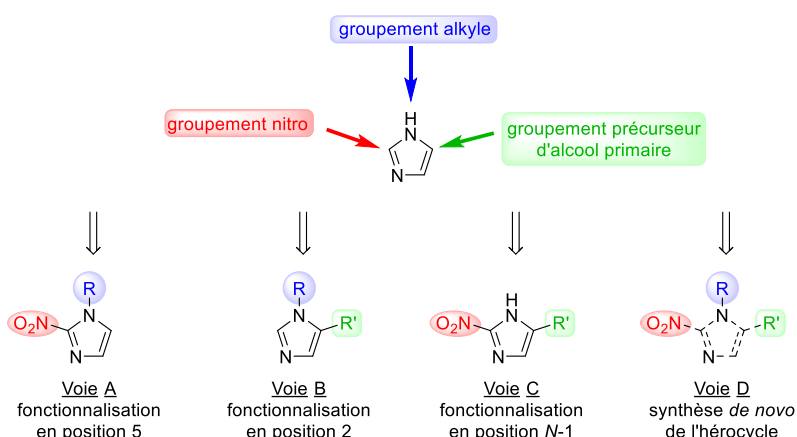


Schéma 9 : Rétrosynthèses pour accéder à imidazole substitué en positions *N*-1, 2 et 5

Résultats et discussion

1. Fonctionnalisation en position 5 d'un imidazole disubstitué en 1,2 (voie A)

Les seuls exemples de la littérature de fonctionnalisation d'un imidazole en position 5 sont réalisés avec des 1-*N*-alkylimidazoles ou 5-halogéno-1-*N*-alkylimidazoles grâce à un couplage palladié^{308,309}. Le groupement introduit est toujours éthylénique ou aromatique et n'est en aucun cas un précurseur d'alcool primaire. De plus, aucune réaction dans la littérature ne permet l'introduction régiosélective d'un groupement en position C-5 sur un 1-*N*-alkyl-2-nitroimidazole. La voie A a donc été écartée.

2. Fonctionnalisation en position 2 d'un imidazole disubstitué en 1,5 (voie B)

Lorsque l'atome d'azote de l'imidazole est substitué en position 1, la nitration par un mélange sulfonitrique conduit à la formation de divers produits mono, di et tri-nitrés, principalement en positions 4 et/ou 5 imidazolique (Schéma 10)³¹⁰. L'utilisation du tétrafluoroborate de nitronium comme agent de nitration permet d'une part de limiter le nombre de produits formés et d'autre part d'accéder au 2-nitroimidazole désiré. Toutefois, le rendement obtenu (6%) est insuffisant pour que cette méthode soit choisie comme voie de synthèse préférentielle.

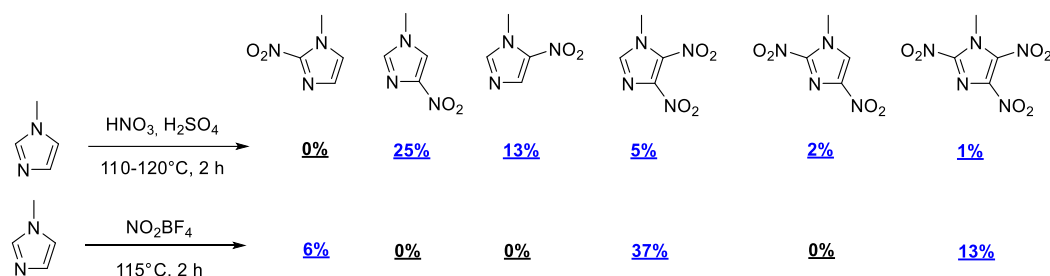
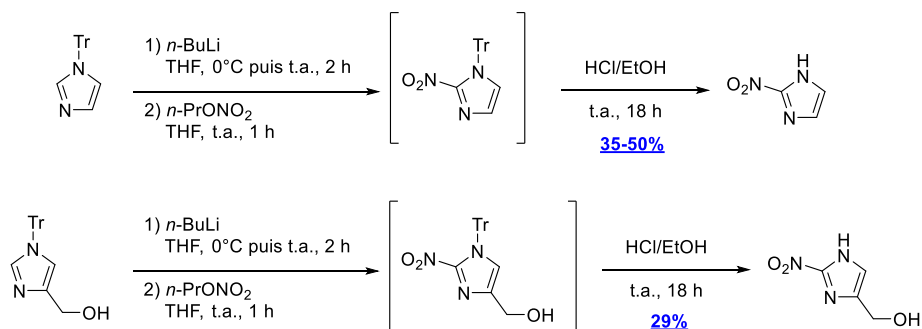


Schéma 10 : Produits de nitration obtenus en utilisant un mélange sulfonitrique ou le tétrafluoroborate de nitronium sur le 1-*N*-méthylimidazole³¹⁰

Une autre méthode est décrite dans la littérature par Davis *et al.* permettant l'introduction d'un groupement nitro sur un imidazole substitué en position 1 ou disubstitué en position 1-4 avec un motif très proche de celui des deux alcools désirés **22** et **12** (Schéma 11)³¹¹. Cette réaction consiste à déprotoner le cycle en position 2 au moyen d'une base forte (*e.g.* *n*-butyllithium) puis de faire réagir le carbanion formé avec le nitrate de propyle pour donner le 2-nitroimidazole correspondant. Les structures contiennent en position 1 un groupement trityle qui sert de protection de l'atome d'azote et peut aisément être retiré en milieu acide. Davis *et al.* ont démontré que la réaction fonctionne, même en présence d'une fonction alcool non protégée, où un équivalent supplémentaire de *n*-butyllithium est additionné pour compenser sa basicité. Le 4(5)-hydroxyméthyl-2-nitro-1*H*-imidazole a été obtenu avec un rendement de 29%³¹¹. Toutefois, même si cette méthode est efficace dans ce cas où l'imidazole est 1-4 di-substitué, elle ne semble pas utilisable lorsqu'il est substitué en position 1-5. Cela a été démontré par Jin *et al.* où, après essai des conditions de Davis *et al.*, aucune réactivité de nitration n'a été observée avec ce type de composé (Schéma 11)¹¹⁸.

Résultats et discussion

Davis *et al.*



Jin *et al.*

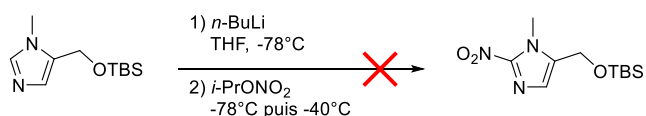


Schéma 11 : Introduction du groupement nitro par voie électrophile en position C-2 sur l'imidazole protégé en position N-_{118,311}

Il semble donc que l'introduction d'un groupement nitro en position 2 ne soit pas possible avec un imidazole substitué en position N-1 et C-5. La voie B a donc également été écartée.

3. Fonctionnalisation en position 1 d'un imidazole disubstitué en 2 et 5 (voie C)

Comme l'a démontré Davis *et al.*, l'obtention d'un synthon 2-nitro-1*H*-imidazo-4(5-yl)méthanol est réalisable. Ce composé pourrait ensuite être alkylé en position N-1 pour donner les composés **22** et **12**.

La principale difficulté de cette stratégie d'alkylation réside dans la régiosélectivité d'une telle réaction. En effet les imidazoles monosubstitués en C-4 sont connus pour s'isomériser en dérivés substitués en C-5 et *vice versa* (Schéma 12). Cet équilibre est régi par la tautomérisation annulaire prototropique entre les deux atomes d'azote du cycle imidazole.

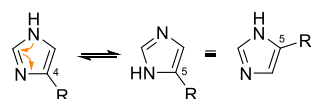


Schéma 12 : Isomérisation par tautomérisation d'un imidazole substitué en position C-4 ou C-5

Par exemple, l'alkylation du 2-nitro-4(5)-méthyl-1*H*-imidazole avec un bromure d'allyle substitué conduit à la formation d'un mélange d'isomères méthylés en positions C-4 et C-5 (respectivement de 60% et 15%) (Schéma 13)³¹².

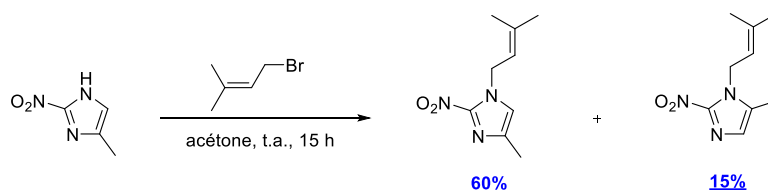
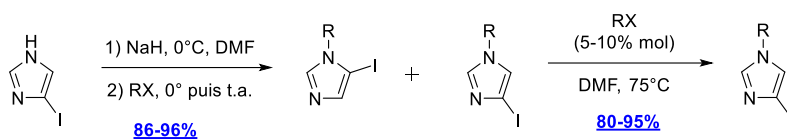


Schéma 13 : N-alkylation du 2-nitro-4(5)-méthyl-1*H*-imidazole donnant les deux isomères substitués en position C-4 et en C-5³¹²

Résultats et discussion

Il est toutefois possible d'orienter la régiosélectivité de la réaction en chauffant le mélange d'isomères en présence du même agent alkylant. Pour une question d'encombrement stérique, le plus stable des deux isomères est obtenu, c'est-à-dire l'imidazole substitué en position 4 comme cela a été démontré pour l'alkylation du 4-iodoimidazole (Schéma 14)³¹³.



RX = BnBr, SEMCl, MOMCl

Schéma 14 : Conversion d'un mélange d'iodoimidazoles substitués en C-4 ou C-5 en isomère substitué en position 4 par chauffage en présence de l'agent alkylant³¹³

Une autre stratégie a été décrite par Chen *et al.* à partir de bases fortes organomagnésiennes³¹⁴. Ainsi le 5-cyano-1-méthylimidazole a été obtenu après alkylation du 4-cyanoimidazole par l'iodure de méthyle, en présence de chlorure de 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine (TMP) amidure de magnésium, avec un rendement de 74% (Schéma 15). Cette alkylation régiosélective semble cependant plus difficile avec d'autres agents alkylants comme le bromure d'allyle (35%) sur le 4(5)-phénylimidazole en présence de chlorure de méthylmagnésium, qui nécessite de surcroît un chauffage aux micro-ondes.

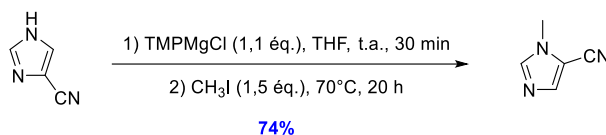


Schéma 15 : N-alkylation du 4-cyanoimidazole donnant l'isomère substitué en position C-5³¹⁴

En résumé, pour obtenir les synthons **22** et **12** polyfonctionnalisés en N-1, C-2 et C-5, aucune des trois voies A, B et C précédentes n'est exploitable. Il est donc nécessaire d'élaborer une voie de synthèse *de novo* du cycle imidazole, directement fonctionnalisé en N-1, C-2 et C-5 par les groupements désirés ou leurs précurseurs.

4. Synthèse *de novo* du cycle imidazole (voie D)

Les principales méthodes de synthèse permettant d'accéder au cycle imidazole sont décrites dans le Schéma 16.

Résultats et discussion

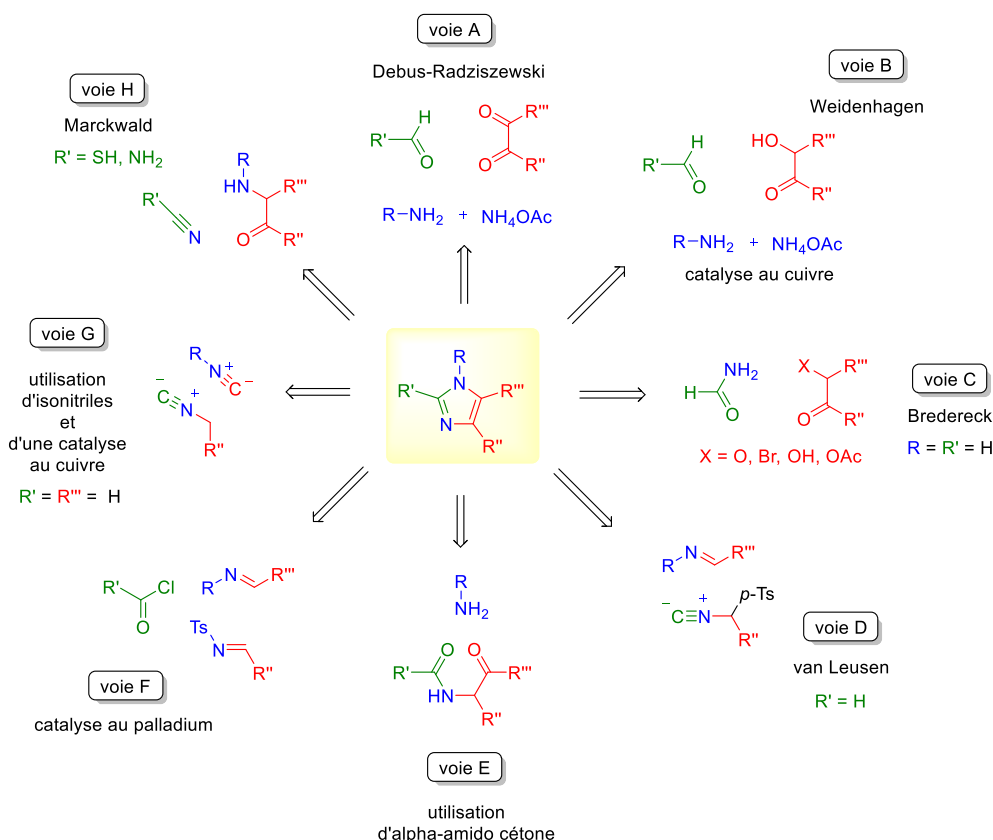


Schéma 16 : Principales voies d'accès au cycle imidazole polyfonctionnalisé³¹⁵⁻³²³

Concernant l'accès direct à un motif 2-nitroimidazole :

- Les voies D et G ne permettent pas d'accéder à une fonctionnalisation en position 2.
- Les voies A, B, C, E et F mettraient en jeu des dérivés nitrés du formaldéhyde, du chloroformiate ou d'un formamide qui ne sont pas référencés dans la littérature car sûrement trop instables.
- la voie H impliquerait l'utilisation de nitrocyanure, composé décrit comme extrêmement réactif par Rahm *et al.* et dont la synthèse est réalisée à $-196\text{ }^\circ\text{C}$ ³²⁴.

En conclusion, aucune de ces voies ne permet d'introduire directement en position 2 le groupement nitro lors de la création du motif imidazole. Il doit donc impérativement être introduit par le biais d'une autre fonction comme la fonction amine. La cyclisation de Marckwald, voie H, permet ce type d'approche conduisant aux (2-amino-1-*N*-alkyl-1*H*-imidazo-5-yl)méthanols.

Deux synthèses utilisant une cyclisation de Marckwald sont retrouvées dans la littérature. Dans les deux cas, le groupement nitro est introduit par diazotation d'un groupement amine en position 2 :

- Pour la première synthèse, décrite par Jin *et al.*¹¹⁸, la diazotation est réalisée dans les conditions de Sandmeyer à partir de l'amine aromatique, elle-même provenant d'un groupement azoture introduit sur l'imidazole par voie électrophile (Figure 74). Cette synthèse a été réalisée au départ du 5-[[*tert*-butyldiméthylsilyloxy]méthyl]-1-*N*-méthyl-1*H*-imidazole. Mais ce dernier composé n'est pas commercial et doit être synthétisé selon une séquence en trois étapes décrite par de Figueiredo *et al.*³²⁵, et basée notamment sur une cyclisation de Marckwald à partir du dimère de la 1,3-dihydroxyacétone, de méthylamine et de thiocyanate

Résultats et discussion

de potassium. Cette séquence réactionnelle en 7 étapes permet d'accéder au composé **12** avec un rendement global de 18% (Figure 74).

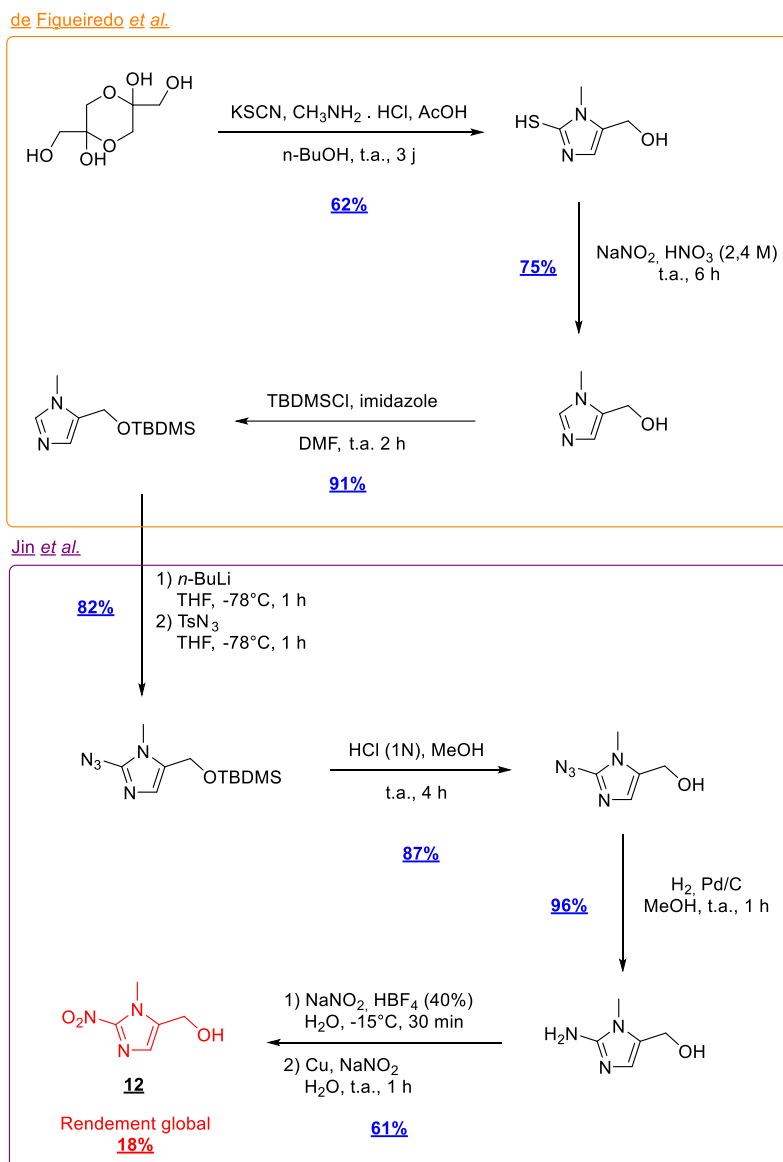


Figure 74 : Conditions de la littérature permettant l'accès au composé **12** (d'après de Figueiredo *et al.* et Jin *et al.*)^{118,325}

- La seconde voie, décrite notamment par Matteucci *et al.*²⁸⁹ et O'Connor *et al.*^{298,322}, est la plus documentée dans la littérature pour accéder au composé **12**, obtenu avec des rendements de 10% à 54% à partir de l'ester éthylique ou méthylique de la sarcosine en 7 étapes (Schéma 17). Elle a notamment été développée pour la synthèse du TH-302²⁸⁹ par la société Threshold Pharmaceuticals. Cette méthode est la plus utilisée dans la littérature pour accéder à des prodrogues possédant ce type de gâchette^{269,270,289,298,322,326,327} et est la seule à notre connaissance qui, grâce à la cyclisation de Marckwald, permet de fonctionnaliser l'hétérocycle en positions N-1, C-2 et C-5 avec les substituants envisagés. C'est cette séquence réactionnelle plus avantageuse en termes d'étapes et de rendements, qui a donc été choisie pour la synthèse du composé **12** et ensuite adaptée à celle du composé **22**. Elle va être développée plus en détail dans le paragraphe suivant.

IV. Synthèse du précurseur **12**

La synthèse du composé **12** est décrite dans la littérature en 7 ou 8 étapes à partir du dérivé *N*-méthylé de la glycine (appelé sarcosine) *via* la formation de l'intermédiaire clé 2-aminoimidazole **9**. La maîtrise de cette voie d'accès est primordiale puisqu'elle devra être transposée à la synthèse du composé **22**.

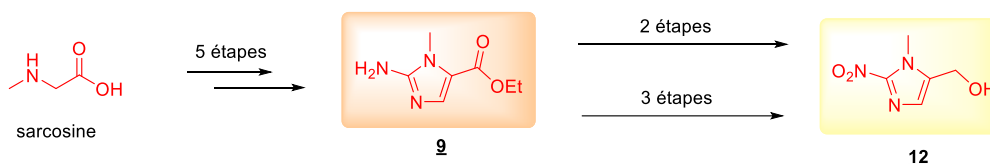


Schéma 17 : Voie de synthèse utilisée pour accéder au composé **12**

A. Estérification de la sarcosine

La sarcosine a été estérifiée par la méthode de Fisher utilisant une catalyse acide³²⁸ (Schéma 18).

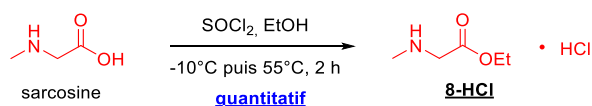


Schéma 18 : Estérification de la sarcosine

L'acide qui a été utilisé est le chlorure d'hydrogène généré *in situ* par addition à froid de chlorure de thionyle dans l'éthanol absolu. Ainsi le sarcosinate d'éthyle **8-HCl** a été obtenu sous forme de chlorhydrate analytiquement pur avec un rendement quantitatif ($n = 4$).

B. *N*-Formylation, *C*-formylation, *N*-déformylation et cyclisation de Marckwald à partir du composé **8-HCl**

La synthèse de l'aminoimidazole **9** a été décrite en quatre étapes par Matteucci *et al.* (Schéma 19)²⁸⁹ : (1) une réaction de *N*-formylation réalisée à partir du chlorhydrate de sarcosinate de méthyle, (2) une *C*-formylation sur le carbone en alpha de l'ester, (3) une *N*-déformylation en milieu acide, (4) une réaction de cyclisation de Marckwald au départ de l' α -aminoénol obtenu et de cyanamide pour donner *in fine* le 2-aminoimidazole **9**. Ces trois dernières étapes sont réalisées sans isoler les différents composés intermédiaires. Concernant la première étape de *N*-formylation, elle peut être réalisée indépendamment en utilisant une base faible (carbonate de potassium) avec un rendement de 81 %²⁸⁹ ou 54%²⁷⁰, ou alors de façon concomitante avec l'étape de *C*-formylation en utilisant une base forte (comme l'hydruure de sodium). Concernant les rendements totaux, seul celui relatif à la seconde alternative est donné par Matteucci *et al.* à savoir 48%.

Résultats et discussion

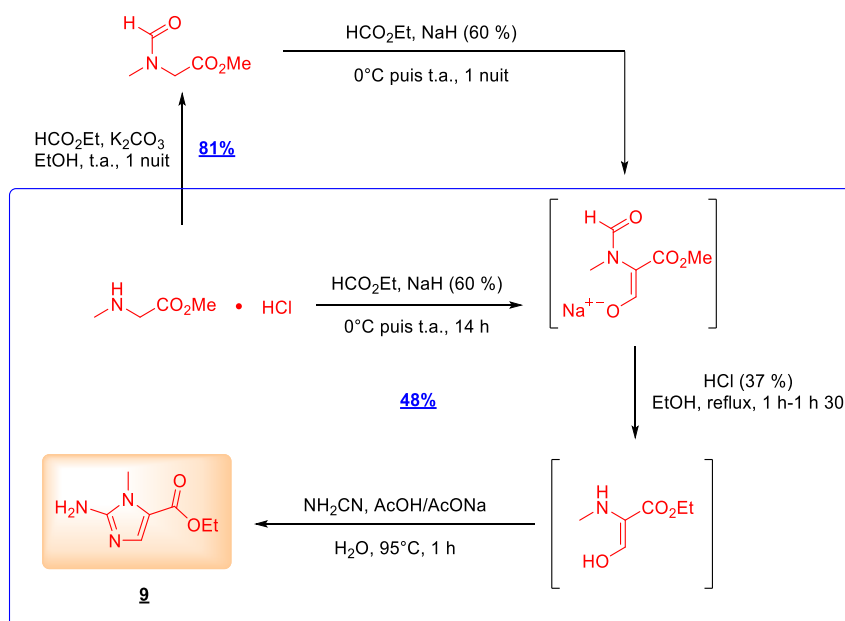


Schéma 19 : Conditions d'accès au composé **9** décrites par Matteucci et al.²⁸⁹

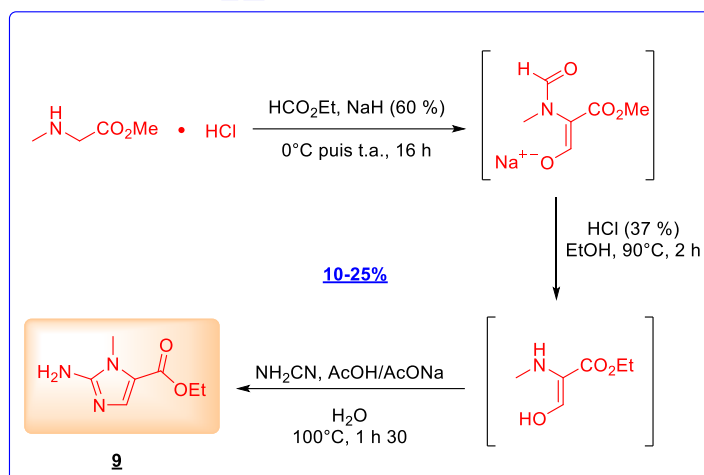
Peu après le début de ces travaux de thèse, deux articles ont été publiés par O'Connor *et al.* sur l'optimisation de cette synthèse en raison des difficultés de mise en œuvre et du manque de reproductibilité observées^{298,322} :

- La première optimisation concerne le type d'ester utilisé : il semble préférable d'utiliser un ester éthylique plutôt que méthylique, plus soluble dans le milieu lors des étapes de formylation ; ce qui est d'autant plus marqué lors de l'ajout de THF anhydre comme co-solvant. Le THF permet également de mieux contrôler la température de la réaction qui est exothermique.
- La deuxième optimisation concerne l'étape de cyclisation. Afin de limiter une hydrolyse potentielle de la fonction ester, le pH de la solution est ajusté à 3 par ajout d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium.

Ces optimisations sont résumées dans le Schéma 20 et les conditions opératoires détaillées sont décrites Tableau 18.

Résultats et discussion

Méthode de Matteucci *et al.*



Méthode d'O'Connor *et al.*

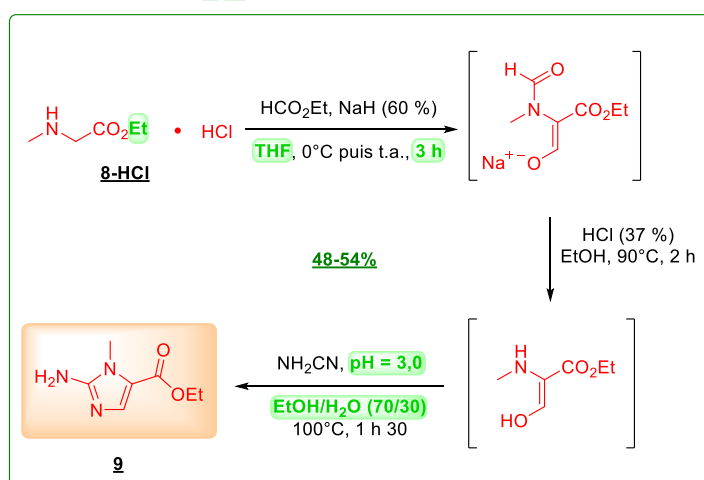


Schéma 20 : Conditions optimisées par O'Connor *et al.* pour l'obtention du composé **9** à partir du composé **8-HCl**^{298,322}

	Conditions 1 de Matteucci <i>et al.</i> ²⁸⁹	Conditions 2 d'O'Connor <i>et al.</i> ^{298,322}	Conditions 2 utilisées au laboratoire
produit de départ	<chem>CN(C)C(=O)OC</chem> · HCl	<chem>CN(C)C(=O)OCC</chem> · HCl 8-HCl	
1^{ère} étape : N et C-formylation			
nombre d'équivalents d'hydrure de sodium	2,3	10	4,5
HCO ₂ Et/THF (v/v)	100/0	50/50	50/50
temps	16 h	3 h	4 h
température	ambiante	ambiante	ambiante
2^{ème} étape : N-déformylation			
nombre d'équivalent d'acide chlorhydrique concentré (37%)	1,0	7,5	6,0
solvant	éthanol	éthanol	éthanol
temps	2 h	2 h	3 h
température	reflux	reflux	reflux

Résultats et discussion

3 ^{ème} étape : cyclisation de Marckwald			
nombre d'équivalents de cyanamide	1,8	2	2
pH	tampon acide acétique/acétate de sodium	3	3
solvant	tampon	éthanol/eau (70/30, v/v)	éthanol/eau (70/30, v/v)
temps	1 h 30	1 h 30	2 h 15
température	reflux	reflux	reflux
rendements moyen	10-25% (n = 5)	48-54% (n = 5)	67 ± 11% (n = 4)

Tableau 18 : Conditions opératoires issues de la littérature ou réalisées au laboratoire pour l'obtention de l'aminimidazole ^{9,289,298,322}

Concernant l'étape de diformylation du composé **8-HCl**, elle a été réalisée en présence de formiate d'éthyle comme agent de formylation et d'hydrure de sodium et s'est avérée capricieuse, comme rapporté par O'Connor *et al.* ²⁹⁸. Lors de cette réaction nous avons pu observer que :

- l'utilisation du chlorhydrate **8-HCl** qui restait en suspension et sédimentait au fond du ballon empêchait l'obtention d'un milieu homogène. Ce problème ne se posait plus dès l'addition du premier équivalent de base qui consommait le chlorhydrate, et conduisait au passage de l'amine en phase organique ;
- une absence de changement de couleur et de dégagement gazeux persistant au premier ajout d'hydrure, était caractéristique de l'absence d'initiation de la réaction, la réaction nécessitait alors d'être initiée par voie thermique ;
- une addition trop rapide de l'hydrure pouvait conduire à un risque d'emballement de la réaction difficilement maîtrisable (augmentation de la température et du volume de dihydrogène libéré).

En fin de réaction, après évaporation, une gomme visqueuse marron a été obtenue. Cette synthèse peut être conduite sur une échelle de 30 à 40 grammes si la phase d'initiation de la réaction est correctement maîtrisée.

L'étape de *N*-déformylation a été réalisée par hydrolyse acide en présence d'acide chlorhydrique concentré. Le chlorure de sodium formé durant la réaction a été éliminé par filtration à chaud du brut réactionnel. Après évaporation, l' α -aminoénol a été obtenu sous la forme d'un liquide vert.

La dernière étape consistait en la cyclisation de Marckwald proprement dite entre l' α -aminoaldéhyde et le cyanamide, en milieu acide hydroalcoolique. La première phase de ce mécanisme (Schéma 21) est l'attaque de l'amine secondaire sur le carbone du cyanamide déficitaire en électrons formant, après protonation, une guanidine. Cette dernière attaque l'aldéhyde pour conduire, après déshydratation, à la fermeture du cycle. Une prototropie intramoléculaire permet alors de transférer le proton en alpha de l'ester sur l'atome d'azote exocyclique pour conduire au cycle imidazole souhaité.

Résultats et discussion

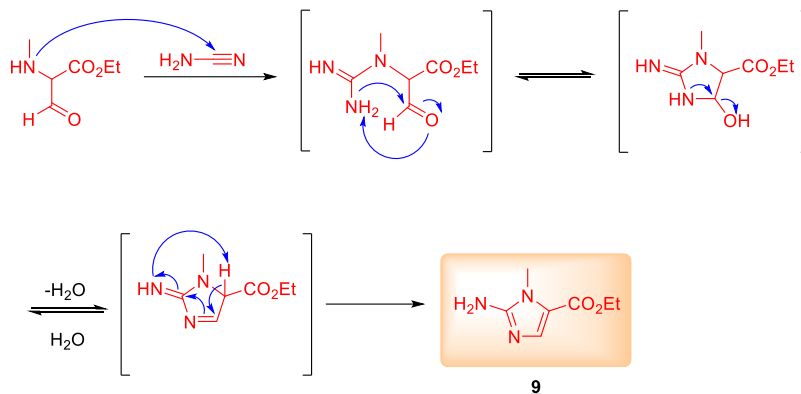


Schéma 21 : Mécanisme proposé pour l'obtention du composé **9** par cyclisation de Marckwald³²⁹

En fin de réaction, le milieu a été concentré sous vide et refroidi dans un bain d'eau glacée avant alcalinisation, pour précipiter le composé **9** qui a été récupéré par filtration. Il a ensuite été séché sous vide et le filtrat extrait à l'acétate d'éthyle. Le brut obtenu a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice permettant d'obtenir une seconde fraction de produit mais qui ne représentait que 1% du rendement final. Lors des essais suivants, seule l'étape de précipitation a été conservée.

Les caractéristiques spectrales sont en accord avec la structure de l'imidazole **9** :

- L'analyse du spectre RMN ^1H montre la présence d'un singulet à 7,27 ppm intégrant pour un proton caractéristique du proton H-4 imidazolique ainsi qu'un singulet élargi à 6,14 intégrant pour deux protons correspondant à ceux de l'amine.
- L'analyse du spectre RMN ^{13}C montre la présence de 3 signaux caractéristiques à 154,27, 136,02 et 116,88 ppm attribuables respectivement aux carbones C-2, C-5 et C-4 aromatiques.
- L'analyse du spectre IR montre des bandes de vibration à 3390 et 3119 cm^{-1} correspondant aux élongations des liaisons N-H respectivement antisymétrique et symétrique d'une amine primaire.

Cette synthèse menée au départ du composé **8-HCl** a permis d'accéder au composé **9** avec un rendement de $67 \pm 11\%$ ($n=4$), comparable à celui donné dans la littérature (*i.e.* 50%)^{298,322}.

En raison du caractère parfois hasardeux de cette étape de diformylation utilisant une grande quantité d'hydruide de sodium, la méthode consistant à isoler le produit intermédiaire de *N*-formylation **10** a également été évaluée. La synthèse du composé **10** à partir du composé **8-HCl** a été réalisée par la méthode de Matteucci *et al.*²⁸⁹. Les rendements obtenus de 82-83 % ($n=2$) sont comparables à ceux de la littérature (*i.e.* 81%). Le composé **9** a ensuite été obtenu avec un rendement de $60 \pm 7\%$ ($n=5$) à partir du composé **10** selon la méthode optimisée par O'Connor *et al.*. Cette séquence en deux étapes distinctes apparaissait donc comme moins intéressante en termes de rendements.

Résultats et discussion

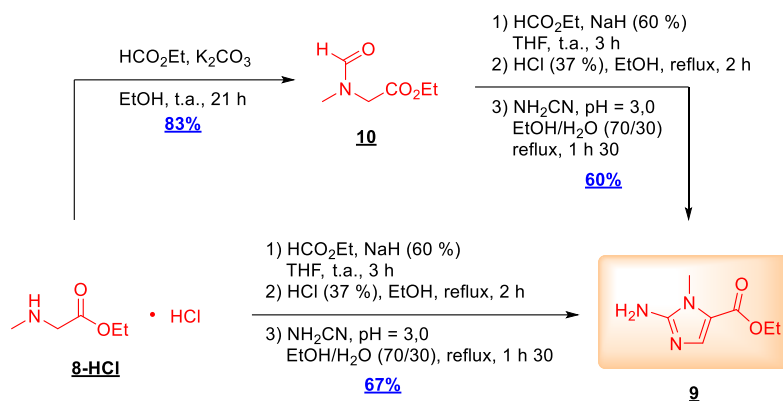


Schéma 22 : Voies de synthèse réalisées au laboratoire pour l'obtention du 2-aminoimidazole **9** à partir du composé **8-HCl**

C. Nitration par diazotation du composé **9**

Deux voies d'accès au dérivé nitré **11** par réaction de diazotation de l'amine **9** sont décrites dans la littérature :

- Voie 1, directement en traitant l'amine par un excès de nitrite de sodium dans l'acide acétique avec des rendements oscillant 58-75%^{289,298,302,322,330}.
- Voie 2, indirectement en isolant le sel de tétrafluoroborate de diazonium, obtenu par diazotation de l'amine dans l'acide tétrafluoroborique, puis en traitant ce dernier par une solution de nitrite de sodium en présence de cuivre (0) avec des rendements de 27 à 53%^{326,327} (conditions de Sandmeyer).

La voie 1 étant la plus largement décrite dans la littérature et offrant les meilleurs rendements, elle est celle que nous avons retenue pour la synthèse du composé **11**. Avec cette même voie d'accès, deux conditions opératoires sont retrouvées dans la littérature et sont regroupées dans le Tableau 19.

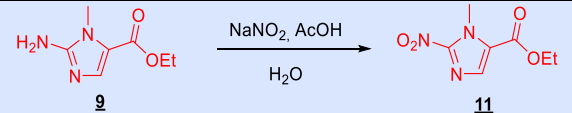
				
	Température	Temps	% acide acétique dans l'eau (en volume)	Rendement de la littérature
Conditions 1	0°C puis t.a.	1 nuit	40	58% ²⁷⁰ , 62% ²⁸⁹ , 75% ^{302,330}
Conditions 2	t.a.	4 h	66	72% ^{298,322}

Tableau 19 : Conditions opératoires décrites dans la littérature pour réaliser la diazotation du composé **9**

Les conditions 1 appliquées au précurseur **9** ont conduit au dérivé **11** avec un rendement moyen de $35 \pm 12\%$ ($n = 6$). Face à ce faible rendement, les conditions 2 ont alors été évaluées avec une légère modification consistant à additionner l'amine **9** à 0 °C avant retour à température ambiante. Egalement et sans explication particulière, un rendement modéré de $40 \pm 6\%$ ($n = 11$) (Schéma 23) a été observé.

Résultats et discussion

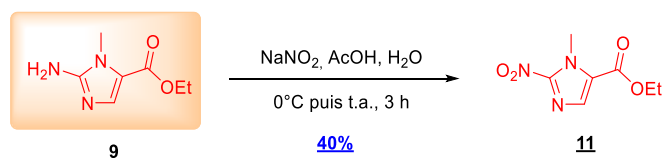


Schéma 23 : Conditions 2 retenues pour la diazotation du composé **9**

L'introduction du groupement nitro est notamment visible après analyse du spectre RMN ^1H par un glissement du signal du proton aromatique vers les champs faibles de 0,5 ppm comparativement au précurseur aminé **9** (*i.e.* 7,78 ppm *versus* 7,27 ppm). L'inverse est observé après analyse du spectre RMN ^{13}C pour le signal relatif au carbone C-2 (*i.e.* 154,27 *versus* 147,61 ppm). L'analyse du spectre infrarouge indique également la présence de bandes à 1486 et 1364 cm^{-1} relatives aux vibrations d'élongation antisymétriques et symétriques du groupement nitro.

D. Réduction de l'ester **11** en alcool **12**

Afin d'obtenir l'alcool **12**, trois méthodes de synthèse sont décrites dans la littérature à partir de l'ester nitré **11** (Schéma 24) :

- **Réduire la fonction ester avec le borohydrure de sodium (voie A)**^{298,322} : même si la réduction des esters n'est généralement pas permise avec ce réducteur, elle peut se faire lorsqu'un groupement électroattracteur est présent soit sur le carbone en alpha (série aliphatique) soit en ortho ou para (série aromatique) de la fonction à réduire^{331,332}.
- **Réduire la fonction ester avec le borohydrure de lithium (voie B)**^{326,327} : ce réducteur plus puissant que son analogue sodé permet de réduire les esters en épargnant les groupements nitrés.
- **Saponifier la fonction ester et convertir l'acide en anhydride mixte avant réduction par le borohydrure de sodium (voie C)**^{270,289} : l'alcool peut être obtenu en deux étapes, *via* l'acide carboxylique correspondant, activé sous forme d'anhydride mixte avant réduction.

Résultats et discussion

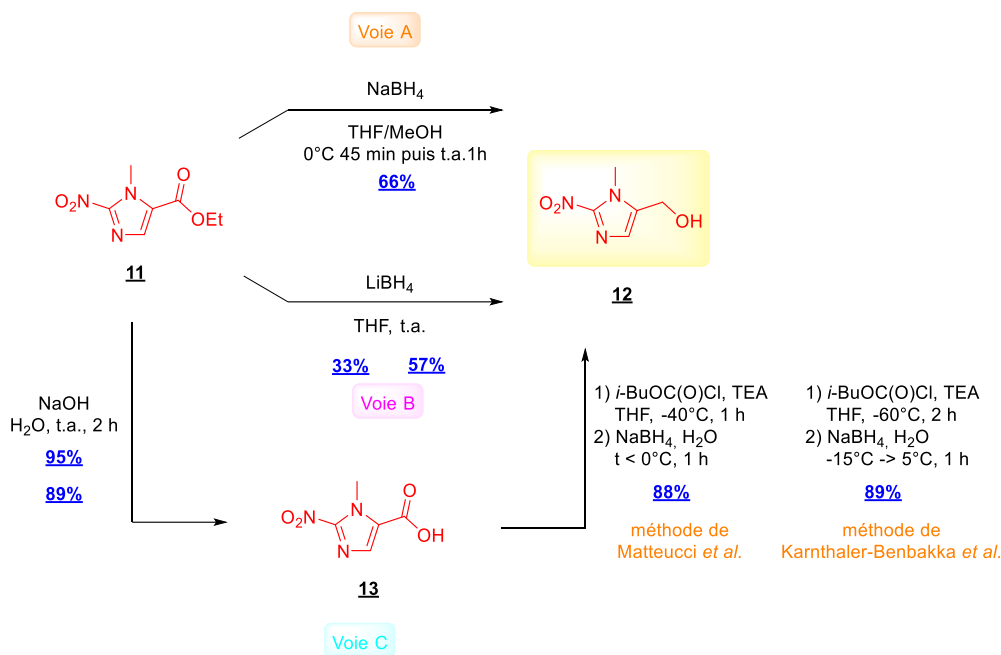


Schéma 24 : Voies d'accès à l'alcool **12** décrites dans la littérature à partir de l'ester **11**^{270,289,298,322,326,327}

La voie C semble la plus optimale en terme de rendement global (84%) pour obtenir le composé **12**, précurseur de l'alcool **42**. En revanche l'utilisation de cette voie pour accéder au composé **22**, qui comporte une fonction amine tertiaire, conduirait à la formation d'un aminoacide, plus difficile à isoler du milieu réactionnel. Aussi les voies de réduction de l'ester en une étape (voie A ou voie B) ont été privilégiées pour ce composé.

1. Réduction avec le borohydure de sodium (voie A)

Après essai de ces conditions au laboratoire à partir de l'ester **11**, une impureté non identifiée était visible en CCM, proche en termes de rapport frontal de l'alcool **12**. Malgré plusieurs essais de purification par chromatographie sur colonne nous n'avons pu isoler une fraction pure de l'alcool. Cette méthode a donc été abandonnée.

2. Réduction avec le borohydure de lithium (voie B)

Les protocoles faisant état de cette méthode de réduction utilisent le borohydure de lithium en suspension dans de THF anhydre et permettent d'obtenir l'alcool **12** avec 33%³²⁷ et 57%³²⁶ de rendement.

Cette méthode a été adaptée au laboratoire. Tout d'abord, le borohydure de lithium a été généré *in situ* dans le THF en traitant le borohydure de sodium par le bromure de lithium. De l'eau a ensuite été ajoutée au milieu, pour rendre la solution homogène, suivi de méthanol afin d'augmenter l'efficacité du borohydure de lithium³³³ et améliorer la miscibilité du mélange THF/eau.

Les essais réalisés au laboratoire ont permis de déterminer les conditions suivantes pour l'obtention du dérivé **12** à savoir : 3 équivalents d'hydrures associés à 3 équivalents de sels de lithium en utilisant une proportion THF/eau 95/5 (v/v) + 5% du volume de solvant en méthanol. La réaction doit impérativement être conduite à froid dans un bain d'eau glacée et la température maintenue en-dessous de 10 °C durant l'ajout de la solution réductrice. A la fin de l'ajout, le retour à température ambiante doit être progressif pour éviter une surchauffe du milieu (réaction

Résultats et discussion

exothermique). Dans le cas contraire, la réaction conduit à de nombreux sous-produits, dont certains ont pu être identifiés comme étant les esters méthyliques et éthyliques du produit dénitré, obtenus en mélange. Leurs structures ont été confirmées tant par l'analyse des spectres RMN ^1H (Figure 75), ^{13}C que par HRMS (spectrométrie de masse haute résolution).

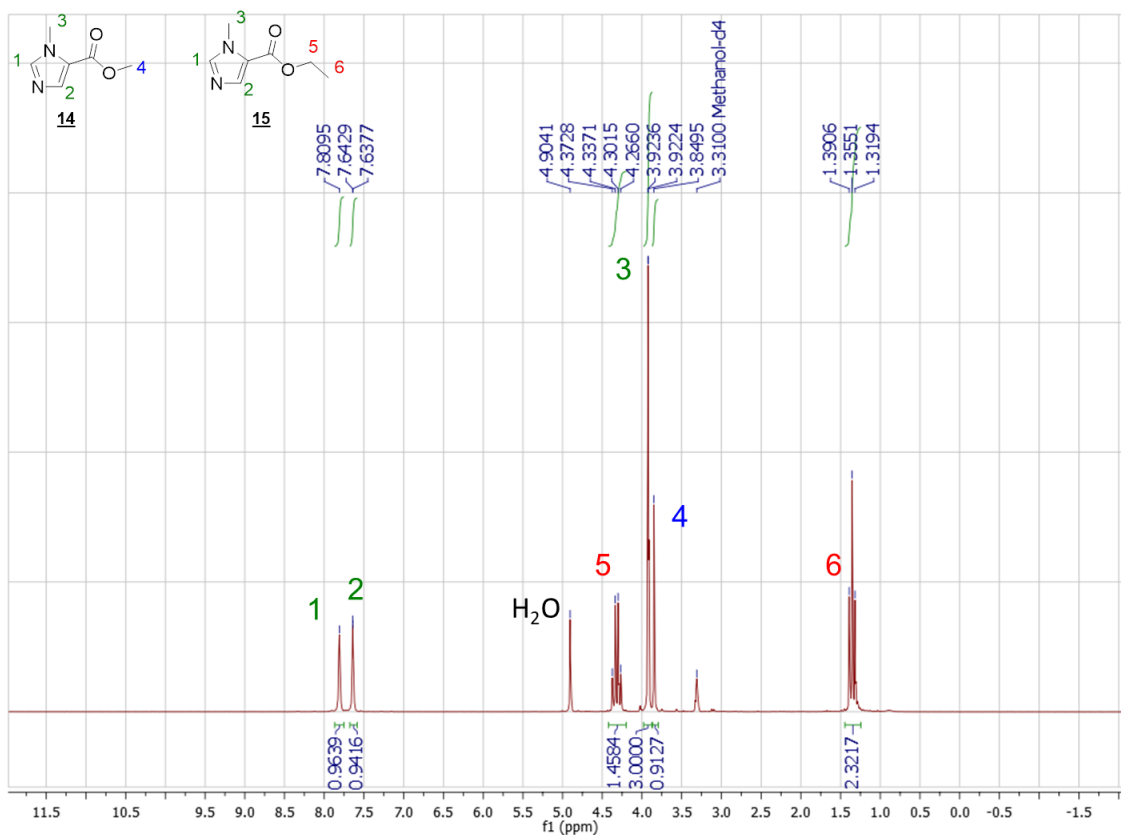


Figure 75 : Spectre RMN ^1H d'un mélange d'esters méthylique et éthylique dénitrés, sous-produits de la réduction du composé **11**

La purification du produit **12** a été réalisée par chromatographie sur colonne de gel de silice, surmontée d'une couche de Célite 545[®] afin de piéger les sels de bore présents dans le brut réactionnel. Cette méthode de réduction conduit à un rendement de $67 \pm 6\%$ ($n = 4$) (Schéma 25), supérieur donc à ceux décrits dans la littérature (33% et 57%)^{326,327}. Toutefois, il est nécessaire de réaliser un contrôle strict de la température du milieu réactionnel sous peine de voir chuter le rendement (<30%).

En RMN ^1H , la disparition du quadruplet à 4,35 ppm et du triplet à 1,32 ppm initialement présents sur le spectre du précurseur **11**, au profit de l'apparition d'un doublet à 4,55 ppm et d'un triplet à 5,46 ppm, intégrant respectivement pour deux et un proton, signe la réduction de l'ester en alcool primaire.

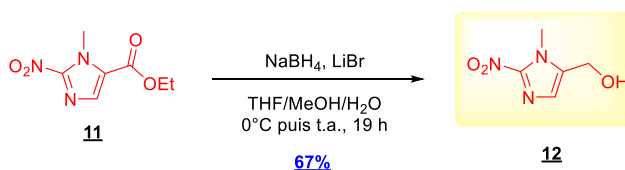


Schéma 25 : Conditions utilisées au laboratoire pour la réduction de l'ester **11** par le borohydride de lithium

Résultats et discussion

3. Réduction via le passage par l'acide carboxylique (voie C)

Le nitro-ester **11** a été saponifié en nitro-acide carboxylique **13** puis réduit en alcool **12** (Schéma 26). La saponification du composé **11** a été réalisée en milieu aqueux avec de l'hydroxyde de sodium. Après acidification du milieu réactionnel, le produit a précipité et a été récupéré par filtration. Il a ensuite été lavé avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 M pour retirer les traces d'impuretés minérales. Cette étape a permis d'isoler une fraction du produit pur de l'ordre de 70%. Le filtrat a été extrait pour récupérer une seconde fraction du produit (environ 20%). Les deux fractions ont été séchées sous vide pour éliminer toute trace d'eau dont la présence est proscrite pour la réaction suivante. Ainsi, l'acide **13** a été obtenu après saponification avec un rendement excellent de $93 \pm 7\%$ ($n = 4$) en accord avec ceux de la littérature (89%-95%)^{270,289,298}.

Ce dernier a été mis en réaction avec du chloroformiate d'*isobutyle* en milieu basique à basse température (-40 °C). L'anhydride mixte obtenu a été ensuite réduit par addition de borohydrure de sodium et d'eau libérant l'aldéhyde correspondant et du carbonate d'*isobutyle*. Ce dernier, instable, se décompose en dioxyde de carbone et en *isobutanol*. L'aldéhyde va ensuite être facilement réduit par le borohydrure en excès. L'addition d'eau dans le milieu réactionnel doit se faire très progressivement sur 1 heure en veillant à ne pas dépasser -10 °C. Après traitement, le milieu réactionnel a été purifié sur un lit de silice. Après évaporation, le produit a été précipité dans l'éther diéthylique puis récupéré par filtration pour conduire à alcool **12** avec un rendement reproductible de $76 \pm 2\%$ ($n = 5$).

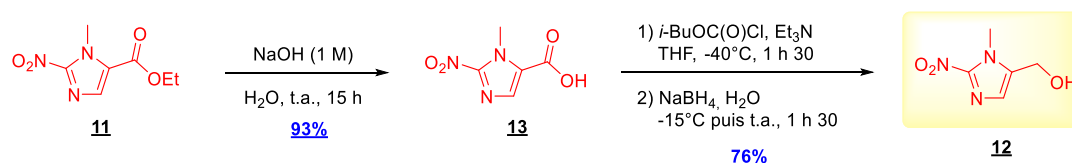


Schéma 26 : Conditions utilisées au laboratoire pour la synthèse et la réduction de l'acide **13**

Ainsi le rendement global sur les deux étapes de synthèse (saponification + réduction) est de 69%. Ce rendement est similaire à celui obtenu avec la voie B utilisant le borohydrure de lithium (*i.e.* 67%, Schéma 25). Bien que le passage par l'acide **13** ajoute une étape de synthèse, cette méthode est simple à mettre en œuvre et plus robuste. Ainsi, cette séquence réactionnelle a été considérée comme la voie d'accès privilégiée pour l'obtention de l'alcool **12**.

En résumé, le rendement global de la synthèse du composé **12** à partir de la sarcosine est de 19% sur 7 étapes (Schéma 27). L'optimisation des différentes étapes nous a permis d'accéder au synthon clé **12** en quantité suffisante pour produire le composé « hit » **ICF05016** à l'échelle du gramme, conditions indispensables pour les études pharmacologiques sur modèle animal. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication à laquelle j'ai été associé, dans le journal *Oncotarget* en 2016³³⁰.

Résultats et discussion

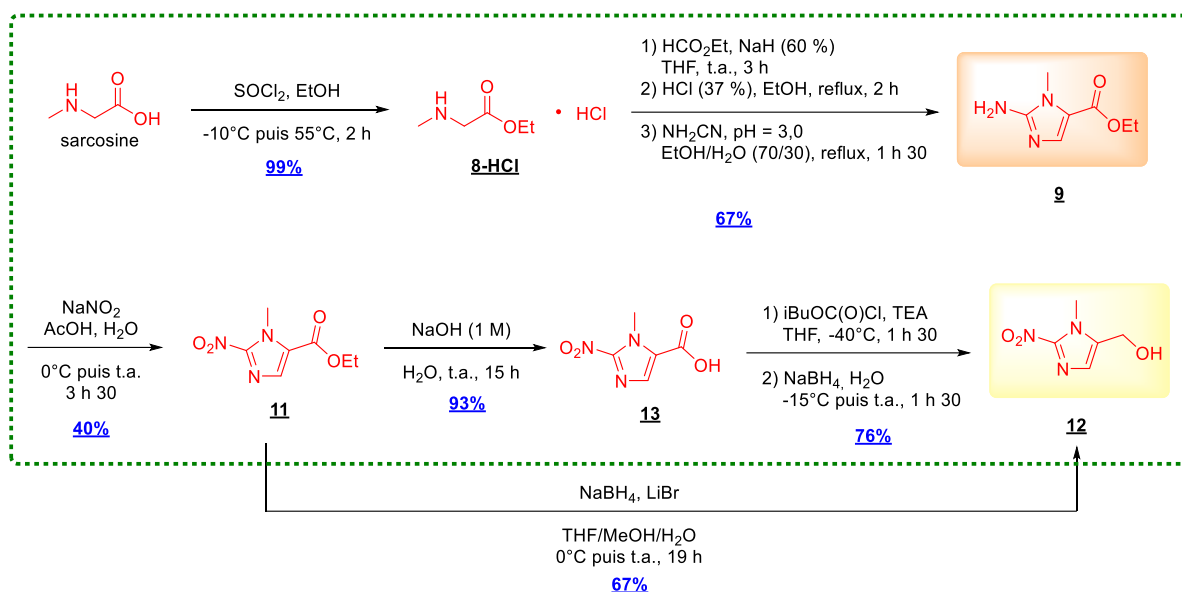


Schéma 27 : Séquence réactionnelle globale mise en œuvre pour l'obtention du composé **12** depuis la sarcosine

L'optimisation de cette séquence réactionnelle a mis en lumière les points critiques de chaque étape. Ce recul s'est avéré très utile lors de la synthèse du composé **22**, obtenu selon une voie similaire, à partir de la 3-(*N,N*-diméthylamino)propylamine.

V. Synthèse de l'alcool **22**

L'alcool **22** a été synthétisé en 7 étapes à partir de la 3-(*N,N*-diméthylamino)propylamine. Cette voie d'accès comprend une étape de cyclisation de Marckwald pour donner l'aminoimidazole **20** qui a été converti en 1-*N*-méthyl-2-nitro-imidazoyleméthanol *N*-1 substitué **22** (Schéma 28).

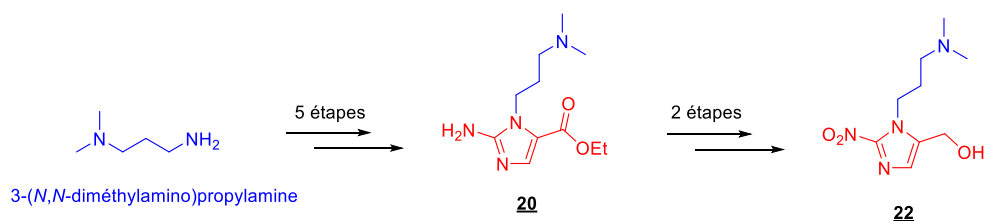


Schéma 28 : Voie d'accès envisagée pour le composé **22**

A. Synthèse du précurseur *N*-[3-(*N,N'*-diméthylamino)propyl]glycinate d'éthyle **16**

L'ester éthylique de la *N*-[3-(*N,N*-diméthylamino)propyl]glycine **16** a été obtenu par substitution nucléophile de l'atome de brome du bromoacétate d'éthyle par la 3-(*N,N*-diméthylamino)propylamine (Schéma 29).

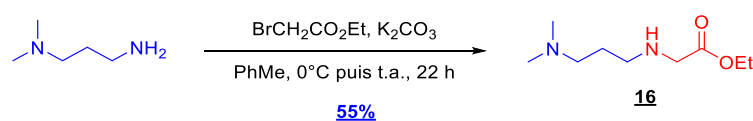


Schéma 29 : Synthèse du composé **16**

Résultats et discussion

Afin d'éviter la double addition du bromoester sur l'amine primaire, celui-ci a été additionné en solution diluée, à 0 °C, très progressivement dans la solution contenant l'amine en excès (2 équivalents). Après traitement du milieu et purification par chromatographie, le glycinate **16** a été obtenu avec un rendement de $55 \pm 4\%$ ($n = 6$) légèrement plus faible que celui décrit dans la littérature (68%)³³⁴, la principale différence résidant dans la méthode de purification utilisée (*i.e.* distillation *versus* chromatographie).

B. N-formylation de l'amine secondaire **16**

Afin de maîtriser au mieux la synthèse de ce nouveau composé et notamment l'étape de cyclisation de Marckwald qui devrait s'avérer être l'étape critique de cette séquence réactionnelle, nous avons choisi de séparer l'étape de N-formylation afin d'isoler et purifier le produit intermédiaire N-formylé **17**. Cette dernière a été réalisée selon les conditions réactionnelles décrites dans la littérature^{270,289} et précédemment utilisées au laboratoire pour accéder au composé **10** (Schéma 30).

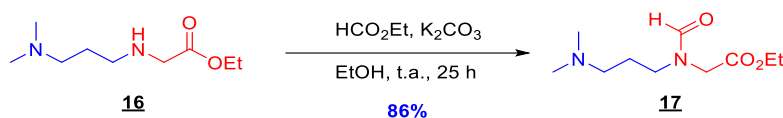


Schéma 30 : N-formylation du composé **16**

Bien que l'extraction du composé **17** de la phase aqueuse se soit avérée difficile, les rendements finaux obtenus sont du même ordre de grandeur que ceux décrits dans la littérature pour l'analogue N-méthyle (*i.e.* $86 \pm 8\%$ ($n = 6$) pour **17** *versus* $82-83\%$ ($n = 2$) pour **10**).

C. Obtention de l'imidazole **20** par cyclisation de Marckwald

Les trois réactions suivantes ont été conduites comme précédemment sans aucune purification (Schéma 31) à savoir : C-formylation, N-déformylation et cyclisation de Marckwald en utilisant la méthode développée par O'Connor (Tableau 18, Conditions 2)^{298,322}. De légères modifications ont toutefois été apportées : lors de l'étape de N-déformylation, un équivalent supplémentaire d'acide chlorhydrique est additionné pour compenser la basicité de l'amine tertiaire. Egalement, et contrairement à son analogue méthylé **9**, le composé **20** ne précipite pas en fin de réaction et doit être extrait du milieu réactionnel.

Résultats et discussion

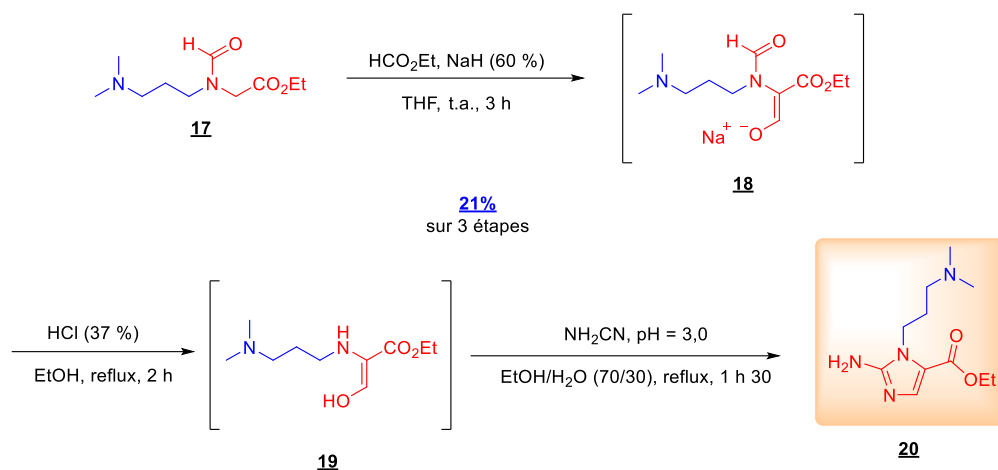


Schéma 31 : Synthèse du composé **20** à partir du glycinat **17**

Après purification sur colonne, le dérivé imidazolique *N*-fonctionnalisé **20** a été obtenu avec un rendement de $21 \pm 9\%$ ($n = 5$) sur 3 étapes. Cette chute de rendement d'environ 50% par rapport à l'analogue *N*-méthyle **9** (67%) montre que l'amine tertiaire a une influence négative sur le déroulé de cette réaction.

D. Introduction du groupement nitro sur l'aminoimidazole **20** par diazotation

La méthode de diazotation utilisée est celle mise au point par O'Connor *et al.* (Tableau 19, Conditions 2)^{298,322} dans une solution aqueuse à 66% en volume d'acide acétique (Schéma 32).

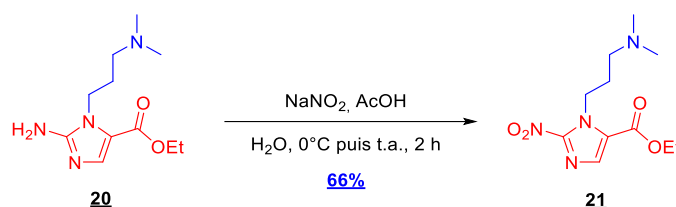


Schéma 32 : Réaction de diazotation du composé **20**

Contrairement aux synthèses réalisées avec le dérivé *N*-méthyle **9**, les rendements obtenus à partir de l'amine **20** lors de la diazotation sont meilleurs ($66 \pm 7\%$, $n = 8$ versus $40 \pm 7\%$) et plus proches de ceux annoncés dans la littérature pour l'obtention du composé **11** ($62-72\%$)^{289,298,322}. Bien que le composé **21** ait été obtenu avec un rendement satisfaisant, son instabilité, nécessite qu'il soit engagé en réaction directement après purification.

E. Réduction de l'ester **21**

Comme précédemment évoqué, si la séquence en deux étapes *via* l'acide a été identifiée comme la plus pertinente pour l'obtention du composé **12**, elle n'apparaît pas ici comme judicieuse car elle conduirait à la formation d'un acide aminé qu'il serait alors difficile d'extraire de la phase aqueuse. Il est donc préférable, pour accéder au composé **22**, d'utiliser la voie de réduction avec le borohydrure de lithium précédemment optimisée pour l'alcool **12** (Schéma 33).

Résultats et discussion

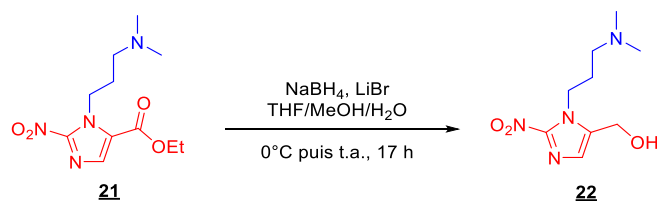


Schéma 33 : Réaction de réduction envisagée pour accéder au composé **21**

Après purification sur colonne de silice, trois produits sont isolés : deux plus apolaires et l'autre plus polaire que l'ester de départ.

L'un des deux produits apolaires a été identifié comme répondant à la structure tetrahydroimidazo[1,2-*a*]pyrimidine donnée Figure 76 et confirmée par l'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C , appuyées par des expériences de type ^1H - ^1H COSY (« correlation spectroscopy ») et ^1H - ^{13}C HSQC (« heteronuclear single quantum coherence ») (Figure 77), HRMS et infrarouge. Les principales caractéristiques spectrales sont les suivantes :

- En IR : absence des bandes de vibration caractéristiques d'un groupement nitro vers 1450 cm^{-1} et 1350 cm^{-1} .
- En RMN ^1H : le singulet intégrant pour six protons, initialement à 2,14 ppm correspondant aux deux groupements méthyles de l'amine tertiaire, disparaît au profit d'un singulet à 3,08 ppm intégrant pour trois protons.
- En spectrométrie de masse : la présence de l'ion chargé $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 210,1234 est en accord avec la masse théorique de la structure proposée ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 210,1237).

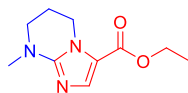


Figure 76 : Structure du composé **23** issu de la dégradation spontanée du dérivé **21** dans le milieu de réduction

Résultats et discussion

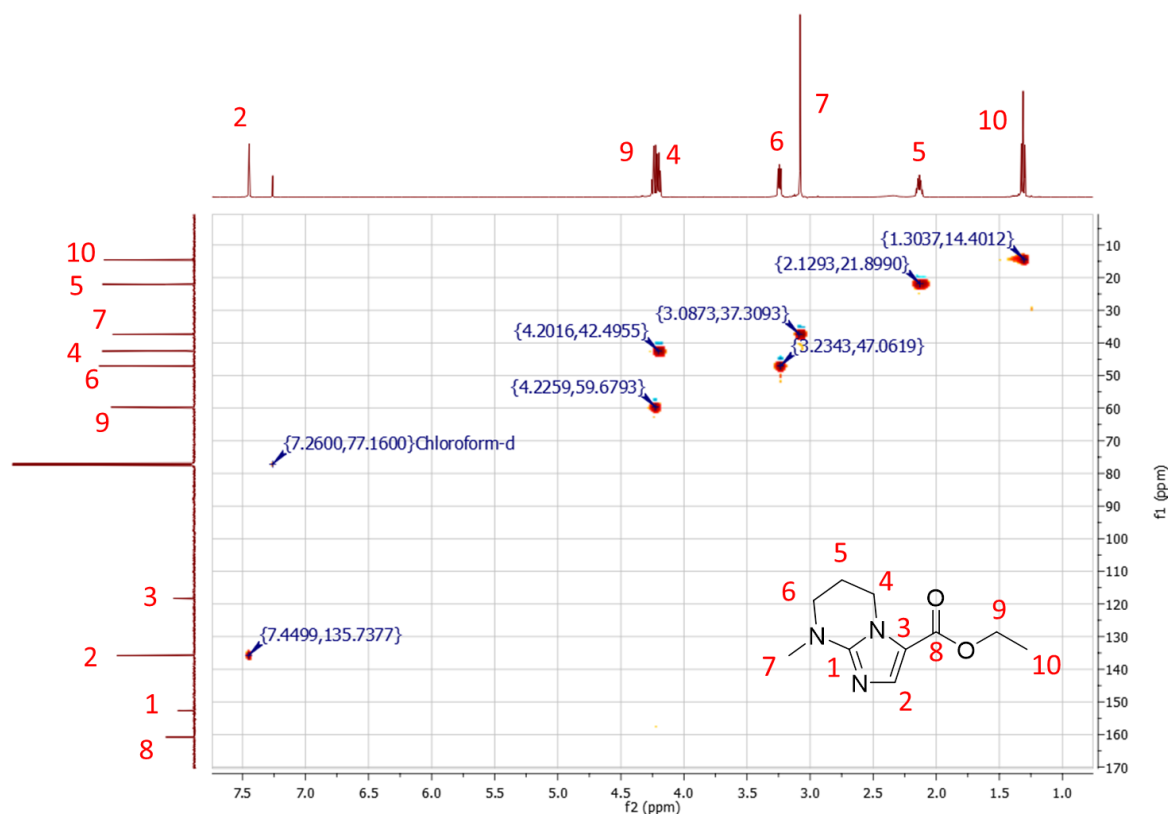


Figure 77 : Spectre ¹H-¹³C HSQC du composé **23**

Compte tenu de la structure obtenue, le composé **23** résulte probablement d'une substitution nucléophile aromatique intramoléculaire du groupement nitro par la fonction amine tertiaire, suivie d'une désalkylation. Une autre hypothèse peut également être envisagée : la présence de bromure dans le milieu pourrait conduire, de façon intermédiaire, à une substitution du groupement nitro par le brome. L'amine tertiaire réaliserait alors une substitution nucléophile aromatique de la même manière que décrit précédemment. Quoi qu'il en soit, ces réactions sont favorisées par la présence en position 5 de l'imidazole d'un groupement électroattracteur (*i.e.* la fonction ester) et par la création d'un cycle à 6 chaînons de type tétrahydropyrimidine thermodynamiquement stable. L'ammonium quaternaire formé serait ensuite déméthylé par un nucléophile présent dans le milieu, mécanisme précédemment décrit dans la littérature pour des 2,4-dichloropyrimidines possédant un électroattracteur en position 5³³⁵.

Cet ester n'étant plus activé par la fonction nitrée ne peut plus être réduit par le borohydrure de lithium contrairement au composé **21**.

Les spectres RMN ¹H des deux autres composés obtenus après l'étape de purification semblaient pouvoir correspondre à la structure du produit attendu **22** (Figure 78). La réduction du groupement ester éthylique est visible par la présence d'un singulet intégrant pour deux protons à 4,76 ppm pour le composé apolaire et 4,58 ppm pour le composé polaire associés à l'absence du quadruplet et du triplet respectivement à 4,35 et 1,32 ppm précédemment observés pour le précurseur **21**. Même si en termes de multiplicité et d'intégrale, l'analyse des spectres RMN ¹H des deux fractions sont en accord avec la structure de l'alcool **22**, une différence majeure est visible au niveau du déplacement chimique des signaux des protons de la diméthylamine. Dans la fraction plus apolaire, ce signal est déblindé (2,60 ppm), comparativement à ceux de la fraction plus polaire (2,19

Résultats et discussion

ppm) et de l'ester de départ (2,14 ppm). Il en va de même pour les signaux relatifs aux protons méthyléniques H-3 et H-4, proches de l'amine tertiaire.

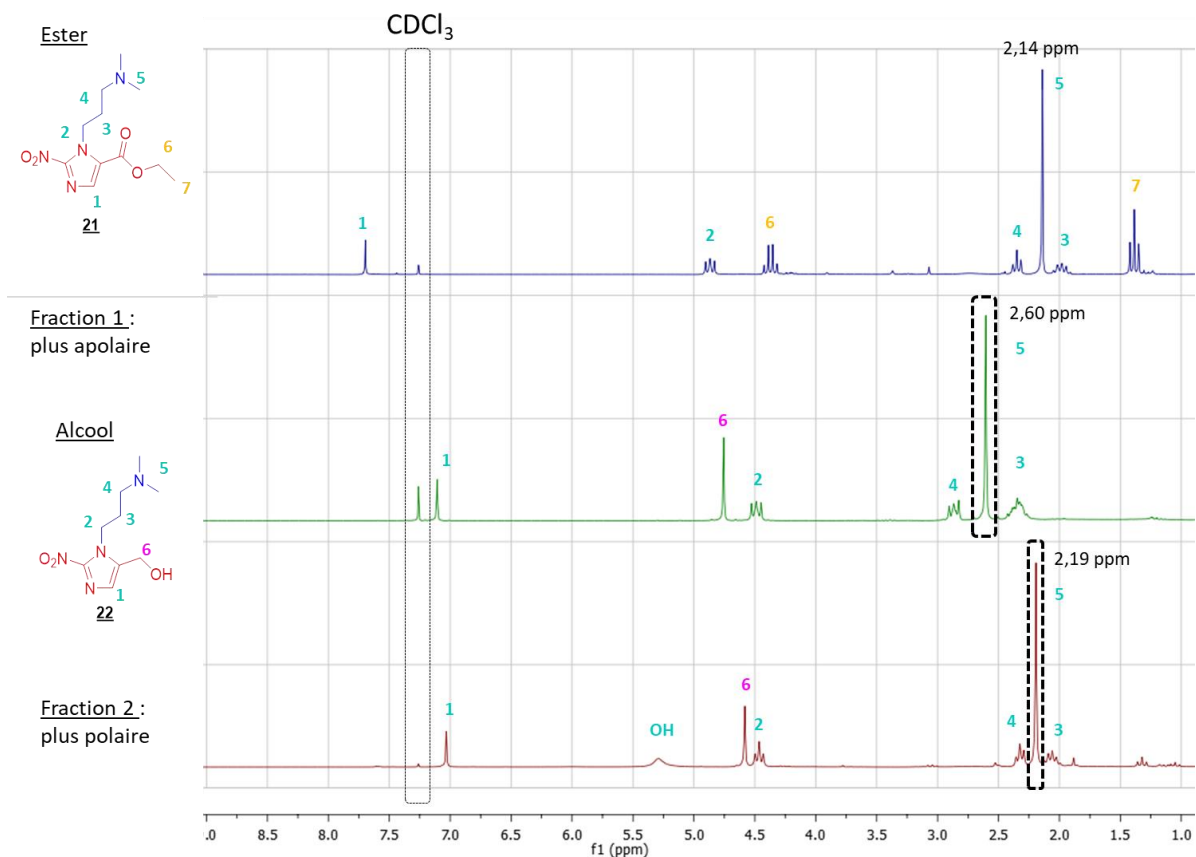


Figure 78 : Spectres RMN ^1H de l'ester **21** et des deux autres produits isolés après réduction

Alors que l'analyse des spectres IR des deux fractions peut être en accord avec la structure du composé **22**, des bandes vibrationnelles supplémentaires entre 2386 et 2271 cm^{-1} apparaissent pour la fraction la plus apolaire. Habituellement peu de fonctions absorbent dans cette zone en dehors des triples liaisons de type alcyne ou nitrile ou bien encore des fonctions azotures. Or, aucune de ces fonctions ne pouvaient être formées lors de la réaction.

L'analyse HRMS de cette fraction confirme bien la structure de l'alcool **22** attendue avec la présence de l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 229,1288 (valeur théorique $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 229,1295) de très faible intensité mais également d'un autre signal majoritaire ayant un rapport m/z de 265,1234 (Figure 79) soit un écart de 36 unités de masse par rapport au produit attendu. Ce dernier possède un massif isotopique pouvant laisser présager la présence d'un atome de bore sur la molécule, caractérisé par des rapports isotopiques 20/80 entre le ^{10}B (19,9 %) et le ^{11}B (80,1%) (Figure 79). Compte tenu de ces éléments, nous avons pu en déduire que la fraction plus apolaire correspondait bien à l'alcool **22** souhaité mais isolé sous la forme d'un complexe de bore formé entre un borane et la fonction amine tertiaire. En effet, sur le spectre de spectrométrie de masse de ce composé sont présents :

- L'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 243,1616 (valeur théorique $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 243,1623) et l'adduit sodé $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 265,1434 (valeur théorique $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 265,1434) prouve de la présence d'un complexe l'alcool **22** / borane.

Résultats et discussion

- L'ion $[M+H]^+$ m/z 229,1288 (valeur théorique $[M+H]^+$ m/z 229,1295) et l'adduit sodé $[M+Na]^+$ m/z 251,1107 (valeur théorique $[M+Na]^+$ = 251,1115) qui correspondent à l'alcool **22** probablement libéré après dissociation du complexe lors de l'ionisation.

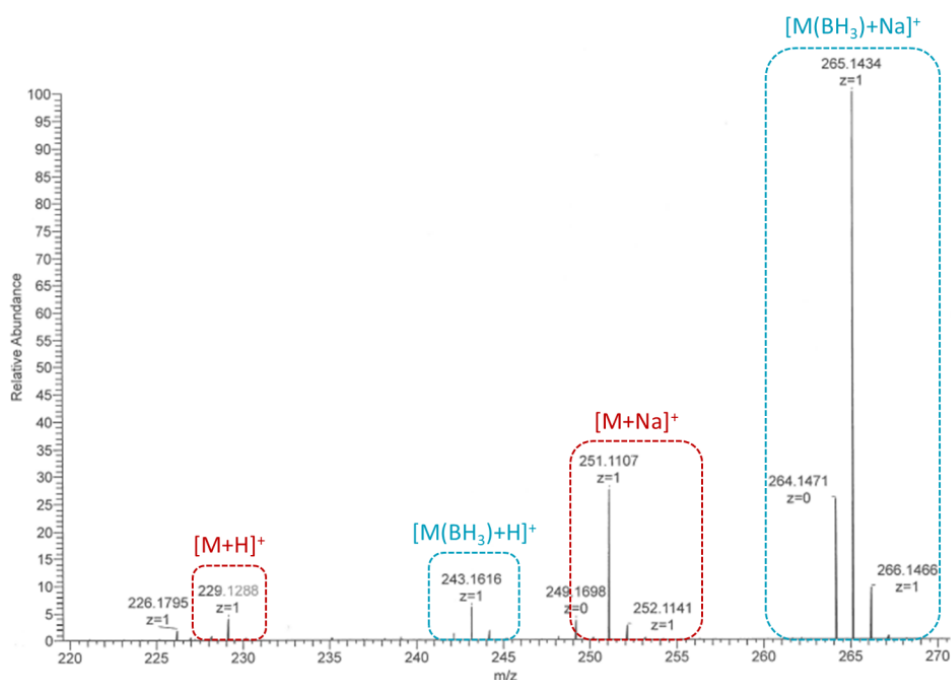


Figure 79 : Spectre de masse de la fraction apolaire

La présence de ce complexe explique le glissement vers les champs faibles en RMN 1H des signaux relatifs aux chaînes alkyles portées par l'amine tertiaire (Figure 78). Egalement, les bandes de vibrations observées sur le spectre IR entre 2386 et 2271 cm^{-1} cadrent avec les vibrations de valence des liaisons B-H. Enfin, la fonction amine étant complexée, la polarité du composé est réduite comparativement à la molécule non complexée, expliquant les grandes différences de rapports frontaux observées. A noter enfin que ce type de structures a déjà été décrit dans la littérature par exemple pour réaliser l' α -métallation puis alkylation de benzylamine³³⁶ ou encore comme source stable de borane pour la synthèse d'acide boroniques³³⁷.

La structure du complexe **22-BH₃** a été finalement confirmée de façon indiscutable par diffraction aux rayons X réalisée après cristallisation dans le DCM par diffusion lente par tension de vapeur d'éther diéthylique (Figure 80).

Résultats et discussion

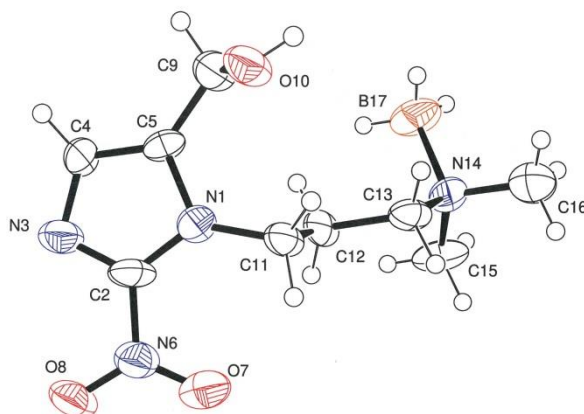


Figure 80 : Structure cristallographique du composé **22-BH₃**. Les ellipsoïdes sont représentés au seuil de probabilité de 50%

Pour conclure, la réduction de l'ester **21** par le borohydrure de lithium conduit majoritairement au complexe de bore **22-BH₃** comparativement à l'alcool non complexé **22** (rendements respectifs de 45 et 7%) et au produit de dégradation **23** (12%) (Schéma 34). Les rendements de réductions sont meilleurs lorsque le composé **21**, instable, est engagé directement après sa purification.

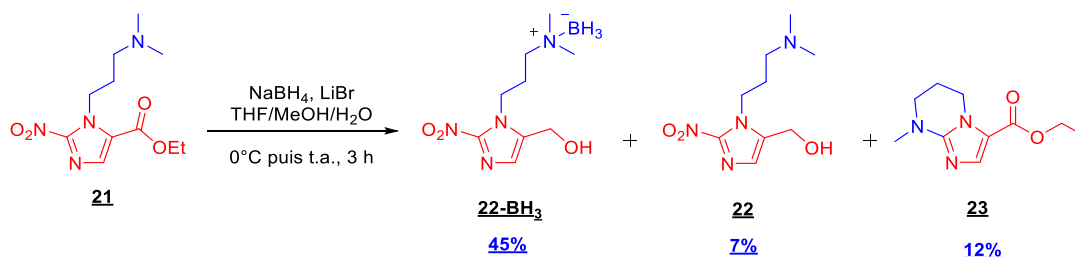


Schéma 34 : Produits obtenus lors de la réaction de réduction de l'ester **21**

A ce stade, deux options s'offraient à nous : soit trouver une méthode alternative de réduction ne mettant pas en jeu le borohydrure, soit tenter de libérer l'amine tertiaire par échange de ligands ou dégradation du complexe. Dans la littérature, diverses conditions acides³³⁸⁻³⁴¹, basiques^{342,343} ou neutres^{336,344,345} sont décrites pour rompre de tels complexes de bore. Certaines d'entre elles ont été évaluées sur **22-BH₃**. Le résultat de ces études est résumé dans le Tableau 20 suivant:

Résultats et discussion

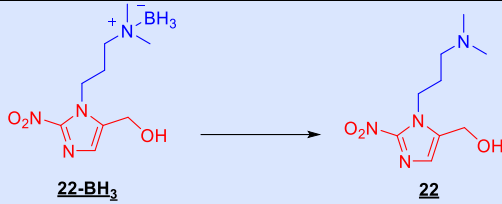
				
Conditions	Réactif	Temps	Température	Observation
1 [†]	Solution aqueuse saturée de NH ₄ Cl/THF (50/50, v/v) (adapté de Breneman <i>et al.</i>) ³⁴⁶	24 h	t.a.	Aucune formation de produit de dissociation du complexe en CCM : complexe de bore stable dans ces conditions
2 [†]	AcOH (2M dans l'eau)/EtOH (50/50, v/v) (adapté de Choi S. <i>et al.</i>) ³⁴¹	18 h	t.a.	Aucune formation de produit de dissociation du complexe en CCM : complexe de bore stable dans ces conditions
3 [†]	HCl (1M)/THF (1/5, v/v) (adapté de Brown <i>et al.</i> et de Donello <i>et al.</i>) ^{340,347}	18 h	t.a.	L'analyse du spectre RMN ¹ H montre une proportion de 50/50 entre la forme chlorhydrate et le complexe. La réaction ne semble plus évoluer d'après le contrôle par CCM.
4 [‡]	K ₂ CO ₃ , EtOH ³⁴³	15 h	reflux	Le mélange noircit après 30 min de chauffage. Rendement de 40%
5 [‡]	EtOH ^{336,342}	4 h	reflux	Produit obtenu sous la forme d'une huile orange. Rendement de 49%

Tableau 20 : Conditions testées pour dissocier le complexe **22-BH₃**
[†]essai réalisé sur le produit pur ; [‡]essai réalisé sur le brut réactionnel après extraction

- L'utilisation d'acides faibles tels que le chlorure d'ammonium ou l'acide acétique ne permet pas de dissocier le complexe. Toutefois en présence d'un acide fort, l'acide chlorhydrique, une déprotection partielle de l'alcool **22** à hauteur de 50% a été observée d'après l'analyse du spectre RMN ¹H.
- L'utilisation de carbonate de potassium dans l'éthanol a conduit, après chauffage à reflux du brut réactionnel obtenu après réduction, à la formation du produit **22**, isolé après purification avec un rendement de 40%. En l'absence de base, le rendement est légèrement amélioré (soit 49%).

Pour conclure, les conditions optimales retenues pour la dissociation du complexe amine-borane de l'alcool **22-BH₃** sont les conditions 5 à savoir l'utilisation d'éthanol à reflux durant 4 heures. Après purification par chromatographie sur colonne, ces conditions ont permis l'obtention de l'alcool **22** avec un rendement de 49% sur deux étapes (réduction et dissociation du complexe).

En résumé, le synthon clé **22** a été obtenu selon une séquence réactionnelle en huit étapes à partir de la 3-(*N,N*-diméthylamino)propylamine avec un rendement global de 3%. Ce rendement est plus faible que celui obtenu pour son analogue *N*-méthylé **12** en utilisant la même voie de synthèse (*i.e.* 13%) en raison notamment des difficultés rencontrées lors de la cyclisation de Marckwald puis de la réduction de la fonction ester.

Résultats et discussion

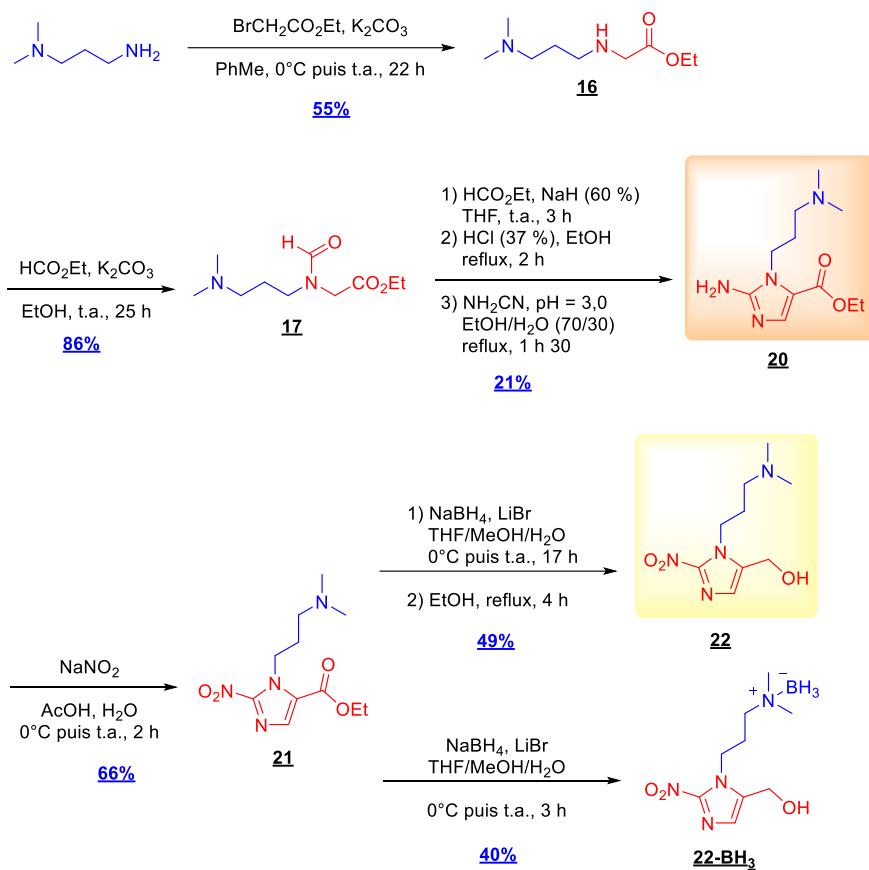


Schéma 35 : Séquence réactionnelle globale mise en œuvre pour l'obtention du composé **22** depuis la 3-(N,N-diméthylamino)propylamine

Résultats et discussion

VI. Synthèse des prodrogues avec le vecteur en position N-1 de l'imidazole

La synthèse des phosphorodiamidates **26**, **27** et **29** à partir de l'alcool **22** et des moutardes phosphorodiamidiques **1**, **2** et **3** selon les méthodes choisies précédemment au terme de l'étude bibliographique (voir paragraphe 0) et qui sont rappelées Schéma 3, p84 vont maintenant être présentées.

A. Synthèse du phosphorodiamidate **26**

Pour la synthèse du phosphorodiamidate **26**, possédant une moutarde de type cyclophosphamide, la méthode de phosphorylation mise en œuvre s'appuie sur les travaux de Matteucci *et al*²⁸⁹ et correspond à celle utilisée pour la synthèse du hit **ICF05016** au départ du dichlorure d'acide phosphoramidique **1**. Elle consiste à additionner de façon séquentielle à l'alcool, déprotoné au préalable par action d'une base lithiée, un équivalent de dichlorure d'acide phosphoramidique **1**, suivi par l'addition de deux équivalents de l'amine correspondante (Schéma 36).

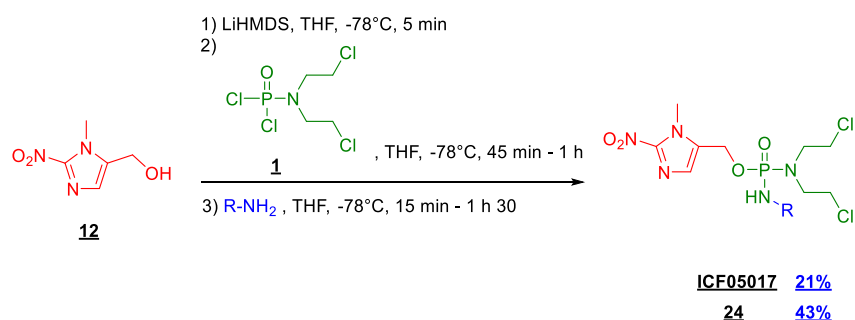


Schéma 36 : Réaction de phosphorylation de l'alcool **12** pour obtenir les phosphorodiamidates **ICF05017** et **24** (précurseur du hit **ICF05016**)

Des conditions réactionnelles identiques ont été mise en œuvre avec l'alcool **22** en vue de l'obtention du phosphorodiamidate **26** (Schéma 37).

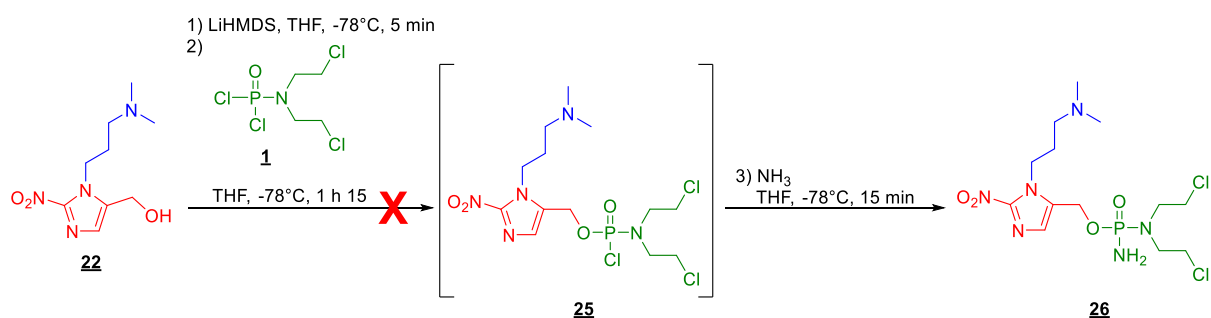


Schéma 37 : Réaction de phosphorylation de l'alcool **22** pour obtenir le phosphorodiamidate **26**

La cinétique de cette réaction de couplage a été suivie par RMN ³¹P afin d'optimiser notamment le temps de réaction entre chaque addition. Lors du premier essai de couplage de l'alcool **22** et du dichlorure d'acide phosphorodiamidique **1**, aucune consommation de ce dernier n'a été constatée soit par analyse des spectres RMN ³¹P (Figure 81) soit sur plaque CCM après 4 heures 30 de réaction à -78 °C.

Résultats et discussion

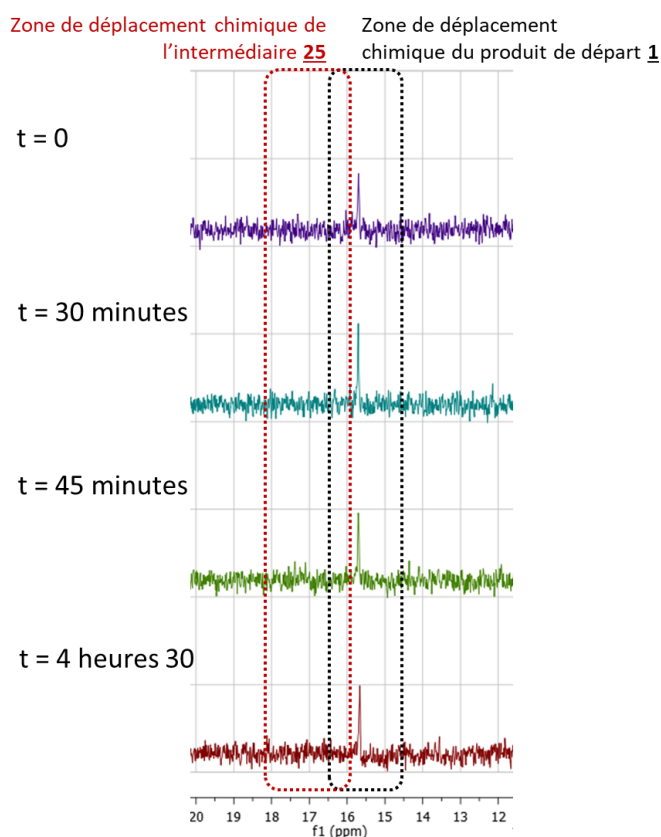


Figure 81 : Suivi cinétique par RMN ^{31}P de la réaction de couplage pour l'obtention du phosphorodiamidate **26** (Spectres réalisés à partir d'un prélèvement du milieu réactionnel dilué dans le THF anhydre)

La cinétique de cette réaction est bien connue au laboratoire au départ de l'alcool **12** où les temps de réaction étaient généralement inférieurs à 1 heure. La présence de la fonction amine tertiaire, et plus particulièrement du doublet non liant de l'azote, semble donc compromettre la formation et/ou la réactivité de l'alcoolate lithié. Dans le but de vérifier cette hypothèse, la réaction de couplage a été testée avec le complexe **22-BH₃** sachant, d'après la littérature, que ce type de complexe semble stable en présence de bases fortes telles que le *n*-butyllithium³³⁶ (Schéma 38).

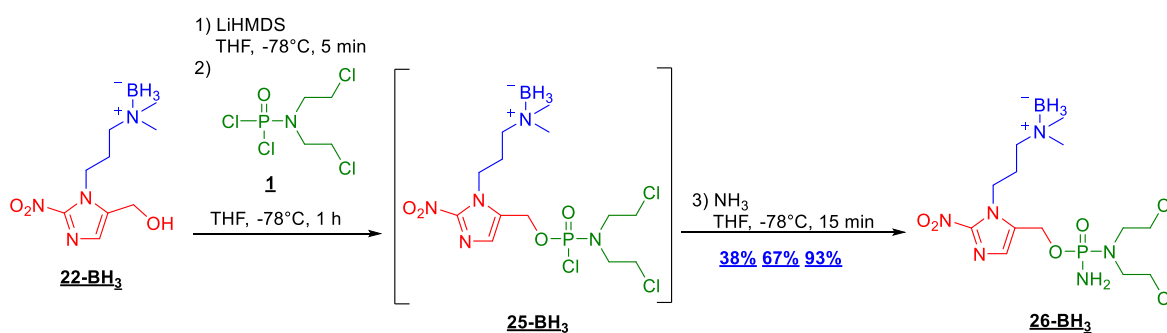


Schéma 38 : Synthèse du phosphorodiamidate **26-BH₃** à partir du complexe de bore **22-BH₃**

Le suivi de la réaction par RMN ^{31}P (Figure 82) a clairement indiqué une rapide consommation du réactif dichloré **1** (signal à 15,71 ppm) au profit de la formation d'un nouveau composé phosphoré (signal à 15,90 ppm) qui pouvait correspondre à l'intermédiaire **25-BH₃**. Après une heure et traitement du milieu réactionnel par un courant d'ammoniac, ce composé a été lui-même entièrement consommé au profit d'un second produit phosphoré (signal à 18,40 ppm).

Résultats et discussion

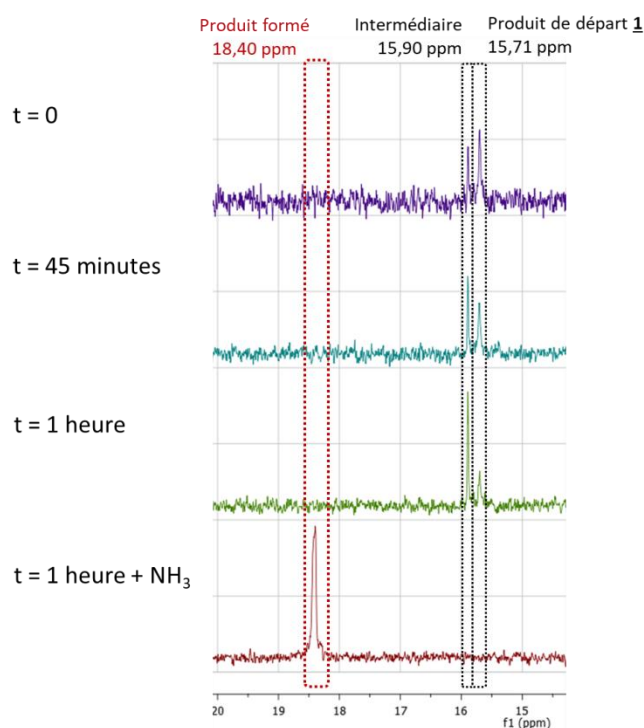


Figure 82 : Suivi cinétique par RMN ^{31}P de la réaction de couplage pour l'obtention du phosphorodiamidate **26-BH₃** (Spectres réalisés à partir d'un prélèvement du milieu réactionnel dilué dans le THF anhydre)

Le produit **26-BH₃** a été obtenu après chromatographie sur colonne avec des rendements oscillants entre 38 et 93% ($n = 3$). A noter que le rendement moyen (66%) est supérieur à celui obtenu pour la synthèse du précurseur de la molécule hit **ICF05016** (48%)³³⁰.

B. Synthèse du phosphorodiamidate **27**

Dans le but de valider le fait que la présence d'une amine tertiaire limite les réactions de phosphorylation, un essai de synthèse du composé **27** a été réalisé avec l'alcool **22** et le dérivé **2** selon la méthode décrite par Duan *et al.*²⁹⁴ (voir Tableau 13, méthode 3.A, p81) (Schéma 39).

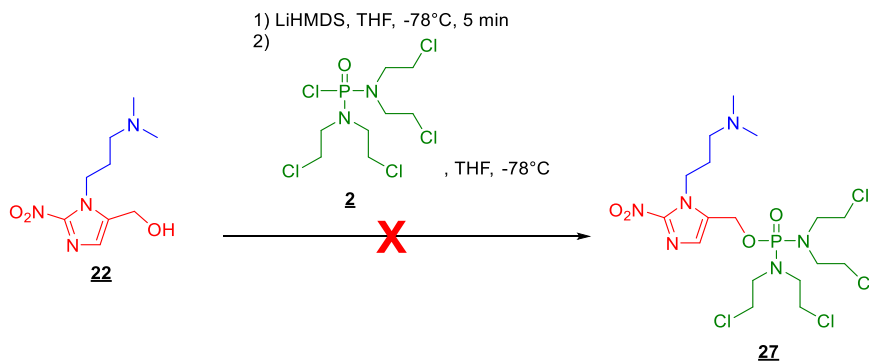


Schéma 39 : Réaction de phosphorylation de l'alcool **22** en phosphorodiamidate **27**

Résultats et discussion

Le temps de réaction n'étant pas précisé dans la publication, le suivi cinétique a été réalisé par RMN ^{31}P (Figure 83). Un signal à 17 ppm apparaissait dès 30 minutes dans la zone de déplacement chimique attendue au détriment de celui du dérivé phosphoré de départ **2** (signal à 25 ppm). Pour activer la réaction, le milieu réactionnel a subi une remontée progressive en température et des contrôles RMN ^{31}P réguliers ont été réalisés. Après 4 heures de réaction, le composé de départ **2** a été quasiment consommé. Ne constatant plus aucune évolution de la réaction après 6 heures d'agitation, cette dernière a été stoppée.

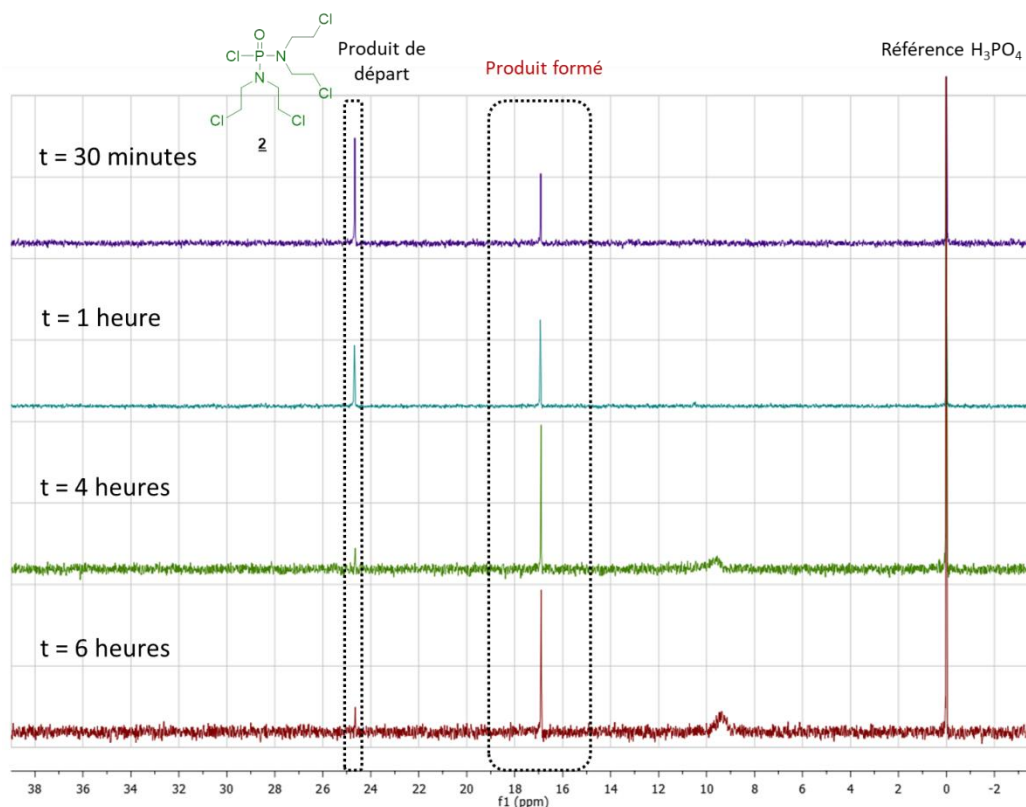
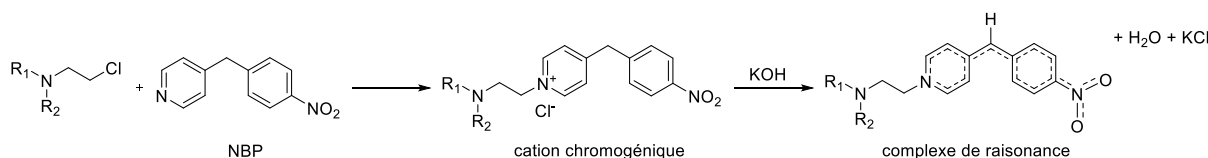


Figure 83 : Suivi cinétique par RMN ^{31}P de la réaction de phosphorylation donnant accès au phosphorodiamidate **27** (Spectres réalisés à partir d'un prélèvement du milieu réactionnel dilué dans le THF anhydre)

L'analyse de la CCM du brut réactionnel indiquait la formation d'un produit majoritaire révélant à l'UV et à la 4-(4'-nitrobenzyl)pyridine (NBP)* et susceptible de correspondre au produit **27** comportant une partie imidazole, visible à l'UV, et des chaînes chlorées alkylantes, révélées par la NBP. Toutefois après filtration du milieu réactionnel, évaporation du filtrat, et purification sur colonne, seul un produit très polaire révélant uniquement à la NBP a été recueilli. L'analyse du spectre RMN ^1H montre l'absence totale de la partie imidazole. Seuls des signaux entre 4,41-3,11 ppm sont présents qui pourraient correspondre aux protons de chaînes chloroéthyles. L'analyse du

* La NBP est un indicateur coloré des agents alkylants. Ces derniers après révélation par la potasse apparaîtront en bleu-violet profond en raison de la formation d'un complexe de résonance :



Résultats et discussion

spectre RMN ^{31}P montre un déplacement chimique à 26,14 ppm qui ne concorde pas avec le signal à 16,92 ppm pourtant majoritaire avant arrêt de la réaction. Ces données signent une dégradation probable du produit lors du traitement et/ou de la purification. Une analyse par spectrométrie de masse du produit obtenu indique la présence d'un ion chargé $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 330,97 qui pourrait être en accord avec une structure de type diazaphospholidine **28** (valeur théorique $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 333,99) (Figure 84).

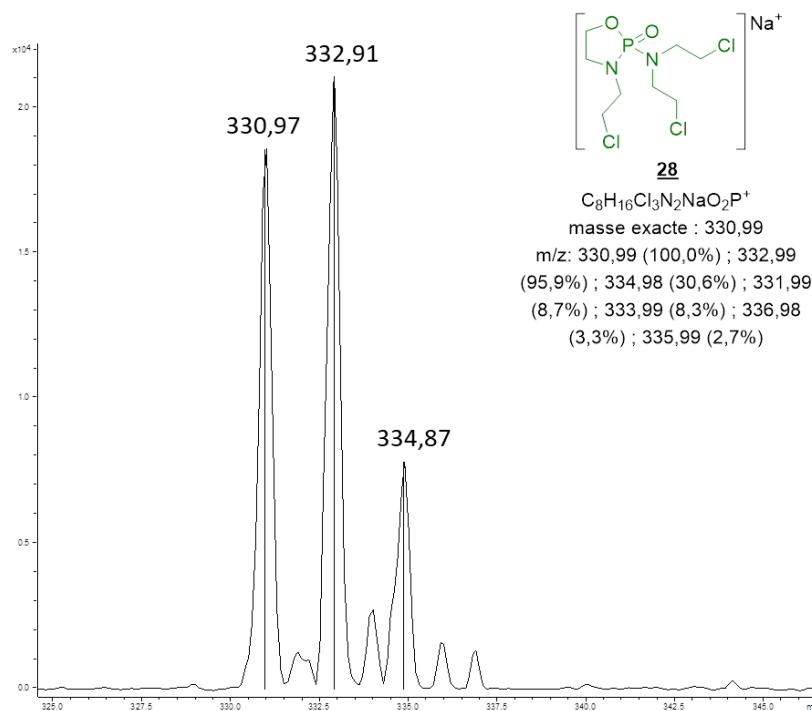
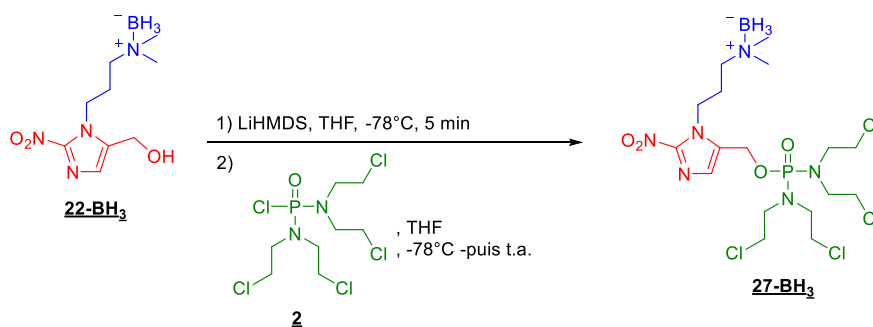


Figure 84 : Extrait du spectre de masse du produit obtenu après purification du composé **27**

L'utilisation du dérivé complexé du composé **22-BH₃** s'est donc imposée pour former ce phosphorodiamidate **27**. La réaction est donc réalisée dans les mêmes conditions que décrites précédemment mais à partir du complexe **22-BH₃** (Schéma 40) avec un suivi par RMN ^{31}P (Figure 85). La cinétique semblait très lente à -78 °C comme observé après analyse du spectre RMN réalisé à 30 minutes, donnant un ratio produit/réactif de 88/12. Le milieu a été porté à température ambiante et laissé sous agitation. Après 3 heures 30, la conversion en produit atteint 75%. Le mélange a été laissé sous agitation à température ambiante durant 24 heures aux termes desquelles la conversion semblait totale (l'excès de 0,1 équivalent de composé **2** étant toujours présent).

Résultats et discussion



75%

Schéma 40 : Réaction de phosphorylation de l'alcool **22-BH₃** en phosphorodiamidate **27-BH₃**

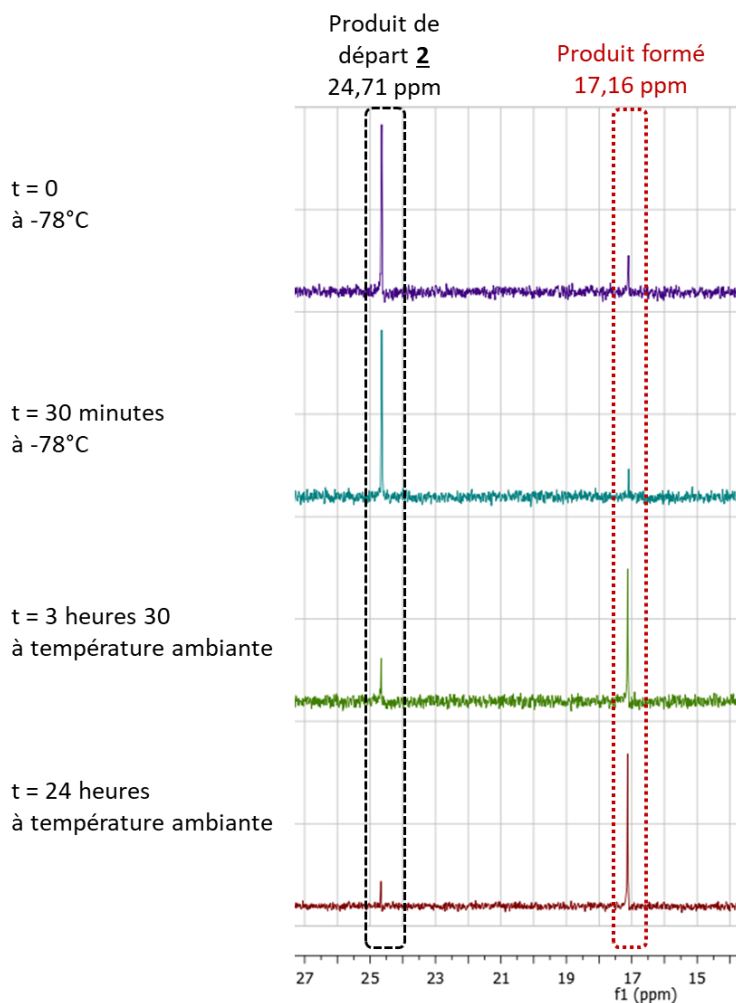


Figure 85 : Suivi cinétique par RMN ³¹P de la réaction de phosphorylation du complexe **22-BH₃** à partir du composé **2** (Spectres réalisés à partir d'un prélèvement du milieu réactionnel dilué dans le THF anhydre)

Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le produit **27-BH₃** a été obtenu avec un rendement de 75 ± 6% (n = 3) largement supérieur à ceux décrits dans la littérature à partir du (1-*N*-méthyl-2-nitroimidazol-5-yl)méthanol **12** (Tableau 13, p81, méthode 2.A 20%²⁹⁴, 2.D 7%²⁹³ ; méthode 3.A 47%²⁹⁴).

Résultats et discussion

C. Synthèse du phosphorodiamidate **29**

D'après l'étude bibliographique nous avons choisi de réaliser la synthèse du phosphorodiamidate **29** selon la réaction de Mitsunobu entre l'alcool **22** et l'acide **3** (Schéma 41). Cette réaction mettant en jeu un acide phosphorodiamidique, l'amine tertiaire sera protonée, ce qui devrait limiter son rôle lors de la réaction de Mitsunobu. De plus, de telles synthèses ont été réalisées dans la littérature avec succès en présence d'amines tertiaires^{348,349}.

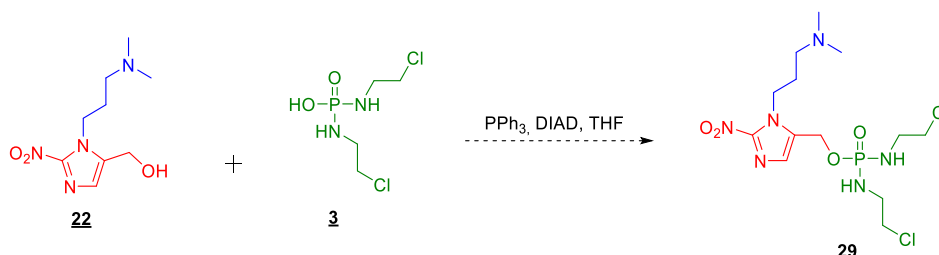


Schéma 41 : Réaction de Mitsunobu envisagée entre l'alcool **22** et l'acide **3** pour l'obtention du phosphorodiamidate **29**

La réaction de Mitsunobu permet de former, dans la majorité des cas, une liaison simple carbone-hétéroatome (oxygène, azote ou soufre)³⁵⁰. Elle met toujours en jeu un alcool, une phosphine, un azodicarboxylate d'alkyle et un nucléophile relativement acide ($pK_a < 11-12$), tel qu'un acide carboxylique ou thiocarboxylique, un phénol ou thiophénol, un amide ou encore des oximes, des sulfonamides ou des acides phosphorodiamidiques.

Le mécanisme de cette réaction (Schéma 42) est initié par l'attaque de la phosphine sur le composé diazoïque formant un adduit zwitterionique. La bétaine ayant un pK_a de 13, se protone en présence du pronucléophile, libérant ensuite sa base conjuguée et l'intermédiaire phosphonium. Pour mener à bien cette étape, la bétaine doit donc être plus basique que le pronucléophile qui doit avoir un pK_a inférieur ou égal à 11³⁵⁰. Le phosphonium étant particulièrement oxophile, l'alcool va attaquer sa lacune électronique conduisant à son activation sous la forme d'un sel d'oxyphosphonium et à la libération concomitante d'une hydrazine issue de la réduction du composé diazoïque de départ. L'intermédiaire oxyphosphonium formé est un excellent groupe partant qui va conduire, après attaque par S_N2 du nucléophile, à la libération du produit substitué et à la formation d'oxyde de trialkylphosphine. La double liaison oxygène phosphore étant une des plus fortes que le phosphore peut créer vis-à-vis d'un autre élément (540 kJ.mol^{-1})³⁵¹, la formation de cet oxyde est donc la force motrice de cette réaction.

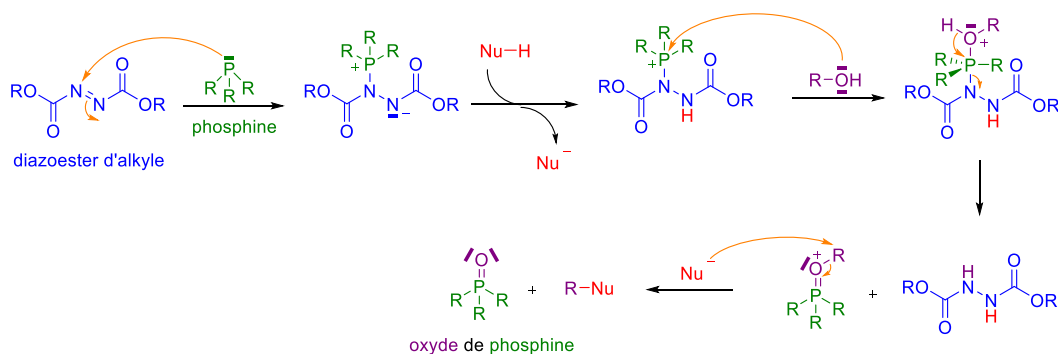


Schéma 42 : Mécanisme de la réaction de Mitsunobu

Résultats et discussion

Afin d'appréhender cette réaction de Mitsunobu, nous avons choisi de réaliser un essai préliminaire au départ de l'alcool **12** en présence de triphénylphosphine et d'azodicarboxylate d'isopropyle (DIAD), pour former le phosphorodiamidate **30** déjà décrit dans la littérature²⁹⁴. L'acide **3** a été produit et engagé directement en réaction dans les conditions de la littérature décrites précédemment Tableau 14 (méthode 7.B) en diminuant toutefois de 2 à 1,2 le nombre d'équivalents des réactifs par rapport à l'acide **3**. Après une heure d'agitation à température ambiante, l'analyse de la CCM montrait que la triphénylphosphine (TPP) semblait avoir été entièrement consommée, bien que de l'alcool de départ **12** était toujours présent. Le brut a été évaporé et purifié par chromatographie pour donner le phosphorodiamidate **30** avec un rendement de 60%, proche de celui de la littérature (63%)²⁹⁴ et ce, malgré la réduction des quantités de réactifs engagés (Schéma 43).

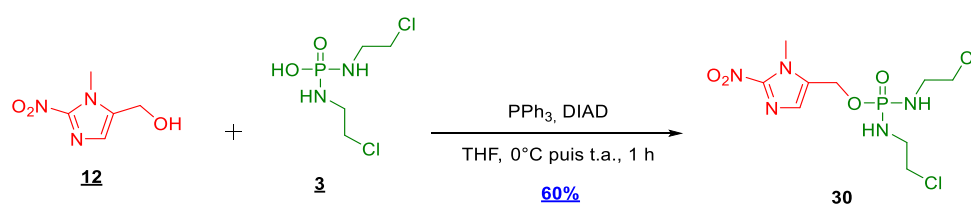


Schéma 43 : Conditions utilisées au laboratoire pour la formation du phosphorodiamidate **30** par la réaction de Mitsunobu à partir de l'acide **3**

Fort de ces résultats prometteurs, nous avons appliqué ces conditions réactionnelles à l'alcool **22**. Après une heure de réaction à température ambiante, le suivi par CCM indique que la TPP est entièrement consommée tandis qu'aucun produit ne semblait s'être formé à l'exception de l'oxyde de triphénylphosphine (TPPO). Deux heures plus tard, la CCM était identique. Le brut a alors été évaporé à sec et purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un éluant contenant de la TEA. Seul l'alcool **22** a été isolé à hauteur de 65% de la masse engagée.

Face à cet échec, nous avons choisi d'engager en réaction le complexe **22-BH₃** dans les mêmes conditions que décrites précédemment (Schéma 44).

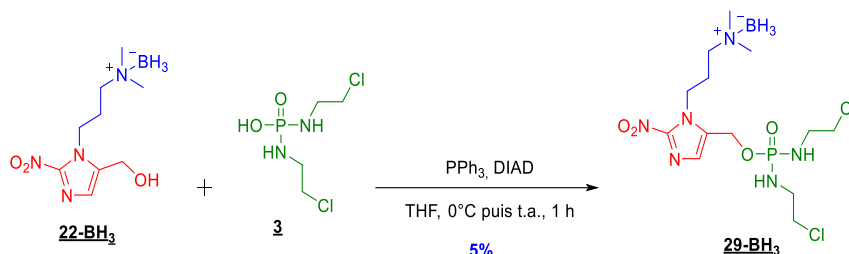


Schéma 44 : Réaction de Mitsunobu envisagée entre l'alcool **22-BH₃** et l'acide **3** pour conduire au phosphorodiamidate **29-BH₃**

Après une heure de réaction, la CCM indique la présence du produit de départ **22-BH₃**, de la TPP à l'état de traces et d'un produit révélant à la fois à l'UV et à la NBP et pouvant être le produit

Résultats et discussion

d'intérêt. Le milieu a été évaporé et une purification par chromatographie sur gel de silice a permis d'isoler l'alcool de départ **22-BH₃** (76%) et le phosphorodiamidate **29-BH₃** attendu mais avec un rendement faible de 5%. Cet alcool **22-BH₃** semble donc moins réactif que l'analogue méthylé **12** lorsqu'il est engagé dans une réaction de Mitsunobu.

Il est toutefois important de noter que deux problèmes récurrents entre chaque manipulation ont été constatés à savoir d'une part, la faible solubilité de l'acide phosphorodiamidique **3** dans le THF et d'autre part, sa faible stabilité. En effet, l'analyse du spectre RMN ³¹P d'une solution d'acide **3** dans le THF ne conduit pas comme attendu, à un signal à 14,17 ppm²⁹⁴, mais à deux signaux très élargis à 13,51 ppm et 8,56 ppm. Le profil de ces spectres était très variable en fonction des différents lots d'acides produits. Ces observations laissent penser que la qualité de l'acide engagé lors des divers essais était variable, expliquant les problèmes de reproductibilité rencontrés. Le rendement faible de formation du composé **29-BH₃** ne serait donc pas uniquement du à la faible réactivité de l'alcool **22-BH₃** de départ mais également à la pureté et la solubilité de l'acide **3** engagé. Aussi, l'accès au phosphorodiamidate **29** par cette voie a été abandonné.

Nous avons alors opté pour une nouvelle voie de synthèse, adaptée de celle mise en œuvre pour accéder au composé **5** (Tableau 14, méthode 6, p82). Celle-ci consiste à traiter l'alcool imidazolique approprié par l'oxychlorure de phosphore en présence d'une base à -78 °C, puis à traiter le dichlorure de phosphoryle intermédiaire par deux équivalents de chloroéthylamine.

Les premiers essais ont d'abord été réalisés avec l'amine complexée **22-BH₃** qui semble conduire à de meilleurs résultats que la forme non protégée, l'objectif étant ensuite de transposer ces résultats à la synthèse du composé **49**. Les essais de réaction ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles décrites pour le dérivé **5** en modulant uniquement la nature du solvant (*i.e.* THF ou DCM) et de la base (*i.e.* TEA ou DMAP). En résumé, une solution d'oxychlorure de phosphore dans le solvant approprié est refroidie à -78 °C avant addition goutte à goutte d'une solution d'alcool **22-BH₃** et de base. Après une heure, deux équivalents d'amine chlorée sous forme chlorhydrate sont additionnés, suivi par l'ajout d'un excès de base. La température de la réaction est ensuite remontée lentement de -78 °C à température ambiante. Le récapitulatif de ces essais de phosphorylation est résumé dans le Tableau 21.

Résultats et discussion

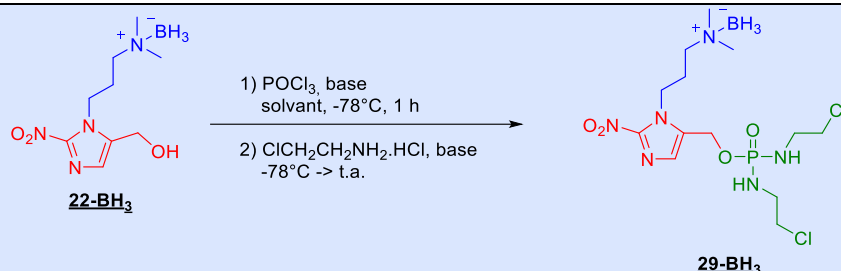
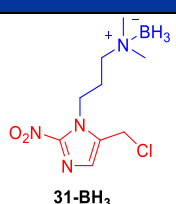
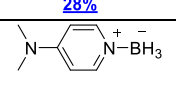
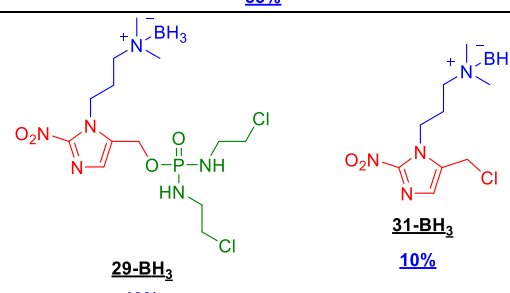
			
Solvant	Base	Temps de réaction après addition de l'amine	Produit(s) obtenu(s)
THF	TEA	14 h	 31-BH₃ 28%
THF	DMAP	23 h	 DMAP-BH₃ 55%
DCM	TEA	21 h	 29-BH₃ 48% and 31-BH₃ 10%

Tableau 21 : Récapitulatif des différentes conditions de phosphorylation évaluées pour l'obtention du composé **29-BH₃**

L'utilisation de la **TEA** et de **THF** conduit uniquement à la formation du dérivé chloré **31-BH₃** (28%). L'oxychlorure de phosphore étant communément employé comme agent de chloration, il n'est pas toutefois pas surprenant d'obtenir ce type de produit en fin de réaction. L'analyse du spectre RMN ¹³C (Figure 86) permet d'observer un glissement vers les champs forts du signal relatif au carbone C-4 après chloration (33,93 ppm versus 54,65 ppm pour l'alcool). L'analyse du spectre de masse confirme cette hypothèse avec la présence de l'ion chargé [M+Na]⁺ m/z 283,06 (valeur théorique [M+H]⁺ m/z 283,11).

Résultats et discussion

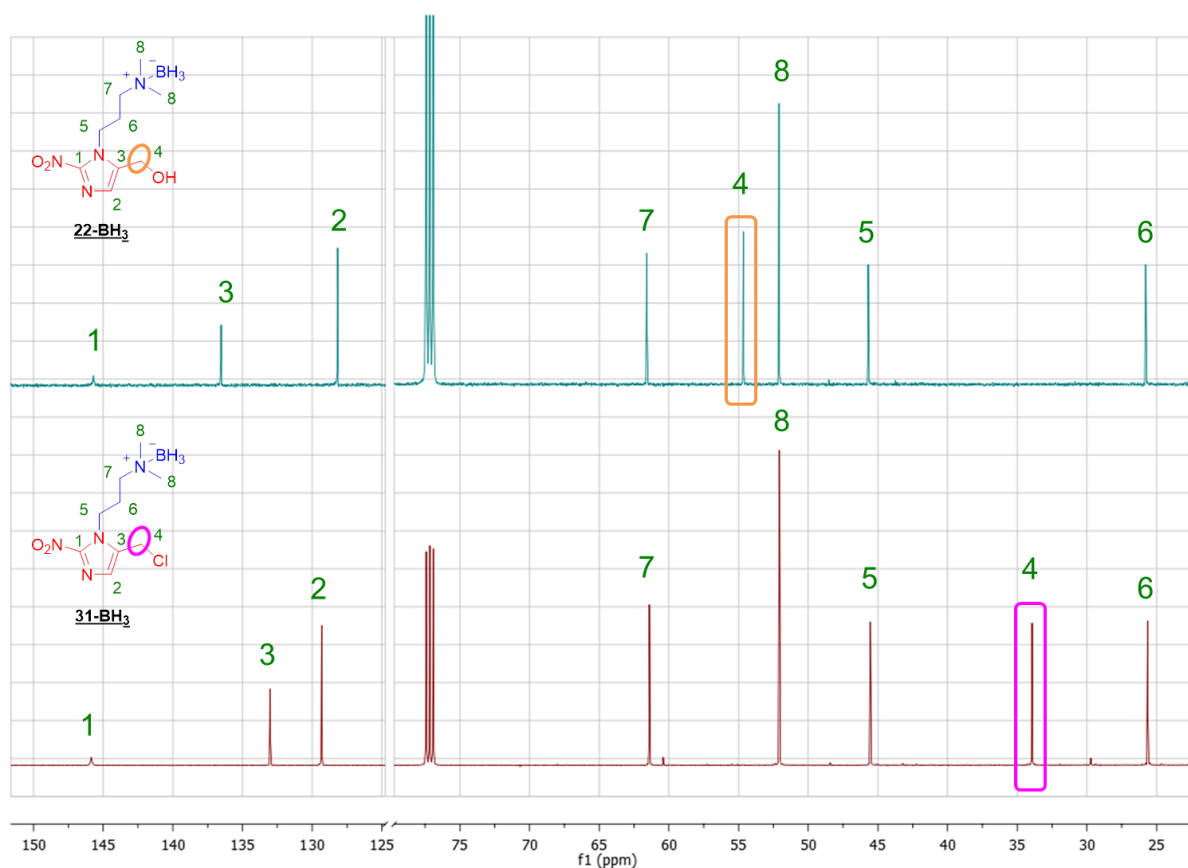


Figure 86 : Comparaison des spectres RMN ^{13}C (CDCl_3 , 126 MHz) de l'alcool **22-BH₃** et de son dérivé chloré

Le remplacement de la **TEA** par la **DMAP**, toujours dans le THF a conduit par échange de ligands à la formation d'un nouveau complexe entre le borane et la DMAP (55%). L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C n'a toutefois pas permis de déterminer précisément sur quel atome d'azote le bore était complexé. Après cristallisation par évaporation lente dans le DCM et caractérisation par DRX, nous pouvons affirmer que ce nouveau complexe est formé par liaison covalente de coordination entre l'azote pyridinique et le borane (Figure 87). La DMAP conduisant à une transchélation du composé **22-BH₃**, cette base est à proscrire pour la formation du phosphorodiamidate **29-BH₃**.

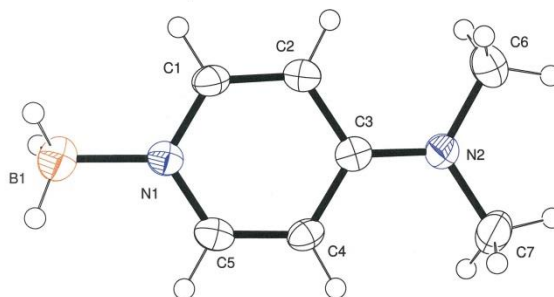


Figure 87 : Structure cristallographique du complexe **DMAP-BH₃**
Les ellipsoïdes sont représentés au seuil de probabilité de 50%

Résultats et discussion

Enfin en présence de TEA et de DCM, le phosphorodiamidate **29-BH₃** a été obtenu avec un rendement de 48% (Tableau 21). Cette réaction s'accompagne de la formation minoritaire du produit chloré précédemment détecté (10%) ainsi que d'un second sous-produit, non visible à l'UV mais révélant uniquement à la NBP. Ce dernier n'a pu être isolé seul mais uniquement en mélange avec le phosphorodiamidate **29-BH₃**. Cette impureté possède un déplacement chimique en RMN ³¹P de 14,98 ppm et l'analyse RMN ¹H indique la présence de massifs attribuables à des protons de chaînes 2-chloroéthylamines. Après analyse par HRMS, un signal à m/z 282,0089 suggère que ce composé résulte de la triple addition de l'amine sur l'oxychlorure de phosphore (**32**) (valeur théorique m/z 282,0091) (Figure 88).

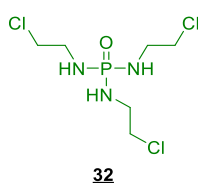


Figure 88 : Structure proposée du sous-produit phosphoré **32** obtenu lors de la phosphorylation par l'oxychlorure de phosphore du composé **29-BH₃**

En conclusion, l'utilisation de DCM et de TEA sont donc les meilleures conditions pour l'obtention du dérivé **29-BH₃**. La synthèse de ce phosphorodiamidate sous sa forme non protégée à partir de l'alcool **22** n'a pas été tentée compte tenu d'une part de son insolubilité dans le DCM et des problèmes de dégradation ou d'absence de réactivité rencontrés jusqu'ici avec les amines tertiaires libres.

Afin de comparer cette approche non publiée pour synthétiser TH-302 avec ses autres voies d'accès décrites dans la littérature, ces conditions ont été appliquées à l'alcool **12** en présence de bromhydrate de la bromoéthylamine (Schéma 45). Cette méthode conduit au TH-302 avec un rendement de 32%, inférieur aux rendements obtenus *via* la réaction de Mitsunobu dans la littérature^{118,289,294,298} (Tableau 14, méthode 7.A, 47%-62%), mais supérieur à celui décrit par Zhang *et al.*²⁹³ (Tableau 14, méthode 5.A, 12%). A noter que pour ce dernier protocole l'ordre d'addition des réactifs a été inversé à savoir : ajout des amines puis de l'alcool à la solution d'oxychlorure de phosphore.

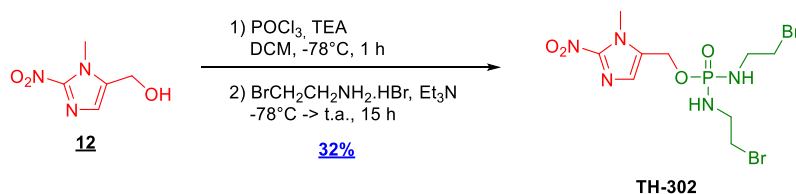


Schéma 45 : Synthèse du TH-302 par la méthode de phosphorylation à l'oxychlorure de phosphore

Les différentes voies d'accès aux phosphorodiamidates **26-BH₃**, **27-BH₃** et **29-BH₃** isolés sous forme de complexe sont résumées Schéma 46.

Résultats et discussion

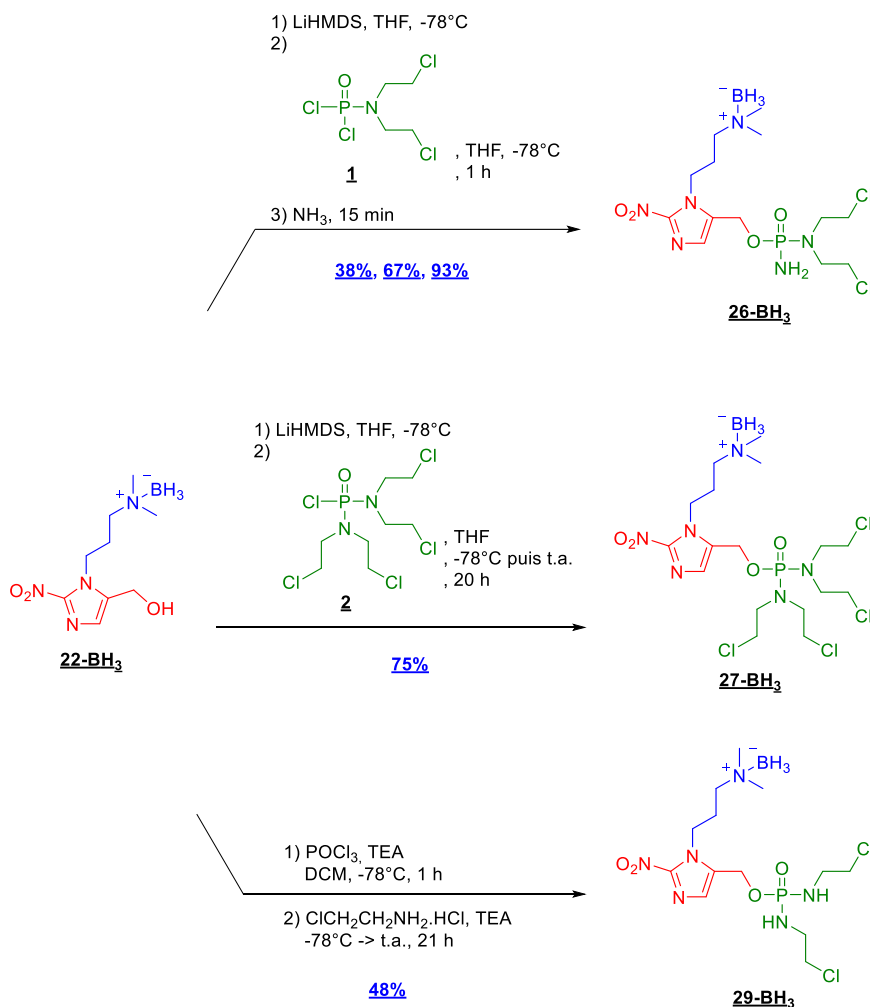


Schéma 46 : Séquence réactionnelle globale mise en œuvre pour l'obtention des phosphorodiamidates **26-BH₃**, **27-BH₃** et **29-BH₃**

D. Éléments de déterminations structurales

La caractérisation structurale des phosphorodiamidates **26-BH₃**, **27-BH₃** et **29-BH₃** s'appuie notamment sur l'étude des spectres RMN ¹H, ¹³C et ³¹P (Figure 89) :

- Un doublet à 5-5,10 ppm intégrant pour 2 protons sur le spectre RMN ¹H et un doublet à 55-56 ppm sur le spectre RMN ¹³C, caractéristiques du méthylène CH₂-8 couplant avec l'atome de phosphore (³J_{H,P} de l'ordre de 7-8 Hz et ²J_{C-P} ≈ 4 Hz).
- Ces couplages avec le phosphore sont également visibles pour les chaînes chloroéthyles (C-9 pour **26-BH₃** et **27-BH₃**; C-10 pour le composé **29-BH₃**) sur le spectre RMN ¹³C avec une constante de couplage ³J_{C-P} de 5 Hz, ainsi que pour le carbone quaternaire C-3 de l'imidazole, donnant un doublet à 132 ppm avec une constante de couplage ³J_{C-P} de 8-9 Hz.
- Un singulet entre 15 et 17,5 ppm en RMN ³¹P.
- Des bandes sur le spectre IR à 2381, 2318 et 2273 cm⁻¹ caractéristiques de la vibration de valence des liaisons B-H du complexe de bore toujours présent sur la molécule.
- Un ion [M-H]⁺ en HRMS résultant probablement de la perte d'un hydrure du complexe de bore (par exemple m/z 443,1295 (valeur théorique : m/z 443,1296) pour le composé **29**).

Résultats et discussion

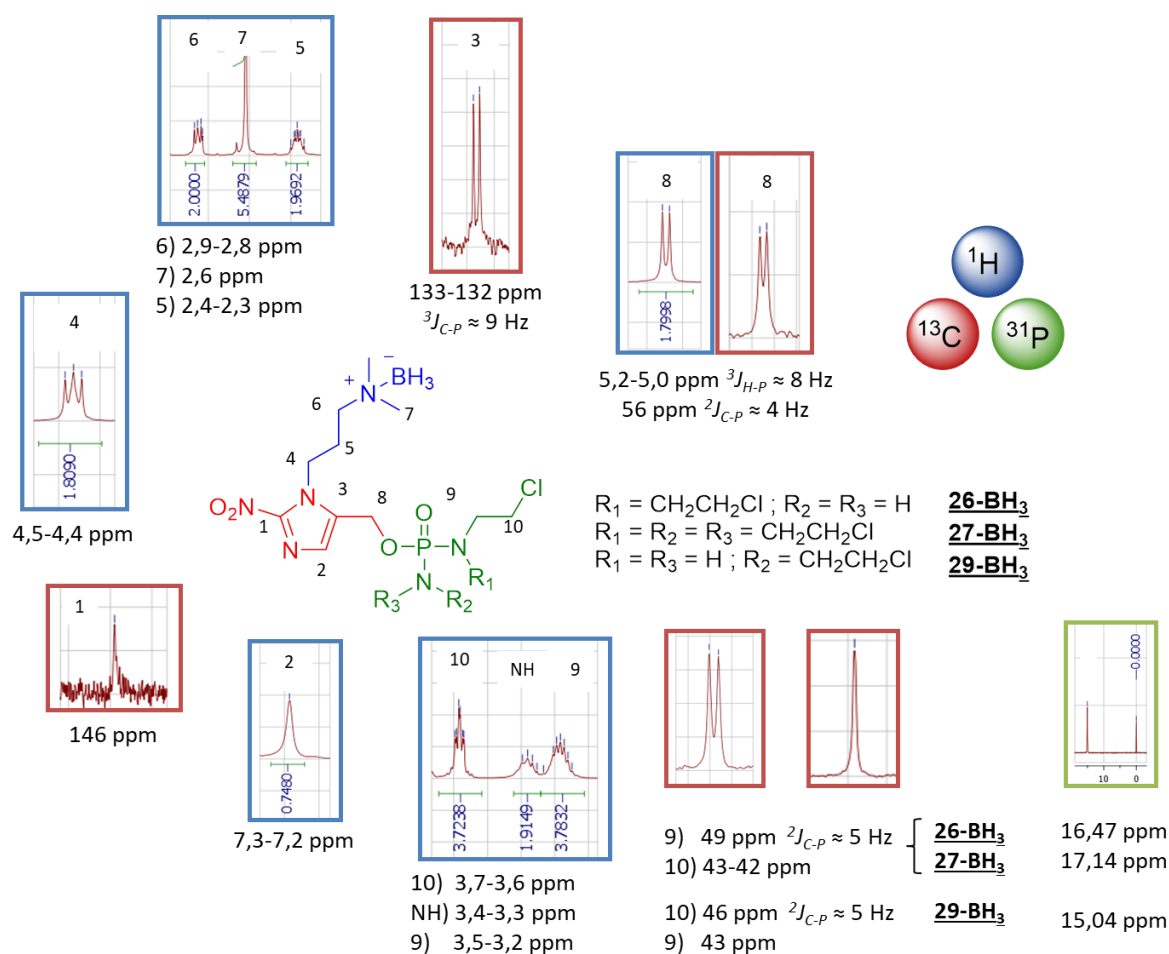


Figure 89 : Caractéristiques spectrales en RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P des composés de la série N-1 (Extrait des spectres RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P du composé $\mathbf{29-BH_3}$)

E. Dissociation des complexes de bore des phosphorodiamidates et quaternisation

Afin de pouvoir réaliser la quaternisation de l'amine tertiaire des phosphorodiamidates $\mathbf{26}$, $\mathbf{27}$ et $\mathbf{29}$, le complexe de bore doit être dissocié. S'appuyant sur les essais de dissociation du complexe réalisés pour le précurseur alcool $\mathbf{22-BH_3}$ et en tenant compte de la fragilité des phosphorodiamidates vis-à-vis de la température, notre choix s'est porté sur un chauffage dans l'éthanol à 50 °C en lieu et place d'un reflux. Malgré cette précaution et confirmant nos craintes, le suivi par CCM de la dissociation du complexe amine-borane du composé $\mathbf{27-BH_3}$ indiquait, à travers l'apparition de tâches révélant uniquement à la NBP, une dégradation du réactif ou du produit formé dès une heure de réaction, dégradation confirmée en RMN ^{31}P par l'apparition d'un signal à 27,46 ppm (Figure 90).

Résultats et discussion

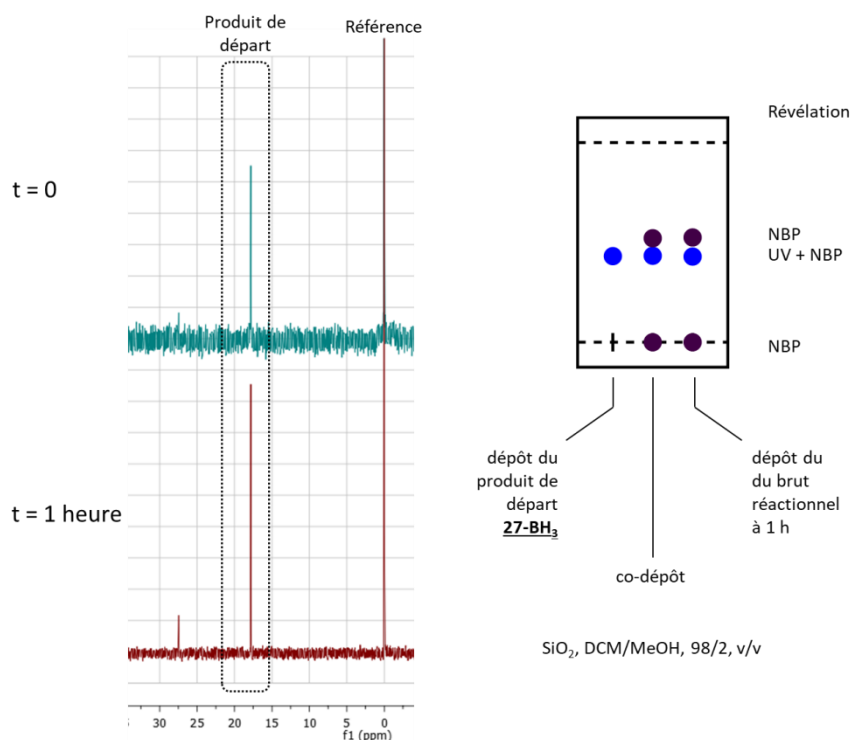


Figure 90 : Suivi cinétique par RMN ^{31}P de la réaction de déprotection du composé **27-BH₃** dans l'éthanol à 50 °C

Ces conditions ne semblant pas optimales, un milieu acide alcoolique a alors été évalué. La déprotection a été réalisée dans un mélange équi-volumique d'éthanol et d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 M à température ambiante durant 2 jours (Schéma 47).

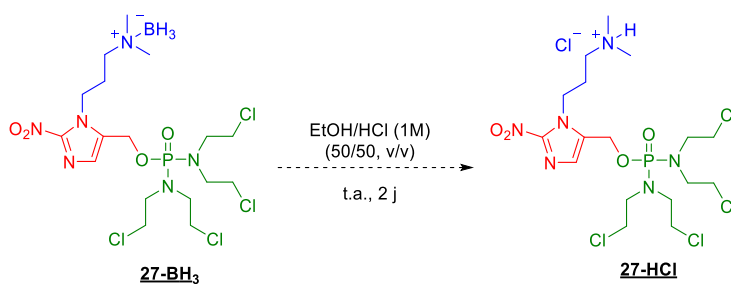


Schéma 47 : Essai de dissociation du complexe **27-BH₃** en milieu acide

Après 48 heures de réaction, l'analyse CCM indiquait la consommation totale du réactif au profit de deux nouveaux produits plus polaires révélant à l'UV et à la NBP. Le milieu a été évaporé à sec puis une analyse RMN ^{31}P a été réalisée (Figure 91) : un signal à 17,84 ppm était présent à 65%, pouvant correspondre au produit formé, parmi d'autres produits phosphorés issus sans doute d'une dégradation du produit. L'analyse HRMS du brut réactionnel a confirmé la présence du produit **27** sous sa forme non complexée et d'une impureté, la bis(2-chloroéthyl)amine, provenant de l'hydrolyse du phosphorodiamidate.

Résultats et discussion

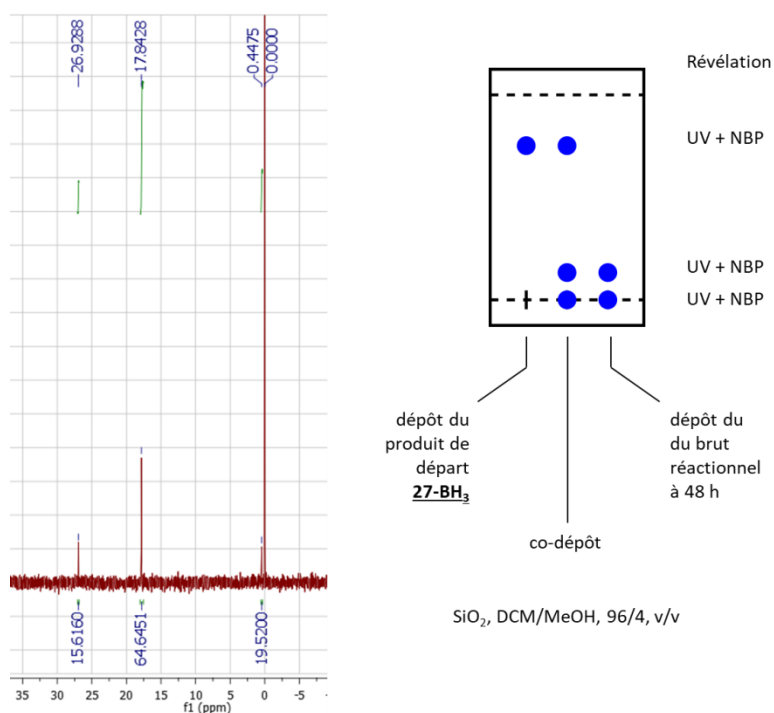


Figure 91 : Spectre RMN ^{31}P après dissociation en milieu acide du complexe **27-BH₃**

Ces mêmes conditions ont été appliquées au phosphorodiamidate **26-BH₃**. Le suivi CCM indiquait après 24 heures d'agitation que le complexe n'était pas entièrement consommé, une solution aqueuse d'acide chlorhydrique plus concentrée (5 M) a alors été additionnée. Après 2 heures, le composé **26-BH₃** ayant totalement disparu en CCM, le milieu a été évaporé à sec. Une analyse RMN ^{31}P du brut réactionnel a révélé la présence à plus de 80% de produits phosphorés ayant un déplacement dans la zone des phosphates inorganiques sans présence d'un signal dans la zone attendue (*i.e.* vers 17 ppm), signe de la dégradation totale du phosphorodiamidate **26**.

L'analyse du spectre RMN ^1H (Figure 92) du brut réactionnel a confirmé cette hypothèse avec l'absence des signaux entre 3,66 et 3,38 ppm, relatifs aux groupements méthylènes de la moutarde. Par ailleurs, la présence de doublets à 5,17 ($J = 7,7$ Hz) et 5,15 ppm ($J = 7,6$ Hz), semblant indiquer le couplage entre des protons méthyléniques H-2 et un phosphore, signe la présence de deux produits organophosphorés possédant la structure imidazolique du composé **22**. Cette hypothèse est confortée par la présence de deux singulets à 7,30 et 7,29 ppm caractéristiques du proton aromatique H-1, des multiplets relatifs à la chaîne propylique ou encore un singulet à 2,94 ppm caractéristique des méthyles H-6, avec une fonction diméthylamine sous forme protonée. En plus de ces sous-produits, on note également la présence de deux triplets à 3,95 ($J = 5,9$ Hz) et 3,53 ppm ($J = 5,9$ Hz) pouvant correspondre aux signaux de la bis(2-chloroéthylamine) sous sa forme protonée, issue de l'hydrolyse du phosphorodiamidate.

Globalement ces résultats indiquaient la présence d'au moins deux produits organophosphorés ayant des structures proches de l'imidazole **22** mais ne comportant pas de chaînes chloroéthyles. Nous avons alors envisagé la formation de deux produits dérivés du composé **22** où la fonction alcool se trouverait soit sous la forme d'un groupement phosphate, soit sous la forme d'un groupement phosphoramidate (Schéma 48). Toutefois leur identification n'a pas été possible par spectrométrie de masse ou seul le signal relatif à la bis(2-chloroéthyl)amine était visible.

Résultats et discussion

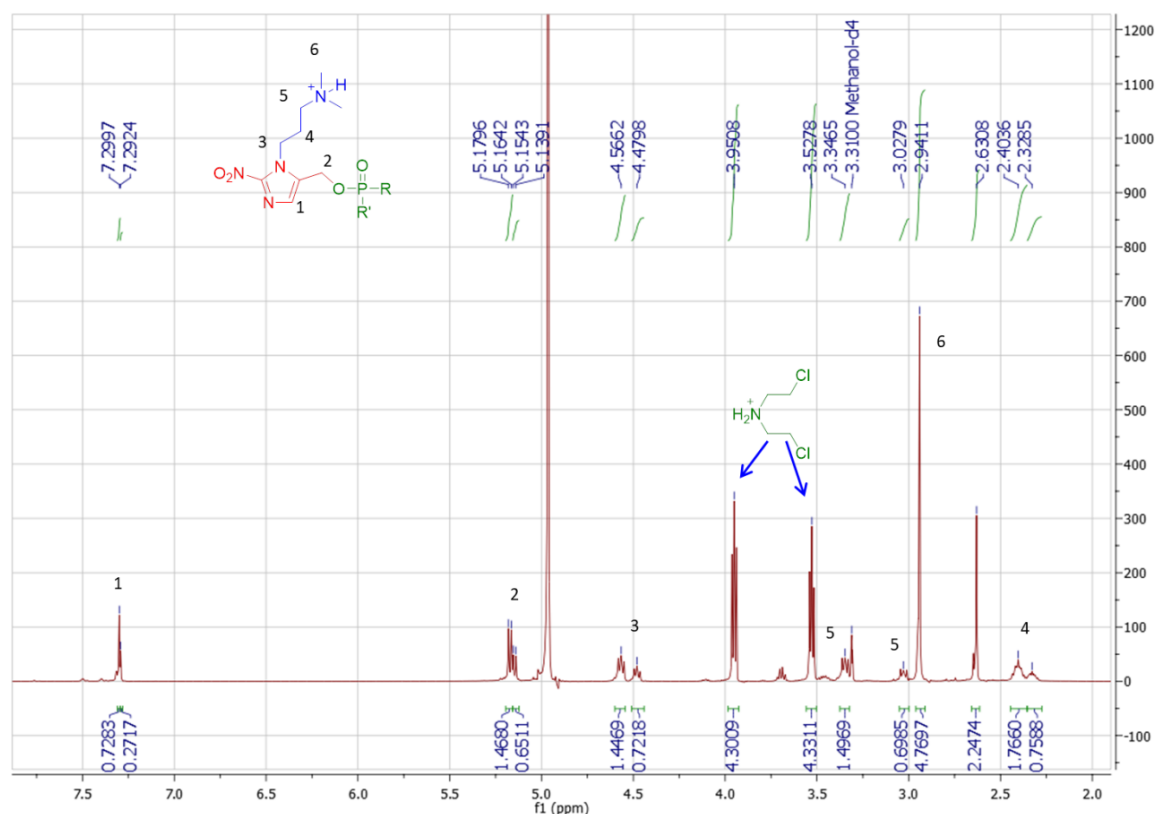


Figure 92 : Spectre RMN ^1H du brut réactionnel résultant de l'hydrolyse acide du composé **26-BH₃**

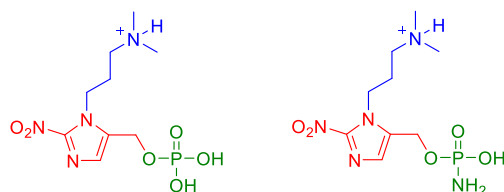


Schéma 48 : Structure proposée des produits de dégradation issus de l'hydrolyse acide du composé **26-BH₃**

Ces conditions de déprotection en milieu acide semblent donc conduire à l'hydrolyse du phosphorodiamidate **26**. Une autre alternative a dû être trouvée dans des conditions plus douces. Comme énoncé précédemment, lors des essais de phosphorylation de l'alcool **22-BH₃** (p127) en présence de DMAP, un échange de ligand du complexe de bore avait eu lieu. Cette constatation et des données bibliographiques faisant état de ce type de réaction d'« échange de borane » entre complexes de bore et une amine tertiaire tel que le DABCO par chauffage dans le toluène à 40 °C³⁵², nous ont incité à tester ces conditions.

Compte-tenu de la faible solubilité des phosphorodiamidates **26-BH₃**, **27-BH₃** et **29-BH₃** dans le toluène, ce solvant a été remplacé par le THF. De plus, afin d'éviter une éventuelle dégradation des phosphorodiamidates possédant la chaîne amine tertiaire, nous avons choisi de réaliser directement l'étape suivante de quaternisation sans tenter d'isoler l'amine intermédiaire. Un large excès d'iodure de méthyle est utilisé pour tenir compte de la présence de DABCO dans le milieu réactionnel.

Un premier essai avec le phosphorodiamidate **27-BH₃** a été réalisé en présence de DABCO (1,2 équivalent) dans le THF anhydre à 40 °C durant 5 heures et conduit à une réaction totale d'après le contrôle CCM et le spectre RMN ^{31}P . Dans le but de raccourcir ce temps de réaction à moins d'une 1 heure 30, le nombre d'équivalent de DABCO est augmenté d'un facteur 5. Le milieu a ensuite été

Résultats et discussion

refroidi à 0 °C avant l'ajout d'iodure de méthyle. Le refroidissement permet de se prémunir d'une éventuelle alkylation de l'azote en position 3 de l'imidazole³⁵³. La température de la réaction a été remontée de façon progressive à température ambiante. L'agent alkylant ayant un point d'ébullition assez bas (41 °C), cette étape a été réalisée dans un ballon scellé. Après évaporation, le résidu a été purifié sur chromatographie préparative en phase inverse (C18) avec un gradient d'ACN dans l'eau. La détection UV de l'appareil de purification est réglée sur 254 nm et 323 nm. Cette dernière valeur est la longueur d'onde maximale d'absorption de l'imidazole fonctionnalisé en position *N*-1. Les fractions recueillies ont été lyophilisées afin d'éviter une exposition prolongée des ammoniums quaternaires à la chaleur lors de l'évaporation de l'eau et de l'ACN. Suivant ces conditions, le composé **34** est obtenu avec un rendement modeste de 21%.

Cette méthode appliquée aux complexes **26-BH₃** et **29-BH₃** a permis d'accéder aux dérivés ammoniums quaternaires **33** et **35** avec des rendements compris entre 37 et 75% (Schéma 49). D'une manière générale, les phosphorodiamidates intermédiaires sous forme base étant instables, leur dégradation est sûrement responsable des variations de rendement observées.

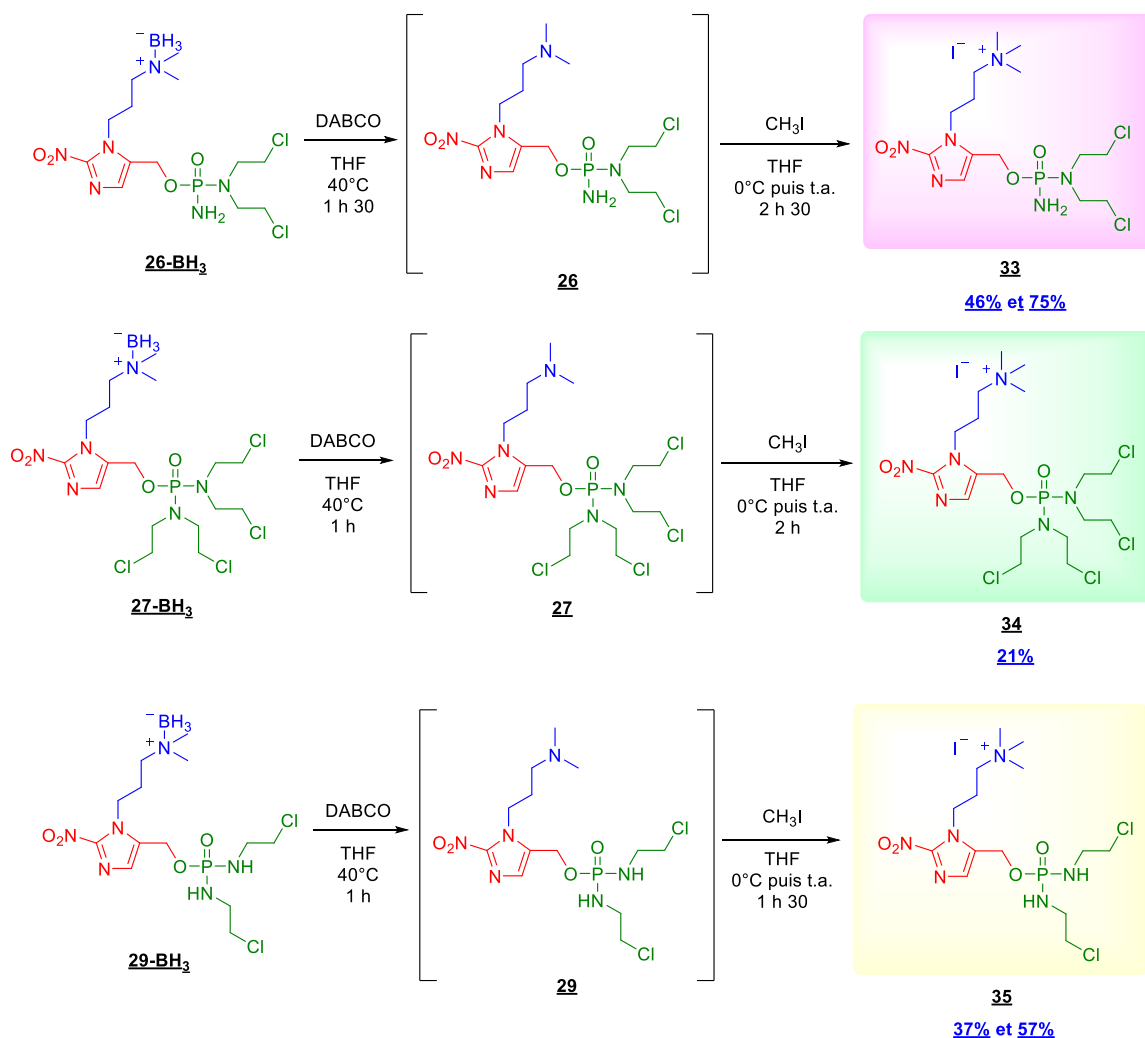


Schéma 49 : Transchélation et quaternisation des composés **26-BH₃**, **27-BH₃** et **29-BH₃** pour conduire respectivement aux produits finaux **33**, **34** et **35**

Les structures des composés **33**, **34** et **35** (Schéma 50) ont été confirmée par spectrométries RMN (¹H, ¹³C et ³¹P), appuyées par des expériences COSY et HSQC, IR et HRMS. Les principales caractéristiques spectrales confirmant la quaternisation sont les suivantes :

Résultats et discussion

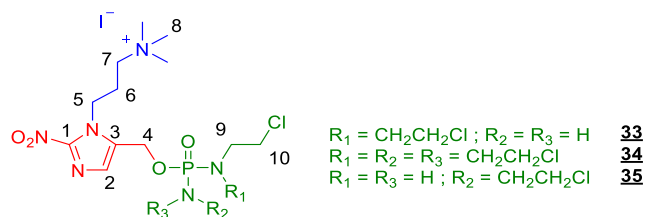


Schéma 50 : Structure générale des composés **33**, **34** et **35**

- En RMN ^1H , l'absence du singulet vers 2,6 ppm intégrant pour 6 protons au profit d'un singulet vers 3,2 ppm intégrant pour 9 protons, caractéristiques des protons méthyliques H-8 de l'ammonium quaternaire.
- Un glissement de 2 à 3 ppm vers les champs faibles en RMN ^{13}C par rapport à l'analogue où l'amine tertiaire est complexée avec le borane des signaux relatifs aux carbones C-7 et C-8

Les trois prodrogues fonctionnalisées en position N-1 **33**, **34** et **35** ont donc été obtenues avec des rendements moyens respectivement de 40%, 16% et 23% à partir du précurseur **22-BH₃**.

VII. Synthèse des prodrogues avec le vecteur en position C-4 de l'imidazole

La synthèse des trois prodrogues envisagées fonctionnalisées en C-4, *i.e.* **46**, **48** et **50**, s'est appuyée sur les méthodes de phosphorylation mises au point en série N-1. Cette approche nécessitait donc au préalable l'obtention du synthon alcool **42** (Schéma 51). Afin d'obtenir ce dernier, il est nécessaire de fonctionnaliser l'hétérocycle en position N-1, C-2, C-4 et C-5. D'après les données bibliographiques (voir chapitre III), il est possible d'accéder à ce type de composé en fonctionnalisant l'alcool **12** dont la synthèse a été préalablement décrite. L'introduction du bras vecteur peut être réalisée grâce à un couplage de Stille mettant en jeu un organostannane et le dérivé bromé **36**, lui-même ayant été synthétisé au départ de l'alcool **12**. Un intermédiaire alcène **38**, issu du couplage de Stille permet d'envisager l'accès à une quatrième prodrogue **44** ayant une double liaison conjuguée avec le cycle aromatique. Cette pharmacomodulation n'a été envisagée que pour la série cyclophosphamide, afin de mesurer l'impact de cette conjugaison sur la cinétique de clivage et sur la cytotoxicité de ce phosphorodiamidate **44** comparativement à son analogue **46**.

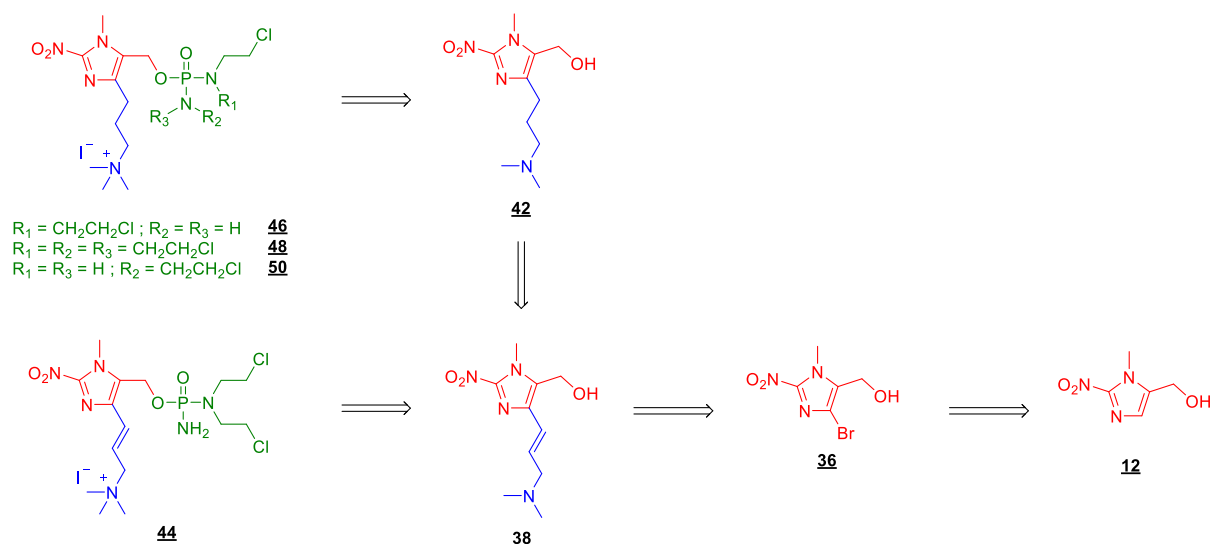


Schéma 51 : Rétrosynthèse envisagée pour accéder aux prodrogues fonctionnalisées en position C-4 de l'imidazole

A. Synthèse de l'alcool 42

1. Réaction de bromation électrophile du composé 12

La première étape de cette séquence réactionnelle consiste en la bromation par voie électrophile de la position 4 de l'imidazole, décrite dans la littérature par Jiao *et al.*⁵⁴ avec un rendement de 87%. Cette réaction a été réalisée au laboratoire suivant le protocole donné dans la littérature exception faite des phases de traitement et de purification (Schéma 52).

Résultats et discussion

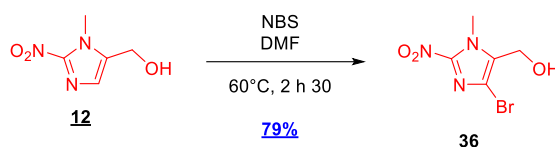


Schéma 52 : Bromation du composé **12**

Après hydrolyse du milieu réactionnel, le produit a été extrait de la phase aqueuse et le brut d'extraction a été précipité dans l'éther diéthylique anhydre pour donner après filtration le produit bromé analytiquement pur, avec un rendement de $64 \pm 7\%$ ($n = 5$), évitant ainsi l'étape de purification par chromatographie décrite dans la littérature. Une autre alternative qui permet d'augmenter le rendement, consistait à réaliser l'hydrolyse en additionnant goutte à goutte le milieu réactionnel dans un grand volume d'eau glacée (6 fois plus grand que le volume de DMF initial) permettant d'amorcer la cristallisation du produit sous la forme d'aiguilles. Après filtration, lavage à l'eau, puis séchage sous vide à 30°C , une première fraction du produit de bromation (environ 60%) a été obtenue. Le filtrat a été saturé en chlorure de sodium et extrait à l'acétate d'éthyle, puis le résidu obtenu après évaporation a été précipité dans l'éther anhydre pour donner une seconde fraction de produit (18%). Cette optimisation a permis d'accéder au bromoalcool **36** avec un bon rendement de $79 \pm 5\%$ ($n = 3$) légèrement inférieur à celui décrit par Jiao *et al.* (87%)³⁵⁴.

2. Réaction de couplage de Stille avec le composé **36**

Dans la littérature, la réaction de couplage de Stille est décrite à partir du composé **36** avec deux organostannanes commerciaux (Schéma 53)³⁵⁴. Compte tenu des rendements obtenus, il semblerait que la réaction fonctionne mieux avec l'organostannane aromatique qu'avec son dérivé vinylique.

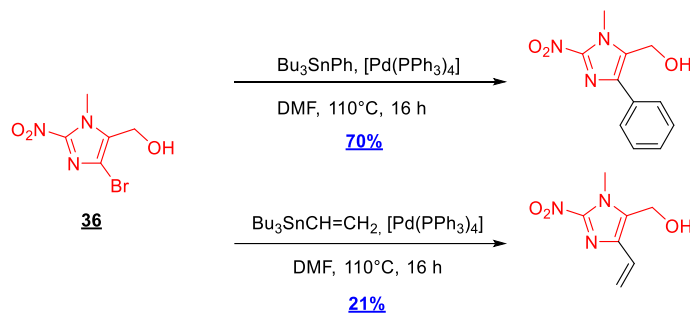


Schéma 53 : Couplages de Stille mettant en jeu le composé **36**

Le composé organostannane **37** n'étant pas commercialisé, il a donc été synthétisé par hydrostannylation radicalaire de la *N,N*-diméthylpropargylamine par l'hydrure de tributylétain (Schéma 54) suivant les conditions décrites dans la littérature pour l'analogue *N,N*-diéthyle³⁵⁵. Le stannane **37** a ainsi été obtenu avec des rendements de 84-85% ($n = 2$), supérieurs à ceux de l'analogue éthylé (*i.e.* 68%).

Résultats et discussion

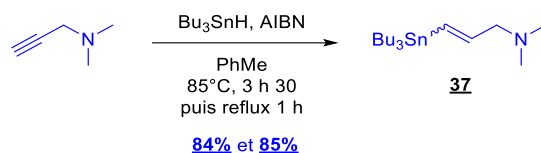


Schéma 54 : Synthèse de l'organostannane **37**

Cette réaction étant non stéréospécifique, les alcènes (*Z*) et (*E*) ont été obtenus. La séparation par chromatographie a été rendue possible par l'utilisation d'un mélange ternaire de solvants à base de cyclohexane / acétate d'éthyle / méthanol. Les deux isomères ayant un rapport frontal très proche, les alcènes (*Z*) et (*E*) ont été isolés seuls à hauteur de 10% et 39% respectivement alors que la fraction correspondant à un mélange (*Z*) / (*E*) avec un ratio 20 / 80 (déterminée par analyse du spectre RMN ^1H) est associée à un rendement de 35% (Figure 93). Sur le spectre de l'isomère (*Z*), le signal du proton H-2 apparaît sous la forme d'un triplet dédoublé à 6,55 ppm avec une constante de couplage $^3J_{\text{H-H cis}}$ H-1-H-2 de 12,6 Hz. Le signal de ce même proton H-2, sur le spectre l'isomère (*E*), apparaît également sous la forme d'un triplet dédoublé mais à 5,97 ppm avec une constante de couplage $^3J_{\text{H-H trans}}$ H-1-H-2 de 18,9 Hz. La présence de l'atome d'étain est visible en RMN ^{13}C à travers les constantes de couplage $^1J_{\text{C-117Sn}} = 328,1$ Hz et $^1J_{\text{C-119Sn}} = 343,3$ Hz du signal relatif aux méthylènes des chaînes butyles liés à l'étain (Figure 94). Pour la synthèse du composé **42**, les deux isomères peuvent être utilisés sachant que la double liaison va être réduite.

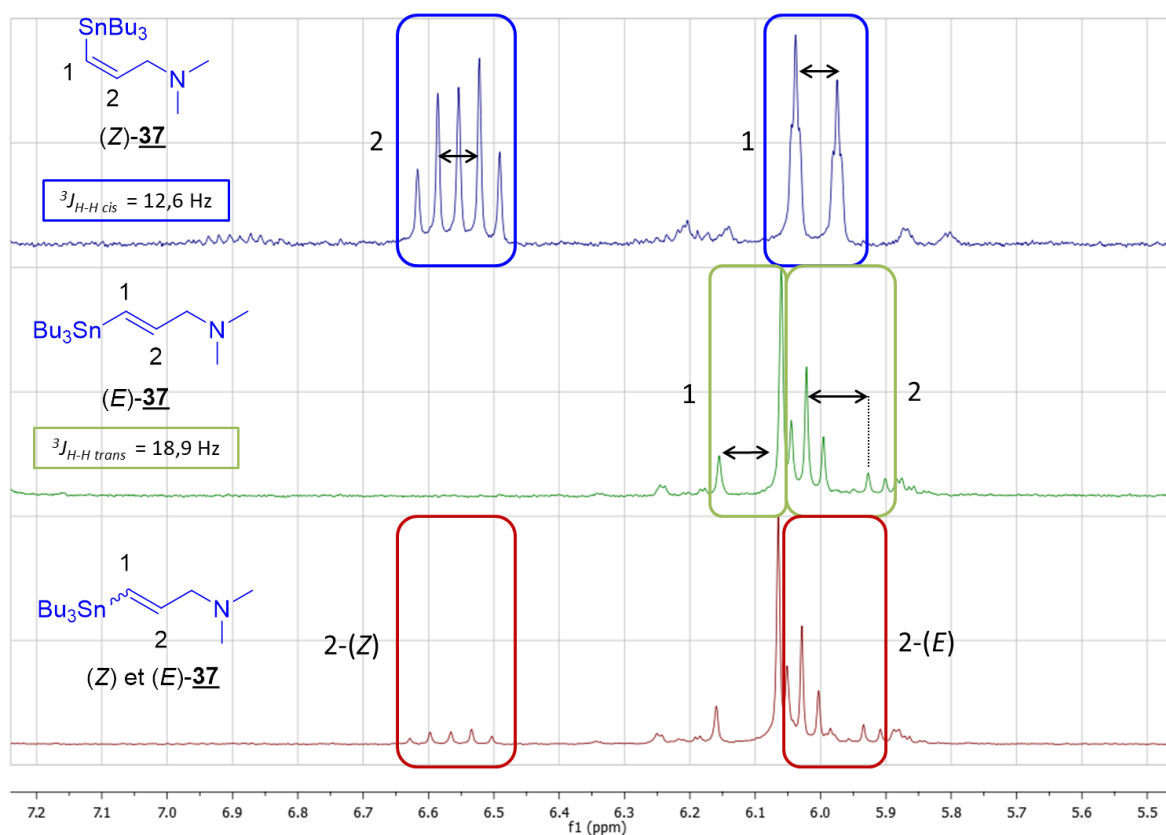


Figure 93 : Agrandissements des spectres RMN ^1H du composé **37** pour l'isomère (*Z*), l'isomère (*E*) et le mélange (*Z*) et (*E*)

Résultats et discussion

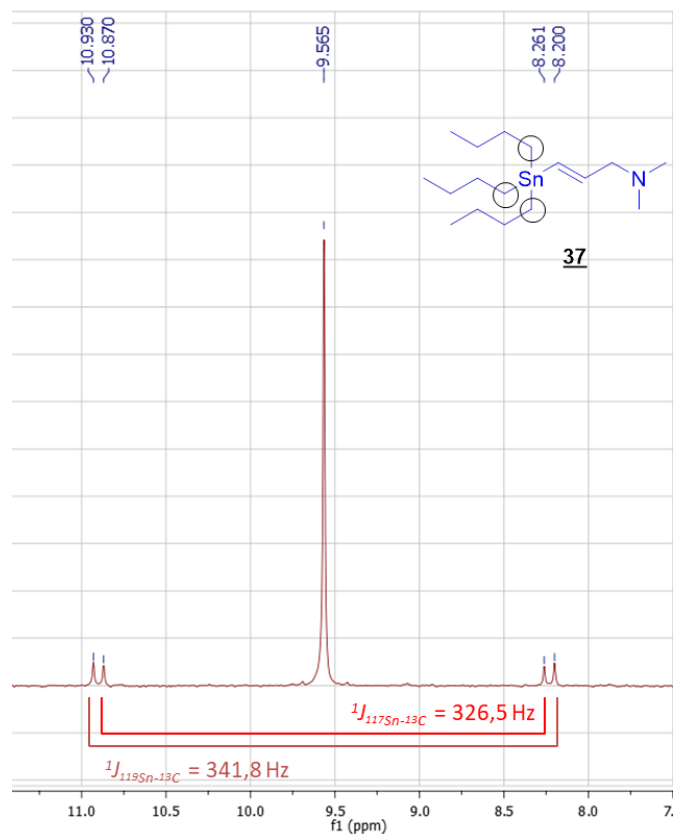


Figure 94 : Agrandissement du spectre RMN ^{13}C du composé **(E)-37**

Le couplage de Stille a été réalisée au départ du composé **36** et de l'isomère (*E*) du composé **37**, dans le DMF anhydre en présence de tétrakis(triphénylphosphine)palladium (0) qui sont les conditions décrites par Jiao *et al.*³⁵⁴. Cette étape est délicate et nécessite un environnement totalement anhydre et inerte. Il est assuré par un dégazage sous vide du milieu réactionnel et par une saturation sous atmosphère d'argon (manipulations réalisées trois fois à chaque ajout de réactif). Un virage de la solution de l'orange au brun signe l'oxydation du palladium et la consommation totale du dérivé bromé de départ **36**, ce qui est confirmé par CCM. Après purification par chromatographie, le composé **38** a été obtenu avec un rendement de 10% et 22% ($n = 2$). Face à ce faible rendement, nous avons décidé de protéger la fonction alcool du composé **36** sous la forme d'un éther silylé.

3. Protection de l'alcool **36**

L'alcool **36** a été silylé par le chlorure de triisopropylsilane en milieu basique et dans du DMF (Schéma 55).

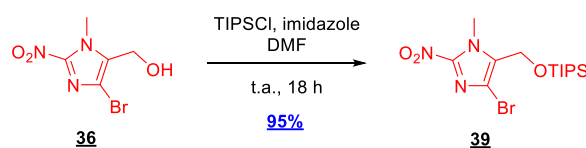


Schéma 55 : Voie de synthèse utilisée pour la silylation de l'alcool **36**

Résultats et discussion

Lors des premiers essais, le traitement suivant a été utilisé : addition d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, extraction par l'acétate d'éthyle puis chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle, 90/10, v/v). Ce traitement a permis d'isoler le produit d'intérêt avec des rendements de 82 et 84 % (n=2).

S'appuyant sur les nouvelles conditions de traitement mises au point pour le composé bromé **36** à savoir une précipitation dans un large volume d'eau suivie d'un séchage sous vide à 30 °C, le composé **39** a été isolé avec un excellent rendement (*i.e.* 95 ± 2%, n = 4). Ces dernières conditions ont donc été privilégiées car elles permettent d'aboutir de façon quantitative et reproductible au dérivé **39** en s'affranchissant d'une purification par chromatographie sur colonne.

4. Réaction de couplage de Stille avec le composé **39**

Le composé bromé protégé **39**, a été couplé dans les conditions décrites précédemment soit avec l'isomère (*E*) seul, soit avec la fraction de mélange des deux isomères de l'organostannane. Malgré divers essais d'optimisation des conditions chromatographiques, la purification du composé **40** a été gênée par la co-élution de l'organostannane **37** en excès avec le produit d'intérêt. Ceci peut expliquer en partie les rendements faibles obtenus (*i.e.* 31 ± 12%, n = 4) (Schéma 56).

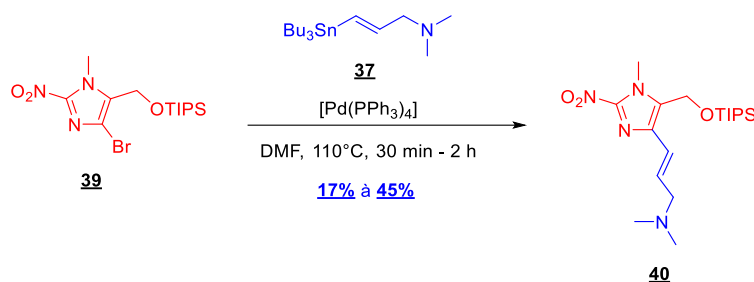


Schéma 56 : Réaction de couplage de Stille entre le dérivé bromé **39** et l'organostannane (*E*)-**37**

De façon surprenante, lorsque la même réaction a été réalisée avec le mélange d'isomère (*Z*) et (*E*) du composé **37** en proportion 40/60, seul l'isomère (*E*) du composé **40** a pu être isolé. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées sur ce résultat :

- L'isomère (*E*) utilisé est celui qui réagit cinétiquement le plus vite des deux isomères. Etant en excès (2 éq.) par rapport au dérivé bromé, et en proportion supérieure dans le mélange d'organostannane, il est le seul à avoir été consommé.
- L'isomère (*Z*) demandant plus d'énergie pour réagir que l'isomère (*E*), la réaction avec ce dernier est donc thermodynamiquement plus favorable.
- L'isomère (*Z*) s'isomérisse sous l'action de la chaleur.

L'utilisation de ce mélange d'isomères a conduit à la formation du composé **40** avec un rendement de 46 ± 11% (n = 6). Ce rendement de couplage est non seulement supérieur à ceux réalisés au laboratoire avec l'organostannane **37** et l'alcool non protégé **36** (*i.e.* 16%) mais également avec le tributylvinylétain et ce même alcool **36** décrit dans la littérature (21%)³⁵⁴.

Résultats et discussion

5. Obtention du dérivé 42

Afin d'obtenir le composé **42** à partir du composé **40**, deux réactions restaient à réaliser : la réduction de l'insaturation et la déprotection de la fonction alcool (Schéma 57). Ces deux voies d'accès ont été développées en parallèle afin de définir la séquence réactionnelle optimale.

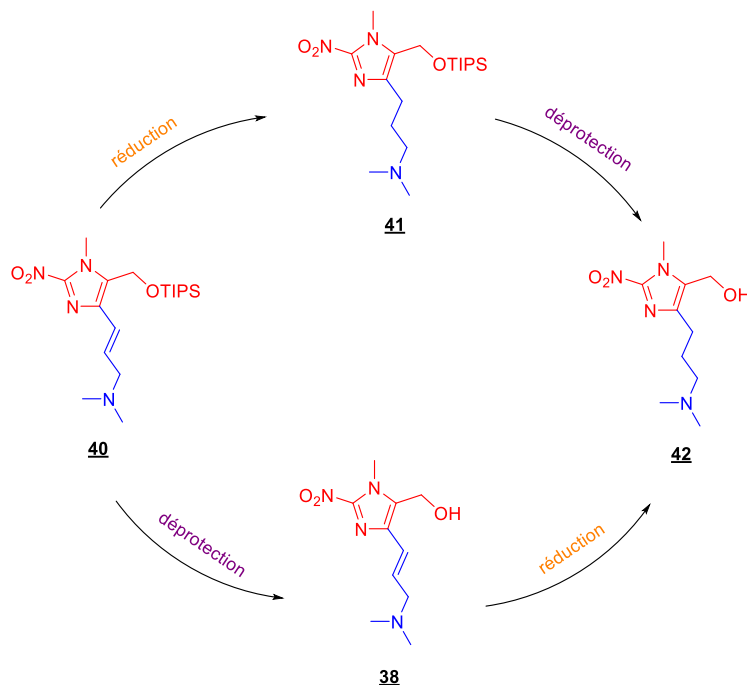


Schéma 57 : Voies d'accès envisagées pour l'obtention du composé **42** à partir du composé **40**

a. Voie 1 : déprotection du composé **40** puis réduction

La déprotection du composé **40** a été effectuée dans le THF en présence de fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) à 0 °C pendant 1 heure 30. Après évaporation du milieu réactionnel, le milieu a été purifié par chromatographie sur colonne et le composé **38** obtenu avec un rendement de $71 \pm 15\%$ ($n = 5$) (Schéma 58).

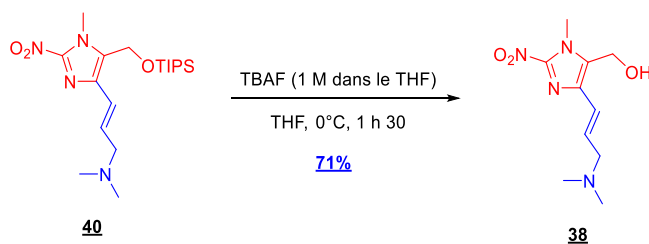


Schéma 58 : Réaction de déprotection du composé **40**

A ce stade nous pouvons conclure sur l'intérêt de protéger la fonction alcool lors du couplage de Stille. En effet, l'alcool **38** a été synthétisé à partir du dérivé bromé **36** en 3 étapes avec un rendement moyen global de 31%, bien supérieur au 16% obtenu par la voie directe à partir de l'alcool **36** (Schéma 59).

Résultats et discussion

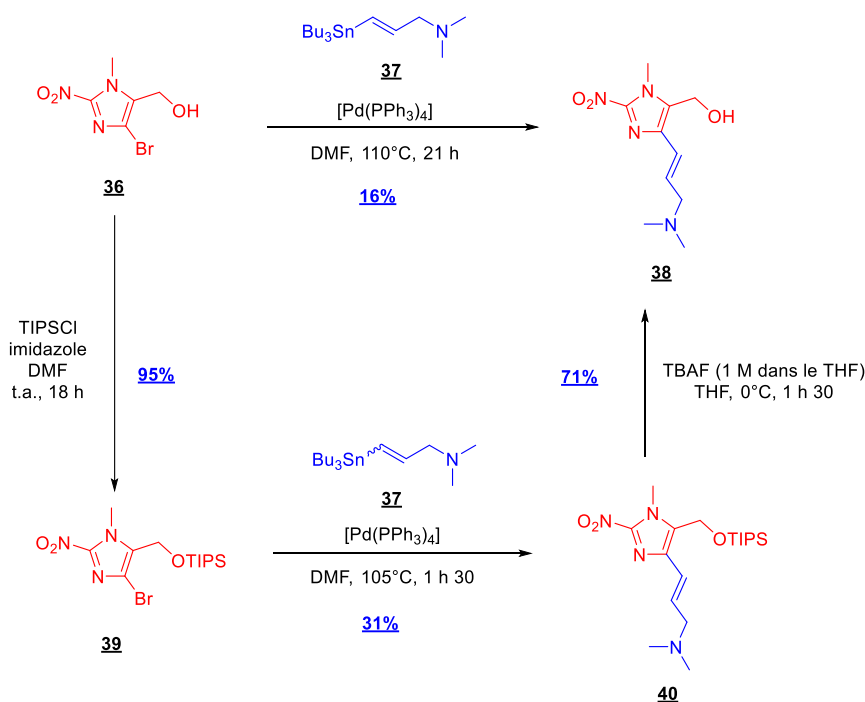


Schéma 59 : Bilan des voies d'accès au composé **38** à partir des composés **36** et **37**

L'utilisation de l'hydrogénation catalytique pour réduire la double liaison du composé **38** est à proscrire du fait de la présence du groupement nitro qui serait réduit en amine. Dans la littérature, deux conditions alternatives ont été décrites pour réduire sélectivement des doubles liaisons portées par un nitroimidazole (Schéma 60) :

- L'utilisation de l'azodicarboxylate de potassium (PADA) en milieu acide assure la réduction du groupement vinyle en position 4 du 2-nitroimidazole précédemment décrit par Jiao *et al.* et ce, de façon quantitative³⁵⁴. Les deux fonctions carboxylates du PADA une fois protonées se décarboxylent produisant le diimide (HN=NH). S'en suit une réaction de cycloaddition sur l'insaturation conduisant à sa réduction et à la libération de diazote (Schéma 61)³⁵⁶.
- L'utilisation de *para*-tosylhydrazine en milieu basique qui permet de réduire un dérivé 5-nitroimidazole substitué en position 2 par un groupement styryle³⁵⁷. Lors de cette réaction, le diimide est cette fois-ci formé *in situ* par déhydrotosylation de la *para*-tosylhydrazine en présence de carbonate de potassium dans la pyridine à 120 °C. Ces conditions plus drastiques conduisent au composé hydrogéné attendu avec un rendement nettement inférieur de 32%.

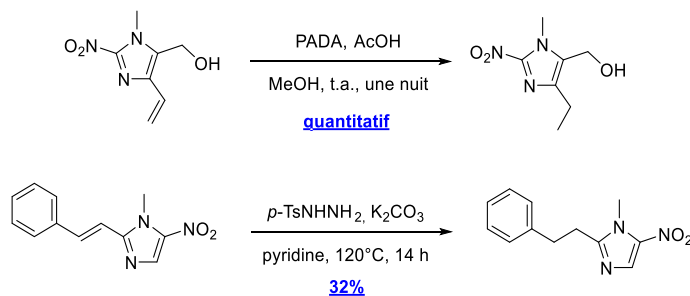


Schéma 60 : Conditions décrites dans la littérature pour l'hydrogénation d'alcènes portés par des nitroimidazoles^{354,357}

Résultats et discussion

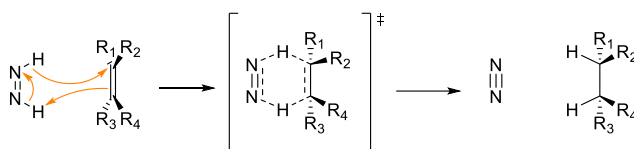


Schéma 61 : Mécanisme de cycloaddition du diimide sur une double liaison³⁵⁶

La première méthode, utilisant des conditions de températures plus douces et permettant l'obtention du produit d'hydrogénation de façon quantitative, a été retenue pour réduire la double liaison du composé **38**. Le PADA a été synthétisé à partir de l'azodicarbonamide en milieu basique selon la procédure décrite par Kraft et ses collaborateurs³⁵⁸. Le composé **38** a été ensuite engagé en réaction comme décrit par Jiao *et al.* en milieu acide avec 5 équivalents de PADA (Schéma 62). Après une heure de réaction, aucune trace du produit **42** n'était visible en CCM. Du PADA a été de nouveau ajouté et après 24 heures d'agitation à température ambiante, aucune réaction n'a été détectée ni par CCM, ni par RMN ¹H. L'alcool de départ a été récupéré de manière quasi quantitative après purification sur colonne de gel de silice. Cette voie d'accès n'est donc pas utilisable avec le composé **38**.

Face à cette absence de réactivité, la deuxième méthode d'hydrogénation a été testée. Le composé **38** a été engagé en réaction avec 5 équivalents de *p*-tosylhydrazine et de carbonate de potassium dans la pyridine à reflux (Schéma 62). Lorsque le solvant commence à refluer, un gaz se dégage du milieu réactionnel et produit une émulsion. Après 3 heures d'agitation, la réaction semblait totale par CCM. La purification de ce composé très polaire a été réalisée sur alumine (support solide basique) pour faciliter son élution. Le rendement obtenu est de 60 ± 12% (n = 6).

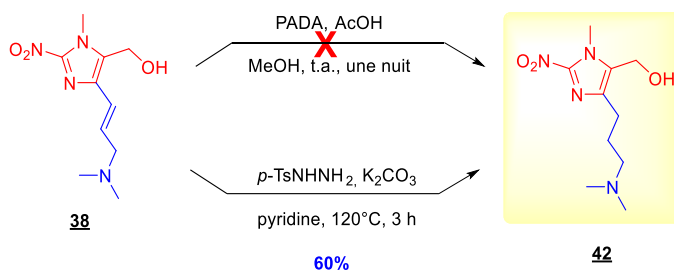


Schéma 62 : Conditions évaluées pour la réduction de la double liaison du composé **38**

b. Voie 2 : réduction du composé **40** puis déprotection

L'autre voie de synthèse consistant à réaliser l'hydrogénation avant la déprotection, a été réalisée sur le dérivé protégé **40** qui a ensuite été déprotégé dans les mêmes conditions que décrites précédemment avec l'utilisation de TBAF (Schéma 63). L'hydrogénation à partir de la *para*-tosylhydrazine a conduit au composé **41** avec un rendement faible de 24%, bien inférieur à celui obtenu précédemment avec le dérivé alcool **38**. De plus, contrairement à l'hydrogénation précédente, des impuretés ayant un rapport frontal proche de celui du composé **41** étaient présentes en CCM. Après purification, la déprotection du silane en présence de fluorure a conduit à l'obtention du dérivé déprotégé **42** avec un rendement de 47% (Schéma 63). Cette stratégie conduisant à un rendement sur deux étapes de seulement 11% a été abandonnée au profit de la séquence réactionnelle précédente enchaînant déprotection puis réduction plus efficace (*i.e.* rendement de 43%).

Résultats et discussion

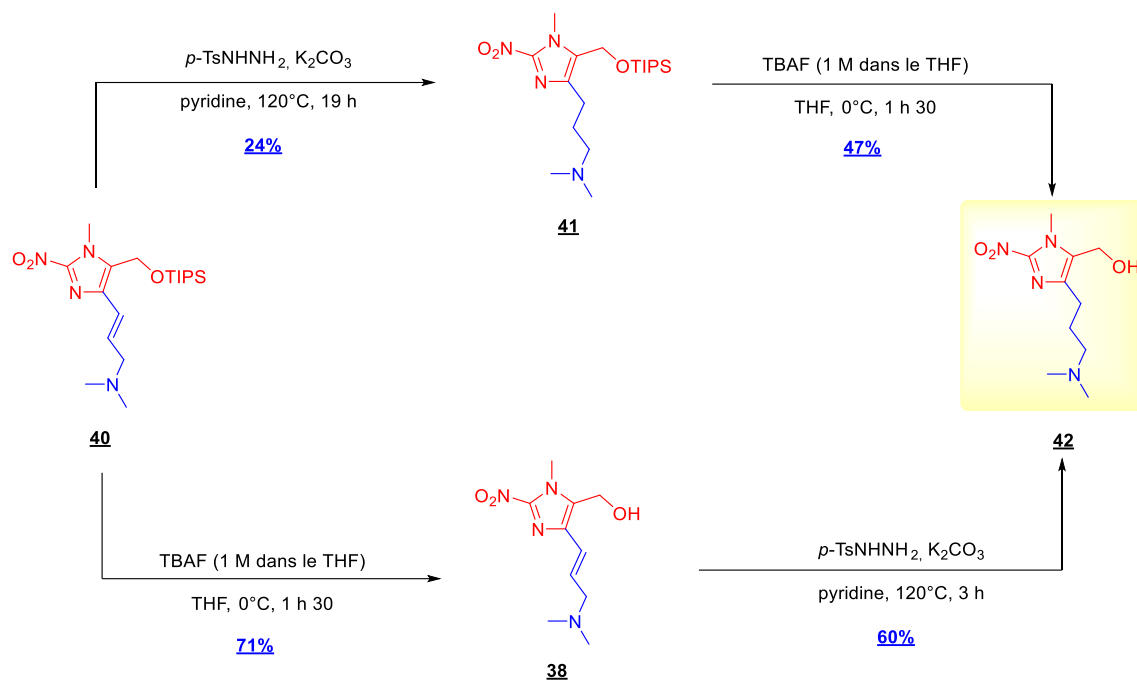


Schéma 63 : Comparaison des deux voies d'accès au composé **42** à partir du composé **40**

La voie de synthèse du composé **42** a été réalisée à partir du composé **12** avec un rendement global de 10% sur 5 étapes, ou encore à partir de la sarcosine en 12 étapes avec un rendement de 2% (Schéma 64). Cette séquence réactionnelle permet également d'accéder au composé **38**, précurseur du phosphorodiamidate **44**.

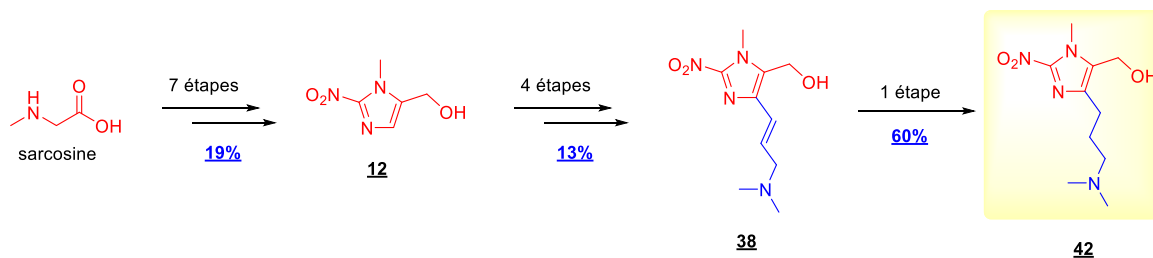


Schéma 64 : Voie de synthèse récapitulative du composé **42**

Résultats et discussion

B. Réactions de phosphorylation et de quaternisation

Les étapes de synthèses des composés phosphorodiamidates intermédiaires **43**, **45**, **47** et **49** sont identiques à celles utilisées pour la série *N*-1 à partir des alcools **38** et **42**.

1. Synthèse des ammoniums quaternaires **44** et **46** à partir des alcools **38** et **42**

Les méthodes de synthèse des composés **43** et **45** sont identiques à celles utilisées pour l'analogue **26-BH₃** à savoir, la formation d'un alcoolate avec une base forte à -78 °C, suivi de l'addition du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** puis de l'ammoniac (Schéma 65).

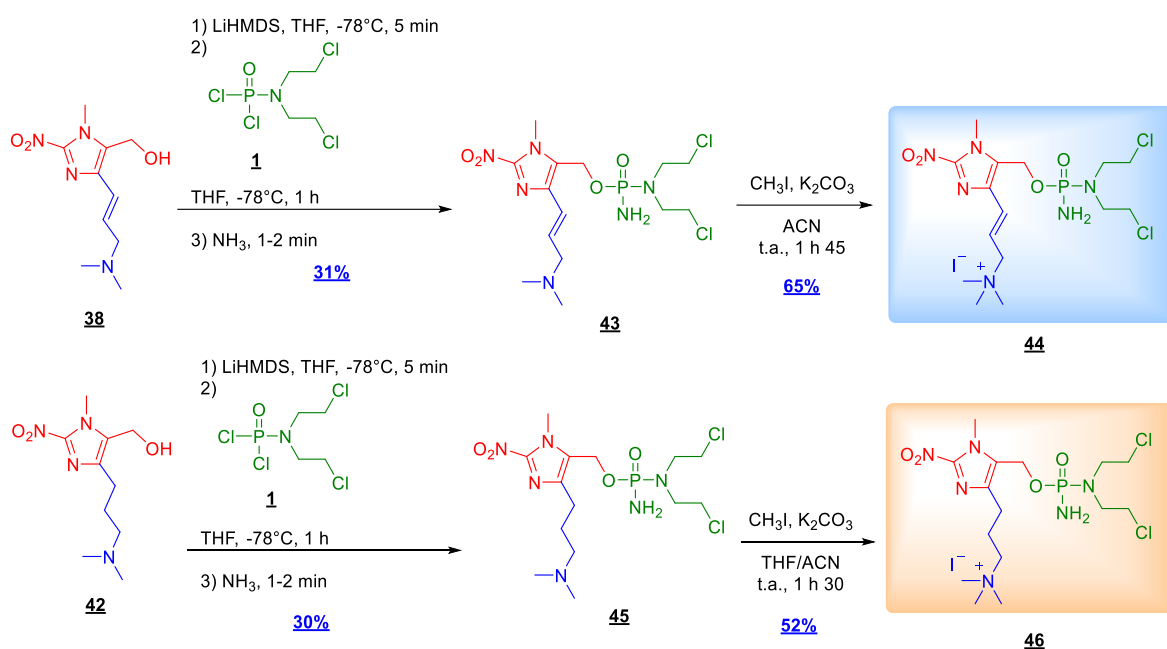


Schéma 65 : Synthèse des composés **44** et **46** selon une séquence réactionnelle en deux étapes distinctes (phosphorylation puis quaternisation) (voie A)

La cinétique de ces manipulations a été suivie par RMN ³¹P. A titre d'exemple, pour l'accès au composé **43** (Figure 95), ce suivi a permis d'observer à t = 0 le signal relatif au réactif **1** à 15,64 ppm qui diminuait progressivement au profit d'un nouveau signal à 15,51 ppm attribuable au produit d'addition attendu. Après une heure d'agitation à -78 °C, la réaction ne semblait plus évoluer et l'ammoniac a été mis à barboter dans le milieu. En RMN ³¹P, l'intermédiaire à 15,51 ppm a été entièrement consommé tandis qu'un nouveau signal à 18,29 ppm, attribuable au produit désiré, apparaissait.

Suivant ces conditions, les composés **43** et **45** ont été obtenus après purification par chromatographie avec des rendements respectifs de 31 et 30 %.

Résultats et discussion

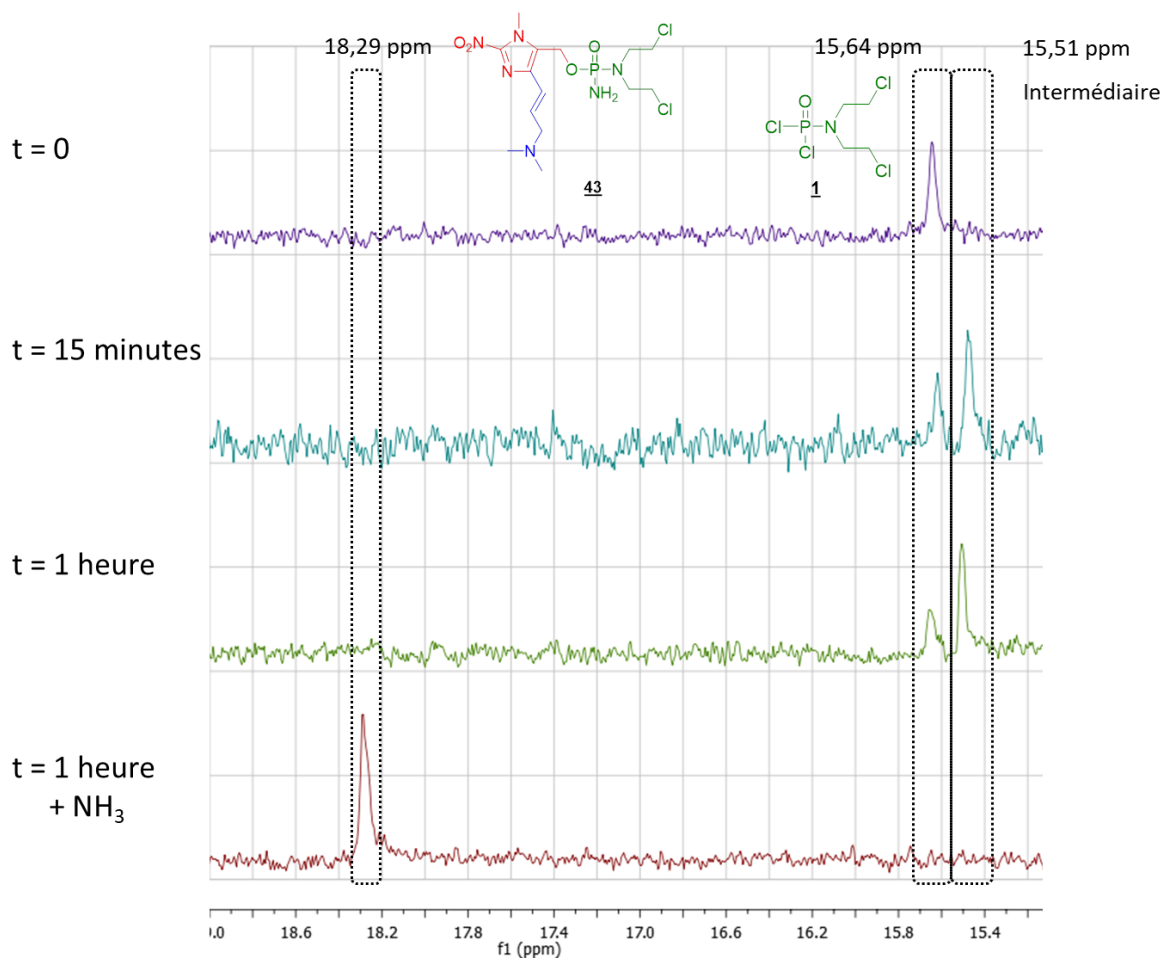


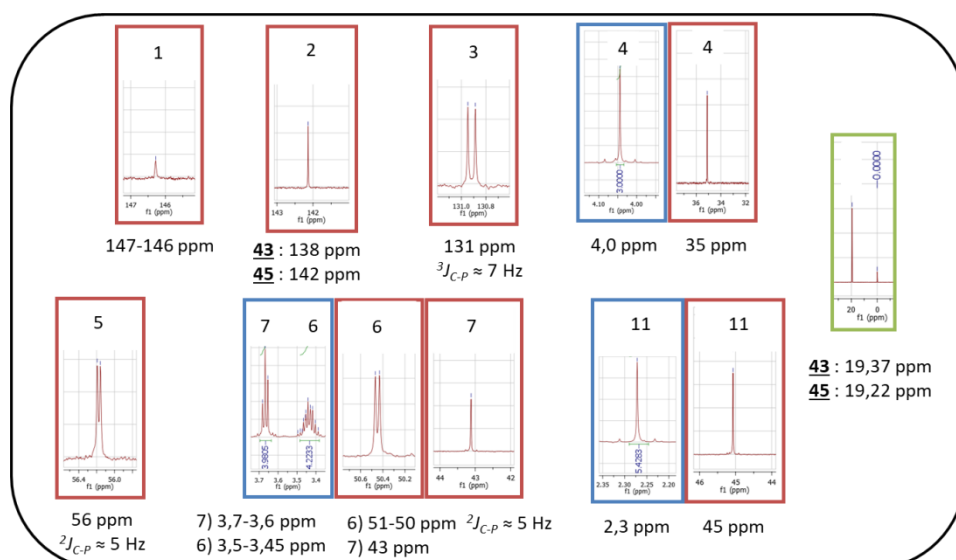
Figure 95 : Suivi cinétique par RMN ^{31}P de la réaction de phosphorylation pour l'obtention du phosphorodiamidate **43** (Spectres réalisés à partir d'un prélèvement du milieu réactionnel dilué dans le THF anhydre)

2. Caractérisation structurale des composés **43** et **45**

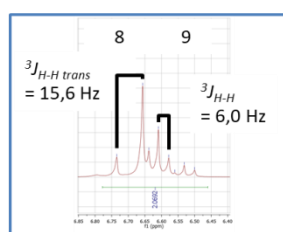
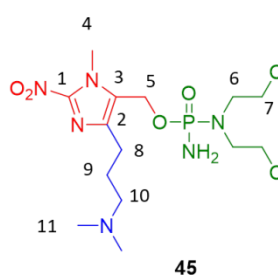
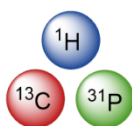
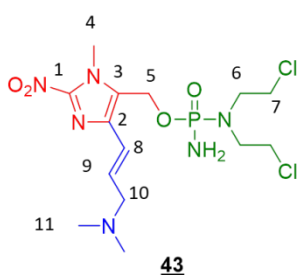
Pour les composés **43** et **45**, les analyses structurales prouvent l'obtention de ces composés grâce notamment à (Figure 96) :

- en RMN ^1H : un doublet à 5,15 ppm pour le composé **43** et deux doublets dédoublés à 5,11 et 5,07 ppm pour le composé **45**, caractéristiques des protons méthyléniques H-5. Ces protons possèdent une constante de couplage avec le phosphore $^3J_{\text{H-P}}$ de l'ordre de 8 Hz. Pour le composé **43**, l'isométrie (*E*) de l'alcène est caractérisée par une constante de couplage $^3J_{\text{H-H trans}}$ de 15,6 Hz entre les protons H-8 et H-9.
- en RMN ^{13}C : un doublet à 131 ppm avec une constante de couplage $^3J_{\text{C,P}}$ de l'ordre de 7 Hz et un doublet à 56 ppm avec une constante de couplage $^2J_{\text{C,P}}$ de l'ordre de 5 Hz correspondant respectivement aux carbones C-3 et C-5.
- en RMN ^{31}P : la présence respective d'un singulet à 19,37 ppm et 19,22 ppm pour les composés **43** et **45**.

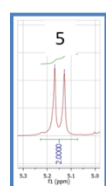
Résultats et discussion



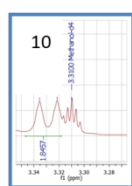
Partie commune
des spectres des
deux molécules



6,70 et 6,57 ppm



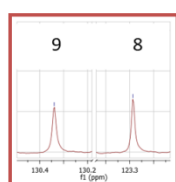
$^3J_{H-P} = 8,0$ Hz



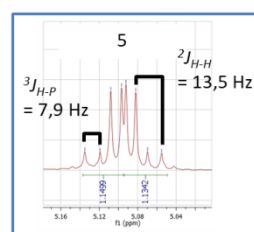
$^3J_{H-H} = 5,9$ Hz



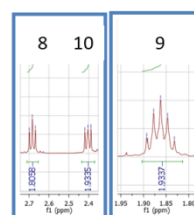
62,17 ppm



9) 130,34 ppm
8) 123,29 ppm

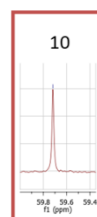


5,11 et 5,08 ppm

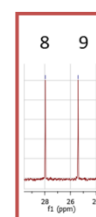


8) 2,68 ppm $^3J_{H-H} = 7,6$ Hz

10) 2,44-2,37 ppm
9) 1,93-1,81 ppm



59,72 ppm



27,96 et 25,41 ppm

Figure 96 : Caractéristiques spectrales RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P des composés **43** et **45**

Résultats et discussion

Les phosphorodiamidates ont alors été engagés en réaction de quaternisation en présence d'iodure de méthyle et de carbonate de potassium (Schéma 65). Après purification par chromatographie préparative en phase inverse (C18) et lyophilisation, les ammoniums quaternaires **44** et **46** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 65 et 52%.

Malgré ces premiers résultats prometteurs, les tentatives suivantes d'obtention des phosphorodiamidates **43** et **45** selon cette stratégie ont été décevantes en termes de reproductibilité. Notamment d'importantes difficultés ont été rencontrées lors des phases de purification, les produits étant fréquemment contaminés par la présence d'impuretés dont la proportion augmentait après chaque purification. Face à ce problème de dégradation, nous avons tenté la réaction de quaternisation directement sur le brut réactionnel issu de la phosphorylation.

Avec cette méthode, les composés **44** et **46** ont pu être obtenus avec des rendements respectifs de 11% et 10% (Schéma 66), rendements deux fois plus faibles que pour la première stratégie (voie A avec purification de l'amine avant quaternisation).

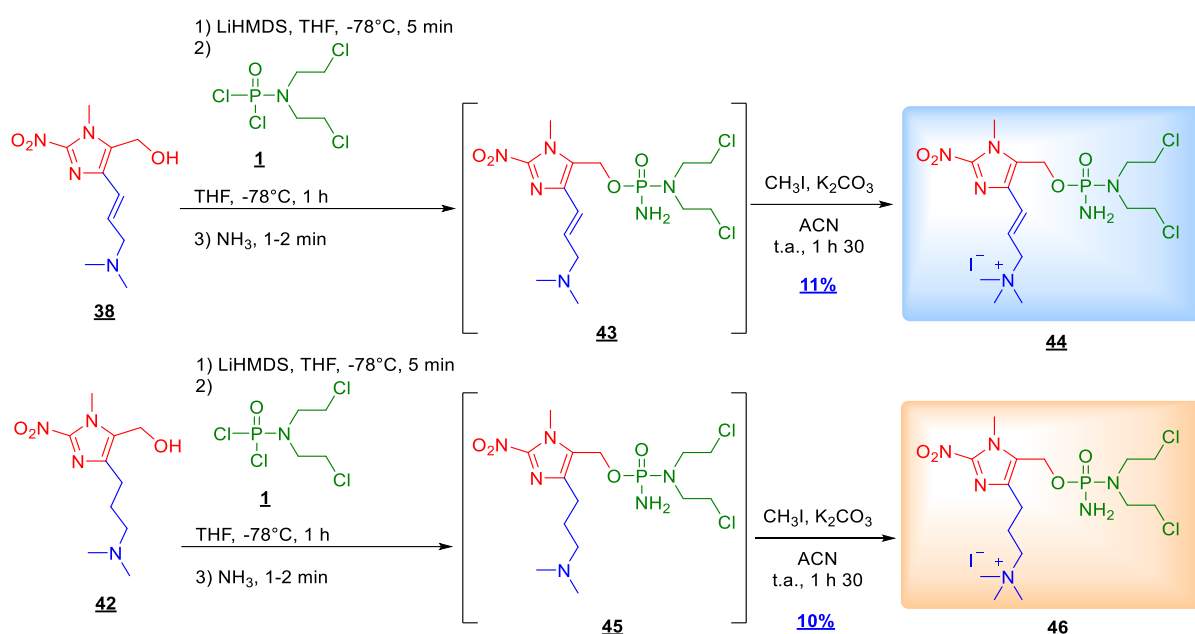


Schéma 66 : Synthèse des composés **44** et **46** sans isoler l'intermédiaire issu de la phosphorylation (voie B)

Les faibles rendements et le manque de reproductibilité des réactions observés, pourraient être encore une fois liés à la présence de la fonction amine tertiaire qui tendrait à rendre instables les phosphorodiamidates formés.

Afin de vérifier cette hypothèse et par analogie avec la série précédente, l'amine du synthon **42** a été protégée sous forme d'un complexe de borane. Ce dernier a été obtenu selon la procédure décrite par Blakemore *et al.*³⁵⁹ légèrement modifiée. Après réaction à 0 °C avec 5 équivalents du complexe borane-THF, la fonction amine de cet alcool est complexée par le bore et ce, avec un rendement de 64 ± 15% (n = 5) (Schéma 67). La structure du complexe **42-BH₃** a été notamment confirmée par diffraction aux rayons X réalisée après cristallisation dans le DCM par diffusion lente par tension de vapeur d'éther diéthylique (Figure 97).

Résultats et discussion

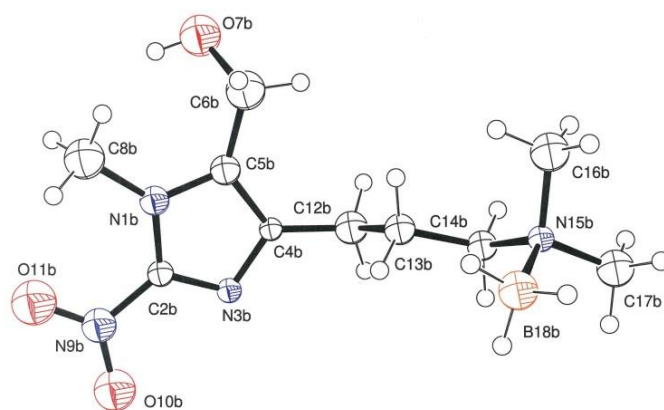


Figure 97 : Structure cristallographique du composé **42-BH₃**. Les ellipsoïdes sont représentés au seuil de probabilité de 50%

La réaction de phosphorylation a alors été réalisée avec l'alcool protégé **42-BH₃** en suivant les conditions utilisées pour son analogue non complexé **42** et a permis d'accéder au phosphorodiamidate **45-BH₃** avec un rendement de 63%. L'utilisation de ce complexe de bore a donc permis de multiplier par deux le rendement de cette étape.

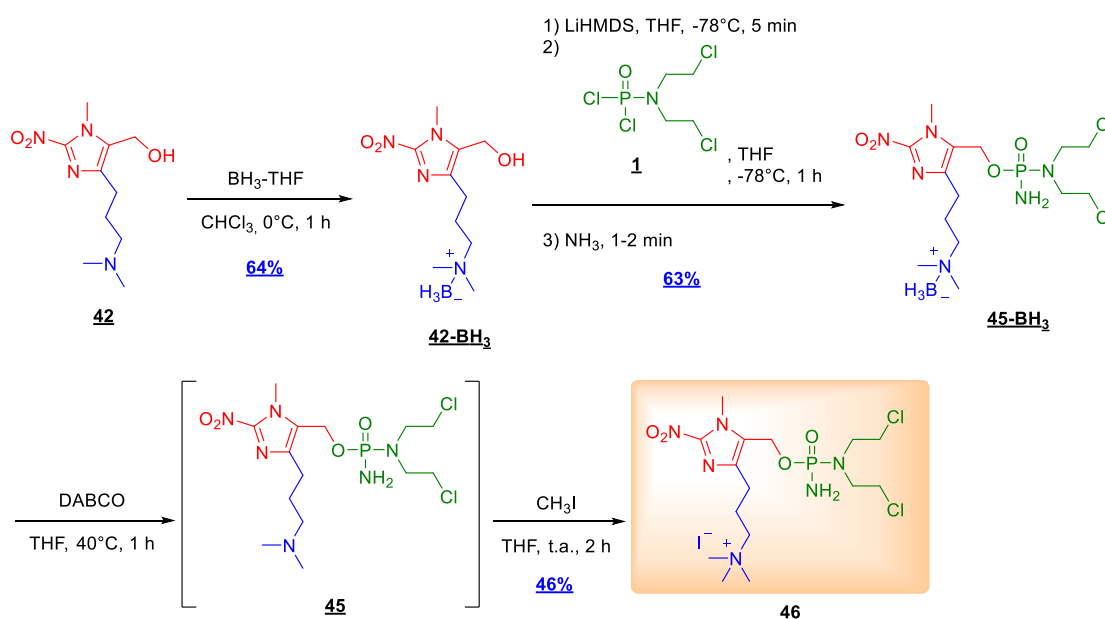


Schéma 67 : Synthèse du composé **46** selon une séquence réactionnelle en quatre étapes via la protection de l'amine tertiaire sous forme de complexe de borane (voie C)

La transchélation de l'amine tertiaire **45-BH₃** a été réalisée dans les mêmes conditions que pour les phosphorodiamidates en série *N*-1, à savoir par chauffage en présence de DABCO dans le THF à 40 °C durant 1 heure. L'alkylation par l'iodure de méthyle a ensuite été réalisée sans isoler l'amine tertiaire libre. Le rendement obtenu pour le dérivé **46-BH₃** sur ces deux étapes après purification est de 46% (Schéma 67).

Résultats et discussion

Comparant les trois voies d'accès A, B et C au phosphorodiamidate **46** au départ de l'alcool **42** en termes de rendements :

- La voie A avec isolement de l'intermédiaire **45** conduit à un rendement global de 16% (Schéma 65).
- La voie B sans isolement du phosphorodiamidate **45** permet d'accéder à l'ammonium quaternaire avec un rendement de 10% (Schéma 66).
- La voie C réalisée en 3 étapes *via* l'alcool complexé **42-BH₃** donne quant à elle un rendement global de 19% (Schéma 67).

Nous pouvons conclure que la voie B est la moins avantageuse en termes de rendements. Pour les voies A et C, les rendements sont sensiblement équivalents. Cependant, l'utilisation du complexe de bore permet l'obtention du phosphorodiamidate de façon reproductible et sous une forme stable. La voie de synthèse C au rendement de 19% est donc la voie privilégiée pour synthétiser l'ammonium quaternaire **46**.

Concernant le composé **44**, la voie B est également moins avantageuse avec un rendement de 11% contre un rendement de 20% pour la voie A. Les conditions de la voie C ne sont pas applicables à la synthèse du composé **44** du fait de l'incompatibilité du borane avec l'alcène.

3. Synthèse de l'ammonium quaternaire **48**

Les conditions décrites précédemment pour le composé **27** ont été utilisées pour la synthèse du composé **47** à partir de l'alcool **42**. Après purification par chromatographie, l'analyse du spectre RMN ³¹P indiquait la présence d'un signal à 18,18 ppm (76%) qui pouvait correspondre au composé attendu. Toutefois au moins deux autres produits phosphorés étaient présents avec des signaux à 29,00 ppm (6%) et à 11,19 ppm (18%). L'analyse par CCM montrait une tache non visible à l'UV mais uniquement à la NBP plus polaire que le phosphorodiamidate. Ce type de profil d'impuretés rappelle celui observé lors de la synthèse du composé **27** dans la série N-1. A chaque tentative de purification, les proportions des impuretés semblaient augmenter. Ces observations nous ont fait supposer une dégradation du produit lors de la purification.

Comme précédemment, nous nous sommes alors tournés vers l'utilisation du complexe **42-BH₃**. Ce dernier a conduit après phosphorylation au complexe **47-BH₃** avec des rendements de 30 et 33% (n = 2) (Schéma 68). Ce dernier est cependant inférieur à ceux obtenus dans la série N-1 (75%).

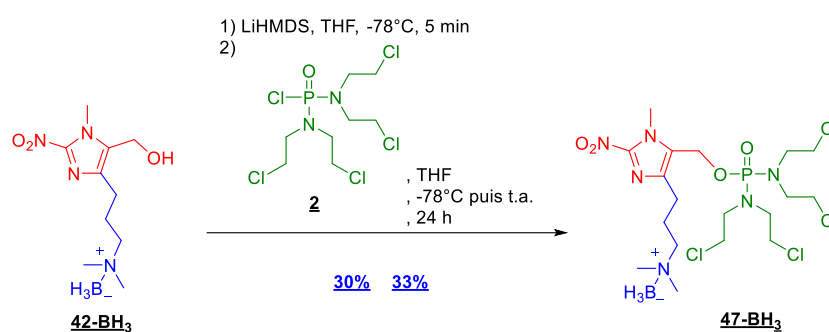


Schéma 68 : Réaction de phosphorylation de l'alcool **42-BH₃** pour donner le phosphorodiamidate **47-BH₃**

Résultats et discussion

Le composé **47-BH₃** a ensuite été engagé en réaction de transchélation et de quaternisation « one pot » pour donner le composé **48** final avec un rendement de 35% sur ces deux dernières étapes, soit un rendement global de 7% à partir de l'alcool **42** (Schéma 69).

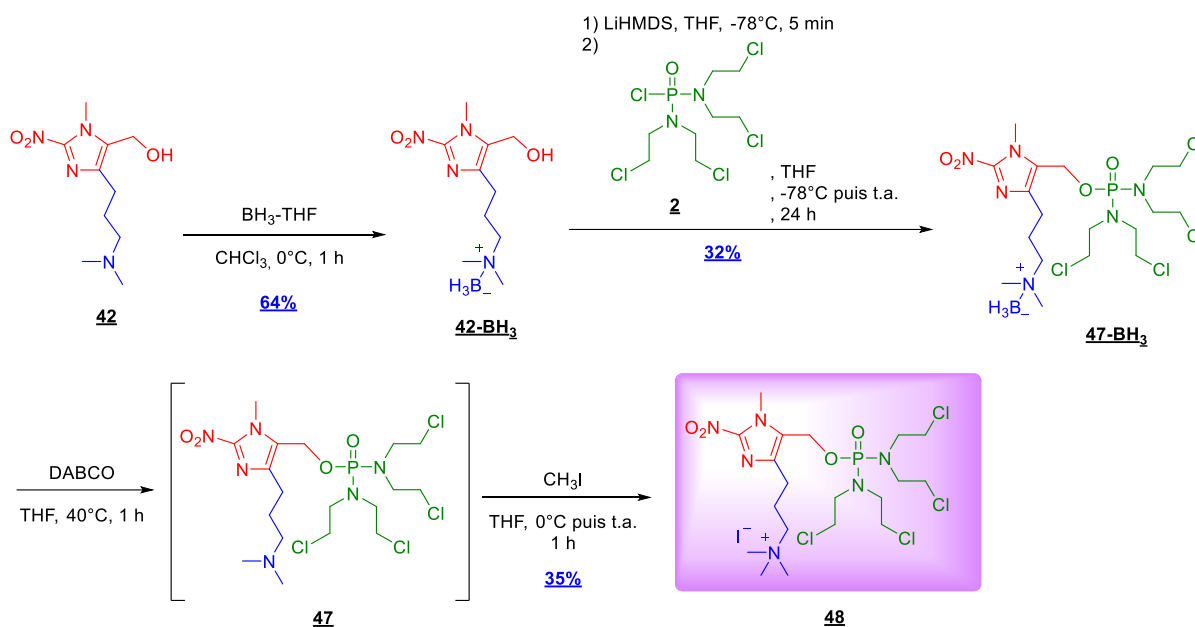


Schéma 69 : Synthèse du composé **48** selon une séquence réactionnelle en quatre étapes via le complexe **42-BH₃**

4. Synthèse de l'ammonium quaternaire 50

Comme cela a été démontré précédemment pour le composé **29**, le DCM est préféré au THF comme solvant de réaction de phosphorylation utilisant l'oxychlorure de phosphore en présence de TEA, et de chloroéthylamine. Compte tenu également de la faible solubilité dans le DCM de l'alcool **42** et des soucis rencontrés jusqu'ici, nous avons réalisés la synthèse du composé **50** via le complexe **42-BH₃**.

Lors de l'étape de phosphorylation, nous avons observé par analyse CCM, même après plus de 15 heures d'agitation à température ambiante, que l'alcool **42-BH₃** était toujours présent. Après purification plus de 30 à 60% de la masse initiale de ce dernier ont été récupérés selon les essais. Le meilleur rendement obtenu est de 41% pour le complexe **49-BH₃** (Tableau 22).

Résultats et discussion

Proportion récupérée d'alcool <u>42-BH₃</u> par rapport à la masse engagée	Temps	Rendement	Rendement corrigé de l'alcool n'ayant pas réagi
51%	25 h	15%	31%
64%	23 h	16%	44%
34%	15 h	41%	62%

Tableau 22 : Proportions d'alcool 42-BH₃ récupéré et rendement de la synthèse du composé 49-BH₃

Des éléments structuraux similaires aux autres produits de la série sont retrouvés pour le composé 49-BH₃ tels qu'en RMN ¹H, le doublet caractéristique du groupement méthylène (H-5) à 5,03 ppm ou bien encore les signaux relatifs aux méthylènes des chaînes chloroéthyles à 3,58 ppm et 3,35-3,19 ppm, affichant des constantes de couplage caractéristiques H-P phosphore.

Les réactions de transchélation et de quaternisation ont été réalisées comme précédemment « one pot » avec un rendement de 56% (Schéma 70). Le dérivé 50 a donc été obtenu avec un rendement global de 15% à partir du composé 42.

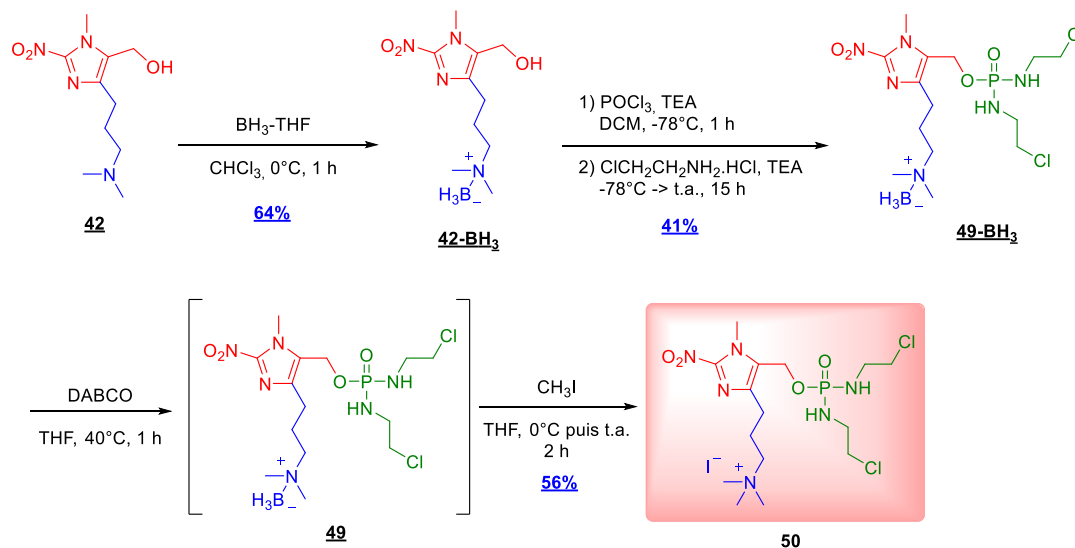


Schéma 70 : Synthèse du composé 50 selon une séquence réactionnelle en quatre étapes via le complexe 42-BH₃

Pour conclure sur la synthèse de cette série de molécules fonctionnalisées en position C-4 de l'imidazole, les prodrogues 46, 48 et 50 ont pu être synthétisées à partir du composé 42, en utilisant le dérivé protégé par le borane 42-BH₃, avec des rendements globaux respectivement de 19%, 7% et 15%, lui-même obtenu avec un rendement de 10% à partir du composé 12. Les rendements de synthèses des prodrogues 46, 48 et 50 à partir de la sarcosine en 15 étapes sont tous inférieurs à

Résultats et discussion

0,5%. Seuls les phosphorodiamidates **45** et **43** ont pu être obtenus respectivement à partir des alcools **42** et **38** sans recourir aux étapes de protection et déprotection de l'amine tertiaire, mais les expériences furent décevantes en termes de reproductibilité. L'instabilité des intermédiaires phosphorodiamidates comportant une fonction amine tertiaire est probablement un des éléments clefs expliquant ces résultats. Le composé **44** a été synthétisé avec un rendement de 20% à partir du composé **38** soit un rendement global de 0,6% à partir de la sarcosine.

L'analyse structurale complète des composés **44**, **46**, **48** et **50** a été réalisée par RMN ^1H , ^{13}C , ^{31}P , COSY, HSQC, IR et HRMS. Les principales caractéristiques témoignant de la quaternisation sont développées ci-après (Schéma 71):

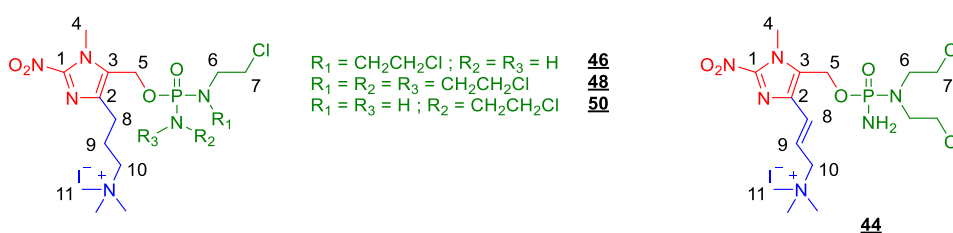


Schéma 71 : Structure générale des composés **44**, **46**, **48** et **50**

- L'analyse du spectre RMN ^1H révèle la présence d'un singulet vers 3,2 ppm intégrant pour neuf protons, caractéristiques des protons méthyliques de l'ammonium quaternaire.
- L'analyse du spectre RMN ^{13}C montre un glissement de 2 à 8 ppm vers les champs faibles des signaux relatifs aux carbones C-10 et C-11 comparativement au complexe amine tertiaire-borane.
- L'analyse du spectre RMN ^{31}P indique la présence d'un singulet unique respectivement à 19,45 ppm, 18,24 ppm, 17,20 ppm et 19,38 ppm pour les composés **44**, **46**, **48** et **50** en accord avec la zone de déplacement chimique attendu.

VIII. Etudes de stabilité et de clivage des prodrogues synthétisées, de leur d'affinité *in tubo* pour l'aggrécane et de leur cytotoxicité *in vitro*

Toutes les prodrogues obtenues ont une pureté supérieure ou égale à 95% estimées grâce aux analyses spectrales de RMN. Les prodrogues synthétisées ont été évaluées en termes : i) de clivage, par réduction chimique, ou enzymatique, ii) d'affinité pour l'aggrécane (protéoglycane majoritaire de la matrice extracellulaire chondrogénique), par résonance plasmonique de surface (SPR), et iii) de cytotoxicité en hypoxie *versus* normoxie sur cellules HEMC-SS. Les résultats seront comparés à ceux obtenus pour la molécule hit **ICF0516** afin de conclure sur les relations structure activité existantes.

A. Etude de la stabilité et du clivage des prodrogues par réduction chimique monitorée par RMN ³¹P

Dans le but de valider la capacité de la prodrogue à être clivée dans un environnement mimant celui de l'hypoxie, des expériences en RMN ³¹P ont été réalisées avec un réducteur chimique : le dithionite de sodium, fréquemment utilisé à ces fins^{360,361}. La prodrogue (*i.e.* **33**, **34**, **35**, **44** ou **46**) a été mise en solution dans un mélange ACN/tampon cacodylate (pH = 7,4). Cette solution a été placée dans un tube RMN muni d'un tube coaxial contenant comme référence une solution à 5% de TPPO dans le DMSO-*d*₆. Après addition de trois équivalents de réducteur dissouts dans du tampon cacodylate, des acquisitions RMN ³¹P successives ont été programmées durant 24 heures à une température de 37 °C. Les premières acquisitions ont été réalisées dans des temps courts puis de plus en plus espacées pour obtenir un maximum d'informations sur le début de la cinétique de clivage.

Le profil des spectres RMN ³¹P est identique pour tous les composés étudiés : le signal de la prodrogue disparaît (17 à 19 ppm) au profit d'un signal pouvant correspondre à la substance active (11 à 12 ppm). Celle-ci se dégrade rapidement en de multiples composés phosphorées qui ont un déplacement chimique proche, puis en phosphate inorganique (environ 0 ppm) (cf Figure 98 pour le composé **46**).

Résultats et discussion

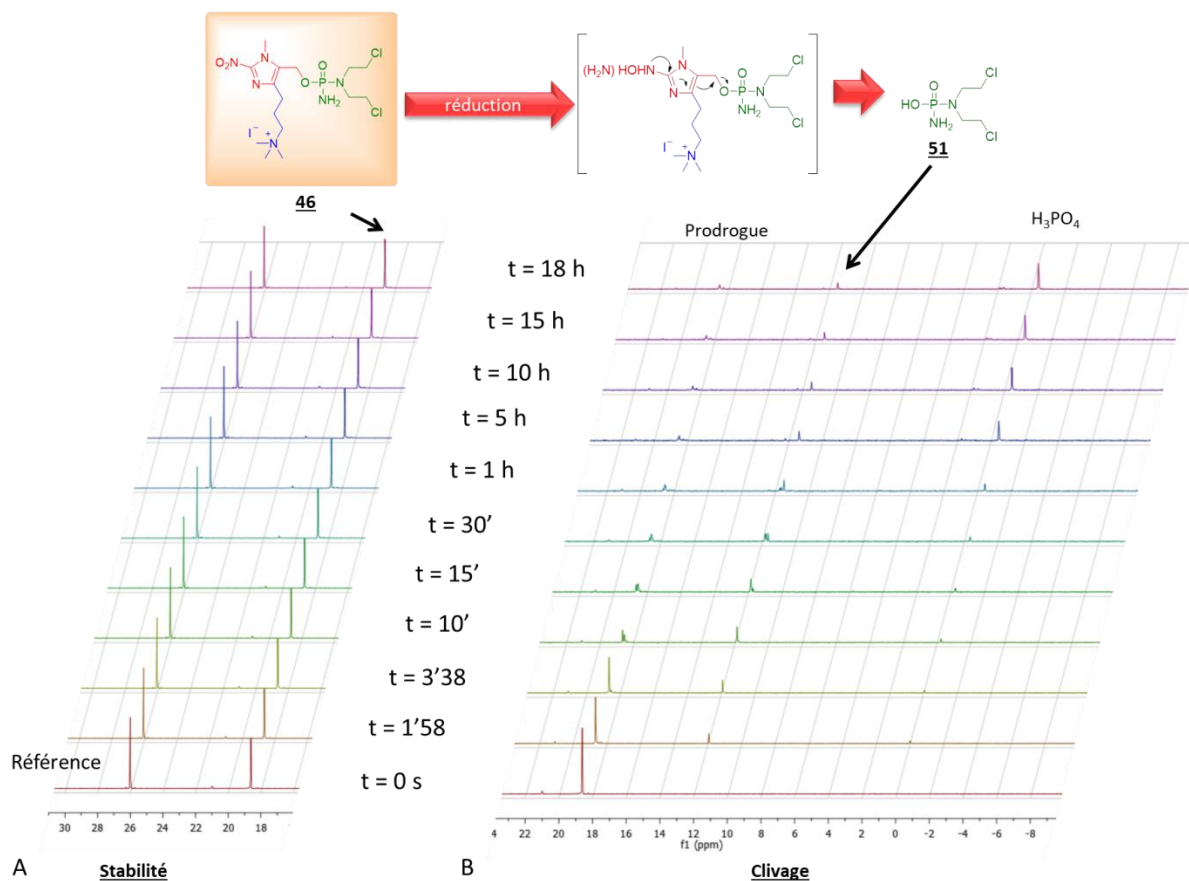


Figure 98 : Stabilité et cinétique de clivage monitorées par RMN ^{31}P du composé **46**
 Référence TPPO dans le DMSO-d_6 ; A : stabilité dans le tampon cacodylate à pH = 7,4 à 37 °C ; B : clivage avec du dithionite de sodium (3,0 éq.) dans le tampon cacodylate à pH = 7,4 à 37 °C

Les trois prodrogues fonctionnalisées en position N-1 **33**, **34** et **35** ont un profil de cinétique de disparition identique et un temps de demi-vie inférieur à 2 minutes (Figure 99). La prodrogue **46** (fonctionnalisation en C-4) possède un profil légèrement différent avec une décroissance plus lente que pour les composés de la série N-1 et un temps de demi-vie d'environ 6 minutes, proche de celui du hit **ICF05016**. La prodrogue **44** (fonctionnalisation en C-4 par un propylène) est quant à elle moins sensible à la réduction chimique, avec une cinétique de libération moins rapide.

Résultats et discussion

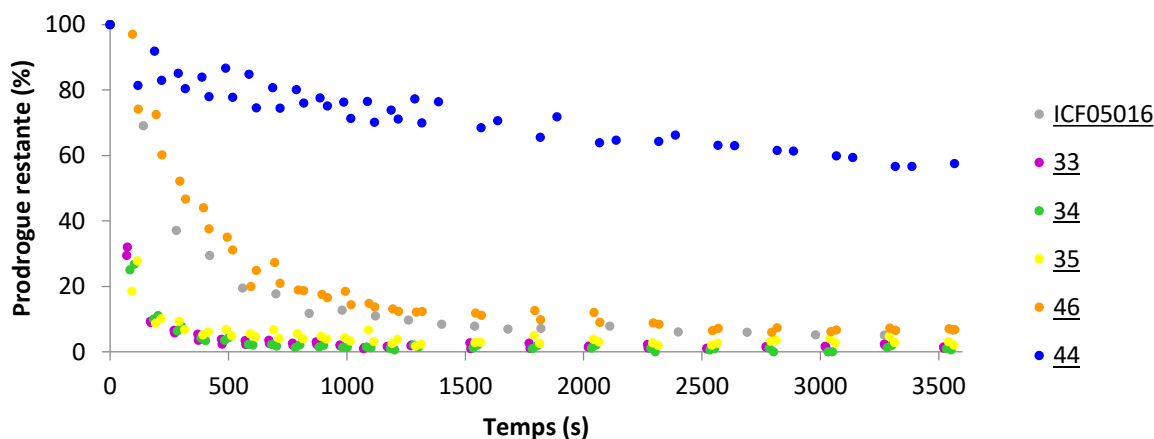


Figure 99 : Evolution du pourcentage de prodrogue en fonction du temps en présence de dithionite de sodium (3,0 éq.) dans du tampon cacodylate à pH = 7,4, à 37 °C

Afin de valider que le signal observé vers 12 ppm est bien relatif à la substance active, une surcharge du tube RMN lors du clivage de la prodrogue, avec l'acide phosphorodiamidique correspondant a été envisagée. Les substances actives **51** et **52** ont été obtenues par hydrogénation de leurs analogues esters benzyles **53**, **54**, (Schéma 72) eux-mêmes synthétisés selon la méthode précédemment décrite pour l'obtention du composé **3**. Leurs structures ont été confirmées par spectrométrie de masse (Tableau 23).

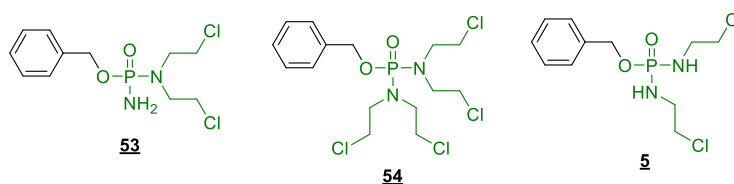


Schéma 72 : Structures des esters benzyles **53**, **54** et **5** utilisés pour la synthèse des moutardes phosphorodiamidiques par hydrogénation

Acide phosphorodiamidique	Mode d'ionisation	Masse théorique	Valeur obtenue	Déplacement chimique RMN ^{31}P (DMSO- d_6)
 51	négatif	[M-H] ⁻ 219,0 m/z	[M-H] ⁻ 219,0 m/z	9,76
 52	négatif	[M-H] ⁻ 345,0 m/z	[M-H] ⁻ 344,9 m/z	10,79
 3	positif	[M+H] ⁺ 221,0 m/z	[M+H] ⁺ 221,0 m/z	11,16

Tableau 23 : Caractérisation des composés **51**, **52** et **3** par spectrométrie de masse et RMN ^{31}P

Résultats et discussion

Cependant, les prodrogues ayant une gâchette 2-nitroimidazole (excepté la molécule **44**) ont une cinétique de clivage très rapide ne permettant pas de réaliser cette expérience de surcharge. Aussi les analogues 4-nitrobenzyliques des moutardes phosphorodiamidiques ont été synthétisés (**55**, **56** et **57**) (Figure 100), ces gâchettes conduisant généralement à des clivages moins efficaces, ce qui a été confirmé ici pour la molécule **57** (Figure 101). En effet, un taux de clivage ne dépassant les 40% en présence de trois équivalents de dithionite de sodium (ou 10 équivalents dans le cas du composé **56**) a été observé et un signal à environ 12 ppm était bien présent, témoin de la libération de la substance active.

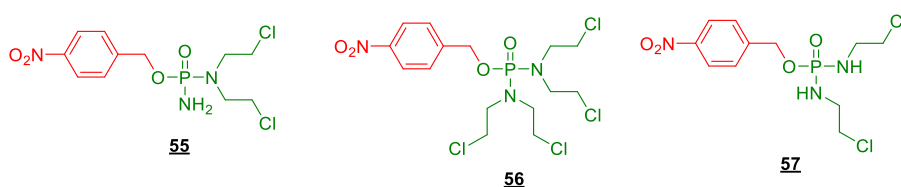


Figure 100 : Structure des prodrogues des trois moutardes phosphorodiamidiques avec une gâchette de type 4-nitrobenzyle

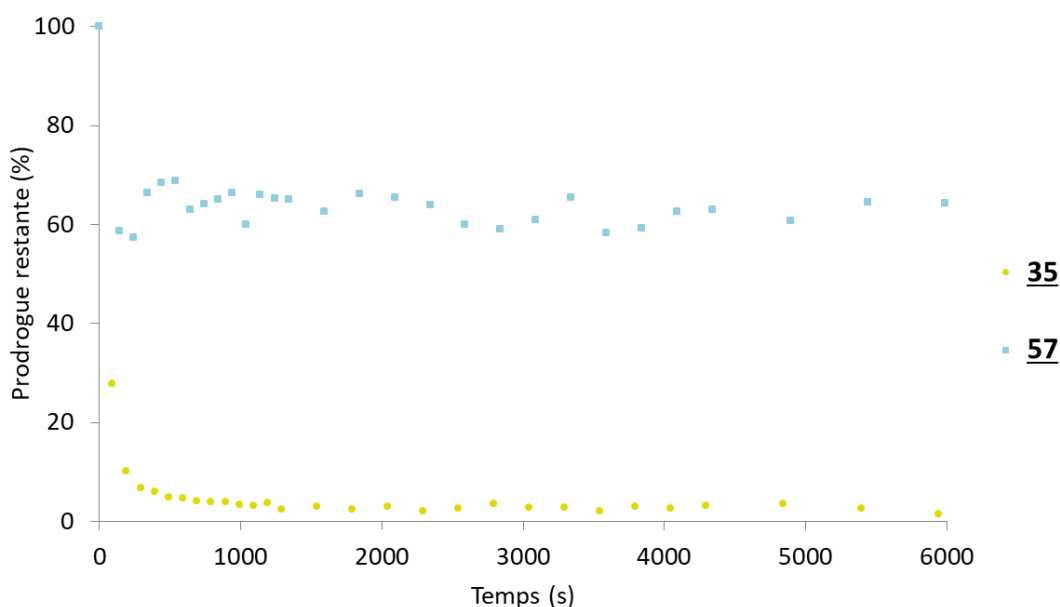


Figure 101 : Evolution du pourcentage des prodrogues **35** et **57** en fonction du temps en présence de dithionite de sodium (3,0 éq.) dans du tampon cacodylate à pH = 7,4, à 37 °C

Parallèlement, la même expérience de réduction a été réalisée mais en ajoutant une quantité connue de moutarde **51**, **52** et **3**, et ce respectivement pour chacune des cinétiques des prodrogues **55**, **56** et **57**. Une acquisition RMN ^{31}P a été réalisée après 5 minutes et a permis de mettre en évidence une augmentation relative de l'intégrale du pic à environ 12 ppm (Figure 102).

Ce signal est donc bien attribuable à la moutarde phosphorodiamidique correspondante, preuve de sa libération par les prodrogues **33**, **34**, **35**, **46** et **44** lors d'une réduction chimique.

Résultats et discussion

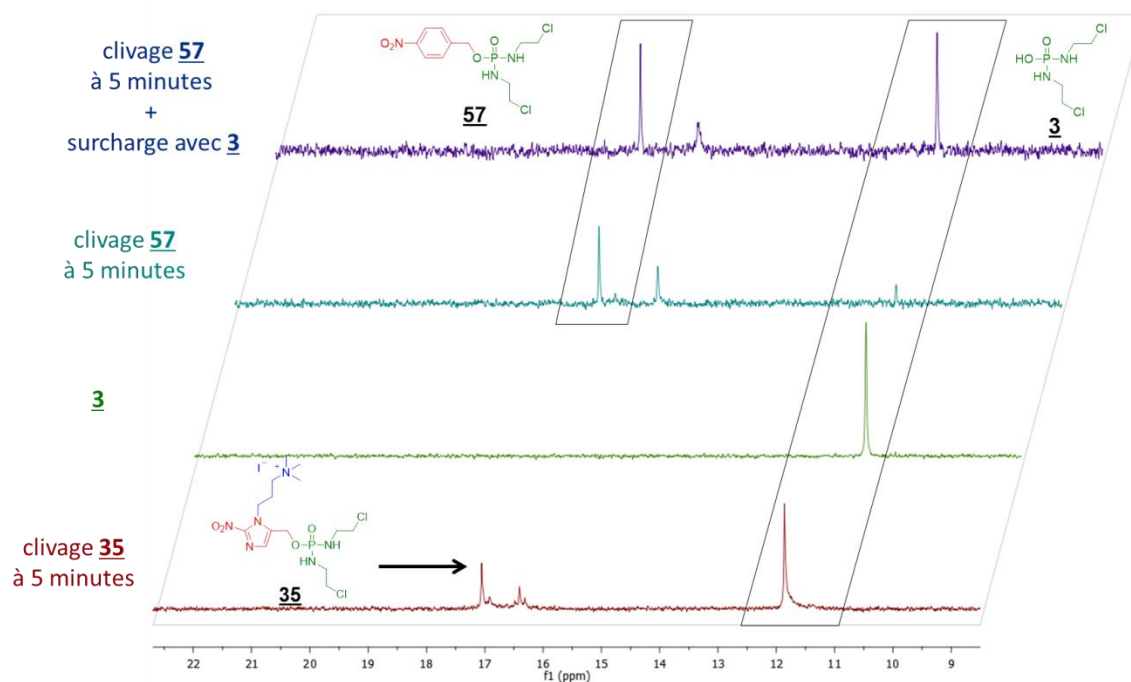


Figure 102 : Cinétique de clivage monitorées par RMN ^{31}P des composés **35** et **57** et spectre de l'acide **3** de référence
Spectres RMN ^{31}P 5 minutes après ajout du réducteur pour le composé **35**, **57** et **57** surchargé avec le composé **3**

B. Etude de l'affinité des prodrogues pour l'aggrécane par SPR

L'affinité par liaison ionique entre les ammoniums quaternaires chargés positivement et les charges négatives de l'aggrécane a été déterminée par SPR. La SPR est un phénomène physique qui permet de suivre en temps réel l'affinité d'un analyte pour un ligand qui est fixé sur une fine feuille d'or, elle-même fixée sur une « sensor ship ». Sur cette « sensor ship » est envoyé de la lumière polarisée par le biais d'un prisme. L'interaction de l'analyte avec le ligand va créer une variation de masse ponctuelle qui va se répercuter sur l'onde plasmonique générée par le faisceau lumineux. L'indice de réfraction de ce dernier est alors modifié. Une unité de détection optique enregistre en temps réel les variations d'angle de la lumière réfléchiée et un logiciel les convertit en unité de résonance (RU) permettant de tracer un sensorgramme (Figure 103).

Résultats et discussion

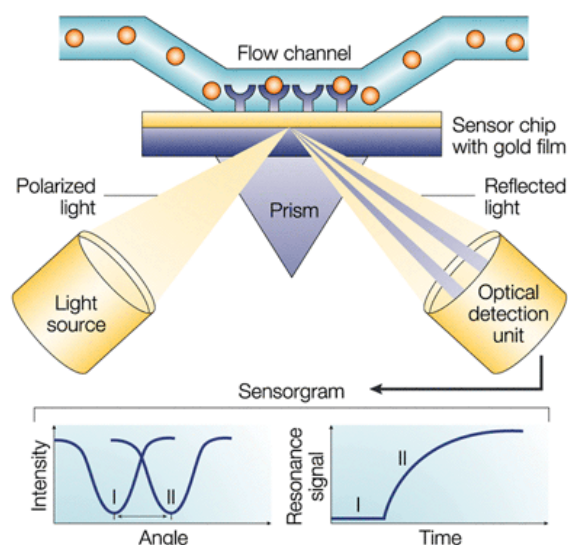


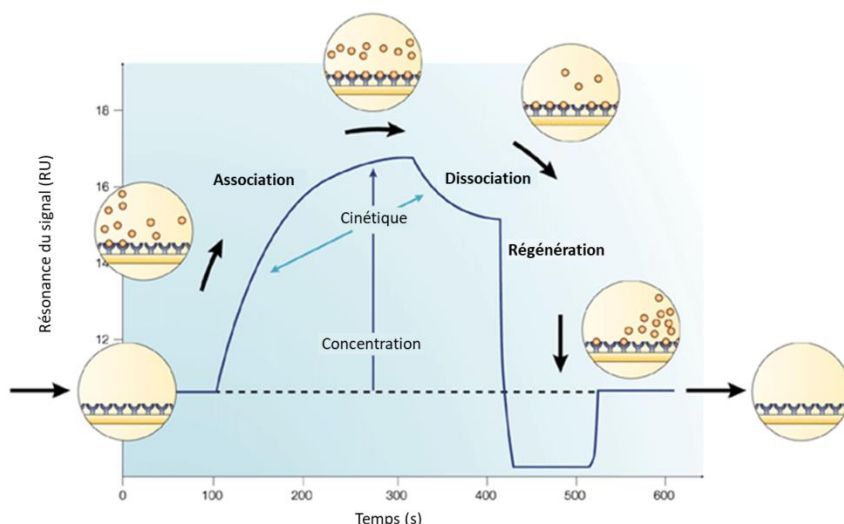
Figure 103 : Principe de la résonance plasmonique de surface³⁶²

Un enregistrement de SPR comprend plusieurs phases lors d'une même analyse d'affinité ligand-substrat (Figure 104) :

- Tout d'abord, un flux de solution tampon seul est envoyé sur la « sensor chip » servant à tracer la ligne de base de l'analyse.
- Ensuite, la solution d'analyte dans le tampon est envoyée de manière continue sur la « sensor ship ». Une phase d'association entre l'analyte et le ligand, s'ils sont affins, est visible sur la courbe par une augmentation du nombre de RU. Lorsque tous les sites sont saturés et/ou que l'équilibre des interactions est atteint, un plateau est obtenu sur le sensorgramme.
- Du tampon seul est ensuite envoyé sur la « sensor ship » créant une phase de dissociation qui s'opère entre le ligand et le récepteur et qui est caractérisée par une diminution du nombre de RU.
- Un cycle de régénération visant à éliminer l'intégralité de l'analyte fixé est réalisé.
- Du tampon est ensuite de nouveau injecté pour un retour à la ligne de base.

Afin de déterminer la constante de dissociation K_D , caractéristique de l'affinité du ligand pour un récepteur donné, l'échantillon est analysé par SPR à différentes concentrations. Plus la valeur du K_D est petite, plus l'affinité avec le ligand sera forte.

Résultats et discussion



Les sept prodrogues synthétisées ont dans un premier temps été évaluées à une concentration de 1 mM, comparativement à la molécule hit **ICF05016** (Figure 105). Toutes les prodrogues semblent avoir une affinité pour l'aggrécane sensiblement équivalente à cette dernière. Il est toutefois intéressant de noter que trois ammoniums quaternaires (*i.e.* **48**, **34**, **46**) ont montré une affinité plus importante que la molécule hit. Un profil de cinétique de fixation et de dissociation particulier a été observé pour la molécule **46** signant vraisemblablement une affinité différente avec l'aggrécane. Quoi qu'il en soit, l'ensemble des prodrogues synthétisées possède toujours une affinité pour l'aggrécane et ce, quel que soit la position du vecteur sur la molécule.

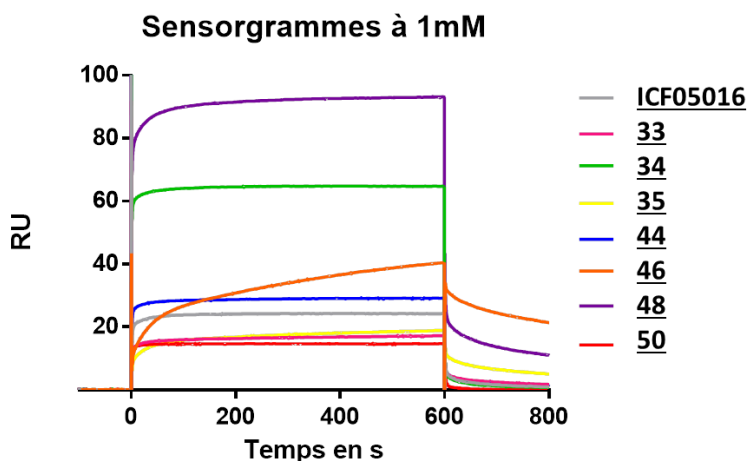


Figure 105 : Sensorgramme des différentes prodrogues évaluées par SPR vis à vis de l'aggrécane

Des analyses réalisées à différentes concentrations, ont permis de calculer la constante de dissociation du meilleur composé (*i.e.* **48**) (Figure 106), qui est de 3,2 mM confirmant une affinité légèrement améliorée par rapport à celle du dérivé **ICF05016** (*i.e.* 23 mM).

Résultats et discussion

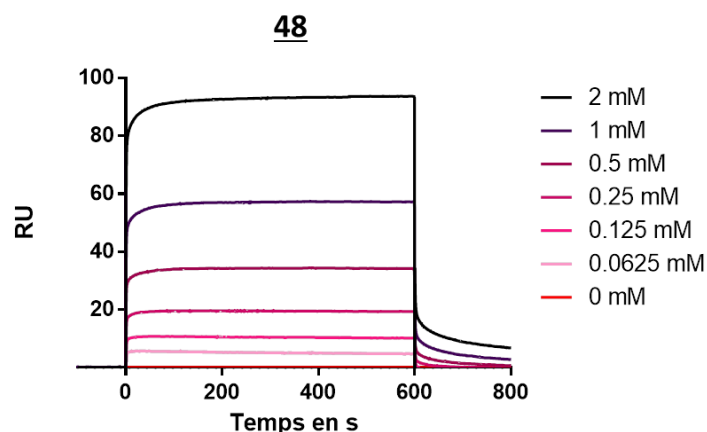


Figure 106 : Sensorgrammes obtenus suite à l'analyse SPR de l'ammonium quaternaire **48** à différentes concentrations

C. Etude de l'activité cytotoxique des prodrogues

L'évaluation de la cytotoxicité des molécules synthétisées a été réalisée sur des cellules de chondrosarcome humain H-EMC-SS cultivées en monocouche. Le protocole suivi consiste à mettre en contact les cellules avec les prodrogues à évaluer sur une durée de 24 heures, dans des concentrations variables (valeur limite de 200 μ M) afin de déterminer les CI_{50} des composés. Les résultats sont regroupés sur la Figure 107. Toutes les prodrogues nouvellement synthétisées ont un HCR inférieur à celui de la molécule hit **ICF05016** (HCR = 6,8), et ce principalement en raison d'une cytotoxicité plus élevée en conditions normoxiques que la molécule de référence. En termes de HCR, les prodrogues qui se démarquent des autres sont la molécule **35** avec un HCR de 4,0 dans la série N-1 et la molécule **48** avec un HCR de 2,6 dans la série C-4. Les conjugués semblent donc avoir perdu leur potentiel de prodrogues activables sélectivement en hypoxie. A partir de ces constats, nous pouvons avancer deux hypothèses : soit les esters phosphorodiamidates possèdent une activité cytotoxique intrinsèque ; soit les molécules sont activées par un mécanisme différent, indépendant de l'hypoxie.

Comme les analogues benzyliques **53** et **5** ne présentent aucune cytotoxicité sur le lignée HEMC-SS, à une concentration atteignant 200 μ M en normoxie comme en hypoxie, nous privilégierions plutôt la seconde hypothèse : à savoir un mécanisme indépendant d'une activation par des réductases et par la même du statut hypoxique pourrait être mis en jeu.

Si les expériences de clivages par RMN ont démontré une sensibilité de nos prodrogues à la réduction, celle-ci était initiée par un réducteur chimique, loin donc de mimer les conditions physiologiques. Au niveau cellulaire, cette réduction sera principalement fonction des enzymes réductrices présentes, qui doivent reconnaître nos prodrogues comme substrats.

Afin d'obtenir un élément de réponse et de valider l'absence, ou quasi-absence, d'un mécanisme d'activation par les réductases, qui pourrait expliquer une perte de sélectivité des prodrogues en hypoxie, des expériences de réduction par voie enzymatique ont été réalisées.

Résultats et discussion

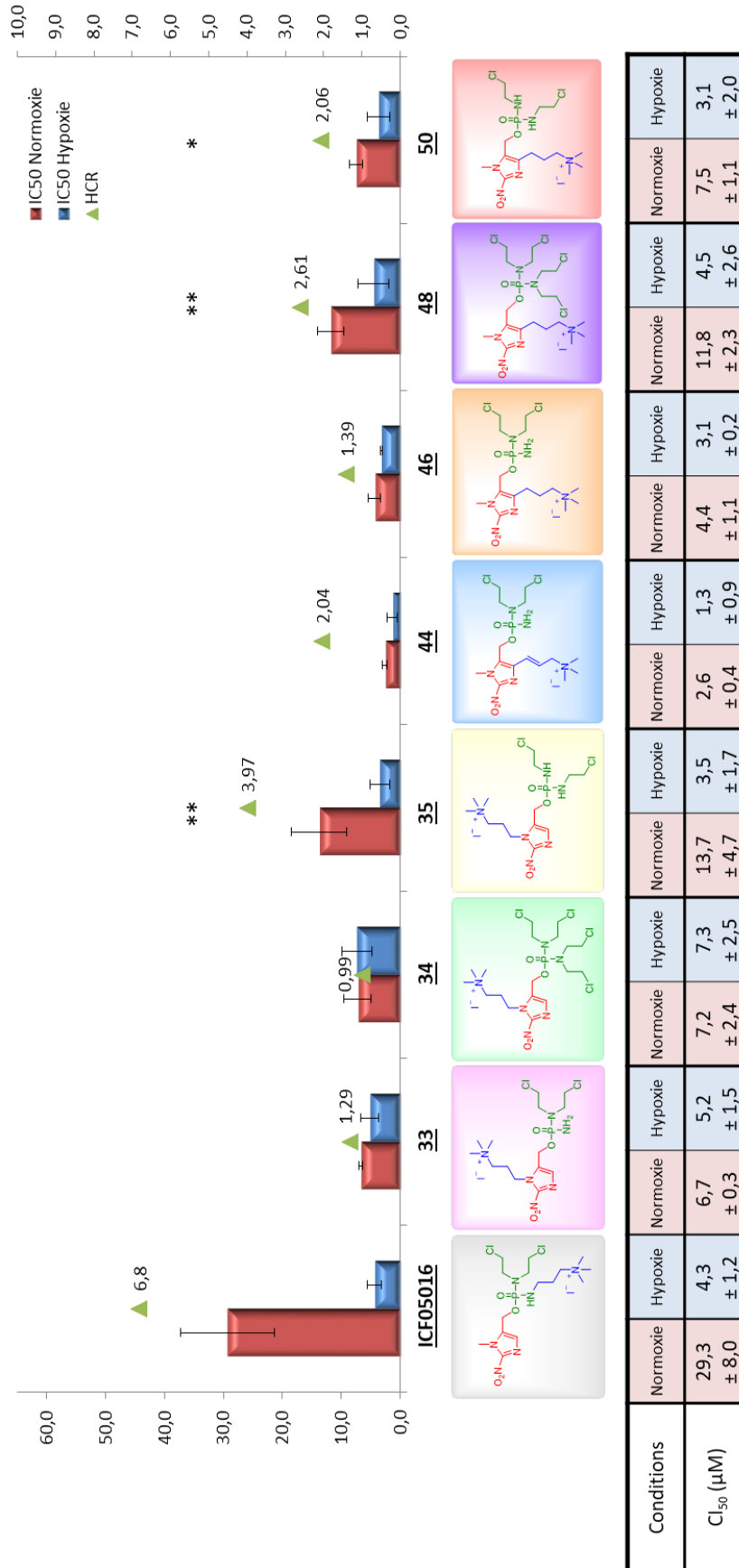


Figure 107 : IC_{50} des prodrogues **ICF05016**, **33**, **34**, **35**, **44**, **46**, **48** et **50** en normoxie et en hypoxie sur cellules H-EMC-SS en 2D

(test de significativité réalisé avec un test t. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

Résultats et discussion

D. Etude de stabilité et du clivage des prodrogues par réduction enzymatique

Une étude de clivage enzymatique des prodrogues a été réalisée en présence d'une nitroréductase diélectronique d'*Escherichia coli* permettant de s'affranchir du taux d'oxygène lors de l'essai de clivage. Le mode opératoire s'est inspiré des travaux décrits par Chen *et al.*¹¹⁸. La prodrogue a été incubée dans le PBS à 37 °C en présence de la nitroréductase et d'un excès du co-facteur dihydronicotinamide adénine dinucléotide phosphate tétrasodique (NADPH). Au préalable, la stabilité de la prodrogue dans le PBS à 37 °C en présence de NADPH seul a été confirmée (aucune dégradation visible sur une période de 2 heures 30 pour l'ensemble des molécules étudiées). Des prélèvements sont réalisés à différents temps puis analysés par HPLC afin de quantifier la quantité de prodrogue présente dans l'échantillon comparativement au temps t_0 . Cette expérience est réalisée en triplicat sur chaque molécule. Le pourcentage de prodrogue présent dans l'échantillon a été tracé en fonction du temps pour visualiser leur cinétique de disparition (Figure 108).

La cinétique de réduction de la molécule hit est très rapide, avec un temps de demi-vie d'environ 5 minutes, et moins de 10% de la prodrogue est encore présente à 35 minutes. Concernant les molécules de la série N-1, les prodrogues **33** et **35** ne montrent aucune décroissance au cours du temps et ne semblent donc pas être substrat de cette nitroréductase ; la prodrogue **34** n'est que très faiblement réduite à hauteur de 20% environ. Comparativement les prodrogues de la série C-4 **50**, **46**, **48**, et **44** semblent être de meilleurs substrats pour cette enzyme avec respectivement 75%, 70%, 50% et 40% de prodrogue inchangée en fin d'analyse. Il est à noter que le composé présentant l'alcène sur le bras vecteur **44** semble plus facilement réduit par cette enzyme que son homologue alcane **46**.

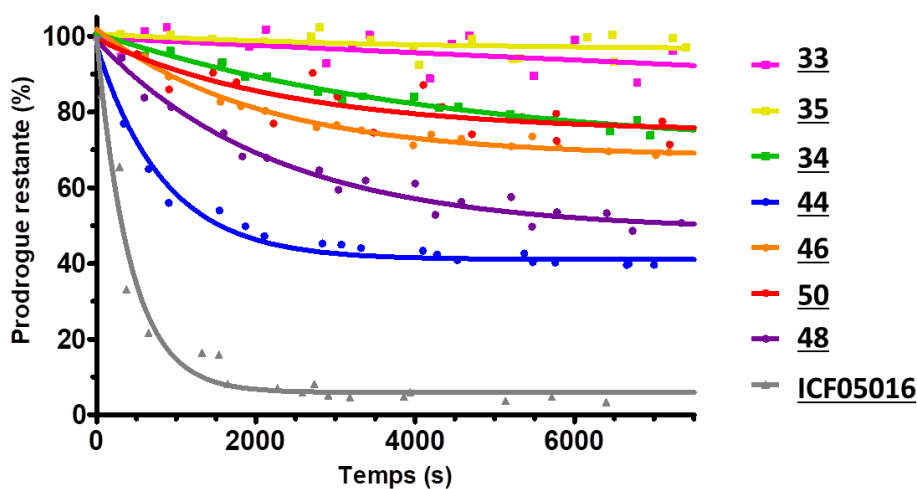


Figure 108 : Evolution du pourcentage de prodrogue en fonction du temps en présence de nitroréductase et de NADPH à 37 °C dans le PBS

Ces observations permettent de conclure que les prodrogues **33**, **34**, **35**, **44**, **46**, **48** et **50** sont peu ou pas activées par cette enzyme réductrice. Elles sont donc activées par le biais d'un autre mécanisme qui est sûrement indépendant des conditions d'hypoxie.

Ces études permettent de conclure que le bras vecteur ammonium quaternaire ne doit en aucun cas se trouver sur la gâchette 2-nitroimidazole, sous peine de rendre la prodrogue moins sensible au clivage enzymatique par une nitroréductase.

IX. Application du concept de HAP vectorisées pour le cancer de la prostate

La molécule **ICF05016** ayant démontré des résultats intéressants en termes de ralentissement de la croissance tumorale et de tolérance sur un modèle murin de xénogreffes de chondrosarcome humain H-EMC-SS, les études précliniques de cette molécule sont actuellement poursuivies, notamment dans un protocole de co-traitement avec la radiothérapie. Parallèlement, nous avons choisi d'étendre cette approche de HAP vectorisées vers une autre pathologie cancéreuse, le cancer de la prostate.

A. Rappel bibliographique sur le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate était en 2016 au niveau mondial le deuxième cancer le plus diagnostiqué chez l'homme (incidence de 1,4 millions de nouveaux cas) et la cinquième cause de mortalité chez les hommes (381 000 morts) derrière 1) le cancer des poumons, des bronches ou de la trachée, 2) le cancer du foie, 3) le cancer de l'estomac et 4) le cancer colorectal³⁶³.

En France, le diagnostic de ce cancer est réalisé au moyen de deux examens principaux : le toucher rectal qui permet de déterminer la présence d'une anomalie anatomique pouvant être signe de la présence d'une tumeur, et une mesure du taux d'antigène spécifique prostatique sérique (PSA). Si le taux de PSA total est supérieur à 4 ng.mL⁻¹, une biopsie prostatique est systématiquement réalisée afin de confirmer le caractère cancéreux des éventuelles lésions³⁶⁴. Des examens complémentaires comme une IRM ou une scintigraphie osseuse peuvent également être prescrits afin d'établir un bilan d'extension de la maladie et déceler la présence d'éventuelles métastases³⁶⁵. A partir des constatations faites, des facteurs de pronostics sont recherchés, dont les plus reconnus sont avec le taux de PSA, la classification TNM (tumeur, ganglions, métastases de l'anglais « tumor, node, metastasis ») et le score de Gleason, sur lesquels s'appuie ensuite le choix du schéma thérapeutique.

La classification TNM prend en compte l'extension de la tumeur locale, l'atteinte ganglionnaire et la présence éventuelle de métastases. (Tableau 24)³⁶⁶.

Tx : tumeur primitive non évaluée	N : ganglions régionaux	M : métastases à distance
T0 : tumeur primitive non retrouvée	Nx : ganglions régionaux non évalués	Mx : métastases à distance non évaluées
T1 : tumeur ni palpable, ni visible en imagerie	N0 : absence de métastase ganglionnaire régionale	M0 : absence de métastase à distance
T2 : tumeur limitée à la prostate	N1 : atteinte ganglionnaire régionale	M1 : métastases à distance
T3 : extension au-delà de la capsule		
T4 : extension aux organes adjacents		

Tableau 24 : Critères utilisés pour réaliser une classification TNM dans le cas du cancer de la prostate (adapté de Parker et al.)³⁶⁶

Cette classification permet de déterminer le stade précis d'évolution de la maladie³⁶⁷ :

- cancer de la prostate localisé (stade T1 ou T2, N0, M0) : la tumeur est limitée à la capsule prostatique ;
- cancer de la prostate localement avancé (stade T3 ou T4, N0, M0) : la tumeur s'étend au-delà de la capsule prostatique pouvant toucher d'autres organes voisins tels que les vésicules séminales, la vessie, le sphincter, le rectum, le muscle releveur de l'anus ou la paroi pelvienne, mais aucune atteinte des ganglions pelviens ni métastase n'est observée ;

Résultats et discussion

- cancer de la prostate avec atteinte des ganglions voisins (stade T3 ou T4, N1, M0) : la tumeur s'étend au-delà de la capsule prostatique touchant également les organes voisins et les ganglions pelviens, mais sans métastases ;
- cancer de la prostate métastatique (stade T3 ou T4, N1, M1) : la tumeur s'étend au-delà de la capsule prostatique, aux organes voisins et aux ganglions pelviens et des métastases apparaissent majoritairement au niveau osseux dans 90% des cas³⁶⁸.

Le score de Gleason est un score histopronostique du cancer de la prostate permettant de décrire l'agressivité du cancer de la prostate qui est corrélé à l'espérance de vie du patient. Défini par Donald Gleason, il permet de classer l'architecture des tissus prélevés dans les biopsies, des grades 1 à 5, avec une malignité croissante³⁶⁹. Le grade 1 montre un tissu dont la composition est proche de celui des tissus prostatiques sains se distinguant toutefois par la présence de modifications architecturales ponctuelles et le grade 5 montre uniquement la présence de tissu tumoral (Figure 109). Si plusieurs grades sont présents au sein des différentes biopsies d'un même patient, la somme des deux grades les plus fréquemment rencontrés permet de définir le score. En théorie, le score de Gleason s'exprime sur une échelle de 2 à 10, mais en pratique, comme les grades 1 et 2 ne sont pas considérés comme cancéreux, on ne rencontre que des scores allant de 6 à 10.

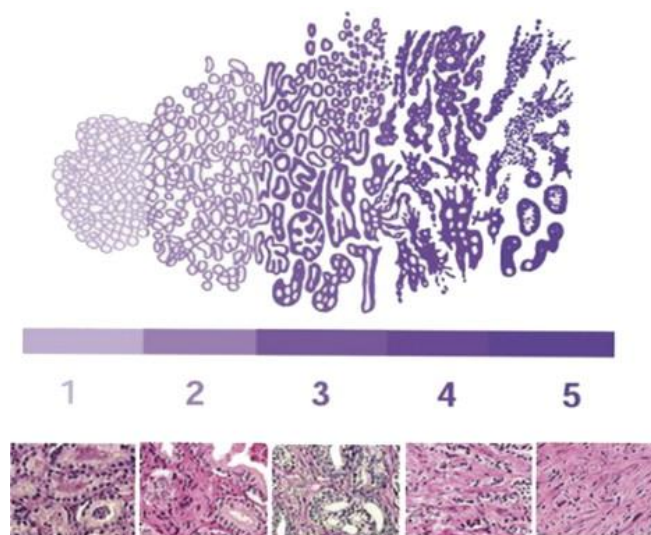


Figure 109 : Représentation de l'architecture tissulaire, et coupes histologiques associées aux différents grades de Gleason (adapté de Harnden et al.)³⁷⁰

La stadification du cancer ainsi que l'espérance de vie du patient vont ensuite dicter le protocole de traitement mis en place par les oncologues³⁶⁴⁻³⁶⁶ (Figure 110) :

Résultats et discussion

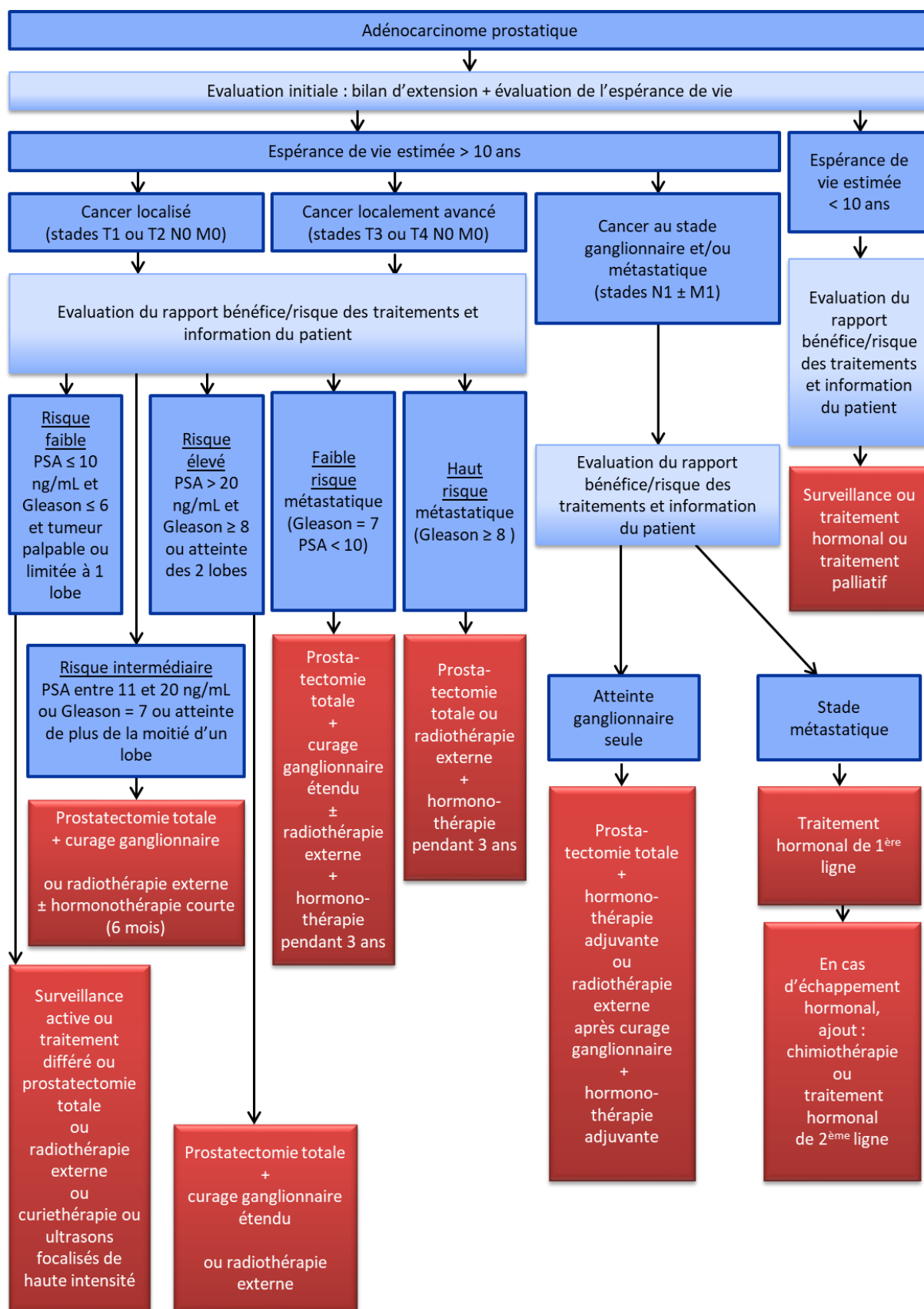


Figure 110 : Arbre décisionnaire général (non exhaustif) pour la prise en charge de patient atteint d'un cancer de la prostate en fonction du stade et de la survie envisagée du patient (extrait du Vidal)³⁶⁴

Résultats et discussion

- La surveillance active est proposée dans le cas unique où la tumeur est localisée et consiste à réaliser des bilans d'extension réguliers de la tumeur (taux de PSA sérique, IRM et biopsie prostatique afin de déterminer si la tumeur change de stade).
- La chirurgie, consistant en l'ablation totale de la prostate est le traitement de référence pour les patients dont la survie est estimée supérieure à 10 ans. Elle peut s'accompagner d'un curage ou d'un retrait des ganglions pelviens.
- L'hormonothérapie est pratiquée chez les patients ayant un cancer androgéno-dépendant. Elle peut être utilisée pour tous les stades des cancers et est considérée comme le traitement de référence pour la prise en charge du cancer métastatique. Cette thérapie consiste à bloquer la production de testostérone par castration chimique en utilisant une substance active*. Les molécules utilisées dans ce cas peuvent être des analogues de la LH-RH[†] (comme la goséreline (Zoladex®), la leuproréline (Eligard®) et la triptoréline (Décapeptyl®)) ou un antagoniste (dégarélix (Firmagon®)).

Des antiandrogènes comme par exemple l'acétate de cyprotérone (Androcur®) ou le bicalutamide (Ormandyl®) qui bloquent les récepteurs androgéniques prostatiques et donc l'action des hormones au niveau de la prostate empêchent la stimulation de la tumeur par la testostérone. Ces thérapies sont généralement utilisées en combinaison avec les inhibiteurs de la LH-RH dans les premiers mois de traitement permettant de réaliser un blocage androgénique total de la tumeur. Elles sont également utilisées pour contrecarrer l'effet du pic de production de testostérone suite aux traitements avec les analogues de la LH-RH.

Il arrive que cette approche de suppression androgénique ne permette pas de détruire totalement les cellules cancéreuses et une hormonothérapie de seconde ligne est alors parfois nécessaire. Dans ce cas, d'autres molécules peuvent être utilisées telles que l'acétate d'abiratéron (Zytiga®), inhibiteur de la biosynthèse des androgènes, et l'enzalutamide (Xtandi®), inhibiteur de la voie de signalisation des récepteurs aux androgènes.

- La radiothérapie externe peut être utilisée comme traitement dans les deux premiers stades de la maladie et est généralement pratiquée pour le troisième stade.
- La radiothérapie interne peut être réalisée avec l'utilisation de chlorure de radium 223 (Xofigo®) (²²³Ra ($t_{1/2} = 11,4$ jours, E_{α} max. = 7386 keV)), dans le traitement des métastases osseuses symptomatiques chez les patients présentant un cancer de la prostate hormono-résistant et métastatique. Elle consiste en l'injection au patient du radiopharmaceutique, qui disposant d'un comportement similaire au calcium, va se fixer principalement aux lésions osseuses. Le radium 223 se désintègre alors avec émission de particules α de faible parcours mais de haute énergie. Ces dernières émises à proximité des cellules tumorales induisent de nombreuses cassures irréversibles des brins d'ADN conduisant à leur apoptose³⁷¹.
- La curiethérapie qui consiste à introduire des implants radioactifs au plus proche des tumeurs, est réalisée pour les stades localisés. Cette stratégie thérapeutique nécessite toutefois une très bonne connaissance de la localisation des zones tumorales au sein de l'organe.
- Les ultrasons focalisés à haute intensité possèdent la même indication. Des impulsions ultrasonores *via* une sonde endorectale sont envoyées, produisant une élévation subite de la température qui va conduire à la destruction définitive des tissus visés. Le faisceau est émis

* Une castration chirurgicale par l'ablation des testicules pour bloquer la production de testostérone peut également être réalisée. Ses indications sont en recul car la castration médicamenteuse a l'avantage d'être réversible et mieux tolérée psychologiquement.

† Hormone produite par l'hypothalamus qui après une cascade d'activation, conduit à la production de testostérone par les testicules

Résultats et discussion

durant environ 5 secondes et le nombre de tirs dépend de la taille de la zone à traiter (300 à 400 tirs successifs sont nécessaires pour traiter une prostate de volume moyen)³⁷².

- La chimiothérapie est utilisée dans les cas métastatiques hormono-indépendants du cancer de la prostate et est à base de taxanes^{373,374} : (1) docétaxel (Taxotère®) en association avec la prednisone (Cortancyl®) qui est souvent le traitement de choix³⁷⁵ ou avec l'estrามustine³⁷⁶, (2) cabazitaxel (Jevtana®) utilisé dans des cas de résistance au docétaxel^{377,378}. La mitoxantrone (Novantrone®) possède quant à elle une AMM dans le traitement palliatif de l'adénocarcinome métastatique hormonorésistant et peut être administrée en association avec la prednisone³⁷⁵.
- L'immunothérapie peut être utilisée dans tous les grades des cancers de la prostate résistants à la castration grâce à l'emploi du vaccin Spileucel-T (Provence®). Des cellules mononucléées y compris les cellules présentatrices d'antigènes (cellules du système immunitaire) sont prélevées chez le patient et incubées avec une protéine de fusion composée de la phosphatase acide prostatique (PAP, antigène retrouvé dans 95% des cas de cancer de la prostate⁹⁸) et de stimulants du système immunitaire. Les nouvelles cellules immunitaires présentatrices de l'antigène PAP sont administrées au patient et vont permettre de stimuler les lymphocytes T qui en retour vont déclencher une réponse ciblée sur les cellules cancéreuses de la prostate porteuses de l'antigène PAP et conduire *in fine* à leur destruction. Ce vaccin a été approuvé par la FDA en 2010³⁸⁰. L'EMA (« European Medicines Agency ») a autorisé la commercialisation de ce vaccin en 2013 avant qu'il soit retiré du marché en 2015³⁸¹. Il n'a pas fait à ce jour l'objet d'une AMM en France.

La majorité de ces traitements entraînent des effets secondaires importants comme l'infécondité, les troubles érectiles ou urinaires ou encore des risques de rectites ou cystites, ces deux derniers étant inhérents à l'utilisation de la radiothérapie externe. Dans les cas de cancers hormono-résistants et métastatiques où le recours à la chimiothérapie s'avère indispensable, des échecs liés à des phénomènes de multirésistances ou bien encore les effets indésirables majeurs inhérents à la chimiothérapie aux taxanes viennent compliquer la prise en charge des patients. De nouvelles approches s'avèrent donc nécessaires.

Comme toute tumeur solide, le cancer de la prostate possède des zones hypoxiques³⁸², en partie responsables du manque d'efficacité des chimiothérapies (voir paragraphe hypoxie). La présence du marqueur de l'hypoxie HIF-1 α a été retrouvée dans des biopsies de tumeurs prostatiques et plus particulièrement pour les tumeurs de haut grade. D'après les travaux de Lekas *et al.*, la quantification de la présence de HIF-1 α dans le sang par qRT-QPCR (« quantitative reverse transcription polymerase chain reaction ») permettrait de faire la différence entre les cancers ne présentant pas de signes évidents de malignité ou localisés et les cancers au stade métastatique³⁸³. La présence de HIF-1 α dans des biopsie de cancer prostatique a également été corrélée avec l'apparition du phénotype hormonodépendant et leur capacité invasive³⁸⁴. Une méta-analyse publiée en 2018 par Huang *et al.* confirme ces hypothèses corrélant le taux de HIF-1 et le degré de malignité de la tumeur³⁸⁵. Ce marqueur de l'hypoxie pourrait être utilisé en complément de la mesure du taux de PSA, comme outil de diagnostic non invasif.

B. Objectifs

Notre approche de HAP vectorisées développées dans le cadre du chondrosarcome pourrait donc également s'avérer prometteuse pour le traitement des cancers de la prostate, en proposant une thérapie plus spécifique que les chimiothérapies anticancéreuses utilisées à l'heure actuelle. Le vecteur envisagé serait, dans ce projet, un ligand spécifique de l'antigène membranaire spécifique à

Résultats et discussion

la prostate (PSMA). Le PSMA est largement décrit et considéré depuis plusieurs années comme un biomarqueur pertinent pour le diagnostic et le traitement de cette pathologie (voir paragraphe II.B.3.b.i(3), p49).

Dans la littérature, le TH-302 a été testé sur cellules d'adénocarcinome prostatique humain exprimant le PSMA (LNCaP) et a démontré une CI_{50} de $520 \pm 25 \mu\text{M}$ en normoxie *versus* $8,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$ en hypoxie, soit un HCR de 60. L'évaluation de la cytotoxicité de la molécule **ICF05017** sur cultures cellulaires 2D et 3D de cellules LNCaP a également mis en exergue un HCR intéressant ; alors que cette molécule ne possède pas de cytotoxicité pour une concentration inférieure ou égale à $200 \mu\text{M}$, sa CI_{50} est de $3,54 \pm 1,16 \mu\text{M}$ et de $13,68 \pm 5,96 \mu\text{M}$ en hypoxie, respectivement en 2D et 3D (Figure 111A). La cytotoxicité de cette prodrogue est très nettement visualisée par une désagrégation du sphéroïde (Figure 111B). A partir de ce constat de différentiel d'activité, l'utilisation de telles structures pourrait s'avérer être une stratégie pertinente dans le cadre du traitement des cancers de la prostate.

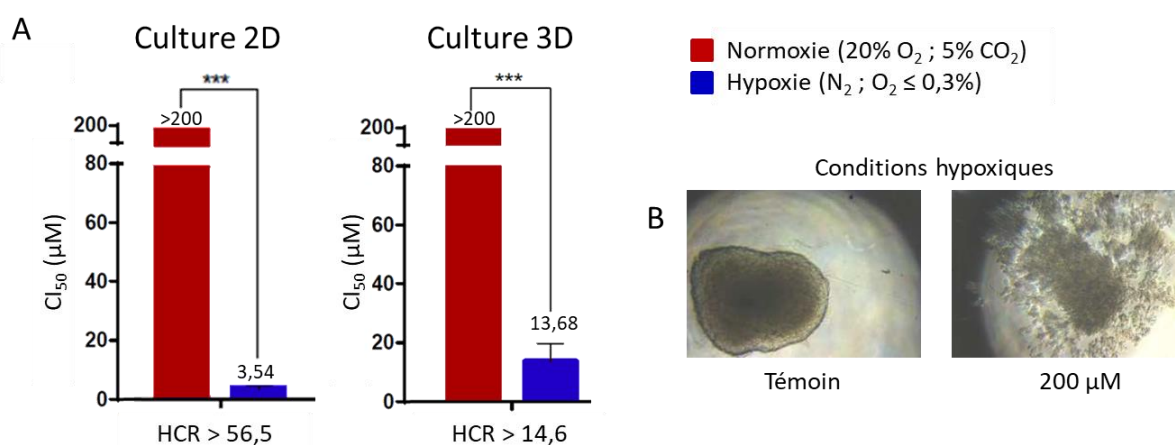


Figure 111 : A : CI_{50} de la molécule **ICF05017** sur culture 2D ou 3D de cellules LNCaP en conditions de normoxie et d'hypoxie ; B : Microscopie optique de sphéroïde 24 heures sans, ou après traitement avec la molécule **ICF05017** (x100)

S'appuyant sur ces premiers résultats, nous avons donc décidé de concevoir une prodrogue bispécifique vectorisée vers les cellules tumorales prostatique surexprimant PSMA. La première molécule envisagée **58** était un analogue de la molécule **ICF05016**, pour lequel la fonction ammonium quaternaire et la chaîne propylique étaient remplacées par le motif Glu-NHCONH-Lys, ligand de PSMA (p 52). Ce motif est lié directement à l'atome de phosphore par le biais de la fonction amine de la lysine (Figure 112). La synthèse envisagée suit la séquence réactionnelle mise en place pour les dérivés **26**, **44** et **46** et est basée sur le couplage entre l'alcool **12**, le chlorure d'acide phosphoramidique **1** et le composé **59** (ligand protégé du PSMA) (Figure 112).

Résultats et discussion

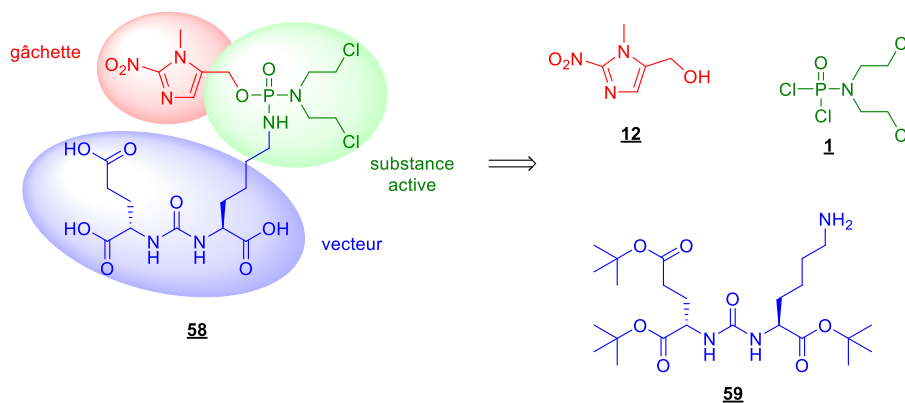


Figure 112 : Structure de la première prodrogue vectorisée envisagée **58** et des précurseurs de synthèse

Un espaceur étant souvent nécessaire pour assurer une affinité substance active/cible et/ou ligand/récepteur efficace, une seconde molécule a été envisagée disposant d'un espaceur entre la substance active et le ligand. Parmi les nombreux choix qu'offre la littérature en termes d'espaceur, notre attention s'est portée sur le motif présent sur une molécule appelée PSMA-617 qui est actuellement en cours d'essais cliniques pour un usage tant diagnostique que thérapeutique des cancers de la prostate (Figure 113). Elle a été conçue avec un vecteur de type Glu-NHCONH-Lys, un espaceur non clivable et une cage de type acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique (DOTA) permettant de chélater un radionucléide métallique choisi en fonction de la finalité attendue. La molécule PSMA-617 a été marquée notamment avec les radionucléides cités dans le Tableau 25 qui ont tous fait l'objet d'une première injection à l'Homme.

Radionucléide utilisé pour le marquage de la molécule PSMA-617	Temps de demi-vie	Type de rayonnement	Energie du rayonnement le plus intense (keV)	Utilisation de la molécule radiomarquée
⁶⁸ Ga	1,13 heures	β ⁺	1899	imagerie TEP ¹⁹⁹
⁴⁴ Sc	3,97 heures	β ⁺	3643	imagerie TEP ³⁸⁶
¹⁷⁷ Lu	6,71 jours	β ⁻	497	radiothérapie interne vectorisée ^{‡,387}
⁹⁰ Y	2,70 jours	β ⁻	2284	radiothérapie interne vectorisée ³⁸⁸
²²⁵ Ac	10,0 jours	α	8377	radiothérapie interne vectorisée ³⁸⁹

Tableau 25 : Radionucléides complexés par le PSMA-617 et rayonnements associés pour un usage diagnostique ou thérapeutique

Si les molécules marquées au scandium 44, à l'yttrium 90 et à l'actinium 225 ne font pas encore l'objet d'essais cliniques en France, le PSMA-617 marqué au gallium 68 est soumis en France à une ATU. La molécule marquée au lutécium 177 est impliquée à ce jour dans pas moins de sept essais cliniques en phase I, II ou III pour des applications en radiothérapie interne vectorisée dans les cas de cancers de la prostate métastatiques hormono-résistants.

[‡] La radiothérapie interne vectorisée consiste à utiliser un vecteur pour acheminer un radionucléide plus spécifiquement dans les tissus tumoraux. Sa désintégration produit un rayonnement suffisamment énergétique pour occasionner des dommages à l'ADN des cellules cancéreuses. Les modes de désintégration (α, β⁺, β⁻ ou γ) sont différents selon les radionucléides ainsi que l'énergie libérée.

Résultats et discussion

Revenons sur le type d'espaceur utilisé par cette molécule. Il comporte un dipeptide d'acides aminés synthétiques : l'acide (S)-2-amino-3-(naphthalén-2-yl)propanoïque et l'acide (1*r*,4*r*)-4-(aminométhyl)cyclohexane-1-carboxylique. Parmi les espaceurs imaginés pour la phamacomodulation de cette molécule par Benešová *et al.*, ce dernier a démontré *in vitro* le meilleur taux d'internalisation ($16,17 \pm 3,66$ % de la dose injectée / 10^6 cellules LNCaP) et *in vivo* le meilleur ratio tumeur / bruit (8,5) ainsi que la meilleure clairance rénale³⁹⁰. Ce dernier critère signe une élimination rapide de la molécule radiomarquée circulante. En plus de cet avantage pharmacocinétique, la présence du noyau naphthalène peut créer une interaction hydrophobe dans une des poches lipophiles du site actif de l'enzyme améliorant l'affinité de la molécule pour le récepteur.

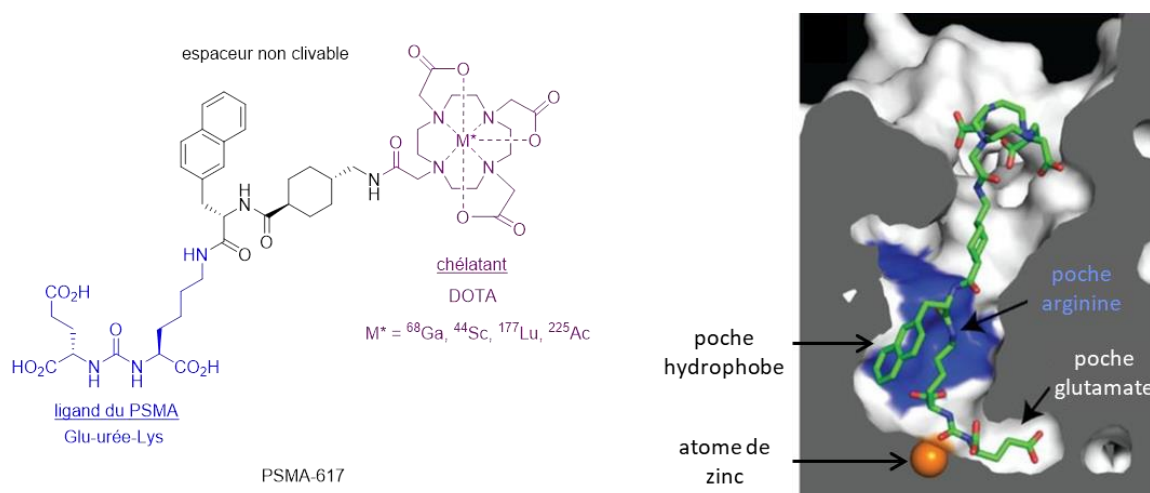


Figure 113 : Structure du PSMA-617 et sa représentation dans la poche du site actif (adapté de Kopka *et al.*)²⁰³

Nous avons donc choisi de concevoir une HAP vectorisée disposant de cet espaceur entre le vecteur et la moutarde organophosphorée (Figure 114). La synthèse de cette molécule **60** a été envisagée à partir des composés **12** et **1** et de la molécule **61** combinant la structure de l'espaceur au vecteur protégé. Cette dernière peut être synthétisée par couplage peptidique entre l'amine **59** et l'acide **62**.

Résultats et discussion

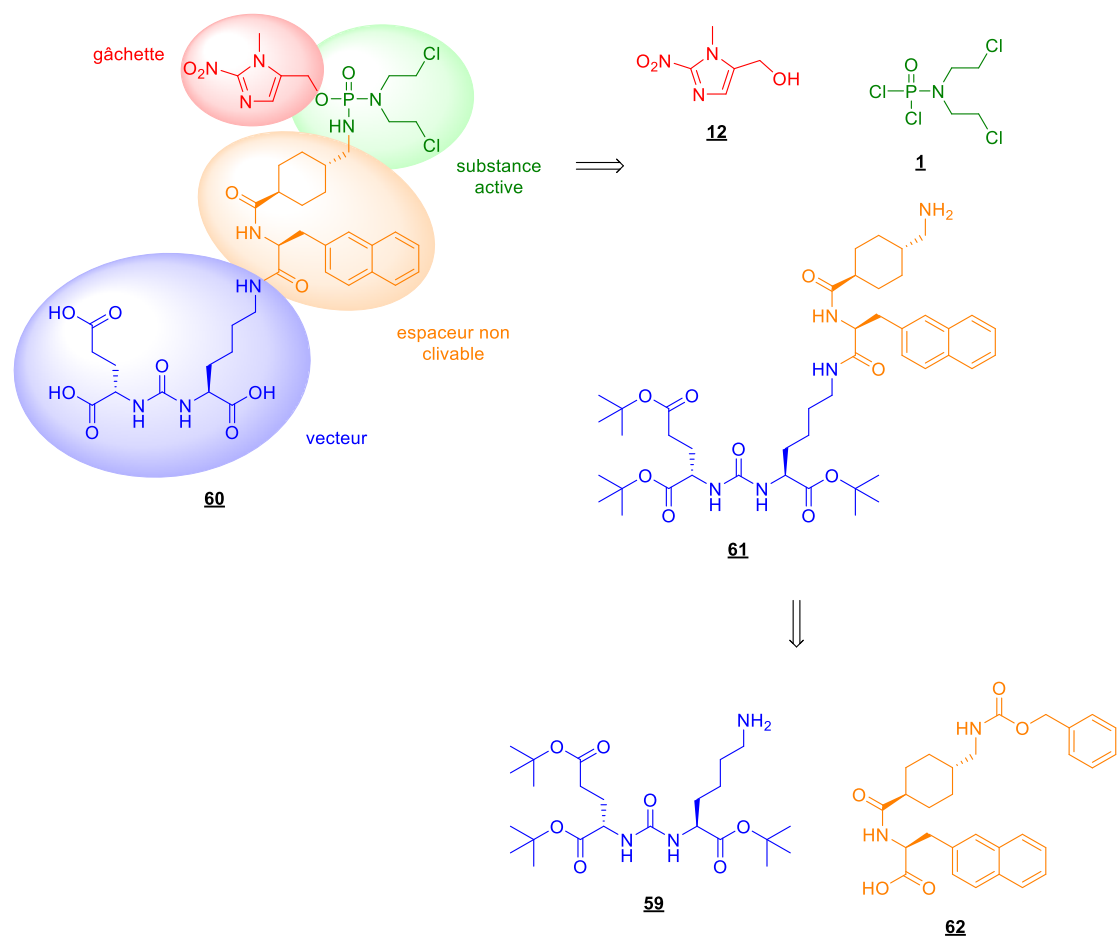


Figure 114 : Structure de la deuxième prodrogue vectorisée envisagée **60** et des précurseurs de synthèse

C. Synthèse des molécules envisagées

1. Synthèses de la molécule 58

La synthèse de la molécule **59** précurseur commun aux deux HAP envisagées, a été réalisée *via* une séquence en 2 étapes, au départ de deux acides aminés commerciaux protégés par des groupements *tert*-butyles : H-Glu(OtBu)-OtBu.HCl et H-Lys(Z)-OtBu.HCl (Tableau 26). Dans la littérature, trois méthodes principales sont utilisées pour le couplage de ces deux acides aminés par l'intermédiaire d'une liaison urée (Tableau 26).

Résultats et discussion

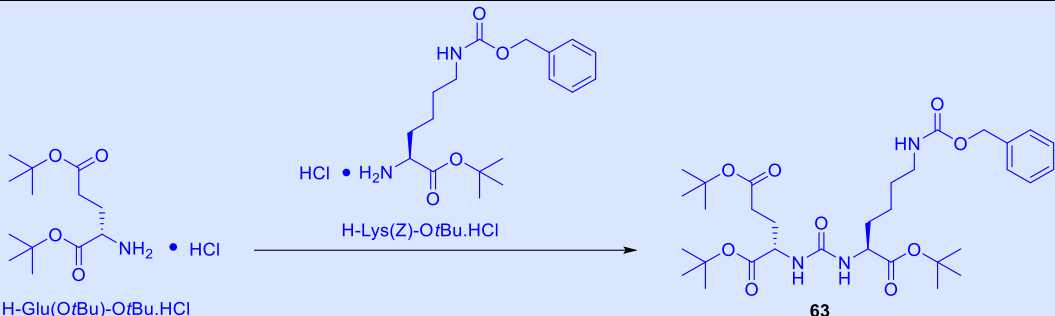
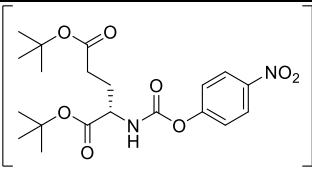
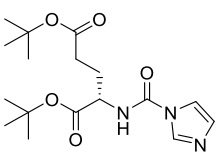
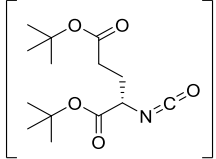
			
Méthode	Conditions	Intermédiaire	Rendement de synthèse du composé 63
<u>Méthode 1</u> Vlahov <i>et al.</i> ³⁹¹	1) <i>p</i> -NO ₂ PhO(CO)Cl, DIPEA DCM, 0 °C puis t.a., 30 min 2) H-Lys(Z)-OtBu.HCl, DIPEA DCM, t.a., 1 h		86%
<u>Méthode 2</u> Babich <i>et al.</i> ³⁹²	<u>Première étape :</u> CDI, TEA, DMAP DCM, 0 °C puis t.a., 18 h 61% <u>Deuxième étape :</u> 1) TMA, TfOMe DCM, 0 °C puis t.a., 1 h 2) H-Lys(Z)-OtBu.HCl DCM, 50 °C, 6 h 74%		45%
<u>Méthode 3</u>			
McEnaney <i>et al.</i> ²⁹⁴			86%
Pearce <i>et al.</i> ³⁹³	1) (Cl ₃ CO) ₂ CO, TEA DCM, -78 °C puis t.a., 30 min 2) H-Lys(Z)-OtBu.HCl, TEA DCM, t.a., 18 h		83%
Murelli <i>et al.</i> ³⁹⁴			86%

Tableau 26 : Méthodes de synthèse issues de littérature du ligand du PSMA de type Glu-urée-Lys protégé

La méthode 1 consiste à former le carbamate de 4-nitrophényle à partir du chlorhydrate de glutamate de di-*tert*-butyle en présence de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA). Cet intermédiaire n'est pas isolé et la lysine protégée est additionnée sous forme de chlorhydrate avec un excès de DIPEA. L'urée substituée est obtenue avec un rendement de 86%. La méthode 2 décrite par Babich *et al.* consiste à faire réagir le carbonyldiimidazole (CDI) avec le chlorhydrate de glutamate de di-*tert*-butyle en milieu basique. L'intermédiaire imidazole est isolé avec un rendement de 61%, puis la fonction urée est activée grâce au triflate de méthyle en présence de triméthylamine (TMA) permettant la méthylation de l'imidazole en position 3. De la lysine protégée est ajoutée et va s'additionner sur l'acylimidazolium intermédiaire très réactif. Après élimination de 1-*N*-

Résultats et discussion

méthylimidazole, l'urée est obtenue avec un rendement de 45% sur deux étapes. Enfin, la méthode 3 utilisant un intermédiaire isocyanate généré par l'action de triphosgène en présence de TEA a été décrite dans la littérature par différents auteurs, McEnaney *et al.*, Pearce *et al.* et Murelli *et al.* et permet d'obtenir l'urée **63** avec des rendements de l'ordre de 85%.

La méthode 2 conduit au composé d'intérêt avec un rendement de seulement 45% et nécessite deux étapes de purification, alors que les méthodes 1 et 3 conduisent à des rendements majorés de 40%. Plus répandue dans la littérature, nous avons optée pour la méthode 3.

La seconde étape consiste en la déprotection de l'amine de la lysine, protégée avec un groupement benzyloxycarbonyle, le plus couramment réalisée de façon quantitative par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon.

Ces deux étapes ont été mises en œuvre au laboratoire selon les conditions décrites dans la littérature avec des rendements respectifs de $81 \pm 9\%$ ($n = 4$) et $89 \pm 7\%$ ($n = 5$), équivalents aux données de la littérature^{393,395} (Schéma 73).

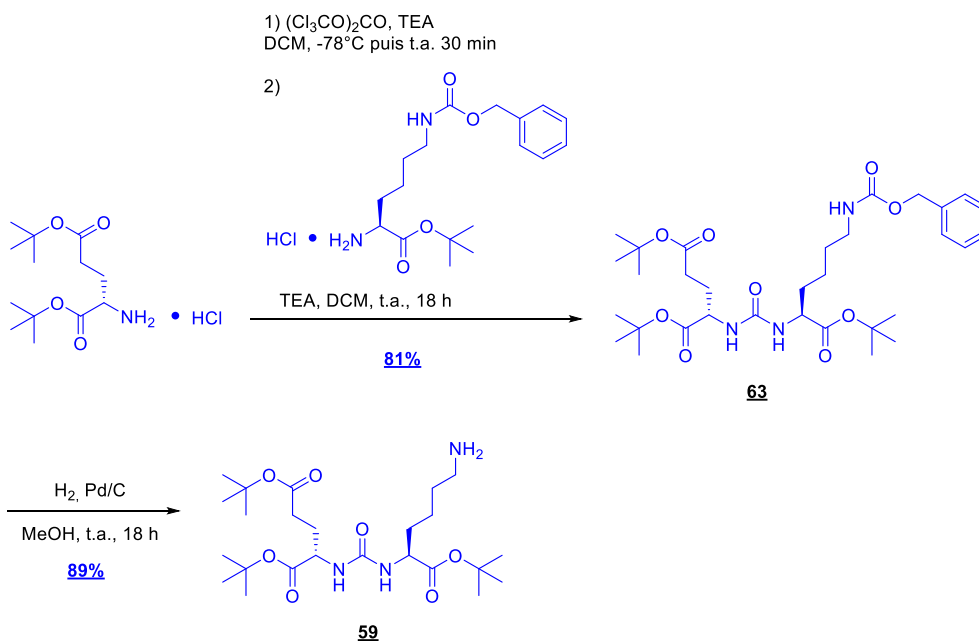


Schéma 73 : Synthèse du composé **59** réalisée au laboratoire, à partir du chlorhydrate du diester tert-butyle de l'acide (S)-glutamique et du carbamate de benzyloxy du chlorhydrate de (S)-lysine

La réaction de couplage entre le ligand protégé **59**, l'alcool **12** et le dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** a été réalisée selon la méthode utilisée pour la synthèse des dérivés de type cyclophosphamide (**26**, **44** et **46**) (Schéma 74) et suivie par RMN ^{31}P (Figure 115). Après addition du composé **1** puis 15 minutes d'agitation à -78°C , le signal de l'intermédiaire était visible à 15,42 ppm avec un ratio **64/1** de 80/20. Après 20 minutes d'agitation, le ligand **59** et un équivalent de TEA ont été additionnés goutte à goutte au milieu réactionnel. Le signal à 15,42 ppm de l'intermédiaire disparaissait progressivement au profit d'un autre signal à 17,45 ppm pouvant correspondre au produit attendu. Après 3 heures d'agitation, l'intermédiaire semblait avoir été consommé en quasi-totalité (90%).

Résultats et discussion

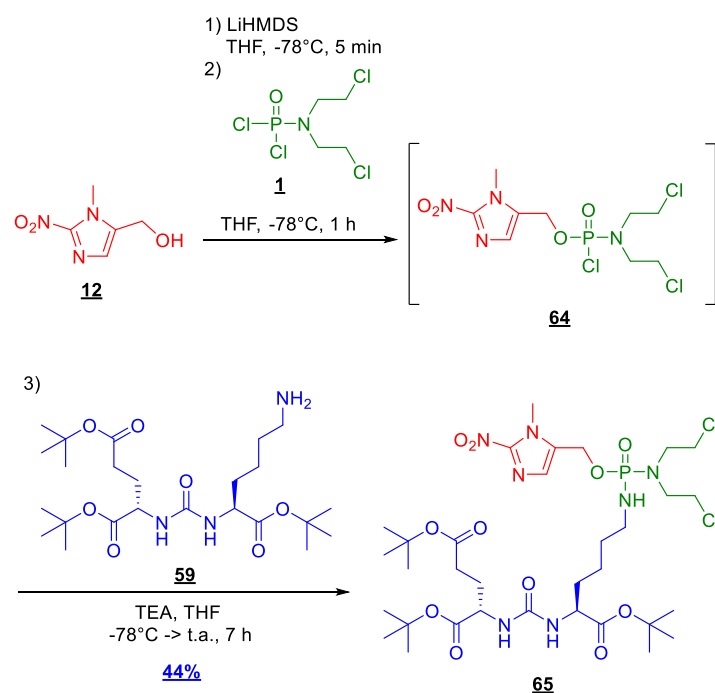


Schéma 74 : Synthèse du composé **65** par phosphorylation du composé **12**

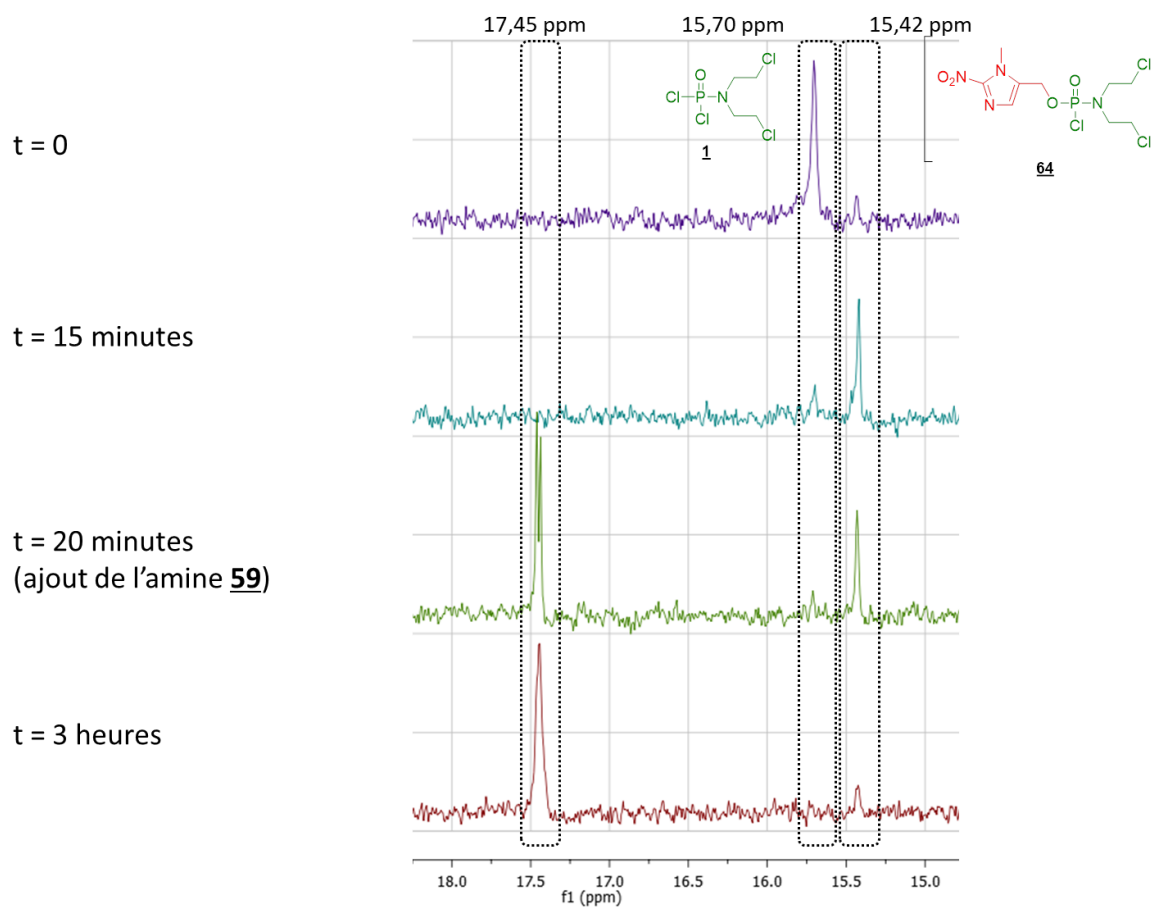


Figure 115 : Suivi cinétique par RMN ^{31}P de la réaction de couplage pour l'obtention du phosphorodiamidate **65**

Résultats et discussion

Après chromatographie sur colonne, le composé **65** a été obtenu avec un rendement de 44%. Les analyses des spectres RMN ^1H et ^{31}P et plus particulièrement l'analyse du spectre RMN ^{13}C montrent un dédoublement de la majorité des signaux (Figure 116) pouvant être lié à la formation de deux diastéréoisomères issus du nouveau centre chiral créé (*i.e.* atome de phosphore).

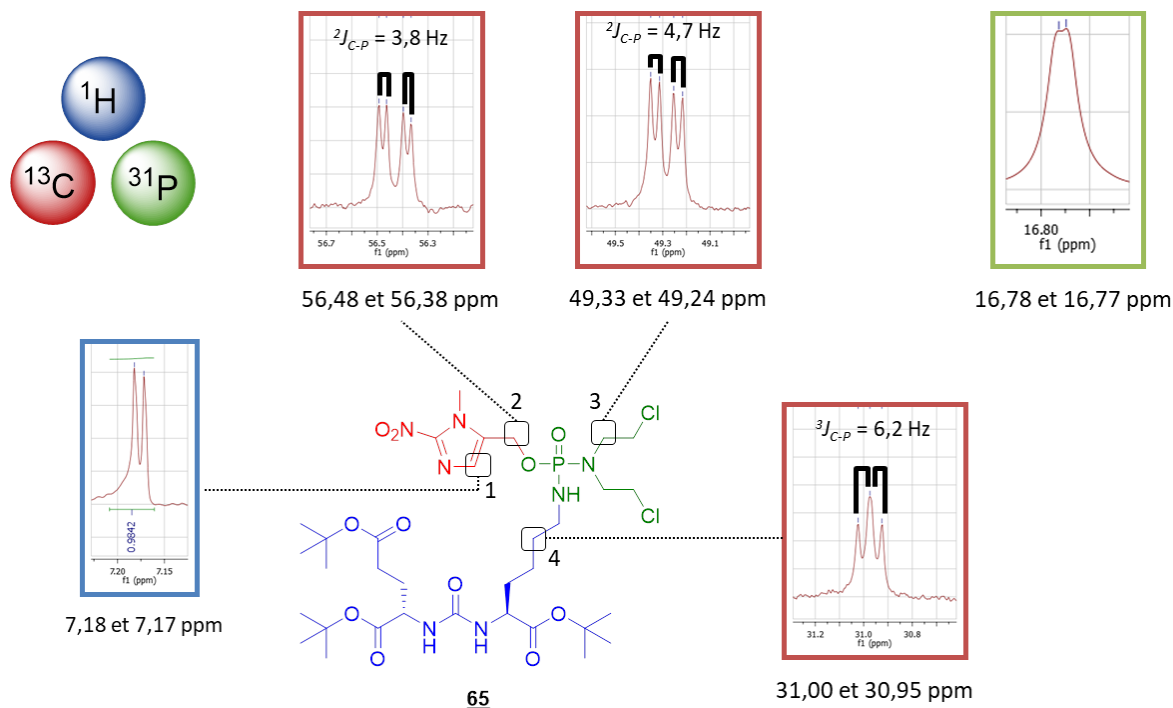


Figure 116 : Eléments de détermination structurale issus de l'analyse des spectres RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P pour la caractérisation du composé **65**

La détermination structurale s'appuie notamment sur les caractéristiques spectrales suivantes :

- Deux singulets à 7,18 et 7,17 ppm intégrant pour un proton sur le spectre RMN ^1H , caractéristiques du proton aromatique (H-1) et un multiplet de 5,18 à 5,01 ppm attribuables aux protons benzyliques (H-2). Les signaux du ligand (partie en bleu) sont en accord avec une partie de ceux retrouvé précédemment pour le composé **63**.
- En RMN ^{13}C , des constantes de couplages $^3J_{\text{C-P}} \approx 6$ Hz, $^2J_{\text{C-P}} \approx 5$ Hz et $^2J_{\text{C-P}} \approx 4$ Hz obtenus pour les carbones C-4, C-3 et C-2 respectivement, qui signent le couplage des différents groupements au phosphore.
- Deux signaux à 16,63 et 16,62 ppm sur le spectre RMN ^{31}P en ratio 50/50.
- Un ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 830,3392 en HRMS, en accord avec la masse théorique de la structure proposée (valeur théorique : m/z 830,3382).

La dernière étape consiste à déprotéger les trois esters *tert*-butyliques de la molécule en milieu acide. De nombreuses méthodes sont présentes dans la littérature pour la déprotection de ce type de ligand comportant une fonction amide ou urée sur une chaîne latérale mais aucun exemple de la littérature ne fait état de liaison phosphorodiamidate. La condition la plus fréquemment retrouvée est celle utilisant de l'acide trifluoroacétique (TFA), pur^{396,397}, dilué dans le DCM³⁹⁸ et/ou additionné de triisopropylsilane (TIS) et d'eau³⁹⁹.

Résultats et discussion

Un essai de déprotection du composé **65** a été réalisé dans du TFA dilué dans du DCM anhydre à 0 °C (Schéma 75) et la réaction a été suivie par LC-MS. Dès 45 minutes, le produit de départ n'est plus visible sur le chromatogramme. Les intermédiaires partiellement protégés ne sont mis en évidence qu'à l'état de traces par détection masse. Ces résultats semblent donc indiquer une dégradation très rapide de ces structures en présence de TFA. Ces observations rejoignent les résultats obtenus suite aux essais de dissociation du complexe de bore du dérivé **26** en milieu acide (p 134).

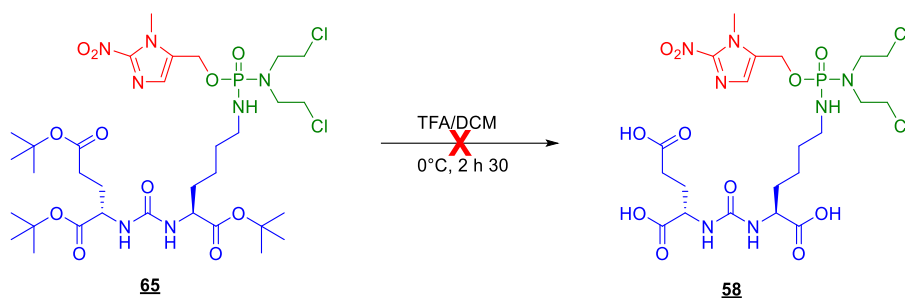


Schéma 75 : Tentative de déprotection du composé **65** en présence de TFA

2. Synthèse des molécules possédant un espaceur triazolique

L'utilisation de conditions acides pour cliver les trois esters *tert*-butyliques semble être à proscrire en présence de la fonction phosphorodiamidate. Il semble donc judicieux de réaliser la réaction de phosphorylation préliminairement à l'introduction du ligand déprotégé. Afin de répondre à cette exigence, notre choix s'est porté sur une réaction de chimie click faisant intervenir une cycloaddition entre un azoture porté par la partie vectrice et un alcyne introduit sur l'ester phosphorodiamidate. Dans ce but, la synthèse de deux nouvelles molécules **66** et **67**, possédant un espaceur modifié par l'introduction d'un motif 4-propyltriazole a été entreprise (Figure 117).

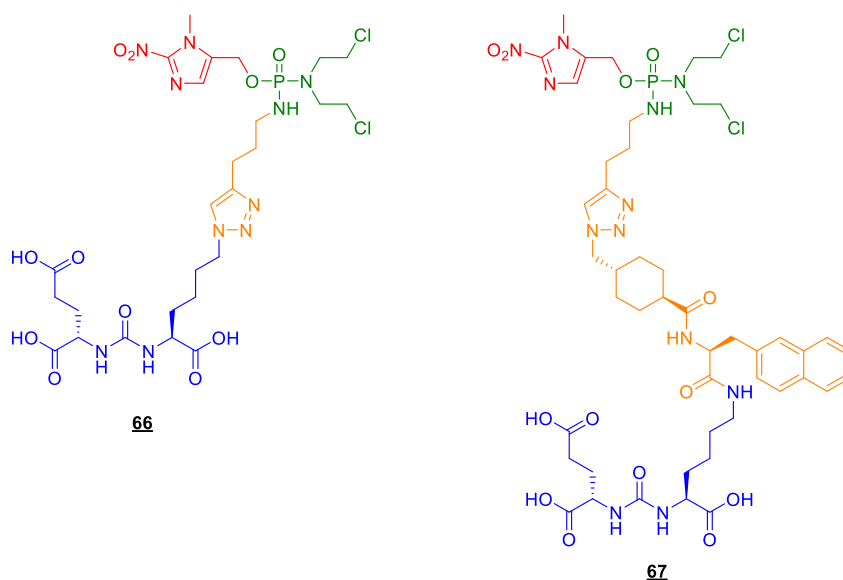


Figure 117 : Structures des deux nouvelles HAP vectorisées vers le PSMA envisagées **66** et **67**

Résultats et discussion

Les voies de synthèses envisagées possèdent un précurseur commun, le dérivé phosphorodiamidate **68** comportant une fonction alcyne vrai sur une chaîne propylique. Ce dernier a été synthétisé dans les conditions de phosphorylation décrites précédemment mais en utilisant cette-fois la pent-4-yn-1-amine. Deux purifications sur colonne de chromatographie sont nécessaires pour s'affranchir d'une impureté non identifiée qui co-élué avec le produit. Le composé **68** est obtenu avec un rendement de 34% (n =2).

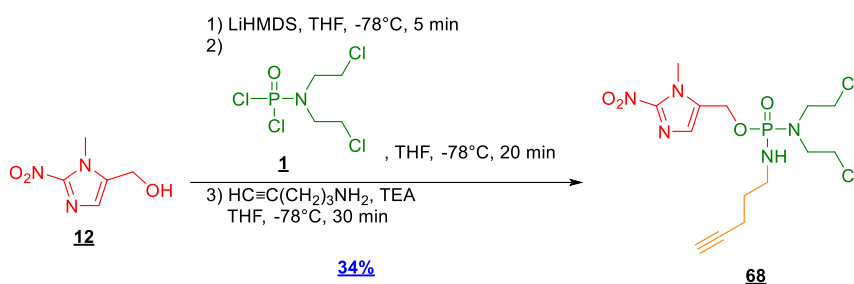


Schéma 76 : Synthèse du précurseur alcyne **68**

3. Synthèse de la molécule **66**

Afin de réaliser la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire, la fonction amine du dérivé **59** doit être convertie en azoture **69**. L'accès à ce composé a déjà été décrit dans la littérature soit à partir du chlorhydrate de l'azoture de 1-*N*-sulfonylimidazole avec un rendement de 64%⁴⁰⁰, soit à partir de l'azoture de triflyle avec des rendements de 52%⁴⁰¹ et 71%³⁹⁴. Ce sont ces dernières conditions qui ont été retenues. L'azoture de triflyle étant instable, il doit être préparé extemporanément à partir d'azoture de sodium et d'anhydride triflique en solution dans un mélange ternaire eau / DCM / MeOH refroidi à 0 °C. Après agitation à température ambiante, décantation et lavages, la solution organique contenant l'azoture de triflyle a été additionnée à une solution méthanolique aqueuse de l'amine **59**, en présence d'une quantité catalytique de sulfate de cuivre. Après purification, le composé **69** est obtenu avec des rendements proches de la littérature de 42% et 78% (n = 2) (Schéma 77).

Le composé **69** a ensuite été déprotégé selon un protocole décrit dans la littérature⁴⁰⁰, basé sur l'utilisation d'un mélange TFA/TIS/H₂O 95/2,5/2,5, v/v/v. Après purification par chromatographie préparative en phase inverse (C18), le triacide **70** est obtenu avec des rendements de 29% et 37% (n = 2).

Résultats et discussion

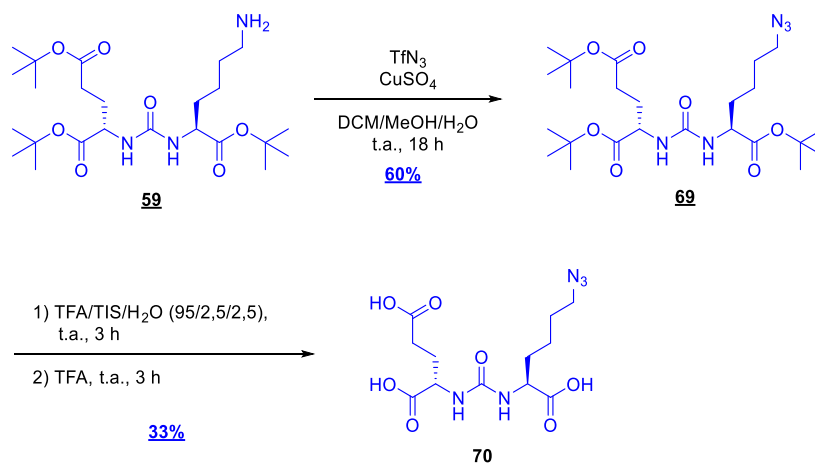


Schéma 77 : Voie d'accès au composé **70** à partir du composé **59**

Les composés **68** et **70** ont alors été engagés dans une réaction de chimie click dans un mélange équimolaire de *tert*-butanol et d'eau à température ambiante, avec addition d'acide ascorbique et de sulfate de cuivre pour créer l'ion cuivreux capable de catalyser la cycloaddition. Même après des additions répétées de solutions de sulfate de cuivre et d'acide ascorbique sur 48 heures, la CCM indiquait une consommation incomplète de l'alcyne **68**. Après purification du milieu réactionnel, aucune fraction ne contenait le produit d'intérêt.

L'utilisation de ligands peut s'avérer nécessaire afin d'activer la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire en stabilisant les ions cuivreux. Parmi ces ligands, le tris(benzyltriazolylméthyl)amine (TBTA), catalyseur de Fokin⁴⁰² est un dérivé de type oligotriazoles, qui est largement décrit dans la littérature comme chélateur du cuivre (+I), le protégeant de l'oxydation, de la dismutation, et ainsi améliorant son activité catalytique. Notre réaction de cycloaddition se déroulant dans un milieu aqueux, un analogue du TBTA, le tris{(1-hydroxy-propyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl}amine (THPTA) possédant trois fonctions alcool lui conférant une meilleure hydrosolubilité a été utilisé.

Un second essai de cycloaddition a donc été réalisé dans les mêmes conditions (15% molaire d'acide ascorbique et 5% molaire de sulfate de cuivre), mais cette fois avec l'addition d'une quantité catalytique de THPTA (5% molaire). Comme précédemment, malgré plusieurs ajouts répétés de catalyseurs allant jusqu'à 0,6 équivalent d'acide ascorbique et 0,10 équivalent de sulfate de cuivre et de THPTA, une consommation incomplète de l'alcyne **68** est observée. Après 3,5 jours d'agitation la réaction a été stoppée et le brut réactionnel purifié par chromatographie préparative en phase inverse (C18). Le composé d'intérêt **66** est obtenu après lyophilisation avec un rendement de 37% (Schéma 78). La structure du composé **66** a été confirmée par l'analyse des spectres RMN ¹H, ¹³C, appuyée par des expériences COSY et HSQC, ainsi que par une analyse HRMS. L'apparition sur le spectre RMN ¹H du proton caractéristique du triazole à 7,77 ppm témoigne notamment de l'efficacité de la cycloaddition.

Résultats et discussion

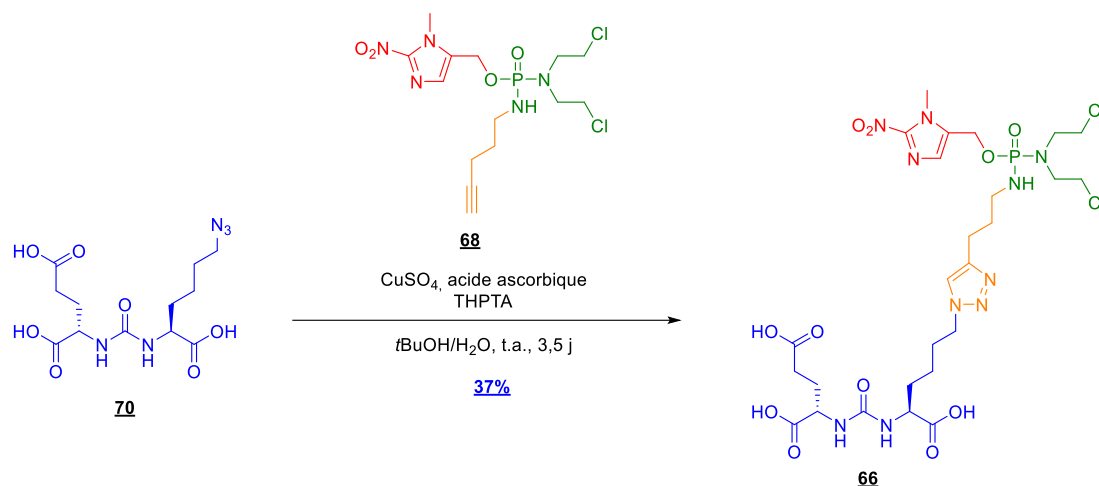


Schéma 78 : Réaction de chimie click entre les composés **70** et **68** pour la synthèse du composé **66**

4. Synthèse de la molécule **67**

La deuxième molécule envisagée, **67**, possède l'espaceur développé pour la molécule PSMA-617 ainsi que le motif propyl triazole, entre le ligand GluNHCONHLys et le phosphorodiamidate. La synthèse supportée du PSMA-617 est décrite dans la littérature^{390,399}, mais nous avons opté pour une synthèse classique en solution. La séquence réactionnelle envisagée comporte 6 étapes au départ de la (*S*)-napht-2-ylméthylglycine, à savoir 2 couplages peptidiques, des protections et déprotections d'acides carboxyliques et une cycloaddition (Schéma 79).

La fonction acide de la (*S*)-(napht-2-yl)méthylglycine a été protégée sous la forme d'un ester *tert*-butylique en présence d'acide perchlorique et d'acétate de *tert*-butyle selon une procédure utilisée par Cheng K. *et al.* pour la protection de la phénylalanine avec un rendement de 89%⁴⁰³. Le produit **71** a été obtenu analytiquement pur après traitement réactionnel par lavages successifs avec un rendement de $66 \pm 3\%$ ($n = 3$).

L'acide (1*r*,4*r*)-4-(azidométhyl)cyclohexane-1-carboxylique a été condensé avec l'amine **71** par synthèse peptidique en milieu basique, en utilisant de l'hexafluorophosphate de benzotriazole-tétraméthyluronium (HBTU) comme agent de couplage, et un équivalent d'hydroxybenzotriazole (HOBT), afin d'éviter la racémisation des centres stéréogènes durant la réaction^{404,405}. Le peptide protégé **72** a été obtenu avec un rendement de 97%.

L'ester *tert*-butylique du composé **72** a ensuite été clivé avec un mélange TFA/DCM, 1/2, v/v additionné à 0 °C. Après 2 heures 30 de réaction à température ambiante, l'acide carboxylique **73**, obtenu après évaporation avec un rendement quantitatif, a été engagé dans l'étape suivante sans autre purification. Ce dernier a alors été couplé avec l'amine **59**, selon les mêmes conditions que décrites précédemment pour conduire à l'azoture **74** avec un rendement de 56%. Les fonctions acides du composé **74** ont ensuite été libérées en présence de TFA à 0 °C puis sous agitation durant 2 heures à température ambiante. Après évaporation du milieu réactionnel et précipitation dans l'éther diéthylique anhydre, le triacide **75** a été isolé de manière quantitative. Ce dernier a été engagé en réaction de cycloaddition dans les mêmes conditions que pour le composé **66** avec le catalyseur THPTA. Là encore la réaction semble peu efficace. L'addition d'un équivalent d'acide ascorbique et un équivalent de sulfate de cuivre, contrairement aux conditions catalytiques décrites dans la littérature, a été nécessaire pour observer en CCM la disparition totale du réactif **68** après 30

Résultats et discussion

minutes d'agitation à température ambiante. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie préparative en phase inverse (C18) et les fractions d'intérêt lyophilisées.

La structure du composé **67** a été confirmée après analyse des spectres RMN ^1H , ^{13}C , ^{31}P appuyées par des expériences de type COSY et HSQC et par analyse HRMS. Le spectre de masse obtenu montre la présence de l'ion monochargé $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1107,3962 (valeur théorique m/z 1107,3981) ainsi que l'ion dichargé correspondant $[\text{M}+2\text{H}]^+$ m/z 554,2026 (valeur théorique : m/z 554,2027). Il est à noter que pour certains lots, le spectre de masse indiquait la présence d'un second produit caractérisé par les signaux relatifs aux ions dichargé $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (m/z 562,7188) et monochargé $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1124,4297. Ce second composé provient de la réaction parasite d'estérification d'une fonction acide carboxylique avec le méthanol deutéré ($\text{C}_{48}\text{H}_{66}\text{D}_3\text{Cl}_2\text{N}_{12}\text{O}_{13}\text{P}_2^{2+}$ valeur théorique $[\text{M}+2\text{H}]^+$: 562,7200). Cette réaction parasite est observée également avec l'intermédiaire réactionnel **75** précédant.

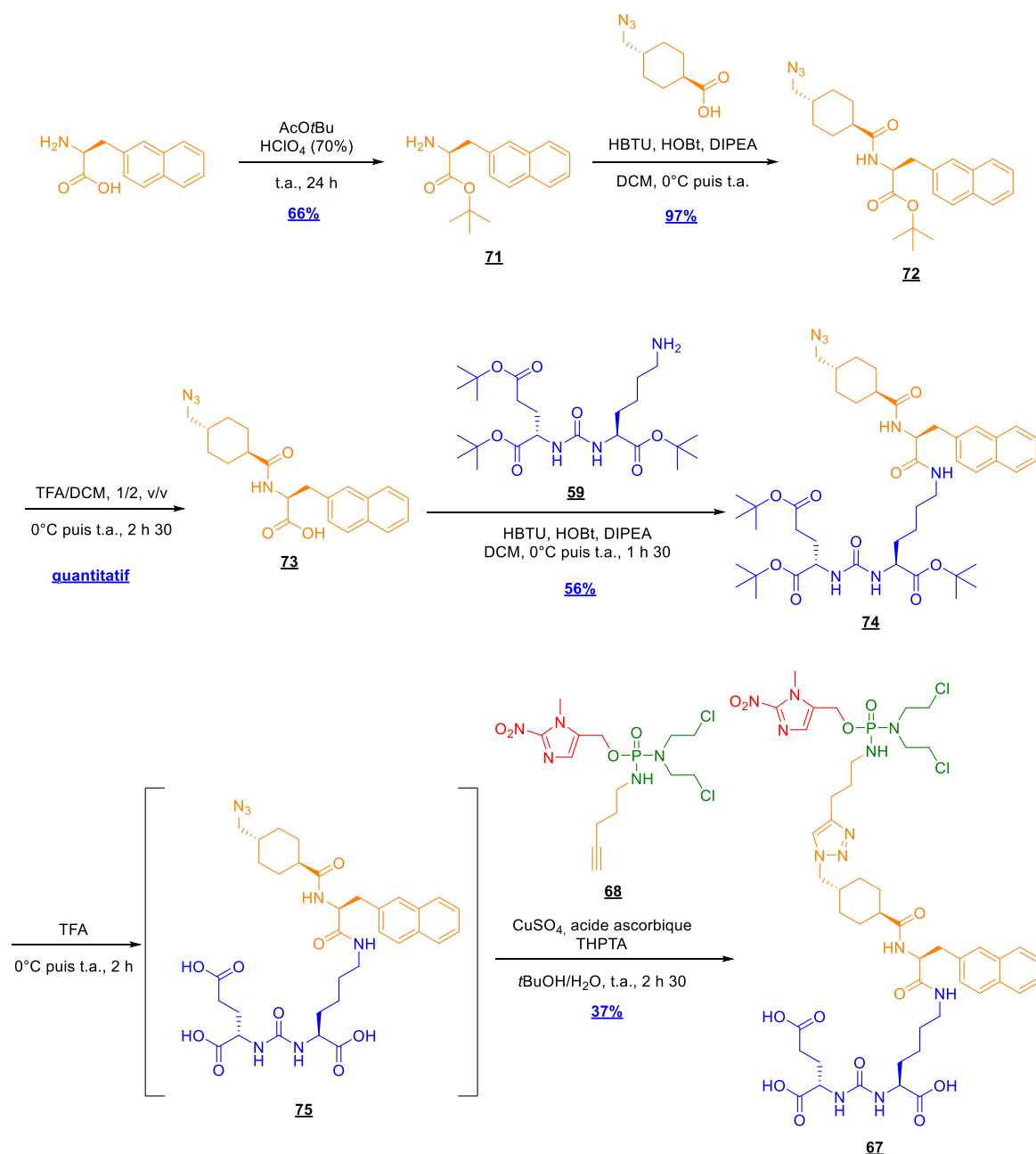


Schéma 79 : Synthèse du composé **67** à partir de la (S)-(naphth-2-yl)méthylglycine

Résultats et discussion

D. Etude de stabilité et de clivage de la prodrogue 66 par réduction enzymatique

L'activation enzymatique par la nitroréductase d'*Escherichia coli* de la prodrogue **66** a été évaluée dans les conditions décrites précédemment, moyennant l'ajout de DMSO pour permettre la dissolution du composé (concentration de 0,3% dans le milieu d'incubation). Afin d'estimer l'impact du ligand GluNHCONHLys, nous avons également réalisé une étude avec la molécule dite « non vectorisée » **ICF05017**.

Les deux prodrogues se sont révélées stables dans les conditions utilisées (PBS, 37 °C) en présence de NADPH seule durant 2 heures. En présence de l'enzyme, l'analyse des chromatogrammes montre que les composés **ICF05017** (Figure 118, courbe bleue) et **66** (Figure 118, courbe verte), sont totalement consommés après environ 400 secondes (~7 minutes) d'incubation, soit un temps de demi-vie des prodrogues **ICF05017** et **66** estimé à 13 et 45 secondes respectivement.

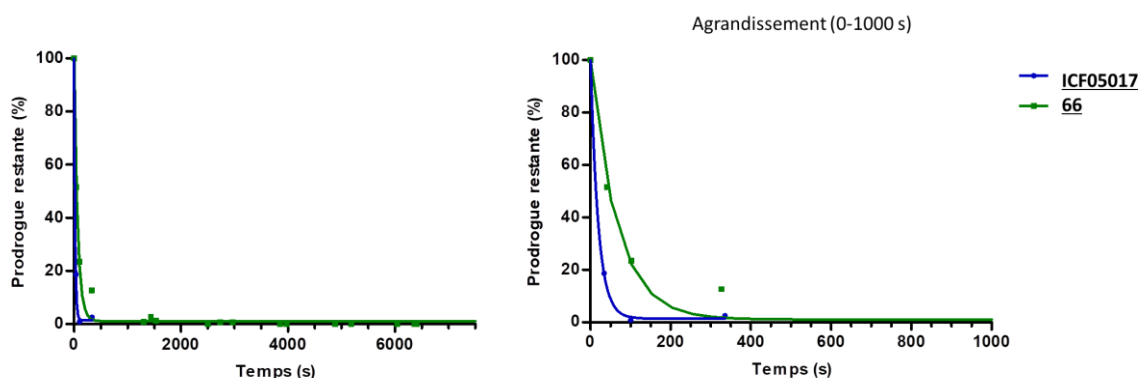


Figure 118 : Evolution du pourcentage des prodrogues **ICF05017** et **66** en fonction du temps en présence de nitroréductase et de NADPH à 37 °C dans le PBS

Ces deux prodrogues sont donc bien substrats de cette nitroréductase : la présence du bras espaceur et du ligand ne semble donc pas nuire à la réaction enzymatique permettant de libérer le principe actif.

E. Etude de l'affinité de la prodrogue 66 pour le PSMA

Dans le but d'évaluer l'affinité de la molécule **66** pour l'antigène PSMA, un test de compétition inhibitrice a été réalisé avec un ligand de référence radioiodé, **[¹²⁵I]-ICF01305**, précédemment décrit dans la littérature²¹², sur des cellules de carcinome prostatique humain LNCaP-Luc (PSMA+). Ce ligand a été choisi en raison de sa forte affinité PSMA, quantifiée par une constante d'inhibition de 0,010 nM. Cette molécule radiomarquée à l'iode 125 a été utilisée pour des tests de compétition d'affinité entre la molécule étudiée **66** et l'antigène PSMA. A noter que la mise au point du radiomarquage et des tests de compétition ont été réalisés au laboratoire pour l'ensemble des programmes de recherche en cours utilisant des vecteurs ciblant le PSMA.

Lors de ces développements, j'ai participé avec d'autres collègues radiochimistes à la mise en place de la radiosynthèse du composé **[¹²⁵I]-ICF01305** ainsi qu'aux évaluations biologiques réalisées par Sophie Besse (Figure 119). Le marquage à l'iode-125 a été réalisé à haute activité spécifique par substitution électrophile aromatique du 4-tributylstannylbenzoate de *N*-succinimide (**ICF01309**), un acide aromatique activé sous forme de *N*-hydroxysuccinimide. La réaction d'iodation électrophile nécessite l'obtention d'ions [¹²⁵I]-I⁺ qui peuvent être facilement obtenus à partir d'une solution

Résultats et discussion

aqueuse d'iodures de sodium [^{125}I]-NaI et d'un oxydant doux. Le choix s'est porté sur la chloramine-T qui est largement décrit dans la littérature pour ce type de marquage aux radioisotopes de l'iode. Après 15 minutes à température ambiante la réaction est totale et le 4- ^{125}I -iodobenzoate de *N*-succinimidyle (**4- ^{125}I -SIB**) est isolé après purification par chromatographie sur colonne semi-préparative (C18) avec un rendement radiochimique de 58%, une pureté radiochimique supérieure à 98% et une activité molaire de 2,7 GBq/ μmol . L'identification du produit a été réalisée en UV-radio-HPLC analytique par co-injection avec la référence froide. Cet ester activé radiomarké a ensuite été mis en réaction dans du DMSO avec le ligand du PSMA, **ICF01268** sous forme de sel de TFA, en présence d'un excès de DIPEA et à température ambiante. Après 45 min, le milieu réactionnel est purifié par RP-HPLC (C18) puis la fraction d'intérêt est diluée par l'eau et déposée sur une cartouche SepPack C18 light. Après élution par l'éthanol puis évaporation, la molécule **^{125}I -ICF01305** est obtenue avec un rendement radiochimique de 67%, une pureté radiochimique supérieure à 98% et une activité molaire de 2,1 GBq/ μmol . Son identification a été réalisée comme précédemment par UV-radio-HPLC analytique comparativement au produit froid co-injecté avec l'échantillon (Figure 119).

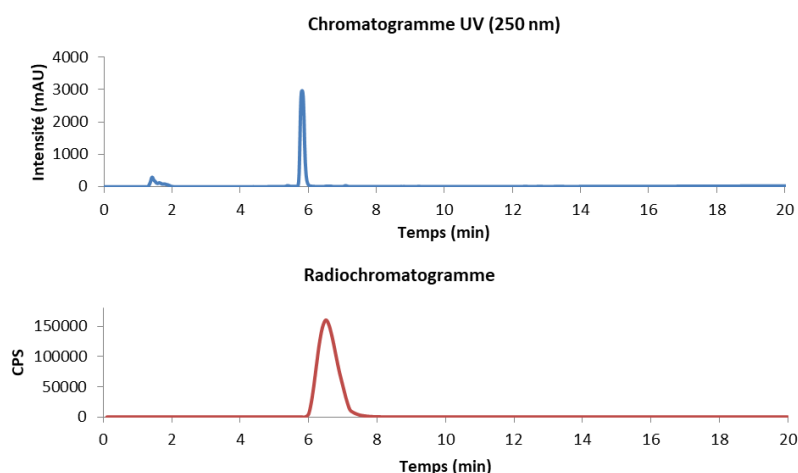
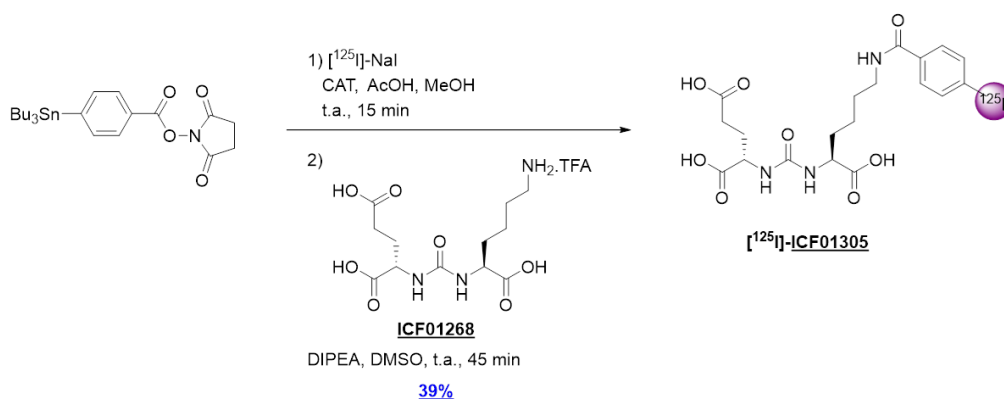


Figure 119 : Radiosynthèse et contrôle qualité par UV-radio-HPLC du ligand **^{125}I -ICF01305**. Les chromatogrammes ont été obtenus après co-injection en HPLC du produit radiomarké et de la référence « froide » **ICF01305**. Le décalage des temps de rétention entre les deux chromatogrammes est dû au montage en série des détecteurs de radioactivité et UV

L'affinité de la molécule pour le récepteur PSMA a été estimée en mesurant la concentration de molécule nécessaire pour inhiber de 50% la fixation du radioligand **^{125}I -ICF01305** sur les cellules LNCaP. Cette mesure a été réalisée en incubant des cellules, avec des concentrations croissantes de

Résultats et discussion

ligand d'intérêt et une concentration fixe du radioligand [¹²⁵I]-ICF01305. Après une heure de contact, les cellules ont été récupérées, lysées et la radioactivité mesurée dans le culot cellulaire. Les courbes d'inhibitions obtenues ont permis de déterminer les CI₅₀ du composé **66** ainsi que du PMPA, ligand de référence pour les tests d'affinité au PSMA. Celles-ci sont respectivement de 19 nM et 188 nM, synonyme d'une affinité plus importante de notre ligand **66** (Figure 120).

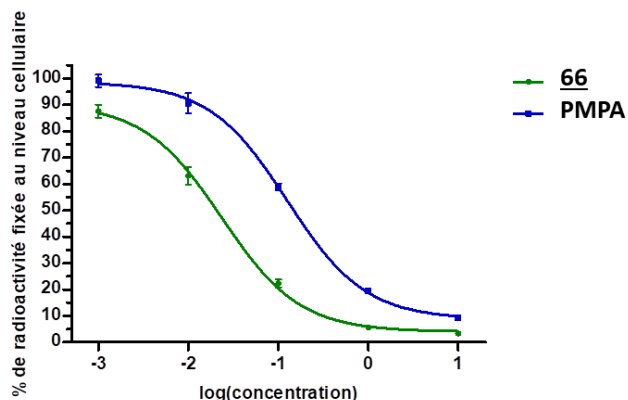


Figure 120 : Affinité relative pour le PSMA de la prodroge **66** ou du PMPA en présence du radioligand [¹²⁵I]-ICF01305

F. Etude de l'activité cytotoxique de la prodroge **66**

Après validation du clivage par réduction enzymatique de la molécule **66** et de son affinité pour l'antigène PSMA, une étude de cytotoxicité a été réalisée sur deux lignées cellulaires d'adénocarcinome prostatique humain, PC3-Luc et LNCaP-Luc, respectivement PSMA- et PSMA+. Alors que la molécule **ICF05017** montre un différentiel de cytotoxicité intéressant (HCR > 56) sur les cellules LNCaP-Luc, la molécule **66** ne possède quant à elle aucune cytotoxicité sur les deux lignées étudiées, que ce soit en normoxie ou en hypoxie et ce jusqu'à des concentrations de 200 µM (Figure 121).

Résultats et discussion

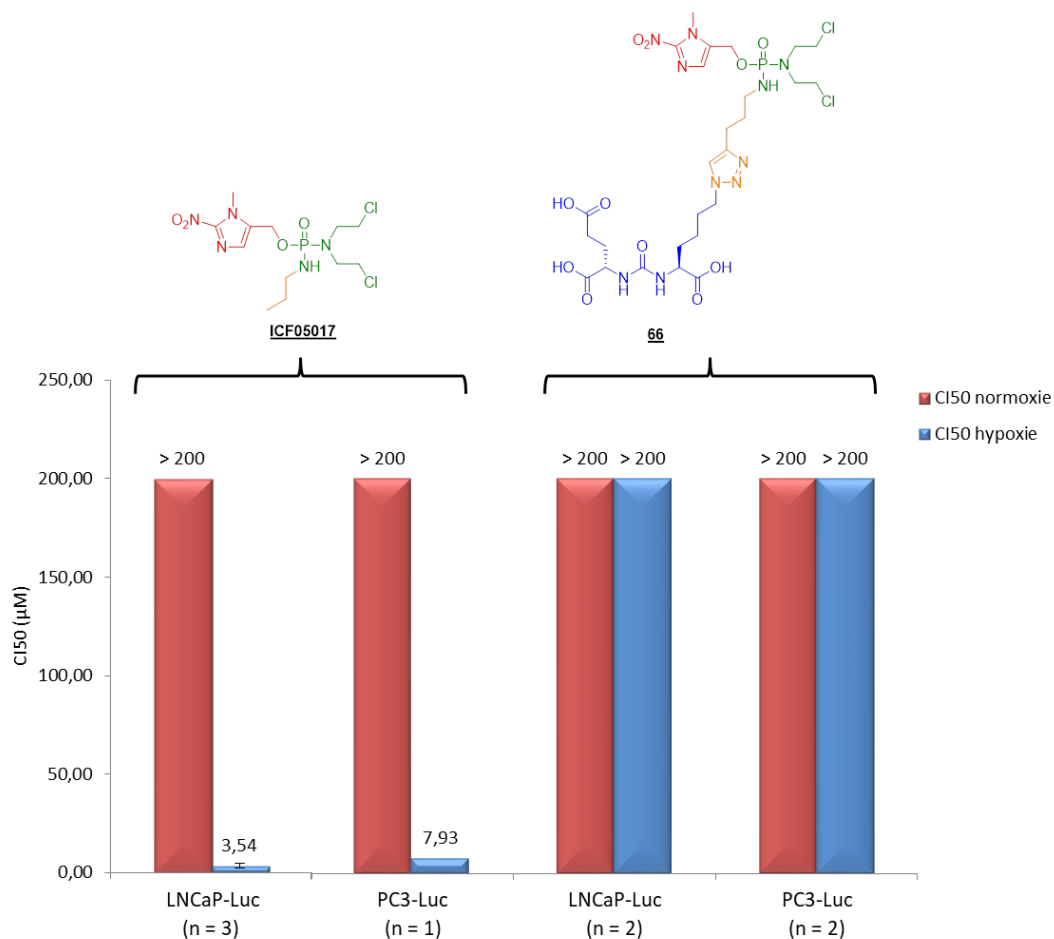


Figure 121 : CI_{50} des composés **ICF05017** et **66** sur les cellules LNCaP-Luc et PC3-Luc

Cette absence d'activité en hypoxie pourrait être liée à une mauvaise libération de la moutarde alkylante, toutefois nos résultats de réduction enzymatique semblent contredire cette hypothèse. De plus, l'affinité entre la molécule et l'antigène PSMA a été préalablement validée avec les tests de déplacements de ligand. Les raisons de cette absence de cytotoxicité de la molécule **66** restent à déterminer.

Conclusion et perspectives

Les travaux décrits dans ce manuscrit avaient pour objectif de développer une approche de prodrogues bispécifiques, activables en situation d'hypoxie et vectorisées vers le tissu tumoral dans le cadre de deux pathologies cancéreuses : le chondrosarcome, maladie orpheline avec environ 120-150 nouveaux cas par an en France et le cancer de la prostate, tumeur maligne la plus couramment diagnostiquée chez les hommes avec environ 48 000 nouveau cas en France (2013) et qui reste une des principales causes de décès liés au cancer.

I. HAP vectorisées vers la matrice extracellulaire du chondrosarcome

La première partie de cette thèse a permis la synthèse de sept molécules originales, dotées d'une part, d'une fonction ammonium quaternaire servant de vecteur vers la matrice extracellulaire du chondrosarcome et d'autre part, d'un cycle 2-nitroimidazole assurant une activation spécifique en conditions d'hypoxie.

Deux séries de prodrogues vectorisées ont été synthétisées présentant un greffage de la chaîne vectrice *N,N,N*-triméthylpropylaminium soit en C-4, soit en N-1 du cycle imidazole (Schéma 80).

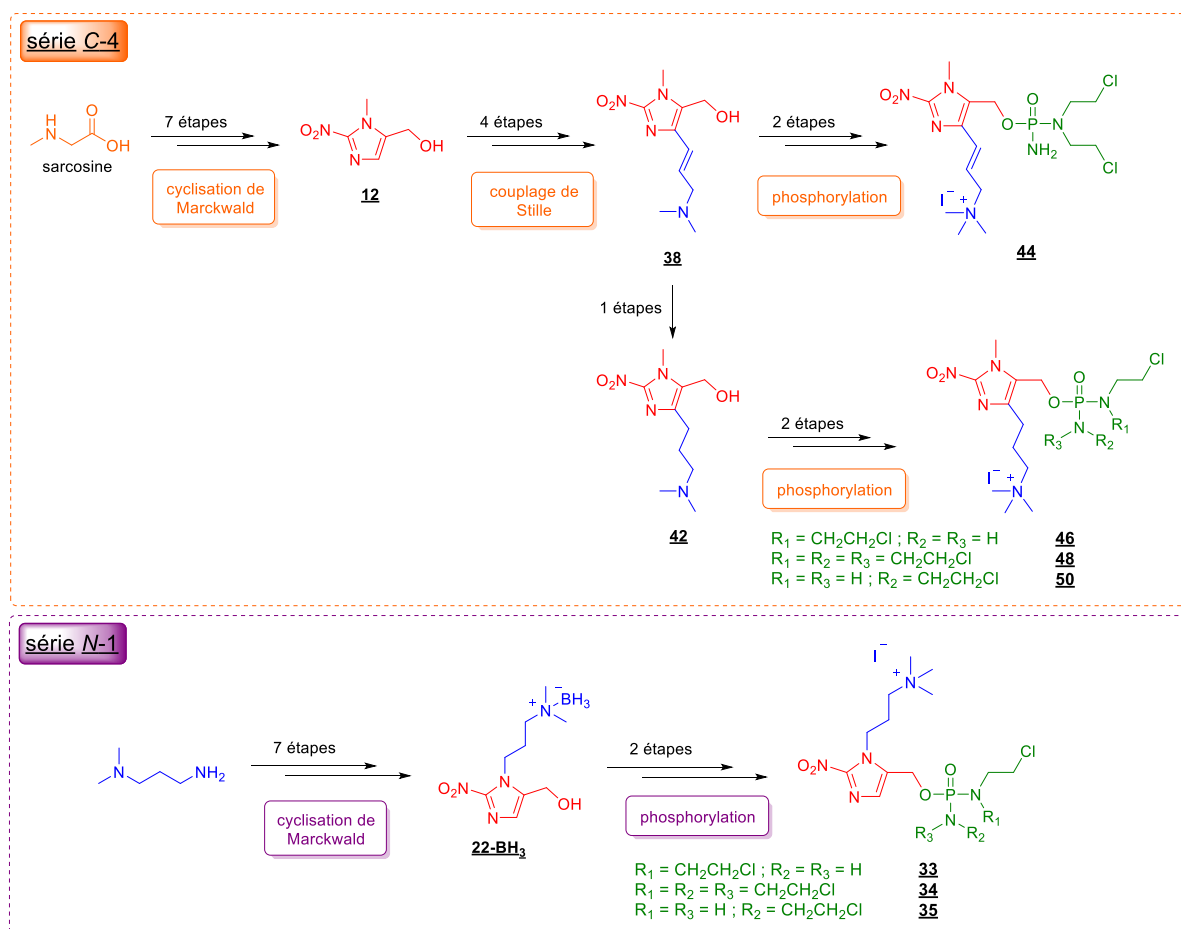


Schéma 80 : Récapitulatif des voies de synthèse des sept prodrogues développées pour le chondrosarcome

Conclusion et perspectives

Concernant la série C-4, la séquence réactionnelle utilisée reposait sur une fonctionnalisation par le biais d'un couplage de Stille du (1-*N*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazo-5-yl)méthanol, **12**, obtenu par construction *de novo* du cycle imidazole selon une cyclisation de Markwald. Cette étape de cyclisation est reconnue dans la littérature comme étant peu reproductible, et constitue le point critique de cette voie de synthèse. Ces conditions réactionnelles ont donc été optimisées, tant en fonction de nos observations qu'à la suite des travaux d'O'Connor *et al.*, nous permettant d'obtenir le composé **12** à partir de la sarcosine en sept étapes avec un rendement global de 19%.

A partir de ce précurseur, le composé (2-nitro-1*H*-imidazo-5-yl)méthanol **42**, fonctionnalisé en position 4 par une chaîne précurseur du vecteur *N,N,N*-triméthylpropylaminium, a été obtenu avec un rendement de 10%, selon une séquence en cinq étapes.

Les phosphorodiamidates *N,N*-bis(2-chloroéthyle) (*i.e.* de type cyclophosphamide) **44** et **46** et *N,N,N',N'*-tétrakis(2-chloroéthyle) **48**, ont pu être obtenus à partir des chlorures de phosphoryles respectifs **1** et **2**. Concernant l'accès à la moutarde de type *N,N'*-bis(2-chloroéthyle) **50** (*i.e.* de type ifosfamide), une méthode alternative à la réaction de Mitsunobu, classiquement décrite dans la littérature pour la synthèse ce type de composé (*e.g.* TH-302), a dû être développée. Cette dernière a consisté à phosphoryler l'alcool **42** par l'oxychlorure de phosphore puis à condenser deux équivalents de chloroéthylamine.

La mise au point des conditions des différentes réactions de phosphorylation s'est appuyée sur un suivi par RMN ³¹P des cinétiques de réaction. Lors de la synthèse des phosphorodiamidates, des problèmes de stabilité des intermédiaires amine tertiaire ont été rencontrés, mais ont pu être contournés avec succès par l'utilisation d'un complexe amine-borane de l'alcool **42**, suite aux observations faites dans la série *N*-1. Après une étape de phosphorylation de ce dernier, une transchélation suivie d'une quaternisation de l'amine tertiaire ont permis d'obtenir les trois prodrogues vectorisées **46**, **48** et **50**.

Concernant la série N-1, les conditions de cyclisation optimisées pour le dérivé 1-*N*-méthyle **12** ont été transposées à la synthèse *de novo* de l'analogue 1-*N*-(3-(*N',N'*-diméthylamino)propyle) **22**. Malgré l'utilisation de conditions identiques, le rendement de l'étape de cyclisation s'est avéré inférieur à celui obtenu pour le dérivé méthylé (*i.e.* 21% *versus* 60%). La synthèse des phosphorodiamidates **26**, **27** et **29** n'a pas été possible à partir des précurseurs amine tertiaire, en raison d'un manque de réactivité des réactifs engagés et/ou d'une instabilité des produits obtenus. L'introduction d'une fonction amine tertiaire s'est révélée problématique par bien des aspects tout au long de ces travaux soit en raison de sa polarité (lors des phases de traitement et de purification) ou de sa nucléophilie (formation du composé 5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2-*a*]pyrimidine **23** par cyclisation intramoléculaire spontanée du dérivé 2-nitro-1*H*-imidazole-5-carboxylate d'éthyle **21**). Cette fonction a donc été « protéger » sous la forme d'un complexe de borane, généré lors de l'étape de réduction de l'ester **21** par le borohydrure de sodium. Cette stratégie originale a permis d'obtenir *in fine* les prodrogues ammoniums quaternaires de la série *N*-1 **33**, **34** et **35** à partir de la *N,N*-diméthylaminopropylamine commerciale en 9 étapes.

Afin de pouvoir établir des relations structure-activité et d'identifier un candidat pour une évaluation pré-clinique plus approfondie sur modèle animal, des études *in tubo* et *in vitro* ont été réalisées sur l'ensemble des prodrogues synthétisées, en termes d'affinité pour l'aggrécane, de stabilité à pH physiologique et à 37 °C, de clivage spécifique par réducteur chimique ou enzymatique et de cytotoxicité en normoxie *versus* hypoxie sur lignées cellulaires de chondrosarcome humain H-EMC-SS.

Conclusion et perspectives

Les études de SPR des sept prodrogues vis-à-vis de l'aggrécane ont permis de démontrer une affinité entre ce protéoglycane et les prodrogues synthétisées, sensiblement identique à celle du hit **ICF05016** ($K_D = 23$ mM) pour les dérivés **33**, **35**, **44**, et **50**. Pour les ammoniums quaternaires **34**, **46** et **48**, une affinité améliorée a été observée, notamment pour le composé **48** qui affiche une constante de dissociation de 3,2 mM.

Ces prodrogues ont ensuite été soumises *in tubo* à un environnement réducteur mimant l'hypoxie. En présence de dithionite de sodium, un réducteur chimique, un clivage rapide de l'ensemble des composés a été observé en RMN ^{31}P (temps de demi-vie inférieur à 6 minutes exception faite pour le composé **44** fonctionnalisé en C-4 avec une fonction alcène), associé à une libération de la moutarde cytotoxique.

Les études de cytotoxicité *in vitro* sur une lignée cellulaire de chondrosarcome myxoïde humain extra-squelettique (H-EMC-SS) ont démontré que les nouvelles prodrogues synthétisées possédaient des cytotoxicités en hypoxie et en normoxie semblables à celle de la molécule hit en hypoxie, et semblaient donc avoir perdu la capacité de s'activer spécifiquement en situation d'hypoxie (*i.e.* HCR <4) comparativement à la molécule hit **ICF05016** (HCR = 7).

Des études de clivages enzymatiques avec une nitroréductase, indépendante du taux d'oxygène, ont confirmé que les prodrogues synthétisées étaient faiblement sensibles à une bioréduction enzymatique probablement en raison de la présence du vecteur ammonium quaternaire sur la gâchette 2-nitroimidazole. Leur activité cytotoxique, indépendante des conditions d'oxygénation, n'a pu être élucidé à ce jour.

II. HAP vectorisées vers le PSMA surexprimé dans l'adénocarcinome prostatique

Cette stratégie a pu être étendue à une autre pathologie cancéreuse, le cancer de la prostate, avec la synthèse de conjugués originaux, associant une prodrogue cytotoxique à un motif affiné pour l'antigène de membrane spécifique à la prostate (PSMA), biomarqueur de ce cancer. Ces molécules pourraient s'avérer pertinentes en particulier pour le traitement des patients atteints de cancers de la prostate hormono-résistants encore associés à un très mauvais pronostic.

La première molécule envisagée **58** émanait d'un couplage direct entre le vecteur et la substance active. Le précurseur **65** issu d'une réaction de phosphorylation entre l'alcool **12**, une moutarde de type cyclophosphamide et le ligand du PSMA triprotégé **59**, a été obtenu sous la forme de deux diastéréoisomères avec un rendement de 44% ; sa déprotection n'a pu être réalisée en présence de TFA, du fait de l'instabilité de la fonction phosphordiamidate dans ces conditions.

Une nouvelle stratégie utilisant la chimie click a alors été envisagée et a conduit à la molécule **66** avec un rendement global de 13% sur 2 étapes à partir de l'alcool **12** et du triacide **70**. L'affinité de ce conjugué pour l'antigène PSMA a été évaluée au travers d'une étude de compétition inhibitrice sur cellules prostatiques LNCaP avec un ligand de référence radiomarqué à l'iode 125 (*i.e.* [^{125}I]-**ICF01305**). Une CI_{50} inférieure à celle du PMPA, inhibiteur de référence du PSMA, a été obtenue (*i.e.* 19 versus 188 nM). Également, une bioréduction très rapide a été observée en présence d'une nitroréductase avec un temps de demi-vie estimé à 45 secondes. Malgré ces premiers résultats prometteurs, la prodrogue **66** s'est avérée être dépourvue de cytotoxicité que ce soit sur cellules LNCaP ou sur cellules PC3, et ce indépendamment du taux d'oxygénation (*i.e.* $\text{CI}_{50} > 200$ μM). Ainsi,

Conclusion et perspectives

alors que l'affinité de la molécule pour l'antigène PSMA a été confirmée, de même que l'aptitude de la gâchette à déclencher la prodrogue dans des conditions réductrices, les raisons de cette absence de cytotoxicité restent à déterminer (*e.g.* faible pénétration cellulaire ou instabilité de la molécule dans le milieu de culture).

Une seconde molécule, **67**, disposant d'un espaceur non clivable de structure analogue à celle d'une molécule en développement clinique, PSMA-617, a pu être synthétisée. L'impureté présente avec cette molécule a pu être identifiée comme provenant de la réaction d'estérification parasite entre les fonctions acides carboxyliques et le méthanol deutéré lors des analyses RMN. Un changement de solvant plus approprié comme l'acétonitrile deutéré devrait permettre de s'assurer de l'absence de cette impureté. Des évaluations biologiques identiques à celles réalisées précédemment, avec la molécule **66**, pourront alors débiter.

En conclusion, face au manque de cytotoxicité observé *in vitro* pour la prodrogue **66**, il paraîtrait judicieux de dissocier le vecteur de la substance active après clivage en conditions hypoxiques. Une nouvelle structure possédant un pont disulfure ou une liaison hydrazone au niveau de l'espaceur séparant le ligand de PSMA de la prodrogue pourrait ainsi être envisagée.

Partie expérimentale

I. Synthèse chimique

Tous **les réactifs et les solvants** commerciaux ont été achetés chez les fournisseurs suivants : Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), Acros Organics (Geel, Belgique), Fisher Scientific (Illkirch, France), Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France), VWR (Fontenay-sous-Bois, France) et Alfa Aesar (Karlsruhe, Allemagne) et ont été utilisés sans aucune autre purification. Le THF anhydre a été obtenu soit par distillation après séchage sur sodium en présence de benzophénone, soit à partir du système de purification de solvant Pure Solv™ (Sigma-Aldrich) équipé d'une colonne d'alumine. Le DCM et le chloroforme anhydres ont été distillés avant usage, respectivement sur hydrure de calcium et carbonate de potassium.

Les réactions sensibles à l'air ou à l'humidité ont été réalisées sous atmosphère d'argon.

Les chromatographies sur couche minces (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice 60 Å (60 F₂₅₄, SDS ou Macherey-Nagel) (20 µm) ou d'alumine (60 F₂₅₄, type E, Merck) éluées par le mélange de solvants adéquat. Les plaques contiennent un révélateur de groupements fluorescents chromophores dans l'ultraviolet (254 nm). Le développement des plaques est réalisé sous lumière UV et/ou après révélation avec le réactif approprié : la ninhydrine à 0,5% dans l'éthanol ; l'acide phosphomolybdique à 10% dans l'éthanol ; le permanganate de potassium à 5% dans l'eau ; la 4-(4'-nitrobenzyl)pyridine (NBP). Dans ce dernier cas, la plaque de chromatographie est plongée dans une solution de NBP à 2,5% dans l'acétone, chauffée puis plongée dans une solution de potasse méthanolique à 10%.

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur support de silice 60 Å phase normale, 35-70 µm ou support d'oxyde d'aluminium neutre 90 standardisé 63-200 µm (Merck, SDS ou Carlo Erba).

La purification par chromatographie liquide haute performance préparative a été réalisée sur un appareil CombiflashEZprep (Teledyne ISCO) avec une colonne (250 mm diamètre intérieur 20 mm) phase inverse C₁₈ (100 Å, 5 µm, 250 x 200 mm) à un débit de 15 mL.min⁻¹ en utilisant les conditions décrites.

Les points de fusion ont été mesurés avec un appareil capillaire IA9100 (Bibby Scientific, Roissy, France).

Les spectres infrarouge (IR) ont été enregistrés de 4000 à 600 cm⁻¹ sur un spectrophotomètre FTIR Nicolet IS10 avec réflectance totale atténuée (ATR) (Fisher Scientific).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés au moyen d'un spectromètre Bruker AM 200 (4,5 T) (¹H : 200 MHz ; ¹³C : 50 MHz) ou d'un spectromètre Bruker Avance-400 (4,5 T) (¹H : 400 MHz ; ¹³C : 101 MHz ; ³¹P : 202 MHz) ou d'un spectromètre Bruker DRX 500 (¹H : 500 MHz ; ¹³C : 126 MHz) (Bruker Biospin SAS, Wissembourg, France). Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en parties par millions (ppm) en se servant du signal résiduel du solvant comme référence en RMN ¹H et ¹³C. Pour les acquisitions de RMN ³¹P, la calibration est réalisée grâce au signal d'une solution d'acide phosphorique (0 ppm) à 1% dans le D₂O, placée dans un tube coaxial. Les valeurs de constantes de couplages (*J*) sont données en Hz. Les multiplicités ont été notées : s (singulet), se (singulet élargi), d (doublet), t (triplet), te (triplet élargi), q (quadruplet), qt (quintuplet), h (hexuplet), m (multiplet ou massif complexe), dd (doublet dédoublé), td (triplet dédoublé), qd

Partie expérimentale

(quadruplet dédoublé) ddd (doublet dédoublé dédoublé). Les analyses des spectres monodimensionnels RMN ^1H et ^{13}C ont été appuyées dans certains cas par des analyses 2D de type ^1H - ^{13}C COSY (correlation spectroscopy) ou ^1H - ^{13}C HSQC (heteronuclear single quantum coherence).

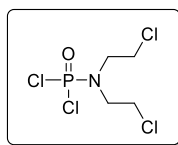
Les chromatogrammes ont été enregistrés au moyen d'une chaîne de chromatographie liquide haute performance (CLHP) HP 1100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA). La séparation a été réalisée sur une colonne C18 (Phenomenex, Luna C18, 3,0 × 150 mm, 3 μm) en utilisant les conditions suivantes : précolonne C18 Phenomenex (Le Pecq, France), détection à 322 nm, volume injecté = 5 μL , débit = 0,4 mL/min, durée totale d'expérience : 20 minutes, phase mobile : $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (v/v) contenant du TFA (15 mM), gradient : 80/20 à 0 minutes \rightarrow 75/25 durant 3 minutes ; 75/25 \rightarrow 60/40 durant 2 minutes ; 60/40 \rightarrow 50/50 durant 5 minutes ; 50/50 \rightarrow 80/20 durant 1 minutes ; 80/20 durant 9 minutes.

Les spectres de masse (MS) ont été obtenus sur un spectromètre de masse haute résolution (HRMS) en mode positif Waters[®] Micromass[®] Q-ToF micro[™] ou sur un spectromètre de masse Spectromètre de masse ESQUIRE (Trappe ionique) BRUKER en mode positif ou négatif.

Les données cristallographiques ont été collectées avec un diffractomètre Bruker à quatre cercles (géométrie Kappa) à détecteur bidimensionnel de type CCD (APEX 2) et muni d'un tube à rayons X à anticathode de molybdène. La radiation $\text{Mo K}\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) est sélectionnée au moyen d'un monochromateur graphite. L'ensemble des données a été collecté à 170 K à l'aide du logiciel APEX 2. L'affinement des paramètres de la maille et l'intégration des données ont été réalisées avec le programme SAINT. Les positions des atomes autres que l'hydrogène ont été déterminées par des méthodes directes à l'aide du programme SHELXS97 puis affinées par une méthode des moindres carrés sur F^2 avec l'aide du programme SHELXL97 selon un modèle anisotrope.

Partie expérimentale

Dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique (**1**)

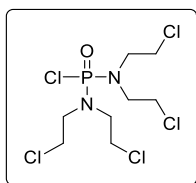


A une suspension de chlorhydrate de la *N,N*-bis(2-chloroéthyl)amine (500 mg ; 2,80 mmol ; 1,0 éq.) dans du DCM (20 mL) est ajoutée de la pyridine (460 μ L ; 5,69 mmol ; 2,0 éq.). La solution est refroidie à 0°C et du trichlorure de phosphoryle (260 μ L ; 2,79 mmol ; 1,0 éq.) est ajouté goutte à goutte. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 18 heures à température ambiante avant d'être évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM) pour conduire au composé phosphorylé **1** (595 mg ; 2,30 mmol).

- ◆ **Aspect** : Cristaux hyalins ◆ **Formule brute** : $C_4H_8Cl_4NOP$ ◆ **Masse molaire** : 258,90 $g \cdot mol^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 83%
- ◆ **CCM** (SiO_2 , NBP, DCM) : $R_f = 0,66$
- ◆ **Point de fusion** : 58-59°C (littérature : 57-59°C)³⁰³
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 1264 ($\nu_{P=O}$, ν_{C-N}) ; 1116 (ν_{P-N})
- ◆ **RMN 1H** ($CDCl_3$, 200 MHz) δ (ppm) : 3,84-3,51 (m, 8H, $N(CH_2CH_2Cl)_2$)
- ◆ **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 50 MHz) δ (ppm) : 49,61 (d, 2C, $^2J_{C-P} = 4,3$ Hz, $N(\underline{C}H_2CH_2Cl)_2$) ; 40,91 (d, 2C, $^3J_{C-P} = 2,9$ Hz, $N(CH_2\underline{C}H_2Cl)_2$)
- ◆ **RMN ^{31}P** ($CDCl_3$, 202 MHz) δ (ppm) : 17,38 ppm

Partie expérimentale

Chlorure de l'acide *N,N,N',N'*-tétrakis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidique (**2**)



A une solution du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** (1,00 g ; 3,86 mmol ; 1,0 éq.) dans le toluène (40 mL), sont ajoutés successivement du chlorure de *N,N*-bis(2-chloroéthyl)amine (695 mg ; 3,89 mmol ; 1,0 éq.) et de la TEA (1,1 mL ; 7,89 mmol ; 2,0 éq.) goutte à goutte. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux durant 72 h. Le milieu est filtré et le solide est lavé avec du toluène (3 x 15 mL). Le filtrat est évaporé sous pression réduite et l'huile jaune pâle obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/acétate d'éthyle, 95/5, v/v) pour conduire au composé phosphorylé **2** (1,10 g ; 3,02 mmol).

◆ **Rendement** : 78%

A une solution agitée d'oxychlorure de phosphore (1,0 mL ; 10,7 mmol ; 1,0 éq.) dans du toluène (120 mL) refroidie à 0 °C, sont ajoutés du chlorure de *N,N*-bis(2-chloroéthyl)amine (1,91 g ; 10,7 mmol ; 1,0 éq.) puis goutte à goutte de la TEA (3,0 mL ; 21,5 mmol ; 2,0 éq.). Le milieu réactionnel est porté à température ambiante et laissé sous agitation pendant 25 heures. Du chlorure de *N,N*-bis(2-chloroéthyl)amine (1,91 g ; 10,7 mmol ; 1,0 éq.) et de la TEA (3,0 mL ; 21,5 mmol ; 2,0 éq.) sont ajoutés successivement au milieu réactionnel qui est ensuite chauffé à reflux durant 44 h. Après retour à température ambiante, le milieu est filtré et le solide est lavé avec du toluène (3 x 100 mL). Le filtrat est évaporé sous pression réduite et le liquide brun obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/acétate d'éthyle, 95/5, v/v) pour conduire au composé phosphorylé **2** (2,12 g ; 5,82 mmol).

◆ **Rendement** : 54%

◆ **Aspect** : Huile jaune pâle ◆ **Formule brute** : C₈H₁₆Cl₅N₂OP ◆ **Masse molaire** : 364,45 g.mol⁻¹

◆ **CCM** (SiO₂, NBP, DCM/acétate d'éthyle, 95/5, v/v) : R_f = 0,55

◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 1246 ; 1221 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) 1120 ; 1085 ; 969 (ν_{P-N})

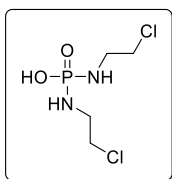
◆ **RMN** ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : 3,76-3,67 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,55 (td, 8H, ³J_{H-P} = 13,7 Hz, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂)

◆ **RMN** ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) : 49,69 (d, 4C, ²J_{C-P} = 3,9 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 41,54 (d, 4C, ³J_{C-P} = 2,7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂)

◆ **RMN** ³¹P (CDCl₃, 202 MHz) δ (ppm) : 25,19

Partie expérimentale

Acide *N,N'*-bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidique (**3**)

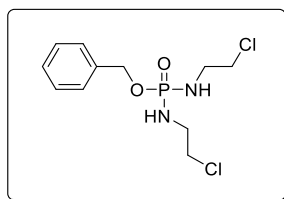


A une solution du composé **5** (367 mg ; 1,18 mmol ; 1,0 éq.) dans du méthanol (10 mL) est ajouté du palladium sur charbon à 10% (39,4 mg). Le mélange est agité à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène durant 1 h. Le milieu réactionnel est filtré sur Célite 545® et le pad est lavé avec du méthanol (4 x 15 mL). Le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner l'acide phosphorodiamidique **3** (245 mg ; 1,11 mmol).

- ◆ **Aspect** : cristaux blanc
- ◆ **Formule brute** : $C_4H_{11}Cl_2N_2O_2P$
- ◆ **Masse molaire** : $221,02 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 94%
- ◆ **CCM** (SiO_2 , NBP, acétate d'éthyle/éthanol, 95/5, v/v) : $R_f = 0,02$
- ◆ **Point de fusion** : 99-100 °C (littérature : 108 °C)³⁰⁶
- ◆ **RMN ^{31}P** ($\text{DMSO-}d_6$, 202 MHz) δ (ppm) : 11,16 (spectre réalisé avec un équivalent de TEA)
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 220,96 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (valeur théorique : m/z 221,00)

Partie expérimentale

N,N'-Bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate de benzyle (**5**)

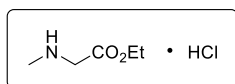


A une solution, refroidie à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, d'oxychlorure de phosphore (3,8 mL ; 40,8 mmol ; 1,0 éq.) dans du DCM anhydre (200 mL), est additionnée goutte à goutte une solution d'alcool benzylique (4,2 mL ; 40,6 mmol, 1,0 éq.) et de TEA (6,0 mL ; 43,0 mmol ; 1,1 éq.) dans du DCM (40 mL). Après 1 heure 30 d'agitation à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, sont ajoutés successivement le chlorhydrate de 2-chloroéthylamine (9,76 g ; 84,7 mmol ; 2,1 éq.) puis goutte à goutte de la TEA (25,5 mL ; 183 mmol ; 4,5 éq.). Après retour progressif à $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ et agitation durant 15 heures, la réaction est stoppée par addition d'eau (200 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 200 mL). Les phases organiques sont réunies et lavées avec une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (200 mL). La phase organique est séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner une huile jaune pâle, qui est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 95/5, v/v) pour conduire au phosphorodiamidate **5** (10,7 g ; 34,4 mmol).

- ◆ **Aspect** : cire blanche ◆ **Formule brute** : $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$ ◆ **Masse molaire** : $311,14\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 85%
- ◆ **CCM** (SiO_2 , UV 254 nm et NBP, acétate d'éthyle/éthanol, 95/5, v/v) : $R_f = 0,54$
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 3206 (ν_{NH}) ; 1207 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 1110 ; 1008 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) : 7,45-7,29 (m, 5H, H_{Ar}) ; 5,03 (d, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 8,4\text{ Hz}$, OCH_2) ; 3,50-3,61 (m, 4H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 3,23 (td, 4H, $^3J_{\text{H-P}} = 11,3\text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-H}} = 5,7\text{ Hz}$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 3,08 (se, 2H, NH)
- ◆ **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) : 136,60 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6,8\text{ Hz}$, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$) ; 128,59 ; 128,30 ; 127,75 (5C, CH_{Ar}) ; 67,06 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4,5\text{ Hz}$, OCH_2) ; 45,69 (d, 2C, $^3J_{\text{C-P}} = 5,2\text{ Hz}$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 42,91 (2C, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$)
- ◆ **RMN ^{31}P** (CDCl_3 , 202 MHz) δ (ppm) : 17,29
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 311,04 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (valeur théorique : m/z 311,05)

Partie expérimentale

Chlorhydrate du sarcosinate d'éthyle (**8-HCl**)

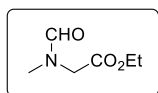


Du chlorure de thionyle (27 mL ; 370 mmol ; 1,1 éq.) est ajouté goutte à goutte à de l'éthanol absolu (150 mL) préalablement refroidi à -10 °C. De la sarcosine (30,0 g ; 337 mmol ; 1,0 éq.) est ensuite additionnée par portion à la solution puis le mélange est chauffé à 55 °C pendant 2 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite pour conduire au chlorhydrate du sarcosinate d'éthyle (51,5 g ; 335 mmol).

- ◆ **Aspect** : Poudre blanche
- ◆ **Formule brute** : C₅H₁₂ClNO₂
- ◆ **Masse molaire** : 153,61 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 99%
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 2970-2440 (ν_{NH}) ; 1742 (ν_{C=O}) ; 1229 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : 9,74 (se, 2H, NH₂⁺) ; 4,27 (q, 2H, ³J_{H-H} = 7,1 Hz, OCH₂) ; 3,84 (te, 2H, ³J = 5,6 Hz, NCH₂) ; 2,83 (t, 2H, ³J = 5,3 Hz, NCH₃) ; 1,29 (t, 3H, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) : 166,15 (CO₂) ; 62,65 (OCH₂) ; 48,95 (NCH₂) ; 33,34 (NCH₃) ; 14,05 (CH₂CH₃)

Partie expérimentale

N-Formylsarcosinate d'éthyle (**10**)

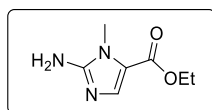


A une solution du chlorhydrate **8-HCl** (35,4 g ; 230 mmol ; 1,0 éq.) dans de l'éthanol absolu (154 mL) sont ajoutés successivement du formiate d'éthyle (136 mL ; 1,69 mol ; 7,3 éq.) et du carbonate de potassium (32,9 g ; 238 mmol ; 1,0 éq.). Après agitation durant 21 heures à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré puis le solide est lavé avec de l'éthanol (50 mL). Le filtrat est évaporé sous pression réduite avant d'être repris dans de l'eau (100 mL). La solution est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 200 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite pour conduire au produit formylé **10** (27,7 g ; 191 mmol) analytiquement pur, et obtenu sous la forme d'un mélange de deux rotamères.

- ◆ **Aspect** : Liquide jaune pâle ◆ **Formule brute** : C₆H₁₁NO₃ ◆ **Masse molaire** : 145,16 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 83%
- ◆ **CCM** (SiO₂, ninhydrine, acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v) : R_f = 0,15
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 1741 (ν_{C=O} ester) ; 1667 (ν_{C=O} amide) ; 1200 (ν_{C-O} ester)
- ◆ **RMN** ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm), 2 rotamères : 7,93 et 7,86 (s, 1H, CHO) ; 4,04 et 4,02 (q, 2H, ³J = 7,1 Hz, OCH₂) ; 3,91 et 3,85 (s, 2H, NCH₂) ; 2,87 et 2,74 (s, 3H, NCH₃) ; 1,12 et 1,10 (t, 3H, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃)
- ◆ **RMN** ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm), 2 rotamères : 168,66 et 168,09 (CO₂) ; 163,06 et 162,75 (CHO) ; 61,35 et 61,07 (OCH₂) ; 50,54 et 45,31 (NCH₂) ; 34,99 et 30,47 (NCH₃) ; 13,83 (CH₂CH₃)

Partie expérimentale

2-Amino-1-*N*-méthyl-1*H*-imidazole-5-carboxylate d'éthyle (**9**)



A une solution du chlorhydrate **8-HCl** (40,0 g ; 261 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (210 mL), est ajouté du formiate d'éthyle (210 mL ; 2,61 mol ; 10 éq.). De l'hydrure de sodium (47,0 g ; 1,18 mol ; 4,5 éq. ; 60% en dispersion dans l'huile) est ensuite additionné par petites portions à température ambiante à la solution, en veillant à contrôler le dégagement gazeux (il est parfois nécessaire d'activer la réaction par chauffage jusqu'à observation du dégagement d'hydrogène et modification de la coloration du milieu réactionnel). Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 heures puis le milieu est évaporé sous pression réduite pour conduire à un solide beige correspondant au dérivé C-formylé. Le solide obtenu est mis en suspension dans de l'éthanol (650 mL) et une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 37% (130 mL ; 1,58 mol ; 6,0 éq.) est additionnée. Le mélange est porté à reflux pendant 3 heures, puis filtré à chaud et le solide lavé avec de l'éthanol bouillant (3 × 150 mL). Le filtrat est évaporé sous pression réduite, pour donner le produit *N*-déformylé sous la forme d'une huile marron directement engagée dans l'étape suivante. Le produit obtenu est solubilisé dans un mélange éthanol/eau (495 mL, 70/30, v/v) puis le pH est ajusté à 3 sous le contrôle d'un pHmètre avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 5 M. Du cyanamide (22,0 g, 523 mmol, 2,0 éq.) est ajouté au mélange. Le milieu réactionnel est ensuite porté à reflux pendant 2 heures 15, puis, après retour à température ambiante, évaporé environ au huitième de son volume initial. Le milieu est ensuite refroidi dans un bain de glace puis alcalinisé (pH ajusté à 9-10) par ajout goutte à goutte d'une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium. Le précipité marron formé est filtré, lavé avec de l'eau (3 x 100 mL) puis placé au dessiccateur sous vide à 40 °C durant une nuit pour donner le composé **9** (31,4 g ; 186 mmol) sans autre purification.

◆ **Rendement** : 71%

A une solution du dérivé formylé **10** (29,6 g ; 204 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (95 mL), sont ajoutés du formiate d'éthyle (95 mL ; 1,18 mol ; 5,8 éq.) et du cyclohexane (12 mL). De l'hydrure de sodium (12,5 g ; 313 mmol ; 1,5 éq. ; 60% en dispersion dans l'huile) est ensuite additionné par petites portions à température ambiante à la solution, en veillant à contrôler le dégagement gazeux (il est parfois nécessaire d'activer la réaction par chauffage jusqu'à observation du dégagement d'hydrogène et modification de la coloration du milieu réactionnel). Après agitation à température ambiante pendant 3 heures 30, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite pour conduire à un solide beige correspondant au dérivé C-formylé. Ce dernier est mis en suspension dans de l'éthanol (255 mL) et une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 32% (61 mL ; 642 mmol ; 3,0 éq.) est additionnée. Le mélange est porté à reflux pendant 2 heures, puis filtré à chaud et le solide lavé avec de l'éthanol bouillant (2 × 150 mL). Le filtrat est évaporé sous pression réduite, pour donner le produit *N*-déformylé sous la forme d'une huile marron directement engagée dans l'étape suivante. Le produit obtenu est solubilisé dans un mélange éthanol/eau (500 mL, 70/30, v/v) puis le pH est ajusté à 3 sous le contrôle d'un pHmètre avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 5 M. Du cyanamide (17,5 g, 416 mmol, 2,0 éq.) est ajouté au mélange. Le milieu réactionnel est ensuite porté à reflux pendant 1 heure 30, puis, après retour à température ambiante, évaporé environ au huitième de son volume initial. Le milieu est ensuite refroidi dans un bain de glace puis alcalinisé (pH

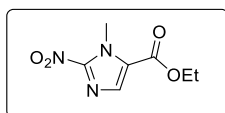
Partie expérimentale

ajusté à 9-10) par ajout goutte à goutte d'une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium. Le précipité marron formé est filtré, lavé avec de l'eau (2 x 150 mL) puis placé au dessiccateur sous vide à 40 °C durant une nuit pour donner le composé **9** (16,9 g, 99,9 mmol) sans autre purification. Le filtrat est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 100 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de magnésium et filtrées avant d'être évaporées sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 95/5, v/v + 0,1% ammoniac) pour donner une fraction supplémentaire du composé **9** (3,78 g ; 22,3 mmol).

- ◆ **Rendement** : 60%
- ◆ **Aspect** : Solide marron ◆ **Formule brute** : $C_7H_{11}N_3O_2$ ◆ **Masse molaire** : $169,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **CCM** (SiO_2 , UV 254 nm, acétate d'éthyle/éthanol, 95/5, v/v + 0,1% ammoniac) : $R_f = 0,57$
- ◆ **Point de fusion** : 159-160 °C (littérature : 130-133 °C)^{298,322}
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 3390 ($\nu_{\text{as NH}_2}$) ; 3119 ($\nu_{\text{s NH}_2}$) ; 1647 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1542 (δ_{NH_2}) ; 1168 ($\nu_{\text{C-O}}$)
- ◆ **RMN ^1H** (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 7,27 (s, 1H, H_{Ar}) ; 6,14 (s, 2H, NH_2) ; 4,15 (q, 2H, $^3J = 7,1 \text{ Hz}$, OCH_2) ; 3,52 (s, 3H, $\text{N}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$) ; 1,23 (t, 3H, $^3J = 7,1 \text{ Hz}$, CH_2CH_3)
- ◆ **RMN ^{13}C** (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm) : 159,68 (CO_2) ; 154,27 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NH}_2$) ; 136,02 (CH_{Ar}) ; 116,88 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{CO}$) ; 58,82 (OCH_2) ; 30,17 ($\text{N}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$) ; 14,30 (CH_2CH_3)

Partie expérimentale

1-N-Méthyl-2-nitro-1H-imidazole-5-carboxylate d'éthyle (**11**)

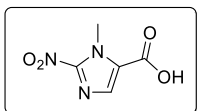


A une solution de nitrite de sodium (20,3 g ; 294 mmol ; 10 éq.) dans l'eau (26 mL) refroidie à 0 °C, est ajoutée goutte à goutte une solution du dérivé aminé **9** (5,00 g ; 29,6 mmol ; 1,0 éq.) dans l'acide acétique glacial (51 mL ; 891 mmol ; 30 éq.). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation durant 3 heures, avant d'ajuster le pH à 4 par ajout progressif de carbonate de sodium (environ 15 g). Le mélange est extrait avec du DCM (3 x 100 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30, v/v) pour donner le composé nitré **11** (2,34 g ; 11,7 mmol).

- ◆ **Aspect** : Solide jaune
- ◆ **Formule brute** : $C_7H_9N_3O_4$
- ◆ **Masse molaire** : $199,17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 40%
- ◆ **Point de fusion** : 58-59 °C (littérature : 56-58 °C)^{298,322}
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 1723 ($\nu_{C=O}$) ; 1486 ($\nu_{as\text{NO}_2}$) ; 1364 ($\nu_{s\text{NO}_2}$) ; 1233 (ν_{C-O})
- ◆ **CCM** (SiO_2 , UV 254 nm, cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30, v/v) : $R_f = 0,48$
- ◆ **RMN ^1H** (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 7,78 (s, 1H, H_{Ar}) ; 4,35 (q, 2H, $^3J = 7,1 \text{ Hz}$, OCH_2) ; 4,18 (s, 3H, N_{Ar}CH_3) ; 1,32 (t, 3H, $^3J = 7,1 \text{ Hz}$, CH_2CH_3)
- ◆ **RMN ^{13}C** (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm) : 158,71 (CO_2) ; 147,61 (C_{Ar}NO_2) ; 133,70 (CH_{Ar}) ; 126,07 (C_{Ar}CO) ; 61,34 (OCH_2) ; 35,14 (N_{Ar}CH_3) ; 13,91 (CH_2CH_3)

Partie expérimentale

Acide 1-N-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazole-5-carboxylique (**13**)

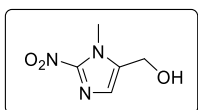


Une suspension de l'ester **11** (28,7 g ; 144 mmol ; 1,0 éq.) dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 1 M (470 mL) est agitée à température ambiante pendant 15 heures. Le mélange est refroidi dans un bain d'eau glacée avant d'être acidifié à pH 1 par ajout d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 37%. Le précipité obtenu est filtré et lavé avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1 M (2 x 200 mL). Le solide rose beige obtenu est séché au dessiccateur sous vide pour donner l'acide **13** (17,5 g ; 102 mmol). Le filtrat est extrait avec de l'acétate d'éthyle (8 x 200 mL) en maintenant la phase aqueuse à pH 1. Les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite pour donner une fraction supplémentaire de l'acide **13** (5,01 g ; 29,3 mmol) analytiquement pur.

- ◆ **Aspect** : Solide rose beige ◆ **Formule brute** : $C_5H_5N_3O_4$ ◆ **Masse molaire** : $171,11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 91%
- ◆ **Point de fusion** : 153-154 °C (littérature : 155-177 °C)^{298,322}
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm, acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v) : $R_f = 0,13$
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3100-2100 (ν_{OH}) ; 1709 ($\nu_{C=O}$) ; 1497 ($\nu_{as NO_2}$) ; 1361 ($\nu_s NO_2$) ; 1238 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN** ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ (ppm) : 7,72 (s, 1H, H_{Ar}) ; 4,16 (s, 3H, N_{Ar}CH₃)
- ◆ **RMN** ¹³C (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ (ppm) : 160,29 (CO₂) ; 147,46 (C_{Ar}NO₂) ; 133,64 (CH_{Ar}) ; 127,06 (C_{Ar}CO) ; 35,00 (N_{Ar}CH₃)

Partie expérimentale

(1-*N*-Méthyl-2-nitro-1*H*-imidazo-5-yl)méthanol (**12**)



Une solution de l'ester **11** (11,0 g ; 55,2 mmol ; 1,0 éq.) dans un mélange THF anhydre/ méthanol (173/25 mL) est refroidie à 0 °C. Du borohydrure de sodium (6,33 g ; 167 mmol ; 3,0 éq.) est mis en suspension dans du THF (50 mL) d'une part, et du bromure de lithium (14,6 g ; 169 mmol ; 3,0 éq.) est dissout dans du THF (50 mL) et refroidi à 0 °C d'autre part. Ces deux solutions sont réunies et de l'eau (50 mL) y est ajoutée. La solution obtenue est additionnée goutte à goutte au mélange réactionnel en veillant à ce que la température ne dépasse pas 10 °C. A la fin de l'addition, la réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 19 heures. Le milieu réactionnel est refroidi dans un bain d'eau glacée et la réaction stoppée par ajout de chlorure d'ammonium (environ 3 g). Après 30 minutes d'agitation, le milieu réactionnel est filtré et le précipité est lavé avec du THF (3 x 50 mL). Après évaporation du filtrat sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (silice surmontée d'une couche de Céelite 545®, éluant : acétate d'éthyle/méthanol, 98/2, v/v). Le solide isolé est lavé avec du DCM (20 mL) pour donner le dérivé alcool **12** (5,91 g ; 37,6 mmol).

◆ **Rendement** : 68%

A une suspension de l'acide **13** (7,00 g ; 40,9 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (125 mL) refroidie à -40 °C est additionné de la TEA (9,0 mL ; 64,6 mmol ; 1,6 éq.). Du chloroformiate d'isobutyle (8,5 mL ; 65,5 mmol ; 1,6 éq.) est ensuite additionné goutte à goutte au milieu réactionnel. L'agitation est maintenue à -40 °C durant 1 heure 30. Du borohydrure de sodium (7,77 g ; 205 mmol ; 5,0 éq.) est ajouté au milieu réactionnel. De l'eau (75 mL) est additionnée goutte à goutte durant 1 heure 30 en maintenant la température à -10 °C. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré et le solide est lavé avec du THF (4 x 50 mL). Le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié sur un pad de silice (éluant : DCM seul puis DCM/méthanol, 90/10, v/v). Après évaporation sous pression réduite, le solide jaune obtenu est mis en suspension dans l'éther diéthylique anhydre (20 mL) et filtré. Le solide est lavé avec de l'éther diéthylique anhydre (20 mL) pour donner l'alcool **12** (5,05 g ; 32,1 mmol).

◆ **Rendement** : 79%

◆ **Aspect** : Solide jaune pâle ◆ **Formule brute** : C₅H₇N₃O₃ ◆ **Masse molaire** : 157,13 g.mol⁻¹

◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm, acétate d'éthyle/méthanol, 98/2, v/v) : R_f = 0,64

◆ **Point de fusion** : 144-145 °C (littérature : 141-143 °C et 142-144 °C)^{298,322,327}

◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3231 (ν_{OH}) ; 1491 (ν_{as NO2}) ; 1358 (ν_{s NO2}) ; 1040 (ν_{C-O})

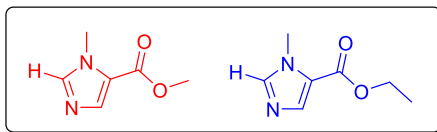
◆ **RMN** ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ (ppm) : 7,11 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,46 (t, 1H, ³J = 5,4 Hz, OH) ; 4,55 (d, 2H, ³J = 5,4 Hz, CH₂) ; 3,92 (s, 3H, N_{Ar}CH₃)

◆ **RMN** ¹³C (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ (ppm) : 145,63 (C_{Ar}NO₂) ; 138,60 (C_{Ar}CH₂) ; 126,50 (CH_{Ar}) ; 52,96 (CH₂) ; 34,03 (N_{Ar}CH₃)

Partie expérimentale

Sous produits de la réaction:

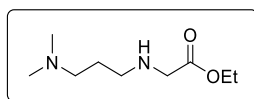
1-*N*-Méthyl-1*H*-imidazo-5-carboxylate de méthyle (**14**) et d'éthyle (**15**)



- ◆ Aspect : solides jaune
- ◆ Formule brute : $C_6H_7N_2O_2$ et $C_7H_{10}N_2O_2$
- ◆ Masse molaire : $140,14 \text{ g.mol}^{-1}$ et $154,17 \text{ g.mol}^{-1}$
- ◆ RMN 1H (CD_3OD , 200 MHz) δ (ppm) : 7,81 (s, 1H, $NCH_{Ar}N$) ; 7,64 (s, 1H, $C_{Ar}CH_{Ar}$) ; 4,32 (q, 2H, $^3J = 7,1 \text{ Hz}$, OCH_2) ; 3,92 (s, 3H, $N_{Ar}CH_3$) ; 3,85 (s, 3H, OCH_3) ; 1,36 (t, $^3J = 7,1 \text{ Hz}$, CH_2CH_3)
- ◆ RMN ^{13}C (CD_3OD , 50 MHz) δ (ppm) : 161,84 ; 161,42 (CO_2) ; 144,04 ($NC_{Ar}HN$) ; 137,14 ; 137,03 ($C_{Ar}CH_{Ar}$) ; 124,83 ; 124,56 ($C_{Ar}CH_{Ar}$) ; 61,67 (OCH_2) ; 52,01 (OCH_3) ; 34,55 ; 34,51 ($N_{Ar}CH_3$) ; 14,58 (CH_2CH_3)
- ◆ HRMS (ESI) : m/z 141,0657 $[M+H]^+$ (valeur théorique : m/z 141,0659)
 m/z 155,0812 $[M+H]^+$ (valeur théorique : m/z 155,0815)

Partie expérimentale

N-[3-(*N,N'*-Diméthylamino)propyl]glycinate d'éthyle (**16**)

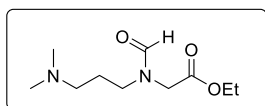


A une solution refroidie à 0 °C de 3-(*N,N*-diméthylamino)propylamine (60 mL ; 477 mmol, 2,0 éq.) dans du toluène (260 mL), est ajouté du carbonate de potassium (54,5 g ; 394 mmol ; 1,7 éq.). Du bromoacétate d'éthyle (26 mL ; 234 mmol, 1,0 éq.) en solution dans du toluène (260 mL) est alors ajouté goutte à goutte pendant 3 heures 30. Après agitation à température ambiante pendant 18 heures, le milieu réactionnel est filtré et le solide est lavé avec du toluène (3 × 200 mL). Après évaporation sous pression réduite du filtrat, le liquide légèrement jaune obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v + 5% TEA) pour donner le dérivé **16** (23,9 g ; 127 mmol).

- ◆ **Aspect** : Liquide jaune pâle ◆ **Formule brute** : C₉H₂₀N₂O₂ ◆ **Masse molaire** : 188,27 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 54%
- ◆ **CCM** (SiO₂, ninhydrine, acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v + 5% TEA) : R_f = 0,71
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3336 (ν_{NH}) ; 1737 (ν_{C=O}) ; 1191 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : 4,15 (q, 2H, ³J = 7,1 Hz, OCH₂) ; 3,36 (s, 2H, CH₂CO) ; 2,62 (t, 2H, ³J = 7,1 Hz, NHCH₂CH₂) ; 2,30 (t, 2H, ³J = 7,2 Hz, (CH₃)₂NCH₂) ; 2,19 (s, 6H, N(CH₃)₂) ; 1,98 (s, 1H, NH) ; 1,64 (qt, ³J = 7,1 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂) ; 1,24 (t, 3H, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) : 172,55 (CO₂) ; 60,74 (OCH₂) ; 57,90 (CH₂N(CH₃)₂) ; 51,07 (NHCH₂CO) ; 48,11 (NHCH₂CH₂) ; 45,55 (2C, N(CH₃)₂) ; 28,06 (CH₂CH₂CH₂) ; 14,29 (CH₂CH₃)

Partie expérimentale

N-Formyl-N-[3-(N',N'-diméthylamino)propyl]glycinate d'éthyle (**4**)

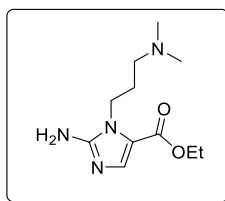


A une solution de l'amine secondaire **16** (24,2 g ; 129 mmol ; 1,0 éq.) dans l'éthanol (86 mL) sont ajoutés du carbonate de potassium (17,7 g, 128 mmol, 1,0 éq.) et du formiate d'éthyle (77 mL ; 957 mmol ; 7,4 éq.). Après agitation pendant 25 heures à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré puis le solide est lavé avec de l'éthanol (3 × 50 mL). Le filtrat est évaporé sous pression réduite avant d'être repris dans de l'eau (100 mL), puis extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 × 200 mL). La phase aqueuse est saturée en chlorure de sodium puis réextraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 200 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite pour conduire au produit formylé **17** (25,7 g ; 119 mmol) analytiquement pur, et obtenu sous la forme d'un mélange de deux rotamères.

- ◆ **Aspect** : Liquide jaune pâle
- ◆ **Formule brute** : $C_{10}H_{20}N_2O_3$
- ◆ **Masse molaire** : $216,28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 90%
- ◆ **CCM** (Al_2O_3 , ninhydrine, acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v + 0,1% ammoniacale) : $R_f = 0,85$
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 1745 ($\nu_{C=O}$ ester) ; 1668 ($\nu_{C=O}$ amide) ; 1196 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN 1H** ($CDCl_3$, 200 MHz) δ (ppm), 2 rotamères : 7,91 et 7,81 (s, 1H, CHO) ; 4,07-3,88 (m, 2H, OCH_2) ; 3,82 et 3,80 (s, 2H, NCH_2CO) ; 3,27-3,08 (m, 2H, $NCHOCH_2CH_2$) ; 2,11-1,92 (m, 8H, $(CH_2N(CH_3)_2)$) ; 1,45 (qt, 2H, $^3J = 6,8 \text{ Hz}$, $CH_2CH_2CH_2$) ; 1,05 et 1,04 (t, 3H, $^3J = 7,1 \text{ Hz}$, CH_2CH_3)
- ◆ **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 50 MHz) δ (ppm), 2 rotamères : 168,99 et 168,20 (CO_2) ; 163,00 (CHO) ; 61,20 et 60,87 (OCH_2) ; 56,27 et 55,33 ($CH_2N(CH_3)_2$) ; 48,79 et 43,73 (NCH_2CO) ; 45,55 et 41,70 ($NCHOCH_2CH_2$) ; 44,90 (2C, $N(CH_3)_2$) ; 25,65 et 24,81 ($CH_2CH_2CH_2$) ; 13,73 (CH_2CH_3)
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 217,14 $[M+H]^+$ (valeur théorique : m/z 217,15)

Partie expérimentale

2-Amino-1-*N*-[3-(*N,N'*-diméthylamino)propyl]-1*H*-imidazole-5-carboxylate d'éthyle (**20**)

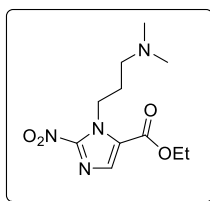


A une solution du composé formylé **17** (19,2 g ; 88,8 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (43 mL), sont ajoutés du formiate d'éthyle (43 mL ; 535 mmol ; 6,0 éq.) et du cyclohexane (5 mL). De l'hydrure de sodium (5,33 g ; 133 mmol ; 1,5 éq. ; 60% en dispersion dans l'huile) est ensuite additionné par petites portions à température ambiante à la solution, en veillant à contrôler le dégagement gazeux (la réaction est activée par chauffage jusqu'à observation du dégagement d'hydrogène et modification de la coloration du milieu réactionnel). Le mélange est laissé sous agitation pendant 3 heures à température ambiante puis est évaporé sous pression réduite pour conduire à un solide beige, correspondant à l'intermédiaire C-formylé. Le solide obtenu est mis en suspension dans de l'éthanol (145 mL) et une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 37% (29 mL ; 353 mmol ; 4,0 éq.) est additionnée. Le mélange est porté à reflux pendant 2 heures, puis filtré à chaud et le solide obtenu lavé avec de l'éthanol bouillant (3 x 50 mL). Le filtrat est évaporé sous pression réduite pour conduire à une huile marron, directement engagée dans l'étape suivante. Cette dernière est solubilisée dans un mélange éthanol/eau (170 mL ; 70/30, v/v) puis le pH est ajusté à 3 sous le contrôle d'un pHmètre avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 5 M. Du cyanamide (7,46 g ; 177 mmol ; 2,0 éq.) est ajouté au mélange. Le milieu réactionnel est ensuite porté à reflux pendant 1 heure 30. Après retour à température ambiante, le mélange est évaporé environ au huitième de son volume initial, refroidi dans un bain de glace puis alcalinisé (pH ajusté à 9-10) par ajout goutte à goutte d'une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium. La solution est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 100 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur sulfate de magnésium et filtrées avant d'être évaporée sous pression réduite. Une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v + 2% TEA) permet d'isolé le composé **20** (4,52 g ; 18,8 mmol).

- ◆ **Aspect** : Solide marron ◆ **Formule brute** : $C_{11}H_{20}N_4O_2$ ◆ **Masse molaire** : $240,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 21%
- ◆ **CCM** (SiO_2 , UV, acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v + 2% TEA) : $R_f = 0,36$
- ◆ **Point de fusion** : 82-83 °C
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 3317 ($\nu_{\text{as NH}_2}$) ; 3194 ($\nu_{\text{s NH}_2}$) ; 1667 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1539 (δ_{NH_2}) ; 1182 ($\nu_{\text{C-O}}$)
- ◆ **RMN ^1H** (CD_3OD , 500 MHz) δ (ppm) : 7,35 (s, 1H, H_{Ar}) ; 4,24 (q, 2H, $^3J = 7,1 \text{ Hz}$, OCH_2) ; 4,11 (t, 2H, $^3J = 6,9 \text{ Hz}$, $\text{N}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$) ; 2,31 (t, 2H, $^3J = 6,9 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ; 2,26 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ; 1,93 (qt, 2H, $^3J = 6,9 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 1,31 (t, 3H, $^3J = 7,1 \text{ Hz}$, CH_2CH_3)
- ◆ **RMN ^{13}C** (CD_3OD , 126 MHz) δ (ppm) : 161,71 (CO_2) ; 155,38 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NH}_2$) ; 136,40 (CH_{Ar}) ; 118,84 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{CO}$) ; 60,85 (OCH_2) ; 56,37 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ; 45,08 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ; 42,11 ($\text{N}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$) ; 28,22 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 14,69 (CH_2CH_3)
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 241,1658 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (valeur théorique : m/z 241,1659)

Partie expérimentale

1-N-[3-(*N,N*-Diméthylamino)prop-1-ényl]-2-nitro-1*H*-imidazole-5-carboxylate d'éthyle (**21**)

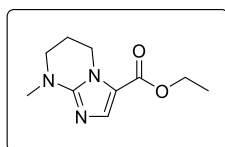


A une solution aqueuse de nitrite de sodium (13,0 g ; 188 mmol ; 10 éq) (17 mL) est additionnée goutte à goutte une solution du dérivé aminé **20** (4,52 g ; 18,8 mmol ; 1,0 éq.) dans de l'acide acétique glacial (33 mL ; 576 mmol ; 31,0 éq.). Lorsque le dégagement gazeux devient important, la solution est refroidie à 0 °C et ce jusqu'à la fin de l'ajout. L'agitation est maintenue à température ambiante durant 2 heures. Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C puis alcalinisé jusqu'à pH = 9-10 par ajout d'une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium (90 mL). La solution est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 200 mL), saturée par ajout de chlorure de sodium avant d'être ré-extraite avec de l'acétate d'éthyle (2 x 200 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées, et évaporées sous pression réduite. Le liquide orange obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 90/10, v/v + 1% TEA) pour conduire au dérivé nitré **21** (3,63 g ; 13,4 mmol).

- ◆ **Aspect** : huile jaune vif ◆ **Formule brute** : $C_{11}H_{18}N_4O_4$ ◆ **Masse molaire** : 270,29 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 71%
- ◆ **CCM** (SiO₂, acétate d'éthyle/éthanol, 90/10, v/v + 1% TEA) : $R_f = 0,55$
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 1722 ($\nu_{C=O}$) ; 1473 ($\nu_{as\ NO_2}$) ; 1334 ($\nu_{s\ NO_2}$) ; 1283 ; 1129 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN** ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : 7,70 (s, 1H, H_{Ar}) ; 4,98-4,77 (m, 2H, N_{Ar}CH₂) ; 4,37 (q, 2H, ³J = 7,1 Hz, OCH₂) ; 2,35 (t, 2H, ³J = 6,6 Hz, CH₂N(CH₃)₂) ; 2,14 (s, 6H, N(CH₃)₂) ; 2,11-1,86 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂) ; 1,39 (t, 3H, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃)
- ◆ **RMN** ¹³C (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ (ppm) : 158,48 (CO₂) ; 147,37 (C_{Ar}NO₂) ; 133,91 (CH_{Ar}) ; 125,91 (C_{Ar}CO₂) ; 61,37 (OCH₂) ; 56,18 (CH₂N(CH₃)₂) ; 46,42 (N_{Ar}CH₂) ; 44,69 (2C, N(CH₃)₂) ; 27,16 (CH₂CH₂CH₂) ; 13,91 (CH₂CH₃)
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 271,1400 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 271,1401)

Sous produit de la réaction:

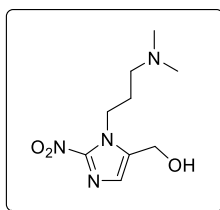
8-*N*-Méthyl-5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxylate d'éthyle



- ◆ **Aspect** : huile marron ◆ **Formule brute** : $C_{10}H_{15}N_3O_2$ ◆ **Masse molaire** : 209,25 g.mol⁻¹
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm, acétate d'éthyle/éthanol, 90/10, v/v + 1 % TEA) : $R_f = 0,61$
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 1690 ($\nu_{C=O}$) ; 1585 ; 1537 ($\nu_{C=N}$) ; 1108 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN** ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 7,45 (s, 1H, CH_{Ar}) ; 4,23 (q, 2H, ³J = 7,1 Hz, OCH₂) ; 4,20 (t, 2H, ³J = 6,2 Hz, N_{Ar}CH₂) ; 3,32-3,19 (m, 2H, CH₂N(CH₃)Ar) ; 3,08 (s, 3H, CH₂N(CH₃)Ar) ; 2,13 (qt, 2H, ³J = 5,9 Hz, CH₂CH₂CH₂) ; 1,31 (t, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃)
- ◆ **RMN** ¹³C (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 160,82 (CO₂) ; 152,65 (NC_{Ar}N) ; 135,78 (C_{Ar}H) ; 118,31 (C_{Ar}CO) ; 59,70 (OCH₂) ; 47,11 (CH₂N(CH₃)Ar) ; 42,54 (N_{Ar}CH₂) ; 37,36 (CH₂N(CH₃)Ar) ; 14,59 (CH₂CH₃)
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 210,1234 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 210,1237)

Partie expérimentale

{1-*N*-[3-(*N,N'*-Diméthylamino)propyl]-2-nitro-1*H*-imidazo-5-yl]méthanol (**22**)

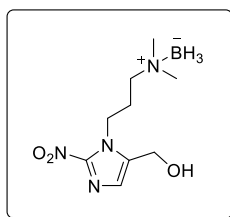


Une solution de l'ester **21** (3,63 g ; 13,4 mmol ; 1,0 éq.) dans un mélange THF/méthanol (32 mL, 80/20, v/v) est refroidie à 0 °C. Du borohydrure de sodium (1,52 g ; 40,2 mmol ; 3,0 éq.) est mis en suspension dans du THF (75 mL) d'une part, et du bromure de lithium (3,51 g ; 40,6 mmol ; 3,0 éq.) est dissout dans de l'eau (20 mL) d'autre part. Ces deux solutions sont réunies puis additionnées goutte à goutte au mélange réactionnel en veillant à ce que la température ne dépasse pas 10 °C. A la fin de l'addition, la réaction est laissée sous agitation dans un bain d'eau glacée, avec un retour progressif à température ambiante durant 17 heures. Le milieu réactionnel est alors refroidi à 0 °C avant ajout d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium (40 mL). Après évaporation du THF, la solution aqueuse obtenue est alcalinisée à pH 10 par addition d'une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium (40 mL). La solution est ensuite saturée par addition de chlorure de sodium, avant extraction avec de l'acétate d'éthyle (3 x 200 mL) en maintenant le pH de la phase aqueuse à 10. Les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. L'huile orange obtenue (2,45 g) est mise en solution dans de l'éthanol (180 mL) et chauffée à reflux durant 4 heures. Après retour à température ambiante et évaporation sous pression réduite, le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/méthanol, 95/5, v/v + 5% TEA) pour donner l'alcool **22** (1,49 g ; 6,53 mmol).

- ◆ **Aspect** : Huile orange
- ◆ **Formule brute** : C₉H₁₆N₄O₃
- ◆ **Masse molaire** : 228,25 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 49%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm, DCM/méthanol, 95/5, v/v + 5% TEA) : R_f = 0,18
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3239 (ν_{OH}) ; 1481 (ν_{as NO2}) ; 1335 (ν_{s NO2}) ; 1031 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : 7,03 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,29 (se, 1H, CH₂OH) ; 4,58 (s, 2H, CH₂OH) ; 4,46 (t, 2H, ³J = 6,8 Hz, N_{Ar}CH₂) ; 2,32 (t, 2H, ³J = 6,3 Hz, CH₂N(CH₃)₂) ; 2,19 (s, 6H, N(CH₃)₂) ; 2,09 (qt, 2H, ³J = 6,5 Hz, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CD₃OD, 126 MHz) δ (ppm) : 146,72 (C_{Ar}NO₂) ; 139,33 (C_{Ar}CH₂) ; 127,92 (CH_{Ar}) ; 57,19 (CH₂N(CH₃)₂) ; 54,58 (CH₂OH) ; 46,55 (N_{Ar}CH₂) ; 45,18 (2C, N(CH₃)₂) ; 28,57 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 229,1293 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 229,1295)

Partie expérimentale

Complexe 3-[(5-hydroxyméthyl)-2-nitro-1*H*-imidazo-1-*N'*-yl]-*N,N*-diméthyl-propyl-1-amine borane
(**22-BH₃**)



A une solution de bromure de lithium (90,7 mg ; 1,05 mmol ; 3,0 équ.) dans le THF (2 mL), est ajouté après refroidissement de la solution à 0 °C, du borohydrure de sodium (40,5 mg ; 1,07 mmol ; 3,0 équ.) puis de l'eau (570 µL). Cette solution est alors ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à 0°C de l'ester **21** (94,0 mg ; 0,348 mmol ; 1,0 équ.) dans un mélange THF/méthanol (80/20, v/v) (850 µL), en veillant à ce que la température ne dépasse pas 10 °C. Le mélange est ensuite laissé sous agitation à température ambiante durant 3 heures. Le milieu est refroidi à 0 °C avant ajout d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium (1 mL). Le pH de la solution est ajusté à 10 par ajout d'une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium. La solution est ensuite saturée par addition de chlorure de sodium, avant extraction avec de l'acétate d'éthyle (3 x 15 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/méthanol, 100/0, 95/5 puis 90/10, v/v). L'alcool **22** est ainsi obtenu sous forme d'un complexe au borane (42,1 mg ; 0,174 mmol).

- ◆ **Aspect** : Cristaux beige ◆ **Formule brute** : C₉H₁₉BN₄O₃ ◆ **Masse molaire** : 242,09 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 50%
- ◆ **CCM** (SiO₂, DCM/méthanol, 90/10, v/v + 1% TEA) : R_f = 0,75
- ◆ **Point de fusion** : 104 –105 °C
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3216 (ν_{OH}) ; 2386 ; 2363 ; 2314 ; 2271 (ν_{BH}) ; 1489 (ν_{as NO2}) ; 1333 (ν_{s NO2}) ; 1166 (ν_{C-N}) ; 1036 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : 7,11 (s, 1H, H_{Ar}) ; 4,76 (m, 2H, CH₂OH) ; 4,57-4,38 (m, 2H, N_{Ar}CH₂) ; 2,98–2,76 (m, 2H, CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 2,60 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂) ; 2,55-2,15 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 145,70 (C_{Ar}NO₂) ; 136,53 (C_{Ar}CH₂) ; 128,17 (CH_{Ar}) ; 61,58 (CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 54,65 (CH₂OH) ; 52,11 (2C, N⁺(CH₃)₂) ; 45,69 (N_{Ar}CH₂) ; 25,78 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 243,1616 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 243,1623)
m/z 265,1434 [M+Na]⁺ (valeur théorique : m/z 265,1442)
- ◆ **Données cristallographiques** :

Des monocristaux de tailles suffisantes pour une étude cristallographique ont été obtenus par cristallisation dans le DCM par diffusion lente par tension de vapeur d'éther diéthylique.

Formule brute	C ₉ H ₁₉ BN ₄ O ₃	Température (K)	170(2)
Masse molaire	242,09	F(000)	520
Système cristallin	monoclinique	λ (Mo Kα) (Å)	0,71073
Groupe d'espace	P 2 ₁ /c	Indices de Miller	-12 ≤ h ≤ 12
Couleur	incolore		-4 ≤ k ≤ 4

Partie expérimentale

a (Å)	15,822(13)		-11 ≤ l ≤ 11
b (Å)	5,983(4)	θ _{min} ; θ _{max} (°)	2,58 ; 17,18
c (Å)	13,470(11)	Réflexions collectées	21050
β (°)	95,12(3)	Réflexions uniques	747
Volume (Å ³)	1270,0(17)	Réflexions avec [I > 2σ(I)]	596
Z	4	Qualité d'affinement, S	1,246
d _{calc} (g.cm ⁻³)	1,266	wR ₂ (596 réfl)	0,2443
μ (mm ⁻¹)	0,094	R ₁ (596 réfl)	0,0791

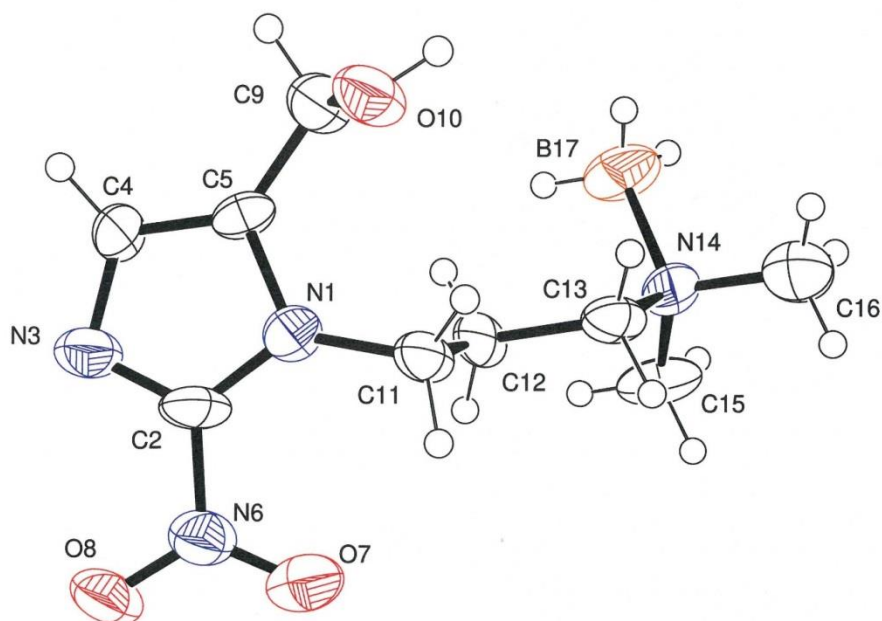


Figure ORTEP du composé **22-BH₃**. Les ellipsoïdes sont représentées au seuil de probabilité de 50%.

Longueurs de liaisons et angles (Å, °) pour le composé 22-BH₃

N1-C2	1,341 (14)	C2-N1-C5	105,5 (12)
N1-C5	1,384 (13)	C2-N1-C11	132,3 (15)
N1-C11	1,445 (14)	C5-N1-C11	122,2 (16)
C2-N3	1,302 (14)	N3-C2-N1	114,9 (14)
C2-N6	1,430 (17)	N3-C2-N6	120,5 (19)
N3-C4	1,356 (13)	N1-C2-N6	124,5 (18)
C4-C5	1,359 (14)	C2-N3-C4	102,6 (11)
C5-C9	1,468 (16)	C5-C4-N3	112,9 (10)
N6-O8	1,211 (11)	C4-C5-N1	104,2 (11)
N6-O7	1,238 (12)	C4-C5-C9	132,3 (16)

Partie expérimentale

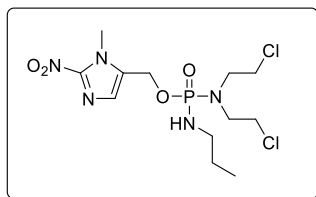
C9-O10	1,423 (12)	N1-C5-C9	123,5 (17)
C11-C12	1,516 (14)	O8-N6-O7	123,9 (13)
C12-C13	1,515 (13)	O8-N6-C2	118,0 (14)
C13-N14	1,489(12)	O7-N6-C2	118,1(14)
N14-C15	1,468(13)	O10-C9-C5	110,5(9)
N14-C16	1,489(12)	N1-C11-C12	112,3(9)
N14-B17	1,619(15)	C13-C12-C11	109,6(9)
		N14-C13-C12	115,9(8)
		C15-N14-C16	108,1(9)
		C15-N14-C13	111,7(8)
		C16-N14-C13	106,4(8)
		C15-N14-B17	110,8(9)
		C16-N14-B17	107,8(8)
		C13-N14-B17	111,7(9)

Angles dièdres (°) pour le composé 22-BH₃

C5-N1-C2-N3	0,7 (12)	C11-N1-C2-N3	179,5 (10)
C5-N1-C2-N6	175,9 (9)	C11-N1-C2-N6	-5,3 (17)
N1-C2-N3-C4	-0,6 (12)	N6-C2-N3-C4	-176,0 (9)
C2-N3-C4-C5	0,3 (12)	N3-C4-C5-N1	0,1 (11)
N3-C4-C5-C9	177,5 (11)	C2-N1-C5-C4	-0,4 (10)
C11-N1-C5-C4	-179,4 (9)	C2-N1-C5-C9	-178,1 (10)
C11-N1-C5-C9	2,9 (14)	N3-C2-N6-O8	9,5 (15)
N1-C2-N6-O8	-165,5 (10)	N3-C2-N6-O7	-169,6 (10)
N1-C2-N6-O7	15,4 (16)	C4-C5-C9-O10	-106,9 (13)
N1-C5-C9-O10	70,1 (13)	C2-N1-C11-C12	-93,6 (13)
C5-N1-C11-C12	85,1 (11)	N1-C11-C12-C13	-159,3 (10)
C11-C12-C13-N14	173,0 (9)	C12-C13-N14-C15	63,1 (12)
C12-C13-N14-C16	-179,1 (8)	C12-C13-N14-B17	-61,6 (12)

Partie expérimentale

N,N-Bis(2-chloroéthyl)-*N'*-propylphosphorodiamidate de (1-*N'*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)méthyle (**ICF05017**)

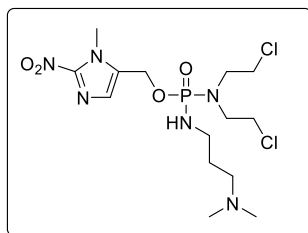


A une solution de l'alcool **12** (1,00 g ; 6,36 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (28 mL) refroidie à -78 °C, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF (7,60 mL ; 7,60 mmol ; 1,2 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** (1,93 g ; 7,45 mmol ; 1,2 éq.) dans du THF anhydre (20 mL) préalablement refroidie à -78 °C est ajoutée rapidement au mélange réactionnel. Le suivi de la réaction est monitoré par RMN ³¹P. Après 45 minutes d'agitation, de la propylamine (1,36 mL ; 16,5 mmol ; 2,6 éq.) est ajoutée et l'agitation est maintenue pendant 1 heure 30 à -78 °C. La réaction est stoppée par addition d'eau (40 mL) et le milieu réactionnel est alors extrait avec de acétate d'éthyle (3 × 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Deux chromatographies successives sont réalisées, la première sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 95/5, v/v + 5% TEA), la seconde sur colonne d'alumine (éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane, 90/10, v/v), pour conduire au phosphorodiamidate **ICF05017** (545 mg ; 1,36 mmol).

- ◆ **Aspect** : huile jaune ◆ **Formule brute** : C₁₂H₂₂Cl₂N₅O₄P ◆ **Masse molaire** : 402,21 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 21%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, acétate d'éthyle/éthanol, 95/5, v/v, + 5% TEA) : R_f = 0,49
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3233 (ν_{NH}) ; 1490 (ν_{as NO2}) ; 1350 (ν_{s NO2}) ; 1218 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1004 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN** ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 7,21 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,09 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,3 Hz, ³J_{H-P} = 7,8 Hz, OCH') ; 5,03 (dd, ²J_{H-H} = 13,3 Hz, ³J_{H-P} = 7,1 Hz, 1H, OCH'') ; 4,08 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,69-3,57 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,52-3,35 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 2,93-2,79 (m, 2H, NHCH₂) ; 2,58 (td, 1H, ²J_{H-P} = 9,3 Hz, ³J_{H-H} = 7,1 Hz, NH) ; 1,52 (h, 2H, ³J_{H-H} = 7,1 Hz, CH₂CH₂CH₃) ; 0,92 (t, 3H, ³J = 7,4 Hz, CH₂CH₂CH₃)
- ◆ **RMN** ¹³C (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 146,47 (C_{Ar}NO₂) ; 132,97 (d, ³J_{C-P} = 7,9 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 129,17 (CH_{Ar}) ; 56,22 (d, ²J_{C-P} = 3,9 Hz, OCH₂) ; 49,30 (d, 2C, ²J_{C-P} = 5,0 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 42,98 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 42,77 (NHCH₂) ; 34,50 (N_{Ar}CH₃) ; 25,09 (d, ³J_{C-P} = 6,6 Hz, CH₂CH₂CH₃) ; 11,29 (CH₂CH₃)
- ◆ **RMN** ³¹P (CDCl₃, 202 MHz) δ (ppm) : 16,34
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 402,0844 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 402,0859)

Partie expérimentale

N,N-Bis(2-chloroéthyl)-*N'*-[3-(*N''*,*N'''*-diméthylamino)propyl]phosphorodiamidate de (1-*N'''*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazo-5-yl)méthyle (**24**)

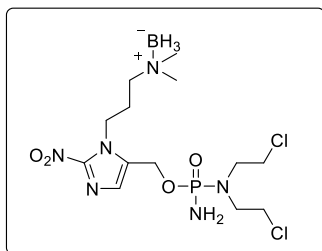


A une solution de l'alcool **12** (500 mg ; 3,18 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (14 mL) refroidie à -78 °C, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF anhydre (3,5 mL ; 3,50 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** (906 mg ; 3,50 mmol ; 1,1 éq.) dans du THF anhydre (20 mL), préalablement refroidie à -78 °C, est ajoutée rapidement au mélange réactionnel. Le suivi de la réaction est monitoré par RMN ³¹P. Après 1 heure d'agitation, de la 3-(*N,N*-diméthylamino)propylamine (800 µL ; 6,36 mmol ; 2,0 éq.) est ajoutée. Le milieu réactionnel est agité pendant 15 minutes à -78 °C. La réaction est stoppée par addition d'eau (20 mL) et le milieu réactionnel est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 × 20 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v, + 5% ammoniacque) pour conduire au phosphorodiamidate **24** (604 mg ; 1,36 mmol).

- ◆ **Aspect** : Huile orange ◆ **Formule brute** : C₁₄H₂₇Cl₂N₆O₄P ◆ **Masse molaire** : 445,28 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 43%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v, + 5% ammoniacque) : R_f = 0,41
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3233 (ν_{NH}) ; 1492 (ν_{as NO2}) ; 1353 (ν_{s NO2}) ; 1221 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1013 (ν_{C-O}, ν_{P-O})
- ◆ **RMN ¹H** (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ (ppm) : 7,25 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,00 (d, 2H, ³J_{H-P} = 7,5 Hz, OCH₂) ; 4,86 (td, 1H, ²J_{H-P} = 12,5 Hz, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, NH) ; 3,95 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,70-3,60 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,36-3,21 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 2,77 (qd, 2H, ³J_{H-P} = 10,7 Hz, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, NHCH₂) ; 2,25 (td, 2H, ³J_{H-H} = 6,9 Hz, ⁵J_{H-P} = 2,4 Hz, CH₂N(CH₂)₃) ; 2,13 (s, 6H, CH₂N(CH₃)₂) ; 1,54 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 7,0 Hz, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ (ppm) : 146,03 (C_{Ar}NO₂) ; 134,00 (d, ³J_{C-P} = 7,9 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 128,13 (CH_{Ar}) ; 56,41 (CH₂N(CH₂)₃) ; 55,69 (d, ²J_{C-P} = 4,1 Hz, OCH₂) ; 48,43 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4,3 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 44,88 (2C, CH₂N(CH₃)₂) ; 42,40 (d, 2C, ³J_{C-P} = 1,4 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 38,49 (NHCH₂) ; 34,20 (N_{Ar}CH₃) ; 28,86 (d, ³J_{C-P} = 5,9 Hz, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** (CD₃OD, 202 MHz) δ (ppm) : 18,17
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 445,1287 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 445,1281)

Partie expérimentale

Complexe 4-{5-[[amino[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl]oxy)méthyl]-2-nitro-1*H*-imidazol-1-*N'*-yl}-*N,N*-diméthylpropan-1-amine borane (**26-BH₃**)

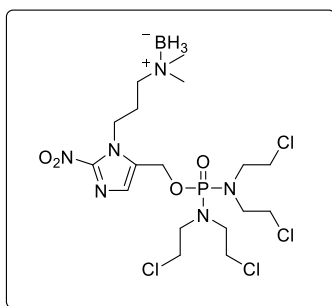


A une solution de l'alcool **22-BH₃** (165 mg ; 0,682 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (5 mL) refroidie à -78 °C, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF (750 µL ; 0,750 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution de dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** (194 mg ; 0,749 mmol ; 1,1 éq.) dans du THF anhydre (2 mL) préalablement refroidie à -78 °C, est ajoutée rapidement au mélange réactionnel. Le suivi de la réaction est monitoré par RMN ³¹P. Après 1 heure d'agitation, un courant d'ammoniac est réalisé durant 1-2 minutes dans le milieu réactionnel, toujours refroidi à -78 °C. De l'eau est additionnée (10 mL) puis la solution est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 × 20 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/éthanol, 97/3, v/v) pour conduire au phosphorodiamidate **26-BH₃** (282 mg ; 0,634 mmol).

- ◆ **Aspect** : Huile beige ◆ **Formule brute** : C₁₃H₂₈BCl₂N₆O₄P ◆ **Masse molaire** : 445,09 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 93%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, DCM/éthanol, 97/3, v/v) : R_f = 0,20
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3241 (ν_{NH2}) ; 2380 ; 2318 ; 2273 (ν_{BH}) ; 1484 (ν_{as} NO₂) ; 1338 (ν_s NO₂) ; 1224 ; 1168 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1012 ; 971 (ν_{C-O}, ν_{P-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 7,25 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,15 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,2 Hz, ³J_{H-P} = 7,0 Hz, OCH') ; 5,02 (dd, ²J_{H-H} = 13,2 Hz, ³J_{H-P} = 5,9 Hz, 1H, OCH'') ; 4,51 (ddd, 1H, ²J_{H-H} = 13,6 Hz, ³J_{H-H} = 10,8 Hz, ³J_{H-H} = 5,4 Hz, N_{Ar}CH') ; 4,41 (ddd, 1H, ²J_{H-H} = 13,6 Hz, ³J_{H-H} = 10,7 Hz, ³J_{H-H} = 5,5 Hz, N_{Ar}CH'') ; 3,70-3,65 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,58-3,44 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,11 (se, 2H, NH₂) ; 2,91 (ddd, 1H, ²J_{H-H} = ³J_{H-H} = 11,8 Hz, ³J_{H-H} = 5,0 Hz, CH'N⁺(CH₃)₂) ; 2,81 (ddd, 1H, ²J_{H-H} = ³J_{H-H} = 11,8 Hz, ³J_{H-H} = 5,1 Hz, CH''N⁺(CH₃)₂) ; 2,65 et 2,61 (s, 3H, N⁺(CH₃)₂) ; 2,48-2,38 (m, 1H, CH₂CH'CH₂) ; 2,38-2,27 (m, 1H, CH₂CH''CH₂) ; 1,97-1,30 (m, 3H, BH₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 145,86 (C_{Ar}NO₂) ; 132,74 (d, ³J_{C-P} = 9,1 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 129,78 (CH_{Ar}) ; 61,50 (CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 55,97 (d, ²J_{C-P} = 3,6 Hz, OCH₂) ; 53,18 ; 51,86 (2C, N⁺(CH₃)₂) ; 48,94 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4,9 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 45,46 (N_{Ar}CH₂) ; 42,70 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 26,12 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** : (CDCl₃, 202 MHz) δ (ppm) : 16,47
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 443,1296 [M-H]⁺ (valeur théorique : m/z 443,1296)
m/z 467,1272 [M+Na]⁺ (valeur théorique : m/z 467,1272)

Partie expérimentale

Complexe 3-{5-[[bis[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl]oxy)méthyl]-2-nitro-1*H*-imidazol-1-*N'*-yl]-*N,N*-diméthylpropan-1-amine borane (**27-BH₃**)

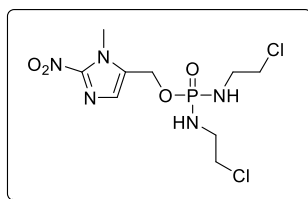


A une solution refroidie à -78 °C de l'alcool **22-BH₃** (150 mg ; 0,620 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (4,5 mL), est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF (680 µL ; 0,680 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du chlorure de l'acide phosphorodiamidique **2** (306 mg ; 0,840 mmol ; 1,4 éq.) dans du THF anhydre (4 mL) préalablement refroidie à -78 °C, est additionnée au milieu réactionnel. Le suivi de la réaction est monitoré par RMN ³¹P. Après 1 heure d'agitation à -78 °C, le mélange est agité à température ambiante durant 20 heures. Après addition d'eau (10 mL), la solution est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 10 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/méthanol, 98/2 v/v) pour conduire au phosphorodiamidate **27-BH₃** (264 mg ; 0,463 mmol).

- ◆ **Aspect** : Huile incolore
- ◆ **Formule brute** : C₁₇H₃₄BCl₄N₆O₄P
- ◆ **Masse molaire** : 570,08 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 70%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, DCM/méthanol, 98/2, v/v) : R_f = 0,28
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 2380 ; 2319 ; 2273 (ν_{BH}) ; 1483 (ν_{as} NO₂) ; 1339 (ν_s NO₂) ; 1219 ; 1169 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1004 ; 964 (ν_{C-O}, ν_{P-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 7,28 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,17 (d, 2H, ³J_{H-P} = 8,1 Hz, OCH₂) ; 4,54-4,47 (m, 2H, N_{Ar}CH₂) ; 3,71-3,56 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,41 (td, 8H, ³J_{H-P} = 12,9 Hz, ³J_{H-H} = 6,5 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 2,87-2,81 (m, 2H, CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 2,61 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂) ; 2,34-2,25 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂) ; 1,30-2,00 (m, 3H, BH₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 145,87 (C_{Ar}NO₂) ; 132,32 (d, ³J_{C-P} = 7,0 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 130,09 (CH_{Ar}) ; 61,47 (CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 56,38 (d, ²J_{C-P} = 3,8 Hz, OCH₂) ; 52,47 (2C, N⁺(CH₃)₂) ; 49,31 (d, 4C, ²J_{C-P} = 4,6 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 45,49 (N_{Ar}CH₂) ; 42,34 (4C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 26,18 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** : (CDCl₃, 202MHz) δ (ppm) : 17,14
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 593,1088 [M+Na]⁺ (valeur théorique : m/z 593,1089)

Partie expérimentale

N,N'-Bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate de (1-*N*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazo-5-yl)méthyle (**30**)

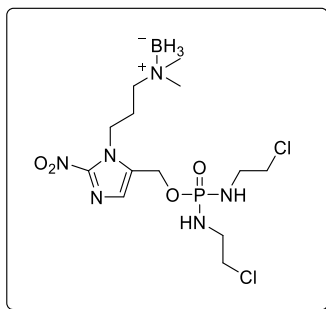


L'acide phosphorodiamidique **3** (357 mg ; 1,62 mmol ; 1,0 éq.) est dissout dans du THF anhydre (60 mL). De la triphénylphosphine (531 mg ; 2,02 mmol ; 1,2 éq.) et l'alcool **12** (317 mg ; 2,02 mmol ; 1,2 éq.) sont ajoutés à la solution. Après refroidissement à 0 °C, de l'azodicarboxylate d'isopropyle (400 µL ; 2,03 mmol ; 1,2 éq.) est ajouté goutte à goutte. Après retour à température ambiante et agitation pendant 1 heure, le milieu est évaporé sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 95/5 puis 93/7, v/v) pour donner le phosphorodiamidate **30** sous la forme d'une huile incolore. Après précipitation du produit dans l'éther diéthylique anhydre et évaporation sous pression réduite, le phosphorodiamidate **30** (352 mg ; 977 µmol) est obtenu.

- ◆ **Aspect** : Solide beige ◆ **Formule brute** : C₉H₁₆Cl₂N₅O₄P ◆ **Masse molaire** : 360,13 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 60%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, acétate d'éthyle/éthanol, 97/3, v/v) : R_f = 0,15
- ◆ **Point de fusion** : 112-113 °C
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3189 (ν_{NH}) ; 1496 (ν_{as} NO₂) ; 1354 (ν_s NO₂) ; 1204 ; 1185 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1014 ; 966 (ν_{C-O}, ν_{P-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN** ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ (ppm) : 7,24 (s, 1H, H_{Ar}) ; 4,98 (d, 2H, ³J_{H-P} = 7,5 Hz, OCH₂) ; 4,92 (td, 2H, ²J_{H-P} = 10,7 Hz, ³J_{H-H} = 7,0 Hz, NH) ; 3,95 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,55 (t, 4H, ³J = 6,6 Hz, NHCH₂CH₂Cl) ; 3,06 (qd, 4H, ³J_{H-P} = 12,4 Hz, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, NHCH₂CH₂Cl)
- ◆ **RMN** ¹³C (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ (ppm) : 145,96 (C_{Ar}NO₂) ; 134,14 (d, ³J_{C-P} = 8,0 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 128,06 (CH_{Ar}) ; 55,52 (d, ²J_{C-P} = 4,1 Hz, OCH₂) ; 44,92 (d, 2C, ³J_{C-P} = 5,1 Hz, NHCH₂CH₂Cl) ; 42,62 (2C, NHCH₂CH₂Cl) ; 34,17 (N_{Ar}CH₃)
- ◆ **RMN** ³¹P (DMSO-*d*₆, 202 MHz) δ (ppm) : 16,19
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 360,0388 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 360,0390)
m/z 382,0207 [M+Na]⁺ (valeur théorique : m/z 382,0209)

Partie expérimentale

Complexe 3-{5-[[bis[(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl]oxy)méthyl]-2-nitro-1*H*-imidazol-1-*N'*-yl]-*N,N*-diméthylpropan-1-amine borane (**29-BH₃**)



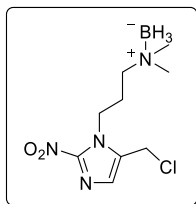
A une solution refroidie à -78 °C d'oxychlorure de phosphore (200 µL ; 2,15 mmol ; 1,0 éq.) dans du DCM anhydre (5 mL), est additionnée goutte à goutte une solution du de l'alcool **22-BH₃** (500 mg ; 2,07 mmol ; 1,0 éq.) et de TEA (320 µL ; 2,30 mmol ; 1,1 éq.) dans du DCM anhydre (4 mL). Après 1 heure d'agitation à -78 °C, sont ajoutés le chlorhydrate de 2-chloroéthylamine (501 mg ; 4,35 mmol ; 2,1 éq.) puis goutte à goutte de la TEA (1,3 mL ; 9,33 mmol ; 4,5 éq.). Après retour progressif à 5°C et agitation durant 18 heures, la réaction est stoppée par addition d'eau (30 mL). Après séparation des phases, la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (30 mL) puis séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner une huile jaune pâle, qui est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 95/5 puis 90/10, v/v) permettant d'isoler le phosphorodiamidate **29-BH₃** (445 mg ; 1,00 mmol).

- ◆ **Aspect** : huile beige ◆ **Formule brute** : C₁₃H₂₈BCl₂N₆O₄P ◆ **Masse molaire** : 445,09 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 48%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, acétate d'éthyle/éthanol, 95/5, v/v) : R_f = 0,15
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3237 (ν_{NH}) ; 2381 ; 2318, 2273 (ν_{BH}) ; 1484 (ν_{as NO2}) ; 1338 (ν_{s NO2}) ; 1209 ; 1168 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1008 ; 972 (ν_{C-O}, ν_{P-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : 7,24 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,07 (d, 2H, ³J_{H-P} = 7,0 Hz, OCH₂) ; 4,48-4,42 (m, 2H, N_{Ar}CH₂) ; 3,61-3,55 (m, 2H, NHCH₂CH₂Cl) ; 3,45-3,34 (m, 2H, NH) ; 3,34-3,22 (m, 4H, NHCH₂CH₂Cl) ; 2,88-2,81 (m, 2H, CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 2,62 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂) ; 2,42-2,32 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂) ; 1,93-1,32 (m, 3H, BH₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 145,90 (C_{Ar}NO₂) ; 132,79 (d, ³J_{C-P} = 8,6 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 129,76 (CH_{Ar}) ; 61,59 (CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 56,05 (d, ²J_{C-P} = 3,8 Hz, OCH₂) ; 52,56 (2C, N⁺(CH₃)₂) ; 45,78 (d, 2C, ³J_{C-P} = 5,4 Hz, NHCH₂CH₂Cl) ; 45,55 (N_{Ar}CH₂) ; 43,17 (2C, NHCH₂CH₂Cl) ; 26,14 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** : (CDCl₃, 202 MHz) δ (ppm) : 15,04
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 443,1295 [M-H]⁺ (valeur théorique : m/z 443,1296)
m/z 467,1270 [M+Na]⁺ (valeur théorique : m/z 467,1272)

Partie expérimentale

Sous produit de la réaction:

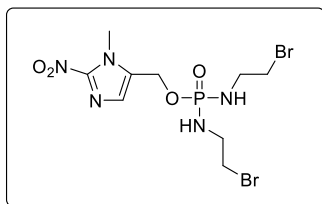
Complexe 3-(2-nitro-5-chlorométhyl-1*H*-imidazo-1-*N'*-yl)-*N,N*-diméthylpropan-1-amine borane



- ◆ **Aspect** : huile beige ◆ **Formule brute** : $C_9H_{18}BClN_4O_2$ ◆ **Masse molaire** : $260,53 \text{ g.mol}^{-1}$
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, DCM/méthanol, 95/5, v/v) : $R_f = 0,90$
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : 7,22 (s, 1H, H_{Ar}) ; 4,67 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,53-4,36 (m, 2H, N_{Ar}CH₂) ; 2,97-2,74 (m, 2H, CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 2,61 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂) ; 2,47-2,23 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 145,85 (C_{Ar}NO₂) ; 130,01 (C_{Ar}CH₂) ; 129,31 (CH_{Ar}) ; 61,40 (CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 52,07 (N⁺(CH₃)₂) ; 45,54 (N_{Ar}CH₂) ; 33,93 (CH₂Cl) ; 25,63 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 283,1 [M+Na]⁺ (valeur théorique : m/z 283,1)

Partie expérimentale

N,N'-Bis(2-bromoéthyl)phosphorodiamidate de (1-*N''*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazo-5-yl)méthyle
(**TH-302**)

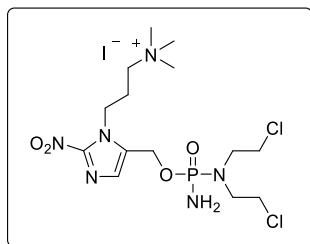


A une solution refroidie à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ d'oxychlorure de phosphore ($57\text{ }\mu\text{L}$; $0,612\text{ mmol}$; $1,0\text{ éq.}$) dans du THF anhydre (1 mL), est additionnée goutte à goutte une solution de l'alcool **12** ($95,2\text{ mg}$; $0,606\text{ mmol}$; $1,0\text{ éq.}$) et de TEA ($90\text{ }\mu\text{L}$; $0,646\text{ mmol}$; $1,1\text{ éq.}$) dans du THF anhydre (3 mL). Après 1 heure d'agitation à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, du bromhydrate de 2-bromoéthylamine (262 mg ; $1,28\text{ mmol}$; $2,1\text{ éq.}$) est ajouté au milieu réactionnel puis goutte à goutte de la TEA ($380\text{ }\mu\text{L}$; $2,73\text{ mmol}$; $4,5\text{ éq.}$). Après retour progressif à température ambiante et agitation durant 15 heures, le milieu réactionnel est filtré et le solide est lavé avec du THF anhydre ($3 \times 2\text{ mL}$). Le filtrat est évaporé sous pression réduite et l'huile beige obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/méthanol, 98/2 puis 94/6, v/v) pour conduire au phosphorodiamidate **TH-302** ($86,1\text{ mg}$; $0,192\text{ mmol}$).

- ◆ **Aspect** : Solide beige
- ◆ **Formule brute** : $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{N}_5\text{O}_4\text{P}$
- ◆ **Masse molaire** : $449,04\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 32%
- ◆ **CCM** (SiO_2 , UV 254 nm et NBP, DCM/méthanol, 98/2, v/v) : $R_f = 0,19$
- ◆ **Point de fusion** : $93\text{-}94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (littérature : $98\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$)⁴⁰⁸
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 3191 (ν_{NH}) ; 1496 ($\nu_{\text{as NO}_2}$) ; 1354 ($\nu_{\text{s NO}_2}$) ; 1200 ; 1115 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 1011 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN ^1H** (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ (ppm) : 7,25 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,24-4,77 (m, 4H, OCH_2 , NH) ; 3,94 (s, 3H, $\text{N}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$) ; 3,48-3,38 (m, 4H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$) ; 3,11 (qd, 4H, $^3J_{\text{H-P}} = 13,8\text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-H}} = 6,9\text{ Hz}$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$)
- ◆ **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) : 146,23 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$) ; 133,02 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7,6\text{ Hz}$, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$) ; 129,06 (CH_{Ar}) ; 56,25 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4,1\text{ Hz}$, OCH_2) ; 42,95 (2C, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$) ; 34,60 ($\text{N}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$) ; 34,58 (d, 2C, $^3J_{\text{C-P}} = 5,1\text{ Hz}$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$)
- ◆ **RMN ^{31}P** (DMSO- d_6 , 202 MHz) δ (ppm) : 15,77
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 449,86 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (valeur théorique : m/z 449,94)

Partie expérimentale

Iodure de 3-{5-[[{amino[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl]oxy)méthyl]-2-nitro-1*H*-imidazol-1-*N'*-yl]-*N,N,N*-triméthylpropan-1-aminium (**33**)

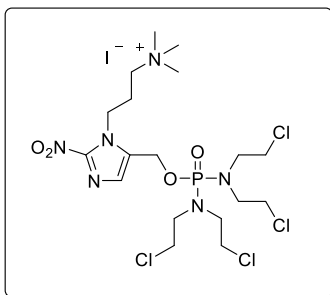


A une solution du complexe de bore **26-BH₃** (39,9 mg ; 89,6 μmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (2,5 mL), est ajouté du DABCO (50,1 mg ; 447 μmol ; 5,0 éq.). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante durant 1 heure puis chauffé à 30 °C durant 1 heure 30. Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C et de l'iodure de méthyle (90 μL ; 1,45 mmol ; 15 éq.) est ajouté. Après 2 heures 30 d'agitation à température ambiante, une quantité supplémentaire d'iodure de méthyle (30 μL ; 0,48 mmol ; 5,0 éq.) est additionnée et l'agitation est maintenue durant 1 heure à température ambiante. Le mélange est évaporé sous pression réduite pour donner une poudre jaune (173 mg), qui est purifiée par chromatographie préparative en phase inverse (éluant : gradient ACN dans l'eau) pour donner après lyophilisation l'ammonium quaternaire **33** (38,4 mg ; 67,0 μmol).

- ◆ **Conditions de purification** : détection : 254 nm et 323 nm ; durée de la séparation : 30 minutes ; éluant : H₂O/ACN (v/v) : 95/5 durant 2 minutes ; 95/5 → 70/30 durant 6 minutes ; 70/30 durant 2 minutes ; 70/30 → 60/40 durant 6 minutes ; 60/40 durant 3 minutes ; 60/40 → 10/90 durant 7 minutes ; 10/90 durant 4 minutes ; temps de rétention : 14,2 minutes
- ◆ **Aspect** : lyophilisat jaune très hygroscopique
- ◆ **Masse molaire** : 573,19 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 75%
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3216 (ν_{NH_2}) ; 1483 ($\nu_{\text{as NO}_2}$) ; 1338 ($\nu_{\text{s NO}_2}$) ; 1220 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 1015 ; 973 ; 923 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN ¹H** (CD₃OD, 200 MHz) δ (ppm) : 7,32 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,19 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,4 Hz, ³J_{H-P} = 7,7 Hz, OCH') ; 5,11 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,4 Hz, ³J_{H-P} = 7,0 Hz, OCH'') ; 4,61-4,46 (m, 2H, N_{Ar}CH₂) ; 3,75-3,67 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,65-3,39 (m, 6H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 3,20 (s, 9H, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 2,55–2,34 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CD₃OD, 50 MHz) δ (ppm) : 147,08 (C_{Ar}NO₂) ; 134,88 (d, ³J_{C-P} = 8,1 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 129,97 (CH_{Ar}) ; 64,34 (CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 57,32 (d, ²J_{C-P} = 4,2 Hz, OCH₂) ; 54,02 ; 53,94 ; 53,87 (3C, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 50,39 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 45,26 (N_{Ar}CH₂) ; 43,18 (d, 2C, ³J_{C-P} = 1,2 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 25,24 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** (CD₃OD, 202 MHz) δ (ppm) : 19,45
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 445,1282 [M]⁺ (valeur théorique : m/z 445,1281)

Partie expérimentale

Iodure de 3-{5-[[bis[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl]oxy)méthyl]-2-nitro-1*H*-imidazol-1-*N'*-yl]-*N,N,N*-triméthylpropan-1-aminium (**34**)

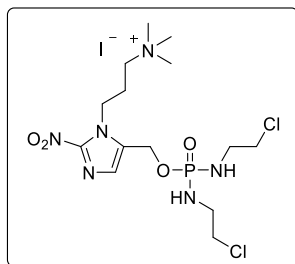


A une solution du complexe de bore **27-BH₃** (128 mg ; 0,225 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (5 mL) est ajouté du DABCO (126 mg ; 1,12 mmol ; 5,0 éq.). Le mélange est chauffé à 40 °C durant 1 heure. Après refroidissement à 0 °C, de l'iodure de méthyle (210 µL ; 3,37 mmol ; 15 éq.) est ajouté et l'agitation est maintenue à température ambiante pendant 1 heure. De l'iodure de méthyle (50 µL ; 0,803 mmol ; 3,5 éq.) est ajouté à 0 °C et l'agitation est maintenue à cette température durant 30 minutes. De l'iodure de méthyle (50 µL ; 0,803 mmol ; 3,5 éq.) est additionné une nouvelle fois et le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante durant 30 minutes. Le mélange est évaporé sous pression réduite pour donner une poudre jaune qui est purifiée par chromatographie préparative en phase inverse (éluant : gradient ACN dans l'eau) pour donner après lyophilisation l'ammonium quaternaire **34** (33,4 mg ; 47,8 µmol).

- ◆ **Conditions de purification** : détection : 254 nm et 323 nm ; durée de la séparation : 30 minutes ; éluant : H₂O/ACN (v/v) : 95/5 durant 2 minutes ; 95/5 → 70/30 durant 6 minutes ; 70/30 durant 2 minutes ; 70/30 → 60/40 durant 6 minutes ; 60/40 durant 3 minutes ; 60/40 → 36/64 durant 1,5 minutes ; 36/64 durant 1,5 minutes ; 36/64 → 10/90 durant 2 minutes ; 10/90 durant 6 minutes ; temps de rétention : 21,1 minutes
- ◆ **Aspect** : lyophilisat jaune très hygroscopique
- ◆ **Formule brute** : C₁₈H₃₄Cl₄IN₆O₄P
- ◆ **Masse molaire** : 698,19 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 21%
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 1483 (ν_{as} NO₂) ; 1339 (ν_s NO₂) ; 1230 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1065, 1057, 1027, 971 (ν_{C-O}, ν_{P-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN ¹H** (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm) : 7,38 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,31 (d, 2H, ³J_{H-P} = 8,7 Hz, OCH₂) ; 4,59 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7,8 Hz, N_{Ar}CH₂) ; 3,76-3,67 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,65-3,60 (m, 2H, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 3,52-3,43 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,21 (s, 9H, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 2,49-2,39 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CD₃OD, 126 MHz) δ (ppm) : 147,09 (C_{Ar}NO₂) ; 134,31 (d, ³J_{C-P} = 6,8 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 130,48 (C_{Ar}) ; 64,28 (CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 57,86 (d, ²J_{C-P} = 4,0 Hz, OCH₂) ; 53,92 ; 53,89 ; 53,86 (3C, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 50,11 (d, 4C, ²J_{C-P} = 4,6 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 45,18 (N_{Ar}CH₂) ; 43,11 (4C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 25,28 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** (CD₃OD, 202 MHz) δ (ppm) : 18,04
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 569,1137 [M]⁺ (valeur théorique : m/z 569,1128)

Partie expérimentale

Iodure de 3-{5-[[bis[(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl]oxy)méthyl]-2-nitro-1*H*-imidazol-1-*N'*-yl]-*N,N,N*-triméthylpropan-1-aminium (**35**)

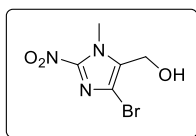


A une solution du complexe de bore **29-BH₃** (90,0 mg ; 0,202 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (5 mL), est ajouté du DABCO (113 mg ; 1,01 mmol ; 5,0 éq.). Le mélange est chauffé à 40 °C durant 1 heure, puis refroidi à 0 °C avant ajout d'iodure de méthyle (190 µL ; 3,05 mmol ; 15 éq.). Après retour progressif du milieu réactionnel à température ambiante, l'agitation est maintenue encore durant 1 heure 30 avant évaporation sous pression. La poudre jaune obtenue est purifiée par chromatographie préparative en phase inverse (éluant : gradient ACN dans l'eau) pour donner après lyophilisation l'ammonium quaternaire **35** (66,6 mg ; 0,116 mmol).

- ◆ **Conditions de purification** : détection : 254 nm et 323 nm ; durée de la séparation : 30 minutes ; éluant : H₂O/ACN (v/v) : 95/5 durant 2 minutes ; 95/5 → 70/30 durant 6 minutes ; 70/30 durant 2 minutes ; 70/30 → 64/36 durant 4 minutes ; 64/36 durant 2 minutes ; 64/36 → 60/40 durant 2 minutes ; 60/40 durant 2 minutes ; 60/40 → 10/90 durant 7 minutes ; 10/90 durant 3 minutes ; temps de rétention : 14,5 minutes
- ◆ **Aspect** : lyophilisat jaune très hygroscopique
- ◆ **Masse molaire** : 573,19 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 57%
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3215 (ν_{NH}) ; 1534 (δ_{NH}) ; 1483 (ν_{as NO₂}) ; 1338 (ν_{s NO₂}) ; 1202 ; 1186 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1009 ; 976 (ν_{C-O}, ν_{P-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN ¹H** (CD₃OD, 200 MHz) δ (ppm) : 7,31 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,16 (d, ³J_{H-P} = 7,9 Hz, 2H, CH₂O) ; 4,77-4,43 (m, 2H, N_{Ar}CH₂) ; 3,70-3,53 (m, 6H, NHCH₂CH₂Cl, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 3,28-3,14 (m, 13H, NHCH₂CH₂Cl, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 2,57-2,34 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CD₃OD, 126 MHz) δ (ppm) : 147,11 (C_{Ar}NO₂) ; 134,92 (d, ³J_{C-P} = 7,8 Hz, C_{Ar}CH₂O) ; 129,89 (CH_{Ar}) ; 64,43 ; 64,40 ; 64,38 (CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 57,73 (d, ²J_{C-P} = 4,6 Hz, C_{Ar}CH₂O) ; 54,00 ; 53,97 ; 53,94 (3C, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 46,01 (d, 2C, ³J_{C-P} = 5,1 Hz, NHCH₂CH₂Cl) ; 45,37 (N_{Ar}CH₂) ; 44,18 (2C, NHCH₂CH₂Cl) ; 25,28 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** (CD₃OD, 202 MHz) δ (ppm) : 17,12
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 455,1281 [M]⁺ (valeur théorique : m/z 455,1281)

Partie expérimentale

(4-Bromo-1-*N*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazo-5-yl)méthanol (**36**)

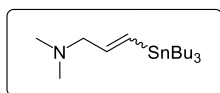


A une solution de l'imidazole **12** (6,01 g ; 38,2 mmol ; 1,0 éq.) dans du DMF anhydre (45 mL), est ajouté du *N*-bromosuccinimide (7,56 g ; 42,5 mmol ; 1,1 éq.). Le mélange est chauffé à 60 °C pendant 2 heures 30. Après retour à température ambiante, la réaction est stoppée par addition d'eau (250 mL). Un précipité jaune/vert est filtré et lavé par de l'éther diéthylique (3 x 30 mL). Le solide est ensuite séché à 30 °C au dessiccateur sous vide pour donner le produit de bromation **36** analytiquement pur (5,84 g ; 24,7 mmol). Le filtrat est décanté et la phase aqueuse est saturée en chlorure de sodium et extraite avec de l'acétate d'éthyle (2 x 200 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (500 mL) puis à l'eau (500 mL). La phase organique est séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le solide jaune/vert obtenu est séché au dessiccateur sous vide à 30 °C pour donner une seconde fraction du dérivé **36** (1,54 g ; 6,52 mmol) analytiquement pur après analyses RMN ¹H et ¹³C.

- ◆ **Aspect** : solide jaune/vert ◆ **Formule brute** : C₅H₈BrN₃O₃ ◆ **Masse molaire** : 236,03 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 82%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm, acétate d'éthyle/cyclohexane, 80/20, v/v) : R_f = 0,82
- ◆ **Point de fusion** : 163-164 °C
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3321 (ν_{OH}) ; 1488 (ν_{as} NO₂) ; 1364 (ν_s NO₂) ; 1015 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN ¹H** (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ (ppm) : 4,51 (s, 2H, OCH₂) ; 3,98 (s, 3H, N_{Ar}CH₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ (ppm) : 144,31 (C_{Ar}NO₂) ; 135,77 (C_{Ar}CH₂) ; 113,92 (C_{Ar}Br) ; 52,02 (OCH₂) ; 35,06 (N_{Ar}CH₃)

Partie expérimentale

(Z) et (E) *N,N*-Diméthyl-3-(tributylstannyl)-prop-2-èn-1-amine (**37**)



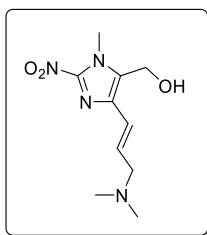
A une solution de *N,N*-diméthylpropargylamine (3,80 mL ; 35,3 mmol ; 1,0 éq.) dans du toluène anhydre (150 mL), est ajouté de l'hydrure de tributylétain (16,4 mL ; 61,0 mmol ; 1,7 éq.) et de l'azobisisobutyronitrile (751 mg ; 4,57 mmol ; 0,1 éq.). Le mélange réactionnel est chauffé à 85 °C pendant 3 heures 30 puis à reflux pendant 1 heure. Après retour à température ambiante et concentration sous pression réduite, le brut réactionnel (24,0 g) est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (cyclohexane/acétate d'éthyle/méthanol, 95/4/1, 90/8/2 puis 90/6/4, v/v/v) pour conduire au dérivé **37** sous la forme de :

- l'isomère (Z) seul (1,36 g ; 3,63 mmol),
- l'isomère (E) seul (5,20 g ; 13,9 mmol),
- et une fraction contenant le mélange des deux isomères (4,62 g ; 12,3 mmol) avec un pourcentage (Z)/(E) = 17/83.

- ◆ **Aspect** : Liquide jaunâtre ◆ **Formule brute** : $C_{17}H_{37}NSn$ ◆ **Masse molaire** : 374,20 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 85%
- ◆ **CCM** (SiO₂, KMnO₄, cyclohexane/acétate d'éthyle/méthanol, 90/6/4, v/v/v) : Isomère (Z), R_f = 0,50 ; Isomère (E) R_f = 0,33
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 2954, 2922, 2871, 2581 (ν_{CH}) ; 1455 (ν_{C=C}) ; 856 (δ_{CH})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : Isomère (Z) : 6,55 (td, 1H, ³J_{H-H cis} = 12,6 Hz, ³J_{H-H} = 6,2 Hz, CH=CHCH₂) ; 6,11-5,90 (td, 1H, ³J_{H-H cis} = 12,7 Hz, ⁴J_{H-H} = 1,2 Hz, CH=CHCH₂) ; 2,90 (dd, 2H, ³J_{H-H} = 6,2 Hz, ⁴J_{H-H} = 1,1 Hz, CH=CHCH₂) ; 2,22 (s, 6H, N(CH₃)₂) ; 1,60-1,40 (m, 6H, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃) ; 1,30 (h, 6H, ³J_{H-H} = 7,3 Hz, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃) ; 1,01-0,81 (m, 15H, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃)
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : Isomère (E) : 6,11 (d, 1H, ³J_{H-H trans} = 19,0 Hz, CH=CHCH₂) ; 5,97 (td, 1H, ³J_{H-H trans} = 18,9 Hz, ³J_{H-H} = 4,9 Hz, CH=CHCH₂) ; 2,97 (d, 2H, ³J_{H-H} = 4,8 Hz, CH=CHCH₂) ; 2,23 (s, 6H, N(CH₃)₂) ; 1,55-1,15 (m, 12H, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃) ; 0,98-0,80 (m, 15H, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : Isomère (Z) : 146,31 (CH=CHCH₂) ; 131,39 (CH=CHCH₂) ; 65,13 (CH=CHCH₂) ; 45,47 (2C, N(CH₃)₂) ; 29,34 (3C, ³J_{C-Sn} = 20,4 Hz, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃) ; 27,47 (3C, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃) ; 13,82 (3C, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃) ; 10,61 (3C, ¹J_{C-119Sn} = 341,8 Hz, ¹J_{C-117Sn} = 326,5 Hz, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : Isomère (E) : 146,03 (CH=CHCH₂) ; 131,76 (¹J_{C-119Sn} = 378,8 Hz, ¹J_{C-117Sn} = 361,9 Hz, CH=CHCH₂) ; 66,58 (³J_{C-119Sn} = 66,2 Hz, ³J_{C-117Sn} = 64,2 Hz, CH=CHCH₂) ; 45,23 (2C, N(CH₃)₂) ; 29,24 (3C, ³J_{C-Sn} = 20,6 Hz, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃) ; 27,39 (3C, ²J_{C-119Sn} = 54,3 Hz, ²J_{C-117Sn} = 52,7 Hz, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃) ; 13,83 (3C, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃) ; 9,57 (3C, ¹J_{C-119Sn} = 343,3 Hz, ¹J_{C-117Sn} = 328,1 Hz, Sn(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃)
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 376,21 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 376,20)

Partie expérimentale

(E)-(1-N-Méthyl-2-nitro-4-[3-(N,N-diméthylamino)prop-1-ényl]-1H-imidazo-5-yl)méthanol (**38**)



A une solution du composé bromé **36** (116 mg ; 0,491 mmol) dans du DMF anhydre (8 mL) sont ajoutés du tétrakis(triphénylphosphine) palladium (0) (49,0 mg ; 0,042 mmol ; 0,15 éq.) et de l'organostannane **37** (309 mg ; 0,826 mmol ; 1,7 éq.). Le mélange obtenu est agité durant 21 heures à 110 °C. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est filtré sur Célite 545®. Le pad de Célite 545® est lavé avec du DMF. Le filtrat est évaporé sous pression réduite à la pompe à palette. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/méthanol, 90/10 avec un gradient d'ammoniaque de 0 à 10%) pour conduire à l'amine **38** (26,0 mg ; 0,108 mmol).

◆ Rendement : 22%

A une solution refroidie à 0 °C de l'éther silylé **40** (303 mg ; 0,764 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (6 mL) est ajoutée une solution 1 M de fluorure de tétrabutylammonium dans le THF (1,15 mL ; 1,15 mmol ; 1,5 éq.). Le mélange obtenu est agité durant 1 heure 30 à 0 °C, puis, après retour à température ambiante, évaporé sous pression réduite. L'huile orange obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/méthanol, 95/5, v/v puis 95/5, v/v + 2% TEA) pour conduire à l'alcool déprotégé **38** (164 mg ; 0,683 mmol).

◆ Aspect : huile jaune ◆ Formule brute : C₁₀H₁₆N₄O₃ ◆ Masse molaire : 240,26 g.mol⁻¹

◆ Rendement : 89%

◆ CCM (SiO₂, UV 254 nm, DCM/méthanol, 90/10, v/v + 5% TEA) : R_f = 0,43

◆ IR ν (cm⁻¹) : 3133 (ν_{OH}) ; 1499 (ν_{as NO2}) ; 1332 (ν_{s NO2}) ; 1035 (ν_{C-O})

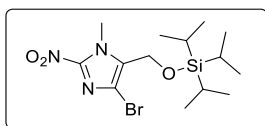
◆ RMN ¹H (CD₃OD, 200 MHz) δ (ppm) : 6,66 (d, 1H, ³J_{H-H trans} = 15,7 Hz, CH=CHCH₂) ; 6,53 (td, 1H, ³J_{H-H trans} = 15,6 Hz, ³J_{H-H} = 6,2 Hz, CH=CHCH₂) ; 4,71 (s, 2H, CH₂OH) ; 4,03 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,24 (d, 2H, ³J_{H-H} = 6,1 Hz, CH=CHCH₂) ; 2,36 (s, 6H, N(CH₃)₂)

◆ RMN ¹³C (CD₃OD, 50 MHz) δ (ppm) : 146,43 (C_{Ar}NO₂) ; 136,67 ; 135,45 (C_{Ar}C) ; 128,64 (CH=CHCH₂) ; 123,98 (CH=CHCH₂) ; 61,98 (CH=CHCH₂) ; 52,69 (CH₂OH) ; 44,84 (2C, N(CH₃)₂) ; 34,94 (N_{Ar}CH₃)

◆ HRMS (ESI) : m/z 241,1295 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 241,1295)

Partie expérimentale

4-Bromo-1-*N*-méthyl-2-nitro-5-[[triisopropylsilyl]oxy]méthyl]-1*H*-imidazole (**39**)

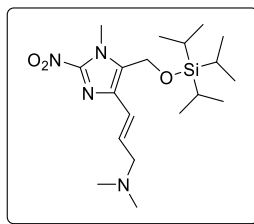


A une solution de l'alcool **36** (9,14 g ; 38,7 mmol ; 1,0 éq.) dans du DMF anhydre (50 mL) sont ajoutés successivement de l'imidazole (7,92 g ; 116 mmol ; 3,0 éq.) puis goutte à goutte du chlorure de triisopropylsilane (9,1 mL ; 42,5 mmol ; 1,1 éq.). La solution jaune obtenue est agitée durant 18 heures à température ambiante. Le mélange est ensuite refroidi à 0 °C et de l'eau (20 mL) est ajoutée goutte à goutte jusqu'à formation d'un précipité. Le reste de l'eau (380 mL) est ajouté d'un seul coup. Le mélange hétérogène est laissé sous agitation dans la glace durant 15 minutes puis filtré. Le solide est lavé avec de l'eau (3 x 100 mL) avant d'être placé au dessiccateur sous vide à 35 °C pour donner l'alcool protégé **39** (14,7 g ; 37,5 mmol).

- ◆ **Aspect** : solide jaune ◆ **Formule brute** : C₁₄H₂₆BrN₃O₃Si ◆ **Masse molaire** : 392,37 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 97%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm, cyclohexane/acétate d'éthyle, 80/20, v/v) : R_f = 0,69
- ◆ **Point de fusion** : 66-67 °C
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 1483 (ν_{asNO2}) ; 1357 (ν_{sNO2}) ; 1081, 1061 (ν_{C-O}, ν_{Si-O})
- ◆ **RMN ¹H** (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ (ppm) : 4,81 (s, 2H, OCH₂) ; 4,00 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 1,22-1,11 (m, 3H, Si(CH(CH₃)₂)₃) ; 1,09-1,01 (m, 18H, Si(CH(CH₃)₂)₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ (ppm) : 144,55 (C_{Ar}NO₂) ; 134,46 (C_{Ar}CH₂) ; 116,61 (C_{Ar}Br) ; 54,41 (OCH₂) ; 35,12 (N_{Ar}CH₃) ; 17,61 (6C, Si(CH(CH₃)₂)₃) ; 11,29 (3C, Si(CH(CH₃)₂)₃)
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 392,1014 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 392,1005)

Partie expérimentale

(*E*)-3-(1-*N'*-Méthyl-2-nitro-5-[[triiisopropylsilyl]oxy]méthyl]-1*H*-imidazol-4-yl)-*N,N*-diméthylprop-2-én-1-amine (**40**)

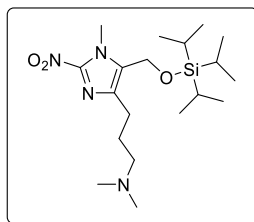


A une solution du composé bromé silylé **39** (2,27 g ; 5,79 mmol ; 1,0 éq.) dans du DMF anhydre (22 mL) sont ajoutés du tétrakis(triphénylphosphine) palladium (0) (1,05 g ; 0,909 mmol ; 0,15 éq.) et un mélange d'isomère (*Z*)/(*E*) (40/60) de l'organostannane **37** (4,34 g ; 11,6 mmol ; 2,0 éq.). Le mélange obtenu est agité durant 1 heure 30 à 105 °C. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est dilué avec de l'acétate d'éthyle (20 mL) puis filtré sur Célite 545®. Le pad de Célite 545® est lavé avec de l'acétate d'éthyle (4 x 25 mL). De l'eau (400 mL) est ajoutée au filtrat puis, après décantation, la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 300 mL) (l'ajout d'une solution aqueuse de chlorure de sodium saturée (50 mL) est parfois nécessaire pour aider à l'extraction). Les phases organiques sont réunies, lavées avec de l'eau (400 mL) puis avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (400 mL). La phase organique est séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite pour conduire à une huile orange-marron (7,30 g), qui est ensuite purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/méthanol, 95/5, 93/7 puis 91/9, v/v) pour conduire à l'amine **40** (1,51 g ; 3,81 mmol).

- ◆ **Aspect** : huile orange ◆ **Formule brute** : C₁₉H₃₆N₄O₃Si ◆ **Masse molaire** : 396,61 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 66%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm, DCM/méthanol, 90/10, v/v) : R_f = 0,51
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 1495 (ν_{as} NO₂) ; 1329 (ν_s NO₂) ; 1081, 1060 (ν_{C-O}, ν_{Si-O})
- ◆ **RMN** ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : 6,59 (td, 1H, ³J_{H-H trans} = 15,5 Hz, ³J_{H-H} = 6,3 Hz, CH=CHCH₂) ; 6,39 (d, 1H, ³J_{H-H trans} = 15,6 Hz, CH=CHCH₂) ; 4,80 (s, 2H, OCH₂) ; 4,04 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,08 (d, 2H, ³J_{H-H} = 6,2 Hz, CH=CHCH₂) ; 2,25 (s, 6H, N(CH₃)₂) ; 1,14-0,90 (m, 21H, Si(CH(CH₃)₂)₃)
- ◆ **RMN** ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) : 145,10 (C_{Ar}NO₂) ; 135,30 ; 133,09 (2C, C_{Ar}C) ; 127,74 (CH=CHCH₂) ; 123,98 (CH=CHCH₂) ; 60,74 (CH=CHCH₂) ; 54,01 (OCH₂) ; 44,31 (2C, N(CH₃)₂) ; 34,67 (N_{Ar}CH₃) ; 17,84 (6C, Si(CH(CH₃)₂)₃) ; 11,74 (3C, Si(CH(CH₃)₂)₃)
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 397,2625 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 397,2629)

Partie expérimentale

N,N-Diméthyl-3-(1-*N'*-méthyl-2-nitro-5-[[triisopropylsilyl]oxy]méthyl)-1*H*-imidazo-4-yl)propyl-1-amine (**41**)

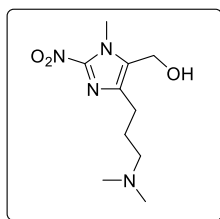


A une solution de l'alcène **40** (108 mg ; 0,271 mmol ; 1,0 éq.) dans de la pyridine (2,0 mL) sont ajoutés de la tosylhydrazine (255 mg ; 1,37 mmol ; 5,0 éq.) et du carbonate de potassium (188 mg ; 1,36 mmol ; 5,0 éq.). Le mélange est chauffé à reflux durant 19 heures. Après refroidissement à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré et lavé avec du DCM (3 x 10 mL). Le filtrat est lavé avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 50 mL) puis avec une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (2 x 50 mL). La phase organique est séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner une huile orange. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : gradient de 5 à 8% de méthanol dans le DCM) pour conduire à l'amine **41** (25,4 mg ; 63,7 mmol).

- ◆ **Aspect:** huile orange ◆ **Formule brute :** C₁₉H₃₈N₄O₃Si ◆ **Masse molaire:** 398,62 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement :** 24%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm, DCM/méthanol, 90/10, v/v) : R_f = 0,31
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 4,76 (s, 2H, CH₂O) ; 4,04 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 2,59 (t, 2H, ³J = 7,5 Hz, C_{Ar}CH₂CH₂) ; 2,38 (t, 2H, ³J = 7,4 Hz, CH₂N(CH₃)₂) ; 2,28 (s, 6H, N(CH₃)₂) ; 1,87 (qt, 2H, ³J = 7,5 Hz, CH₂CH₂CH₂) ; 1,20-0,93 (m, 21H, Si(CH(CH₃)₂))

Partie expérimentale

{4-[3-(*N,N'*-Diméthylamino)propyl]-1-*N*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazo-5-yl}méthanol (**42**)



A une solution de l'alcène **38** (688 mg ; 2,86 mmol ; 1,0 éq.) dans de la pyridine (25 mL) sont ajoutés de la tosylhydrazine (2,67 g ; 14,3 mmol ; 5,0 éq.) et du carbonate de potassium (1,99 g ; 14,4 mmol ; 5,0 éq.). Le mélange est placé sous agitation à reflux durant 3 heures. Après retour à température ambiante, de l'acétate d'éthyle est ajouté (15 mL). Le précipité est filtré et lavé avec de l'acétate d'éthyle (3 x 15 mL). Après évaporation du filtrat, l'huile orange obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne d'alumine (éluant : gradient d'éthanol de 2 à 20% dans l'acétate d'éthyle, v/v) pour donner le dérivé hydrogéné **42** (464 mg ; 1,92 mmol).

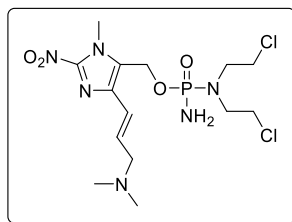
- ◆ **Aspect** : huile jaune ◆ **Formule brute** : C₁₀H₁₈N₄O₃ ◆ **Masse molaire** : 242,27 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 67%
- ◆ **CCM** (Al₂O₃, acétate d'éthyle/éthanol, 90/10, v/v) : R_f = 0,41
- ◆ **IR** (cm⁻¹) : 3290 (ν_{OH}) ; 1487 (ν_{as NO2}) ; 1327 (ν_{s NO2}) ; 1020 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN ¹H** (CD₃OD, 200 MHz) δ (ppm) : 4,65 (s, 2H, CH₂OH) ; 4,03 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 2,63 (t, 2H, ³J = 7,5 Hz, C_{Ar}CH₂CH₂) ; 2,43-2,30 (m, 2H, CH₂N(CH₃)₂) ; 2,24 (s, 6H, N(CH₃)₂) ; 1,93-1,73 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CD₃OD, 50 MHz) δ (ppm) : 145,76 (C_{Ar}NO₂) ; 140,60 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 135,00 (C_{Ar}CH₂OH) ; 59,60 (CH₂N(CH₃)₂) ; 52,99 (CH₂OH) ; 45,32 (2C, N(CH₃)₂) ; 34,88 (N_{Ar}CH₃) ; 28,12 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 25,30 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 243,14 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 243,15)

A une solution refroidie à 0°C de l'éther silylé **41** (30,0 mg ; 75,2 μmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (1 mL) est ajoutée une solution 1 M de fluorure de tétrabutylammonium dans le THF (140 μL ; 140 μmol ; 1,9 éq.). Le mélange obtenu est agité durant 1 heure à 0 °C, puis évaporé sous pression réduite. L'huile orange obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne d'alumine (éluant : acétate d'éthyle/éthanol/ammoniaque, 95/4/1, v/v/v) pour conduire à l'alcool déprotégé **38** (8,5 mg ; 35,4 μmol).

- ◆ **Rendement** : 47%

Partie expérimentale

N,N-Bis(2-chloroéthyl)-phosphorodiamidate de {1-*N'*-méthyl-4-[3-(*N''*,*N''*-diméthylamino)prop-1-ényl]-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl}méthyle (**43**)

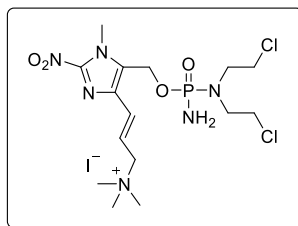


A une solution de l'alcool **38** (93,0 mg ; 0,387 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (3 mL) refroidie à -78 °C, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF (430 µL ; 0,430 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** (110 mg ; 0,425 mmol ; 1,1 éq.) dans du THF anhydre (1 mL) préalablement refroidie à -78 °C, est ajoutée rapidement au mélange réactionnel. Le suivi de la réaction est monitoré par RMN ³¹P. Après 45 minutes d'agitation, un courant d'ammoniac gazeux est réalisé durant 1-2 minutes dans le milieu réactionnel, toujours refroidi à -78 °C. La réaction est stoppée par addition d'eau (10 mL) et le milieu réactionnel est extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 20 mL). Les phases organiques sont séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v + 5% ammoniac) pour donner le phosphorodiamidate **43** (52,4 mg ; 0,134 mmol).

- ◆ **Aspect:** huile orange ◆ **Formule brute :** C₁₄H₂₅Cl₂N₆O₄P ◆ **Masse molaire:** 585,20 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement :** 31%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v + 5% ammoniac) : R_f = 0,68
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3417 ; 3222 (ν_{NH2}) ; 1495 (ν_{as} NO₂) ; 1331 (ν_s NO₂) ; 1220 ; 1187 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1002 ; 977 (ν_{P-O}, ν_{C-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN ¹H** (CD₃OD, 200 MHz) δ (ppm) : 6,70 (d, 1H, ³J_{H-H trans} = 15,6 Hz, CH=CHCH₂) ; 6,57 (td, 1H, ³J_{H-H trans} = 15,6 Hz, ³J_{H-H} = 6,0 Hz, CH=CHCH₂) ; 5,15 (d, 2H, ³J_{H-P} = 8,0 Hz, CH₂O) ; 4,05 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,72-3,58 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,53-3,33 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,20 (d, 2H, ³J_{H-H} = 5,9 Hz, CH=CHCH₂) ; 2,32 (s, 6H, N(CH₃)₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CD₃OD, 126 MHz) δ (ppm) : 146,92 (C_{Ar}NO₂) ; 138,20 (C_{Ar}CH=CH) ; 131,04 (d, ³J_{C-P} = 7,4 Hz, C_{Ar}CH₂O) ; 130,34 (CH=C_HCH₂) ; 123,29 (C_H=CHCH₂) ; 62,17 (CH=CHCH₂) ; 55,91 (d, ²J_{C-P} = 4,5 Hz, CH₂O) ; 50,49 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4,8 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 45,07 (2C, N(CH₃)₂) ; 43,12 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 35,09 (N_{Ar}CH₃)
- ◆ **RMN ³¹P** (CD₃OD, 202 MHz) δ (ppm) : 19,37
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 443,06 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 443,11)

Partie expérimentale

Iodure de 3-{5-[[amino[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl]oxy)méthyl]-1-*N'*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazol-4-yl}-*N,N,N*-triméthylprop-2-én-1-aminium (**44**)



A une solution du phosphorodiamidate **43** (69,2 mg ; 0,156 mmol ; 1,0 éq.) dans de l'ACN anhydre (5 mL), sont ajoutés du carbonate de potassium (129 mg ; 0,933 mmol ; 6,0 éq.) et de l'iodure de méthyle (59 μ L ; 0,948 mmol ; 6,0 éq.). Après agitation à température ambiante durant 1 heure 45, le milieu réactionnel est filtré sur filtre PTFE 0,45 μ M. Le filtre est rincé avec de l'ACN (2 mL) et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner une poudre jaune. Le brut est purifié par chromatographie préparative en phase inverse et lyophilisé pour donner l'ammonium quaternaire **44** (59,6 mg ; 0,102 mmol).

- ◆ **Conditions de purification** : détection : 254 nm et 338 nm ; durée de la séparation : 30 minutes ; éluant : H₂O/ACN (v/v) : 95/5 durant 2 minutes ; 95/5 \rightarrow 70/30 durant 6 minutes ; 70/30 durant 2 minutes ; 70/30 \rightarrow 60/40 durant 6 minutes ; 60/40 durant 2 minutes ; 60/40 \rightarrow 10/90 durant 8 minutes ; 10/90 durant 4 minutes ; temps de rétention : 15,4 minutes
- ◆ **Rendement** : 65%

A une solution de l'alcool **38** (137 mg ; 0,570 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (4 mL) refroidie à -78 °C, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF anhydre (630 μ L ; 0,630 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** (165 mg ; 0,637 mmol ; 1,1 éq.) dans du THF anhydre (2 mL) préalablement refroidie à -78 °C, est ajoutée rapidement au mélange réactionnel. Le suivi de la réaction est monitoré par RMN ³¹P. Après 1 heure d'agitation, un courant d'ammoniac gazeux est réalisé durant 1-2 minutes dans le milieu réactionnel, toujours refroidi à -78 °C. Le milieu réactionnel est ensuite remonté à température ambiante et dilué avec de l'acétate d'éthyle (25 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau (10 mL), séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite pour conduire à un solide orange (253 mg). Ce dernier est directement mis en solution dans de l'ACN anhydre (3 mL) puis du carbonate de potassium (474 mg ; 3,43 mmol ; 6,0 éq.) et de l'iodure de méthyle (370 μ L ; 5,94 mmol ; 10 éq.) sont ajoutés. Après agitation à température ambiante pendant 1 heure 30, le milieu réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle (15 mL) et filtré sur filtre PTFE 0,45 μ M. Le filtre est rincé avec de l'ACN (2 mL) et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour conduire à une huile orange. Le brut est purifié par chromatographie préparative en phase inverse (éluant gradient d'ACN dans l'eau) pour donner après lyophilisation l'ammonium quaternaire **44** (38,2 mg ; 65,3 μ mol).

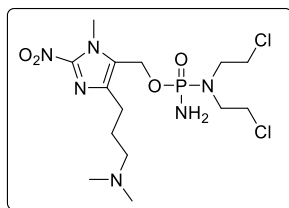
- ◆ **Rendement** : 11%
- ◆ **Aspect**: lyophilisat jaune très hygroscopique
- ◆ **Masse molaire**: 585,20 g.mol⁻¹
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3403, 3229 (ν_{NH_2}) ; 1542 (δ_{NH_2}) ; 1497 ($\nu_{\text{as NO}_2}$) ; 1331 ($\nu_{\text{s NO}_2}$) ; 1214, 1187 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 1004, 978 ($\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **Formule brute** : C₁₅H₂₈Cl₂IN₆O₄P

Partie expérimentale

- ◆ **RMN ^1H** (CD_3OD , 500 MHz) δ (ppm) : 7,12 (d, 1H, $^3J_{\text{H-H trans}} = 15,4$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 6,67 (td, 1H, $^3J_{\text{H-H trans}} = 15,4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7,7$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 5,20 (d, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 9,6$ Hz, CH_2O) ; 4,17 (d, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7,7$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 4,07 (s, 3H, $\text{N}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$) ; 3,69-3,58 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 3,49-3,33 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 3,17 (s, 9H, $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$)
- ◆ **RMN ^{13}C** (CD_3OD , 126 MHz) δ (ppm) : 147,18 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$) ; 136,36 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}=\text{CH}$) ; 133,17 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6,5$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{O}$) ; 132,31 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 119,01 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 68,74 ; 68,72 ; 68,70 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$) ; 56,04 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4,7$ Hz, CH_2O) ; 53,49 ; 53,46 ; 53,42 ($\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) ; 50,46 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4,8$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 43,25 (2C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 35,45 ($\text{N}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$)
- ◆ **RMN ^{31}P** (CD_3OD , 202 MHz) δ (ppm) : 19,38
- ◆ **HRMS (ESI)** : m/z 457,1288 $[\text{M}]^+$ (valeur théorique : m/z 457,1281)

Partie expérimentale

N,N-Bis(2-chloroéthyl)-phosphorodiamidate de {1-*N'*-méthyl-4-[3-(*N''*,*N''*-diméthylamino)propyl]-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)méthyle (**45**)

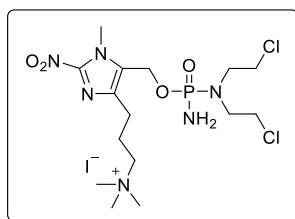


A une solution de l'alcool **42** (102 mg ; 0,421 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (4 mL) refroidie à -78°C, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF (460 µL ; 0,460 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du dichlorure de l'acide phosphoroamidique **1** (121 mg ; 0,467 mmol ; 1.1 éq.) dans du THF anhydre (2 mL) préalablement refroidie à -78°C, est ajoutée rapidement au milieu réactionnel. Le suivi de la réaction est monitoré par RMN ³¹P. Après 1 heure 15 d'agitation, un courant d'ammoniac gazeux est réalisé durant 1-2 minutes dans le milieu réactionnel, toujours refroidi à -78°C. De l'eau (10 mL) est additionnée et le milieu réactionnel est remonté à température ambiante, avant extraction avec de l'acétate d'éthyle (3 × 25 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite pour donner une huile orange. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v + 5% TEA) pour donner le phosphorodiamidate **45** (56,0 mg ; 0,126 mmol).

- ◆ **Aspect:** huile jaune ◆ **Formule brute :** C₁₄H₂₇Cl₂N₆O₄P ◆ **Masse molaire:** 445,28 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement :** 30 %
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v + 5% TEA) : R_f = 0,10
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3345 ; 3258 (ν_{NH2}) ; 1493 (ν_{as} NO₂) ; 1331 (ν_s NO₂) ; 1208 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1044 ; 981 (ν_{C-O}, ν_{P-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN ¹H** (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm) : 5,11 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,5 Hz, ³J_{H-P} = 7,7 Hz, OCH') ; 5,08 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,5 Hz, ³J_{H-P} = 7,7 Hz, OCH'') ; 4,04 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,67 (t, 4H, ³J_{H-H} = 7,1 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,52-3,35 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 2,68 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7,6 Hz, C_{Ar}CH₂CH₂) ; 2,44-2,37 (m, 2H, CH₂N(CH₃)₂) ; 2,27 (s, 6H, N(CH₃)₂) ; 1,93-1,81 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CD₃OD, 126 MHz) δ (ppm) : 146,28 (C_{Ar}NO₂) ; 142,14 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 130,92 (d, ³J_{C-P} = 7,7 Hz, C_{Ar}CH₂O) ; 59,72 (CH₂N(CH₃)₂) ; 56,18 (d, ²J_{C-P} = 4,5 Hz, CH₂O) ; 50,45 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4,8 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 45,34 (2C, N(CH₃)₂) ; 43,13 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 35,11 (N_{Ar}CH₃) ; 27,96 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 25,41 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** (CDCl₃, 202 MHz) δ (ppm) : 19,22
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 445,13 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 445,13)

Partie expérimentale

Iodure de 3-{5-[[amino[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl]oxy)méthyl]-1-*N'*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazol-4-yl}-*N,N,N*-triméthylpropan-1-aminium (**46**)



A une solution agitée du phosphorodiamidate **45** (42,8 mg ; 96,1 μmol ; 1,0 éq.) dans un mélange de THF anhydre (1 mL) et d'ACN anhydre (500 μL) est ajouté de l'iodure de méthyle (36 μL ; 578 μmol ; 6,0 éq.). Après agitation à température ambiante durant 7 heures, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite pour donner une poudre jaune. Le brut est purifié par chromatographie préparative (éluant gradient d'ACN dans l'eau) en phase inverse pour donner après lyophilisation l'ammonium quaternaire **46** (29,2 mg ; 49,7 μmol).

- ◆ **Conditions de purification** : détection : 254 nm et 338 nm ; durée de la séparation : 30 minutes ; éluant : H₂O/ACN (v/v) : 95/5 durant 2 minutes ; 95/5 \rightarrow 70/30 durant 6 minutes ; 70/30 durant 2 minutes ; 70/30 \rightarrow 60/40 durant 6 minutes ; 60/40 durant 3 minutes ; 60/40 \rightarrow 10/90 durant 7 minutes ; 10/90 durant 4 minutes ; temps de rétention : 15,4 minutes
- ◆ **Rendement** : 52%

A une solution de complexe de bore **45-BH₃** (50,3 mg ; 110 μmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (3 mL), est ajouté du DABCO (62,8 mg ; 560 μmol ; 5,0 éq.). Le mélange est laissé sous agitation à 40 °C durant 1 heure. Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C et de l'iodure de méthyle (100 μL ; 1,61 mmol ; 15 éq.) est ajouté. Après 2 heures d'agitation à 0 °C, le mélange est évaporé sous pression réduite pour donner une poudre jaune qui est purifiée par chromatographie préparative en phase inverse (éluant : gradient ACN dans l'eau) pour conduire après lyophilisation à l'ammonium quaternaire **46** (29,5 mg ; 50,2 μmol).

- ◆ **Rendement** : 46%

A une solution de l'alcool **42** (88,4 mg ; 0,365 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (3,5 mL) refroidie à -78 °C, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF (400 μL ; 0,400 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du composé **1** (106 mg ; 0,400 mmol ; 1,1 éq.) dans du THF anhydre (2 mL) préalablement refroidie à -78 °C, est ajoutée rapidement au mélange réactionnel. Le suivi de la réaction est monitoré par RMN ³¹P. Après 1 heure d'agitation, un courant d'ammoniac gazeux est réalisé durant 1-2 minutes dans le milieu réactionnel, toujours refroidi à -78 °C. Le milieu réactionnel est ensuite remonté à température ambiante et dilué avec de l'acétate d'éthyle (25 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau (5 mL) puis séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite pour conduire à un solide orange (112 mg). Ce dernier est directement mis en solution dans de l'ACN anhydre (4 mL) puis du carbonate de potassium (208 mg ; 1,51 mmol ; 6,0 éq.) et de l'iodure de méthyle (94 μL ; 1,51 mmol ; 10 éq.) sont ajoutés. Après agitation à température ambiante durant 1 heure 30, le milieu réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle (15 mL) et filtré sur filtre PTFE 0,45 μM . Le filtre est rincé avec de

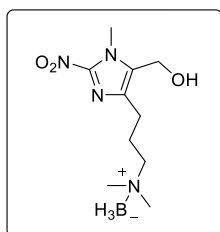
Partie expérimentale

l'acétate d'éthyle (2 mL) et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner une huile orange. Le brut est purifié par chromatographie préparative en phase inverse (éluant : gradient d'ACN dans l'eau) puis lyophilisé pour donner l'ammonium quaternaire **46** (21,9 mg ; 37,3 μ mol).

- ◆ **Rendement** : 10%
- ◆ **Aspect**: lyophilisat jaune très hygroscopique
- ◆ **Masse molaire**: 587,22 g.mol⁻¹
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3232 (ν_{NH_2}) ; 1493 ($\nu_{\text{as NO}_2}$) ; 1332 ($\nu_{\text{s NO}_2}$) ; 1228 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 979 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN ¹H** (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm) : 5,16 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,7 Hz, ³J_{H-P} = 9,3 Hz, OCH') ; 5,06 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,7 Hz, ³J_{H-P} = 9,1 Hz, OCH'') ; 4,05 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,74-3,62 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,54-3,35 (m, 6H, N(CH₂CH₂Cl)₂, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 3,15 (s, 9H, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 2,78 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7,3 Hz, C_{Ar}CH₂CH₂) ; 2,32-2,05 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CD₃OD, 126 MHz) δ (ppm) : 146,53 (C_{Ar}NO₂) ; 140,01 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 131,52 (d, ³J_{C-P} = 6,4 Hz, C_{Ar}CH₂O) ; 66,97 ; 66,89 ; 66,85 (CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 56,42 (d, ²J_{C-P} = 4,8 Hz, CH₂O) ; 53,82 ; 53,74 ; 53,66 (CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 50,41 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4,8 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 43,18 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 35,36 (N_{Ar}CH₃) ; 24,07 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 23,33 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** (CDCl₃, 202 MHz) δ (ppm) : 19,45
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 459,1444 [M]⁺ (valeur théorique : m/z 459,1438)
- ◆ **Conditions de purification** : détection : 254 nm et 338 nm ; durée de la séparation : 19 minutes ; éluant : H₂O/ACN (v/v) : 95/5 durant 2 minutes ; 95/5 → 70/30 durant 6 minutes ; 70/30 durant 2 minutes ; 70/30 → 60/40 durant 6 minutes ; 60/40 durant 3 minutes ; temps de rétention : 15,0 minutes

Partie expérimentale

Complexe *N,N*-diméthyl-3-(5-hydroxyméthyl-1-*N'*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazo-4-yl)propyl-1-amine borane (**42-BH₃**)



A une solution de l'amine tertiaire **42** (224 mg ; 0,925 mmol ; 1,0 éq.) dans du chloroforme anhydre (4,6 mL) refroidie à 0 °C, est ajouté goutte à goutte une solution 1 M de complexe borane-THF (4,6 mL ; 4,60 mmol ; 5,0 éq.). Le mélange est laissé sous agitation à 0 °C durant 1 heure avant addition goutte à goutte de méthanol anhydre (4,6 mL). Après agitation pendant 15 minutes à 0 °C, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/méthanol, 98/2, v/v) pour donner le complexe **42-BH₃** (209 mg ; 0,816 mmol).

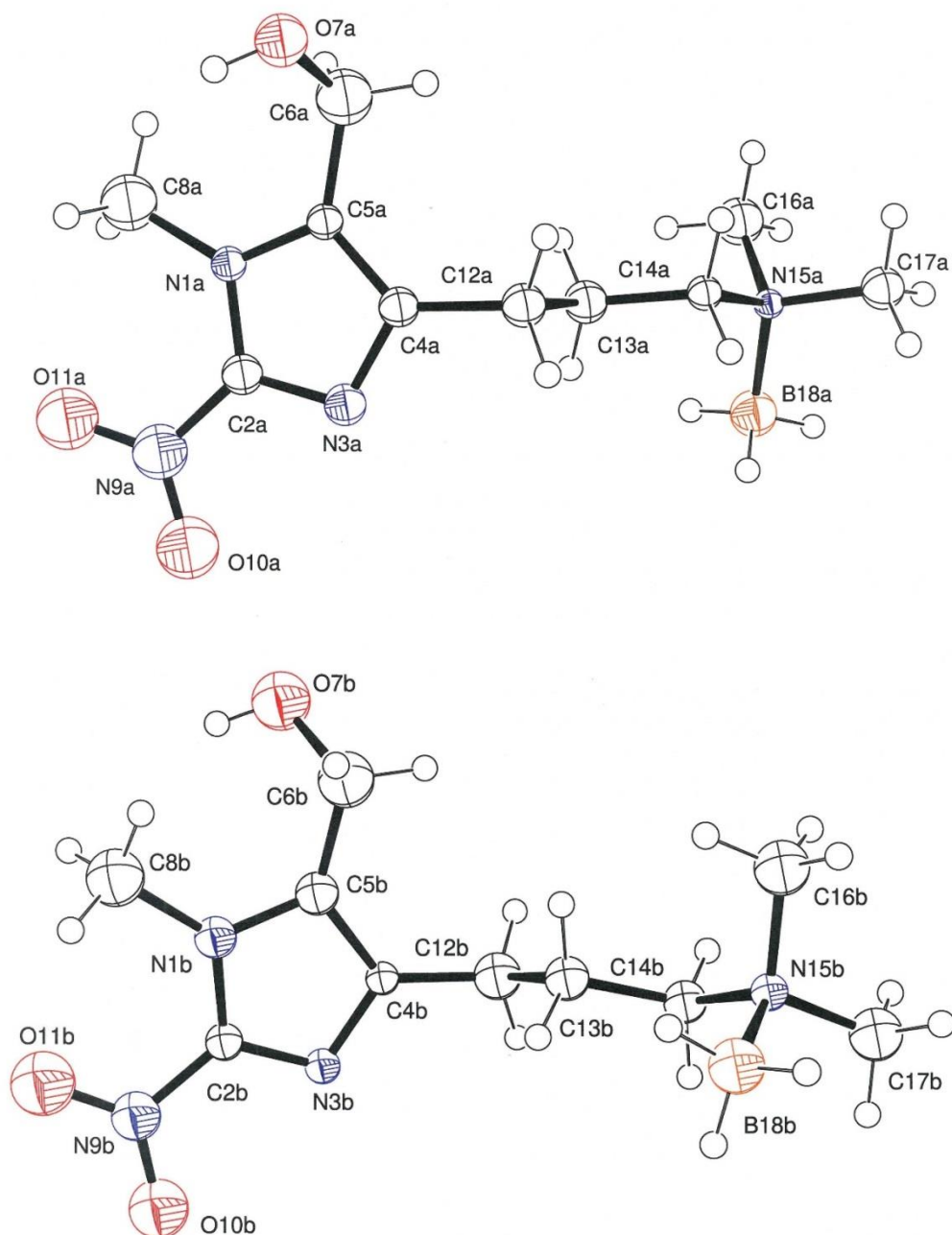
- ◆ **Aspect** : cristaux beiges ◆ **Formule brute** : C₁₀H₂₁BN₄O₃ ◆ **Masse molaire** : 256,11 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 70%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm, DCM/méthanol, 98/2, v/v) : R_f = 0,37
- ◆ **Point de fusion** : 99-100 °C
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3268 (ν_{OH}) ; 2379 ; 2321 ; 2275 (ν_{BH}) ; 1490 (ν_{as NO2}) ; 1331 (ν_{s NO2}) ; 1170 (ν_{C-N}) ; 1027 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : 4,69 (s, 2H, CH₂OH) ; 4,06 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 2,88 (se, 1H, OH) ; 2,79-2,68 (m, 2H, CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 2,62 (t, 2H, ³J = 7,5 Hz, C_{Ar}CH₂CH₂) ; 2,54 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂) ; 2,20-1,98 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂) ; 1,96-0,74 (m, 3H, BH₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) : 144,81 (C_{Ar}NO₂) ; 139,18 ; 132,94 (2C, C_{Ar}CH₂) ; 63,84 (CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 53,13 (CH₂OH) ; 51,78 (2C, N⁺(CH₃)₂) ; 34,67 (N_{Ar}CH₃) ; 24,73 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 24,09 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 255,15 [M-H]⁺ (valeur théorique : m/z 255,16)
m/z 279,13 [M+Na]⁺ (valeur théorique : m/z 279,16)
- ◆ **Données cristallographiques** :

Des monocristaux de tailles suffisantes pour une étude cristallographique ont été obtenus par cristallisation dans le DCM par diffusion lente par tension de vapeur d'éther diéthylique.

Formule brute	C ₁₀ H ₂₁ BN ₄ O ₃	Température (K)	170(2)
Masse molaire	256,12	F(000)	552
Système cristallin	monoclinique	λ (Mo Kα) (Å)	0,71073
Groupe d'espace	P n	Indices de Miller	-5 ≤ h ≤ 5
Couleur	incolore		-9 ≤ k ≤ 9
a (Å)	5,6402(3)		-21 ≤ l ≤ 21
b (Å)	10,2672(7)	θ _{min} ; θ _{max} (°)	1,69 ; 18,57
c (Å)	24,131(2)	Réflexions collectées	23004

Partie expérimentale

β (°)	90,051(3)	Réflexions uniques	2081
Volume (Å ³)	1397,4(2)	Réflexions avec [$I > 2\sigma(I)$]	2040
Z	4 (Z' = 2)	Qualité d'affinement, S	1,185
d_{calc} (g.cm ⁻³)	1,217	wR ₂ (2040 réfl)	0,2035
μ (mm ⁻¹)	0,089	R ₁ (2040 réfl)	0,0742



Figures ORTEP des deux motifs cristallographiquement indépendants A et B du composé **42-BH₃**. Les ellipsoïdes sont représentées au seuil de probabilité de 50%.

Longueurs de liaisons (Å) pour le composé **42-BH₃**

Partie expérimentale

Motif A		Motif B	
N1a-C5a	1,301(16)	N1b-C2b	1,337(17)
N1a-C2a	1,343(17)	N1b-C5b	1,354(17)
N1a-C8a	1,48(2)	N1b-C8b	1,52(2)
C2a-N3a	1,320(17)	C2b-N3b	1,312(16)
C2a-N9a	1,430(19)	C2b-N9b	1,414(19)
N3a-C4a	1,360(18)	N3b-C4b	1,328(16)
C4a-C5a	1,365(19)	C4b-C5b	1,412(19)
C4a-C12a	1,50(2)	C4b-C12b	1,45(2)
C5a-C6a	1,51(2)	C5b-C6b	1,47(2)
C6a-O7a	1,396(19)	C6b-O7b	1,46(2)
N9a-O11a	1,211(16)	N9b-O11b	1,213(15)
N9a-O10a	1,225(17)	N9b-O10b	1,221(16)
C12a-C13a	1,55(2)	C12b-C13b	1,53(2)
C13a-C14a	1,468(19)	C13b-C14b	1,49(2)
C14a-N15a	1,506(17)	C14b-N15b	1,534(18)
N15a-C17a	1,457(17)	N15b-C16b	1,461(19)
N15a-C16a	1,483(19)	N15b-C17b	1,478(19)
N15a-B18a	1,58(2)	N15b-B18b	1,56(2)

Angles dièdres (°) pour le composé 42-BH₃

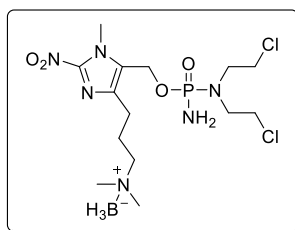
Motif A		Motif B	
C5a-N1a-C2a-N3a	0,5(15)	C5b-N1b-C2b-N3b	-1,4(15)
C5a-N1a-C2a-N9a	-177,9(13)	C5b-N1b-C2b-N9b	179,0(12)
C8a-N1a-C2a-N3a	175,8(13)	C8b-N1b-C2b-N3b	-172,3(13)
C8a-N1a-C2a-N9a	-3(2)	C8b-N1b-C2b-N9b	8(2)
C2a-N1a-C5a-C4a	-2,9(14)	C2b-N1b-C5b-C4b	1,0(14)
C2a-N1a-C5a-C6a	-177,4(12)	C2b-N1b-C5b-C6b	-176,2(13)
C8a-N1a-C5a-C4a	-178,3(13)	C8b-N1b-C5b-C4b	172,4(12)
C8a-N1a-C5a-C6a	7(2)	C8b-N1b-C5b-C6b	-5(2)
C4a-N3a-C2a-N1a	2,2(15)	C4b-N3b-C2b-N1b	1,2(15)
C4a-N3a-C2a-N9a	-179,4(12)	C4b-N3b-C2b-N9b	-179,2(12)
C2a-N3a-C4a-C5a	-3,9(14)	C2b-N3b-C4b-C5b	-0,5(14)
C2a-N3a-C4a-C12a	-176,2(12)	C2b-N3b-C4b-C12b	170,0(13)
O10a-N9a-C2a-N1a	175,5(13)	O10b-N9b-C2b-N1b	-173,8(13)

Partie expérimentale

O10a-N9a-C2a-N3a	-3(2)	O10b-N9b-C2b-N3b	6,7(19)
O11a-N9a-C2a-N1a	-7(2)	O11b-N9b-C2b-N1b	7(2)
O11a-N9a-C2a-N3a	174,6(13)	O11b-N9b-C2b-N3b	-172,2(13)
C16a-N15a-C14a-C13a	61,3(14)	C16b-N15b-C14b-C13b	-71,2(14)
C17a-N15a-C14a-C13a	177,6(11)	C17b-N15b-C14b-C13b	171,9(12)
B18a-N15a-C14a-C13a	-61,7(14)	B18b-N15b-C14b-C13b	52,6(16)
N3a-C4a-C5a-N1a	4,4(15)	N3b-C4b-C5b-N1b	-0,3(14)
N3a-C4a-C5a-C6a	178,4(13)	N3b-C4b-C5b-C6b	176,6(14)
C12a-C4a-C5a-N1a	175,6(14)	C12b-C4b-C5b-N1b	-170,6(13)
C12a-C4a-C5a-C6a	-10(2)	C12b-C4b-C5b-C6b	6(2)
N3a-C4a-C12a-C13a	84,2(16)	N3b-C4b-C12b-C13b	-99,5(16)
C5a-C4a-C12a-C13a	-86,2(18)	C5b-C4b-C12b-C13b	69,3(19)
N1a-C5a-C6a-O7a	60,9(18)	N1b-C5b-C6b-O7b	-59,2(19)
C4a-C5a-C6a-O7a	-112,4(16)	C4b-C5b-C6b-O7b	124,3(16)
C4a-C12a-C13a-C14a	176,2(11)	C4b-C12b-C13b-C14b	166,9(13)
C12a-C13a-C14a-N15a	172,5(11)	C12b-C13b-C14b-N15b	173,1(12)

Partie expérimentale

Complexe 3-{5-[[{amino[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl]oxy)méthyl]-1-*N'*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazol-4-yl]-*N,N*-diméthylpropan-1-amine borane (**45-BH₃**)

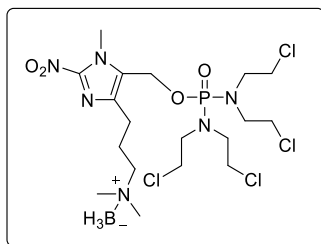


A une solution de l'alcool **42-BH₃** (133 mg ; 0,519 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (4 mL) refroidie à -78 °C, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF (570 µL ; 0,570 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes, une solution du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** (147 mg ; 0,568 mmol ; 1,1 éq.) dans du THF anhydre (2 mL) préalablement refroidie à -78 °C est ajoutée rapidement au mélange réactionnel. Après 1 heure d'agitation, de l'ammoniac est mis à barboter dans le milieu réactionnel à -78 °C durant 1-2 minutes. De l'eau est additionnée (10 mL) et le mélange est porté à température ambiante. Le milieu réactionnel est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 × 25 mL) et les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/éthanol, 96/4, v/v) afin d'obtenir le phosphorodiamidate **45-BH₃** (150 mg ; 0,629 mmol).

- ◆ **Aspect** : Huile beige ◆ **Formule brute** : C₁₄H₃₀BCl₂N₆O₄P ◆ **Masse molaire** : 459,12 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 63%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm ou NBP, DCM/éthanol, 97/3, v/v) : R_f = 0,20
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3231 (ν_{NH}) ; 2380 ; 2318 ; 2272 (ν_{BH}) ; 1492 (ν_{as} NO₂) ; 1330 (ν_s NO₂) ; 1227 ; 1193 ; 1168 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1003 ; 980 (ν_{C-O}, ν_{P-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 5,14 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,4 Hz, ³J_{H-P} = 7,7 Hz, OCH') ; 4,99 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,4 Hz, ³J_{H-P} = 6,4 Hz, OCH'') ; 4,06 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,69-3,61 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,54-3,43 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,08 (se, 2H, NH₂) ; 2,83-2,72 (m, 2H, CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 2,68 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7,4 Hz, C_{Ar}CH₂CH₂) ; 2,56 et 2,54 (2s, 3H, CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 2,13-2,06 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 7,7 Hz, CH₂CH₂CH₂) ; 1,92-1,32 (m, 3H, BH₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 145,24 (C_{Ar}NO₂) ; 141,16 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 129,17 (d, ³J_{C-P} = 8,2 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 63,89 (CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 55,11 (d, ²J_{C-P} = 4,0 Hz, CH₂O) ; 51,55 ; 51,48 (CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 48,93 (d, 2C, ²J_{C-P} = 5,0 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 42,70 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 34,63 (N_{Ar}CH₃) ; 24,79 ; 24,00 (C_{Ar}CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** (CDCl₃, 202 MHz) δ (ppm) : 16,17
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 457,08 [M-H]⁺ (valeur théorique : m/z 457,15)

Partie expérimentale

Complexe 3-{5-[(bis[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl)oxy)méthyl]-1-*N'*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazol-4-yl)-*N,N*-diméthylpropan-1-amine borane (**47-BH₃**)

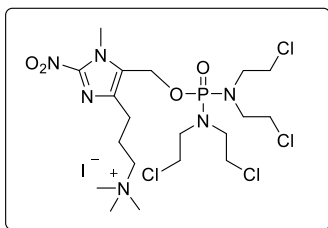


A une solution refroidie à -78 °C de l'alcool **42-BH₃** (120 mg ; 469 μmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (4,0 mL), est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF (520 μL ; 520 μmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes, une solution du chlorure de l'acide phosphorodiamidique **2** (189 mg ; 519 μmol ; 1,1 éq.) dans du THF anhydre (2,0 mL) préalablement refroidie à -78 °C, est ajoutée au milieu réactionnel. Après retour progressif à 5°C et agitation durant 24 heures, la réaction est stoppée par addition d'eau (10 mL). La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 10 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite pour donner une huile jaune. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/éthanol, 98/2, v/v) pour conduire au phosphorodiamidate **47-BH₃** (90,7 mg ; 155 μmol).

- ◆ **Aspect** : huile beige ◆ **Formule brute** : C₁₈H₃₆BCl₄N₆O₄P ◆ **Masse molaire** : 584,11 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 33%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm ou NBP, DCM/éthanol, 98/2, v/v) : R_f = 0,31
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 2381 ; 2318 ; 2272 (ν_{BH}) ; 1493 (ν_{as} NO₂) ; 1331 (ν_s NO₂) ; 1219 ; 1167 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1088 ; 973 (ν_{C-O}, ν_{P-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 5,13 (d, 2H, ³J_{H-P} = 8,2 Hz, CH₂O) ; 4,06 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,68-3,54 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,40 (td, 8H, ³J_{H-P} = 12,6 Hz, ³J_{H-H} = 6,4 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 2,85-2,74 (m, 2H, CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 2,67 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7,6 Hz, C_{Ar}CH₂CH₂) ; 2,55 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂) ; 2,18-1,97 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂) ; 1,87-1,25 (m, 3H, BH₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 145,31 (C_{Ar}NO₂) ; 141,47 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 128,53 (d, ³J_{C-P} = 6,5 Hz, C_{Ar}CH₂O) ; 63,89 (CH₂N⁺(CH₃)₂) ; 55,36 (d, ²J_{C-P} = 3,9 Hz, CH₂O) ; 51,55 (2C, N⁺(CH₃)₂) ; 49,22 (d, 4C, ³J_{C-P} = 4,6 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 42,36 (4C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 34,66 (N_{Ar}CH₃) ; 24,65 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 23,91 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** (CDCl₃, 202 MHz) δ (ppm) : 17,04
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 583,14 [M-H]⁺ (valeur théorique : m/z 583,13)

Partie expérimentale

Iodure de 3-{5-[(bis[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl)oxy)méthyl]-1-*N'*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazol-4-yl}-*N,N,N*-triméthylpropan-1-aminium (**48**)

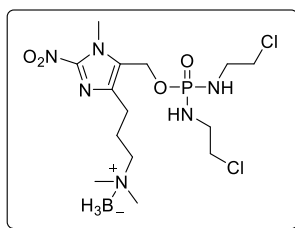


A une solution du complexe de bore **47-BH₃** (90,7 mg ; 155 μ mol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (5 mL), est ajouté du DABCO (87,5 mg ; 780 μ mol ; 5,0 éq.). Le mélange est laissé sous agitation à 40 °C durant 1 heure. Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C et de l'iodure de méthyle (150 μ L ; 2,41 mmol ; 15 éq.) est ajouté. Après 1 heure d'agitation à 0 °C, le mélange est évaporé sous pression réduite. La poudre jaune obtenue est purifiée par chromatographie préparative en phase inverse (éluant : gradient ACN dans l'eau) pour conduire après lyophilisation à l'ammonium quaternaire **48** (38,8 mg ; 54,5 μ mol).

- ◆ **Conditions de purification** : détection : 254 nm et 338 nm ; durée de la séparation : 30 minutes ; éluant : H₂O/ACN (v/v) : 95/5 durant 2 minutes ; 95/5 \rightarrow 70/30 durant 6 minutes ; 70/30 durant 2 minutes ; 70/30 \rightarrow 60/40 durant 6 minutes ; 60/40 durant 3 minutes ; 60/40 \rightarrow 10/90 durant 7 minutes ; 10/90 durant 4 minutes ; temps de rétention : 21,7 minutes
- ◆ **Aspect** : lyophilisat jaune très hygroscopique ◆ **Formule brute** : C₁₉H₃₆Cl₄IN₆O₄P
- ◆ **Masse molaire** : 712,21 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 35%
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 1491 ($\nu_{\text{as NO}_2}$) ; 1331 ($\nu_{\text{s NO}_2}$) ; 1210 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 973 ; 959 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN ¹H** (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm) : 5,26 (d, 1H, ³*J*_{H-P} = 10,0 Hz, CH₂O) ; 4,08 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,76-3,64 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,51-3,38 (m, 10H, CH₂N⁺(CH₃)₃, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,17 (s, 9H, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 2,81 (t, 2H, ³*J*_{H-H} = 7,3 Hz, C_{Ar}CH₂CH₂) ; 2,27-2,18 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CD₃OD, 126 MHz) δ (ppm) : 146,72 (C_{Ar}NO₂) ; 140,48 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 130,86 (d, ³*J*_{C-P} = 5,0 Hz, C_{Ar}CH₂O) ; 67,05 ; 67,03 ; 67,91 (CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 56,98 (d, ²*J*_{C-P} = 4,5 Hz, CH₂O) ; 53,84 ; 53,81 ; 53,78 (CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 50,11 (d, 4C, ²*J*_{C-P} = 4,7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 43,06 (4C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 35,43 (N_{Ar}CH₃) ; 24,16 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 23,19 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** (CD₃OD, 202 MHz) δ (ppm) : 18,24
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 583,1292 [M]⁺ (valeur théorique : m/z 583,1284)

Partie expérimentale

Complexe 3-{5-[[bis[(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl]oxy)méthyl]-1-*N'*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazol-4-yl]-*N,N*-diméthylpropan-1-amine borane (**49-BH₃**)

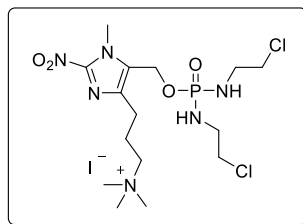


A une solution refroidie à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ d'oxychlorure de phosphore ($38\text{ }\mu\text{L}$; $0,408\text{ mmol}$; $1,0\text{ éq.}$) dans du DCM anhydre (5 mL), est additionnée goutte à goutte une solution de l'alcool **42-BH₃** (105 mg ; $0,410\text{ mmol}$; $1,0\text{ éq.}$) et de TEA ($63\text{ }\mu\text{L}$; $0,452\text{ mmol}$; $1,0\text{ éq.}$) dans du DCM anhydre (2 mL). Après 1 heure d'agitation à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, sont ajoutés successivement au milieu réactionnel le chlorhydrate de 2-chloroéthylamine (102 mg ; $0,885\text{ mmol}$; $2,1\text{ éq.}$) puis goutte à goutte de la TEA ($260\text{ }\mu\text{L}$; $1,87\text{ mmol}$; $4,5\text{ éq.}$). Après retour progressif à 5°C durant 15 heures, la réaction est stoppée par addition d'eau (10 mL). Après décantation, la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée d'hydrogénosulfate de sodium (10 mL) puis séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner une huile jaune pâle, qui est purifiée sur chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM seul puis DCM/méthanol, $98/2$, v/v) pour conduire au phosphorodiamidate **49-BH₃** ($78,0\text{ mg}$; $0,170\text{ mmol}$).

- ◆ **Aspect** : huile beige ◆ **Formule brute** : $\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{BCl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{P}$ ◆ **Masse molaire** : $459,12\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 41%
- ◆ **CCM** (SiO_2 , UV 254 nm ou NBP, DCM/méthanol, $98/2$, v/v) : $R_f = 0,26$
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 3338, 3235 (ν_{NH}) ; 2381 ; 2318 ; 2271 (ν_{BH}) ; 1493 ($\nu_{\text{as NO}_2}$) ; 1331 ($\nu_{\text{s NO}_2}$) ; 1193 ; 1167 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 1110 ; 999 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm) : 5,03 (d, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 7,4\text{ Hz}$, CH_2O) ; 4,05 (s, 3H, $\text{N}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$) ; 3,58 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 5,5\text{ Hz}$, 4H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 3,35-3,19 (m, 6H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 2,81-2,72 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$) ; 2,67 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7,4\text{ Hz}$, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 2,54 (s, 6H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$) ; 2,12-2,01 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 1,77-1,32 (m, 3H, BH_3)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl_3 , 126 MHz) δ (ppm) : 145,11 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$) ; 141,04 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 129,24 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7,8\text{ Hz}$, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{O}$) ; 63,82 ($\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$) ; 55,03 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4,1\text{ Hz}$, CH_2O) ; 51,47 (2C, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$) ; 45,87 (d, 2C, $^3J_{\text{C-P}} = 5,2\text{ Hz}$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 43,10 (2C, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 34,65 ($\text{N}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$) ; 24,73 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 23,97 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)
- ◆ **RMN ³¹P** (CDCl_3 , 202 MHz) δ (ppm) : 14,82
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 457,13 $[\text{M-H}]^+$ (valeur théorique : m/z 457,15)
 m/z 481,09 $[\text{M+Na}]^+$ (valeur théorique : m/z 481,14)

Partie expérimentale

Iodure de 3-{5-[[bis[(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl]oxy)méthyl]-1-*N'*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazol-4-yl]-*N,N,N*-triméthylpropan-1-aminium (**50**)

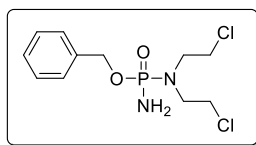


A une solution du complexe de bore **49-BH₃** (67,0 mg ; 146 μ mol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (5 mL), est ajouté du DABCO (82,4 mg ; 735 μ mol ; 5,0 éq.). Le mélange est laissé sous agitation à 40 °C durant 1 heure. Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C et de l'iodure de méthyle (140 μ L ; 2,25 mmol ; 15 éq.) est ajouté. Après 2 heures d'agitation à 0 °C, le mélange est évaporé sous pression réduite pour donner une poudre jaune qui est purifiée par chromatographie préparative en phase inverse (éluant : gradient ACN dans l'eau) pour conduire après lyophilisation à l'ammonium quaternaire **50** (47,9 mg ; 81,6 μ mol).

- ◆ **Conditions de purification** : détection : 254 nm et 338 nm ; durée de la séparation : 30 minutes ; éluant : H₂O/ACN (v/v) : 95/5 durant 2 minutes ; 95/5 \rightarrow 70/30 durant 6 minutes ; 70/30 durant 2 minutes ; 70/30 \rightarrow 60/40 durant 6 minutes ; 60/40 durant 3 minutes ; 60/40 \rightarrow 10/90 durant 7 minutes ; 10/90 durant 4 minutes ; temps de rétention : 14,1 minutes
- ◆ **Aspect** : Solide jaune très hygroscopique
- ◆ **Formule brute** : C₁₅H₃₀Cl₂IN₆O₄P
- ◆ **Masse molaire** : 587,22 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 56%
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3246 (ν_{NH}) ; 1496 ($\nu_{\text{as NO}_2}$) ; 1329 ($\nu_{\text{s NO}_2}$) ; 1211 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 1002 ; 990 ; 979 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN ¹H** (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm) : 5,11 (d, 1H, ³*J*_{H-P} = 9,4 Hz, CH₂O) ; 4,06 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,57 (t, 4H, ³*J*_{H-H} = 6,3 Hz, NHCH₂CH₂Cl) ; 3,47-3,38 (m, 2H, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 3,20 (td, 4H, ³*J*_{H-P} = 12,5 Hz, ³*J*_{H-H} = 6,3 Hz, NHCH₂CH₂Cl) ; 3,15 (s, 9H, CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 2,79 (t, 2H, ³*J*_{H-H} = 7,3 Hz, C_{Ar}CH₂CH₂) ; 2,24–2,16 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CD₃OD, 126 MHz) δ (ppm) : 146,48 (C_{Ar}NO₂) ; 140,13 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 131,52 (d, ³*J*_{C-P} = 6,5 Hz, C_{Ar}CH₂O) ; 66,92 ; 66,94 ; 66,90 (CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 56,57 (d, ²*J*_{C-P} = 4,8 Hz, CH₂O) ; 53,91 ; 53,88 ; 53,84 (CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 45,88 (d, 2C, ²*J*_{C-P} = 5,0 Hz, NHCH₂CH₂Cl) ; 44,18 (2C, NHCH₂CH₂Cl) ; 35,44 (N_{Ar}CH₃) ; 24,12 (C_{Ar}CH₂CH₂) ; 23,34 (CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** (CD₃OD, 202 MHz) δ (ppm) : 17,20
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 459,1446 [M]⁺ (valeur théorique : m/z 459,1438)

Partie expérimentale

N,N-Bis-(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate de benzyle (**53**)

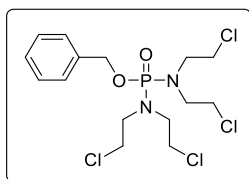


A une solution d'alcool benzylique (500 μL ; 4,83 mmol ; 1,0 eq.) dans du THF anhydre (20 mL) refroidie à $-78\text{ }^\circ\text{C}$, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF (5,3 mL ; 5,30 mmol ; 1,1 eq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** (1,38 g ; 5,33 mmol ; 1,1 eq.) dans du THF anhydre (3 mL) préalablement refroidie à $-78\text{ }^\circ\text{C}$ est ajoutée rapidement au mélange réactionnel. Le milieu est laissé sous agitation à $-78\text{ }^\circ\text{C}$ durant 1 heure 30. Un courant d'ammoniac gazeux est réalisé dans le milieu réactionnel durant 2 minutes. La réaction est stoppée par addition d'eau (20 mL) à $-78\text{ }^\circ\text{C}$. Après retour à température ambiante, la solution est extraite avec de l'acétate d'éthyle ($3 \times 25\text{ mL}$). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 97/3 puis 96/4, v/v) pour donner le phosphorodiamidate **53** (879 mg ; 2,83 mmol).

- ◆ **Aspect** : cire blanche ◆ **Formule brute** : $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$ ◆ **Masse molaire** : $311,14\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 58%
- ◆ **CCM** (SiO_2 , UV 254 nm ou NBP, acétate d'éthyle/éthanol, 96/4, v/v) : $R_f = 0,44$
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 3316 ; 3239 (ν_{NH}) ; 1181 ; 1158 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 1011 ; 1001 ; 967 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) : 7,47-7,29 (m, 5H, H_{Ar}) ; 5,06 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11,8\text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8,5\text{ Hz}$, $\text{CH}'\text{O}$) ; 4,98 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11,8\text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 7,9\text{ Hz}$, $\text{CH}''\text{O}$) ; 3,66-3,53 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 3,52-3,32 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 2,79 (s, 2H, NH_2)
- ◆ **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) : 136,59 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7,1\text{ Hz}$, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{O}$) ; 128,79 ; 128,56 ; 127,99 (5C, CH_{Ar}) ; 67,32 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4,7\text{ Hz}$, CH_2O) ; 49,34 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4,8\text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 42,68 (d, 2C, $^3J_{\text{C-P}} = 1,1\text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$)
- ◆ **RMN ^{31}P** (CDCl_3 , 202 MHz) δ (ppm) : 15,90
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 311,02 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (valeur théorique : m/z 311,05)

Partie expérimentale

N,N,N',N'-Tétrakis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate de benzyle (**54**)

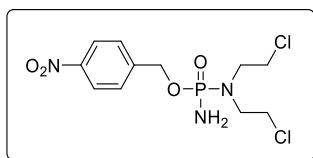


A une solution d'alcool benzylique (140 μL ; 1,35 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (1 mL) refroidie à $-78\text{ }^\circ\text{C}$, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF (1,5 mL ; 1,50 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du chlorure de l'acide phosphorodiamidique **2** (551 mg ; 1,51 mmol ; 1,1 éq.) dans du THF anhydre (3 mL) préalablement refroidie à $-78\text{ }^\circ\text{C}$, est ajoutée goutte à goutte au mélange réactionnel. Après agitation à température ambiante pendant 15 heures, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu est mis en suspension dans du DCM (10 mL) puis lavé avec de l'eau (10 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner une huile jaune pâle, qui est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/acétate d'éthyle, 100/0 puis 90/10, v/v) pour donner le phosphorodiamidate **54** (294 mg ; 0,674 mmol).

- ◆ **Aspect** : Solide blanc ◆ **Formule brute** : $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$ ◆ **Masse molaire** : $436,13\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 50%
- ◆ **Point de fusion** : $47\text{-}48\text{ }^\circ\text{C}$
- ◆ **CCM** (SiO_2 , UV 254 nm et NBP, DCM) : $R_f = 0,73$
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 1220 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 974 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) : 7,38 (s, 5H, H_{Ar}) ; 5,06 (d, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 7,9\text{ Hz}$, OCH_2) ; 3,70-3,49 (m, 8H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 3,48-3,30 (m, 8H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$)
- ◆ **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) : 136,00 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6,8\text{ Hz}$, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$) ; 128,93, 128,86, 128,19 (5C, CH_{Ar}) ; 67,82 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4,6\text{ Hz}$, OCH_2) ; 49,67 (d, 4C, $^2J_{\text{C-P}} = 4,6\text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 42,41 (4C, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$)
- ◆ **RMN ^{31}P** (CDCl_3 , 202 MHz) : 16,08
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 437,02 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (valeur théorique : m/z 437,03)
 m/z 458,94 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (valeur théorique : m/z 459,01)

Partie expérimentale

N,N-Bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate de 4-nitrobenzyle (**55**)

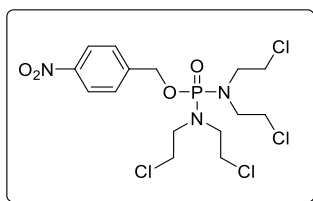


A une solution de l'alcool 4-nitrobenzylique (500 mg ; 3,26 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (14 mL) refroidie à -78 °C, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF (3,6 mL ; 3,60 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** (931 mg ; 3,60 mmol ; 1,1 éq.) dans du THF anhydre (4 mL) préalablement refroidie à -78 °C, est ajoutée rapidement au mélange réactionnel. Après 1 heure d'agitation, un courant d'ammoniac est réalisé durant 1-2 minutes dans le milieu réactionnel, toujours refroidi à -78 °C. 20 mL d'eau sont additionnés à -78 °C, avant retour à température ambiante et extraction avec de l'acétate d'éthyle (3 × 25 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle) pour conduire au phosphorodiamidate **55** (722 mg ; 2,03 mmol).

- ◆ **Aspect** : Solide beige
- ◆ **Formule brute** : C₁₁H₁₆Cl₂N₃O₄P
- ◆ **Masse molaire** : 356,14 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 62%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, acétate d'éthyle) : R_f = 0,39
- ◆ **Point de fusion** : 83-84 °C (littérature : 86-88 °C)²⁹²
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3329 ; 3253 (ν_{NH}) ; 1450 (ν_{as} NO₂) ; 1340 (ν_s NO₂) ; 1219 ; 1185 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1023 ; 1013 ; 985 ; 950 (ν_{C-O}, ν_{P-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 8,21 (d, 2H, ³J_{H-H} = 8,8 Hz, H_{Ar}) ; 7,54 (d, 2H, ³J_{H-H} = 8,8 Hz, H_{Ar}) ; 5,16 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,1 Hz, ³J_{H-P} = 7,7 Hz, OCH') ; 5,09 (dd, ²J_{H-H} = 13,1 Hz, ³J_{H-P} = 7,5 Hz, 1H, OCH'') ; 3,69-3,58 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,56-3,40 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 2,86 (se, 2H, NH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 147,91 (C_{Ar}NO₂) ; 143,95 (d, ³J_{C-P} = 7,7 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 128,02 ; 123,98 (4C, CH_{Ar}) ; 65,85 (d, ²J_{C-P} = 4,1 Hz, OCH₂) ; 49,20 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4,9 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 42,67 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂)
- ◆ **RMN ³¹P** (CDCl₃, 202 MHz) δ (ppm) : 16,30
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 356,00 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 356,03)

Partie expérimentale

N,N,N',N'-Tétrakis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate de 4-nitrobenzyle (**56**)

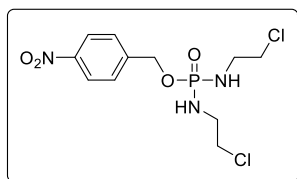


A une solution d'alcool 4-nitrobenzylique (239 mg ; 1,56 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (7,0 mL) refroidie à -78 °C, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF (1,7 mL ; 1,70 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du chlorure de l'acide phosphorodiamidique **2** (625 mg ; 1,71 mmol ; 1,1 éq.) dans du THF anhydre (4,0 mL) préalablement refroidie à -78 °C, est ajoutée goutte à goutte au mélange réactionnel. Le mélange est laissé sous agitation à -78 °C durant 2 heures. Après retour à température ambiante et agitation pendant 17 heures, la réaction est stoppée par addition d'eau (10 mL) puis extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 15 mL). Les phases organiques sont recueillies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite pour donner une huile jaune. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30 puis 90/10, v/v) pour donner le phosphorodiamidate **56** (488 mg ; 1,01 mmol).

- ◆ **Aspect** : Solide jaune
- ◆ **Formule brute** : $C_{15}H_{22}Cl_4N_3O_4P$
- ◆ **Masse molaire** : $481,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 65%
- ◆ **Point de fusion** : 76-77°C (littérature : 64°C)²⁹⁶
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, cyclohexane/acétate d'éthyle, 50/50, v/v) : $R_f = 0,45$
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 1520 ($\nu_{\text{as NO}_2}$) ; 1347 ($\nu_{\text{s NO}_2}$) ; 1239 ; 1221 ; 1199 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 1039 ; 974 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN** ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 8,24 (d, 2H, ³J_{H-H} = 8,8 Hz, H_{Ar}) ; 7,55 (d, 2H, ³J_{H-H} = 8,8 Hz, H_{Ar}) ; 5,16 (d, 2H, ³J_{H-P} = 7,4 Hz, OCH₂) ; 3,69-3,58 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,47-3,40 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂)
- ◆ **RMN** ¹³C (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 148,12 (C_{Ar}NO₂) ; 143,20 (d, ³J_{C-P} = 7,5 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 128,38 ; 124,16 (4C, CH_{Ar}) ; 66,26 (d, ²J_{C-P} = 4,0 Hz, CH₂O) ; 49,61 (d, 4C, ²J_{C-P} = 4,6 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 42,38 (4C, N(CH₂CH₂Cl)₂)
- ◆ **RMN** ³¹P (CDCl₃, 202 MHz) : 16,49
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 481,99 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 482,01)

Partie expérimentale

N,N'-Bis(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate de 4-nitrobenzyle (**57**)

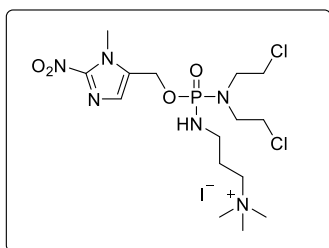


L'acide phosphorodiamidique **3** (146 mg ; 0,661 mmol ; 1,0 éq.) est mis en suspension dans du THF anhydre (20 mL) sous atmosphère inerte. La solution obtenue est refroidie à 0 °C, puis sont successivement additionnés de la triphénylphosphine (208 mg ; 0,793 mmol ; 1,2 éq.), de l'alcool 4-nitrobenzylique (121 mg ; 0,790 mmol ; 1,2 éq.) et goutte à goutte de l'azodicarboxylate d'isopropyle (160 μ L ; 0,813 mmol ; 1,2 éq.). Après agitation à température ambiante pendant 1 heure, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et l'huile jaune obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 100/0 puis 95/5, v/v) pour donner le phosphorodiamidate **57** (64,2 mg ; 0,180 mmol).

- ◆ **Aspect** : Solide beige ◆ **Formule brute** : $C_{11}H_{16}Cl_2N_3O_4P$ ◆ **Masse molaire** : $356,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 27%
- ◆ **Point de fusion** : 71-72 °C (littérature : 74-75 °C)²⁹⁷
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, acétate d'éthyle) : $R_f = 0,20$
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3221 (ν_{NH}) ; 1472 ($\nu_{\text{as NO}_2}$) ; 1347 ($\nu_{\text{s NO}_2}$) ; 1191 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 1051 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN** ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) : 8,23 (d, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 8,7 \text{ Hz}$, H_{Ar}) ; 7,55 (d, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 8,7 \text{ Hz}$, H_{Ar}) ; 5,13 (d, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 8,0 \text{ Hz}$, CH₂O) ; 3,60 (t, 4H, $^3J = 5,5 \text{ Hz}$, NHCH₂CH₂Cl) ; 3,29 (td, 4H, $^3J_{\text{H-P}} = 11,2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-H}} = 5,5 \text{ Hz}$, NHCH₂CH₂Cl) ; 3,03 (se, 2H, NH)
- ◆ **RMN** ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) : 147,80 (C_{Ar}NO₂) ; 144,00 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7,2 \text{ Hz}$, C_{Ar}CH₂) ; 128,01 ; 123,96 (4C, CH_{Ar}) ; 65,83 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4,4 \text{ Hz}$, CH₂O) ; 45,96 (d, 2C, $^3J_{\text{C-P}} = 5,2 \text{ Hz}$, NHCH₂CH₂Cl) ; 43,10 (2C, NHCH₂CH₂Cl)
- ◆ **RMN** ³¹P : (CDCl₃, 202 MHz) : 14,53
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 356,05 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 356,03)

Partie expérimentale

Iodure de 3-({[bis(2-chloroéthyl)amino][(1-*N'*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)méthoxy]phosphoryl)amino)-*N,N,N*-triméthylpropane-1-aminium (**ICF05016**)

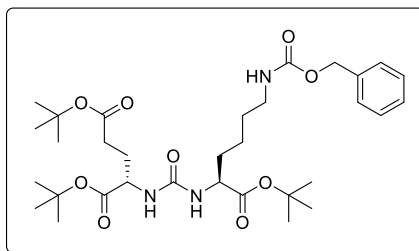


A une solution du phosphorodiamidate **24** (422 mg ; 0,948 mmol ; 1,0 éq.) dans de l'ACN anhydre (3,0 mL) sont ajoutés du carbonate de sodium (602 mg ; 5,68 mmol ; 6,0 éq.) et de l'iodure de méthyle (710 μ L ; 11,4 mmol ; 12 éq.). Après agitation à température ambiante durant 3 heures 45, le milieu réactionnel est filtré et le solide est lavé avec de l'ACN (3 x 10 mL) pour conduire après évaporation sous pression réduite à l'ammonium quaternaire **ICF05016** analytiquement pur (436 mg ; 0,742 mmol).

- ◆ **Aspect** : Huile jaune ◆ **Formule brute** : $C_{15}H_{30}Cl_2IN_6O_4P$ ◆ **Masse molaire** : $587,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 78%
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 3441 ($\nu_{\text{N-H}}$) ; 1490 ($\nu_{\text{as NO}_2}$) ; 1352 ($\nu_{\text{s NO}_2}$) ; 1223 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 1193 ; 1012 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN ^1H** (CD_3OD , 500 MHz) δ (ppm) : 7,27 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,19 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8,4 \text{ Hz}$, OCH') ; 5,15 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 8,5 \text{ Hz}$, OCH'') ; 4,08 (s, 3H, $\text{N}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$) ; 3,74–3,65 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 3,52–3,36 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$, $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) ; 3,17 (s, 9H, $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) ; 3,01 (td, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 12,5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-H}} = 6,5 \text{ Hz}$, NHCH_2) ; 2,06-1,93 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)
- ◆ **RMN ^{13}C** (CD_3OD , 50 MHz) δ (ppm) : 147,61 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$) ; 134,95 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7,3 \text{ Hz}$, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$) ; 129,34 (CH_{Ar}) ; 65,83 ; 65,76 ; 65,71 ($\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) ; 57,96 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4,7 \text{ Hz}$, OCH₂) ; 53,98 ; 53,90 ; 53,83 ($\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) ; 50,04 (d, 2C, $^2J_{\text{C-P}} = 4,7 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 43,24 (d, 2C, $^3J_{\text{C-P}} = 1,3 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 38,75 (NHCH_2) ; 35,50 ($\text{N}_{\text{Ar}}\text{CH}_3$) ; 26,25 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5,1 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)
- ◆ **RMN ^{31}P** (CD_3OD , 202 MHz) : 18,04 ppm
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 459,1443 [M]⁺ (valeur théorique : m/z 459,1438)

Partie expérimentale

(9S,13S)-3,11-Dioxo-1-phényl-2-oxa-4,10,12-triazapentadécane-9,13,15-tricarboxylate de tri-*tert*-butyle (**63**)

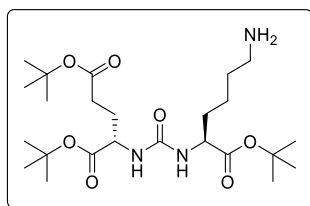


A une solution de chlorhydrate de l'ester di-*tert*-butylique de l'acide (*L*)-glutamique (2,50 g ; 8,45 mmol ; 1,6 éq.) dans du DCM anhydre (75 mL) et refroidie à -78 °C, est additionnée de la TEA (3,9 mL ; 28,0 mmol ; 5,4 éq.). Une solution de triphosgène (846 mg ; 2,85 mmol ; 0,3 éq.) dans du DCM anhydre (25 mL) est ajoutée goutte à goutte. La solution est portée à température ambiante, et laissée sous agitation pendant 30 minutes. Du chlorhydrate de l'ester *tert*-butylique de l'acide (*L*)-2-amino-6-benzyloxycarbonylaminohexanoïque (1,94 g ; 5,20 mmol ; 1,0 éq.) est additionné, suivi par l'ajout de TEA (700 µL ; 5,02 mmol ; 1,0 éq.). Après 16 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec du dichlorométhane (100 mL) avant d'être lavé avec de l'eau (2 x 100 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30 puis 60/40, v/v) pour donner l'urée **63** (2,88 g ; 4,63 mmol).

- ◆ **Aspect** : cire blanche
- ◆ **Formule brute** : C₃₂H₅₁N₃O₉
- ◆ **Masse molaire** : 621,77 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 89%
- ◆ **CCM** (SiO₂, acide phosphomolybdique, cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30, v/v) : R_f = 0,31
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3360 (ν_{NH}) ; 1724 (ν_{C=O} ester) ; 1687 ; 1645 (ν_{C=O} urée/carbamate) ; 1533 (δ_{NH}) ; 1150 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN** ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 7,41-7,27 (m, 5H, H_{Ar}) ; 5,19-4,97 (m, 5H, NHCOOCH₂, NHCONH) ; 4,38-4,28 (m, 2H, CHCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CH₂) ; 3,22-3,12 (m, 2H, CH₂NH) ; 2,38-2,22 (m, 2H, CH₂CO) ; 2,12-2,00 et 1,90-1,80 (m, 2x1H, CHCH₂CH₂CO) ; 1,81-1,72 (m, 1H, CHCH'₂CH₂CH₂CH₂NH₂) ; 1,68-1,24 (m, 32H, CHCH'₂CH₂CH₂, C(CH₃)₃)
- ◆ **RMN** ¹³C (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 172,58 ; 172,51 ; 172,34 (CO₂) ; 156,98 ; 156,72 (NHCO) ; 136,90 (C_{Ar}CH₂) ; 82,24 ; 81,93 ; 80,68 (C(CH₃)₃) ; 66,72 (C_{Ar}CH₂) ; 53,49 ; 53,25 (CHCH₂CH₂CH₂, CHCH₂CH₂CO) ; 40,81 (CH₂NH) ; 32,82 (CHCH₂CH₂CH₂) ; 31,76 (CH₂CO) ; 29,54 (CHCH₂CH₂CH₂) ; 28,52 (CHCH₂CH₂CO) ; 28,25 ; 28,19 ; 28,17 (C(CH₃)₃) ; 22,38 (CHCH₂CH₂CH₂)
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 622,40 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 622,37)

Partie expérimentale

{{[(1S)-6-Amino-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl]carbamoyl}-(L)-glutamate de di-*tert*-butyle (**59**)

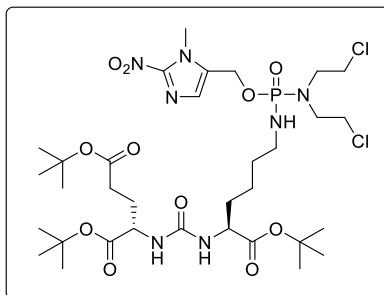


A une solution du carbamate **63** (669 mg, 1,08 mmol, 1,0 éq.) dans du méthanol (13 mL) est ajouté du palladium sur charbon à 10% (134 mg). L'agitation est maintenue durant 15 heures sous atmosphère d'hydrogène. La suspension est filtrée sur Célite 545[®] et le pad est lavé avec du méthanol (6 x 15 mL). Le filtrat est concentré sous pression réduite puis filtré sur un filtre PTFE 0,45 µm. Après évaporation sous pression réduite, l'amine **59** est obtenu analytiquement pure (453 mg, 929 µmol).

- ◆ **Aspect** : huile incolore ◆ **Formule brute** : C₂₄H₄₅N₃O₇ ◆ **Masse molaire** : 487,63 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 86%
- ◆ **CCM** (SiO₂, ninhydrine, acétate d'éthyle/éthanol, 80/20, v/v, + 5% ammoniacque) : R_f = 0,37
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3300-3400 (ν_{NH}) ; 1727 (ν_{C=O} ester) ; 1644 (ν_{C=O} urée) ; 1557 (δ_{NH}) ; 1147 (ν_{C-O})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 5,76 (d, 1H, ³J = 7,8 Hz, NHCHCH₂CH₂CO) ; 5,67 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, NHCHCH₂CH₂CH₂) ; 4,60 (se, 2H, NH₂) ; 4,44-4,17 (m, 2H, CHCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CH₂) ; 2,95-2,82 (m, 2H, CH₂NH₂) ; 2,42-2,21 (m, 2H, CH₂CO) ; 2,14-1,98 et 1,90-1,80 (m, 2×1H, CHCH₂CH₂CO) ; 1,80-1,73 (m, 1H, CHCH'₂CH₂CH₂) ; 1,73-1,59 (m, 3H, CHCH''₂CH₂CH₂) ; 1,59, 1,29 (m, 29H, C(CH₃)₃, CHCH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 173,13 ; 172,77 ; 172,57 (3C, COO) ; 157,38 (NHCONH) ; 82,27 ; 81,78 ; 80,68 (C(CH₃)₃) ; 53,56 (CHCH₂CH₂CH₂) ; 53,17 (CHCH₂CH₂CO) ; 40,68 (CH₂NH₂) ; 32,04 (CHCH₂CH₂CH₂) ; 31,88 (CHCH₂CH₂CH₂) ; 28,44 (CH₂CO) ; 28,25 ; 28,20 (3C, C(CH₃)₃) ; 27,56 (CHCH₂CH₂CO) ; 22,21 (CHCH₂CH₂CH₂)
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 488,30 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 488,33)

Partie expérimentale

(10*S*,14*S*)-1-Chloro-3-(2-chloroéthyl)-4-[(1-*N*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)méthoxy]-4,12-dioxo-3,5,11,13-tétraza-4λ₅-phosphahexadécane-10,14,16-tricarboxylate de tri-*tert*-butyle (**65**)

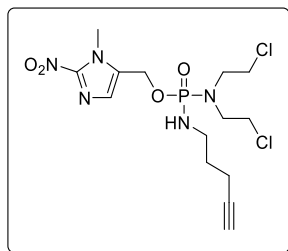


A une solution de l'alcool **12** (161 mg ; 1,02 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (4,5 mL), refroidie à -78 °C, est ajoutée une solution 1M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF anhydre (1,1 mL ; 1,10 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** (294 mg ; 1,14 mmol ; 1,1 éq.) dans du THF anhydre (3,5 mL) et préalablement refroidie à -78 °C est ajoutée rapidement au mélange réactionnel. Après 20 minutes d'agitation à -78 °C, une solution du ligand **59** (499 mg ; 1,02 mmol ; 1,0 éq.) et de TEA (140 µL ; 1,00 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (4 mL) est ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel. Après retour progressif à 0 °C durant 7 heures, la réaction est stoppée par addition d'eau (10 mL) et le milieu réactionnel est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 × 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/acétate d'éthyle, 60/40, 40/60, 20/80, v/v) pour conduire au phosphorodiamidate **65** (375 mg ; 0,451 mmol).

- ◆ **Aspect:** huile jaune pâle ◆ **Formule brute :** C₃₃H₅₈Cl₂N₇O₁₁P ◆ **Masse molaire:** 830,74 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement :** 44%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm ou NBP, DCM/acétate d'éthyle, 60/40, v/v) : R_f = 0,15
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3340 (ν_{NH}) ; 1726 (ν_{C=O} ester) ; 1660 (ν_{C=O} urée) ; 1540 (δ_{NH}) ; 1492 (ν_{as} NO₂) ; 1366 (ν_s NO₂) ; 1150 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1008 ; 978 ; 959 (ν_{C-O}, ν_{P-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm), produit obtenu sous la forme de 2 diastéréoisomères : 7,18 et 7,17 (2s, 1H, H_{Ar}) ; 5,92 et 5,84 (2d, ³J_{H-H} = 7,7 Hz, 1H, NHCHCH₂CH₂CH₂) ; 5,73 (2d, ³J_{H-H} = 8,1 Hz, 1H, NHCHCH₂CH₂CO) ; 5,18-5,01 (m, 2H, CH₂O) ; 4,34-4,16 (m, 2H, CHCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CH₂) ; 4,03 et 4,02 (2s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,65-3,53 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,48-3,30 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,22-3,07 (m, 1H, PNH) ; 2,95-2,78 (m, 2H, CH₂NH) ; 2,35-2,16 (m, 2H, CH₂CH₂CO) ; 2,05-1,96 et 1,83-1,73 (m, 1H, CH₂CH₂CO) ; 1,72-1,63 (m, 1H, CHCH'CH₂CH₂) ; 1,62-1,26 (m, 32H, CHCH''CH₂CH₂, C(CH₃)₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm), produit obtenu sous la forme de 2 diastéréoisomères : 172,68 ; 172,63 ; 172,61 ; 172,56 ; 172,40 ; 172,39 (3C, CO₂) ; 157,44 et 157,42 (NHCONH) ; 146,37 (C_{Ar}NO₂) ; 133,18 et 133,10 (d, ³J_{C-P} = 8,2 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 129,04 et 129,00 (CH_{Ar}) ; 81,87 ; 81,86 ; 81,49 ; 81,43 (3C, C(CH₃)₃) ; 56,48 et 56,38 (2d, ²J_{C-P} = 3,8 Hz, CH₂O) ; 53,42 et 53,23 (CHCH₂CH₂CH₂) ; 52,89 et 52,82 (CHCH₂CH₂CO) ; 49,33 et 49,24 (2d, 2C, ²J_{C-P} = 4,7 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 42,70 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 40,56 et 40,20 (CH₂NH) ; 34,48 (N_{Ar}CH₃) ; 32,16 et 32,00 (CHCH₂CH₂CH₂) ; 31,67 (CH₂CO) ; 31,00 et 30,95 (2d, ³J_{C-P} = 6,2 Hz, CH₂CH₂NH) ; 28,67 et 28,65 (CH₂CH₂CO) ; 28,11 ; 28,07 ; 28,02 (9C, C(CH₃)₃) ; 21,81 et 21,75 (CHCH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN ³¹P** (CDCl₃, 202 MHz) δ (ppm) : produit obtenu sous la forme de 2 diastéréoisomères: 16,63 et 16,62
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 830,3392 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 830,3382)

Partie expérimentale

N,N-Bis(2-chloroéthyl)-*N'*-pent-4-ynphosphorodiamidate de (1-*N'*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)méthyle (**68**)

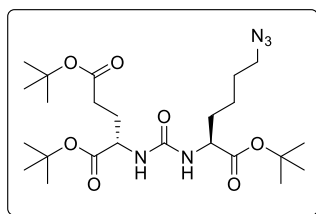


A une solution de l'alcool **12** (322 mg ; 2,05 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (30 mL), refroidie à -78°C, est ajoutée une solution 1 M de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF anhydre (2,2 mL ; 2,20 mmol ; 1,1 éq.). Après 5 minutes d'agitation, une solution du dichlorure de l'acide phosphoramidique **1** (605 mg ; 2,34 mmol ; 1,1 éq.) dans du THF anhydre (6 mL) et préalablement refroidie à -78 °C est ajoutée rapidement au mélange réactionnel. Le suivi de la réaction est monitoré par RMN ³¹P. Après 1 heure d'agitation à -78 °C, une solution de pent-4-yn-1-amine (200 µL ; 2,07 mmol ; 1,0 éq.) et de TEA (280 µL ; 2,01 mmol ; 1,0 éq.) dans du THF anhydre (500 µL) est ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel. Après 30 minutes d'agitation à -78 °C, la réaction est stoppée par addition d'eau (10 mL). Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est extrait avec du DCM (3 × 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Deux chromatographies successives sur colonne de gel de silice sont réalisées (1^{er} éluant : DCM/éthanol, 96/4, v/v ; 2^{ème} éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 95/5, v/v + 0,5% TEA) pour conduire au phosphorodiamidate **68** (301 mg ; 0,706 mmol).

- ◆ **Aspect** : huile jaune ◆ **Formule brute** : C₁₄H₂₂Cl₂N₅O₄P ◆ **Masse molaire** : 426,23 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 34%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm et NBP, DCM/éthanol, 96/4, v/v) : R_f = 0,40
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3292 ; 3233 (ν_{C-H}, ν_{NH}) ; 1490 (ν_{as} NO₂) ; 1350 (ν_s NO₂) ; 1220 (ν_{P=O}, ν_{C-N}) ; 1008 ; 978 (ν_{C-O}, ν_{P-O}, ν_{P-N})
- ◆ **RMN** ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 7,22 (s, 1H, H_{Ar}) ; 5,11 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,3 Hz, ³J_{H-P} = 7,9 Hz, OCH') ; 5,04 (dd, 1H, ²J_{H-H} = 13,3 Hz, ³J_{H-P} = 7,1 Hz, OCH'') ; 4,08 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,68-3,59 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,53-3,36 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,09-3,00 (m, 2H, NHCH₂) ; 2,73 (se, 1H, NHCH₂) ; 2,27 (td, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, ⁴J_{H-H} = 2,7 Hz, 2H, CH₂C≡CH) ; 1,96 (t, 1H, ⁴J_{H-H} = 2,7 Hz, C≡CH) ; 1,72 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, CH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN** ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) : 146,21 (C_{Ar}NO₂) ; 132,98 (d, ³J_{C-P} = 7,9 Hz, C_{Ar}CH₂) ; 129,00 (CH_{Ar}) ; 83,20 (CH₂C≡CH) ; 69,35 (CH₂C≡CH) ; 56,09 (d, ²J_{C-P} = 3,9 Hz, OCH₂) ; 48,93 (d, 2C, ²J_{C-P} = 4,8 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 42,61 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 39,95 (NHCH₂) ; 34,50 (N_{Ar}CH₃) ; 30,05 (³J_{C-P} = 6,0 Hz, CH₂CH₂CH₂) ; 15,72 (CH₂C≡CH)
- ◆ **RMN** ³¹P (CDCl₃, 202 MHz) δ (ppm) : 16,24
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 426,10 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 426,09)

Partie expérimentale

{{[(1S)-6-Azido-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl]carbamoyl}-(L)-glutamate de di-*tert*-butyle (**69**)



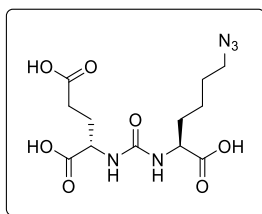
A une solution d'azoture de sodium (93,2 mg ; 1,43 mmol ; 1,0 éq.) dans l'eau (3,0 mL), est ajouté du DCM (4,5 mL). Le mélange est refroidi à 0 °C puis de l'anhydride triflique (500 µL ; 2,98 mmol ; 2,0 éq.) est additionné goutte à goutte. Après 3 heures d'agitation à température ambiante, le milieu est décanté et la phase aqueuse est extraite avec du DCM (3 x 2 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium (3,5 mL), pour conduire à 6 mL d'une solution d'azoture triflique, théoriquement à une concentration de 0,238 M.

A une solution d'amine **59** (87,3 mg ; 0,179 mmol ; 1,0 éq.) dans de l'eau (700 µL) et du méthanol (1,5 mL), sont ajoutés successivement du carbonate de potassium (44,2 mg ; 0,320 mmol ; 1,8 éq.), du sulfate de cuivre pentahydraté (0,7 mg ; 2,80 µmol ; 0,02 éq.) puis rapidement la solution d'azoture triflique (1,25 mL ; 0,298 mmol ; 1,7 éq.). Le mélange est agité durant 18 heures à température ambiante. Après décantation, la phase aqueuse est extraite avec du DCM (2 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : DCM/MeOH, 98/2, v/v) pour donner l'azoture **69** (72,0 mg ; 0,140 mmol).

- ◆ **Aspect** : solide blanc ◆ **Formule brute** : C₂₄H₄₃N₅O₇ ◆ **Masse molaire** : 513,64 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 78%
- ◆ **CCM** (SiO₂, DCM/MeOH, 98/2, v/v) : R_f = 0,67
- ◆ **Point de fusion** : 83-84 °C
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3369 (ν_{NH}) ; 2099 (ν_{as N=N}) ; 1722 (ν_{C=O ester}) ; 1645 (ν_{C=O urée}) ; 1534 (δ_{NH}) ; 1250 ; 1148 (ν_{s N=N, ν_{C-O, ν_{C-N}})}
- ◆ **RMN** ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 5,31 (se, 2H, NH) ; 4,31 (m, 2H, CHCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CH₂) ; 3,22 (t, ³J = 6,7 Hz, 2H, CH₂N₃) ; 2,36-2,17 (m, 2H, CH₂CO) ; 2,03 (tdd, 1H, ³J = 9,4 Hz, ³J = 5,9 Hz, ²J_{H-H} = 13,7 Hz, CH'CH₂CO) ; 1,86-1,78 (m, 1H, CH''CH₂CO) ; 1,78-1,71 (m, 1H, CHCH'CH₂CH₂) ; 1,65-1,50 (m, 3H, CHCH''CH₂CH₂, CHCH₂CH₂CH₂) ; 1,48-1,31 (m, 29H, CHCH₂CH₂CH₂, C(CH₃)₃)
- ◆ **RMN** ¹³C (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 172,52 ; 172,44 ; 172,33 (CO₂) ; 156,99 (NHCONH) ; 82,06 ; 81,90 ; 80,53 (C(CH₃)₃) ; 53,36 ; 53,14 (CHCH₂CH₂CH₂, CHCH₂CH₂CO) ; 51,23 (CH₂N₃) ; 32,84 (CHCH₂CH₂CH₂) ; 31,66 (CH₂CO) ; 28,55 ; 28,50 (CHCH₂CH₂CH₂, CHCH₂CH₂CO) ; 28,14 ; 28,08 (C(CH₃)₃) ; 22,37 (CHCH₂CH₂CH₂)
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 514,27 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 514,27)

Partie expérimentale

Acide [((1S)-5-azido-1-carboxypentyl)carbamoyl]-(L)-glutamique (**70**)

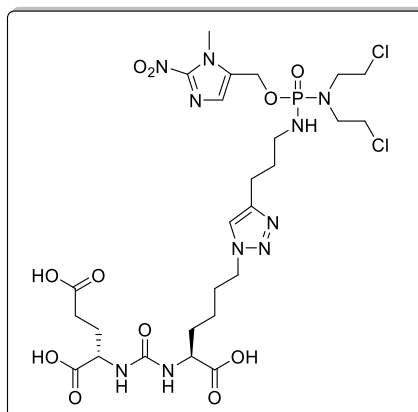


Le triester **69** (120 mg ; 234 μmol ; 1,0 eq.) est mis en solution dans un mélange TFA/TIS/eau (2 mL ; 95/2,5/2,5 ; v/v/v). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante durant 3 heures. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite puis remis en solution dans du TFA (2,0 mL). Après 3 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le TFA est co-évaporé avec du DCM (2 x 10 mL). L'huile marron obtenue est purifiée par chromatographie préparative en phase inverse (éluant : gradient d'ACN dans l'eau + 0,1% TFA) pour conduire après lyophilisation au triacide **70** (23,4 mg ; 67,8 μmol).

- ◆ **Aspect** : huile incolore ◆ **Formule brute** : $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_7$ ◆ **Masse molaire** : $345,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 29%
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 3362 (ν_{NH}) ; 3300-2500 (ν_{NH}) ; 2096 ($\nu_{\text{as N=N}}$) ; 1709 ($\nu_{\text{C=O acide}}$) ; 1628 ($\nu_{\text{C=O urée}}$) ; 1557 (δ_{NH}) ; 1208 ($\nu_{\text{s N=N}}$, $\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$)
- ◆ **RMN ^1H** (CD_3OD , 500 MHz) δ (ppm) : 4,32 (dd, 1H, $^3J = 8,6 \text{ Hz}$, $^3J = 5,1 \text{ Hz}$, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) ; 4,28 (dd, 1H, $^3J = 8,1 \text{ Hz}$, $^3J = 5,0 \text{ Hz}$, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 3,30 (t, 2H, $^3J = 6,8 \text{ Hz}$, CH_2N_3) ; 2,48-2,35 (m, 2H, CH_2CO) ; 2,19-2,10 (m, 1H, $\text{CH}'\text{CH}_2\text{CO}$) ; 1,95-1,80 (m, 2H, $\text{CH}''\text{CH}_2\text{CO}$, $\text{CHCH}'\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 1,73-1,55 (m, 3H, $\text{CHCH}''\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 1,53-1,42 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)
- ◆ **RMN ^{13}C** (CD_3OD , 126 MHz) δ (ppm) : 176,45 ; 176,31 ; 175,82 (CO_2) ; 160,09 (NHCONH) ; 53,92 ($\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 53,52 ($\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) ; 52,28 (CH_2N_3) ; 33,06 (CHCH_2CH_2) ; 31,10 (CH_2CO) ; 29,51 ; 28,92 ($\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) ; 23,79 ($\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 344,05 [M-H] $^-$ (valeur théorique : m/z 344,12)
- ◆ **Conditions de purification** : détection : 210 nm et 220 nm ; durée de la séparation : 20 minutes ; éluant : H_2O + 0,1 % TFA/ACN + 0,1% TFA (v/v) : 95/5 durant 3 minutes ; 95/5 \rightarrow 10/90 durant 7 minutes ; 10/90 durant 10 minutes ; temps de rétention : 16,2 minutes

Partie expérimentale

Acide [((1S)-5-{4-[3-({[bis(2-chloroéthyl)amino][[1-N'-méthyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)méthoxy]phosphoryl]amino)propyl]-1H-1,2,3-triazol-1-N-yl}-1-carboxypentyl)carbamoyl]-(-L)-glutamique (**66**)



A une solution de l'azoture **70** (55,9 mg ; 162 μmol ; 1,0 éq.) et de l'alcyne **68** (77,6 mg ; 182 μmol ; 1,1 éq.) dans un mélange tBuOH/eau (50/50, v/v) (4 mL), est ajoutée une solution 0,1 M d'acide ascorbique dans l'eau (245 μL ; 24,5 μmol ; 0,15 éq.). Une solution de catalyseur de Fokin, préparée à partir d'une solution 0,1 M de sulfate de cuivre (+II) dans l'eau (81 μL ; 8,1 μmol ; 0,05 éq.) et d'une solution 0,23 M de THPTA dans l'eau (35 μL ; 8,1 μmol ; 0,05 éq.), est ajoutée au milieu réactionnel. Après 9 heures d'agitation à température ambiante, des solutions d'acide ascorbique et de catalyseur de Fokin sont une nouvelle fois ajoutées au milieu réactionnel dans les mêmes proportions. Après 24 heures d'agitation à température ambiante, une solution 0,1 M d'acide ascorbique dans l'eau (490 μL ; 49,0 μmol ; 0,30 éq.) est de nouveau ajoutée. Après agitation pendant 24 heures, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis co-évaporé avec de l'ACN. L'huile jaune/verte obtenue est purifiée par chromatographie préparative sur phase inverse (éluant : gradient d'ACN dans l'eau, + 0,1% de TFA) pour conduire après lyophilisation au triazole **66** (46,1 mg ; 59,8 μmol).

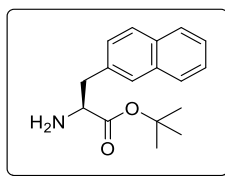
- ◆ **Aspect** : lyophilisat blanc très hygroscopique
- ◆ **Masse molaire** : 771,55 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 37%
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3500-2500 (ν_{NH} , ν_{OH}) ; 1716 ($\nu_{\text{C=O}}$ ester/acide) ; 1659 ($\nu_{\text{C=O}}$ urée) ; 1549 (δ_{NH}) ; 1494 ($\nu_{\text{as NO}_2}$) ; 1353 ($\nu_{\text{s NO}_2}$) ; 1190 ; 1136 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$) ; 1009 ; 962 ($\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN** ¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm) : 7,77 (s, 1H, H_{Ar} triazole) ; 7,23 (s, 1H, H_{Ar} imidazole) ; 5,12 (d, 2H, ³J_{H-P} = 8,0 Hz, CH₂O) ; 4,38 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7,0 Hz, N_{Ar}CH₂) ; 4,33-4,24 (m, 2H, CHCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CH₂) ; 4,05 (s, 3H, N_{Ar}CH₃) ; 3,70-3,59 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 3,51-3,33 (m, 4H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 2,94-2,87 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂) ; 2,74 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7,4 Hz, NHCH₂CH₂CH₂) ; 2,46-2,37 (m, 2H, CH₂CO) ; 2,18-2,08 (m, 1H, CH'CH₂CO) ; 2,05-1,81 (m, 6H, CH''CH₂CO, CHCH'CH₂CH₂, NHCH₂CH₂) ; 1,74-1,62 (m, 1H, CHCH''CH₂CH₂) ; 1,45-1,36 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂)
- ◆ **RMN** ¹³C (CD₃OD, 126 MHz) δ (ppm) : 176,40 ; 176,13 ; 175,80 (CO₂) ; 160,07 (NHCONH) ; 148,24 ; 147,63 (C_{Ar}NO₂, C_{Ar} triazole) ; 134,99 (d, ³J_{C-P} = 7,5 Hz, C_{Ar}CH₂O) ; 129,19 (CH_{Ar} imidazole) ; 123,55 (CH_{Ar} Triazole) ; 57,62 (d, ²J_{C-P} = 4,6 Hz, CH₂O) ; 53,76 ; 53,55 (2C, CHCH₂CH₂CO, CHCH₂CH₂CH₂) ; 51,20 (N_{Ar}CH₂) ; 50,27 (d, 2C, ³J_{C-P} = 7,5 Hz, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 43,18 (2C, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 41,16 (d, ²J_{C-P} = 3,7 Hz, NHCH₂CH₂CH₂) ; 35,09 (N_{Ar}CH₃) ; 32,87 (CHCH₂CH₂CH₂) ; 32,28 (d, ³J_{C-P} = 6,2 Hz, NHCH₂CH₂CH₂) ; 31,12 (CH₂CO) ; 30,65 (CHCH₂CH₂CH₂) ; 28,89 (CH₂CH₂CO) ; 23,48 (CHCH₂CH₂CH₂) ; 23,33 (NHCH₂CH₂CH₂)

Partie expérimentale

- ◆ **RMN ³¹P** (CD₃OD, 202 MHz) δ (ppm) : 18,32 ppm
- ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 771,2151 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 771,2144)
- ◆ **Conditions de purification** : détection : 220 nm et 323 nm ; durée de la séparation : 22 minutes ; éluant : H₂O + 0,1 % TFA/ACN + 0,1% TFA (v/v) : 95/5 durant 3 minutes ; 95/5 → 60/40 durant 7 minutes ; 60/40 durant 3 minutes ; 60/40 → 10/90 durant 3 minutes ; 10/90 durant 6 minutes ; temps de rétention : 18,7 minutes

Partie expérimentale

(S)-2-Amino-3-(naphtalén-2-yl)propanoate de *tert*-butyle (**71**)

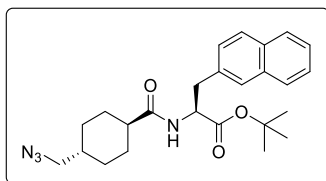


A une suspension de l'acide (S)-2-amino-3-(naphtalén-2-yl)propanoïque (100 mg ; 465 μmol ; 1,0 éq.) dans de l'acétate de *tert*-butyle (1,2 mL ; 8,95 mmol ; 19 éq.) refroidie à 0 °C, est ajouté goutte à goutte de l'acide perchlorique à 70% dans l'eau (61 μL ; 707 μmol ; 1,5 éq.). Après agitation pendant 24 heures à température ambiante, la réaction est stoppé par addition d'eau (3 mL) puis de DCM (5 mL). La solution est alcalinisée (pH 9-10) par addition d'une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium (5 mL). Après décantation, la phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 3 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. L'ester **71** (79,8 mg ; 294 μmol) est obtenu analytiquement pur d'après les analyses RMN ^1H et ^{13}C .

- ◆ **Aspect** : huile marron ◆ **Formule brute** : $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_2$ ◆ **Masse molaire** : 271,16 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : 63%
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 3053 (ν_{NH}) ; 1725 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1149 ($\nu_{\text{C-O}}$)
- ◆ **RMN ^1H** (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm) : 7,83-7,75 (m, 3H, H_{Ar}) ; 7,67 (s, 1H, H_{Ar}) ; 7,49-7,41 (m, 2H, H_{Ar}) ; 7,36 (dd, 1H, $^3J = 8,4 \text{ Hz}$, $^4J = 1,5 \text{ Hz}$, H_{Ar}) ; 3,72 (dd, 1H, $^3J = 7,6 \text{ Hz}$, $^3J = 5,7 \text{ Hz}$, CHCH_2Ar) ; 3,21 (dd, 1H, $^2J = 13,6 \text{ Hz}$, $^3J = 5,6 \text{ Hz}$, $\text{CHCH}'\text{Ar}$) ; 3,01 (dd, 1H, $^2J = 13,6 \text{ Hz}$, $^3J = 7,7 \text{ Hz}$, $\text{CHCH}''\text{Ar}$) ; 1,73 (s, 2H, NH_2) ; 1,43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)
- ◆ **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 126 MHz) δ (ppm) : 174,22 (CO) ; 135,13 ; 133,53 ; 132,44 ($\text{C}_{\text{IV Ar}}$) ; 128,12 ; 128,07 ; 127,68 ; 127,65 ; 127,58 ; 126,10 ; 125,57 (CH_{Ar}) ; 81,27 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 56,30 (CHCH_2Ar) ; 41,41 (CHCH_2Ar) ; 28,07 (3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 272,14 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (valeur théorique : m/z 272,16)

Partie expérimentale

(2S)-2-[(1r,4S)-4-(Azidométhyl)cyclohex-1-ylcarboxamido]-3-(naphtalén-2-yl)propanoate de *tert*-butyle (**72**)

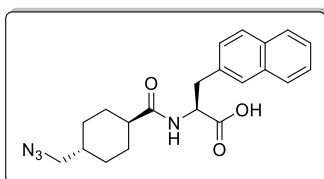


A une solution de l'amine **71** (345 mg ; 1,27 mmol ; 1,0 éq.) dans du DCM anhydre (20 mL) refroidi à 0 °C, sont ajoutés successivement de l'acide *trans* 4-azidométhylcyclohexane carboxylique (231 mg ; 1,26 mmol ; 1,0 éq.), de l'HOBt (173 mg ; 1,28 mmol ; 1,0 éq.), de l'HBTU (482 mg ; 1,27 mmol ; 1,0 éq.) puis goutte à goutte de la DIPEA (450 µL ; 2,58 mmol ; 2,0 éq.). Après agitation à température ambiante pendant 2 heures, le milieu réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle (50 mL) et la solution est lavée successivement avec de l'eau (25 mL), une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (25 mL), et une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (25 mL). La phase organique est séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30, v/v) pour donner l'amide **72** (540 mg ; 1,24 mmol).

- ◆ **Aspect** : solide blanc ◆ **Formule brute** : C₂₅H₃₂N₄O₃ ◆ **Masse molaire** : 436,56 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 97%
- ◆ **CCM** (SiO₂, UV 254 nm ou acide phosphomolybdique, cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30, v/v) : R_f = 0,49
- ◆ **Point de fusion** : 120-121 °C
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3343 (ν_{NH}) ; 2083 (ν_{as N=N}) ; 1718 (ν_{C=O ester}) ; 1657 (ν_{C=O amide}) ; 1523 (δ_{NH}) ; 1246 ; 1148 ; 1136 (ν_{s N=N}, ν_{C-O}, ν_{C-N})
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 7,82-7,72 (m, 3H, H_{Ar}) ; 7,58 (s, 1H, H_{Ar}) ; 7,49-7,42 (m, 2H, H_{Ar}) ; 7,28 (dd, 1H, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 1,7 Hz, H_{Ar}) ; 5,93 (d, 1H, ³J = 7,5 Hz, NH) ; 4,83 (td, 1H, ³J = 7,5 Hz, ³J = 5,9 Hz, CHCH₂Ar) ; 3,30 (dd, 1H, ²J = 13,8 Hz, ³J = 6,1 Hz, CHCH'Ar) ; 3,26 (dd, 1H, ²J = 13,8 Hz, ³J = 5,4 Hz, CHCH''Ar) ; 3,12 (d, 2H, ³J = 6,5 Hz, CH₂N₃) ; 2,02 (tt, ³J_{ax-ax} = 12,2 Hz, ³J_{ax-eq} = 3,5 Hz, CHCONHCH) ; 1,95-1,79 (m, 4H, CH₂ cyclohexyle) ; 1,59-1,39 (m, 3H, CH₂ cyclohexyle, CHCH₂N₃) ; 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 0,98 (dddd, 2H, ³J_{ax-ax} = 13,2 Hz, ³J_{ax-ax} = 13,2 Hz, ²J = 13,0 Hz, ³J_{ax-eq} = 3,5 Hz, CH₂ cyclohexyle)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 174,97 (CO₂) ; 170,98 (CONH) ; 133,97 ; 133,47 ; 132,60 (C_{Ar}) ; 128,38 ; 128,08 ; 127,87 ; 127,81 ; 127,56 ; 126,29 ; 125,79 (CH_{Ar}) ; 82,62 (C(CH₃)₃) ; 57,79 (CH₂N₃) ; 53,41 (CHCH₂Ar) ; 45,19 (CHCONHCH) ; 38,18 (CHCH₂Ar) ; 37,47 (CHCH₂N₃) ; 29,82 ; 29,74 ; 29,05 ; 28,79 (CH₂ cyclohexyle) ; 28,14 (3C, C(CH₃)₃)
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 437,19 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 437,25)

Partie expérimentale

Acide (2S)-2-[(1r,4S)-4-(azidométhyl)cyclohex-1-ylcarboxamido]-3-(naphtalén-2-yl)propanoïque (**73**)

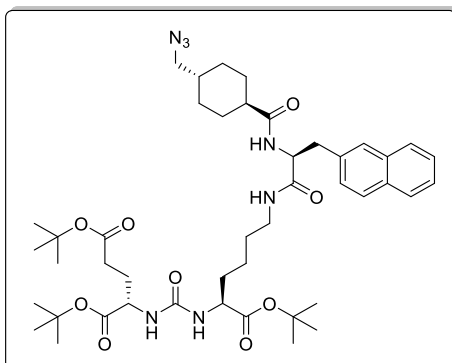


A une solution de l'ester **72** (307 mg ; 703 μmol ; 1,0 éq.) dans du DCM anhydre (6 mL) refroidie à 0 °C, est ajouté du TFA (3 mL). Après agitation à température ambiante pendant 2 heures 30, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et co-évaporé avec du DCM (3 x 15 mL). Le résidu est trituré dans l'éther diéthylique anhydre puis évaporé sous pression réduite pour donner l'acide **73** (298 mg ; 783 μmol) analytiquement pur.

- ◆ **Aspect** : solide beige ◆ **Formule brute** : $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3$ ◆ **Masse molaire** : $380,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ◆ **Rendement** : Quantitatif
- ◆ **CCM** : (SiO_2 , UV 254 nm, acétate d'éthyle/cyclohexane, 50/50, v/v) : $R_f = 0,73$
- ◆ **Point de fusion** : 120-121 °C
- ◆ **IR** ν (cm^{-1}) : 3500-2500 (ν_{OH} , ν_{NH}) ; 2096 ($\nu_{\text{as N=N}}$) ; 1727 ($\nu_{\text{C=O}} \text{ acide}$) ; 1633 ($\nu_{\text{C=O}} \text{ amide}$) ; 1509 (δ_{NH}) ; 1251 ; 1197 ; 1171 ($\nu_{\text{s N=N}}$, $\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$)
- ◆ **RMN** ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ (ppm) : 7,80 (dd, 1H, $^3J = 7,8 \text{ Hz}$, $^4J = 1,5 \text{ Hz}$, H_{Ar}) ; 7,77 (d, 2H, $^3J = 8,6 \text{ Hz}$, H_{Ar}) ; 7,67 (se, 1H, H_{Ar}) ; 7,48-7,39 (m, 2H, H_{Ar}) ; 7,37 (dd, 1H, $^3J = 8,4 \text{ Hz}$, $^4J = 1,6 \text{ Hz}$, H_{Ar}) ; 4,78 (dd, 1H, $^3J = 9,3 \text{ Hz}$, $^3J = 5,1 \text{ Hz}$, CHCH_2Ar) ; 3,39 (dd, 1H, $^3J = 5,0 \text{ Hz}$, $^2J = 14,0 \text{ Hz}$, $\text{CHCH}'\text{Ar}$) ; 3,16-3,09 (m, 3H, $\text{CHCH}''\text{Ar}$, CH_2N_3) ; 2,11 (tt, 1H, $^3J_{\text{ax-ax}} = 12,2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{ax-eq}} = 3,4 \text{ Hz}$, CHCONHCH) ; 1,84-1,68 (m, 3H, $\text{CH}_2 \text{ cyclohexyle}$) ; 1,63-1,55 (m, 1H, $\text{CH}_2 \text{ cyclohexyle}$) ; 1,50-1,42 (m, 1H, CHCH_2N_3) ; 1,42-1,20 (m, 2H, $\text{CH}_2 \text{ cyclohexyle}$) ; 1,05-0,88 (m, 2H, $\text{CH}_2 \text{ cyclohexyle}$)
- ◆ **RMN** ^{13}C (CDCl_3 , 126 MHz) δ (ppm) : 178,56 (CO_2) ; 174,80 (CONH) ; 136,07 ; 134,93 ; 133,94 (C_{Ar}) ; 128,97 ; 128,94 ; 128,59 ; 128,53 ; 128,47 ; 127,07 ; 126,59 (CH_{Ar}) ; 58,72 (CH_2N_3) ; 54,55 (CHCH_2Ar) ; 45,80 (CHCONHCH) ; 38,68 (CHCH_2N_3) ; 38,62 (CHCH_2Ar) ; 30,64 ; 30,58 ; 29,98 ; 29,65 ($\text{CH}_2 \text{ cyclohexyle}$)
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 379,11 [M-H] $^-$ (valeur théorique : m/z 379,18)

Partie expérimentale

{[(2S)-6-[(2S)-2-[(1*r*,4*S*)-4-(azidométhyl)cyclohex-1-ylcarboxamido]-3-(naphthalén-2-yl)propanamido]-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl]carbamoyl}-(*L*)-glutamate de di-*tert*-butyle (**74**)

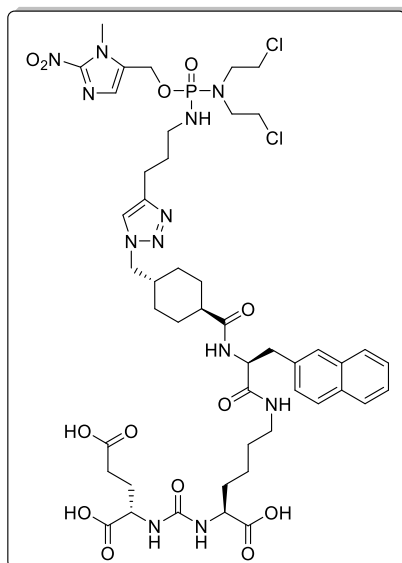


A une solution de l'amine **59** (343 mg ; 0,703 mmol ; 1,0 éq.) dans du DCM anhydre (20 mL) refroidie à 0 °C, sont ajoutés successivement de l'acide **73** (298 mg ; 0,783 mmol ; 1,1 éq.), de l'HOBt (96,6 mg ; 0,715 mmol ; 1,0 éq.), de l'HBTU (266 mg ; 0,701 mmol ; 1,0 éq.) puis goutte à goutte de la DIPEA (250 µL ; 1,43 mmol ; 2,0 éq.). Le mélange est agité à température ambiante durant 1 heure 30. La réaction est stoppée par addition d'eau (10 mL). Après décantation, la phase organique est lavée successivement par une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (20 mL) et une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (20 mL). La phase organique est séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30 puis 50/50, v/v) pour donner le triacyde **74** (334 mg ; 0,393 mmol).

- ◆ **Aspect** : solide blanc ◆ **Formule brute** : C₄₅H₆₇N₇O₉ ◆ **Masse molaire** : 850,07 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 56%
- ◆ **CCM** : (SiO₂, UV 254 nm, cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30, v/v) : R_f = 0,27
- ◆ **Point de fusion** : 71-72°C
- ◆ **RMN ¹H** (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 8,56 (se, 1H, CH₂NH) ; 7,98 (de, 1H, ³J = 6,3 Hz, NHCHCH₂Ar) ; 7,66 (d, 1H, ³J = 9,0 Hz, H_{Ar}) ; 7,65 (s, 1H, H_{Ar}) ; 7,54 (d, 1H, ³J = 8,2 Hz, H_{Ar}) ; 7,46 (t, 1H, ³J = 7,4 Hz, H_{Ar}) ; 7,38 (t, 1H, ³J = 7,5 Hz, H_{Ar}) ; 7,17-7,04 (m, 3H, 2H_{Ar}, NHCHCH₂CH₂CO) ; 6,17 (d, 1H, ³J = 8,7 Hz, NHCHCH₂CH₂CH₂) ; 5,24-5,18 (m, 1H, CHCH₂Ar) ; 4,69 (td, 1H, ³J = 9,1 Hz, ³J = 4,3 Hz, CHCH₂CH₂CO) ; 4,31 (td, 1H, ³J = 8,2 Hz, ³J = 5,4 Hz, CHCH₂CH₂CH₂) ; 3,54-3,45 (m, 1H, NHCH') ; 3,22 (dd, 1H, ²J = 13,6 Hz, ³J = 3,9 Hz, CHCH'Ar) ; 3,12-2,93 (m, 4H, NHCH'', CHCH''Ar, CH₂N₃) ; 2,51-2,35 (m, 2H, CH₂CO) ; 2,25-2,16 (m, 1H, CH'CH₂CO) ; 1,94-1,84 (m, 2H, CH''CH₂CO, CHCONHCH) ; 1,75-0,69 (m, 42H, CHCH₂CH₂CH₂, CHCH₂N₃, 4×CH₂_{cyclohexyle}, C(CH₃)₃)
- ◆ **RMN ¹³C** (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 177,11 ; 175,12 ; 174,48 ; 172,58 ; 172,53 (CO) ; 157,56 (NHCONH) ; 135,06 ; 133,37 ; 132,22 (C_{Ar}) ; 128,09 ; 127,97 ; 127,86 ; 127,31 ; 127,03 ; 126,00 ; 125,46 (CH_{Ar}) ; 82,58 ; 80,99 ; 80,45 (C(CH₃)₃) ; 57,66 (CH₂N₃) ; 54,68 (CHCH₂Ar) ; 53,23 (CHCH₂CH₂CH₂) ; 52,23 (CHCH₂CH₂CO) ; 44,24 (CHCONHCH) ; 40,30 (CONHCH₂) ; 39,59 (CHCH₂Ar) ; 37,22 (CHCH₂N₃) ; 31,68 (CH₂CO) ; 32,96 ; 29,91 ; 29,76 ; 29,48 ; 29,44 ; 29,15 ; 27,70 ; 23,56 (4×CH₂_{cyclohexyle}, CHCH₂CH₂CH₂, CHCH₂CH₂CO) ; 28,26 ; 28,20 ; 28,11 (9C, C(CH₃)₃)
- ◆ **MS** (ESI) : m/z 850,55 [M+H]⁺ (valeur théorique : m/z 850,51)
m/z 872,54 [M+Na]⁺ (valeur théorique : m/z 872,49)

Partie expérimentale

Acide [(((1S)-5-((2S)-2-((1*r*,4*S*)-4-({4-[3-({[bis(2-chloroéthyl)amino][[(1-*N'*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)méthoxy]phosphoryl)amino)propyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-*N*-yl)méthyl)cyclohex-1-ylcarboxamido]-3-(naphthalén-2-yl)propanamido}-1-carboxypentyl)carbamoyl)-(L)-glutamique (**67**)



Le tri-ester **74** (50,6 mg ; 74,2 μmol ; 1,0 éq.) est mis en solution dans du TFA (500 μL) à 0 °C. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est agité pendant 2 heures avant d'être évaporé sous pression réduite. Le résidu est co-évaporé avec du DCM (3 x 5 mL) puis de l'éther diéthylique anhydre (2 x 5 mL) pour donner le tri-acide **75** utilisé sans autre purification.

Ce dernier est mis en solution avec l'alcyne **68** (27,1 mg ; 63,6 μmol ; 0,8 éq.) dans un mélange *t*-BuOH/eau (50/50, v/v) (2 mL), puis sont ajoutées successivement, une solution 0,1 M d'acide ascorbique dans l'eau (60 μL ; 6,0 μmol ; 0,1 éq.) et une solution 0,1 M de sulfate de cuivre dans l'eau (60 μL ; 6,0 μmol ; 0,1 éq.). Après une heure d'agitation à température ambiante, une solution de catalyseur de Fokin, préparée à partir d'une solution 0,1 M de sulfate de cuivre dans l'eau (4 μL ; 4,0 μmol ; 0,06 éq.) et d'une solution 0,23 M de THPTA dans l'eau (8,5 μL ; 2,0 μmol ; 0,03 éq.) et une solution 0,1 M d'acide ascorbique dans l'eau (4 μL ; 4,0 μmol ; 0,06 éq.) sont ajoutées au milieu réactionnel. Après 1 heure d'agitation à température ambiante, une solution 0,1 M d'acide ascorbique dans l'eau (535 μL ; 53,5 μmol ; 0,8 éq.) et une solution 0,1 M de sulfate de cuivre dans l'eau (535 μL ; 53,5 μmol ; 0,8 éq.) sont une nouvelle fois ajoutées. Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, le milieu est filtré sur un filtre PTFE 0,45 μm . Le filtrat est évaporé sous pression réduite. L'huile marron obtenue est purifiée par chromatographie préparative sur phase inverse (éluant : gradient d'ACN dans l'eau + 0,1% TFA) pour conduire après lyophilisation au triazole **67** (26,9 mg ; 59,8 μmol).

- ◆ **Aspect** : lyophilisat blanc très hygroscopique
- ◆ **Masse molaire** : 1107,98 g.mol⁻¹
- ◆ **Rendement** : 37%
- ◆ **IR** ν (cm⁻¹) : 3500-2800 (ν_{NH} , ν_{OH}) ; 1720 ($\nu_{\text{C=O}}$ acide) ; 1633 ($\nu_{\text{C=O}}$ amide/urée) ; 1540 (δ_{NH}) ; 1191 ; 1129 ; 1010 ; 964 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$, $\nu_{\text{C-O}}$, $\nu_{\text{P-O}}$, $\nu_{\text{P-N}}$)
- ◆ **RMN** ¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm) : 7,83-7,74 (m, 4H, H_{Ar} naphthalène, H_{Ar} triazole) ; 7,67 (s, 1H, H_{Ar} naphthalène) ; 7,45-7,39 (m, 2H, H_{Ar} naphthalène) ; 7,37 (dd, 1H, ³J_{H-H} = 8,5 Hz, ⁴J_{H-H} = 1,6 Hz, H_{Ar} naphthalène) ; 7,23 (s, 1H, H_{Ar} imidazole) ; 5,11 (d, 2H, ³J_{H-P} = 7,3 Hz, CH₂O) ; 4,65 (dd, 1H, ³J_{H-H} = 8,6 Hz, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, CHCH₂Ar) ; 4,31 (dd, 1H, ³J_{H-H} = 8,6 Hz, ³J_{H-H} = 5,0 Hz, CHCH₂CH₂CO) ; 4,20 (d, 2H, ³J_{H-H} = 7,2 Hz,

Partie expérimentale

- $N_{Ar}CH_2$) ; 4,17 (dd, 1H, $^3J_{H-H} = 8,5$ Hz, $^3J_{H-H} = 4,8$ Hz, $CHCH_2CH_2CH_2$) ; 4,04 et 4,03 (2s, 3H, $N_{Ar}CH_3$) ; 3,70-3,59 (m, 4H, $N(CH_2CH_2Cl)_2$) ; 3,48-3,33 (m, 4H, $N(CH_2CH_2Cl)_2$) ; 3,23 (dd, 1H, $^2J_{H-H} = 13,7$ Hz, $^3J_{H-H} = 6,6$ Hz, $CHCH'Ar$) ; 3,18-3,08 (m, 2H, $CONHCH_2$) ; 3,06 (dd, 1H, $^2J_{H-H} = 13,7$ Hz, $^3J_{H-H} = 8,7$ Hz, $CHCH''Ar$) ; 2,91 (td, 2H, $^3J_{H-P} = 11,1$ Hz, $^3J_{H-H} = 7,1$ Hz, $PNHCH_2$) ; 2,75 (t, 2H, $^3J_{H-H} = 7,4$ Hz, CH_2CH_2Ar) ; 2,46-2,34 (m, 2H, CH_2CO) ; 2,21-2,09 (m, 2H, $CH'CH_2CO$, $CHCONHCH$) ; 1,92-1,77 (m, 5H, $N_{Ar}CH_2CH$, CH_2CH_2Ar , $CH''CH_2CO$, $CHCH'CH_2CH_2$) ; 1,72-1,47 (m, 5H, $2 \times CH_2$ cyclohexyle, $CHCH''CH_2CH_2$) ; 1,40-1,20 (m, 6H, CH_2 cyclohexyle, $CHCH_2CH_2CH_2CH_2$) ; 1,09-0,96 (m, 2H, CH_2 cyclohexyle)
- ◆ **RMN ^{13}C** (CD_3OD , 126 MHz) δ (ppm) : 178,53 ; 176,38 ; 175,98 ; 173,63 ($5C$, CO) ; 160,12 ($NHCONH$) ; 147,64 ($C_{Ar}NO_2 / C_{Ar}$ triazole) ; 135,95 ; 135,94 ; 134,89 ; 133,89 (C_{Ar}) ; 129,16 ; 129,03 ; 128,97 ; 128,64 ; 128,54 ; 128,49 ; 127,11 ; 126,64 (CH_{Ar}) ; 124,21 (CH_{Ar} triazole) ; 57,58 (d, $^2J_{C-P} = 4,5$ Hz, CH_2O) ; 57,25 ($N_{Ar}CH_2$) ; 55,94 ($NHCHCONH$) ; 53,88 ($CHCH_2CH_2CH_2$) ; 53,49 ($CHCH_2CH_2CO$) ; 50,20 ($2C$, $^2J_{C-P} = 4,6$ Hz, $N(CH_2CH_2Cl)_2$) ; 45,52 ($CHCONHCH$) ; 43,14 ($2C$, $N(CH_2CH_2Cl)_2$) ; 41,09 ($PNHCH_2$) ; 39,81 ($CONHCH_2$) ; 39,31 ($CHCH_2Ar$) ; 39,25 ($N_{Ar}CH_2CH$) ; 35,10 ($N_{Ar}CH_3$) ; 32,80 ($CHCH_2CH_2CH_2$) ; 32,27 (d, $^3J_{C-P} = 5,6$ Hz, CH_2CH_2Ar) ; 31,11 ; 30,46 ; 30,53 ; 29,94 ; 29,56 ; 29,42 ; 28,94 ; 23,57 ; 23,14 ($4 \times CH_2$ cyclohexyle, $CHCH_2CH_2CH_2$, $CHCH_2CH_2CO$, CH_2CH_2Ar)
 - ◆ **RMN ^{31}P** (CD_3OD , 202 MHz) δ (ppm) : 18,24
 - ◆ **HRMS** (ESI) : m/z 1107,3962 [$M+H$] $^+$ (valeur théorique : m/z 1107,3981)
 - ◆ **Conditions de purification** : détection : 220 nm et 323 nm ; durée de la séparation : 30 minutes ; éluant : $H_2O + 0,1\%$ TFA/ACN + 0,1% TFA (v/v) : 95/5 durant 3 minutes ; 95/5 \rightarrow 60/40 durant 7 minutes ; 60/40 durant 3 minutes ; 60/40 \rightarrow 20/80 durant 2 minutes ; 20/80 durant 7 minutes ; 20/80 \rightarrow 0/100 durant 1 minutes ; 0/100 durant 7 minutes ; temps de rétention : 20,3 minutes

II. Etude de stabilité et de clivage chimique des prodrogues par RMN ^{31}P

Les études de stabilité et de cinétique de clivage ont été réalisées à 37 °C sur un spectromètre Bruker DRX 500 (Bruker Biospin SAS, Wissembourg, France), après programmation d'une séquence d'acquisitions à intervalles de temps déterminés (toutes les 100, 250 et 550 secondes durant les 20, 60, 120 minutes puis à intervalles plus longs jusqu'à 24 heures). Les solutions à analyser sont placées dans un tube RMN muni d'un tube co-axial contenant une solution de TPPO à 5% dans le DMSO- d_6 (26 ppm) et la température du spectromètre est maintenue à 37 °C.

Les prodrogues (≈ 12 mg) sont solubilisées dans de l'ACN (≈ 65 μL), puis environ 350 μL de tampon cacodylate ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{As}_3\text{H}_2\text{O}$; 0,1 M, pH = 7,4) sont additionnés*** pour obtenir une solution à 29 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les acquisitions RMN ^{31}P sont alors réalisées sur 24 heures et à 37 °C pour les études de stabilité.

Pour les études de clivage, une acquisition RMN ^{31}P est réalisée à partir de cette solution pour obtenir le temps t_0 de la cinétique. Trois équivalents de dithionite de sodium sont alors ajoutés (solution à 195 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du tampon cacodylate, pH = 7,4) et la séquence d'acquisition de RMN ^{31}P est initiée.

Pour l'interprétation individuelle de chaque spectre, le logiciel Mnova a été utilisé et les concentrations relatives des différentes espèces ont été déterminées à partir des intégrales de leurs signaux respectifs, après avoir normalisé à 100 le pic de référence. Les courbes et les données de cinétiques ont été déterminées avec le logiciel GraphPad Prism en reportant les rapports d'intégrale au temps t à l'intégrale corrigée à t_0 de la prodrogue, en fonction du temps.

*** Pour le clivage des phosphorodiamidate *p*-nitrobenzyle, la proportion finale du mélange tampon/ACN est de 25/75 (v/v)

III. Etude du clivage enzymatique des prodrogues

Les études ont été réalisées avec une nitroréductase recombinante d'*Escherichia Coli* (90%) (Sigma Aldrich) en présence de dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADPH, forme réduite, sel tétrasodique, Sigma Aldrich).

Une solution à 17 μM de composés à tester est préparée à partir de 10 μL d'une solution mère (1,7 mM dans l'eau ultra pure⁺⁺⁺) et de 100 μL d'une solution de NADPH (9 mM dans l'eau ultra pure), complétée à 1000 μL avec du PBS (10 mM, pH 7,4, 37 °C). La réaction a été initiée par l'addition de 25 ou 15 μL d'E. coli nitroréductase (1,0 mg/mL dans le PBS) et incubée à 37 °C. Des aliquots sont prélevés à différents temps sur une période de 2 heures et analysés par CLHP.

Le pourcentage de prodrogue restante au cours du temps est évalué par le rapport des surfaces sous les courbes de la prodrogue à un temps donné sur celles obtenues avec la prodrogue en présence de NADPH mais en absence de l'enzyme.

Les modélisations et les données de cinétiques ont été déterminées avec le logiciel GraphPad Prism.

⁺⁺⁺ Pour les composé **66** et **ICF05017** la solution mère contient 30% de DMSO

IV. Etude de cytotoxicité des prodrogues

A. Culture des cellules tumorales

Les cellules de chondrosarcome humain H-EMC-SS (Human Extraskelatal Myxoid Chondrosarcoma) ont été obtenues de l'ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures). Elles ont été cultivées en flacon de culture T75 cm² (Nunc) dans 12 mL de milieu de culture DMEM/F12 (Invitrogen) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Dutscher) et 4 µg/mL de gentamicine (Invitrogen).

La lignée de cellules épithéliales dérivée d'un adénocarcinome prostatique humain LNCaP-Luc (Lymph Node Cancer Prostate) (PerkinElmer), sont transfectées par le gène de la luciférase. Elles sont cultivées en flacon de culture T75 cm² (Nunc) dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (Eurobio) et 4 µg/mL de gentamycine (PAN Biotech).

Les cellules de carcinome prostatique humain PC3-Luc (PerkinElmer), sont transfectées par le gène de la luciférase. Elles ont été cultivées en flacon de culture T75 cm² (Nunc) dans du milieu MEM (Invitrogen) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (Eurobio) et 2 µg/mL de puromycine (Invivogen).

B. Protocole de l'étude de cytotoxicité des prodrogues

Après décollement avec 2 mL de trypsine 1X et numération, les cellules PC3-Luc sontensemencées dans des plaques 96 puits (à raison de 20.10³ cellules pour la lignée H-EMC-SS et de 5.10³ cellules pour la lignée LNCaP-Luc et PC3-Luc) dans 150 µL de milieu de culture complet. Afin que les cellules adhèrent au support, les plaques sont incubées 24 heures dans une étuve à 37 °C (21% O₂ ; 5% CO₂).

Des concentrations croissantes de prodrogue diluée dans le DMSO (en maintenant la concentration finale en DMSO à 0,5% (v/v)) ont été ajoutées. Après incubation des plaques durant 24 heures dans des conditions normoxiques (21% O₂ ; 5% CO₂, 37 °C) ou hypoxiques (N₂, O₂ < 0,3%, 37 °C), le milieu de culture a été enlevé et les cellules rincées avec 200 µl de PBS 1X. Deux cents microlitre de milieu de culture a ensuite été ajouté et les cellules laissées incuber durant 48 heures en condition normoxique. La viabilité cellulaire a été quantifiée grâce au test à la résazurine (AlamarBlue®). L'activité cytotoxique est quantifiée par la CI₅₀, c'est-à-dire la concentration de prodrogue nécessaire pour inhiber la croissance cellulaire à hauteur de 50% (CI₅₀). Elle a été déterminée grâce au logiciel GraphPad Prism

V. Protocole de l'étude de compétition des prodrogues pour l'antigène PSMA

Les cellules LnCap-Luc (Perkin Elmer) sontensemencées à raison de 150 000 cellules par puits en plaque 24 puits et cultivées pendant 48 heures jusqu'à confluence.

Le ligand **[¹²⁵I]-ICF01305** est préparé à une concentration de 0,45 nM selon l'activité spécifique donnée. Les ligands froids **66** et **PMPA** (AX6113, Interchim) sont dilués successivement dans le DMSO stérile puis dans le tampon (RPMI1640 Glutamax, 0,5% BSA) afin d'avoir une concentration finale dans le puits de 10 µM, 1 µM, 0,1 µM, 0,01 µM et 0,001 µM (avec une concentration maximale de DMSO n'excédant pas 0,5%).

Le milieu de culture est retiré et le tapis cellulaire est rincé avec 300 µL de tampon (RPMI1640 Glutamax, 0,5% BSA). Les deux ligands (**[¹²⁵I]ICF01305** + ligand froid) sont mélangés dans 300 µL de tampon puis incubés sur les cellules 1 heure à 37 °C (21% O₂ ; 5% CO₂). Après incubation, le surnageant est retiré et le tapis cellulaire est rincé avec 300 µL de tampon.

Les cellules sont lysées dans 300 µL de tampon RIPA (50 mM Tris pH = 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% deoxycholate de sodium, 0,1% SDS) et le puits est rincé avec 1 mL de PBS.

Les échantillons sont ensuite comptés au Gamma Counter (Perkin Elmer).

La quantité de radioactivité retrouvée dans les cellules incubées avec le ligand **[¹²⁵I]ICF01305** et le ligand froid d'intérêt aux différentes concentrations est normalisée par rapport à la quantité de radioactivité retrouvée dans les cellules incubée avec le ligand **[¹²⁵I]ICF01305** seul. L'affinité du ligand d'intérêt est exprimée comme la concentration de ligand nécessaire pour déplacer le ligand chaud de 50% de l'antigène PSMA. Elle a été déterminée grâce au logiciel de calcul XLSTAT.

Partie expérimentale

Références bibliographiques

- (1) Biermann, J. S.; Chow, W.; Reed, D. R.; Lucas, D.; Adkins, D. R.; Agulnik, M.; Benjamin, R. S.; Brigman, B.; Budd, G. T.; Curry, W. T.; et al. NCCN Guidelines Insights: Bone Cancer, Version 2.2017. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **2017**, *15* (2), 155–167. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0017>.
- (2) Brown, H. K.; Schiavone, K.; Gouin, F.; Heymann, M.-F.; Heymann, D. Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments. *Calcif. Tissue Int.* **2017**. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0372-2>.
- (3) The ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Bone Sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2014**, *25* (suppl 3), iii113–iii123. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu256>.
- (4) Stevenson, J. D.; Laitinen, M. K.; Parry, M. C.; Sumathi, V.; Grimer, R. J.; Jeys, L. M. The Role of Surgical Margins in Chondrosarcoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.05.033>.
- (5) Onishi, A. C.; Hincker, A. M.; Lee, F. Y. Surmounting Chemotherapy and Radioresistance in Chondrosarcoma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Sarcoma* **2011**, *2011*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2011/381564>.
- (6) Fiorenza, F.; Abudu, A.; Grimer, R. J.; Carter, S. R.; Tillman, R. M.; Ayoub, K.; Mangham, D. C.; Davies, A. M. Risk Factors for Survival and Local Control in Chondrosarcoma of Bone. *Bone Jt. J.* **2002**, *84* (1), 93–99.
- (7) Kim, M.-J.; Cho, K.-J.; Ayala, A. G.; Ro, J. Y. Chondrosarcoma: With Updates on Molecular Genetics. *Sarcoma* **2011**, *2011*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2011/405437>.
- (8) Angelini, A.; Guerra, G.; Mavrogenis, A. F.; Pala, E.; Picci, P.; Ruggieri, P. Clinical Outcome of Central Conventional Chondrosarcoma: Central Conventional Chondrosarcoma. *J. Surg. Oncol.* **2012**, *106* (8), 929–937. <https://doi.org/10.1002/jso.23173>.
- (9) Bovée, J. V. M. G.; Hogendoorn, P. C. W.; Wunder, J. S.; Alman, B. A. Cartilage Tumours and Bone Development: Molecular Pathology and Possible Therapeutic Targets. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10* (7), 481–488. <https://doi.org/10.1038/nrc2869>.
- (10) Italiano, A.; Mir, O.; Cioffi, A.; Palmerini, E.; Piperno-Neumann, S.; Perrin, C.; Chaigneau, L.; Penel, N.; Duffaud, F.; Kurtz, J. E.; et al. Advanced Chondrosarcomas: Role of Chemotherapy and Survival. *Ann. Oncol.* **2013**, *24* (11), 2916–2922. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt374>.
- (11) Malchenko, S.; Seftor, E. A.; Nikolsky, Y.; Hasegawa, S. L.; Kuo, S.; Stevens, J. W.; Poyarkov, S.; Nikolskaya, T.; Kucaba, T.; Wang, M.; et al. Putative Multifunctional Signature of Lung Metastases in Dedifferentiated Chondrosarcoma. *Sarcoma* **2012**, *2012*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/820254>.
- (12) Gelderblom, H.; Hogendoorn, P. C. W.; Dijkstra, S. D.; van Rijswijk, C. S.; Krol, A. D.; Taminiau, A. H. M.; Bovee, J. V. M. G. The Clinical Approach Towards Chondrosarcoma. *The Oncologist* **2008**, *13* (3), 320–329. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2007-0237>.
- (13) Xu, J.; Li, D.; Xie, L.; Tang, S.; Guo, W. Mesenchymal Chondrosarcoma of Bone and Soft Tissue: A Systematic Review of 107 Patients in the Past 20 Years. *PLOS ONE* **2015**, *10* (4), e0122216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122216>.
- (14) Schneiderman, B. A.; Kliethermes, S. A.; Nystrom, L. M. Survival in Mesenchymal Chondrosarcoma Varies Based on Age and Tumor Location: A Survival Analysis of the SEER

Références bibliographiques

- Database. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2017**, 475 (3), 799–805. <https://doi.org/10.1007/s11999-016-4779-2>.
- (15) Bagley, L.; Kneeland, J. B.; Dalinka, Murray K.; Bullough, P.; Brooks, J. Unusual Behavior of Clear Cell Chondrosarcoma. *Skeletal Radiol.* **1993**, 22 (4). <https://doi.org/10.1007/BF00197674>.
- (16) Cleven, A. H. G.; Zwartkruis, E.; Hogendoorn, P. C. W.; Kroon, H. M.; Briaire-de Bruijn, I.; Bovée, J. V. M. G. Periosteal Chondrosarcoma: A Histopathological and Molecular Analysis of a Rare Chondrosarcoma Subtype. *Histopathology* **2015**, 67 (4), 483–490. <https://doi.org/10.1111/his.12666>.
- (17) Papagelopoulos, P. J.; Galanis, E. C.; Mavrogenis, A. F.; Savvidou, O. D.; Bond, J. R.; Unni, K. K.; Sim, F. H. Survivorship Analysis in Patients with Periosteal Chondrosarcoma: *Clin. Orthop.* **2006**, 448, 199–207. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000194684.40624.a8>.
- (18) Evans, H. L.; Ayala, A. G.; Romsdahl, M. M. Prognostic Factors in Chondrosarcoma of Bone. A Clinicopathologic Analysis with Emphasis on Histologic Grading. *Cancer* **1977**, 40 (2), 818–831. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197708\)40:2<818::AID-CNCR2820400234>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197708)40:2<818::AID-CNCR2820400234>3.0.CO;2-B).
- (19) Rozeman, L. B.; Cleton-Jansen, A. M.; Hogendoorn, P. C. W. Pathology of Primary Malignant Bone and Cartilage Tumours. *Int. Orthop.* **2006**, 30 (6), 437–444. <https://doi.org/10.1007/s00264-006-0212-x>.
- (20) Rozeman, L. B.; Sangiorgi, L.; Bruijn, I. H. B.; Mainil-Varlet, P.; Bertoni, F.; Cleton-Jansen, A. M.; Hogendoorn, P. C. W.; Bovée, J. V. M. G. Enchondromatosis (Ollier Disease, Maffucci Syndrome) Is Not Caused by the PTHR1 Mutation p.R150C: NO PTHR1 MUTATION IN ENCHONDROMATOSIS. *Hum. Mutat.* **2004**, 24 (6), 466–473. <https://doi.org/10.1002/humu.20095>.
- (21) Cho, H. S.; Han, I.; Kim, H.-S. Secondary Chondrosarcoma from an Osteochondroma of the Proximal Tibia Involving the Fibula. *Clin. Orthop. Surg.* **2017**, 9 (2), 249. <https://doi.org/10.4055/cios.2017.9.2.249>.
- (22) Maione, V.; Stinco, G.; Errichetti, E. Multiple Enchondromas and Skin Angiomas: Maffucci Syndrome. *The Lancet* **2016**, 388 (10047), 905. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00088-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00088-X).
- (23) Chen, C.; Zhou, H.; Wei, F.; Jiang, L.; Liu, X.; Liu, Z.; Ma, Q. Increased Levels of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Are Associated with Bcl-XL Expression, Tumor Apoptosis, and Clinical Outcome in Chondrosarcoma. *J. Orthop. Res.* **2011**, 29 (1), 143–151. <https://doi.org/10.1002/jor.21193>.
- (24) Aigner, T.; Müller, S.; Neureiter, D.; Illstrup, D. M.; Kirchner, T.; Björnsson, J. Prognostic Relevance of Cell Biologic and Biochemical Features in Conventional Chondrosarcomas: Prognostic Parameters in Chondrosarcomas. *Cancer* **2002**, 94 (8), 2273–2281. <https://doi.org/10.1002/cncr.10461>.
- (25) Gao, Y.; Liu, S.; Huang, J.; Guo, W.; Chen, J.; Zhang, L.; Zhao, B.; Peng, J.; Wang, A.; Wang, Y.; et al. The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes. *BioMed Res. Int.* **2014**, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/648459>.
- (26) Praillet, C.; Grimaud, J.; Lortat-Jacob, H. Les protéoglycanes. (I) Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques? *médecine/sciences* **1998**, 14 (4), 412. <https://doi.org/10.4267/10608/1056>.

Références bibliographiques

- (27) Iozzo, R. V.; Schaefer, L. Proteoglycan Form and Function: A Comprehensive Nomenclature of Proteoglycans. *Matrix Biol.* **2015**, *42*, 11–55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003>.
- (28) Yanagishita, M. Function of Proteoglycans in the Extracellular Matrix. *Pathol. Int.* **1993**, *43* (6), 283–293. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1993.tb02569.x>.
- (29) Wight, T. N.; Kinsella, M. G.; Qwarnström, E. E. The Role of Proteoglycans in Cell Adhesion, Migration and Proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1992**, *4* (5), 793–801. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(92\)90102-I](https://doi.org/10.1016/0955-0674(92)90102-I).
- (30) Kim, S.-H.; Turnbull, J.; Guimond, S. Extracellular Matrix and Cell Signalling: The Dynamic Cooperation of Integrin, Proteoglycan and Growth Factor Receptor. *J. Endocrinol.* **2011**, *209* (2), 139–151. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0377>.
- (31) Mulloy, B.; Rider, C. C. Cytokines and Proteoglycans: An Introductory Overview. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34* (3), 409–413. <https://doi.org/10.1042/BST0340409>.
- (32) Willems, S. M.; Wiweger, M.; van Roggen, J. F. G.; Hogendoorn, P. C. W. Running GAGs: Myxoid Matrix in Tumor Pathology Revisited: What's in It for the Pathologist? *Virchows Arch.* **2010**, *456* (2), 181–192. <https://doi.org/10.1007/s00428-009-0822-y>.
- (33) Fox, A. J. S.; Bedi, A.; Rodeo, S. A. The Basic Science of Human Knee Menisci: Structure, Composition, and Function. *Sports Health Multidiscip. Approach* **2012**, *4* (4), 340–351. <https://doi.org/10.1177/1941738111429419>.
- (34) Jerosch, J. Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids. *Int. J. Rheumatol.* **2011**, *2011*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2011/969012>.
- (35) Nimer, E.; Schneiderman, R.; Maroudas, A. Diffusion and Partition of Solutes in Cartilage under Static Load. *Biophys. Chem.* **2003**, *106* (2), 125–146. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(03\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(03)00157-1).
- (36) McKeown, S. R. Defining Normoxia, Physoxia and Hypoxia in Tumours—Implications for Treatment Response. *Br. J. Radiol.* **2014**, *87* (1035), 20130676. <https://doi.org/10.1259/bjr.20130676>.
- (37) Horsman, M. R.; Mortensen, L. S.; Petersen, J. B.; Busk, M.; Overgaard, J. Imaging Hypoxia to Improve Radiotherapy Outcome. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2012**, *9* (12), 674–687. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.171>.
- (38) Yeom, C.; Goto, Y.; Zhu, Y.; Hiraoka, M.; Harada, H. Microenvironments and Cellular Characteristics in the Micro Tumor Cords of Malignant Solid Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13* (12), 13949–13965. <https://doi.org/10.3390/ijms131113949>.
- (39) Muz, B.; de la Puente, P.; Azab, F.; Azab, A. K. The Role of Hypoxia in Cancer Progression, Angiogenesis, Metastasis, and Resistance to Therapy. *Hypoxia* **2015**, *83*. <https://doi.org/10.2147/HP.S93413>.
- (40) Soni, S.; Padwad, Y. S. HIF-1 in Cancer Therapy: Two Decade Long Story of a Transcription Factor. *Acta Oncol.* **2017**, *56* (4), 503–515. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1301680>.
- (41) Liu, W.; Shen, S.-M.; Zhao, X.-Y.; Chen, G.-Q. Targeted Genes and Interacting Proteins of Hypoxia Inducible Factor-1. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **2012**, *3* (2), 165–178.
- (42) Razungles, J.; Cavaillès, V.; Jalaguier, S.; Teyssier, C. L'effet Warburg: De La Théorie Du Cancer Aux Applications Thérapeutiques En Cancérologie. *médecine/sciences* **2013**, *29* (11), 1026–1033. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132911020>.

Références bibliographiques

- (43) Wigerup, C.; Pålman, S.; Bexell, D. Therapeutic Targeting of Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Cancer. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *164*, 152–169. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.009>.
- (44) Boeuf, S.; Bovée, J. V. M. G.; Lehner, B.; Hogendoorn, P. C. W.; Richter, W. Correlation of Hypoxic Signalling to Histological Grade and Outcome in Cartilage Tumours. *Histopathology* **2010**, *56* (5), 641–651. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03528.x>.
- (45) Kubo, T.; Sugita, T.; Shimose, S.; Matsuo, T.; Arihiro, K.; Ochi, M. Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Its Relationship to Tumour Angiogenesis and Cell Proliferation in Cartilage Tumours. *J. Bone Joint Surg. Br.* **2008**, *90-B* (3), 364–370. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.90B3.19806>.
- (46) Li, Y.; Zhang, W.; Li, S.; Tu, C. Prognosis Value of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression in Patients with Bone and Soft Tissue Sarcoma: A Meta-Analysis. *SpringerPlus* **2016**, *5* (1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3064-x>.
- (47) Parlier-Cuau, C.; Bousson, V.; Ogilvie, C. M.; Lackman, R. D.; Laredo, J.-D. When Should We Biopsy a Solitary Central Cartilaginous Tumor of Long Bones? Literature Review and Management Proposal. *Eur. J. Radiol.* **2011**, *77* (1), 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2010.06.051>.
- (48) Douis, H.; Saifuddin, A. The Imaging of Cartilaginous Bone Tumours. II. Chondrosarcoma. *Skeletal Radiol.* **2013**, *42* (5), 611–626. <https://doi.org/10.1007/s00256-012-1521-3>.
- (49) Terek, R. M.; Schwartz, G. K.; Devaney, K.; Glantz, L.; Mak, S.; Healey, J. H.; Albino, A. P. Chemotherapy and P-Glycoprotein Expression in Chondrosarcoma. *J. Orthop. Res.* **1998**, *16* (5), 585–590. <https://doi.org/10.1002/jor.1100160510>.
- (50) Mitchell, A. D.; Ayoub, K.; Mangham, D. C.; Grimer, R. J.; Carter, S. R.; Tillman, R. M. Experience in the Treatment of Dedifferentiated Chondrosarcoma. *J. BONE Jt. Surg.* **2000**, *82* (1), 7.
- (51) Grimer, R. J.; Gosheger, G.; Taminiau, A.; Biau, D.; Matejovsky, Z.; Kollender, Y.; San-Julian, M.; Gherlinzoni, F.; Ferrari, C. Dedifferentiated Chondrosarcoma: Prognostic Factors and Outcome from a European Group. *Eur. J. Cancer* **2007**, *43* (14), 2060–2065. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.06.016>.
- (52) Cesari, M.; Bertoni, F.; Bacchini, P.; Mercuri, M.; Palmerini, E.; Ferrari, S. Mesenchymal Chondrosarcoma. An Analysis of Patients Treated at a Single Institution. *Tumori J.* **2007**, *93* (5), 423–427. <https://doi.org/10.1177/030089160709300503>.
- (53) Schaap, F. G.; French, P. J.; Bovée, J. V. M. G. Mutations in the Isocitrate Dehydrogenase Genes IDH1 and IDH2 in Tumors: *Adv. Anat. Pathol.* **2013**, *20* (1), 32–38. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e31827b654d>.
- (54) Amary, M. F.; Damato, S.; Halai, D.; Eskandarpour, M.; Berisha, F.; Bonar, F.; McCarthy, S.; Fantin, V. R.; Straley, K. S.; Lobo, S.; et al. Ollier Disease and Maffucci Syndrome Are Caused by Somatic Mosaic Mutations of IDH1 and IDH2. *Nat. Genet.* **2011**, *43* (12), 1262–1265. <https://doi.org/10.1038/ng.994>.
- (55) Pansuriya, T. C.; van Eijk, R.; d’Adamo, P.; van Ruler, M. A. J. H.; Kuijjer, M. L.; Oosting, J.; Cleton-Jansen, A.-M.; van Oosterwijk, J. G.; Verbeke, S. L. J.; Meijer, D.; et al. Somatic Mosaic IDH1 and IDH2 Mutations Are Associated with Enchondroma and Spindle Cell Hemangioma in Ollier Disease and Maffucci Syndrome. *Nat. Genet.* **2011**, *43* (12), 1256–1261. <https://doi.org/10.1038/ng.1004>.

Références bibliographiques

- (56) Waitkus, M. S.; Diplas, B. H.; Yan, H. Biological Role and Therapeutic Potential of IDH Mutations in Cancer. *Cancer Cell* **2018**, *34* (2), 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.04.011>.
- (57) Suijker, J.; Oosting, J.; Koornneef, A.; Struys, E. A.; Salomons, G. S.; Schaap, F. G.; Waaijer, C. J. F.; Wijers-Koster, P. M.; Bruijn, I. H. B.; Haazen, L.; et al. Inhibition of Mutant IDH1 Decreases D-2-HG Levels without Affecting Tumorigenic Properties of Chondrosarcoma Cell Lines. *Oncotarget* **2015**, *6* (14). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3723>.
- (58) Li, L.; Paz, A. C.; Wilky, B. A.; Johnson, B.; Galoian, K.; Rosenberg, A.; Hu, G.; Tinoco, G.; Bodamer, O.; Trent, J. C. Treatment with a Small Molecule Mutant IDH1 Inhibitor Suppresses Tumorigenic Activity and Decreases Production of the Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate in Human Chondrosarcoma Cells. *PLOS ONE* **2015**, *10* (9), e0133813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133813>.
- (59) Tiet, T. D.; Hopyan, S.; Nadesan, P.; Gokgoz, N.; Poon, R.; Lin, A. C.; Yan, T.; Andrulis, I. L.; Alman, B. A.; Wunder, J. S. Constitutive Hedgehog Signaling in Chondrosarcoma Up-Regulates Tumor Cell Proliferation. *Am. J. Pathol.* **2006**, *168* (1), 321–330. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050001>.
- (60) Campbell, V. T.; Nadesan, P.; Ali, S. A.; Wang, C. Y. Y.; Whetstone, H.; Poon, R.; Wei, Q.; Keilty, J.; Proctor, J.; Wang, L. W.; et al. Hedgehog Pathway Inhibition in Chondrosarcoma Using the Smoothened Inhibitor IPI-926 Directly Inhibits Sarcoma Cell Growth. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13* (5), 1259–1269. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0731>.
- (61) Lee, H. Phosphorylated MTOR Expression Profiles in Human Normal and Carcinoma Tissues. *Dis. Markers* **2017**, *2017*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/1397063>.
- (62) Zhang, Y.-X.; van Oosterwijk, J. G.; Sicinska, E.; Moss, S.; Remillard, S. P.; van Wezel, T.; Buhemann, C.; Hassan, A. B.; Demetri, G. D.; Bovee, J. V. M. G.; et al. Functional Profiling of Receptor Tyrosine Kinases and Downstream Signaling in Human Chondrosarcomas Identifies Pathways for Rational Targeted Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19* (14), 3796–3807. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3647>.
- (63) Perez, J.; Decouvelaere, A. V.; Pointecouteau, T.; Pissaloux, D.; Michot, J. P.; Besse, A.; Blay, J. Y.; Dutour, A. Inhibition of Chondrosarcoma Growth by MTOR Inhibitor in an In Vivo Syngeneic Rat Model. *PLoS ONE* **2012**, *7* (6), e32458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032458>.
- (64) Thornton, K. A.; Chen, A. R.; Trucco, M. M.; Shah, P.; Wilky, B. A.; Gul, N.; Carrera-Haro, M. A.; Ferreira, M. F.; Shafique, U.; Powell, J. D.; et al. A Dose-Finding Study of Temsirolimus and Liposomal Doxorubicin for Patients with Recurrent and Refractory Bone and Soft Tissue Sarcoma: High-Risk Bone and Soft Tissue Sarcoma. *Int. J. Cancer* **2013**, *133* (4), 997–1005. <https://doi.org/10.1002/ijc.28083>.
- (65) Tzeng, H.-E.; Chen, P.-C.; Lin, K.-W.; Lin, C.-Y.; Tsai, C.-H.; Han, S.-M.; Teng, C.-L.; Hwang, W.-L.; Wang, S.-W.; Tang, C.-H. Basic Fibroblast Growth Factor Induces VEGF Expression in Chondrosarcoma Cells and Subsequently Promotes Endothelial Progenitor Cell-Primed Angiogenesis. *Clin. Sci.* **2015**, *129* (2), 147–158. <https://doi.org/10.1042/CS20140390>.
- (66) van Oosterwijk, J. G.; van Ruler, M. A. J. H.; Briaire-de Bruijn, I. H.; Herpers, B.; Gelderblom, H.; van de Water, B.; Bovée, J. V. M. G. Src Kinases in Chondrosarcoma Chemoresistance and Migration: Dasatinib Sensitises to Doxorubicin in TP53 Mutant Cells. *Br. J. Cancer* **2013**, *109* (5), 1214–1222. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.451>.

Références bibliographiques

- (67) Sulzbacher, I.; Birner, P.; Trieb, K.; Mühlbauer, M.; Lang, S.; Chott, A. Platelet-Derived Growth Factor-Alpha Receptor Expression Supports the Growth of Conventional Chondrosarcoma and Is Associated with Adverse Outcome. *Am. J. Surg. Pathol.* **2001**, *25* (12), 1520–1527.
- (68) Grignani, G.; Palmerini, E.; Stacchiotti, S.; Boglione, A.; Ferraresi, V.; Frustaci, S.; Comandone, A.; Casali, P. G.; Ferrari, S.; Aglietta, M. A Phase 2 Trial of Imatinib Mesylate in Patients with Recurrent Nonresectable Chondrosarcomas Expressing Platelet-Derived Growth Factor Receptor- α or - β : An Italian Sarcoma Group Study. *Cancer* **2011**, *117* (4), 826–831. <https://doi.org/10.1002/cncr.25632>.
- (69) Jones, R. L.; Katz, D.; Loggers, E. T.; Davidson, D.; Rodler, E. T.; Pollack, S. M. Clinical Benefit of Antiangiogenic Therapy in Advanced and Metastatic Chondrosarcoma. *Med. Oncol.* **2017**, *34* (10). <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1030-2>.
- (70) Torabi, A.; Amaya, C. N.; Wians, F. H.; Bryan, B. A. PD-1 and PD-L1 Expression in Bone and Soft Tissue Sarcomas. *Pathology (Phila.)* **2017**, *49* (5), 506–513. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.05.003>.
- (71) Kostine, M.; Cleven, A. H.; de Miranda, N. F. C. C.; Italiano, A.; Cleton-Jansen, A.-M.; Bovée, J. V. M. G. Analysis of PD-L1, T-Cell Infiltrate and HLA Expression in Chondrosarcoma Indicates Potential for Response to Immunotherapy Specifically in the Dedifferentiated Subtype. *Mod. Pathol.* **2016**, *29* (9), 1028–1037. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.108>.
- (72) Tawbi, H. A.-H.; Burgess, M. A.; Crowley, J.; Van Tine, B. A.; Hu, J.; Schuetze, S.; D'Angelo, S. P.; Attia, S.; Priebe, D. A.; Okuno, S. H.; et al. Safety and Efficacy of PD-1 Blockade Using Pembrolizumab in Patients with Advanced Soft Tissue (STS) and Bone Sarcomas (BS): Results of SARC028—A Multicenter Phase II Study. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34* (15_suppl), 11006–11006. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.11006.
- (73) Sakimura, R.; Tanaka, K.; Yamamoto, S.; Matsunobu, T.; Li, X.; Hanada, M.; Okada, T.; Nakamura, T.; Li, Y.; Iwamoto, Y. The Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on the Induction of Differentiation in Chondrosarcoma Cells. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (1), 275–282. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1696>.
- (74) Singh, Y.; Palombo, M.; Sinko, P. J. Recent Trends in Targeted Anticancer Prodrug and Conjugate Design. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15* (18), 1802–1826.
- (75) Guise, C. P.; Mowday, A. M.; Ashoorzadeh, A.; Yuan, R.; Lin, W.-H.; Wu, D.-H.; Smaill, J. B.; Patterson, A. V.; Ding, K. Bioreductive Prodrugs as Cancer Therapeutics: Targeting Tumor Hypoxia. *Chin. J. Cancer* **2014**, *33* (2), 80–86. <https://doi.org/10.5732/cjc.012.10285>.
- (76) Mahato, R.; Tai, W.; Cheng, K. Prodrugs for Improving Tumor Targetability and Efficiency. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (8), 659–670. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.002>.
- (77) Kerns, E. Pharmaceutical Profiling in Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (7), 316–323. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02649-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02649-7).
- (78) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs: Design and Clinical Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (3), 255–270. <https://doi.org/10.1038/nrd2468>.
- (79) Albert, A. Chemical Aspects of Selective Toxicity. *Nature* **1958**, *182* (4633), 421–423. <https://doi.org/10.1038/182421a0>.
- (80) Albert, A. *Selective Toxicity: The Physico-Chemical Basis of Therapy*; Springer Science & Business Media, **2012**.
- (81) Stella, V.; Borchardt, R.; Hageman, M.; Oliyai, R.; Maag, H.; Tilley, J. *Prodrugs: Challenges and Rewards*; Springer Science & Business Media, **2007**.

Références bibliographiques

- (82) Estramustine sodium phosphate E0407
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e0407> (accessed Jun 24, **2018**).
- (83) Heimbach, T.; Oh, D.-M.; Li, L. Y.; Rodríguez-Hornedo, N.; Garcia, G.; Fleisher, D. Enzyme-Mediated Precipitation of Parent Drugs from Their Phosphate Prodrugs. *Int. J. Pharm.* **2003**, *261* (1–2), 81–92. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00287-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00287-4).
- (84) Takahashi, T.; Tsukamoto, H.; Yamada, H. Design and Synthesis of a Water-Soluble Taxol Analogue : Taxol-Sialyl Conjugate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (1), 113–116. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(97\)10189-5](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(97)10189-5).
- (85) Konno, T.; Watanabe, J.; Ishihara, K. Enhanced Solubility of Paclitaxel Using Water-Soluble and Biocompatible 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine Polymers. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *65* (2), 209–214.
- (86) Shen, J.; Zhang, D.; Zhao, Z.; Jia, L.; Zheng, D.; Liu, G.; Hao, L.; Zhang, Q.; Tian, X.; Li, C.; et al. Synthesis, Characterization, in Vitro and in Vivo Evaluation of PEGylated Oridonin Conjugates. *Int. J. Pharm.* **2013**, *456* (1), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.014>.
- (87) Ding, C.; Zhang, Y.; Chen, H.; Yang, Z.; Wild, C.; Chu, L.; Liu, H.; Shen, Q.; Zhou, J. Novel Nitrogen-Enriched Oridonin Analogues with Thiazole-Fused A-Ring: Protecting Group-Free Synthesis, Enhanced Anticancer Profile, and Improved Aqueous Solubility. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (12), 5048–5058. <https://doi.org/10.1021/jm400367n>.
- (88) VIDAL - Irinotécan <https://www.vidal.fr/substances/12311/irinotecan/> (accessed Apr 29, **2018**).
- (89) Culine, S.; Drouet, L.; Eymard, J.-C.; Fizazi, K.; Gravis, G.; Hennequin, C.; Oudard, S.; Ravery, V.; Zerbib, M. Le point sur l'utilisation d'estramustine dans le cancer de la prostate métastatique. *Prog. En Urol.* **2010**, *20* (1), 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2009.08.039>.
- (90) VIDAL - Paclitaxel <https://www.vidal.fr/substances/4403/paclitaxel/> (accessed Jul 18, **2018**).
- (91) Zhou, G.-B.; Kang, H.; Wang, L.; Gao, L.; Liu, P.; Xie, J.; Zhang, F.-X.; Weng, X.-Q.; Shen, Z.-X.; Chen, J. Oridonin, a Diterpenoid Extracted from Medicinal Herbs, Targets AML1-ETO Fusion Protein and Shows Potent Antitumor Activity with Low Adverse Effects on t (8; 21) Leukemia in Vitro and in Vivo. *Blood* **2007**, *109* (8), 3441–3450.
- (92) Khadka, P.; Ro, J.; Kim, H.; Kim, I.; Kim, J. T.; Kim, H.; Cho, J. M.; Yun, G.; Lee, J. Pharmaceutical Particle Technologies: An Approach to Improve Drug Solubility, Dissolution and Bioavailability. *Asian J. Pharm. Sci.* **2014**, *9* (6), 304–316. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.05.005>.
- (93) VIDAL - ZOVIRAX 200 mg cp - Pharmacocinétique <https://www.vidal.fr/Medicament/zovirax-18172-pharmacocinetique.htm> (accessed Apr 30, **2018**).
- (94) EBILFUMIN 75 mg gél - VIDAL eVIDAL https://evidal-vidal-fr/medicament/ebilfumin_75_mg_gel-144151-pharmacocinetique.html (accessed Sep 27, **2018**).
- (95) ALTEIS 20 mg cp pellic - VIDAL eVIDAL https://evidal-vidal-fr/medicament/alteis_20_mg_cp_pellic-20982-pharmacocinetique.html (accessed Sep 27, **2018**).
- (96) Eisert, W. G.; Huel, N.; Stangier, J.; Wienen, W.; Clemens, A.; van Ryn, J. Dabigatran: An Oral Novel Potent Reversible Nonpeptide Inhibitor of Thrombin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30* (10), 1885–1889. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.203604>.

Références bibliographiques

- (97) Blech, S.; Ebner, T.; Ludwig-Schwellinger, E.; Stangier, J.; Roth, W. The Metabolism and Disposition of the Oral Direct Thrombin Inhibitor, Dabigatran, in Humans. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36* (2), 386–399. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.019083>.
- (98) VIDAL - VIREAD 123 mg cp pellic - Pharmacocinétique <https://www.vidal.fr/Medicament/viread-124179-pharmacocinetique.htm> (accessed Apr 30, **2018**).
- (99) Ruane, P. J.; DeJesus, E.; Berger, D.; Markowitz, M.; Bredeek, U. F.; Callebaut, C.; Zhong, L.; Ramanathan, S.; S. Rhee, M.; Fordyce, M. W.; et al. Antiviral Activity, Safety, and Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Tenofovir Alafenamide as 10-Day Monotherapy in HIV-1-Positive Adults: *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2013**, *63* (4), 449–455. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3182965d45>.
- (100) Sitar, D. S. Clinical Pharmacokinetics of Bambuterol. *Clin. Pharmacokinet.* **1996**, *31* (4), 246–256.
- (101) Persson, G.; Pahlm, O.; gnospelius, Y. Oral Bambuterol versus Terbutaline in Patients with Asthma. *Curr. Ther. Res.* **1995**, *56* (5), 457–465. [https://doi.org/10.1016/0011-393X\(95\)85078-3](https://doi.org/10.1016/0011-393X(95)85078-3).
- (102) Farid, N. A.; Payne, C. D.; Ernest, C. S.; Li, Y. G.; Winters, K. J.; Salazar, D. E.; Small, D. S. Prasugrel, a New Thienopyridine Antiplatelet Drug, Weakly Inhibits Cytochrome P450 2B6 in Humans. *J. Clin. Pharmacol.* **2008**, *48* (1), 53–59. <https://doi.org/10.1177/0091270007309709>.
- (103) Clarke, T. A.; Waskell, L. A. The Metabolism of Clopidogrel Is Catalyzed by Human Cytochrome P450 3A and Is Inhibited by Atorvastatin. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31* (1), 53–59.
- (104) Huttunen, K. M.; Raunio, H.; Rautio, J. Prodrugs—from Serendipity to Rational Design. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63* (3), 750–771. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003459>.
- (105) Ettmayer, P.; Amidon, G. L.; Clement, B.; Testa, B. Lessons Learned from Marketed and Investigational Prodrugs. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (10), 2393–2404. <https://doi.org/10.1021/jm0303812>.
- (106) VIDAL - Capécitabine <https://www.vidal.fr/substances/18983/capecitabine/> (accessed Nov 5, **2017**).
- (107) Tsukamoto, Y.; Kato, Y.; Ura, M.; Horii, I.; Ishitsuka, H.; Kusuhara, H.; Sugiyama, Y. A Physiologically Based Pharmacokinetic Analysis of Capecitabine, a Triple Prodrug of 5-FU, in Humans: The Mechanism for Tumor-Selective Accumulation of 5-FU. *Pharm. Res.* **2001**, *18* (8), 1190–1202.
- (108) Srinivasarao, M.; Galliford, C. V.; Low, P. S. Principles in the Design of Ligand-Targeted Cancer Therapeutics and Imaging Agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14* (3), 203–219. <https://doi.org/10.1038/nrd4519>.
- (109) Walther, R.; Rautio, J.; Zelikin, A. N. Prodrugs in Medicinal Chemistry and Enzyme Prodrug Therapies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *118*, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.06.013>.
- (110) Lougerstay-Madec, R.; Florent, J. C.; Monneret, C.; Nemati, F.; Poupon, M. F. Synthesis of Self-Immolative Glucuronide-Based Prodrugs of a Phenol Mustard. *Anticancer. Drug Des.* **1998**, *13* (8), 995–1007.
- (111) Niculescu-Duvaz, D.; Niculescu-Duvaz, I.; Friedlos, F.; Martin, J.; Lehouritis, P.; Marais, R.; Springer, C. J. Self-Immolative Nitrogen Mustards Prodrugs Cleavable by Carboxypeptidase

Références bibliographiques

- G2 (CPG2) Showing Large Cytotoxicity Differentials in GDEPT. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (9), 1690–1705. <https://doi.org/10.1021/jm020462i>.
- (112) Hu, L.; Wu, X.; Han, J.; Chen, L.; Vass, S. O.; Browne, P.; Hall, B. S.; Bot, C.; Gobalakrishnapillai, V.; Searle, P. F.; et al. Synthesis and Structure–Activity Relationships of Nitrobenzyl Phosphoramidate Mustards as Nitroreductase-Activated Prodrugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (13), 3986–3991. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.05.009>.
- (113) Alaoui, A. E.; Saha, N.; Schmidt, F.; Monneret, C.; Florent, J.-C. New Taxol® (Paclitaxel) Prodrugs Designed for ADEPT and PMT Strategies in Cancer Chemotherapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (14), 5012–5019. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.03.002>.
- (114) Erez, R.; Segal, E.; Miller, K.; Satchi-Fainaro, R.; Shabat, D. Enhanced Cytotoxicity of a Polymer–Drug Conjugate with Triple Payload of Paclitaxel. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (13), 4327–4335. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.05.028>.
- (115) Damen, E. W. P.; Nevalainen, T. J.; van den Bergh, T. J. M.; de Groot, F. M. H.; Scheeren, H. W. Synthesis of Novel Paclitaxel Prodrugs Designed for Bioreductive Activation in Hypoxic Tumour Tissue. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10* (1), 71–77. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00235-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00235-8).
- (116) Leu, Y.-L.; Roffler, S. R.; Chern, J.-W. Design and Synthesis of Water-Soluble Glucuronide Derivatives of Camptothecin for Cancer Prodrug Monotherapy and Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT) †. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (18), 3623–3628. <https://doi.org/10.1021/jm990124q>.
- (117) Gopin, A.; Rader, C.; Shabat, D. New Chemical Adaptor Unit Designed to Release a Drug from a Tumor Targeting Device by Enzymatic Triggering. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (8), 1853–1858. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.01.041>.
- (118) Jin, C.; Zhang, Q.; Lu, W. Synthesis and Biological Evaluation of Hypoxia-Activated Prodrugs of SN-38. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *132*, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.040>.
- (119) Platel, D.; Bonoron-Adele, S.; Dix, R. K.; Robert, J. Preclinical Evaluation of the Cardiac Toxicity of HMR-1826, a Novel Prodrug of Doxorubicin. *Br. J. Cancer* **1999**, *81* (1), 24.
- (120) Greenwald, R. B.; Pendri, A.; Conover, C. D.; Zhao, H.; Choe, Y. H.; Martinez, A.; Shum, K.; Guan, S. Drug Delivery Systems Employing 1,4- or 1,6-Elimination: Poly(Ethylene Glycol) Prodrugs of Amine-Containing Compounds. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (18), 3657–3667. <https://doi.org/10.1021/jm990166e>.
- (121) Mauger, A. B.; Burke, P. J.; Somani, H. H.; Friedlos, F.; Knox, R. J. Self-Immolative Prodrugs: Candidates for Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy in Conjunction with a Nitroreductase Enzyme. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (21), 3452–3458.
- (122) Levine, M. N.; Raines, R. T. Trimethyl Lock: A Trigger for Molecular Release in Chemistry, Biology, and Pharmacology. *Chem. Sci.* **2012**, *3* (8), 2412. <https://doi.org/10.1039/c2sc20536j>.
- (123) Schmidt, F.; Florent, J. C.; Monneret, C.; Straub, R.; Czech, J.; Gerken, M.; Bosslet, K. Glucuronide Prodrugs of Hydroxy Compounds for Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT) : A Phenol Nitrogen Mustard Carbamate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7* (8), 1071–1076. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(97\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(97)00157-1).
- (124) Hu, L.; Liu, B.; Hacking, D. R. 5H-[2-(2-Nitrophenyl)-2-Methylpropionyl]-2H-Deoxy-5-urouridine as a Potential Bioreductively Activated Prodrug of FUDR: Synthesis, Stability and Reductive Activation. *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, *4*.

Références bibliographiques

- (125) Vergote, I.; Leamon, C. P. Vintafolide: A Novel Targeted Therapy for the Treatment of Folate Receptor Expressing Tumors. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2015**, *7* (4), 206–218.
- (126) Pillow, T. H.; Schutten, M.; Yu, S.-F.; Ohri, R.; Sadowsky, J.; Poon, K. A.; Solis, W.; Zhong, F.; Del Rosario, G.; Go, M. A. T.; et al. Modulating Therapeutic Activity and Toxicity of Pyrrolobenzodiazepine Antibody–Drug Conjugates with Self-Immolative Disulfide Linkers. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16* (5), 871–878. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0641>.
- (127) Zhang, X.; Li, X.; You, Q.; Zhang, X. Prodrug Strategy for Cancer Cell-Specific Targeting: A Recent Overview. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *139*, 542–563. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.010>.
- (128) Chantrain, C.; DeClerck, Y. A. Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *médecine/sciences* **2002**, *18* (5), 565–575. <https://doi.org/10.1051/medsci/2002185565>.
- (129) Vartak, D. G.; Gemeinhart, R. A. Matrix Metalloproteases: Underutilized Targets for Drug Delivery. *J. Drug Target.* **2007**, *15* (1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/10611860600968967>.
- (130) Hu, Z.; Jiang, X.; Albright, C. F.; Graciani, N.; Yue, E.; Zhang, M.; Zhang, S.-Y.; Bruckner, R.; Diamond, M.; Dowling, R.; et al. Discovery of Matrix Metalloproteases Selective and Activated Peptide–Doxorubicin Prodrugs as Anti-Tumor Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (3), 853–856. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.12.084>.
- (131) Podgorski, I.; Sloane, B. F. Cathepsin B and Its Role(s) in Cancer Progression. **2003**, *14*.
- (132) Aggarwal, N.; Sloane, B. F. Cathepsin B: Multiple Roles in Cancer. *PROTEOMICS - Clin. Appl.* **2014**, *8* (5–6), 427–437. <https://doi.org/10.1002/prca.201300105>.
- (133) Biniossek, M. L.; Nägler, D. K.; Becker-Pauly, C.; Schilling, O. Proteomic Identification of Protease Cleavage Sites Characterizes Prime and Non-Prime Specificity of Cysteine Cathepsins B, L, and S. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (12), 5363–5373. <https://doi.org/10.1021/pr200621z>.
- (134) Shao, L.-H.; Liu, S.-P.; Hou, J.-X.; Zhang, Y.-H.; Peng, C.-W.; Zhong, Y.-J.; Liu, X.; Liu, X.-L.; Hong, Y.-P.; Firestone, R. A.; et al. Cathepsin B Cleavable Novel Prodrug Ac-Phe-Lys-PABC-ADM Enhances Efficacy at Reduced Toxicity in Treating Gastric Cancer Peritoneal Carcinomatosis: An Experimental Study. *Cancer* **2012**, *118* (11), 2986–2996. <https://doi.org/10.1002/cncr.26596>.
- (135) Schlager, J. J.; Powis, G. Cytosolic NAD(P)H:(Quinone-Acceptor)Oxidoreductase in Human Normal and Tumor Tissue: Effects of Cigarette Smoking and Alcohol. *Int. J. Cancer* **1990**, *45* (3), 403–409. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910450304>.
- (136) Siegel, D.; Yan, C.; Ross, D. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) in the Sensitivity and Resistance to Antitumor Quinones. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83* (8), 1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.017>.
- (137) Liu, P.; Xu, J.; Yan, D.; Zhang, P.; Zeng, F.; Li, B.; Wu, S. A DT-Diaphorase Responsive Theranostic Prodrug for Diagnosis, Drug Release Monitoring and Therapy. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (46), 9567–9570. <https://doi.org/10.1039/C5CC02149A>.
- (138) Schumacher, U.; Adam, E.; Zangemeister-Wittke, U.; Gossrau, R. Histochemistry of Therapeutically Relevant Enzymes in Human Tumours Transplanted into Severe Combined Immunodeficient (SCID) Mice: Nitric Oxide Synthase-Associated Diaphorase, Beta-D-Glucuronidase and Non-Specific Alkaline Phosphatase. *Acta Histochem.* **1996**, *98* (4), 381–387.

Références bibliographiques

- (139) Graaf, M.; Boven, E.; Scheeren, H.; Haisma, H.; Pinedo, H. Beta-Glucuronidase-Mediated Drug Release. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8* (15), 1391–1403. <https://doi.org/10.2174/1381612023394485>.
- (140) Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Jayle, C.; Alsarraf, J.; Thomas, M.; Papot, S. Synthesis and Biological Evaluations of a Monomethylauristatin E Glucuronide Prodrug for Selective Cancer Chemotherapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.037>.
- (141) Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Berjeaud, J.-M.; Guilhot, F.; Papot, S. Synthesis and Antitumor Efficacy of a β -Glucuronidase-Responsive Albumin-Binding Prodrug of Doxorubicin. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (9), 4516–4520. <https://doi.org/10.1021/jm300348r>.
- (142) Devic, S. Warburg Effect - a Consequence or the Cause of Carcinogenesis? *J. Cancer* **2016**, *7* (7), 817–822. <https://doi.org/10.7150/jca.14274>.
- (143) Semenza, G. L. Regulation of Cancer Cell Metabolism by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19* (1), 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.11.009>.
- (144) Damaghi, M.; Wojtkowiak, J. W.; Gillies, R. J. PH Sensing and Regulation in Cancer. *Front. Physiol.* **2013**, *4*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00370>.
- (145) Patel, A.; Sant, S. Hypoxic Tumor Microenvironment: Opportunities to Develop Targeted Therapies. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34* (5), 803–812. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.04.005>.
- (146) Cooper, G. M. Lysosomes. *Cell Mol. Approach 2nd Ed.* **2000**.
- (147) Kratz, F. DOXO-EMCH (INNO-206): The First Albumin-Binding Prodrug of Doxorubicin to Enter Clinical Trials. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2007**, *16* (6), 855–866. <https://doi.org/10.1517/13543784.16.6.855>.
- (148) Hochdörffer, K.; Abu Ajaj, K.; Schäfer-Obodozie, C.; Kratz, F. Development of Novel Bisphosphonate Prodrugs of Doxorubicin for Targeting Bone Metastases That Are Cleaved PH Dependently or by Cathepsin B: Synthesis, Cleavage Properties, and Binding Properties to Hydroxyapatite As Well As Bone Matrix. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (17), 7502–7515. <https://doi.org/10.1021/jm300493m>.
- (149) Chen, C.; Zhou, J.-L.; Han, X.; Song, F.; Wang, X.-L.; Wang, Y.-Z. A Prodrug Strategy Based on Chitosan for Efficient Intracellular Anticancer Drug Delivery. *Nanotechnology* **2014**, *25* (25), 255101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/25/255101>.
- (150) Li, S.-Y.; Liu, L.-H.; Jia, H.-Z.; Qiu, W.-X.; Rong, L.; Cheng, H.; Zhang, X.-Z. A PH-Responsive Prodrug for Real-Time Drug Release Monitoring and Targeted Cancer Therapy. *Chem Commun* **2014**, *50* (80), 11852–11855. <https://doi.org/10.1039/C4CC05008H>.
- (151) Moktan, S.; Ryppa, C.; Kratz, F.; Raucher, D. A Thermally Responsive Biopolymer Conjugated to an Acid-Sensitive Derivative of Paclitaxel Stabilizes Microtubules, Arrests Cell Cycle, and Induces Apoptosis. *Invest. New Drugs* **2012**, *30* (1), 236–248. <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9560-x>.
- (152) Wang, J.; Zhou, H.; Zheng, Q.; Yan, J.; Liu, P.; Li, G.; Zhang, X.; Tang, H. Synthesis of PH-Sensitive, Water-Soluble Paclitaxel Prodrugs Based on Norbornene-Functional Polylactide by Copper-Free Click Chemistry. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2016**, *65* (15), 789–796. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1171219>.

Références bibliographiques

- (153) Liu, Y.; Li, D.; Guo, X.; Xu, H.; Li, Z.; Zhang, Y.; Song, C.; Fan, R.; Tang, X.; Zhang, Z. A PH-Responsive Prodrug Delivery System of 10-HCPT for Controlled Release and Tumor Targeting. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, Volume 12, 2227–2242. <https://doi.org/10.2147/IJN.S125849>.
- (154) Koester, D.; Garcia, J.; Fuchs, O.; Kratz, F. Abstract 2061: DK049, a Novel Acid-Sensitive Prodrug of Gemcitabine: Design, in Vitro Properties and in Vivo Efficacy. *Cancer Res.* **2016**, 76 (14 Supplement), 2061–2061. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2016-2061>.
- (155) Sachdev, E.; Sachdev, D.; Mita, M. Aldoxorubicin for the Treatment of Soft Tissue Sarcoma. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2017**, 26 (10), 1175–1179. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1371134>.
- (156) Gu, Y.; Zhong, Y.; Meng, F.; Cheng, R.; Deng, C.; Zhong, Z. Acetal-Linked Paclitaxel Prodrug Micellar Nanoparticles as a Versatile and Potent Platform for Cancer Therapy. *Biomacromolecules* **2013**, 14 (8), 2772–2780. <https://doi.org/10.1021/bm400615n>.
- (157) Wang, H.; He, J.; Cao, D.; Zhang, M.; Li, F.; Tam, K. C.; Ni, P. Synthesis of an Acid-Labile Polymeric Prodrug DOX-Acetal-PEG-Acetal-DOX with High Drug Loading Content for PH-Triggered Intracellular Drug Release. *Polym. Chem.* **2015**, 6 (26), 4809–4818.
- (158) Uzor, P. F. Recent Developments on Potential New Applications of Emetine as Anti-Cancer Agent. *EXCLI J. 15Doc323 ISSN 1611-2156* **2016**. <https://doi.org/10.17179/excli2016-280>.
- (159) Akinboye, E. S.; Bamji, Z. D.; Kwabi-Addo, B.; Ejeh, D.; Copeland, R. L.; Denmeade, S. R.; Bakare, O. Design, Synthesis and Cytotoxicity Studies of Dithiocarbamate Ester Derivatives of Emetine in Prostate Cancer Cell Lines. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23 (17), 5839–5845. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.06.072>.
- (160) Akinboye, E. S.; Rosen, M. D.; Denmeade, S. R.; Kwabi-Addo, B.; Bakare, O. Design, Synthesis, and Evaluation of PH-Dependent Hydrolyzable Emetine Analogues as Treatment for Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (17), 7450–7459. <https://doi.org/10.1021/jm300426q>.
- (161) Bender, M. L. General Acid-Base Catalysis in the Intramolecular Hydrolysis of Phtalimic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79 (5), 1258–1259. <https://doi.org/10.1021/ja01562a059>.
- (162) Gupta, S. C.; Hevia, D.; Patchva, S.; Park, B.; Koh, W.; Aggarwal, B. B. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, 16 (11), 1295–1322. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4414>.
- (163) Chen, W.; Balakrishnan, K.; Kuang, Y.; Han, Y.; Fu, M.; Gandhi, V.; Peng, X. Reactive Oxygen Species (ROS) Inducible DNA Cross-Linking Agents and Their Effect on Cancer Cells and Normal Lymphocytes. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (11), 4498–4510. <https://doi.org/10.1021/jm401349g>.
- (164) Kim, E.-J.; Bhuniya, S.; Lee, H.; Kim, H. M.; Cheong, C.; Maiti, S.; Hong, K. S.; Kim, J. S. An Activatable Prodrug for the Treatment of Metastatic Tumors. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (39), 13888–13894. <https://doi.org/10.1021/ja5077684>.
- (165) Perez, C.; Monserrat, J.-P.; Chen, Y.; Cohen, S. M. Exploring Hydrogen Peroxide Responsive Thiazolidinone-Based Prodrugs. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (33), 7116–7119. <https://doi.org/10.1039/C4CC09921D>.
- (166) Gund, M.; Khanna, A.; Dubash, N.; Damre, A.; Singh, K. S.; Satyam, A. Water-Soluble Prodrugs of Paclitaxel Containing Self-Immolative Disulfide Linkers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25 (1), 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.088>.
- (167) Xu, Z.; Hou, M.; Shi, X.; Gao, Y.-E.; Xue, P.; Liu, S.; Kang, Y. Rapidly Cell-Penetrating and Reductive Milieu-Responsive Nanoaggregates Assembled from an Amphiphilic Folate-

Références bibliographiques

- Camptothecin Prodrug for Enhanced Drug Delivery and Controlled Release. *Biomater. Sci.* **2017**, 5 (3), 444–454. <https://doi.org/10.1039/C6BM00800C>.
- (168) Shami, P. J.; Saavedra, J. E.; Wang, L. Y.; Bonifant, C. L.; Diwan, B. A.; Singh, S. V.; Gu, Y.; Fox, S. D.; Buzard, G. S.; Citro, M. L.; et al. JS-K, a Glutathione/Glutathione S-Transferase-Activated Nitric Oxide Donor of the Diazeniumdiolate Class with Potent Antineoplastic Activity. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, 2 (4), 409–417.
- (169) Maciag, A. E.; Holland, R. J.; Robert Cheng, Y.-S.; Rodriguez, L. G.; Saavedra, J. E.; Anderson, L. M.; Keefer, L. K. Nitric Oxide-Releasing Prodrug Triggers Cancer Cell Death through Deregulation of Cellular Redox Balance. *Redox Biol.* **2013**, 1 (1), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.002>.
- (170) Li, Q.; Zou, P.; Sun, J.; Chen, L. O₂-(2,4-Dinitrophenyl)Diazeniumdiolates Derivatives: Design, Synthesis, Cytotoxic Evaluation and Reversing MDR in MCF-7/ADR Cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 143, 732–744. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.081>.
- (171) Torchilin, V. Tumor Delivery of Macromolecular Drugs Based on the EPR Effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, 63 (3), 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.011>.
- (172) Loureiro, A.; Azoia, N. G.; Cavaco-Paulo, A. C. G. and A. Albumin-Based Nanodevices as Drug Carriers <http://www.eurekaselect.com/138717/article> (accessed Apr 30, **2018**).
- (173) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65 (1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>.
- (174) Gidwani, B.; Vyas, A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *BioMed Res. Int.* **2015**, 2015, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2015/198268>.
- (175) Dragojevic, S.; Ryu, J.; Raucher, D. Polymer-Based Prodrugs: Improving Tumor Targeting and the Solubility of Small Molecule Drugs in Cancer Therapy. *Molecules* **2015**, 20 (12), 21750–21769. <https://doi.org/10.3390/molecules201219804>.
- (176) Liao, J.; Zheng, H.; Fei, Z.; Lu, B.; Zheng, H.; Li, D.; Xiong, X.; Yi, Y. Tumor-Targeting and PH-Responsive Nanoparticles from Hyaluronic Acid for the Enhanced Delivery of Doxorubicin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 113, 737–747. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.004>.
- (177) Parker, N.; Turk, M. J.; Westrick, E.; Lewis, J. D.; Low, P. S.; Leamon, C. P. Folate Receptor Expression in Carcinomas and Normal Tissues Determined by a Quantitative Radioligand Binding Assay. *Anal. Biochem.* **2005**, 338 (2), 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.026>.
- (178) Leamon, C. P.; Vlahov, I. R.; Reddy, J. A.; Vetzal, M.; Santhapuram, H. K. R.; You, F.; Bloomfield, A.; Dorton, R.; Nelson, M.; Kleindl, P.; et al. Folate–Vinca Alkaloid Conjugates for Cancer Therapy: A Structure–Activity Relationship. *Bioconjug. Chem.* **2014**, 25 (3), 560–568. <https://doi.org/10.1021/bc400441s>.
- (179) Henne, W. A.; Kularatne, S. A.; Hakenjos, J.; Carron, J. D.; Henne, K. L. Synthesis and Activity of a Folate Targeted Monodisperse PEG Camptothecin Conjugate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (21), 5810–5813. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.113>.
- (180) Yoo, H. S.; Park, T. G. Folate-Receptor-Targeted Delivery of Doxorubicin Nano-Aggregates Stabilized by Doxorubicin–PEG–Folate Conjugate. *J. Controlled Release* **2004**, 100 (2), 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.017>.
- (181) Leamon, C. P.; Reddy, J. A.; Vlahov, I. R.; Dorton, R.; Bloomfield, A.; Vetzal, M.; Klein, P. J.; Westrick, E.; Xu, L.; Wang, Y. Enhancing the Therapeutic Range of a Targeted Small-Molecule

Références bibliographiques

- Tubulysin Conjugate for Folate Receptor-Based Cancer Therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, 79 (6), 1151–1160. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3311-z>.
- (182) Gokhale, M.; Thakur, A.; Rinaldi, F. Degradation of BMS-753493, a Novel Epothilone Folate Conjugate Anticancer Agent. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2013**, 39 (9), 1315–1327. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.728226>.
- (183) Leamon, C. P.; Reddy, J. A.; Vlahov, I. R.; Westrick, E.; Dawson, A.; Dorton, R.; Vetzal, M.; Santhapuram, H. K.; Wang, Y. Preclinical Antitumor Activity of a Novel Folate-Targeted Dual Drug Conjugate. *Mol. Pharm.* **2007**, 4 (5), 659–667. <https://doi.org/10.1021/mp070049c>.
- (184) Leamon, C. P.; Reddy, J. A.; Klein, P. J.; Vlahov, I. R.; Dorton, R.; Bloomfield, A.; Nelson, M.; Westrick, E.; Parker, N.; Bruna, K.; et al. Reducing Undesirable Hepatic Clearance of a Tumor-Targeted Vinca Alkaloid via Novel Saccharopeptidic Modifications. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, 336 (2), 336–343. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.175109>.
- (185) Reddy, J. A.; Dorton, R.; Bloomfield, A.; Nelson, M.; Dircksen, C.; Vetzal, M.; Kleindl, P.; Santhapuram, H.; Vlahov, I. R.; Leamon, C. P. Pre-Clinical Evaluation of EC1456, a Folate-Tubulysin Anti-Cancer Therapeutic. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27320-5>.
- (186) Alsarraf, J.; Péraudeau, E.; Poinot, P.; Tranoy-Opalinski, I.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Papot, S. A Dendritic β -Galactosidase-Responsive Folate–Monomethylauristatin E Conjugate. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (87), 15792–15795. <https://doi.org/10.1039/C5CC05294G>.
- (187) Renoux, B.; Raes, F.; Legigan, T.; Péraudeau, E.; Eddhif, B.; Poinot, P.; Tranoy-Opalinski, I.; Alsarraf, J.; Koniev, O.; Kolodych, S.; et al. Targeting the Tumour Microenvironment with an Enzyme-Responsive Drug Delivery System for the Efficient Therapy of Breast and Pancreatic Cancers. *Chem. Sci.* **2017**, 8 (5), 3427–3433. <https://doi.org/10.1039/C7SC00472A>.
- (188) Rao, S. I.; Pugh, M.; Nelson, M.; Reddy, J. A.; Klein, P. J.; Leamon, C. P. Development and Validation of a UPLC–MS/MS Method for the Novel Folate-Targeted Small Molecule Drug Conjugate EC1456 and Its Metabolites in Tumor Homogenates from Mice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 122, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.049>.
- (189) Medina, R. A.; Owen, G. I. Glucose Transporters: Expression, Regulation and Cancer. *Biol. Res.* **2002**, 35 (1), 9–26. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602002000100004>.
- (190) Calvaresi, E. C.; Hergenrother, P. J. Glucose Conjugation for the Specific Targeting and Treatment of Cancer. *Chem. Sci.* **2013**, 4 (6), 2319. <https://doi.org/10.1039/c3sc22205e>.
- (191) Ciuleanu, T. E.; Pavlovsky, A. V.; Bodoky, G.; Garin, A. M.; Langmuir, V. K.; Kroll, S.; Tidmarsh, G. T. A Randomised Phase III Trial of Glufosfamide Compared with Best Supportive Care in Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma Previously Treated with Gemcitabine. *Eur. J. Cancer* **2009**, 45 (9), 1589–1596. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.12.022>.
- (192) Lin, Y.-S.; Tungpradit, R.; Sinchaikul, S.; An, F.-M.; Liu, D.-Z.; Phutrakul, S.; Chen, S.-T. Targeting the Delivery of Glycan-Based Paclitaxel Prodrugs to Cancer Cells via Glucose Transporters. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (23), 7428–7441. <https://doi.org/10.1021/jm8006257>.
- (193) Liu, D.-Z.; Sinchaikul, S.; Reddy, P. V. G.; Chang, M.-Y.; Chen, S.-T. Synthesis of 2'-Paclitaxel Methyl 2-Glucopyranosyl Succinate for Specific Targeted Delivery to Cancer Cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (3), 617–620. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.11.008>.
- (194) Cao, J.; Cui, S.; Li, S.; Du, C.; Tian, J.; Wan, S.; Qian, Z.; Gu, Y.; Chen, W. R.; Wang, G. Targeted Cancer Therapy with a 2-Deoxyglucose-Based Adriamycin Complex. *Cancer Res.* **2013**, 73 (4), 1362–1373. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2072>.

Références bibliographiques

- (195) El Hilali, M.; Reux, B.; Debiton, E.; Leal, F.; Galmier, M.-J.; Vivier, M.; Chezal, J.-M.; Miot-Noirault, E.; Coudert, P.; Weber, V. Linker Structure-Activity Relationships in Fluorodeoxyglucose Chlorambucil Conjugates for Tumor-Targeted Chemotherapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25* (20), 5692–5708. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.08.043>.
- (196) Iglesias-Guerra, F.; Romero, I.; Alcludia, F.; Vega-Pérez, J. M. Alkylating Agents from Sugars. Cyclophosphamides Derived from 2-Amino-2-Deoxy-d-Allose. *Carbohydr. Res.* **1998**, *308* (1–2), 57–62. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00056-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00056-1).
- (197) Patra, M.; Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. A Potent Glucose-Platinum Conjugate Exploits Glucose Transporters and Preferentially Accumulates in Cancer Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (7), 2550–2554. <https://doi.org/10.1002/anie.201510551>.
- (198) Mhaweche-Fauceglia, P.; Zhang, S.; Terracciano, L.; Sauter, G.; Chadhuri, A.; Herrmann, F. R.; Penetrante, R. Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Protein Expression in Normal and Neoplastic Tissues and Its Sensitivity and Specificity in Prostate Adenocarcinoma: An Immunohistochemical Study Using Multiple Tumour Tissue Microarray Technique. *Histopathology* **2007**, *50* (4), 472–483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02635.x>.
- (199) Afshar-Oromieh, A.; Hetzheim, H.; Kratochwil, C.; Benesova, M.; Eder, M.; Neels, O. C.; Eisenhut, M.; Kubler, W.; Holland-Letz, T.; Giesel, F. L.; et al. The Theranostic PSMA Ligand PSMA-617 in the Diagnosis of Prostate Cancer by PET/CT: Biodistribution in Humans, Radiation Dosimetry, and First Evaluation of Tumor Lesions. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (11), 1697–1705. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.161299>.
- (200) Bostwick, D. G.; Pacelli, A.; Blute, M.; Roche, P.; Murphy, G. P. Prostate Specific Membrane Antigen Expression in Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Adenocarcinoma: A Study of 184 Cases. *Cancer* **1998**, *82* (11), 2256–2261.
- (201) Ghosh, A.; Heston, W. D. W. Tumor Target Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) and Its Regulation in Prostate Cancer. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *91* (3), 528–539. <https://doi.org/10.1002/jcb.10661>.
- (202) Mesters, J. R.; Barinka, C.; Li, W.; Tsukamoto, T.; Majer, P.; Slusher, B. S.; Konvalinka, J.; Hilgenfeld, R. Structure of Glutamate Carboxypeptidase II, a Drug Target in Neuronal Damage and Prostate Cancer. *EMBO J.* **2006**, *25* (6), 1375–1384. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600969>.
- (203) Kopka, K.; Benešová, M.; Bařinka, C.; Haberkorn, U.; Babich, J. Glu-Ureido-Based Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen: Lessons Learned During the Development of a Novel Class of Low-Molecular-Weight Theranostic Radiotracers. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (Supplement 2), 175–265. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.186775>.
- (204) Liu, H.; Rajasekaran, A. K.; Moy, P.; Xia, Y.; Kim, S.; Navarro, V.; Rahmati, R.; Bander, N. H. Constitutive and Antibody-Induced Internalization of Prostate-Specific Membrane Antigen. *Cancer Res.* **1998**, *58* (18), 4055–4060.
- (205) Jackson, P. F.; Cole, D. C.; Slusher, B. S.; Stetz, S. L.; Ross, L. E.; Donzanti, B. A.; Trainor, D. A. Design, Synthesis, and Biological Activity of a Potent Inhibitor of the Neuropeptidase N-Acetylated α -Linked Acidic Dipeptidase. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (2), 619–622. <https://doi.org/10.1021/jm950801q>.
- (206) Lapi, S. E.; Wahnische, H.; Pham, D.; Wu, L. Y.; Nedrow-Byers, J. R.; Liu, T.; Vejdani, K.; VanBrocklin, H. F.; Berkman, C. E.; Jones, E. F. Assessment of an ^{18}F -Labeled Phosphoramidate Peptidomimetic as a New Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Imaging Agent for Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (12), 2042–2048. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.066589>.

Références bibliographiques

- (207) Majer, P.; Jackson, P. F.; Delahanty, G.; Grella, B. S.; Ko, Y.-S.; Li, W.; Liu, Q.; Maclin, K. M.; Poláková, J.; Shaffer, K. A.; et al. Synthesis and Biological Evaluation of Thiol-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II: Discovery of an Orally Active GCP II Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (10), 1989–1996. <https://doi.org/10.1021/jm020515w>.
- (208) Majer, P.; Hin, B.; Stoermer, D.; Adams, J.; Xu, W.; Duvall, B. R.; Delahanty, G.; Liu, Q.; Stathis, M. J.; Wozniak, K. M.; et al. Structural Optimization of Thiol-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II by Modification of the P1' Side Chain. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (10), 2876–2885. <https://doi.org/10.1021/jm051019l>.
- (209) Ferraris, D. V.; Majer, P.; Ni, C.; Slusher, C. E.; Rais, R.; Wu, Y.; Wozniak, K. M.; Alt, J.; Rojas, C.; Slusher, B. S.; et al. δ -Thiolactones as Prodrugs of Thiol-Based Glutamate Carboxypeptidase II (GCP II) Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (1), 243–247. <https://doi.org/10.1021/jm401703a>.
- (210) Kularatne, S. A.; Zhou, Z.; Yang, J.; Post, C. B.; Low, P. S. Design, Synthesis, and Preclinical Evaluation of Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted ^{99m}Tc -Radioimaging Agents. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (3), 790–800. <https://doi.org/10.1021/mp9000712>.
- (211) Chen, Y.; Pullambhatla, M.; Foss, C. A.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Senthamizhchelvan, S.; Sgouros, G.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. 2-(3-ureido)-pentanedioic acid, [18F]DCFPyL, a PSMA-based PET imaging agent for prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17* (24), 7645–7653. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1357>.
- (212) Chen, Y.; Foss, C. A.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Pullambhatla, M.; Fox, J. J.; Castanares, M.; Lupold, S. E.; Babich, J. W.; Mease, R. C.; et al. Radiohalogenated prostate-specific membrane antigen (PSMA)-based ureas as imaging agents for prostate cancer. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (24), 7933–7943. <https://doi.org/10.1021/jm801055h>.
- (213) Mease, R. C.; Dusich, C. L.; Foss, C. A.; Ravert, H. T.; Dannals, R. F.; Seidel, J.; Prideaux, A.; Fox, J. J.; Sgouros, G.; Kozikowski, A. P.; et al. N-[N-[(S)-1,3-dicarboxypropyl]carbonyl]-4-[18F]fluorobenzyl-L-cysteine, [18F]DCFBC: a new imaging probe for prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (10), 3036–3043. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1517>.
- (214) Kularatne, S. A.; Wang, K.; Santhapuram, H.-K. R.; Low, P. S. Prostate-specific membrane antigen targeted imaging and therapy of prostate cancer using a PSMA inhibitor as a homing ligand. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (3), 780–789. <https://doi.org/10.1021/mp900069d>.
- (215) Kumar, A.; Mastren, T.; Wang, B.; Hsieh, J.-T.; Hao, G.; Sun, X. Design of a small-molecule drug conjugate for prostate cancer targeted theranostics. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (7), 1681–1689. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00222>.
- (216) Diamantis, N.; Banerji, U. Antibody-drug conjugates—an emerging class of cancer treatment. *Br. J. Cancer* **2016**, *114* (4), 362–367. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.435>.
- (217) Tsuchikama, K.; An, Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein Cell* **2016**. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0323-0>.
- (218) Chalouni, C.; Doll, S. Fate of antibody-drug conjugates in cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37* (1). <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0667-1>.
- (219) Stasi, R.; Evangelista, M. L.; Buccisano, F.; Venditti, A.; Amadori, S. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer Treat. Rev.* **2008**, *34* (1), 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.09.001>.
- (220) DeAngelo, D. J.; Stock, W.; Stein, A. S.; Shustov, A.; Liedtke, M.; Schiffer, C. A.; Vandendries, E.; Liao, K.; Ananthakrishnan, R.; Boni, J. Inotuzumab ozogamicin in adults with relapsed or

Références bibliographiques

- Refractory CD22-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: A Phase 1/2 Study. *Blood Adv.* **2017**, *1* (15), 1167–1180.
- (221) Barok, M.; Joensuu, H.; Isola, J. Trastuzumab Emtansine: Mechanisms of Action and Drug Resistance. *Breast Cancer Res.* **2014**, *16* (2), 209.
- (222) Francisco, J. A. CAC10-VcMMAE, an Anti-CD30-Monomethyl Auristatin E Conjugate with Potent and Selective Antitumor Activity. *Blood* **2003**, *102* (4), 1458–1465. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0039>.
- (223) Ducancel, F.; Muller, B. H. Molecular Engineering of Antibodies for Therapeutic and Diagnostic Purposes. *mAbs* **2012**, *4* (4), 445–457. <https://doi.org/10.4161/mabs.20776>.
- (224) Marín, A.; Martín, M.; Liñán, O.; Alvarenga, F.; López, M.; Fernández, L.; Büchser, D.; Cerezo, L. Bystander Effects and Radiotherapy. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* **2015**, *20* (1), 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2014.08.004>.
- (225) Hunter, F. W.; Wouters, B. G.; Wilson, W. R. Hypoxia-Activated Prodrugs: Paths Forward in the Era of Personalised Medicine. *Br. J. Cancer* **2016**, *114* (10), 1071–1077. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.79>.
- (226) Liang, D.; Tranmer, G. H. M. and G. K. Hypoxia Activated Prodrugs: Factors Influencing Design and Development. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22* (37), 4313–4325. <https://doi.org/10.2174/0929867322666151021111016>.
- (227) Wardman, P. Electron Transfer and Oxidative Stress as Key Factors in the Design of Drugs Selectively Active in Hypoxia. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8* (7), 739–761. <https://doi.org/10.2174/0929867013372959>.
- (228) Yeh, J. J.; Kim, W. Y. Targeting Tumor Hypoxia With Hypoxia-Activated Prodrugs. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33* (13), 1505–1508. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.0759>.
- (229) Chen, Y.; Hu, L. Design of Anticancer Prodrugs for Reductive Activation. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29* (1), 29–64. <https://doi.org/10.1002/med.20137>.
- (230) VIDAL - Mitomycine <https://www.vidal.fr/substances/2400/mitomycine/> (accessed Nov 5, **2017**).
- (231) Colucci, M. A.; Couch, G. D.; Moody, C. J. Natural and Synthetic Quinones and Their Reduction by the Quinone Reductase Enzyme NQO1: From Synthetic Organic Chemistry to Compounds with Anticancer Potential. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (4), 637–656. <https://doi.org/10.1039/B715270A>.
- (232) Beijnen, J. H.; Underberg, W. J. M. Degradation of Mitomycin C in Acidic Solution. *Int. J. Pharm.* **1985**, *24* (2–3), 219–229. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(85\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0378-5173(85)90022-5).
- (233) Haffty, B. G.; Wilson, L. D.; Son, Y. H.; Cho, E. I.; Papac, R. J.; Fischer, D. B.; Rockwell, S.; Sartorelli, A. C.; Ross, D. A.; Sasaki, C. T.; et al. Concurrent Chemo-Radiotherapy with Mitomycin C Compared with Porfiromycin in Squamous Cell Cancer of the Head and Neck: Final Results of a Randomized Clinical Trial. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2005**, *61* (1), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.07.730>.
- (234) Phillips, R. M. Targeting the Hypoxic Fraction of Tumours Using Hypoxia-Activated Prodrugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, *77* (3), 441–457. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2920-7>.
- (235) Phillips, R.; Loadman, P.; Cronin, B. Evaluation of a Novel in Vitro Assay for Assessing Drug Penetration into Avascular Regions of Tumours. *Br. J. Cancer* **1998**, *77* (12), 2112–2119. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.355>.

Références bibliographiques

- (236) Phillips, R. M.; Hendriks, H. R.; Sweeney, J. B.; Reddy, G.; Peters, G. J. Efficacy, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation of Apaziquone in the Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2017**, *13* (7), 783–791. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1341490>.
- (237) Zeman, E. M.; Brown, J. M.; Lemmon, M. J.; Hirst, V. K.; Lee, W. W. SR-4233: A New Bioreductive Agent with High Selective Toxicity for Hypoxic Mammalian Cells. *Int. J. Radiat. Oncol.* **1986**, *12* (7), 1239–1242. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(86\)90267-1](https://doi.org/10.1016/0360-3016(86)90267-1).
- (238) Marcu, L.; Olver, I. Tirapazamine: From Bench to Clinical Trials. *Curr. Clin. Pharmacol.* **2006**, *1* (1), 71–79.
- (239) DiSilvestro, P. A.; Ali, S.; Craighead, P. S.; Lucci, J. A.; Lee, Y.-C.; Cohn, D. E.; Spirtos, N. M.; Tewari, K. S.; Muller, C.; Gajewski, W. H.; et al. Phase III Randomized Trial of Weekly Cisplatin and Irradiation Versus Cisplatin and Tirapazamine and Irradiation in Stages IB2, IIA, IIB, IIIB, and IVA Cervical Carcinoma Limited to the Pelvis: A Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32* (5), 458–464. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.51.4265>.
- (240) Rischin, D.; Peters, L. J.; O’Sullivan, B.; Giralt, J.; Fisher, R.; Yuen, K.; Trotti, A.; Bernier, J.; Bourhis, J.; Ringash, J.; et al. Tirapazamine, Cisplatin, and Radiation Versus Cisplatin and Radiation for Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (TROG 02.02, HeadSTART): A Phase III Trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28* (18), 2989–2995. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.4449>.
- (241) Hicks, K. O.; Siim, B. G.; Jaiswal, J. K.; Pruijn, F. B.; Fraser, A. M.; Patel, R.; Hogg, A.; Liyanage, H. D. S.; Dorie, M. J.; Brown, J. M.; et al. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling Identifies SN30000 and SN29751 as Tirapazamine Analogues with Improved Tissue Penetration and Hypoxic Cell Killing in Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16* (20), 4946–4957. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1439>.
- (242) Gu, Y.; Jaiswal, J. K.; Wang, J.; Hicks, K. O.; Hay, M. P.; Wilson, W. R. Photodegradation of the Benzotriazine 1,4-Di-N-Oxide Hypoxia-Activated Prodrug SN30000 in Aqueous Solution. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103* (11), 3464–3472. <https://doi.org/10.1002/jps.24099>.
- (243) Gu, Y.; Chang, T. T.-A.; Wang, J.; Jaiswal, J. K.; Edwards, D.; Downes, N. J.; Liyanage, H. D. S.; Lynch, C. R. H.; Pruijn, F. B.; Hickey, A. J. R.; et al. Reductive Metabolism Influences the Toxicity and Pharmacokinetics of the Hypoxia-Targeted Benzotriazine Di-Oxide Anticancer Agent SN30000 in Mice. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00531>.
- (244) Patterson, L. H.; McKeown, S. R. AQ4N: A New Approach to Hypoxia-Activated Cancer Chemotherapy. *Br. J. Cancer* **2000**, *83* (12), 1589–1593. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1564>.
- (245) Papadopoulos, K. P.; Goel, S.; Beeram, M.; Wong, A.; Desai, K.; Haigentz, M.; Milian, M. L.; Mani, S.; Tolcher, A.; Lalani, A. S.; et al. A Phase 1 Open-Label, Accelerated Dose-Escalation Study of the Hypoxia-Activated Prodrug AQ4N in Patients with Advanced Malignancies. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (21), 7110–7115. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0483>.
- (246) Albertella, M. R.; Loadman, P. M.; Jones, P. H.; Phillips, R. M.; Rampling, R.; Burnet, N.; Alcock, C.; Anthoney, A.; Vjaters, E.; Dunk, C. R.; et al. Hypoxia-Selective Targeting by the Bioreductive Prodrug AQ4N in Patients with Solid Tumors: Results of a Phase I Study. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (4), 1096–1104. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4020>.
- (247) Nesbitt, H.; Byrne, N. M.; Williams, S. N.; Ming, L.; Worthington, J.; Errington, R. J.; Patterson, L. H.; Smith, P. J.; McKeown, S. R.; McKenna, D. J. Targeting Hypoxic Prostate Tumors Using the Novel Hypoxia-Activated Prodrug OCT1002 Inhibits Expression of Genes Associated with

Références bibliographiques

- Malignant Progression. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23* (7), 1797–1808. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1361>.
- (248) Patterson, S.; Wyllie, S. Nitro Drugs for the Treatment of Trypanosomatid Diseases: Past, Present, and Future Prospects. *Trends Parasitol.* **2014**, *30* (6), 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>.
- (249) Brown, J. M. Tumor Hypoxia in Cancer Therapy. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, **2007**; Vol. 435, pp 295–321. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)35015-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)35015-5).
- (250) Patterson, A. V.; Ferry, D. M.; Edmunds, S. J.; Gu, Y.; Singleton, R. S.; Patel, K.; Pullen, S. M.; Hicks, K. O.; Syddall, S. P.; Atwell, G. J.; et al. Mechanism of Action and Preclinical Antitumor Activity of the Novel Hypoxia-Activated DNA Cross-Linking Agent PR-104. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (13), 3922–3932. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0478>.
- (251) Foehrenbacher, A.; Patel, K.; Abbattista, M. R.; Guise, C. P.; Secomb, T. W.; Wilson, W. R.; Hicks, K. O. The Role of Bystander Effects in the Antitumor Activity of the Hypoxia-Activated Prodrug PR-104. *Front. Oncol.* **2013**, *3*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00263>.
- (252) McKeage, M. J.; Jameson, M. B.; Ramanathan, R. K.; Rajendran, J.; Gu, Y.; Wilson, W. R.; Melink, T. J.; Tchekmedyan, N. S. PR-104 a Bioreductive Pre-Prodrug Combined with Gemcitabine or Docetaxel in a Phase Ib Study of Patients with Advanced Solid Tumours. *BMC Cancer* **2012**, *12* (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-496>.
- (253) Konopleva, M.; Thall, P. F.; Yi, C. A.; Borthakur, G.; Coveler, A.; Bueso-Ramos, C.; Benito, J.; Konoplev, S.; Gu, Y.; Ravandi, F.; et al. Phase I/II Study of the Hypoxia-Activated Prodrug PR104 in Refractory/Relapsed Acute Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia. *Haematologica* **2015**, *100* (7), 927–934. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.118455>.
- (254) Meng, F.; Evans, J. W.; Bhupathi, D.; Banica, M.; Lan, L.; Lorente, G.; Duan, J.-X.; Cai, X.; Mowday, A. M.; Guise, C. P.; et al. Molecular and Cellular Pharmacology of the Hypoxia-Activated Prodrug TH-302. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11* (3), 740–751. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0634>.
- (255) Hong, C. R.; Dickson, B. D.; Jaiswal, J. K.; Pruijn, F. B.; Hunter, F. W.; Hay, M. P.; Hicks, K. O.; Wilson, W. R. Cellular Pharmacology of Evofosfamide (TH-302): A Critical Re-Evaluation of Its Bystander Effects. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *156*, 265–280. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.027>.
- (256) Grkovski, M.; Fanchon, L.; Pillarsetty, N. V. K.; Russell, J.; Humm, J. L. 18F-Fluoromisonidazole Predicts Evofosfamide Uptake in Pancreatic Tumor Model. *EJNMMI Res.* **2018**, *8* (1). <https://doi.org/10.1186/s13550-018-0409-1>.
- (257) Pourmorteza, M.; Rahman, Z. U.; Young, M. Evofosfamide, a New Horizon in the Treatment of Pancreatic Cancer. *Anticancer. Drugs* **2016**, *27* (8), 723. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000386>.
- (258) Borad, M. J.; Reddy, S. G.; Bahary, N.; Uronis, H. E.; Sigal, D.; Cohn, A. L.; Schelman, W. R.; Stephenson, J.; Chiorean, E. G.; Rosen, P. J.; et al. Randomized Phase II Trial of Gemcitabine Plus TH-302 Versus Gemcitabine in Patients With Advanced Pancreatic Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33* (13), 1475–1481. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.7504>.
- (259) Van Cutsem, E.; Lenz, H.-J.; Furuse, J.; Tabernero, J.; Heinemann, V.; Ioka, T.; Bazin, I.; Ueno, M.; Csösz, T.; Wasan, H.; et al. MAESTRO: A Randomized, Double-Blind Phase III Study of Evofosfamide (Evo) in Combination with Gemcitabine (Gem) in Previously Untreated Patients (Pts) with Metastatic or Locally Advanced Unresectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC). *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34* (15_suppl), 4007–4007. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.4007.

Références bibliographiques

- (260) Tap, W. D.; Papai, Z.; Tine, B. A. V.; Attia, S.; Ganjoo, K. N.; Jones, R. L.; Schuetze, S.; Reed, D.; Chawla, S. P.; Riedel, R. F.; et al. Doxorubicin plus Evofosfamide versus Doxorubicin Alone in Locally Advanced, Unresectable or Metastatic Soft-Tissue Sarcoma (TH CR-406/SARC021): An International, Multicentre, Open-Label, Randomised Phase 3 Trial. *Lancet Oncol.* **2017**, *18* (8), 1089–1103. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30381-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30381-9).
- (261) Anderson, R. F.; Li, D.; Hunter, F. W. Antagonism in Effectiveness of Evofosfamide and Doxorubicin through Intermolecular Electron Transfer. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *113*, 564–570. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.385>.
- (262) Badar, T.; Handisides, D. R.; Benito, J. M.; Richie, M. A.; Borthakur, G.; Jabbour, E.; Harutyunyan, K.; Konoplev, S.; Faderl, S.; Kroll, S.; et al. Phase I Study of Evofosfamide, an Investigational Hypoxia-Activated Prodrug, in Patients with Advanced Leukemia: Phase I Study of Evofosfamide in Advanced Leukemia. *Am. J. Hematol.* **2016**, *91* (8), 800–805. <https://doi.org/10.1002/ajh.24415>.
- (263) Ikeda, Y.; Hisano, H.; Nishikawa, Y.; Nagasaki, Y. Targeting and Treatment of Tumor Hypoxia by Newly Designed Prodrug Possessing High Permeability in Solid Tumors. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (7), 2283–2289. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00011>.
- (264) Jin, C.; Wen, S.; Zhang, Q.; Zhu, Q.; Yu, J.; Lu, W. Synthesis and Biological Evaluation of Paclitaxel and Camptothecin Prodrugs on the Basis of 2-Nitroimidazole. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (7), 762–765. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00189>.
- (265) Patterson, A. V.; Silva, S.; Guise, C.; Bull, M.; Abbattista, M.; Hsu, A.; Sun, J. D.; Hart, C. P.; Pearce, T. E.; Smaill, J. B. TH-4000, a Hypoxia-Activated EGFR/Her2 Inhibitor to Treat EGFR-TKI Resistant T790M-Negative NSCLC. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33* (15_suppl), e13548–e13548. https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.e13548.
- (266) Study for Treatment of Patients With EGFR Mutant, T790M-negative NSCLC - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02454842> (accessed Sep 13, **2018**).
- (267) Study for Treatment of Patients With Recurrent or Metastatic SCCHN or SCCS - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02449681> (accessed Sep 13, **2018**).
- (268) Cazares-Körner, C.; Pires, I. M.; Swallow, I. D.; Grayer, S. C.; O'Connor, L. J.; Olcina, M. M.; Christlieb, M.; Conway, S. J.; Hammond, E. M. CH-01 Is a Hypoxia-Activated Prodrug That Sensitizes Cells to Hypoxia/Reoxygenation Through Inhibition of Chk1 and Aurora A. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (7), 1451–1459. <https://doi.org/10.1021/cb4001537>.
- (269) Lindquist, K. E.; Cran, J. D.; Kordic, K.; Chua, P. C.; Winters, G. C.; Tan, J. S.; Lozada, J.; Kyle, A. H.; Evans, J. W.; Minchinton, A. I. Selective Radiosensitization of Hypoxic Cells Using BCCA621C: A Novel Hypoxia Activated Prodrug Targeting DNA-Dependent Protein Kinase. *Tumor Microenviron. Ther.* **2013**, *1*. <https://doi.org/10.2478/tumor-2013-0003>.
- (270) Karnthaler-Benbakka, C.; Groza, D.; Koblmüller, B.; Terenzi, A.; Holste, K.; Haider, M.; Baier, D.; Berger, W.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; et al. Targeting a Targeted Drug: An Approach Toward Hypoxia-Activatable Tyrosine Kinase Inhibitor Prodrugs. *ChemMedChem* **2016**, *11* (21), 2410–2421. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600417>.
- (271) Kumar, R.; Kim, E.-J.; Han, J.; Lee, H.; Shin, W. S.; Kim, H. M.; Bhuniya, S.; Kim, J. S.; Hong, K. S. Hypoxia-Directed and Activated Theranostic Agent: Imaging and Treatment of Solid Tumor. *Biomaterials* **2016**, *104*, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.010>.
- (272) Russell-Jones, G.; McTavish, K.; McEwan, J.; Rice, J.; Nowotnik, D. Vitamin-Mediated Targeting as a Potential Mechanism to Increase Drug Uptake by Tumours. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98* (10), 1625–1633. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.07.009>.

Références bibliographiques

- (273) Madelmont, J.-C.; Giraud, I.; Nicolas, C.; Maurizis, J.-C.; Rapp, M.; Ollier, M.; Renard, P.; Caignard, D.-H. Novel Quaternary Ammonium Derivatives, Method for Preparing Same and Pharmaceutical Use. WO2001000621A1, January 4, **2001**.
- (274) Denis, C.; Gaumet, V.; VIDAL, A.; Auzeloux, P.; Madelmont, J.-C.; Miot-Noirault, E.; Chezal, J.-M. Macrocyclic Complexes, Their Process of Preparation and Use as Pet Imaging Agents. WO2016016272A1, February 4, **2016**.
- (275) Peyrode, C.; Weber, V.; Voissière, A.; Maisonia-Besset, A.; Vidal, A.; Auzeloux, P.; Gaumet, V.; Borel, M.; Dauplat, M.-M.; Quintana, M.; et al. Proteoglycans as Target for an Innovative Therapeutic Approach in Chondrosarcoma: Preclinical Proof of Concept. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15* (11), 2575–2585. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0003>.
- (276) Miot-Noirault, E.; David, E.; Vidal, A.; Peyrode, C.; Besse, S.; Dauplat, M.-M.; Heymann, M.-F.; Gouin, F.; Chezal, J.-M.; Heymann, D.; et al. 99mTc-NTP 15-5 Assessment of the Early Therapeutic Response of Chondrosarcoma to Zoledronic Acid in the Swarm Rat Orthotopic Model. *EJNMMI Res.* **2013**, *3* (1), 40. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-3-40>.
- (277) Miot-Noirault, E.; Guicheux, J.; Vidal, A.; Gauthier, O.; Auzeloux, P.; Lesoeur, J.; Cachin, F.; Askienazy, S.; Chezal, J. M.; Vinatier, C. In Vivo Experimental Imaging of Osteochondral Defects and Their Healing Using 99mTc-NTP 15-5 Radiotracer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39* (7), 1169–1172. <https://doi.org/10.1007/s00259-012-2081-4>.
- (278) Miot-Noirault, E.; Vidal, A.; Pastoureau, P.; Bonafous, J.; Chomel, A.; Sarry, L.; Audin, L.; Madelmont, J.-C.; Moins, N. Early Detection and Monitoring of Cartilage Alteration in the Experimental Meniscectomised Guinea Pig Model of Osteoarthritis by 99mTc-NTP 15-5 Scintigraphy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34* (8), 1280–1290. <https://doi.org/10.1007/s00259-006-0320-2>.
- (279) Khairnar, A.; Marchand, F.; Vidal, A.; Etienne, M.; Miladi, I.; Auzeloux, P.; Cachin, F.; Eschalier, A.; Chezal, J.-M.; Ardid, D.; et al. 99mTc-NTP 15-5 Imaging for Cartilage Involvement in Experimental Rheumatoid Arthritis: Comparison with Routinely Used Molecular Imaging Methods and Sensitivity to Chronic Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Treatment. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (5), 798–804. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.151415>.
- (280) Cachin, F.; Boisgard, S.; Vidal, A.; Filaire, M.; Auzeloux, P.; Culot, D.; Askienazy, S.; Madelmont, J.-C.; Chezal, J.-M.; Miot-Noirault, E. First Ex Vivo Study Demonstrating That 99mTc-NTP 15-5 Radiotracer Binds to Human Articular Cartilage. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38* (11), 2077–2082. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-1890-1>.
- (281) Sadri, N.; Zhang, P. Hypoxia-Inducible Factors: Mediators of Cancer Progression; Prognostic and Therapeutic Targets in Soft Tissue Sarcomas. *Cancers* **2013**, *5* (4), 320–333. <https://doi.org/10.3390/cancers5020320>.
- (282) Vaupel, P. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *The Oncologist* **2004**, *9* (suppl_5), 10–17. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-90005-10>.
- (283) Powis, G.; Kirkpatrick, L. Hypoxia Inducible Factor-1 α as a Cancer Drug Target. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3* (5), 647–654.
- (284) Zeng, W.; Wan, R.; Zheng, Y.; Singh, S. R.; Wei, Y. Hypoxia, Stem Cells and Bone Tumor. *Cancer Lett.* **2011**, *313* (2), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.09.023>.
- (285) Wilson, W. R.; Hay, M. P. Targeting Hypoxia in Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11* (6), 393–410. <https://doi.org/10.1038/nrc3064>.

Références bibliographiques

- (286) Guise, C. P.; Mowday, A. M.; Ashoorzadeh, A.; Yuan, R.; Lin, W.-H.; Wu, D.-H.; Smaill, J. B.; Patterson, A. V.; Ding, K. Bioreductive Prodrugs as Cancer Therapeutics: Targeting Tumor Hypoxia. *Chin. J. Cancer* **2014**, *33* (2), 80–86. <https://doi.org/10.5732/cjc.012.10285>.
- (287) Baran, N.; Konopleva, M. Molecular Pathways: Hypoxia-Activated Prodrugs in Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23* (10), 2382–2390. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0895>.
- (288) Wagner, M. J.; Livingston, J. A.; Patel, S. R.; Benjamin, R. S. Chemotherapy for Bone Sarcoma in Adults. *J. Oncol. Pract.* **2016**, *12* (3), 208–216. <https://doi.org/10.1200/JOP.2015.009944>.
- (289) Matteucci, M.; Duan, J.-X.; Jiao, H.; Kaizerman, J.; Ammons, S. Phosphoramidate Alkylator Prodrugs. WO2007002931 (A2), January 4, **2007**.
- (290) Springer, J. B.; Michael Colvin, O.; Ludeman, S. M. Synthesis of [3H,33P]-Phosphoramidate and -Isophosphoramidate Mustards and Metabolites [3H]-Chloroethylaziridine and -Aziridine for Studies of DNA Alkylation. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2007**, *50* (2), 79–84. <https://doi.org/10.1002/jlcr.1157>.
- (291) Hu, L. Nitroaryl Phosphoramidate Compositions and Methods for Targeting and Inhibiting Undesirable Cell Growth or Proliferation. US20040214798A1, October 28, **2004**.
- (292) Hu, L.; Yu, C.; Jiang, Y.; Han, J.; Li, Z.; Browne, P.; Race, P. R.; Knox, R. J.; Searle, P. F.; Hyde, E. I. Nitroaryl Phosphoramidates as Novel Prodrugs for *E. Coli* Nitroreductase Activation in Enzyme Prodrug Therapy. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (23), 4818–4821. <https://doi.org/10.1021/jm034133h>.
- (293) Zhang, W.; Fan, W.; Zhou, Z.; Garrison, J. Synthesis and Evaluation of Radiolabeled Phosphoramidate Mustard with Selectivity for Hypoxic Cancer Cells. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (12), 1269–1274. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00355>.
- (294) Duan, J.-X.; Jiao, H.; Kaizerman, J.; Stanton, T.; Evans, J. W.; Lan, L.; Lorente, G.; Banica, M.; Jung, D.; Wang, J.; et al. Potent and Highly Selective Hypoxia-Activated Achiral Phosphoramidate Mustards as Anticancer Drugs. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (8), 2412–2420. <https://doi.org/10.1021/jm701028q>.
- (295) Jain, M.; Fan, J.; Baturay, N. Z.; Kwon, C.-H. Sulfonyl-Containing Aldophosphamide Analogues as Novel Anticancer Prodrugs Targeted against Cyclophosphamide-Resistant Tumor Cell Lines. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (15), 3843–3852. <https://doi.org/10.1021/jm0304764>.
- (296) Mulcahy, R. T.; Gipp, J. J.; Schmidt, J. P.; Joswig, C.; Borch, R. F. Nitrobenzyl Phosphorodiamidates as Potential Hypoxia-Selective Alkylating Agents. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (11), 1610–1615. <https://doi.org/10.1021/jm00037a011>.
- (297) Misiura, K.; Szymanowicz, D.; Kuœnierczyk, H.; Wietrzyk, J.; Opolski, A. Isophosphoramidate Mustard Analogues as Prodrugs for Anti- Cancer Gene-Directed Enzyme-Prodrug Therapy (GDEPT)*. **2002**, *49*, 8.
- (298) O'Connor, L. J.; Cazares-Körner, C.; Saha, J.; Evans, C. N. G.; Stratford, M. R. L.; Hammond, E. M.; Conway, S. J. Efficient Synthesis of 2-Nitroimidazole Derivatives and the Bioreductive Clinical Candidate Evofosfamide (TH-302). *Org. Chem. Front.* **2015**, *2* (9), 1026–1029. <https://doi.org/10.1039/C5QO00211G>.
- (299) Chen, X.; Yuan, J.; Wang, J.; Qu, L.; Yu, Z.; Zhao, Y. A Convenient Synthesis of Chrysin-7-Yl Aryl *N*-Bis(2-Chloroethyl) Phosphoramidate. *J. Chem. Res.* **2010**, *34* (7), 407–409. <https://doi.org/10.3184/030823410X12790414891526>.

Références bibliographiques

- (300) Chen, R.-Y.; Wang, H.-L.; Zhou, J. Synthesis and Properties of Novel Amino Acid Linked Phosphoryl Nitrogen Mustard Derivatives. *Heteroat. Chem.* **1994**, *5* (5–6), 497–501. <https://doi.org/10.1002/hc.520050513>.
- (301) Liuji, Z.; Lingbo, Q.; Baojun, Z.; Xiaolan, C.; Yufen, Z. A Convenient Method for the Synthesis of Cyclophosphamide Analogues. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2008**, *183* (2–3), 799–803. <https://doi.org/10.1080/10426500701808200>.
- (302) Ghedira, D.; Voissière, A.; Peyrode, C.; Kraiem, J.; Gerard, Y.; Maubert, E.; Vivier, M.; Miot-Noirault, E.; Chezal, J.-M.; Farhat, F.; et al. Structure-Activity Relationship Study of Hypoxia-Activated Prodrugs for Proteoglycan-Targeted Chemotherapy in Chondrosarcoma. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 51–67. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.060>.
- (303) Borch, R. F.; Valente, R. R. Synthesis, Activation, and Cytotoxicity of Aldophosphamide Analogs. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (10), 3052–3058. <https://doi.org/10.1021/jm00114a014>.
- (304) Herr, R. J.; Zhichkin, P.; Hernández-Abad, P. E.; Meckler, H.; Schow, S. R. An Efficient Synthesis of 2-Hydroxyethyl *N,N,N',N'*-Tetrakis(2-Chloroethyl)Phosphorodiamidate. *Org. Process Res. Dev.* **2001**, *5* (4), 442–444. <https://doi.org/10.1021/op010208k>.
- (305) Gale, R. P. Salts of Isophosphoramidate Mustard and Analogs Thereof as Anti-Tumor Agents. US20110118209A1, May 19, **2011**.
- (306) Lorenz, P.; Wiessler, M. Synthesen von *N,N*-Di(2-chlorethyl)-*N'*-alkylphosphorsäurediamiden. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1985**, *318* (7), 577–582. <https://doi.org/10.1002/ardp.19853180702>.
- (307) Waligora, F. W.; Amedio, J. C. Synthesis and Formulations of Salts of Isophosphoramidate Mustard and Analogs Thereof. US8664201B2, March 4, **2014**.
- (308) Kim, H.; Hwang, Y. J.; Han, I.; Joo, J. M. Regioselective C–H Alkenylation of Imidazoles and Its Application to the Synthesis of Unsymmetrically Substituted Benzimidazoles. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (50), 6879–6882. <https://doi.org/10.1039/C8CC02405G>.
- (309) Bellina, F.; Manzini, C.; Marianetti, G.; Pezzetta, C.; Fanizza, E.; Lessi, M.; Minei, P.; Barone, V.; Pucci, A. Colourless p -Phenylene-Spaced Bis-Azoles for Luminescent Concentrators. *Dyes Pigments* **2016**, *134*, 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.07.005>.
- (310) Duddu, Rm.-S.; Zhang, M.-X.; Damavarapu, R.; Gelber, N. Molten-State Nitration of Substituted Imidazoles: New Synthetic Approaches to the Novel Melt-Cast Energetic Material, 1-Methyl-2,4,5-Trinitroimidazole. *N. Y.* **2011**, No. 17, 6.
- (311) Davis, D. P.; Kirk, K. L.; Cohen, L. A. New Synthesis of 2-Nitroimidazoles. *J. Heterocycl. Chem.* **1982**, *19* (2), 253–256. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570190206>.
- (312) Ramalingam, K.; Raju, N.; Nanjappan, P.; Nowotnik, D. P. Synthesis of Nitroimidazole Substituted 3,3,9,9-Tetramethyl-4,8-Diazaundecane-2,10-Dione Dioximes (Propylene Amine Oximes, PnAOs): Ligands for Technetium-99m Complexes with Potential for Imaging Hypoxic Tissue. *Tetrahedron* **1995**, *51* (10), 2875–2894. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00042-7](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00042-7).
- (313) He, Y.; Chen, Y.; Du, H.; Schmid, L. A.; Lovely, C. J. A Convenient Synthesis of 1,4-Disubstituted Imidazoles. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (28), 5529–5532. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.05.011>.
- (314) Chen, S.; Graceffa, R. F.; Boezio, A. A. Direct, Regioselective *N*-Alkylation of 1,3-Azoles. *Org. Lett.* **2016**, *18* (1), 16–19. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02994>.
- (315) Gracias, V.; Gasiiecki, A. F.; Djuric, S. W. Synthesis of Fused Bicyclic Imidazoles by Sequential Van Leusen/Ring-Closing Metathesis Reactions. *Org Lett* **2005**, *7* (15), 4.

Références bibliographiques

- (316) Gupta, R. R.; Kumar, M.; Gupta, V. Five-Membered Heterocycles with Two Heteroatoms. In *Heterocyclic Chemistry*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1999**; pp 357–486. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07757-3_4.
- (317) Frantz, D. E.; Morency, L.; Soheili, A.; Murry, J. A.; Grabowski, E. J. J.; Tillyer, R. D. Synthesis of Substituted Imidazoles via Organocatalysis. *Org. Lett.* **2004**, *6* (5), 843–846. <https://doi.org/10.1021/ol0498803>.
- (318) Wang, Q.-D.; Yang, J.-M.; Zhou, B.; Fang, D.; Ren, J.; Zeng, B.-B. Highly Regioselective Debus-Radziszewski Reaction of C-3 Indole-Substituted 1,2-Diketones: Facile Synthesis of 3-(1,2,4-Triaryl-1 H -Imidazol-5-Yl)-Indoles. *ChemistrySelect* **2017**, *2* (17), 4807–4810. <https://doi.org/10.1002/slct.201700612>.
- (319) Weidenhagen Synthesis: (Weidenhagen Reaction, Weidenhagen Imidazole Synthesis). In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2010**. <https://doi.org/10.1002/9780470638859.conrr659>.
- (320) Kanazawa, C.; Kamijo, S.; Yamamoto, Y. Synthesis of Imidazoles through the Copper-Catalyzed Cross-Cycloaddition between Two Different Isocyanides. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (33), 10662–10663. <https://doi.org/10.1021/ja0617439>.
- (321) Laufer, M.; Hauser, D. R. J.; Liedtke, A. J. Regiospecific and Highly Flexible Synthesis of 1,4,5-Trisubstituted 2-Sulfanylimidazoles from Structurally Diverse Ethanone Precursors. *N. Y.* **2008**, No. 2, 14.
- (322) O'Connor, L. J.; Cazares-Korner, C.; Saha, J.; Evans, C. N. G.; Stratford, M. R. L.; Hammond, E. M.; Conway, S. J. Design, Synthesis and Evaluation of Molecularly Targeted Hypoxia-Activated Prodrugs. *Nat Protoc.* **2016**, *11* (4), 781–794.
- (323) Siamaki, A. R.; Arndtsen, B. A. A Direct, One Step Synthesis of Imidazoles from Imines and Acid Chlorides: A Palladium Catalyzed Multicomponent Coupling Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (18), 6050–6051. <https://doi.org/10.1021/ja060705m>.
- (324) Rahm, M.; Bélanger-Chabot, G.; Haiges, R.; Christe, K. O. Nitryl Cyanide, NCNO₂. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (27), 6893–6897. <https://doi.org/10.1002/anie.201404209>.
- (325) de Figueiredo, R. M.; Coudray, L.; Dubois, J. Synthesis and Biological Evaluation of Potential Bisubstrate Inhibitors of Protein Farnesyltransferase. Design and Synthesis of Functionalized Imidazoles. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (20), 3299. <https://doi.org/10.1039/b709854e>.
- (326) Parveen, I.; Naughton, D. P.; Whish, W. J. D.; Threadgill, M. D. 2-Nitroimidazol-5-Ylmethyl as a Potential Bioreductively Activated Prodrug System: Reductively Triggered Release of the Parp Inhibitor 5-Bromoisoquinolinone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (14), 2031–2036. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(99\)00306-6](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00306-6).
- (327) Cavalleri, B.; Ballotta, R.; Lancini, G. C. Synthesis of 1-Alkyl-2-Nitroimidazole-5-Carboxaldehydes. *J. Heterocycl. Chem.* **1972**, *9* (5), 979–984. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570090502>.
- (328) Webert, J.-M.; Cagniant, D.; Cagniant, P.; Kirsch, G.; Weber, J.-V. Synthèse d'analogues bihétérocycliques du phénanthrène: Les méthyl-1-[1]benzothinéo, benzoséléno[2,3-b]pyrroles, et méthyl-1-[1]benzofuro, benzothiéno et benzoséléno[3,2-b]pyrroles. *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, *20* (1), 49–53. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570200112>.
- (329) Milcent, R.; Chau, F. *Chimie organique hétérocyclique (Structures fondamentales)*; EDP Sciences, **2012**.
- (330) Voissiere, A.; Weber, V.; Gerard, Y.; Rédini, F.; Raes, F.; Chezal, J.-M.; Degoul, F.; Peyrode, C.; Miot-Noirault, E. Proteoglycan-Targeting Applied to Hypoxia-Activated Prodrug Therapy in

Références bibliographiques

- Chondrosarcoma: First Proof-of-Concept. *Oncotarget* **2017**, *8* (56). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21337>.
- (331) Niu, H.-Y.; Bai, S.-X.; Wu, S.; Qu, G.-R.; Guo, H.-M. Synthesis of Chiral N-(Purin-6-Yl)Amino Acid Derivatives by Using Natural Amino Acids as Starting Materials. *Asian J. Org. Chem.* **2012**, *1* (3), 238–244. <https://doi.org/10.1002/ajoc.201200081>.
- (332) Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Sozzani, P. Reduction of Esters to Alcohols by Means of Sodium Borohydride in Polyethylene Glycols. *J. Org. Chem.* **1981**, *46* (22), 4584–4585. <https://doi.org/10.1021/jo00335a058>.
- (333) Soai, K.; Ookawa, A. Mixed Solvents Containing Methanol as Useful Reaction Media for Unique Chemoselective Reductions with Lithium Borohydride. **1986**, *51* (21), 4000–4005.
- (334) Yeu, J.-P.; Yeh, J.-T.; Chen, T.-Y.; Uang, B.-J. An Expedient Synthesis of 1-[3-(Dimethylamino)Propyl]-5-Methyl-3-Phenyl-1H-Indazole (FS-32) - An Antidepressant. *Synthesis* **2001**, *2001* (12), 1775–1777. <https://doi.org/10.1055/s-2001-17517>.
- (335) Lee, M.; Rucil, T.; Heseck, D.; Oliver, A. G.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. Regioselective Control of the S_NAr Amination of 5-Substituted-2,4-Dichloropyrimidines Using Tertiary Amine Nucleophiles. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (15), 7757–7763. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01044>.
- (336) Ebden, M. R.; Simpkins, N. S.; Fox, D. N. A. Metallation of Benzylic Amines via Amine-Borane Complexes. **1998**, 30.
- (337) Richard, J.; Birepinte, M.; Charbonnier, J.; Liautard, V.; Pinet, S.; Pucheault, M. Borinic Acids via Direct Arylation of Amine-Borane Complexes: An Air- and Water-Stable Boron Source. *Synthesis* **2016**, *49* (04), 736–744. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1588345>.
- (338) Allan, K. M.; Spencer, J. L. Synthesis and Characterisation of Novel O-Xylene-Based P,E Ligands. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (6), 956–964. <https://doi.org/10.1039/C3OB42244E>.
- (339) Renn, O.; Meares, C. F. Large-Scale Synthesis of the Bifunctional Chelating Agent 2-(p-Nitrobenzyl)-1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-Tetraacetic Acid, and the Determination of Its Enantiomeric Purity by Chiral Chromatography. *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3* (6), 563–569. <https://doi.org/10.1021/bc00018a017>.
- (340) Brown, H. C.; Choi, Y. M.; Narasimhan, S. Selective Reductions. 29. A Simple Technique to Achieve an Enhanced Rate of Reduction of Representative Organic Compounds by Borane-Dimethyl Sulfide. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (16), 3153–3163. <https://doi.org/10.1021/jo00137a025>.
- (341) Choi, S.; Bruce, I.; Fairbanks, A. J.; Fleet, G. W. J.; Jones, A. H.; Nash, R. J.; Fellows, L. E. Alexines from Heptonolactones. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (40), 5517–5520. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)80072-E](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)80072-E).
- (342) Brayer, J.-L.; Alazard, J.-P.; Thal, C. Alcaloïdes Monoterpéniques: Synthèse Stéréospécifique de La Δ-7(7a) 4a-BH Isotécomanine. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29* (6), 643–646. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)80171-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)80171-9).
- (343) Schwartz, M. A.; Rose, B. F.; Vishnuvajjala, Baburao. Intramolecular Oxidative Phenol Coupling. III. Two-Electron Oxidation with Thallium(III) Trifluoroacetate. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (2), 612–613. <https://doi.org/10.1021/ja00783a064>.
- (344) Collins, C. J.; Lanz, M.; Goralski, C. T.; Singaram, B. Aminoborohydrides. 10. The Synthesis of Tertiary Amine-Boranes from Various Benzyl Halides and Lithium N,N - Dialkylaminoborohydrides. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (7), 2574–2576. <https://doi.org/10.1021/jo982176d>.

Références bibliographiques

- (345) Couturier, M.; Tucker, J. L.; Andresen, B. M.; Dubé, P.; Negri, J. T. Palladium and Raney Nickel Catalyzed Methanolic Cleavage of Stable Borane–Amine Complexes. *Org. Lett.* **2001**, *3* (3), 465–467. <https://doi.org/10.1021/ol006969+>.
- (346) Brenneman, J. B.; Ginn, J. D.; Sarko, C. R.; Westbrook, J.; Zhang, Z.; Yu, M.; HOPKINS, T. D.; Lowe, M. D. Heterocyclic Carboxylic Acids as Activators of Soluble Guanylate Cyclase. WO2016014463A1, January 28, **2016**.
- (347) Donello, J. E.; Yang, R.; Leblond, B.; Beausoleil, E.; Casagrande, A.-S.; DESIRE, L. J. R.; Pando, M. P.; Chauvignac, C.; Taverne, T. Substituted 6,7-Dialkoxy-3-Isoquinolinol Derivatives as Inhibitors of Phosphodiesterase 10 (Pde10a). WO2012112946A1, August 23, **2012**.
- (348) Yang, W.; Cui, Y.-M.; Zou, J.-F.; Wang, C.-Y.; Huang, W.-S.; Zhang, J.; Xu, L.-W. Investigation of the Mitsunobu Reaction of BINOL and Cinchona Alkaloids: Inversion or Retention of Configuration? *Synth. Commun.* **2014**, *44* (21), 3173–3182. <https://doi.org/10.1080/00397911.2014.930494>.
- (349) Simon, C.; Hosztafi, S.; Makleit, S. Stereoselective Synthesis of β -Naltrexol, β -Naloxol β -Naloxamine, β -Naltrexamine and Related Compounds by the Application of the Mitsunobu Reac. *Tetrahedron* **1994**, *50* (32), 9757–9768. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)85541-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)85541-1).
- (350) Fletcher, S. The Mitsunobu Reaction in the 21st Century. *Org. Chem. Front.* **2015**, *2* (6), 739–752. <https://doi.org/10.1039/C5QO00016E>.
- (351) Goldwhite, H. *Introduction to Phosphorous Chemistry*; CUP Archive, **1981**.
- (352) Tam, A.; Soellner, M. B.; Raines, R. T. Water-Soluble Phosphinothiols for Traceless Staudinger Ligation and Integration with Expressed Protein Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (37), 11421–11430. <https://doi.org/10.1021/ja073204p>.
- (353) Che, Q.; Zhou, L.; Wang, J. Fabrication and Characterization of Phosphoric Acid Doped Imidazolium Ionic Liquid Polymer Composite Membranes. *J. Mol. Liq.* **2015**, *206*, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.01.054>.
- (354) Jiao, H.; Lewis, J.; Matteucci, M.; Sun, D. Hypoxia Activated Prodrugs of Antineoplastic Agents. WO2008151253 (A1), December 11, **2008**.
- (355) Sheppard, G. S.; Wang, J.; Kawai, M.; Fidanze, S. D.; BaMaung, N. Y.; Erickson, S. A.; Barnes, D. M.; Tedrow, J. S.; Kolaczowski, L.; Vasudevan, A.; et al. Discovery and Optimization of Anthranilic Acid Sulfonamides as Inhibitors of Methionine Aminopeptidase-2: A Structural Basis for the Reduction of Albumin Binding. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (13), 3832–3849. <https://doi.org/10.1021/jm0601001>.
- (356) *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations Vol. 48: Alkanes*; Georg Thieme Verlag, **2014**.
- (357) Valdez, C. A.; Tripp, J. C.; Miyamoto, Y.; Kalisiak, J.; Hruz, P.; Andersen, Y. S.; Brown, S. E.; Kangas, K.; Arzu, L. V.; Davids, B. J.; et al. Synthesis and Electrochemistry of 2-Ethenyl and 2-Ethanyl Derivatives of 5-Nitroimidazole and Antimicrobial Activity against *Giardia Lamblia*. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (13), 4038–4053. <https://doi.org/10.1021/jm900356n>.
- (358) Kraft, V.; Kretzschmar, G.; Rossen, K. Process for the Production of Artemisinin Intermediates. WO2011030223A2, March 17, **2011**.
- (359) Blakemore, P. R.; Kim, S.-K.; Schulze, V. K.; White, J. D.; Yokochi, A. F. T. Asymmetric Synthesis of (+)-Loline, a Pyrrolizidine Alkaloid from Rye Grass and Tall Fescue. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **2001**, No. 15, 1831–1847. <https://doi.org/10.1039/b103936a>.

Références bibliographiques

- (360) Hernick, M.; Flader, C.; Borch, R. F. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Indolequinone Phosphoramidate Prodrugs Targeted to DT-Diaphorase. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (16), 3540–3548. <https://doi.org/10.1021/jm020191b>.
- (361) McGuigan, C.; Bourdin, C.; Derudas, M.; Hamon, N.; Hinsinger, K.; Kandil, S.; Madela, K.; Meneghesso, S.; Pertusati, F.; Serpi, M.; et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Phosphorodiamidate Prodrugs of Antiviral and Anticancer Nucleosides. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 326–340. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.047>.
- (362) Cooper, M. A. Optical Biosensors in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (7), 515–528. <https://doi.org/10.1038/nrd838>.
- (363) Global Burden of Disease Cancer Collaboration; Fitzmaurice, C.; Akinyemiju, T. F.; Al Lami, F. H.; Alam, T.; Alizadeh-Navaei, R.; Allen, C.; Alsharif, U.; Alvis-Guzman, N.; Amini, E.; et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* **2018**. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2706>.
- (364) Cancer de la prostate - Prise en charge - VIDAL eVIDAL https://evidal-vidal-fr/recos/details/3395/cancer_de_la_prostate/prise_en_charge (accessed Sep 23, **2018**).
- (365) Cancers de la prostate : les symptômes et le diagnostic | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer /cancers-prostate-symptomes-et-diagnostic (accessed Aug 26, **2018**).
- (366) Parker, C.; Gillissen, S.; Heidenreich, A.; Horwich, A. Cancer of the Prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2015**, *26* (suppl 5), v69–v77. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv222>.
- (367) Cheng, L.; Montironi, R.; Bostwick, D. G.; Lopez-Beltran, A.; Berney, D. M. Staging of Prostate Cancer. *Histopathology* **2012**, *60* (1), 87–117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.04025.x>.
- (368) Leuret, T.; Méjean, A. Les sites métastatiques atypiques des cancers de la prostate. *Prog. En Urol.* **2008**, *18*, S357–S364. [https://doi.org/10.1016/S1166-7087\(08\)74567-6](https://doi.org/10.1016/S1166-7087(08)74567-6).
- (369) Salomon, L. Le score de Gleason pour les nuls. *Prog. En Urol. - FMC* **2014**, *24* (1), F13–F15. <https://doi.org/10.1016/j.fpurol.2013.06.004>.
- (370) Harnden, P.; Shelley, M. D.; Coles, B.; Staffurth, J.; Mason, M. D. Should the Gleason Grading System for Prostate Cancer Be Modified to Account for High-Grade Tertiary Components? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Oncol.* **2007**, *8* (5), 411–419. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70136-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70136-5).
- (371) Deshayes, E.; Roumiguie, M.; Thibault, C.; Beuzeboc, P.; Cachin, F.; Hennequin, C.; Huglo, D.; Rozet, F.; Kassab-Chahmi, D.; Rebillard, X.; et al. Radium 223 Dichloride for Prostate Cancer Treatment. *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, *Volume 11*, 2643–2651. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S122417>.
- (372) HIFU traitement du cancer de la prostate par ultrasons focalisés de haute intensité | Urofrance <https://www.urofrance.org/nc/lurologie-grandpublic/fiches-patient/resultats-de-la-recherche/html/hifu-traitement-du-cancer-de-la-prostate-par-ultrasons-focalises-de-haute-intensite.html> (accessed Sep 23, **2018**).
- (373) Petrylak, D. P. Docetaxel for the Treatment of Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Rev. Urol.* **2003**, *5* (Suppl 2), S14–S21.

Références bibliographiques

- (374) Antonarakis, E.; Schweizer, M. Chemotherapy and Its Evolving Role in the Management of Advanced Prostate Cancer. *Asian J. Androl.* **2014**, *16* (3), 334. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122593>.
- (375) Tannock, I. F.; Horti, J.; Oudard, S.; James, N. D.; Rosenthal, M. A. Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *11*.
- (376) Petrylak, D. P.; Lara, P. N.; Burch, P. A.; Kohli, M.; Raghavan, D. Docetaxel and Estramustine Compared with Mitoxantrone and Prednisone for Advanced Refractory Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *8*.
- (377) Seruga, B.; Ocana, A.; Tannock, I. F. Drug Resistance in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *8* (1), 12–23. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.136>.
- (378) Yap, T. A.; Pezaro, C. J.; Bono, J. S. de. Cabazitaxel in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2012**, *12* (9), 1129–1136. <https://doi.org/10.1586/era.12.88>.
- (379) Goldstein, N. S. Immunophenotypic Characterization of 225 Prostate Adenocarcinomas With Intermediate or High Gleason Scores. *Am. J. Clin. Pathol.* **2002**, *117* (3), 471–477. <https://doi.org/10.1309/G6PR-Y774-X738-FG2K>.
- (380) Mansi, L.; Thiery-Vuillemin, A.; Kalbacher, E.; Nguyen, T.; Maurina, T.; Nallet, J.; Kim, S.; Borg, C.; Kleinclauss, F.; Pivot, X.; et al. L'immunothérapie : une nouvelle approche dans la prise en charge du cancer de prostate résistant à la castration. *Bull. Cancer (Paris)* **2015**, *99* (1S), 57–65. <https://doi.org/10.1684/bdc.2012.1564>.
- (381) Provenge European Medicines Agency <https://www.ema.europa.eu/medicines/human/EPAR/provenge> (accessed Oct 8, **2018**).
- (382) Movsas, B.; Chapman, J. D.; Greenberg, R. E.; Hanlon, A. L.; Horwitz, E. M.; Pinover, W. H.; Stobbe, C.; Hanks, G. E. Increasing Levels of Hypoxia in Prostate Carcinoma Correlate Significantly with Increasing Clinical Stage and Patient Age: An Eppendorf PO(2) Study. *Cancer* **2000**, *89* (9), 2018–2024.
- (383) Lekas, A.; Lazaris, A. C.; Deliveliotis, C.; Chrisofos, M.; Zoubouli, C.; Lapas, D.; Papatthomas, T.; Fokitis, I.; Nakopoulou, L. The Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) and Angiogenesis Markers in Hyperplastic and Malignant Prostate Tissue. *ANTICANCER Res.* **2006**, *5*.
- (384) Ranasinghe, W. K. B.; Xiao, L.; Kovac, S.; Chang, M.; Michiels, C.; Bolton, D.; Shulkes, A.; Baldwin, G. S.; Patel, O. The Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 α in Determining the Properties of Castrate-Resistant Prostate Cancers. *PLoS ONE* **2013**, *8* (1), e54251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054251>.
- (385) Huang, M.; Du, H.; Zhang, L.; Che, H.; Liang, C. The Association of HIF-1 α ; Expression with Clinicopathological Significance in Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *Cancer Manag. Res.* **2018**, *Volume 10*, 2809–2816. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S161762>.
- (386) Eppard, E.; de la Fuente, A.; Benešová, M.; Khawar, A.; Bundschuh, R. A.; Gärtner, F. C.; Kreppel, B.; Kopka, K.; Essler, M.; Rösch, F. Clinical Translation and First In-Human Use of [⁴⁴Sc]Sc-PSMA-617 for PET Imaging of Metastasized Castrate-Resistant Prostate Cancer. *Theranostics* **2017**, *7* (18), 4359–4369. <https://doi.org/10.7150/thno.20586>.
- (387) Umbricht, C. A.; Benešová, M.; Schmid, R. M.; Türlér, A.; Schibli, R.; van der Meulen, N. P.; Müller, C. 44Sc-PSMA-617 for Radiotheragnostics in Tandem with 177Lu-PSMA-617—

Références bibliographiques

- Preclinical Investigations in Comparison with 68Ga-PSMA-11 and 68Ga-PSMA-617. *EJNMMI Res.* **2017**, 7 (1). <https://doi.org/10.1186/s13550-017-0257-4>.
- (388) Rathke, H.; Bronzel, M.; Mier, W.; Kopka, K.; Giesel, F.; Haberkorn, U.; Kratochwil, C. First Clinical Experience with 90Y-PSMA-617 - Is There a Rationale for Varying the Radionuclide in PSMA-RLT? *J. Nucl. Med.* **2018**, 59 (supplement 1), 527–527.
- (389) Kratochwil, C.; Bruchertseifer, F.; Giesel, F. L.; Weis, M.; Verburg, F. A.; Mottaghy, F.; Kopka, K.; Apostolidis, C.; Haberkorn, U.; Morgenstern, A. 225Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted - Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2016**, 57 (12), 1941–1944. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.178673>.
- (390) Benešová, M.; Bauder-Wüst, U.; Schäfer, M.; Klika, K. D.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M. Linker Modification Strategies To Control the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeting and Pharmacokinetic Properties of DOTA-Conjugated PSMA Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (5), 1761–1775. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01210>.
- (391) Vlahov, I. R.; Reddy, J. A.; BLOOMFIELD, A.; DORTON, R.; NELSON, M.; VETZEL, M.; Leamon, C. P. Conjugates for Treating Diseases Caused by PsmA Expressing Cells. WO2014078484A1, May 22, **2014**.
- (392) Babich, J. W.; Kelly, J. M.; Amor-Coarasa, A.; Ponnala, S. 18f-Labeled Triazole Containing PsmA Inhibitors. US20170369454A1, December 28, **2017**.
- (393) Pearce, A. K.; Rolfe, B. E.; Russell, P. J.; Tse, B. W.-C.; Whittaker, A. K.; Fuchs, A. V.; Thurecht, K. J. Development of a Polymer Theranostic for Prostate Cancer. *Polym Chem* **2014**, 5 (24), 6932–6942. <https://doi.org/10.1039/C4PY00999A>.
- (394) Murelli, R. P.; Zhang, A. X.; Michel, J.; Jorgensen, W. L.; Spiegel, D. A. Chemical Control over Immune Recognition: A Class of Antibody-Recruiting Small Molecules That Target Prostate Cancer. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (47), 17090–17092. <https://doi.org/10.1021/ja906844e>.
- (395) McEnaney, P. J.; Fitzgerald, K. J.; Zhang, A. X.; Douglass, E. F.; Shan, W.; Balog, A.; Kolesnikova, M. D.; Spiegel, D. A. Chemically Synthesized Molecules with the Targeting and Effector Functions of Antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (52), 18034–18043. <https://doi.org/10.1021/ja509513c>.
- (396) Cleeren, F.; Lecina, J.; Billaud, E. M. F.; Ahamed, M.; Verbruggen, A.; Bormans, G. M. New Chelators for Low Temperature Al ¹⁸ F-Labeling of Biomolecules. *Bioconjug. Chem.* **2016**, 27 (3), 790–798. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00012>.
- (397) Kommidi, H.; Guo, H.; Nurili, F.; Vedvyas, Y.; Jin, M. M.; McClure, T. D.; Ehdai, B.; Sayman, H. B.; Akin, O.; Aras, O.; et al. ¹⁸ F-Positron Emitting/Trimethine Cyanine-Fluorescent Contrast for Image-Guided Prostate Cancer Management. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (9), 4256–4262. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00240>.
- (398) Darwish, A.; Blacker, M.; Janzen, N.; Rathmann, S. M.; Czorny, S.; Hillier, S. M.; Joyal, J. L.; Babich, J. W.; Valliant, J. F. Triazole Appending Agent (TAAG): A New Synthone for Preparing Iodine-Based Molecular Imaging and Radiotherapy Agents. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3 (4), 313–316. <https://doi.org/10.1021/ml300003v>.
- (399) Benešová, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Afshar-Oromieh, A.; Kratochwil, C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2015**, 56 (6), 914–920. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.147413>.
- (400) Krapf, P.; Richarz, R.; Urusova, E. A.; Neumaier, B.; Zlatopolskiy, B. D. Seyferth-Gilbert Homologation as a Route to ¹⁸ F-Labeled Building Blocks: Preparation of Radiofluorinated

Références bibliographiques

- Phenylacetylenes and Their Application in PET Chemistry. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (3), 430–433. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501377>.
- (401) Kim, C.; Axup, J.; Yun, H.; Schultz, P.; Ma, J.; Shen, J.; Yang, P. Targeting Agent Antibody Conjugates and Uses Thereof. WO2014153164 (A1), September 25, **2014**.
- (402) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **2004**, 6 (17), 2853–2855. <https://doi.org/10.1021/ol0493094>.
- (403) Cheng, K.; Wang, X.; Yin, H. Small-Molecule Inhibitors of the TLR3/DsRNA Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (11), 3764–3767. <https://doi.org/10.1021/ja111312h>.
- (404) García-Reynaga, P.; VanNieuwenhze, M. S. A New Total Synthesis of Patellamide A. *Org. Lett.* **2008**, 10 (20), 4621–4623. <https://doi.org/10.1021/ol801895y>.
- (405) Mali, S. M.; Ganesh Kumar, M.; Katariya, M. M.; Gopi, H. N. HBTU Mediated 1-Hydroxybenzotriazole (HOBt) Conjugate Addition: Synthesis and Stereochemical Analysis of β -Benzotriazole N-Oxide Substituted γ -Amino Acids and Hybrid Peptides. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12 (42), 8462–8472. <https://doi.org/10.1039/C4OB01548G>.
- (406) Siegel, R.; Ma, J.; Zou, Z.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2014. *CA. Cancer J. Clin.* **2014**, 64 (1), 9–29. <https://doi.org/10.3322/caac.21208>.
- (407) Schröder, F. H.; Hugosson, J.; Roobol, M. J.; Tammela, T. L. J.; Zappa, M.; Nelen, V.; Kwiatkowski, M.; Lujan, M.; Määttänen, L.; Lilja, H.; et al. Screening and Prostate Cancer Mortality: Results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 Years of Follow-Up. *The Lancet* **2014**, 384 (9959), 2027–2035. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60525-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60525-0).
- (408) Duan, J.-X.; Matteucci, M.; Davar, N.; Andersen, D. Th-302 Solid Forms and Methods Related Thereto. WO2016011195A1, January 21, **2016**.

Le chondrosarcome (CHS), cancer du cartilage est une tumeur chimio- et radiorésistance dont le seul traitement efficace reste la chirurgie. Une prodrogue vectorisée et activable en hypoxie, **ICF05016**, est actuellement développée par l'UMR 1240, et évaluée en préclinique comme potentielle alternative thérapeutique pour ce cancer. La structure de cette molécule regroupe i) une moutarde cytotoxique, ii) un vecteur ammonium quaternaire chargé positivement possédant un tropisme pour l'aggrécane, protéoglycane majoritaire de la matrice extracellulaire tumorale, iii) une gâchette de type 2-nitroimidazole permettant une activation sélective en situation d'hypoxie, une des caractéristiques principales du CHS.

Ces travaux de thèse ont consisté à pharmacomoduler cette prodrogue bispécifique **ICF05016** en modifiant la position du vecteur ainsi que la nature de l'agent cytotoxique. Ainsi sept prodrogues vectorisées ont été synthétisées présentant une chaîne vectrice *N,N,N*-triméthylpropylammonium soit en *C-4*, soit en *N-1* du cycle imidazole. Leur activation par réduction chimique, mimant l'hypoxie, ainsi que leur affinité pour l'aggrécane ont été confirmées *in tubo* par des analyses de RMN ³¹P et de SPR, toutefois elles se sont avérées

Mots clés : chondrosarcome, relations structure-activités, ammonium quaternaire, prodrogue activable en hypoxie, PSMA, cancer de la prostate

non sélectives en termes de cytotoxicité (CI_{50} comprises entre 15 et 1 μ M, et ce, quelles que soient les conditions d'oxygénation) et faiblement sensibles à une bio-réduction enzymatique. La fonctionnalisation par un vecteur ammonium quaternaire de la gâchette 2-nitroimidazole annihile donc l'activation en hypoxie des prodrogues.

Cette stratégie a ensuite été étendue au cancer de la prostate en remplaçant le vecteur ammonium quaternaire par un ligand de type urée affin pour l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA). La première molécule synthétisée, qui possède un espaceur triazole, a démontré une affinité pour le récepteur PSMA, par une étude de compétition avec un radioligand, ainsi qu'une activation *in tubo* par bioréduction enzymatique. Toutefois aucune cytotoxicité n'a été constatée sur les lignées LNCaP-Luc et PC3-Luc. Une seconde molécule combinant un espaceur triazole avec une séquence peptidique identifiée pour la molécule PSMA-617, actuellement en cours d'essai clinique, est actuellement développée mais sa synthèse doit être optimisée, notamment au niveau de l'étape de cycloaddition 1,3-dipolaire.

Chondrosarcoma (CHS), the malignant tumor of the cartilage, is a chemo- and radio-resistant cancer. Surgical resection is still considered the mainstay of treatment of this pathology. A dual targeted hypoxia-activated prodrug, **ICF05016** was developed by the UMR 1240 and evaluated in preclinical studies as a potential therapeutic alternative for CHS. The latter is a nitroheteroaryl-based compound designed as follows: a phosphorodiamidic mustard functionalized with a quaternary ammonium (QA) used as targeting function, and a 2-nitroimidazole group to trigger fragmentation and then release the bis-alkylating mustard anion by bioreduction under hypoxic conditions, chemical hallmark of CHS.

This project deals with the pharmacomodulation of **ICF05016**, more specifically by modification of the position of the targeting moiety as well as the nature of the cytotoxic agent. Seven QA-targeted prodrugs have been synthesized with *N,N,N*-trimethylpropylammonium tethered to the imidazole either in the *C-4*, or the *N-1* position. These prodrugs were cleaved *in vitro* under chemical

Keywords : chondrosarcoma, structure-activity relationships, quaternary ammonium, hypoxia-activated prodrug, PSMA, prostate cancer

reductive conditions, which mimic *in vivo* hypoxia conditions. In addition, the binding of these derivatives to aggrecan was highlighted by surface plasmon resonance. *In vitro* assays on human CHS cells (H-EMC-SS) demonstrated quite equivalent cytotoxicities, whatever the oxygen conditions used and their evaluation as substrate of an oxygen-insensitive nitroreductase revealed the almost total lack of activation. A QA targeting moiety grafted on the trigger seems to alter hypoxia activation.

New prodrugs with prostate specific membrane antigen (PSMA)-targeting ligand were synthesized to extend this HAP strategy to prostate cancer. The first tested compound, having a triazole spacer, presented selective affinity for PSMA in an *in vitro* binding experiment as well as activation under enzymatic reduction. However, no cytotoxicity was observed on LNCaP-Luc and PC3-Luc cells. The synthesis of a prodrug combining the spacer of PSMA-617, currently in clinical trial, and a propyltriazole moiety, was initiated but the 1,3-dipolar cycloaddition still need to be optimized.