

Stratégies d'activations multiples d'espaceurs auto-immolables

Steve Huvelle

▶ To cite this version:

Steve Huvelle. Stratégies d'activations multiples d'espaceurs auto-immolables. Chimie organique. Université Paris sciences et lettres, 2017. Français. NNT: 2017PSLET033. tel-02365236

HAL Id: tel-02365236 https://theses.hal.science/tel-02365236

Submitted on 15 Nov 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.

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres PSL Research University

Préparée à l'Institut Curie

Stratégies d'activations multiples d'espaceurs auto-immolables

Ecole doctorale n°563

Médicament, Toxicologie, Chimie, Imagerie (MTCI)

Spécialité Médicament, Toxicologie, Chimie, Imagerie

COMPOSITION DU JURY :

M. PAPOT Sébastien Université de Poitiers, Rapporteur

M. DURAND Philippe ICSN, Rapporteur

M. JULLIEN Ludovic ENS, Examinateur

M. MICOUIN Laurent Université Paris Descartes, Examinateur

Mme. VIAUD-MASSUARD Marie-Claude Université de Tours, Examinateur, Présidente du jury

M. SCHMIDT Frédéric Institut Curie, Directeur de thèse

Soutenue par Steve HUVELLE le 20 novembre 2017

Dirigée par Frédéric SCHMIDT





 « Il n'y a que l'homme qui a connu la défaite qui peut aller chercher au plus profond de soi-même et revenir avec le supplément de force qu'il lui faut pour gagner » Mohammed Ali

A la mémoire de mon père,

cette thèse lui est dédiée.

Remerciements

Cette aventure qu'est une thèse ne s'aurait s'achever sans remercier toutes les personnes qui y ont contribué, de quelques manières que ce soit.

J'aimerais en premier lieu remercier les membres du jury Pr Sebastien Papot, Dr Philippe Durand, Pr Marie-Claude Viaud-Massuard et Dr Laurent Micouin de m'avoir fait l'honneur d'avoir acceptés d'évaluer ce travail de thèse.

J'aimerais plus particulièrement remercier Pr Ludovic Jullien, d'avoir accepté de faire partie de ce jury, mais également pour son implication constante dans ces projets et pour les conseils précieux qu'il m'a prodigués.

Je remercie mon directeur de thèse, Dr Frédéric Schmidt, de m'avoir encadré pendant près de 4 ans, de m'avoir soutenu et de s'être autant impliqué dans cette thèse.

Remerciements sincères au Dr Jean-Claude Florent pour avoir toujours été disponible, pour avoir répondu à toutes mes interrogations et pour s'être porté volontaire pour relire cette thèse.

Je tiens également à remercier mon formateur et énigmatique mentor, Ahmed, pour avoir partagé son savoir et bien plus encore.

J'adresse aussi mes remerciements les plus chaleureux au McGyver des chercheurs, Dr Thomas le Saux, pour son aide inestimable dans les études physicochimiques et plus particulièrement pour m'avoir aidé à dompter Igor.

Un grand merci également à Stéphanie, Christine et Sylvie pour toutes les analyses réalisées...et également mes excuses pour vous avoir rendu folles par moment.

J'exprime aussi toute ma gratitude aux anciens, Daniel et Philippe, les chercheurs les plus érudits et passionnés que j'ai eu la chance de rencontrer, pour avoir été là et m'avoir redonné confiance dans les moments les plus sombres.

Petites pensées pour Cornélie et toutes ces pauses mémorables, Gaëlle pour m'avoir servi d'exemple, Manal pour toutes ses réflexions sur la vie, Michel pour m'avoir appris à rester humble, sans oublier Marion et Rafik.

To my « labmate » : Emmanuel, Lax, Haifei, Bibhuti, Bhanu and Marie : thanks for all the real good time in our lab !

A mes biologistes préférés, Stefan, Siau et Estelle : ne changez rien.

Aux stagiaires, Lu' et Widly : que de souvenirs les enfants...

A Katharina, Barbara, Michael, Yannick et Yoanne : toujours sur le qui-vive, toujours efficaces!

A Aicha, dont le sourire du matin m'a rendu plus léger qu'une plume lorsque j'avais le cœur lourd.

To all my colleagues: Jo, Julio, Antoine, Seb, Boom, Raph & Raph, Anne & Anne, Lav, Tati, Manos, Mai et Marco ; thanks for all !

Spéciale mention pour mes camardes de route : Sylvain, Ben et Ben Le, pour toutes ces années d'amitiés et pour m'avoir aidé à rester simple ; bisous les gars !

Je tiens plus que tout à remercier ma famille, plus particulièrement : mère grand, qui n'a jamais cessé de croire en moi, quand moi-même je n'y croyais plus ; ma filleule et sa petite famille, qui m'a donné le courage d'aller jusqu'au bout ces derniers mois ; ma petite sœur, ma seconde maman ; et enfin mes parents : Papa et Maman, je vous dois tous car vous m'avez fait tel que je suis. Les mots me manquent pour vous exprimer l'affection que je vous porte, mais sachez que je vous serais éternellement reconnaissant de tout ce que vous avez fait pour moi.

J'aimerais finir en remerciant ma chère et tendre : je ne saurais te dire à quel point ta présence m'a été indispensable ces dernières années, mais sache que je te remercie du fond du cœur.

Liste des abréviations

aq	Aqueux
Сх	Cyclohexane
DCM	Dichlorométhane
DMF	Dimethylformamide
EtOAc	Acétate d'éthyle
H ₂	Dihydrogène
HCI	Chlorure d'hydrogène
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
Hz	Hertz
NMR	Résonnance Magnétique Nucléaire
Rf	Rapport frontal
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TLC	Chromatographie sur couche mince
UV	Ultraviolet
KHMDS	Hexaméthyldisilazoture de potassium
LDA	Diisopropylamide de lithium

Sommaire

Introduction générale13				
CH/ LIM	APIT ITA	TRE 1 : LES ESPACEURS AUTO-IMMOLABLES : APPLICATIONS, FONCTIONNEMENTS ET	Г 5	
١.		Applications des espaceurs auto-immolables1	5	
А	. <u>S</u>	tratégies prodrogues15	5	
	1.	Activations enzymatiques15	5	
	2.	Accroissement de solubilité)	
	3.	Augmentation de sélectivité22	2	
	4.	Les stratégies ADEPT, ADCs et apparentés24	1	
В	. <u>S</u>	ondes et imageries	1	
	1.	Détections de composés chimiques34	1	
	2.	Détections d'enzymes locales	5	
С	. <u>Ir</u>	mportance du paramètre cinétique dans les utilisations in vitro/in vivo)	
	1.	Pharmacocinétique, diffusion et les contraintes qu'elles imposent)	
	2.	Difficultés de la détermination cinétique41	1	
	3.	Modèle employé par notre équipe42	2	
	4.	Etat de l'art des cinétiques reportées48	3	
П	•	Les mécanismes d'auto-immolations50)	
A	. <u>L</u>	es processus d'éliminations)	
	1.	Eliminations 1.4, 1.6, 1.8 et 1.10 50)	
	2.	Influence de l'hétéroatome	1	
	3.	Structures alkyliques, aromatiques et hétéroaromatiques55	5	
	4.	Groupements partants	5	
В	. <u>L</u>	es processus de cyclisations57	7	
	1.	Cyclisations aromatiques et alkyliques57	7	
	2.	Hétéroatomes nucléophiles	Э	
	3.	Electrophiles et groupements partants	9	
Obj	ecti	ifs61	L	
CHAPITRE 2 : ETUDES CINETIQUES D'ESPACEURS CYCLISANTS REPRESENTATIFS63				
١.		Travaux antérieurs relatifs aux exemples étudiés63	3	
A	. <u>2</u>	-hydroxyphényl carbamates (2-HPC)63	3	
	1.	Précédentes études concernant la liaison carbamate63	3	

2.	L'importance accordée au dérivé <i>para</i> -nitro et la question de la nature du substituan	it 5
3.	Vers une étude systématique	6
B. (Cyclisation faisant intervenir le trimethyl lock (TML)	7
1.	Généralités et avantages des dérivés trimethyl lock : l'effet Thorpe-Ingold	7
2.	Exemples non exhaustifs d'utilisation du trimethyl lock	9
3.	Fréquence d'utilisation du dérivé ester7	1
н.	Synthèses et études cinétiques d'espaceurs auto-immolables basés sur u processus de cyclisation7	n 2
A. <u>I</u>	But de l'étude7	2
1.	Modèle cinétique et constante de vitesse7	2
2.	Comparaison des processus d'élimination et de cyclisation	3
3.	Structures cibles et stratégies de synthèses7	4
В. <u>/</u>	Article : Syntheses and kinetic studies of cyclisation-based self-immolative spacers 8	1
C. <u>(</u>	Conclusions de l'étude9	<u>0</u>
1.	L'apport des données cinétiques au domaine9	0
2.	Travaux complémentaires pour une plus grande compréhension des espaceurs 9	1
CHAPI D'ESP/	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES9	۷ 3
CHAPI D'ESP/ I.	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES9 Limitations des voies d'activations simples et émergence des composés mult	N 3 i-
CHAPI D'ESP/ I.	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES	N 3 i-
CHAPI D'ESP/ I. A. <u>I</u>	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES	N 3 i- 3 3
CHAPI D'ESP/ I. A. <u>I</u> 1.	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES	N 3 i- 3 3
CHAPI D'ESP/ I. A. <u>I</u> 1. 2.	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES	N 3 i- 3 3 5
CHAPI D'ESP/ I. A. <u>I</u> 1. 2. 3.	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES	N 3 i- 3 3 5 7
CHAPI D'ESP/ I. A. <u>I</u> 1. 2. 3. B. <u>(</u>	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES. 9 Limitations des voies d'activations simples et émergence des composés multicagés 9 Molécules masquées à voies d'activations multiples. 9 Exemples de sondes et prodrogues dans la littérature 9 Principales contraintes à la stratégie de bis-activation 10 Les espaceurs auto-immolables comme structures polyvalentes 10 Conception d'espaceurs auto-immolables à double activation 11	N 3 i- 3 3 5 7 0
CHAPI D'ESP/ I. A. <u>I</u> 1. 2. 3. B. <u>(</u> 1.	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES. 9 Limitations des voies d'activations simples et émergence des composés mult 9 Molécules masquées à voies d'activations multiples. 9 Exemples de sondes et prodrogues dans la littérature 9 Principales contraintes à la stratégie de bis-activation 10 Les espaceurs auto-immolables comme structures polyvalentes. 10 Conception d'espaceurs auto-immolables à double activation 11 Mécanismes d'auto-immolation et hétéroatome initiateur 11	N 3 i - 3 <u>3</u> 5 7 <u>0</u> 0
CHAPI D'ESP/ I. A. <u>I</u> 1. 2. 3. B. <u>(</u> 1. 2.	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES. 9 Limitations des voies d'activations simples et émergence des composés multicagés. 9 Molécules masquées à voies d'activations multiples. 9 Exemples de sondes et prodrogues dans la littérature 9 Principales contraintes à la stratégie de bis-activation 10 Les espaceurs auto-immolables comme structures polyvalentes. 10 Conception d'espaceurs auto-immolables à double activation 11 Mécanismes d'auto-immolation et hétéroatome initiateur 11 Fonctions dicarbonylées de l'azote 11	N 3 3 3 3 5 7 0 0 0 0
CHAPI D'ESP/ I. A. <u>I</u> 1. 2. 3. B. <u>(</u> 1. 2. 3.	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES. 9 Limitations des voies d'activations simples et émergence des composés mult cagés 9 Molécules masquées à voies d'activations multiples. 9 Exemples de sondes et prodrogues dans la littérature 9 Principales contraintes à la stratégie de bis-activation 10 Les espaceurs auto-immolables comme structures polyvalentes 10 Conception d'espaceurs auto-immolables à double activation 11 Mécanismes d'auto-immolation et hétéroatome initiateur 11 Fonctions dicarbonylées de l'azote 11 Sélection du groupement partant et des activateurs 11	N 3i-33570002
CHAPI D'ESP/ I. A. <u>I</u> 1. 2. 3. B. <u>(</u> 1. 2. 3. 4.	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES	N 3i-3335700024
CHAPI D'ESP/ I. A. <u>I</u> 1. 2. 3. B. <u>(</u> 1. 2. 3. 4. II.	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES 9 Limitations des voies d'activations simples et émergence des composés mult 9 Molécules masquées à voies d'activations multiples 9 Exemples de sondes et prodrogues dans la littérature 9 Principales contraintes à la stratégie de bis-activation 10 Les espaceurs auto-immolables comme structures polyvalentes 10 Conception d'espaceurs auto-immolables à double activation 11 Mécanismes d'auto-immolation et hétéroatome initiateur 11 Sélection du groupement partant et des activateurs 11 Défis et enjeux 11 Synthèses de dérivés 4-aminobenzyle dicarbonylées 11	N3 i- 3 <u>3</u> <u>3</u> 5700024 5
CHAPI D'ESP/ I. A. <u>I</u> 1. 2. 3. B. <u>(</u> 1. 2. 3. 4. 4. 2. 3. 4. 2. 3. 4. 2. 3. 4. 2. 3. 4. 2. 3. 4. 2. 3. 4. 5. 2. 3. 4. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5.	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES	N 3 i - 3 <u>3</u> 3 5 7 <u>0</u> 0 0 2 4 5 <u>5</u>
CHAPI D'ESP/ I. A. <u>I</u> 1. 2. 3. B. <u>(</u> 1. 2. 3. 4. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 3. 1. 2. 3. 1. 2. 3. 3. 1. 2. 3. 3. 3. 1. 2. 3. 3. 1. 2. 3. 3. 2. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3.	TRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION ACEURS AUTO-IMMOLABLES. 9 Limitations des voies d'activations simples et émergence des composés mult 9 Molécules masquées à voies d'activations multiples. 9 Exemples de sondes et prodrogues dans la littérature 9 Principales contraintes à la stratégie de bis-activation 10 Les espaceurs auto-immolables comme structures polyvalentes. 10 Conception d'espaceurs auto-immolables à double activation 11 Mécanismes d'auto-immolation et hétéroatome initiateur 11 Sélection du groupement partant et des activateurs. 11 Défis et enjeux 11 Synthèses de dérivés 4-aminobenzyle dicarbonylées 11 Synthèse de dérivés bis-amides. 11 Auto-immolation à partir d'un amide aromatique : généralités. 11	N 3 i - 3 <u>3</u> 3 5 7 <u>0</u> 0 0 2 4 5 <u>5</u> 5

3. Conclusions et perspectives rapport aux bis-a	mides 123			
B. Synthèses de dérivés bis-carbamates				
1. Obtention du bis-carbamate portant 2 substit	uants différents125			
2. Nouvelle approche et structure cible				
C. <u>Résultats et perspectives</u>				
1. Synthèse du bis-carbamate modèle				
2. Etudes physico-chimiques et preuve de conce	pt141			
3. Attentes futures concernant les espaceurs à a	ctivation double 145			
CHAPITRE 4 : AUTO-IMMOLATION A DECLENCHEME	NT MULTIPLE POUR L'AMPLIFICATION			
DE SIGNAL	149			
I. De l'activation simple à l'activation m dendrimères	ultiple : l'apport des polymères et 149			
A. Composés à simple activation pour une sensibili	té accrue149			
1. Le rôle des espaceurs auto-immolables dans l	e domaine149			
2. Libération de composés multiples				
B. Polymères et dendrimères pluri-activables pour	l'augmentation de sensibilité 153			
1. Augmentation de la proportion d'un même ac	tivateur 153			
2. Voies d'activations distinctes pour une unique	e auto-immolation155			
3. Adaptation du concept de multi-activation à u	in espaceur monomérique 156			
II. Conceptions d'espaceurs auto-immolables	polyactivables compacts157			
A. Mise au point de dérivés du 2.4.6-trihydroxyben	zaldéhyde157			
1. Relations structures-propriétés				
2. Liaison entre le(s) groupement(s) photoactiva	ble(s) et l'espaceur158			
3. Nature de la liaison au fluorophore				
B. <u>Stratégies de synthèses et obstacles principaux</u> .				
1. Substitutions directes des positions phénols				
2. Modifications de la fonction aldéhyde				
3. Modifications de polarité et de conjugaison de	es fonctions phénols162			
4. Réaction sur le phloroglucinol				
5. Travaux en cours et perspectives				
Conclusions et perspectives				
Annexe				
Références175				
Experimental section				

Introduction générale

Introduits originellement par Katzenellenbogen en 1981¹, les espaceurs auto-immolables sont définis comme des assemblages covalents capable de corréler la coupure de deux liaisons (voir schéma général). La première coupure intervient au niveau du groupement protecteur A, générant un intermédiaire qui conduit spontanément à la rupture de la liaison entre l'espaceur et l'espèce B.



Schéma général : Principe d'un espaceur auto-immolable

Katzenellenbogen avança que les espaceurs auto-immolables pourraient permettre d'outrepasser les limitations des thérapies classiques (administration directe de composés bioactifs, notamment) et conduiraient à l'émergence d'une nouvelle génération de prodrogues. Ayant effectivement amené une innovation considérable dans ce domaine, ces espaceurs ont depuis trouvé nombre d'applications dans des domaines plus variés (chimie analytique, matériaux, ...) ; nous en présenterons un aperçu, tout en nous focalisant sur les applications biologiques (sondes et prodrogues).

Nous tacherons également de décrire plus en détail les mécanismes d'auto-immolation, conduisant l'intermédiaire à se désassembler et libérer la molécule B. En effet, chacun de ces mécanismes confère des propriétés particulières à l'espaceur en termes de cinétique d'auto-immolation et de structures chimiques principalement. Il est donc primordial d'établir les avantages et les inconvénients de chaque type d'espaceur afin de déterminer au mieux quel genre de structure employer en fonction de l'utilisation choisie.

Notre travail de thèse consistera dans un premier temps à compléter les données de la littérature afin d'approfondir notre connaissance des espaceurs auto-immolables.

Enfin, si ces espaceurs ont été introduits pour dépasser les limitations des stratégies préexistantes, ils ne sont pas toujours aptes à répondre à certaines problématiques (sélectivité et sensibilité de leurs activations notamment) ; ceci nous a amenés à tenter de créer une nouvelle génération d'espaceurs auto-immolables capables de mieux répondre à ces attentes.

¹ P. L. Carl, P. K. Chakravarty, J. A. Katzenellenbogen, J. Med. Chem., 1981, 24, 5, 479-480

CHAPITRE 1 : LES ESPACEURS AUTO-IMMOLABLES : APPLICATIONS, FONCTIONNEMENTS ET LIMITATIONS

I. Applications des espaceurs auto-immolables

- A. Stratégies prodrogues
- 1. Activations enzymatiques

Les stratégies prodrogues ont été utilisées par le passé pour repousser les limites des traitements classiques, tout particulièrement dans le cas des chimiothérapies antitumorales. En effet, l'administration directe d'un composé actif n'est pas sans parfois poser quelques difficultés, notamment en termes de biodistribution ou de toxicité. Considérant le cas particulier des cancers, les traitements actuels n'ont qu'une sélectivité modérée pour les cellules tumorales ; celles-ci sont en effet très similaires aux cellules saines. De plus, certains agents anticancéreux montrent des propriétés pharmacocinétiques défavorables (pic plasmatique faible, solubilité médiocre, élimination rapide), ce qui limite tout autant l'efficacité de telles molécules. Les prodrogues ont été introduites pour remédier à ces problèmes récurrents : le principe étant d'intégrer à la molécule bioactive un groupement chimique inactivateur (dit protecteur), lequel va à la fois masquer l'activité du composé autant qu'il apportera un avantage (groupement polaire, élément de ciblage, ...) pour compenser les inconvénients du principe actif d'origine. Ce groupement protecteur étant lié à la molécule active par une liaison covalente, il est nécessaire que cette liaison puisse être clivée *in vivo* afin de permettre l'action thérapeutique.

De nombreuses stratégies prodrogues ont été mises au point ces dernières décennies². Cependant, on pourra noter une certaine préférence pour les prodrogues dont la liaison groupement protecteur/principe actif est coupée par voie enzymatique : en effet, les enzymes montrent généralement une action spécifique et sont capables de rompre des liaisons très diverses. Parmi celles-ci, nous pourrons citer les liaisons esters (utilisés en stratégies prodrogues pour la protection d'alcools ou d'acides carboxyliques en vue d'allonger la durée de vie du composé), phosphates (employés principalement pour augmenter la solubilité du composé d'origine) ou encore amides secondaires. Cette dernière fonction possède l'avantage de protéger les amines primaires et d'apporter polarité ou apolarité (selon les acides aminés introduits) afin de moduler au mieux les propriétés pharmacocinétiques du composé d'origine ; les amides secondaires (dites aussi liaisons peptidiques) sont de plus particulièrement résistantes à l'hydrolyse en milieu biologique tout en restant très facilement dégradables par les enzymes correspondantes (peptidases). L'exemple que nous avons choisi de représenter est celui donné par Katzenellenbogen en 1983³ : les auteurs ont décidé de moduler la sélectivité de la doxorubicine (inhibiteur de topoisomérase II) en incorporant une séquence peptidique reconnue par la plasmine (Schéma 1), enzyme particulièrement présente dans nombre de tumeurs solides. La chaine peptidique a été introduite sur l'amine primaire

² F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke, ChemMedChem, 2008, 3, 20–53

³ P. K. Chakravarty, P. L. Carl, M. J. Weber, J. A. Katzenellenbogen, J. Med. Chem., 1983, 26, 5, 638-644

de la glucosamine, formant une liaison de type peptidique pouvant être coupée par la plasmine. Les auteurs ont ainsi pu montrer une augmentation de sélectivité d'un facteur 7 (établie par différence de cytotoxicité entre la doxorubicine et sa prodrogue), ce qui illustre bien le concept de prodrogue et son efficacité en chimie médicinale.



Schéma 1 : Structures de la doxorubicine et de sa prodrogue comportant une chaine lysine-leucinevaline telle que conçue par Katzenellenbogen et al.

Cependant, on ne manquera pas de remarquer que, dans ce cas, il est possible de greffer le groupement protecteur (ici séquence peptidique) directement à la molécule d'intérêt : en effet, la doxorubicine comportant une amine primaire permet de construire un amide secondaire reconnu par la peptidase ciblée (plasmine). Si la doxorubicine ne possédait pas d'amine ou si celle-ci avait été secondaire ou tertiaire, il n'aurait alors pas été possible d'appliquer cette stratégie. Cette remarque est fondamentale pour comprendre l'intérêt des espaceurs auto-immolables dans les stratégies prodrogues (Schéma 2). En effet, l'incompatibilité chimique entre le groupement protecteur et la substance d'intérêt est une des causes des limites actuelles des prodrogues « classiques » : la prodrogue doit lier les deux parties par une liaison qui doit être coupée *in vivo*. De fait, il est nécessaire d'introduire un espaceur qui permettra de les lier tout en conservant la fonctionnalité de la prodrogue résultante.



Schéma 2 : Récapitulatif de 3 stratégies majeures en thérapie classique ; avec : 1. Administration directe, 2. Prodrogue classique, 3. Prodrogue utilisant un espaceur auto-immolable

On notera également que la liaison directe entre le groupement protecteur et le composé actif implique un certain encombrement stérique qui peut être délétère sur l'activité de l'enzyme cible : trop peu accessible, le site pourrait être trop difficile d'accès, ce qui conduirait à la non rupture de la liaison.

Le premier exemple d'espaceur auto-immolable que nous avons choisi d'illustrer a été rapporté en 2008^4 et concerne une prodrogue d'aminocamptothécine : celle-ci est lié par une liaison carbamate à un dérivé de 4-hydroxybenzyle dont le phénol est protégé par un β -glucuronide (Schéma 3). En effet, la β -glucuronidase est une enzyme présente en quantité relativement importante dans le milieu extracellulaire des tumeurs nécrotiques ; ceci provient d'une réaction du système immunitaire dont certaines cellules (leucocytes) secrètent cette enzyme dans l'environnement des cellules tumorales⁵.



Schéma 3 : Prodrogue de l'aminocamptothécine ciblant la β-glucuronidase

La présence du glucuronide permet de cibler efficacement l'environnement tumoral, mais également de protéger la fonction phénol de l'espaceur et maintenir la prodrogue en assemblage stable. En effet, après activation (coupure de la liaison espaceur/activateur, ici le glucuronide) on génère un intermédiaire possédant un phénol libre qui délocalise ses électrons *via* le cycle aromatique jusqu'à la position benzylique, provoquant le départ de l'acide carbamique de camptothécine qui redonne le composé actif par décarboxylation. On a donc ici un parfait exemple d'espaceur auto-immolable stable redonnant la molécule d'intérêt après un stimulus spécifique. On notera également que la liaison glycosidique directe entre la camptothécine et le glucuronide n'aurait certainement pas été le meilleur choix : le seul alcool de la camptothécine est un alcool tertiaire particulièrement encombré, ce qui aurait pu être délétère pour l'action de la glucuronidase. La présence de l'espaceur est donc ici tout à fait

⁴ Y.-L. Leu, C.-S. Chen, Y.-J. Wu, J.-W. Chern, J. Med. Chem., 2008, 51, 1740–1746

⁵ K. Bosslet, R. Straub, M. Blumrich, J. Czech, M. Gerken, B. Sperker, H. K. Kroemer, J.-P. Gesson, M. Koch, C. Monneret, Cancer Res., 1998, 58, 6, 1195-1201

pertinente et montre des résultats prometteurs : le composé prodrogue est 10 fois moins toxique que l'aminocamptothécine seule lorsqu'aucune activation de la glucuronidase n'a lieu, tandis que la cytotoxicité est intégralement restaurée après activation.

Une équipe de chercheurs a reporté en 2012⁶ une nouvelle prodrogue basée sur la même voie d'activation (glucuronidase). A la différence de l'exemple précédent, cette nouvelle prodrogue possède, en plus d'un espaceur auto-immolable dérivé de 4-hydroxybenzyle, un second espaceur basé sur un noyau aniline : celui-ci est capable de libérer, par 2 mécanismes d'auto-immolation successifs, 2 molécules de doxorubicine (Schéma 4). Après activation par la β -glucuronidase, un phénol est généré : celui-ci élimine l'acide carbamique en *para* (en bleu), comme dans l'exemple précédent, qui se décarboxyle pour régénérer l'aniline libre (en noir). Celle-ci va alors éliminer les acides carbamiques de doxorubicines (en rouge) des positions benzyliques *ortho* et *para*. Les auteurs ont également prouvé que la prodrogue ainsi créée montrait une cytotoxicité deux fois plus élevé qu'une prodrogue monomérique (libérant une seule doxorubicine) ou que la doxorubicine seule. On attirera l'attention sur le fait que l'utilisation d'un espaceur auto-immolable permet cette double libération après une unique activation, ce qui est impossible à concevoir dans une stratégie prodrogue classique.



Schéma 4 : Prodrogue dendrimérique sensible à la 6-glucuronidase et libérant deux équivalents de doxorubicine, décrite par Papot et al.

⁶ M. Grinda, J. Clarhaut, B. Renoux, I. Tranoy-Opalinski, S. Papot, Med. Chem. Commun., 2012, 3, 68

Parallèlement à cette approche, une équipe allemande⁷ a développé un nouveau type de prodrogue pouvant libérer 2 substrats, différents cette fois : une doxorubicine et un inhibiteur de la P-glycoprotéine, laquelle efflue la doxorubicine et est à l'origine de résistance à cet anticancéreux. Cette stratégie est pertinente car elle maximise les chances de succès en améliorant ou restaurant la sensibilité de la lignée tumorale considérée au traitement appliqué, mais elle possède aussi un autre avantage vis-à-vis de l'administration simultanée de ces 2 substances : en effet, chaque molécule possède son propre profil pharmacocinétique, lequel peut ne pas se révéler compatible avec un autre. Il parait donc improbable que ces 2 substances administrées simultanément se trouvent distribué à la cible à concentrations optimales au même moment, le ratio optimal ayant été montré comme étant 1:1 doxorubicine/inhibiteur. La libération synchronisée au sein de la cellule tumorale peut permettre d'accéder à cette situation. On notera que les auto-immolations relâchant les 2 molécules thérapeutiques sont déclenchées par un même type d'évènement : le clivage de deux séquences reconnues par la même cathepsine B, enzyme lysosomale surexprimée par nombre de cellules cancéreuses. Après activation par la cathepsine, les séquences peptidiques concernées sont coupées (en vert sur le schéma 5), générant les carbamates paraaminobenzyliques (bleu) qui éliminent les 2 substances d'intérêts (rouge) que sont l'inhibiteur de la P-glycoprotéine et la doxorubicine. De par cette approche, les auteurs ont ainsi pu montrer une réponse thérapeutique satisfaisante et en dessous du seuil de toxicité de la doxorubicine sur des lignées résistances à ce traitement.



Schéma 5 : Prodrogue conçue par Kratz et al

Ce ciblage de la cathepsine B est particulièrement intéressant du fait de l'expression élevée de cette enzyme par un grand nombre de lignées cancéreuses. Néanmoins, cette protéase est exclusivement présente dans le lysosome : l'activation d'une prodrogue cathepsine-sensible implique donc nécessairement un passage dans cette organelle, soit par diffusion soit par ciblage actif. Dans l'exemple précédent, aucun élément de ciblage du lysosome n'était présent ; le composé atteignait celui-ci par diffusion à travers la membrane lysosomale. Afin

⁷ K. Abu Ajaj, F. Kratz, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, 19, 995–1000

d'augmenter la proportion de composés présents dans le compartiment cible, un élément de ciblage de celui-ci peut être incorporé dans la structure de la prodrogue ; comme c'est le cas dans le composé synthétisé par *Chen et al⁸*. Dans cet exemple, les auteurs ont incorporé un dérivé morpholine ciblant le lysosome (appelé aussi « lysotracker ») sur le composé libérable de l'espaceur auto-immolable, sans pour autant compromettre ses propriétés (Schéma 6). Ils ont également pu montrer une accumulation du composé libéré spécifiquement dans les lysosomes des cellules cancéreuses uniquement, démontrant le ciblage efficace de l'organelle et la spécificité de l'activation par les cellules cancéreuses.



Schéma 6 : Prodrogue accumulée dans le lysosome de Chen et al.

Comme nous l'avons vu à travers ces exemples, les espaceurs auto-immolables activables par voie enzymatique offrent de nombreuses possibilités notamment en terme de sélectivité.

2. Accroissement de solubilité

Comme l'avait justement remarqué Stella il y a plusieurs années⁹, certains paramètres (notamment la polarité de la molécule) jouent un rôle clé dans le succès d'une thérapie donnée : la molécule active doit en effet être capable de franchir les membranes des cellules cibles pour accéder à son objectif, autant qu'elle doit être présente en concentration suffisante pendant un temps suffisamment long pour pouvoir exercer son action. Ces derniers paramètres dépendent en partie de la solubilité du produit dans les milieux aqueux biologiques : un produit bien trop soluble (chargé notamment) pénètre difficilement à l'intérieur des cellules par diffusion, alors qu'un produit peu soluble ne sera que peu concentré dans ce genre de milieu.

C'est pour ces raisons que certaines équipes se sont attachées à produire des prodrogues offrant un compromis entre ces 2 cas de figure, notamment Greenwald et ses collaborateurs¹⁰. Les auteurs ont décidé d'incorporer au groupement protecteur de l'auto-immolation différentes chaines de polyéthylène glycol (PEG) afin d'augmenter la solubilité de l'assemblage très hydrophobe dans le milieu cellulaire (Schéma 7).

⁸ Y. Wang, J. Li, L. Feng, J. Yu, Y. Zhang, D. Ye, H.-Y. Chen, Anal. Chem., 2016, 88, 12403–12410

⁹ V. J. Stella, K. J. Himmelstein, J. Med. Chem., 1980, 23, 12, 1275-1282

¹⁰ R. B. Greenwald, Y. H. Choe, C. D. Conover, K. Shum, D. Wu, M. Royzen, J. Med. Chem., 2000, 43, 475-487



Schéma 7 : Prodrogue hydrosoluble de Greenwald et al

De la même manière, des substrats enzymatiques naturels peuvent être utilisés pour cette stratégie d'augmentation de solubilité, notamment les peptides. En effet, l'agencement de la séquence aminé ajoutée, alternant acides aminés polaires et apolaires, permet de moduler la polarité à souhait. C'est la stratégie suivie par Khan et son équipe¹¹ en liant le taxol (inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules pendant la mitose), *via* une liaison carbonate, à un dérivé 4-aminobenzyle ; la fonction aniline de ce dernier est protégée par une chaine peptidique (Schéma 8). Cette chaine comportant un nombre conséquent d'acides aminés polaires (sérine et glutamine), voire chargés (histidine et lysine), cela ne peut qu'augmenter la polarité de l'assemblage comportant une molécule très apolaire (la faible solubilité dans les milieux aqueux est l'inconvénient principal du taxol). Les auteurs ont ainsi pu montrer une augmentation de la concentration en taxol administré d'un facteur 200 environ, démontrant l'efficacité de cette approche. Ils ont également pu prouver que l'activité anticancéreuse était intégralement restaurée en présence de PSA (Prostate Specific Antigen) lequel coupe la séquence peptidique, libère l'aniline et induit l'élimination du taxol.



Schéma 8 : Prodrogue sensible au PSA de Khan et al.

¹¹ S. K. Kumar, S. A. Williams, J. T. Isaacs, S. R. Denmeade, S. R. Khan, Bioorg. Med. Chem., 2007, 15, 4973–4984

3. Augmentation de sélectivité

A travers ces deux derniers points concernant la modulation de solubilité et l'activation spécifique de prodrogues, nous avons principalement vu le rôle prépondérant des enzymes dans ce type de stratégie. La littérature montre cependant un nombre conséquent de prodrogues ne faisant pas intervenir ces enzymes pour leur activation, ce qui sera l'objet du présent paragraphe. Les tumeurs, principales pathologies considérées par les stratégies prodrogues, possèdent en effet des particularités biochimiques (électrochimiques, présence élevée de métabolites, …) ; lesquelles peuvent être exploitées au même titre que leurs surexpressions enzymatiques¹².

La capacité des cellules cancéreuses à survivre en milieu hypoxique peut être exploitée. En effet, ces cellules doivent trouver un moyen de produire leur propre oxygène pour pallier ce handicap, notamment par la réduction de fonctions oxygénées comme les nitro. Cette stratégie a été suivi avec succès par *Scheeren et al.*¹³ pour libérer une molécule de taxol au sein de lignées cancéreuses. On note néanmoins que l'activité des prodrogues nitrées est inférieure à celle du taxol seul (d'un facteur 2 à 10). Cependant, tous les composés sont actifs sur les 6 lignées testées signifiant que la réduction du nitro conduit systématiquement à l'élimination du taxol, par délocalisation sur un cycle aromatique ou hétéroaromatique (Schéma 9).



Ar = benzène, imidazole, furane, thiophène

Schéma 9 : Libération de taxol à la suite de la réduction de la nitroaniline en milieu hypoxique

Une autre particularité biochimique qui a suscité l'intérêt des chercheurs depuis quelques années est la production anormale de ROS (Espèces réactives de l'oxygène) par des cellules soumises à un stress oxydant intense (cellules cancéreuses, cellules subissant une réactions inflammatoire, …). Ainsi, l'oxydation de certaines fonctions chimiques par les ROS (tel H₂O₂) peut être mis à profit pour la construction de prodrogues qui ciblerait de tels tissus. *Cohen et al.* ont utilisé cette approche pour administrer *in cellulo* un inhibiteur de métalloprotéinase de

¹² A. K. Sinhababu, D. R. Thakker, Advanced Drug Delivery Reviews, 1996, 19, 241-273

¹³ E. W.P. Damen, T. J. Nevalainen, T. J.M. van den Bergh, F. M.H. de Groot, H. W. Scheeren, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 71–77

matrice (MMP)¹⁴, des enzymes excrétées dans le milieu extracellulaire afin de conduire à la dégradation du tissu matriciel (collagène principalement). Ceci entraine inévitablement une rupture de la matrice, conduisant en autres à la dégradation des tissus périphériques. Ces conséquences sont relativement fréquentes dans les cas où les tissus sont en état d'hypoxie, ce qui entrainent une surproduction de ROS, induisant un stress oxydant menant à la sécrétion de MMP et causant d'importants dégâts. Cohen et son équipe ont ainsi développé une nouvelle prodrogue activée par l'eau oxygénée afin de tirer avantage de cette situation : les tissus en état de stress, produisant plus de ROS, activent de fait la prodrogue qui administre localement un inhibiteur de MMP afin d'épargner les tissus périphériques d'éventuels dommages (Schéma 10). Les auteurs ont ainsi pu montrer in vitro l'innocuité de la prodrogue en absence d'eau oxygénée, alors qu'une concentration conséquente de H_2O_2 (100 μ M) entrainait une inhibition enzymatique de MMP sub-micromolaire équivalente à celle reportée précédemment pour l'inhibiteur seul. On admettra que la concentration en activateur (H_2O_2) requise est relativement élevée mais que la stratégie n'en reste pas moins efficace en principe : le composé ne montre ses propriétés inhibitrices qu'après libération du principe actif sous un stimulus spécifique non enzymatique.



Schéma 10 : Fonctionnement de la prodrogue ROS-sensible de Cohen et al.

Ces 2 derniers exemples sont particulièrement intéressants du fait qu'ils offrent une réelle alternative aux prodrogues activables par voie enzymatique tout en conservant une sélectivité

¹⁴ J. L. Major Jourden, S. M. Cohen, Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 6795 –6797

correcte pour la cellule ciblée. Tous ces exemples ont en commun de reposer sur une activation spécifique après incorporation de la prodrogue au sein de la cellule, le plus souvent par diffusion. D'autres méthodes de ciblages sont basés sur une reconnaissance spécifique de la cellule cible (tumorale notamment), permettant une incorporation du composé par celle-ci par d'autres moyens que la diffusion (endocytose principalement).

4. Les stratégies ADEPT, ADC et apparentés

La sélectivité vient donc, dans ce cas présent, non plus de l'activation spécifique de la prodrogue mais de son incorporation sélective au sein de la cible.

Le principe de telles stratégies est d'exploiter la reconnaissance spécifique d'une cellule cible par une biomolécule, (ligand, anticorps, protéine, aptamère, …). Au sein de ce type d'approche, nous allons discuter 2 stratégies représentatives (Schéma 11) :

- La stratégie ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy) : le principe est d'utiliser un anticorps reconnaissant un antigène à la surface d'une cellule cible. Cet anticorps est lié à une enzyme naturellement non présente chez la cible, ou tout du moins peu exprimée, qui permettra d'activer sélectivement la prodrogue administrée par la suite. Ainsi, l'anticorps se liant spécifiquement à se cible *via* la liaison à l'antigène, une prodrogue introduite ultérieurement sera activée par l'enzyme portée par l'anticorps et le composé actif sera libéré à proximité de la cible thérapeutique à l'extérieur de la cellule. Le premier avantage de cette stratégie est de permettre le ciblage d'à peu près n'importe quel antigène de surface, pourvu que l'anticorps correspondant existe. Le composé actif étant libéré à l'extérieur de la cible, les cellules périphériques sont exposées, ce qui est un autre avantage de cette stratégie : les cellules tumorales n'exprimant pas toutes l'antigène en quantités suffisantes, cela permet une action sur l'ensemble de la tumeur, y compris sur les cellules exprimant peu l'antigène ciblé par l'anticorps.
- Les stratégies ADCs (Antibody Drug Conjugate) et apparentées : ces stratégies font intervenir un conjugué constitué d'un anticorps (ou protéine, peptide, aptamère, ose, ...) reconnaissant un ligand spécifique de la cible et d'une molécule active directement greffée à cet anticorps. Le conjugué est ensuite internalisé dans la cellule et subit des modifications *in cellulo* : si l'espaceur entre l'anticorps et le composé actif est clivable, alors la liaison les liant sera coupé pour redonner directement la substance active ; si la liaison ne peut être coupée, alors l'anticorps sera digéré par la cellule (*via* les protéases) et on génère un composé actif dérivé de celui d'origine (molécule active + résidu d'espaceur). Le point positif de cette approche est de permettre la libération du composé dans la cellule, à condition que la liaison de l'anticorps à l'antigène entraine l'internalisation du conjugué.

On notera que pour ces deux approches, un argument régulièrement opposé est le coût du traitement : entre 4 et 20 fois plus cher qu'une chimiothérapie classique, du fait de l'utilisation d'anticorps.



Schéma 11 : Illustration des stratégies ADEPT et ADCs

Comme nous l'avions signifié précédemment, la réduction de fonction nitro a été utilisée pour permettre l'activation de prodrogues. Cette réduction peut intervenir par l'intermédiaire de réducteurs chimiques (NADH, NADPH, ...) ou par voie enzymatique, *via* les nitroréductases cellulaires. Afin d'augmenter l'efficacité de l'activation, *Knox et al.* ont décidé de passer par une stratégie ADEPT consistant en l'ajout d'un anticorps couplé à une nitroréductase et en l'introduction de prodrogues dont l'activation est réalisée par réduction d'un nitro¹⁵. Pour prouver l'efficacité du système, les auteurs ont conçu différentes prodrogues (Schéma 12),

¹⁵ A. B. Mauger, P. J. Burke, H. H. Somani, F. Friedlos, R. J. Knox, J. Med. Chem. 1994,37, 3452-3458

toutes basées sur espaceur portant un carbonate ou carbamate *para*-nitro benzylique et dont la réduction du nitro est effectué par la même enzyme (nitroréductase de *Escherichia coli*). Au final, 5 composés à activités anticancéreuses différentes ont été libérés par ce moyen. Toutes les prodrogues se sont avérées peu toxiques (de 50 à 90% de survie) comparés aux composés libres, qui eux entrainaient inévitablement la mort des cellules ou souris exposées. L'activité antitumorale est en grande partie restaurée dans tous les cas après activation (nitroréductase en présence du cofacteur NADH). Le composé le plus prometteur semble être la prodrogue d'actinomycine D, celle-ci montrant la toxicité la plus faible (100 fois plus faible que l'actinomycine libre, soit presque 100 % de survie chez les cellules et souris exposées) tout en montrant l'activité la plus forte après activation (population de cellules cancéreuses réduite de 75%). On relève également que l'activation enzymatique *in vitro* conduit à la libération quasi quantitative de l'actinomycine D (plus de 92% de libération).



Schéma 12 : Prodrogues nitro-activables de Knox et al.

On peut néanmoins objecter que les nitroréductases sont également des enzymes endogènes, exprimées dans un certain nombre de lignées cellulaires (cancéreuses ou non). On admettra tout de même que l'utilisation d'un anticorps couplé à une nitroréductase permet une activation plus importante au niveau des cellules ciblées, mais la stratégie ADEPT a plutôt pour objectif d'introduire une enzyme généralement non exprimée par l'organisme traité. C'est notamment le cas de la glucuronidase, qui n'est normalement pas présente dans le milieu extracellulaire, excepté dans le microenvironnement d'un certain nombre de cancers (nécrotiques en particulier) : l'utilisation d'un anticorps couplé à cette enzyme parait être une approche intéressante, en augmentant la proportion d'une enzyme seulement présente dans l'environnement de cellules tumorales. A priori, les cellules saines n'excrétant pas la β -glucuronidase et exprimant peu l'antigène reconnu par l'anticorps qui porterait cette enzyme, cela semble être une stratégie pertinente d'un point de vue sélectivité/toxicité. De plus, la β -glucuronidase est une enzyme d'origine humaine, et de fait non immunogène : cela ne peut que renforcer la pertinence de cette approche, la présence de l'anticorps n'induisant aucune réaction de l'organisme traité. Allant dans ce sens, une équipe de l'Institut Curie avait

développé une prodrogue entrant dans le cadre d'une stratégie ADEPT¹⁶. Du fait de la taille du paclitaxel et de la mauvaise cinétique enzymatique associée, les auteurs ont décidé de réduire l'encombrement stérique en introduisant 2 espaceurs auto-immolables dans la molécule : le premier, un carbamate de *para*-hydroxy benzyle dont le phénol est protégé par un glucuronide, s'auto-immole après action de l'enzyme pour éliminer *in fine* une amine secondaire ; cette amine secondaire s'additionnant sur le carbonyle du carbonate de taxol dans une seconde étape d'auto-immolation, par cyclisation cette fois (Schéma 13). Il a été décidé de construire 2 prodrogues sur ce principe : une portant un groupement nitro en position *ortho* de l'éther phénolique, et une portant une fonction amino. Les auteurs ont ainsi pu montrer que le dérivé NH₂ se montrait plus stable que son équivalent NO₂. Ce composé montre par ailleurs une toxicité sous sa forme prodrogue 70 fois moins importante que le paclitaxel libre. On note également que l'activité du composé après action de la glucuronidase est presque intégralement restaurée, ce qui confirme l'utilité du système employé par notre équipe.



Schéma 13 : Prodrogue du taxol activable par la glucuronidase de Schmidt et al.

Dans cette même logique d'introduire une enzyme relativement absente de l'organisme traité, nous avons pu constater l'intérêt croissant des chercheurs pour des enzymes peu communes (en dépit du risque d'immunogénicité de celles-ci). Développé il y a quelques années, l'anticorps catalytique 38C2 est de loin le plus connu des anticorps à activité aldolase¹⁷. Du fait de la présence dans son site actif d'une lysine nucléophile, cette enzyme est capable de s'additionner sur un carbonyle, formant une base de Schiff et catalysant de fait la formation de l'aldol. Cependant, le 38C2 est populaire pour les raisons contraires : cet anticorps est en effet capable de catalyser la réaction inverse en agissant comme une rétro-aldolase. Le mécanisme de cette réaction est détaillé dans le schéma 14 : tout d'abord, une lysine (notée R-NH₂) s'additionne sur la cétone pour former une base de Schiff (étape 1) ; l'alcool perd ensuite son proton (étape 2), récupère les électrons de la liaison pour redonner

¹⁶ A. El Alaoui, N. Saha, F. Schmidt, C. Monneret, J.-C. Florent, Bioorg. Med. Chem., 2006, 14, 5012–5019

¹⁷ J. Wagner, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, Science. 1995, 270,1797-1800

la cétone correspondante, provoquant la rupture de liaison carbone-carbone en α de l'imine (laquelle est ensuite hydrolysé pour redonner la cétone) du fait de l'effet mésomère attracteur de celle-ci ; la cétone restante forme à son tour une base de Schiff, en équilibre avec la forme énamine qui induit une réaction de rétro-Michael (étape 3) ; le groupement partant libéré (carbonate/carbamate) subit ensuite une décarboxylation, rendant la réaction réverse impossible (étape 4).



Schéma 14 : Mécanisme de la réaction de rétro-aldolisation catalysée par 38C2

En 2001, Barbas et al.¹⁸ ont décidé de démontrer l'efficacité de cette voie d'activation en construisant une prodrogue d'un inhibiteur de topoisomérase II, l'étoposide. Une prodrogue de ce composé est déjà utilisée en clinique : l'étopophos[®], consistant en un phosphate de l'étoposide en position phénolique, en vue d'améliorer la solubilité du composé d'origine. Les auteurs ayant jugé l'activation par les phosphatases peu sélective, ils ont pris la décision de construire un analogue activable par l'anticorps 38C2. Celui-ci pouvant être introduit et fixé spécifiquement au niveau de la tumeur ciblée, on concèdera que cela pourrait permettre de gagner en sélectivité. La prodrogue conçue par Barbas et son équipe (Schéma 15) montrent en effet des résultats intéressants : bien qu'introduite en quantité dépassant de 30 fois la dose maximale d'étoposide administrable, aucune toxicité n'a été observée, même une fois l'injection d'anticorps 38C2 réalisée ; de plus, le traitement prodrogue/38C2 semble bien plus efficace que le composé d'origine, permettant une réduction de 75% du volume tumoral. La stratégie de Barras parait en effet prometteuse mais on regrettera tout de même qu'aucune comparaison avec l'étopophos® n'ait été effectuée, celui-ci étant le composé de référence (l'étoposide n'étant que peu utilisé seul en raison de sa solubilité médiocre et de son caractère non sélectif).

¹⁸ D. Shabat, H. N. Lode, U. Pertl, R. A. Reisfeld, C. Rader, R. A. Lerneri, C. F. Barbas III, PNAS, 2001, 98, 13, 7528–7533



Schéma 15 : Prodrogue aldol de l'étoposide telle que décrite par Barras et al.

Cette voie d'activation ayant montré son efficacité, Barbas (en collaboration avec Shabat¹⁹) a décidé d'étendre le concept d'une activation sélective par l'anticorps 38C2 à la libération de plus d'un composé actif : la nouvelle prodrogue développée permet en effet de libérer 3 molécules anticancéreuses identiques (camptothécine, liée à l'espaceur par son alcool tertiaire). Les auteurs ont ainsi pu montrer que le composé libérant 3 équivalent de camptothécine (schéma 16) possède une meilleure activité que le composé n'en libérant qu'un seul, jusqu'à atteindre le même niveau d'inhibition que la camptothécine d'origine (entre 2 et 19 nM selon la lignée cellulaire testée, contre 15 à 100 nm pour la prodrogue monomérique).



Schéma 16 : Prodrogue trimérique de la camptothécine de Shabat et al.

On a donc pu voir au travers de ces derniers exemples que l'utilisation d'enzymes exogènes (glucuronidase, rétro-aldolase ou encore β -glycosidase²⁰) était un moyen efficace d'apporter un gain de sélectivité évident. Cependant, on ne notera qu'il n'y a à l'heure actuelle aucun traitement reposant sur la stratégie ADEPT en phase clinique, où cette approche semble avoir

¹⁹ K. Haba, M. Popkov, M. Shamis, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, D. Shabat, Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 716 –720

²⁰ H. J. Schuster, B. Krewer, J. Marian von Hof, K. Schmuck, I. Schuberth, F. Alves, Lutz F. Tietze, Org. Biomol. Chem., 2010, 8, 1833–1842

montré ses limites ; la principale étant que le traitement se déroule en 2 étapes (injection de l'anticorps puis de la prodrogue) : ceci impose des contraintes en terme de pharmacocinétique, les deux molécules considérées (anticorps et prodrogue) devant être présents à concentration optimales au même moment, d'autant qu'il est impératif de démontrer l'innocuité de ces deux protagonistes séparément.

Partant de ce constat, nous avons assisté ces dernières années à l'émergence d'une nouvelle stratégie reposant sur l'utilisation d'anticorps pour les thérapies ciblées : la stratégie ADC.

Cette approche connait un succès indéniable depuis les découvertes des anticorps monoclonaux et de composés cytotoxiques puissants : en effet, les anticorps monoclonaux sont à la base de ces stratégies, vectorisant le composé actif ; néanmoins, les composés peu actifs ayant montrés une efficacité faible, des molécules plus toxiques sont nécessaires pour obtenir une réponse thérapeutique satisfaisante. Depuis, plusieurs de ces conjugués ayant été amenés en phase clinique ou obtenu une autorisation de mise sur le marché (Schéma 17).



ADCETRIS ® (BRENTUXIMAB VEDOTIN)

Schéma 17 : ADCs actuellement utilisés en thérapie ciblée anticancéreuse ; la coupure in cellulo est signifiée pour chaque conjugué

Les 2 premiers ADC (Mylotarg[®] et Besponsa[®]) sont constitués du même agent anticancéreux (*ozogamicine*, en rouge, de la famille des ènediynes) et du même espaceur sensible à la réduction en milieu biologique (pont disulfure) ; ils diffèrent en revanche de par la nature de l'anticorps portant cet assemblage. Si l'activité sur cellules est identique du fait du relargage (selon le même mécanisme) du même principe actif, la cible de ces deux ADC est différentes :

le Mylotarg[®] est indiqué pour le traitement de leucémies aiguës myéloblastiques, présentant l'antigène CD33 reconnu par l'anticorps du Mylotarg[®] ; alors que le Besponsa[®] est indiqué dans les cas de leucémies lymphoblastiques aiguës, présentant l'antigène CD22. Nous pouvons ainsi constater le rôle fondamental de l'anticorps dans le choix de la cible thérapeutique, un même assemblage moléculaire (composé actif et espaceur) pouvant être utilisé dans plus d'une indication par simple changement d'anticorps. On notera que le Mylotarg[®] a tout de même montré des inconvénients majeurs (en particulier de toxicité) après sa mise sur le marché, entrainant son retrait 10 ans plus tard. Cependant, celui-ci a été de nouveau autorisé en 2017 du fait du manque de traitements efficaces actuellement pour ce type d'indication thérapeutique. On admettra donc que, même si les ADC peuvent révéler certaines faiblesses, ils peuvent également apporter une réponse thérapeutique dans des cas où toute autre approche a échoué.

Le Kadcyla[®] se montre en revanche bien plus robuste que les 2 précédents, n'ayant rencontré aucun souci majeur depuis sa mise sur le marché il y a 4 ans, et constitue à l'heure actuelle un traitement efficace pour le traitement des cancers du sein HER-2 positifs (antigène ciblé par l'anticorps de l'ADC). On notera que, comme dans les deux cas précédemment cités, le Kadcyla[®] ne possède pas, dans sa structure, d'espaceur auto-immolable. Or, ceci impose une limitation en soi quant au choix de la molécule thérapeutique utilisée : celle-ci doit posséder une fonction chimique compatible avec l'espaceur tout en étant capable d'être régénéré par la suite ou être active sous forme modifiée (molécule originale comportant un résidu d'espaceur, comme c'est le cas pour Kadcyla[®]).

L'introduction d'un espaceur auto-immolable peut permettre une certaine flexibilité quant à la nature de l'agent cytotoxique greffé à l'assemblage anticorps-espaceur. C'est ainsi que l'Adcetris[®] a été développé : cet ADC cible spécifiquement l'antigène CD30, présent sur les cellules cancéreuses dans les cas de lymphome hodgkinien et anaplagique à large cellule par sa partie anticorps. Après internalisation, la chaine valine- citrulline est reconnue par la cathepsine B, libérant l'aniline qui induit l'élimination du carbamate en *para* ; après décarboxylation, la monométhylauristatine E (MMAE) est régénérée. On notera que seul l'utilisation d'espaceur auto-immolable permet la réalisation d'un tel conjugué : en effet, l'amine de la MMAE est secondaire, rendant l'obtention d'une liaison amide reconnaissable par la cathepsine B impossible, la liaison direct MMAE-citrulline-valine se présentant alors comme un amide tertiaire non peptidique. L'utilisation de l'espaceur *para*-aminobenzyle permet de résoudre ce problème en éliminant l'acide carbamique de MMAE. On soulignera également que ceci a permis d'utiliser un agent cytotoxique extrêmement puissant (IC50 *sub*-nM).

Ce concept de conjugué portant un composé bioactif *via* un bras auto-immolable a depuis été étendu à d'autres biomolécules, notamment dans notre laboratoire (Schéma 18)^{21,22,23}.



Schéma 18 : Conjugués de la toxine de Shiga réalisés par notre équipe

Ces conjugués font intervenir la toxine de Shiga comme agent de vectorisation en lieu et place d'un anticorps. Cette protéine pentamérique d'origine bactérienne possède la propriété de lier spécifiquement le Gb3 (glycolipide membranaire), surexprimé au niveau des cellules cancéreuses, et d'être par la suite internalisée dans la cellule. La protéine est ensuite scindée en ses 2 parties : la sous unité A (STxA) et la sous unité B (STxB). STxA est responsable de la toxicité de la toxine de Shiga tandis que STxB est la sous unité responsable de la fixation au Gb3 et de la vectorisation. Notre équipe a donc exploité les propriétés de STxB : en greffant l'agent cytotoxique comme dans une stratégie ADC classique, il est possible de cibler les cellules cancéreuses présentant le Gb3 en s'affranchissant de STxA. Nous ajouterons que l'avantage de la toxine de Shiga est de reconnaitre un ligand spécifique et de ne montrer qu'une très faible immunogénicité (qui peut être variable dans le cas des anticorps, en imposant de les humaniser, comme nous l'avons vu précédemment). La première génération de conjugué à exploiter cette voie a permis de montrer que 5 molécules cytotoxiques pouvaient être greffées sur STxB (une par cystéine libre). Ce premier conjugué libérait alors, après cyclisation 5-exo-trig, le SN38 (analogue de la camptothécine) avec des activités de l'ordre de 300 nM. Dans le but d'améliorer encore la toxicité des composés, deux nouvelles

²¹ A. El Alaoui, F. Schmidt, M. Amessou, M. Sarr, D. Decaudin, J.-C. Florent, L. Johannes, Angew. Chem. Int. Ed., 2007, 46, 6469–6472

²² C. Batisse, E. Dransart, R. Ait Sarkouh, L. Brulle, S.-K. Bai, S. Godefroy, L. Johannes, F. Schmidt, Eur J Med Chem, 2015, 95, 483-491

 ²³ V. Kostova, E. Dransart, M. Azoulay, L. Brulle, S.-K. Bai, J.-C. Florent, L. Johannes, F. Schmidt, Bioorg Med Chem., 2015,23, 22, 7150-7157

générations ont été synthétisées : en utilisant la MMAE comme agent cytotoxique, l'activité a été ramenée à quelques nM (entre 1 et 6, selon la méthode de bioconjugaison).

Ce dernier point illustre bien que la stratégie ADC pourrait être adaptée à d'autres biomolécules, toujours sur le principe de reconnaissance spécifique d'un antigène. Il apparait également possible d'utiliser des biomolécules non macromoléculaires pour cibler un récepteur en particulier : les travaux de *Ojima et al.*²⁴ montre en effet qu'un antigène (en l'occurrence : le L1210FR, présent dans certaines formes de leucémie) peut être reconnu par de petites molécules (ici, la biotine). L'internalisation du composé est ensuite suivie de la réduction du pont disulfure, générant un soufre nucléophile qui formera un cycle à 5 chainons et libérera le taxol *in cellulo* (Schéma 19). Le composé prodrogue montre une sélection drastique de la lignée cellulaire testée (60 fois plus sélectif pour les cellules présentant L1210FR) tout en augmentant l'efficacité du composé cytotoxique de base (la prodrogue est 13 fois plus toxique pour les cellules présentant l'antigène que le taxol libre).



Schéma 19 : Prodrogue du taxol biotinylée de Ojima et al.

A travers ce premier paragraphe, nous avons pu voir un aperçu très large des applications des espaceurs auto-immolables dans les stratégies prodrogues. Ayant été reportés une première fois dans le cadre de cette approche, les exemples d'utilisation de ces structures en thérapeutique sont nombreux et variés : ils sont présents dans de nombreuses approches prodrogues (augmentation de solubilité, de sensibilité ou de sélectivité) et certaines prodrogues comportant un espaceur auto-immolable sont même actuellement utilisés en clinique (l'Adcetris[®] en est un parfait exemple). Néanmoins, bien que moins nombreux car

²⁴ S. Chen, X. Zhao, J. Chen, J. Chen, L. Kuznetsova, S. S. Wong, I. Ojima, Bioconjugate Chem., 2010, 21, 979–987

plus récents, d'autres applications pour ces espaceurs ont été développées ces dernières années dans le domaine de l'imagerie notamment. Fonctionnant sur un principe similaire (auto-immolation libérant un composé d'intérêt, ici fluorescent), nous ne citerons que les exemples les plus pertinents concernant ces applications non thérapeutiques.

- B. Sondes et imageries
- 1. Détections de composés chimiques

Nombre de petites molécules, organiques ou inorganiques, sont considérés comme des contaminants et polluants : leur détection fait donc l'objet d'intenses recherches. Beaucoup d'exemples sont actuellement décrits, mais tous rencontrent la même limitation : la sensibilité pour l'analyte ciblé. En effet, ces contaminants peuvent avoir un impact (éco)toxicologique important, même à des concentrations faibles ; il est donc impératif que les sondes permettant de les détecter aient une sensibilité suffisante.

L'ion fluorure, en particulier, peut se révéler extrêmement toxique même à faible concentration. Il est généralement admis que seule une forte dose peut causer une fluorose aigüe capable d'entrainer la mort à court terme. Cependant, la corrélation entre différentes pathologies (fragilisation osseuse grave et irréversible, dérèglement de la thyroïde, …) et la présence de fluorure a été largement démontrée, pour des concentrations en ions très fable (de l'ordre du ppm). De fait, la détection de F⁻ est devenu un enjeu important, ceux-ci étant de plus en plus présent dans la nature du fait de l'activité humaine. *Shabat et al.*²⁵ ont imaginé un système dendritique (en bleu) pouvant sélectivement détecter l'ion fluorure avec une sensibilité remarquable : en effet, le dendrimère réagissant avec le F⁻ libère, en plus du rapporteur (en rouge), deux équivalents de fluorure qui pourront à leurs tours activer le dendrimère, amplifiant le signal par une réaction en chaine (Schéma 20) ; ce qui permet une réponse de la sonde correcte avec peu d'équivalent de fluorure.



Schéma 20 : Sonde fluoro-sensible auto-amplifiable de Shabat et al.

²⁵ R. Perry-Feigenbaum, E. Sella, D. Shabat, Chem. Eur. J., 2011, 17, 12123-12128

Les résultats de Shabat montrent clairement une sélectivité pour les sels de fluors (NaF, TBAF), comme attendu, en plus de démontrer la sensibilité de la sonde : le F⁻ peut ainsi être détecté à hauteur de 0.004 équivalents par rapport à la sonde.

On notera que ces travaux constituent une avancée par rapport aux précédentes publications de cette équipe : l'année précédente, *Shabat et al.* ont en effet décrit un système autoamplifiable²⁶ constitué de deux molécules (une pour amplifier et l'autre libérant le rapporteur, voir schéma 21). Ce système est bien moins satisfaisant car non induit par une unique molécule ; ce qui peut être un handicap, les deux parties constituant la sonde ne se trouvant pas à la même localisation aux mêmes concentrations (dans le cadre d'une utilisation *in cellulo* notamment). De plus, les résultats se montraient moins prometteurs : le système n'était capable d'offrir un signal satisfaisant qu'à partir de 0.1 équivalent d'analyte (H₂O₂), soit 2.5 fois plus que pour la sonde décrite au schéma 20.



Schéma 21 : Précédent système auto-amplifiable de Shabat et al.

2. Détections d'enzymes locales

Si les sondes sont parfois mises à contributions dans le cadre de la chimie analytique pour la détection de contaminants, leur utilisation majeure reste l'imagerie *in vitro, in cellulo* et *in vivo*. En effet, incorporés au sein d'espaceurs auto-immolables, les molécules rapportrices ne montrent pas toutes leurs propriétés (magnétiques, fluorescentes, ...); celles-ci ne sont dévoilées qu'après auto-immolation à la suite du déclenchement du signal spécifique considéré. Les sondes pour quantifier une activité enzymatique donnée sont particulièrement étudiées, comme dans le cas de l'exemple donné par *Tung et al.*²⁷ (Schéma 22). Les auteurs

²⁶ E. Sella, A. Lubelski, J. Klafter, D. Shabat, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 11, 3945–3952

²⁷ N.-H. Ho, R. Weissleder, C.-H. Tung, ChemBioChem, 2007, 8, 560 – 566
ont conçu une sonde répondant à une activité β -galactosidase de par sa partie galactose (vert), libérant un phénol (bleu) éliminant le carbamate en position para-benzylique pour donner le fluorophore lié à une glycine (rose). La lysine terminale ainsi formée étant instable, celle-ci s'hydrolyse spontanément pour régénérer le fluorophore 2SBPO libre (rouge), exhibant pleinement sa fluorescence. Le suivi de celle-ci au cours du temps donne l'activité enzymatique correspondante. Les auteurs justifient la présence de la glycine de la façon suivante : la sonde sans glycine (où le carbamate éliminé est le carbamate de 2SBPO) s'est révélé fluorescent, la fonction carbamate ne permettant vraisemblablement pas de supprimer la fluorescence de l'intermédiaire. A l'inverse, un amide de 2SBPO suffit à éteindre la fluorescence, d'où la présence de l'acide aminé dans la structure finale. Considérant que l'hydrolyse spontanée de la partie lysine ne peut intervenir qu'après la libération de sa partie amine et non à partir de la forme carbamate, seule l'action de la galactosidase est apte à régénérer la fluorescence de 2SBPO. Après avoir montré la spécificité de la sonde pour la galactosidase, les auteurs ont également démontré une vitesse de coupure du profluorophore très rapide comparé à son équivalent sans espaceur auto-immolable : ceci prouve une fois de plus l'utilité de ce genre de structure, ici en permettant d'éviter tout encombrement stérique lors de l'action de l'enzyme (hypothèse des auteurs).



Schéma 22 : Sonde quantifiant l'activité β-galactosidase de Tung et al.

Cet exemple est particulièrement intéressant, considérant l'importance de la β -galactosidase comme gène rapporteur en biologie moléculaire (après transfection de plasmide par exemple), et de l'importance de quantifier l'activité enzymatique correspondante.

La mesure de fluorescence a toutefois été souvent citée comme potentiellement problématique : bien que de très faibles concentrations en fluorophore suffisent à obtenir une fluorescence forte, celle-ci pourrait être neutralisée par l'environnement où elle se trouve ; surtout si celui-ci est cellulaire (les protéines absorbant une partie non négligeable de la fluorescence, en plus de présenter une auto-fluorescence). Si tel était le cas, la stratégie citée pourrait être ternie par ce handicap. De la même manière, un rapporteur dosable par colorimétrie (mesure d'absorbance dans le spectre visible) ne présente pas ce désavantage mais nécessite des concentrations bien plus élevées pour être détecté. *Shabat et al.* ayant considérés que ces deux techniques étaient complémentaires dans leurs avantages et inconvénients, ils ont décidé d'associer les deux types de rapporteurs au sein d'une même structure (Schéma 23) : la méthode de visualisation utilisée sera alors choisie en fonction du cas présent. Dans cette approche, les auteurs ont incorporé à un substrat sensible à la Pénicilline G Acylase (PGA, enzyme bactérienne) 2 voies d'auto-immolations identiques (éliminations 1.4) libérant chacune un rapporteur différent : le *para*-nitrophénol (en rose, rapporteur colorimétrique) et la 6-aminoquinoline (en rouge, rapporteur fluorescent). Ainsi, une même activation (coupure par la PGA) mène à la libération de 2 rapporteurs, pour autant de méthodes d'analyses.



Schéma 23 : Dendrimère à double rapporteur de Shabat et al.

Un autre inconvénient régulièrement attribué aux stratégies profluorophores est la diffusion de la molécule fluorescente hors de son site d'activation après sa libération. Ceci entraine logiquement un aspect plus diffus du signal.

*Hasserodt et al.*²⁸ se sont particulièrement attachés à résoudre ce problème en synthétisant des sondes basées sur le 2-(2'-hydroxyphenyl)-4(3H)-quinazolinone (HPQ) (Schéma 24), un fluorophore insoluble dans les milieux aqueux : dû à cette dernière propriété, les auteurs suppriment toute diffusion éventuelle, le fluorophore précipitant au niveau du site d'activation.

De plus, le HPQ montrent d'autres propriétés intéressantes (large déplacement de Stokes, fluorescence intense). Selon les auteurs, l'intérêt d'une telle sonde serait de fournir un signal spécifique, intense et net au niveau du site d'activation.

²⁸ X.-B. Zhang, M. Waibel, J. Hasserodt, Chem. Eur. J., 2010, 16, 792 – 795



Schéma 24 : Profluorophore de HPQ sensible à la leucine aminopeptidase

Il reste également possible de libérer un rapporteur autre que fluorescent ou possédant une densité optique et ainsi se tourner vers d'autres formes d'imagerie. En ce sens, l'exemple fourni par Antunes et al.²⁹ est particulièrement adapté : les auteurs ont synthétisé une sonde auto-immolable sensible à la β-glucuronidase libérant une fluoroéthylamine dont le fluor est l'isotope F¹⁸. Cet isotope est actuellement utilisé couramment en imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons) de par sa capacité à produire un positron par désintégration β^+ , lequel sera annihilé par un électron du milieu où il se trouve, produisant deux photons détectables. Ainsi, la localisation du traceur F¹⁸ pourra être déterminée, celui-ci s'accumulant au niveau de sa cible. A l'heure actuelle, le F¹⁸-fluoroglucose est utilisé pour discriminer les cellules à fort besoin métabolisme, comme les tumeurs (ce traceur se comportant comme le glucose, source d'énergie) où il s'accumule. Antunes et al. ont eux conçu un traceur discriminant les cellules excrétant dans le milieu extracellulaire la ß-glucuronidase : celle-ci est régulièrement présente dans l'environnement des tumeurs solides. De fait, la sonde de cette équipe pourrait permettre d'identifier la localisation d'une tumeur, autant qu'elle confirmerait l'expression de l'enzyme par la tumeur. Ceci permettrait à terme d'identifier rapidement et efficacement le profil de chaque tumeur et d'apporter la réponse thérapeutique adaptée (prodrogue sensible à la glucuronidase ou non). Le principe de la sonde d'Antunes et al. est le suivant (Schéma 25) : les cellules produisant la β-glucuronidase activent le composé, libérant le phénol libre et induisant l'élimination 1.6 du carbamate en position para ; la fluoroéthylamine générée après décarboxylation, très hydrophobe, s'incorpore dans les cellules tumorales environnantes qui sont révélées par l'imagerie TEP. Les résultats sont prometteurs et ont bien permis de discriminer in vivo (souris) les tumeurs exprimant la glucuronidase d'autres tumeurs ne sécrétant pas cette enzyme, celles-ci accumulant la fluoroéthylamine radioactive. Même si cette technique peut apparaitre limitée, faisant

²⁹ I. F. Antunes, H. J. Haisma, P. H. Elsinga, R. A. Dierckx, E. F. J. de Vries, Bioconjugate Chem., 2010, 21, 911–920

intervenir un isotope à la durée de vie faible (moins de 2h) et donc très instable dans le temps, elle présente au moins l'avantage d'induire une sélectivité pour la tumeur ciblée bien plus élevée par rapport au fluoroglucose.



Schéma 25 : Principe de la sonde de Antunes et al. pour l'imagerie TEP

Le dernier exemple de sonde utilisant un espaceur auto-immolable que nous avons choisi de présenter concerne l'imagerie par résonnance magnétique (IRM)³⁰. Dans cet article, les auteurs s'appuient sur le phénomène PARACEST (PARamagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer), consistant en une modification des propriétés paramagnétiques d'une entité par échange de molécules d'eau ou de proton. Ici, les auteurs forment un complexe d'ytterbium au sein duquel se trouve un carbamate de benzyle (en bleu dans le schéma 26). Celui-ci peut être éliminé par élimination 1.6 par coupure du galactose greffé (en vert) en position phénolique par action de la β-galactosidase. Une fois l'auto-immolation réalisée, on forme une amine secondaire : celle-ci échange des protons (avec les molécules d'eau saturant le milieu environnant, en rouge) différemment que le carbamate d'origine, ce qui induit un changement des propriétés paramagnétiques du complexe d'ytterbium ; la détection de ce changement est perceptible en IRM. Les auteurs avancent que le groupement protecteur du phénol (galactose) est sans incidence sur les propriétés paramagnétiques du complexe : ainsi, ce substrat pourrait être remplacé par tout autre substrat enzymatique (séquence peptidique, ester, ...) et donc que cette stratégie pourrait être adaptée à la détection d'autres enzymes. On notera que, les lanthanides ayant des réactivités similaires, le Yb pourrait également être remplacé (par du gadolinium, par exemple) afin d'exploiter des effets physico-chimiques différents (luminescence, absorption infrarouge, ...). Le fait que ces deux parties de la sonde (nature du substrat enzymatique et nature du lanthanide) puissent être modifiées pour apporter de nouvelles propriétés autoriserait de nombreuses applications, confirmées et reportées par la suite par cette même équipe³¹.

³⁰ T. Chauvin, P. Durand, M. Bernier, H. Meudal, B.-T. Doan, F. Noury, B. Badet, J.-C. Beloeil, E. Tóth, Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47, 4370 –4372

³¹ J. He, C. S. Bonnet, S. V. Eliseeva, S. Lacerda, T. Chauvin, P. Retailleau, F. Szeremeta, B. Badet, S. Petoud, E. Tóth, P. Durand, J. Am. Chem. Soc., 2016, 138, 2913–2916



Schéma 26 : Sonde PARACEST basée sur un espaceur auto-immolable, crée par Durand et al.

Nous avons pu voir à travers ce paragraphe des exemples très variés de sondes autoimmolables répondant à une activité enzymatique, aussi bien au niveau des enzymes ciblées (protéases, glycosidases, ...) que des techniques analytiques exploitées (spectroscopie visible, fluorescence, magnétisme, ...).

- C. Importance du paramètre cinétique dans les utilisations in vitro/in vivo
- 1. Pharmacocinétique, diffusion et les contraintes qu'elles imposent

Un aspect des espaceurs auto-immolables que nous n'avons encore pas abordé est celui de la cinétique d'auto-immolation : en effet, la libération du composé d'intérêt (molécule active, rapporteur) à partir d'un composé prodrogue ou profluorophore est un phénomène multiétape (schéma 27). La première, celle d'activation, consiste à couper la liaison entre le groupement protecteur et l'espaceur auto-immolable. Comme nous l'avons vu précédemment, l'étape d'activation peut être enzymatique ou chimique. Cette étape possède sa propre constante de vitesse k₁, variable selon la méthode d'activation. Une fois celle-ci réalisée, un intermédiaire instable est formé et subira une étape d'auto-immolation qui conduira à la libération du composé d'intérêt. Comme pour l'activation, l'auto-immolation possède une constante cinétique noté k₂, variable selon l'espaceur.



Schéma 27 : Aspects cinétiques d'un espaceur auto-immolable, de l'activation à la libération du composé B

La vitesse d'auto-immolation est un point qui ne peut être négligé, la plupart des applications dépendant fortement de la vitesse à laquelle le composé sera libéré : que cela soit dans le cas des sondes comme dans celui des prodrogues, il peut être problématique d'avoir une vitesse d'auto-immolation trop faible, au risque de laisser le temps à l'intermédiaire de diffuser et libérer le composé hors du site d'activation. Dans le cas d'une sonde, on perdrait en résolution car le rapporteur serait libéré loin de l'analyte considéré ; dans le cas d'une prodrogue, le composé actif pourrait être libéré loin de sa cible et induirait certainement une toxicité.

2. Difficultés de la détermination cinétique

Les cinétiques d'auto-immolation restent des paramètres méconnus : celles-ci dépendent avant tout du mécanisme d'auto-immolation (cyclisation ou élimination) et de la structure de l'espaceur. De plus, la cinétique impliquant deux étapes distinctes (l'activation puis l'auto-immolation), il est impératif de découpler la cinétique de chacune des étapes : dans le cas contraire, on observerait essentiellement la vitesse de l'étape cinétiquement limitante (la plus lente). Or, il apparait que les voies d'activations classiquement utilisées (chimiques et enzymatiques) sont souvent lentes (jusqu'à plusieurs minutes) et peuvent se révéler problématique dans l'acquisition de la cinétique de l'étape d'auto-immolation. Les études cinétiques de *Lee et al.*³² menées en 2009 illustrent bien la difficulté d'obtenir des valeurs fiables pour les vitesses d'auto-immolations élevées (Schéma 28).

Les auteurs ont construit des espaceurs utilisant l'umbelliferone (7-hydroxycoumarine) comme rapporteur de l'auto-immolation, un noyau phénol comme cœur de l'espaceur et un groupement silylé greffé sur le phénol comme groupement protecteur de l'auto-immolation.

L'activation est réalisée par introduction de F⁻, coupant l'éther silylé et régénérant le phénol, induisant l'élimination (1.4 ou 1.6) de l'umbelliferone (rapporteur fluorescent).

La mesure de fluorescence, associée à un traitement mathématique, donne la constante d'auto-immolation k_2 .

Par cette méthode, utilisant une activation chimique, aucune cinétique d'élimination de dérivés carbonates n'a pu être déterminée, les mesures correspondant à des cinétiques de pseudo premier ordre.

Cependant, les auteurs ont pu déterminer les cinétiques d'auto-immolation des dérivés éthers : la valeur donnée pour τ (défini comme étant l'inverse de k₂, constante de vitesse d'auto-immolation) est de 1.16 min, pour les dérivés *ortho* et *para*. Ce dernier point démontre une équivalence cinétique entre les éliminations 1.4 et 1.6.

³² H.-Y. Lee, X. Jiang, D. Lee, Org. Lett., 2009, 11, 10, 2065-2068



Schéma 28 : Molécules modèles pour la détermination de cinétique d'élimination 1.4 et 1.6 de dérivés éthers et carbonates

Bien qu'intéressantes, ces conclusions soulèvent de nombreuses questions. La première concerne la cinétique de dérivés carbonates, toujours inconnues. Il en est de même pour d'autres dérivés couramment rencontrés dans la littérature, tels les carbamates. Enfin, nous noterons que les cinétiques déterminés ici ne concernent que le noyau benzénique non substitué : il serait souhaitable d'observer les modifications de cinétiques induites par l'introduction de substituants sur des cycles aromatiques ou hétéroaromatiques. Afin de répondre à ces questions, notre équipe s'est attachée à construire un modèle permettant la détermination précise de constantes cinétiques d'auto-immolation, depuis les plus lentes jusqu'aux plus rapides.

3. Modèle employé par notre équipe

Comme nous l'avons signifié, l'activation chimique ne permet d'obtenir une résolution cinétique suffisante pour déterminer les constantes de vitesses des composés dont l'autoimmolation est rapide, tels les carbonates et carbamates pourtant très décrits dans la littérature. L'activation enzymatique ne montrerait en général pas de meilleurs résultats, celle-ci étant souvent plus lente que ne peut l'être l'activation chimique. Il a donc fallu trouver une voie de déprotection de l'hétéroatome initiant l'auto-immolation plus rapide que les deux précédemment citées, tout en conservant un bon rendement. En ce sens, l'activation photochimique présente de nombreux avantages : certains groupements protecteurs, tels les dérivés *ortho*-nitrobenzyles, sont en effet clivables en quelques millisecondes dans le proche UV avec d'excellents rendements³³. De ce fait, l'utilisation d'un tel groupement pourrait permettre de dépasser la limite de résolution imposée par l'étape d'activation, k₁ devenant bien plus élevé que k₂. Inspirée des travaux précédents, notre équipe a choisi comme rapporteurs de l'étape d'auto-immolation des molécules fluorescentes, dont le suivi de l'évolution donnera la constante k₂ après traitement mathématique (voir Annexe).

In fine, les espaceurs auto-immolables étudiées dans un premier temps par notre équipe³⁴ reposent sur les éléments suivants (Schéma 29) :

³³ I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien, Chem. Eur. J., 2006, 12, 6865 – 6879

³⁴ A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, I. Aujard, S. Dubruille, F. Schmidt, L. Jullien, Chem. Eur. J., 2013, 19, 11717 – 11724

- Le noyau utilisé comme cœur de l'espaceur est un noyau phénol, possédant une position benzylique en ortho. Celle-ci porte le groupement partant rapporteur de l'auto-immolation, tandis que le phénol est protégé par un groupement photoactivable. Le phénol porte différents substituants, en vue de déterminer l'effet de ceux-ci sur la cinétique d'auto-immolation.
- Le groupement photoactivable choisi est le 4.5-diméthoxy-2-nitrobenzyle (dit 6nitrovératryle), sélectivement clivable par irradiation à 365 nm. On note que le temps où l'auto-immolation est initiée est de fait parfaitement connu, puisqu'il correspond au moment où l'irradiation commence.
- Les rapporteurs utilisés sont trois molécules fluorescentes : la 7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one) (dite DDAO), émettant à 660 nm ; la 7-hydroxy-4-trifluorométhylcoumarine et la 7-amino-4-trifluorométhylcoumarine, toutes deux émettant à 500 nm. On notera que les trois rapporteurs fluorescencent après excitation à 365 nm, soit la même longueur d'onde que celle de photoactivation.
- La liaison entre l'espaceur et le rapporteur peut être de trois natures : éther (d'hydroxycoumarine), carbonate (d'hydroxycoumarine ou de DDAO), et carbamate (d'aminocoumarine).



Schéma 29 : Modèle d'études cinétiques mis au point par notre équipe

Une fois les composés synthétisés, ceux-ci ont été analysés par suivi de fluorescence au cours du temps ce qui a permis, après traitement mathématique, de déterminer la valeur de k₂, la constante de vitesse d'auto-immolation. Expérimentalement, le composé cagé est tout d'abord solubilisé dans un mélange (1 :1) CH₃CN/tampon Britton-Robinson³⁵. Ce tampon présente l'avantage d'être parfaitement miscible avec l'acétonitrile en dépit de sa haute concentration en sels inorganiques (0.1 M acide borique/acide phosphorique). La solution est ensuite placée dans une cuve soumise à irradiation. Le signal résultant (à 660 nm ou à 500 nm,

³⁵ C. Frugoni, Gazz. Chim. Ital., 1957, 87, 403-407

dépendant du fluorophore) est détecté au cours du temps pour donner la courbe expérimentale (ici en rouge sur le schéma 30). Cette courbe est alors corrélée à la courbe théorique (en noir) donnée par le modèle mathématique traduisant la totalité du phénomène, de l'activation jusqu'à l'auto-immolation ce qui permet d'extraire les valeurs numériques des constantes cinétiques (Voir Annexe).



Schéma 30 : Montage utilisé en fluorimétrie (gauche) pour l'obtention des courbes de fluorescences en fonction du temps

Les résultats obtenus par *Labruère et al.* ont permis de déterminer les cinétiques d'éliminations 1.4 basées sur des dérivés phénols (Schéma 31) et l'influence de certains paramètres sur celles-ci (température, pH, pKa du groupement partant, substitution du cycle). Les auteurs ont également pu remarquer que l'élimination d'un phénol à partir d'un dérivé éther (cas 1, encadré plein sur le schéma 31) ne faisait pas appel au même modèle cinétique que l'élimination d'un acide carbonique/carbamique à partir du carbonate/carbamate correspondant (cas 2, encadré pointillé) : en effet, l'élimination 1.4 d'un dérivé carbonate ou carbamate conduit à la libération d'un acide non fluorescent, qui subira par la suite une décarboxylation régénérant l'entité fluorescente. Cette étape de décarboxylation possède sa propre constante cinétique à trois étapes, contre deux dans le cas de dérivé éther. Néanmoins, notre équipe a montré que la constante de vitesse de décarboxylation était très élevée dans tous les cas (moins d'une milliseconde, en accord avec la littérature³⁶), ce qui en fait une étape cinétiquement négligeable : aussi, les cinétiques ont été déterminées sur la base d'un modèle à trois étapes pour tous les dérivés (éthers, carbonates et carbamates).

³⁶ S. L. Johnson, D. L. Morrison, J. Am. Chem. Soc., 1972, 94, 4, 1323-1334



Schéma 31 : Différentes étapes cinétiques des dérivés éthers et carbonates/ carbamates, de la photolyse à la régénération du fluorophore

Les auteurs ont ainsi pu établir l'effet positif de la température sur la cinétique d'autoimmolation : plus la température augmente (de 293 à 310 K) et plus l'élimination est rapide (d'un facteur entre 5 et 10 selon la nature du groupement partant), ceci pour toutes les séries.

De la même manière, le pH accélère l'élimination dans le cas où celui-ci serait assez élevé pour que le phénol existe sous forme déprotoné : l'élimination étant basée sur la délocalisation des électrons de l'oxygène vers la position benzylique par le cycle aromatique, on peut considérer qu'augmenter la richesse de l'oxygène en formant le phénolate accélère le processus (d'un facteur 100 en moyenne).

Le pKa du groupement partant est également un facteur critique de la cinétique d'élimination : l'équipe a effectivement montré que l'élimination d'acides (carboniques ou carbamiques) intervenait en moyenne 10³ fois plus rapidement que l'élimination de phénol. Les temps de désassemblages des dérivés éthers sont en effet de l'ordre de la minute alors que les temps d'auto-immolations en séries carbonate et carbamate sont de l'échelle de la seconde ou de la milliseconde, en fonction des substituants.

La différence de cinétique entre les dérivés carbonate et carbamate n'est que peu significative : le carbonate de coumarine a montré une constante de vitesse tout juste 1.5 fois plus élevée que celle du carbamate correspondant. De la même manière, les dérivés

carbonates de coumarine (pKa = 7) et de DDAO (pKa = 5) ont montré des temps de désassemblage très proches : le temps d'élimination du carbonate est 2.5 fois plus court pour le dérivé coumarine que pour le dérivé DDAO, tentant à indiquer que le pKa du phénol après décarboxylation n'a pas d'incidence majeure sur la cinétique.

La nature du substituant porté par le cycle aromatique a une grande influence sur la cinétique d'auto-immolation. De manière générale, la présence d'un substituant électroattracteur (Br, NO₂) diminue la vitesse d'élimination : le dérivé bromé par exemple élimine 20 fois moins rapidement que le dérivé non substitué. Cependant, ceci n'est valable qu'à état de protonation égal : en effet, les substituants électroattracteurs diminuent le pKa, accroissant la proportion de phénolate à pH équivalent par rapport au dérivé sans substituant. Le dérivé nitro, par exemple, possède un pKa d'environ 7 : ceci le rend partiellement déprotoné au pH de mesure 8, ce qui explique alors la relative accélération par rapport au dérivé non substitué. On peut donc affirmer que si la présence d'un groupement électroattracteur ne modifie pas l'état de protonation, alors on observera une diminution de la cinétique d'auto-immolation.

A l'inverse, la présence d'un substituant électrodonneur induit une augmentation considérable de la cinétique d'élimination (facteur 70 entre le dérivé H et le dérivé OMe) : les auteurs justifient ce résultat par l'augmentation de la stabilisation du cation benzylique formé lors de l'élimination du groupement partant.

Ainsi, *Labruère et al.* ont réussi à déterminer les cinétiques de dérivés carbonates et carbamates, jusqu'alors inconnues, de même qu'ont été identifiés les facteurs prépondérants de la vitesse d'auto-immolation (pH, pKa du groupement partant, effet du substituant, ...). De fait, à partir d'une même série de phénols réalisant une élimination 1.4, les auteurs ont établi des temps de désassemblage allant de 10^3 à 10^{-2} s.

La pyridine ayant été précédemment utilisée avec succès comme noyau d'espaceurs autoimmolables³⁷ et dans la même optique d'approfondir notre connaissance des espaceurs autoimmolables, notre équipe s'est attachée à déterminer les cinétiques d'éliminations 1.4 et 1.6 de dérivés basés sur des noyaux hétéroaromatiques pyridines et pyrimidines³⁸ (Schéma 32).

L'hypothèse de travail était de démontrer que les cycle hétéroaromatiques pouvaient montrer des cinétiques d'éliminations rapides du fait de leurs énergies de résonnances faibles. En effet, le mécanisme d'auto-immolation par élimination implique de briser temporairement l'aromaticité du cycle : logiquement, plus l'énergie de résonnance d'un cycle est faible et plus la barrière énergétique à franchir est faible, ce qui devrait favoriser cinétiquement le processus d'élimination. Avec une énergie de résonnance de 150 kJ/mol, le cycle benzénique est celui dont l'aromaticité est sensée être la plus dure à briser, suivi de la pyridine (142 kJ/mol) et de la pyrimidine (132 kJ/mol).

³⁷ R. Perry-Feigenbaum, P. S. Baran, D. Shabat, Org. Biomol. Chem., 2009, 7, 4825–4828

³⁸ A. Alouane, R. Labruère, K. J. Silvestre, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, Chem. Asian J., 2014, 9, 1334–1340



Schéma 32 : Structures des espaceurs contenant des noyaux hétéroaromatiques cinétiquement analysés

Les résultats semblent indiquer le contraire cependant : typiquement, les espaceurs pyrimidiques (L31 et L32) éliminent 10 fois rapidement que les cycles pyridiniques (L28,29 et 30), qui eux même éliminent 70 fois moins rapidement que les espaceurs benzéniques. Les auteurs ont attribué ce résultat à la faible densité électronique des cycles azotés, laquelle entrainerait une baisse de la délocalisation du doublet de l'oxygène formé après photoactivation, diminuant la cinétique.

Comme nous l'avons laisser entendre, les espaceurs basés sur un cycle pyridinique montrent des vitesses d'auto-immolations plus faibles qu'en série benzène : à pH 4, les temps d'éliminations vont de 25min à 2h ; ils sont compris entre 2 et 30min à pH 8. On notera qu'aucun dérivé pyridine n'est sous forme phénolate à ce pH ; en revanche, le cycle est sous forme pyridine à pH 8, alors qu'il est sous forme pyridinium à pH 4. Ceci pourrait expliquer le résultat, le cycle étant plus pauvre en électron sous forme protonée ; ce qui est cohérent avec l'hypothèse corrélant cinétique et densité électronique du noyau.

Labruère et al. ont également montré, comme en série benzène, la similarité de cinétique des éliminations 1.4 (L28) et 1.6 (L30), n'étant distinct que d'un facteur 3 à pH 4 et 2 à pH 8.

En revanche, ils ont noté une différence significative entre la cinétique du dérivé L28 et celle du dérivé L29, tendant à prouver que la position de l'azote par rapport à la position benzylique a une incidence sur la vitesse d'auto-immolation. En effet, dans le cas du dérivé L28 où l'azote est en *ortho* du carbamate benzylique, le temps d'élimination est de 45 min à pH 4 (forme pyridinium) et de 2 min à pH 8. Dans le cas du dérivé L29 (N en *para* du carbamate), le temps de désassemblage est de 25 min à pH 4 et reste inchangé à pH 8. Notre équipe a conclu que, sous forme pyridinium où seule compte la richesse électronique du cycle, les deux dérivés avaient des cinétiques comparables ; ceux-ci sont strictement équivalents en terme de densité électronique. Cependant, sous forme pyridine, l'hypothèse formulée était que le doublet de l'azote peut s'additionner sur le carbonyle du carbamate, assistant l'auto-immolation. Ceci expliquerait la différence de cinétique significative entre L28, assistant l'élimination par son azote en *ortho* du benzyle, et L29 n'en étant pas capable.

La série pyrimidine a montré des résultats tout à fait similaires, à une différence près : sous forme pyrimidinium (à pH 4), la densité électronique est si faible qu'elle ne permet pas l'élimination du groupement partant (aucune fluorescence relevée). Les auteurs ont confirmé qu'une alcalinisation du milieu permettait de poursuivre l'auto-immolation.

Les deux exemples ici développés constituent à l'heure actuelle les études cinétiques les plus complètes réalisées sur les espaceurs auto-immolables, confirmant la robustesse de la méthode développée par notre équipe. Cependant, elles ne constituent pas l'intégralité des recherches sur le sujet : c'est pourquoi nous nous nous attacherons à relayer un aperçu des propriétés cinétiques reportées dans la littérature et de placer nos conclusions dans ce contexte.

4. Etat de l'art des cinétiques reportées

Les données reportés jusqu'alors par notre équipe concernait les dérivés dont l'autoimmolation était initiée par délocalisation des électrons d'un phénol sur un cycle aromatique. Néanmoins, l'oxygène n'est pas le seul hétéroatome utilisé comme initiateur. Comme nous l'avons vu, l'azote est également souvent rencontré dans les espaceurs dont l'autoimmolation est basée sur une élimination 1.4 ou 1.6. Les espaceurs de type aniline sont donc particulièrement considérés et étudiés cinétiquement. *Phillips et al.*, par exemple, décrivait en 2012³⁹ que l'introduction de substituants donneurs (méthoxy) en position 3 (*meta* de l'azote, *ortho* de la position benzylique) accroissait drastiquement la cinétique d'élimination 1.6. Le modèle de Phillips et son équipe est le suivant (Schéma 33) : l'aniline protégée par un groupement alloc (allyloxycarbonyle) possède une fonction benzylique en *para* lié à divers phénols par une liaison éther. Trois dérivés ont été synthétisés : un dérivé sans substituant (L33), un dérivé monosubstitué en *meta* (L34) et un dérivé disubstitué en *meta/meta*' (L35).

³⁹ K. M. Schmid, L. Jensen, S. T. Phillips, J. Org. Chem., 2012, 77, 4363-4374



Schéma 33 : Structures proposées par Phillips et al. pour l'étude de la meta-substitution sur la cinétique d'élimination d'anilines

Les auteurs ont ainsi pu montrer la différence conséquente entre les cinétiques d'éliminations des dérivés non et mono substitué (L33 et L34) : le facteur d'accélération dépasse les 50, passant d'un temps de demi-vie de presque une journée pour L33 à une demi-heure pour L34. L'introduction d'un second méthoxy diminue encore d'au moins 35 le $t_{1/2}$, à tel point que celuici se trouve au-delà de la limite de résolution cinétique de la technique d'analyse (HPLC). Les résultats obtenus par *Phillips et al.* sont en parfaite adéquation avec les résultats de *Labruère et al.*, à savoir que la présence de substituants donneurs a une influence considérable sur la réduction du temps d'élimination.



Schéma 34 : Structures aromatique et polyaromatiques de l'étude de Phillips et al.

De même, Phillips et son équipe (Schéma 34) ont par la suite relayé les mêmes conclusions que les nôtres⁴⁰ quant à l'impact de la densité électronique sur la vitesse d'auto-immolation : dans cet article, les auteurs ont en effet comparé les cinétiques de différentes anilines (benzylique, naphtalénique, phénanthrénique). En effet, les calculs indiquent une chute de l'aromaticité quand le nombre de cycle augmente : considérant l'aniline L33 comme référence ayant une aromaticité de 1, l'aminonaphtalène L36 et l'aminophénanthrène L37 montrent une

⁴⁰ K. M. Schmid, S. T. Phillips, J. Phys. Org. Chem., 2013, 26, 608-610

aromaticité de 0.912 et 0.813, respectivement. Conformément à nos résultats, les temps de demi-vies des composés naphtalène et phénanthrène sont de 2 et 2.5 fois plus long que celui de l'aniline, respectivement. On notera que le temps de demi-vie de l'aniline L33 diffère légèrement de celle obtenue précédemment, du fait que les études cinétiques ont été menées dans un solvant différent.

Comme nous avons pu le voir jusqu'à présent, les espaceurs auto-immolables ont été couramment utilisés dans les stratégies prodrogues et pour la construction de sondes. Les cinétiques de ces structures ont depuis peu retenu l'attention des chercheurs et sont de plus en plus reconnues comme des paramètres cruciaux dans les applications citées. On ne manquera pas de remarquer cependant que l'élimination est un phénomène bien plus décrit que la cyclisation, tant d'un point de vue cinétique que du point de vue des utilisations.

Afin de compléter cette introduction des espaceurs auto-immolables et dans le but d'offrir un aperçu exhaustif des structures disponibles, nous détaillerons plus en détails les deux mécanismes d'auto-immolations.

II. Les mécanismes d'auto-immolations

- A. Les processus d'éliminations
- 1. Eliminations 1.4, 1.6, 1.8 et 1.10

Comme nous l'avons vu au travers des exemples décrits, plusieurs mécanismes d'éliminations ont été décrit par le passé. Dans la plupart des cas, l'élimination implique la délocalisation d'un doublet électronique d'un hétéroatome sur un cycle aromatique, laquelle est ensuite transmise jusqu'à une position benzylique portant le groupement partant à éliminer⁴¹ (Schéma 35).



Schéma 35 : Mécanismes d'éliminations faisant intervenir une délocalisation vers un système π conjugué ; avec : LG, groupement partant et X, hétéroatome

⁴¹ A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, Angew. Chem. Int. Ed., 2015, 54, 7492 – 7509

La position du benzyle dicte le type d'élimination réalisée : dans le cas des cycles aromatiques simples (benzène, pyridine, pyrimidine), si le benzyle est en *ortho* de l'hétéroatome on parlera d'élimination 1.4 (L38) ; si le benzyle est en *para* de l'hétéroatome, l'élimination est de type 1.6 (L39). Dans les cas, plus rares, où la délocalisation sur un cycle aromatique serait suivie d'une seconde *via* un système conjugué comportant des électrons π (double/triple liaison, second cycle aromatique), on parlera d'éliminations 1.8 (L40/L41) et 1.10 (L42).

Comme nous l'avons souligné, les mécanismes d'éliminations décrits sont majoritairement de type 1.4 et 1.6, dans une moindre mesure de type 1.8 avec des structures similaires à la molécule L40. Les éliminations 1.8 basées sur un cycle naphtalène (L41) ou les éliminations 1.10 (L42) ne sont qu'épisodiquement reportés, de par la complexité qu'ils imposent (synthèse, solubilité, rendement du mécanisme d'élimination). De plus, certains cas d'éliminations 1.8 et 1.10 ont été reportés comme inefficaces, c'est-à-dire ne menant pas à l'élimination du groupement partant : *Gillies et al.*⁴² décrivent en effet qu'il n'y avait pas d'élimination de carbamates ou carbonates par les mécanismes L41 et L42 lorsque l'hétéroatome est un azote (Schéma 36), dû à l'énergie de résonnance trop élevée rendant la rupture de l'aromaticité difficile.



Schéma 36 : Non éliminations d'espèces carbonylées par éliminations 1.8 et 1.10 induites par l'azote

L'élimination 1.8 par le mécanisme L40 est en revanche efficace et utilisée ponctuellement pour la libération de plusieurs composés par une unique voie d'auto-immolation⁴³. En effet, la double liaison sur la position benzylique peut porter deux substituants, pour autant de groupement partant (L45). Ainsi, l'élimination 1.8 conduit à la libération d'un premier composé ; après réaromatisation et réitération de l'élimination 1.8 (L46), une seconde molécule est libérée (Schéma 37).

⁴² A. D. Wong, M. A. DeWit, E. R. Gillies, Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64, 1031–1045

⁴³ F. M. H. de Groot, C. Albrecht, R. Koekkoek, P. H. Beusker, H. W. Scheeren, Angew. Chem. Int. Ed., 2003, 42, 4490 –4494



Schéma 37 : Libération de deux composés par une élimination 1.8

Dans la majorité des cas, seules les éliminations 1.4 et 1.6 ont été retenues pour la construction d'espaceurs auto-immolables. L'élimination 1.6 est particulièrement appréciée du fait de l'éloignement du groupement protecteur et du groupement partant, ce qui diminue l'encombrement stérique autour de la liaison activable. Pour pousser cette logique plus loin, certains chercheurs⁴⁴ ont eu l'idée de construire des structures constituées de plusieurs espaceurs réalisant une élimination 1.6 afin de rendre l'encombrement stérique négligeable (Schéma 38).



Schéma 38 : Augmentation de la vitesse d'activation par l'utilisation de deux éliminations 1.6 successives

⁴⁴ F. M. H. de Groot, W. J. Loos, R. Koekkoek, L. W. A. van Berkom, G. F. Busscher, A. E. Seelen, C. Albrecht, P. de Bruijn, H. W. Scheeren, J. Org. Chem., 2001, 66, 8815-8830

Les auteurs ont ainsi prouvé que la vitesse de la réaction enzymatique coupant le groupement protecteur était bien plus élevée dans le cas d'une structure contenant deux espaceurs *para*-aminobenzyle carbamate (L48) que dans le cas où une seule élimination entre en jeu (L47).

Cet exemple illustre également une autre approche largement développée ces dernières années : l'utilisation de plus d'un mécanisme d'auto-immolation au sein de la même structure. Il est en effet régulièrement reporté des exemples d'espaceurs où plus d'un mécanisme d'auto-immolation est réalisé après une unique activation. Chacune des éliminations peut libérer un composé d'intérêt, celui-ci pouvant être le même ou bien différent (Schéma 39). Pour approfondir ce dernier cas de figure, nous avons choisi l'exemple de *Warnecke et al.*⁴⁵ où les auteurs ont construit un espaceur basé sur un noyau aniline déclenchant une élimination 1.4 et une 1.6 après activation (L49).



Schéma 39 : Espaceur combinant éliminations 1.4 et 1.6 de Warnecke et al.

Il est intéressant de noter que l'élimination 1.4 libère un rapporteur (L50), molécule d'intérêt ici, alors que l'élimination 1.6 élimine un second monomère (L51), qui va propager le phénomène, etc... (Schéma 39). La combinaison d'éliminations 1.4 et 1.6 permet ici une réponse particulièrement puissante après une unique activation, ce qui peut être un avantage dans les domaines de la chimie analytique ou thérapeutique.

Parmi les combinaisons d'auto-immolations couramment reportées, les structures faisant appel à la fois à un mécanisme d'élimination et à la fois à un mécanisme de cyclisation sont largement décrits. Les espaceurs cyclisants, comme nous le verrons par la suite peuvent

⁴⁵ A. Warnecke, F. Kratz, J. Org. Chem., 2008, 73, 1546-1552

apporter une certaine flexibilité, réduire l'encombrement stérique et permettre parfois d'introduire des fonctions chimiques qui ne pourrait être conçues en liant directement l'espaceur éliminant et le composé d'intérêt (Schéma 40).



Schéma 40 : Exemple d'espaceurs combinant élimination et cyclisation, adapté de Shabat et al.⁴⁶

Dans l'exemple fourni par *Shabat et al.*, on notera que l'utilisation de l'espaceur cyclisant a permis la construction de deux carbamates stables (L52). En effet, la liaison directe de l'espaceur et du groupement partant *via* sa fonction alcool aurait imposé le passage par un carbonate. Or cette dernière fonction se montre parfois instable, ce qui ne serait pas à l'avantage des auteurs. Ceux-ci ont donc évité ce problème éventuel en introduisant l'éthylène diamine en tant qu'espaceur supplémentaire, dans un objectif de stabilité.

2. Influence de l'hétéroatome

Comme nous l'avons observé jusqu'alors, les hétéroatomes principalement rencontrés dans les processus d'éliminations (en particulier 1.4 et 1.6) sont l'azote et l'oxygène. Chacun de ces hétéroatomes possèdent ses propres avantages, en particulier en ce qui concerne la nature des groupements protecteurs utilisables pour stabiliser l'assemblage (c'est-à-dire, empêcher l'auto-immolation, schéma 41).



Schéma 41 : Trois des principaux hétéroatomes rencontrés dans les processus d'éliminations

⁴⁶ M. Shamis, H. N. Lode, D. Shabat, J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, 6, 1726–1731

L'avantage des espaceurs faisant intervenir l'oxygène est de pouvoir être protégé par des fonctions très diverses (ester, carbonate, carbamate) dont certaines sont très stables (notamment les éthers) souvent reconnus *in vivo* comme substrats enzymatiques (estérases pour les esters, glycosidases pour les éthers d'oses, ...). On notera que, l'oxygène étant divalent, un seul groupement protecteur suffit à stabiliser l'espaceur en empêchant l'autoimmolation. Ceci n'est pas le cas de l'azote, qui nécessite la présence systématique d'un carbonyle, induisant une mésomérie qui piège le doublet de l'azote, afin de prévenir la délocalisation de ses électrons sur le cycle aromatique. Dans le cas contraire (cas d'une aniline non carbonylée), l'azote initie l'auto-immolation avec ses électrons disponibles.

L'occurrence des espaceurs soufrés n'est pas à négliger, bien que ceux-ci soient assez limités sur la nature du groupement protecteur : seuls des ponts disulfures sont reportés actuellement) ; *Senter et al.*⁴⁷, par exemple, ont développé différents dérivés de thiophénol pouvant réaliser une élimination 1.4 ou 1.6 après réduction *in cellulo*.

3. Structures alkyliques, aromatiques et hétéroaromatiques

Comme nous l'avons vu précédemment, la plupart des éliminations ont lieu par délocalisation des électrons d'un hétéroatome sur un cycle aromatique, principalement de type benzène, ou hétéroaromatique (pyridine et pyrimidine, par exemple). Si les espaceurs benzéniques sont les plus utilisés, certains noyaux hétéroaromatiques continuent d'être utilisés. La plupart d'entre eux sont des cycles à six chainons, mais d'autres tailles de cycles ont été reportés^{48,49} (Schéma 42).



Schéma 42 : Mécanismes d'éliminations 1.4 et 1.6 à partir d'hétérocycles à 5 chainons

Ces exemples d'hétérocycles concernent essentiellement les éliminations 1.4 (L56) et 1.6 (L57) à partir d'hétérocycles à cinq chainons (furane, thiophène, pyrrole). Il existe de rares utilisations du noyau imidazole, exploitant toujours les mécanismes d'éliminations 1.4 et 1.6 (L58 et L59). On notera également que le noyau triazole, aisément synthétisé par cycloaddition

⁴⁷ P. D. Senter, W. E. Pearce, R. S. Greenfield, J. Org. Chem., 1990, 55, 2975-2978

⁴⁸ M. P. Hay, R. F. Anderson, D. M. Ferry, W. R. Wilson, W. A. Denny, J. Med. Chem., 2003, 46, 5533-5545

⁴⁹ C. A. Blencowe, D. W. Thornthwaite, W. Hayes, A. T. Russell, Org. Biomol. Chem., 2015, 13, 8703-8707

de Huisgen, peut être utilisé pour la réalisation d'élimination 1.4. On soulignera tout de même que les espaceurs hétéroaromatiques à cinq chainons, de par leurs énergies de résonnances faibles (de 67 à 120 kJ/mol), sont des cycles extrêmement pauvres : bien que les cinétiques de libérations soient inconnues, on peut présager de temps bien supérieurs à ceux rencontré en élimination à partir d'un noyau benzénique.

Les espaceurs aromatiques, bien que majoritaires dans les processus d'éliminations, ne constituent pas la totalité des structures décrites. En effet, il existe quelques exemples d'éliminations non aromatiques^{50,51} où une paire d'électrons d'un hétéroatome se délocalise sur la liaison hétéroatome-carbone. Celui-ci porte un groupement partant qui subit alors une β -élimination (Schéma 43). On admettra que ces derniers peuvent présenter un avantage dans le cadre de la chimie des matériaux (en particulier la dépolymérisation des acétals, L61) ou pour une libération prolongée (β -élimination basée sur un carbamate L62, où la libération peut être de plusieurs mois). En revanche, on s'accordera à dire que pour une utilisation en stratégies prodrogues ou profluorophores classiques ils ne représentent un avantage ni en termes de cinétique ni en terme de facilité de synthèse.



Schéma 43 : Exemples d'éliminations non aromatiques

4. Groupements partants

Au travers de ce manuscrit, nous avons pu observer que peu de fonctions pouvaient faire office de groupements partants, et pour cause : la cinétique d'élimination dépend du caractère nucléofuge du groupement partant, souvent dépendant du pKa de celui-ci. La vitesse d'auto-immolation décroit exponentiellement lorsque le pKa du groupement partant augmente : comme nous l'avons mentionné au paragraphe I.C, la différence considérable entre les cinétiques d'éliminations des carbonates/carbamates et des éthers de phénols est dû à cette différence de pKa (entre 3 et 4 pour les carbonates/carbamates, entre 5 et 7 pour

⁵⁰ E. L. Schneider, L. Robinson, R. Reid, G. W. Ashley, D. V. Santi, Bioconjugate Chem., 2013, 24, 1990–1997

⁵¹ W. Seo, S. T. Phillips, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 27, 9234–9235

les phénols). Certains travaux ont mis en évidence l'élimination du phénol, de pKa 10. En revanche, aucune élimination d'éther alkylique n'a été reportée à ce jour, laissant à penser que celle-ci ne se produit pas car cinétiquement trop lente. Ainsi, les fonctions les plus couramment considérées comme groupements partants dans les processus d'éliminations ici décrits sont les acides carboxyliques, les carbonates et les phénols.

- B. Les processus de cyclisations
- 1. Cyclisations aromatiques et alkyliques

De la même manière que pour les processus d'éliminations, les espaceurs cyclisants peuvent être basés sur un noyau aromatique comme sur des structures alkyliques. A la différence de ce que nous avons décrit en série élimination, les structures aromatiques ne sont pas prépondérantes dans les auto-immolations faisant appel à une cyclisation : on trouve de fait nombre d'exemples basés sur les deux types de structures (Schéma 44).



Schéma 44 : Mécanismes de cyclisations actuellement reportés

Dans tous les cas, les processus de cyclisations se déroulent comme suit : l'étape de déprotection génère un hétéroatome nucléophile qui procède ensuite à une attaque de type substitution (SN2) ou addition/élimination, menant à la libération du groupement partant.

De manière analogue à ce qui est décrit en série élimination, plusieurs types de cyclisations peuvent être différenciés. La différence provient essentiellement de la longueur du cycle formé (3, 4, 5 ou 6 chainons), les plus courants étant les cycles à 5 et 6 chainons, plus stable thermodynamiquement. Certains exemples de cyclisation aboutissant à la formation de cycles inférieurs à 5 chainons sont cependant relatés (notamment à 3 chainons). Satyam décrivait qu'une cyclisation 1.3 ou 1.5 pouvait être réalisée à partir d'un même précurseur L68 γ -

thiocarbonate/ γ -thiocarbamate⁵². Même si la cyclisation 1.5 (L69) est majoritaire, le mécanisme 1.3 (L70) est cependant non négligeable du fait qu'il conduit à la formation d'un produit stable (CO₂) en plus du thirane (Schéma 45). Quoi qu'il en soit, les deux processus mènent à la libération finale d'un même produit, nous jugerons le mécanisme de cyclisation 1.3 non essentiel pour la réalisation des objectifs de l'auteur (prodrogue réductible).



Schéma 45 : Cyclisations 1.3 et 1.5 d'espaceurs γ-thiocarbonylés

On notera qu'à l'instar des cycles en série cyclisation, les espaceurs aromatiques cyclisants peuvent être substitués en vue d'améliorer la réactivité du nucléophile qu'ils portent⁵³. Néanmoins, l'introduction de contraintes stériques en vue de faciliter la réaction de cyclisation reste l'option privilégiée, tant en série aromatique^{54,55} que non aromatique⁵⁶ (Schéma 46).

Dans le cas de l'aromatique L71 (aussi nommé « triméthyl lock »), les deux méthyles géminés interfèrent avec le méthyle en *meta* du cycle, ce qui pousse la molécule à adopter la conformation L72 : dans cette conformation, le nucléophile phénol et l'électrophile carbonylé sont très proches, ce qui facilite la réaction d'addition/élimination intramoléculaire. Dans le cas de l'amine secondaire L73, le principe est similaire : les groupements volumineux en positions géminés imposent une minimisation de l'encombrement stérique par rotation de liaison, rapprochant électrophile et nucléophile. On notera que ce genre d'espaceurs est représentatifs des structures cyclisantes exploitant un encombrement stérique, notamment le triméthyl lock (L71/L72), particulièrement décrit.

⁵² A. Satyam, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, 18, 3196–3199

⁵³ D. Shan, M. G. Nicolaou, R. T. Borchard, B. Wang, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1997, 86, 7, 765-767

⁵⁴ A. Zheng, D. Shan, X. Shi, B. Wang, J. Org. Chem. 1999, 64, 7459-7466

⁵⁵ A. Zheng, D. Shan, B. Wang, J. Org. Chem. 1999, 64, 156-161

⁵⁶ M. A. DeWit, E. R. Gillies, Org. Biomol. Chem., 2011, 9, 1846-1854



Schéma 46 : Exemples représentatifs de l'influence des effets stériques sur le processus de cyclisation ; avec R₁ et R₂, substituants divers (Me, Ph, Bn, ...)

2. Hétéroatomes nucléophiles

Comme nous l'avons vu au travers des paragraphes précédents, les processus de cyclisations nécessitent la génération d'un hétéroatome nucléophile après déprotection. Les trois hétéroatomes les plus reportés dans ces structures sont le soufre, l'azote et l'oxygène. On ajoutera que les avantages d'un hétéroatome comparés à un autre concernent :

- La nature du groupement protecteur, comme dans les séries éliminations.
- La nucléophilie, l'oxygène étant moins nucléophile que le soufre et l'azote, celui-ci sera moins efficace.
- Le pH où a lieu la déprotection : les amines peuvent se protoner et perdre leurs nucléophilies, alors que les oxygènes (sous formes phénols) peuvent se présenter déprotonés à pH relativement élevé.
- Le risque d'oxydation, particulièrement vrai pour le soufre qui y est très sensible.

Généralement, les espaceurs basés sur des cycles aromatiques exploitent davantage l'oxygène (phénols) alors que l'azote est bien plus utilisé dans les espaceurs alkyliques (amines). Le soufre lui n'est utilisé que dans les rares cas où la présence de réducteur (tel que le glutathion) est l'activation spécifique ciblée (réduction de ponts S-S).

3. Electrophiles et groupements partants

Plusieurs types d'électrophiles peuvent être rencontrés au sein des espaceurs basés sur une cyclisation, principalement des dérivés carbonylés. Parmi ceux-ci, on relèvera :

- Les esters, pour la libération d'alcools et phénols : très électrophiles mais potentiellement sensibles aux estérases ; ce qui rendrait la construction de l'espaceur inefficace, le relargage du groupement partant n'étant pas issu de l'auto-immolation.

Ils restent cependant très utilisés du fait des vitesses d'auto-immolations associées considérées comme rapides.

- Les carbonates, pour la libération d'alcools et phénols : également très électrophiles mais parfois reportés comme étant sensibles à l'hydrolyse.
- Les carbamates, pour la libération d'alcools/phénols ou d'amines/anilines : relativement électrophiles, n'étant pas substrats enzymatiques et relativement stables en conditions physiologiques. Ils sont, tous comme les esters, particulièrement utilisés dans tous types d'espaceurs (alkyliques et aromatiques).
- Les amides, pour la libération d'amines/anilines : peu réactifs, très stables mais potentiellement sensibles aux protéases ; ils sont de plus en plus utilisés, notamment dans les espaceurs aromatiques.

Objectifs de nos projets

Comme nous avons pu le voir jusqu'à présent, les espaceurs auto-immolables sont des structures permettant la liaison de deux protagonistes : un groupement protecteur (aussi nommé activateur) et une molécule d'intérêt (composé bioactif, rapporteur, …). L'introduction des espaceurs a permis de résoudre un certain nombre de problématiques dans des domaines très variés (imagerie et thérapeutique principalement), tels que : incompatibilité chimique entre l'activateur et la molécule d'intérêt (rendant impossible la liaison entre eux), manque de sélectivité, de solubilité, … ; le succès de cette approche est d'ailleurs démontré par la présence de certaines structures dans les thérapies actuelles.

Cependant, malgré un apport indéniable aux domaines précédemment cités, les espaceurs actuels ne sont pas sans présenter des inconvénients : de fait, le but principal de notre travail sera de proposer et de caractériser de nouvelles classes d'espaceurs auto-immolables, en vue de dépasser les limitations actuelles de ces structures.

• <u>Etudes cinétiques d'espaceurs cyclisants</u>

Ce n'est que récemment que les chercheurs se sont intéressés à un aspect fondamental des espaceurs auto-immolables : les cinétiques des processus d'auto-immolations. Depuis quelques années, notre équipe a développé une méthode permettant la détermination de cinétiques, lentes comme rapides (d'échelle de temps allant de l'heure à la milliseconde), avec précision. Les travaux réalisés jusque-là ont permis de déterminer des vitesses d'auto-immolation d'espaceurs basés sur des processus d'élimination. En revanche, aucune donnée cinétique aussi précise n'est actuellement disponible concernant les espaceurs basés sur un mécanisme de cyclisation. De plus, une comparaison cinétique entre mécanismes de cyclisations et d'éliminations n'a jamais été reportée.

Partant de ce constat, nous avons décidé de caractériser cinétiquement les espaceurs cyclisants parmi les plus utilisés actuellement ; dans un second temps, nous avons procédé à une étude comparative des deux processus d'auto-immolation, afin de clarifier définitivement ces deux points.

• <u>Synthèse d'espaceurs bi-activables</u>

Actuellement, les stratégies prodrogues et profluorophores connaissent des limitations en terme de sélectivité : en effet, l'activation de ces composés au niveau de la cible (cellule, tissu, ...) est parfois insuffisamment sélective. On attribue souvent ceci au fait que l'activateur en question est parfois coupé dans des cellules saines (ou autres cibles) en plus de celles ciblées. Or, si les espaceurs actuels permettent de lier efficacement un activateur et un composé d'intérêt, ceux-ci ne permettent pas d'apporter une sélectivité supplémentaire. Selon nous, un moyen possible d'induire une sélectivité supplémentaire serait de construire un espaceur libérant la molécule d'intérêt après plus d'une activation. En effet, si l'espaceur doit obéir à

deux conditions spécifiques (contre une jusqu'ici), alors on peut s'attendre à une libération du composé actif majoritairement au niveau de la cible considérée.

C'est pourquoi nous avons synthétisé une nouvelle génération d'espaceurs auto-immolables capable de répondre à une double activation, afin d'apporter une solution à cette problématique existante.

• Synthèse d'espaceurs multi-branchés pour l'augmentation de sensibilité

Un autre point encore non évoqué des espaceurs auto-immolables est le rendement de leurs activations. Dans la plupart des cas que nous avons cités, nous avons toujours observé une libération satisfaisante du composé d'intérêt après activation de l'espaceur : ceci est dû au fait que, dans ces cas ci, l'activation des composés était suffisante pour permettre un désassemblage des espaceurs corrects. En revanche, il a été parfois reporté que l'activation d'espaceurs pouvait s'avérer très incomplète, amenant à la libération de peu de composés actifs/fluorescents et donc à un effet peu significatif. La raison la plus souvent citée est la faible intensité du stimulus réalisant l'activation (concentrations en enzymes faibles, par exemple). Afin de répondre à ce défi, quelques rares équipes ont développé des espaceurs plus sensibles du fait de voies d'activations multiples : l'espaceur comptent plusieurs activateurs, l'activation d'un seul d'entre eux suffit à induire l'auto-immolation. Il a été montré une corrélation entre le nombre d'activateur et le rendement de l'auto-immolation à un temps donné.

Dans cette même optique, nous avons taché de développer un système basé sur un principe similaire, tout en étant plus compacte : la plupart des exemples reportés, des dendrimères, ont montré des inconvénients (solubilité, pénétration cellulaire) limitant leur utilisation potentielle. Un système plus compacte pourrait éventuellement permettre d'outrepasser ces limitations.

CHAPITRE 2 : ETUDES CINETIQUES D'ESPACEURS CYCLISANTS REPRESENTATIFS

I. Travaux antérieurs relatifs aux exemples étudiés

- A. 2-hydroxyphényl carbamates (2-HPC)
- 1. Précédentes études concernant la liaison carbamate

Décrit originellement par *Fife et al.* en 1973⁵⁷, les hydroxyphényl carbamates ont été considérés comme un moyen efficace de corréler le clivage d'une liaison éther ou ester de phénols à la libération d'un groupement partant de type alcool, le plus souvent phénol. Ces structures sont également parmi les premières à permettre une liaison directe d'un alcool à une aniline *via* une fonction carbamate. Les carbamates ne sont communément pas considérés comme des substrats enzymatiques naturels, sont relativement stables dans les conditions physiologiques et sont donc ainsi à considérer pour des applications biomédicales. De plus, leurs propriétés peuvent être encore modulées par l'introduction d'un substituant supplémentaire sur l'azote ; passant ainsi d'un carbamate secondaire à un carbamate tertiaire, dont Fife et son équipe ont démontré l'effet positif sur la stabilité. Les auteurs ont avancé que l'introduction du substituant méthyle sur l'azote bloquait la forme carbamate en rendant impossible le passage à l'isocyanate par arrachage du proton, prévenant ainsi la dégradation du composé par l'eau (Schéma 47).



Schéma 47 : Hydrolyse du carbamate secondaire par β-élimination.

Le mécanisme d'auto-immolation a dans le même temps été proposé (Schéma 48) : le phénolate généré s'additionne sur le carbonyle du carbamate par une cyclisation 5-*exo*-trig, provoquant le départ du groupement partant (ici, le phénol).

Les données cinétiques (par suivi d'absorbance du phénol, groupement partant de l'autoimmolation) collectées par *Fife et al.* indiquent que la cyclisation est bien plus rapide que l'hydrolyse du composé en milieu basique (1M KOH), ce qui tend à prouver que la réaction intramoléculaire est largement favorisée. Cependant, la cyclisation peut être véritablement considérée comme « rapide » uniquement à fort pH (>9). Les auteurs justifient cette conclusion en s'appuyant sur le mécanisme proposé, à savoir que le phénolate est le nucléophile impliqué dans cette réaction intramoléculaire. En effet, le phénolate est censé être un bien meilleur nucléophile que le phénol du fait de la charge négative portée par l'oxygène. *De facto*, un pH nettement basique est nécessaire dans ce cas précis pour se placer

⁵⁷ Hutchins, J.E.C.; Fife, T.H.J. Am. Chem. Soc. 1973, 95, 2282

au-delà du pKa du phénol (8.9) et rendre majoritaire la forme phénolate. Considérant ceci, un tel dérivé n'est pas compatible avec des utilisations biomédicales, où le pH est significativement inférieur à 9.



Schéma 48 : Cyclisation 5-exo-trig du dérivé 2-HPC décrit par Fife et al.

Par la suite, Bergon et Vigroux ont développé d'autres analogues de 2-HPC⁵⁸ dans le cadre d'une stratégie prodrogue visant à corréler la distribution de 2 principes actifs. Dans ce cas (Schéma 49), le produit de cyclisation (5-chlorzoxazone) possède une activité myorelaxante alors que le composé libéré après auto-immolation (acetaminophène) montre une activité analgésique. Considérant que ces 2 molécules agissent en synergie sur la pathologie visée et qu'elles sont effectivement formées simultanément lors de l'auto-immolation, cela présente un avantage certain en termes de pharmacocinétique. Dans l'optique de maitrise des paramètres cinétiques, la vitesse d'auto-immolation a été déterminée dans des conditions physiologiques à pH 7.4. Il semble que le pKa de l'alcool libérée lors de l'auto-immolation possède une forte influence sur la vitesse de cyclisation : en effet, si on peut considérer que la différence de vitesse de libération entre 2 phénols est peu significative (à peine un facteur 4), l'écart entre phénols et alcools aliphatiques est beaucoup plus prononcé (facteur 10⁵). On notera que la cyclisation du dérivé 4-chloro-2-hydroxyphenyl carbamate est possible et rapide à pH 7.4, alors qu'elle est bien plus lente avec le dérivé 2-HPC non substitué précédemment reporté par Fife et son équipe. Afin d'aller plus loin dans la compréhension et le contrôle de la cinétique d'auto-immolation, les auteurs ont publié une seconde étude⁵⁹ pour déterminer en quoi la nature du substituant du 2-HPC pouvait influencer la constante de vitesse de cyclisation.



Schéma 49 : Prodrogue 2-HPC de Bergon et al. menant à la libération d'une substance active et la formation d'une seconde.

La conclusion avancée par *Bergon et al.* consiste à faire du pKa du 2-HPC un facteur essentiel de la cinétique d'auto-immolation. Cela peut s'expliquer par le fait que plus le pKa du phénol est bas et proche du pH de mesure (7.4), plus la proportion de phénolate augmente et donc

⁵⁸ Vigroux, A.; Bergon, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995, 5, 427

⁵⁹ Vigroux, A.; Bergon, M.; Zedde, C. J. Med. Chem. 1995, 38, 3983

plus le 2-HPC montrera une vitesse de cyclisation élevée ; le phénolate est considéré comme plus nucléophile que sa forme protonée phénol.

La mise en perspective de toutes ces études nous indique que les 2-HPC peuvent être des systèmes de relargage de phénols stables et efficaces, en particulier lorsque :

- Le carbamate est rendu tertiaire (par N-méthylation notamment)
- Le pKa du 2-HPC est abaissé par l'introduction d'un substituant électroattracteur
- Le pKa du groupement partant est faible

A la lumière de ces conclusions, d'autres dérivés ont été synthétisés en 1997, par notre équipe à l'institut Curie.

2. L'importance accordée au dérivé para-nitro et la question de la nature du substituant

Les travaux publiés en 1997 par *Schmidt et al.*⁶⁰ s'inscrivent dans cette phase d'optimisation des 2-HPC. Le dérivé 4-nitro-2-hydroxyphenyl est ici utilisé pour corréler la libération d'une moutarde azotée phénolique (agent anticancéreux) au clivage d'un β-glucuronide lié au phénol du 2-HPC (Schéma 50) dans le cadre de la stratégie de vectorisation de type ADEPT. L'équipe a décidé de retenir la structure tertiaire du carbamate afin de prévenir le retour à l'isocyanate et d'introduire un groupement électroattracteur sur le cycle aromatique en vue de diminuer le pKa du phénol comme l'avait suggéré *Bergon et al.* L'originalité la plus significative apportée à la structure se situe dans la nature du substituant introduit : le nitro en position *para* permet d'apporter un effet mésomère attracteur, ce qui n'avait jusqu'alors jamais été envisagé dans la série des 2-HPC. L'effet mésomère du nitro est ici supposé plus puissant que l'effet inductif attracteur du chlore qu'avait proposé Bergon et son équipe. De fait, le pKa du dérivé *para*-nitrophénol est théoriquement plus faible que celui du *para*-chlorophénol précédemment cité, la proportion de phénolate plus élevée et la constante de cyclisation plus importante.



Schéma 50 : Prodrogue de moutarde azotée supportée par un squelette 2-HPC

⁶⁰ F. Schmidt, J.-C. Florent, C. Monneret, R. Straub, J. Czech, M. Gerken and K. Bosslet, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1997, 7, 1071–1076.

La comparaison fine des cinétiques n'a pas pu être effectué, du fait de la non comparabilité des 2 séries (celle de Schmidt et celle de Bergon), bien que le relargage en quelques minutes de l'intégralité de la moutarde azoté semble corréler l'hypothèse d'une cinétique accrue. Cependant, le dérivé 4-nitrophénol a pu être réutilisé par 2 fois avec succès⁶¹⁻⁶².

A la suite des travaux de Schmidt, de nouvelles problématiques sont apparues, offrant nombre de perspectives. En effet, le remplacement du chlore par un nitro en position *para* autorise à penser d'autres substituants. De plus, la méthodologie de détermination cinétique mise au point récemment dans notre laboratoire, en collaboration avec une équipe de l'ENS, nous permet de mesurer avec une haute précision (+/- 20ms) les constantes de vitesses d'auto-immolations. C'est pourquoi nous avons décidé d'appliquer notre expertise dans ce domaine à une étude plus large relative aux 2-HPC afin de clarifier cette question.

3. Vers une étude systématique

Pour mettre au point le modèle qui nous permettrait de répondre à cette problématique, plusieurs points sont à considérer. Le premier concerne la nature du carbamate. Dans le cas de *Bergon et al.*, le carbamate devait être secondaire pour produire *in situ* le 5-chlorzoxazone, principe actif faisant partie intégrante de la stratégie développée par cette équipe. N'ayant pas d'intérêt particulier à baser nos structures sur un carbamate secondaire, nous nous sommes tournés vers un carbamate tertiaire, plus stable. Le second point concerne l'état de protonation du phénol : il est en effet relaté dans les travaux antérieurs que le phénolate est plus nucléophile que le phénol. De ce fait, il nous a semblé fondamental de vérifier cette affirmation en étudiant, pour le même dérivé, les cinétiques du phénol et du phénolate. Pour ce faire, au moins une de nos mesures sera faite à différents pH (acide ou basique). Le dernier point que nous voulons investiguer concerne la nature des substituants. Nous avons décidé de conserver la position *para* qui est la plus décrite dans la littérature. Pour ce qui concerne la nature des groupements en position 4, différents substituants ont été introduits :

- Le nitro, comme vu précédemment, censé diminuer le pKa du 2-HPC de par son effet mésomère attracteur.
- Le brome, par analogie au chlore déjà utilisé par Bergon.
- L'hydrogène, comme 2-HPC « témoin », sans aucun effet électronique notable.
- Le methoxy, un substituant mésomère donneur, afin de déterminer si un substituant autre qu'attracteur pouvait avoir un effet sur la vitesse de cyclisation.

Deux effets contradictoires peuvent être observés a priori (Schéma 51) :

⁶¹ F. Schmidt, C. Monneret, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2002, 1302–1308

⁶² F. Schmidt, C. Monneret, Bioorganic & Medicinal Chemistry 11 (2003) 2277–2283



Schéma 51 : Effets attendus des substituants sur le phénol

Comme illustré sur le schéma 51, la nature des substituants peut influer sur le comportement du phénol. En effet, si le substituant en *para* est un groupement attracteur (mésomère ou inductif), alors le pKa du phénol sera plus faible. L'augmentation de la proportion de phénolate, plus nucléophile, peut permettre une accélération de l'auto-immolation. De fait, plus le substituant en position 4 sera attracteur et plus la cyclisation se fera rapidement. Dans notre cas, le dérivé nitro est attendu comme le plus rapide, suivi du bromo, du dérivé non substitué et enfin du methoxy.

A l'inverse, si le substituant est électro-donneur, on peut s'attendre à un enrichissement de du cycle aromatique, plus riche en électrons du fait de l'apport du groupement donneur, et le phénol serait moins apte à donner ses électrons au cycle. En conséquence, les doublets de l'oxygène sont plus disponibles pour attaquer le carbonyle du carbamate. Ainsi, plus le groupement en *para* sera donneur et plus le phénol résultant sera nucléophile ; accélérant ainsi la cyclisation. Dès lors, le dérivé le plus rapide serait le methoxy, suivi par le non substitué, le bromo et le nitro.

On note que ces 2 théories donnent un ordre de cinétique de la plus rapide à la plus lente diamétralement opposé. On ne peut toutefois pas exclure un recouvrement des 2 possibilités : l'accélération de la vitesse de cyclisation peut être à la fois du fait d'un abaissement de pKa que d'un effet d'enrichissement de cycle.

Les expériences menées auront donc pour but de mettre en évidence l'effet le plus important.

- B. Cyclisation faisant intervenir le trimethyl lock (TML)
- 1. Généralités et avantages des dérivés trimethyl lock : l'effet Thorpe-Ingold

Bien que les 2-HPC ait retenu l'intérêt de nombreuses équipes, ils ne constituent pas l'exemple le plus décrit de la littérature. La majorité des espaceurs aromatiques cyclisant reportés concernent les dérivés trimethyl lock. La particularité de cette structure est d'exploiter l'effet

Thorpe-Ingold⁶³ : l'encombrement stérique entre le méthyle en position *meta* du phénol L78 et les 2 méthyles géminés de la chaine alkylique impose un changement de conformation, rapprochant le phénol nucléophile et le carbonyle électrophile (Schéma 52).



Schéma 52 : Illustration de l'effet Thorpe-Ingold dans le cas des dérivés TML par Raines et al.⁶⁴

La modification de la constante de vitesse de cyclisation est significative (Schéma 53) : dès l'introduction des 2 méthyles sur la chaine alkylique, on observe une accélération nette de la vitesse de lactonisation (4.10⁴) ; cette différence entre les constantes de vitesse devient bien plus élevée lorsque le méthyle en meta du cycle aromatique est présent (10¹¹ par rapport à la structure non méthylée).



Schéma 53 : Constantes cinétiques relatives des dérivés d'acide hydroxy-dihydrocinnamique à différents états de méthylation (Raines et al.)

Ce facteur d'accélération important permet des lactonisations rapides, ce qui a attiré l'attention de nombreuses équipes pour la construction de prodrogues et de composés cagés pour l'imagerie. Encore récemment, les propriétés des dérivés TML ont été exploitées, notamment pour la libération d'aniline⁶⁵.

⁶³ R. M. Beesley, C. K. Ingold, J. F. Thorpe, J. Chem. Soc., Trans., 1915, 107, 1080.

⁶⁴ M. N. Levine, R. T. Raines, Chem. Sci., 2012, 3, 2412.

⁶⁵ I. Daryaei, K. M. Jones, M. D. Pagel, Chem. Eur. J. 2017, 23, 6514 - 6517

2. Exemples non exhaustifs d'utilisation du triméthyl lock

Les composés comprenant une partie TML ont été très largement utilisés pour la libération de composés actifs depuis de nombreuses années⁶⁶. Le processus de cyclisation libère généralement une substance bioactive ou un fluorophore, ce type de structure étant presque exclusivement dédié à des applications biologiques. On peut néanmoins relever de rares exemples de trimethyl lock utilisés dans le domaine des matériaux⁶⁷. Dans le cas de *Small et al.*, le système trimethyl lock (Schéma 54) est fixé sur une membrane nanoporeuse dans le but d'introduire une sélectivité dans le passage des ions au sein des nanopores. La différence de sélectivité entre la forme TML quinone (faible) et TML lactone (élevée) est ici exploitée : par oxydo-réduction, on passe d'une forme à une autre ; modulant l'entrée d'une espèce ionique à volonté.

L'activation d'un dérivé TML consiste à générer un phénol. Comme nous l'avons vu, l'oxygène des TML est le plus souvent masqué par un groupement neutralisant ses propriétés nucléophiles (ester, éther ; L79). Néanmoins, il est également possible de générer un phénol à partir de la 1.4-benzoquinone (L80) correspondante (Schéma 54). La réduction de la benzoquinone peut se faire par voie chimique *in cellulo* (NADH, acide ascorbique, glutathion), qui reste la voie la plus décrite ; mais également par voie photochimique, par irradiation dans le spectre UV ou visible^{68,69}, par introduction d'un photoréducteur (sulfures notamment).



X = NH/O

Schéma 54 : Les principales voies de régénération du phénol du TML

La nature du signal déclenchant l'auto-immolation (et conditionnant *de facto* l'usage qui en est fait) est quant à elle nettement plus variée. Les activations les plus courantes sont

⁶⁶ D. Shan, M. G. Nicolaou, R. T. Borchardt, B. Wang, J. Pharm. Sci., 1997, 86(7), 765–767.

⁶⁷ L. J. Small, D. R. Wheeler and E. D. Spoerke, Nanoscale, 2015,7, 16909-16920

⁶⁸ D. P. Walton, D. A. Dougherty, J. Am. Chem. Soc. 2017, 139, 4655-4658

⁶⁹ C. J. Regan, D. P. Walton, O. S. Shafaat, D. A. Dougherty, J. Am. Chem. Soc., 2017, 139, 13, 4729-4736

l'hydrolyse de phosphates ou esters de phénols par les enzymes dédiées (phosphatases et estérases), largement présentes dans l'ensemble des cellules⁷⁰. L'objectif de ce type de prodrogues est à rapprocher des stratégies de prodrogues « classiques » où un groupement est introduit afin de moduler les propriétés pharmacologiques du composé d'origine, comme la stabilité ou la solubilité. L'étopophos[®] (ester phosphate de l'étoposide) en est un parfait exemple, de même que certaines prodrogues du taxol ; dont un analogue TML comportant un ester phosphate a également été synthétisé⁷¹ (Schéma 55).



Schéma 55 : Prodrogue TML phosphate du taxol décrite par Zhang et al.

Avec l'émergence de la chemobiologie (« chemical biology »), les groupements cagés ont été de plus en plus impliqués comme outils pour comprendre le fonctionnement de phénomènes biologiques. Les espaceurs auto-immolables, de par leur capacité à corréler spatialement et temporairement 2 phénomènes (l'activation par un signal spécifique et la libération d'une tierce molécule, ici un rapporteur), ont particulièrement retenu l'attention des chercheurs. C'est ainsi que plusieurs équipes se sont attachées à développer des structures TML pour répondre à des problématiques cellulaires. L'un des mécanismes les plus importants de la cellule, et également l'un des plus étudiés, est l'endocytose. C'est par endocytose que se font nombres d'échanges entre la cellule et son environnement extérieur ; de la même manière, un certain nombre de métabolismes emprunte cette voie. Partant de ce constat, Raines et al.⁷² se sont attachés à quantifier l'endocytose d'un phospholipide lié à un squelette TML et portant une rhodamine (ici rapporteur de l'auto-immolation). Considérant que l'activation du dérivé TML ne peut se faire que par l'action d'une estérase intracellulaire, ils ont déduit que l'intensité de fluorescence était directement corrélée avec le nombre de composés cagés internalisés. Il apparait que le lipide étudié pénétrait la membrane efficacement pour être massivement transporté vers les endosomes tardifs puis les lysosomes. Il est parfois nécessaire de lier une partie « transportrice » à un substrat d'intérêt pour lui permettre de franchir la membrane cellulaire. Dans le cas de Raines et son équipe, le lipide a rempli cette fonction. Le principe peut également être transposé à d'autres biomolécules, comme les protéines. Les travaux de Cali et al.⁷³ illustrent cette possible adaptation du modèle de Raines (Schéma 56).

⁷⁰ M. G. Nicolaou, C.-S. Yuan, R. T. Borchardt, J. Org. Chem. 1996, 61, 8636-8641.

⁷¹ Z. Meng, Q. Lv, J. Lu, H. Yao, X. Lv, F. Jiang, A. Lu, G. Zhang, Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 796

⁷² M. N. Levine, T. T. Hoang, R. T. Raines, Chemistry & Biology 20, 614–618

⁷³ D. Mustafa, D. Ma, W. Zhou, P. Meisenheimer, J. J. Cali, *Bioconjugate Chem.*, 2016, 27, 1, 87–101.



Schéma 56 : Sonde réductible pour la quantification de cellules vivantes

Dans cet article, Cali décrit une quinone trimethyl lock liée à un transporteur (L82, pouvant être spécifiquement endocyté *via* un récepteur inhérent à la lignée cellulaire considérée) et possédant un fluorophore comme rapporteur de la lactonisation. Cali avance que seules les cellules vivantes seront à même d'endocyter le cargo (l'endocytose étant un processus « actif ») et de réduire la quinone. Ainsi ne fluoresceront que les cellules fonctionnelles. La méthode de cette équipe est une approche novatrice de quantification de cellules vivantes/mortes, autant qu'en termes de détection de cellules surexprimant le récepteur ciblé et utilisé pour internaliser le cargo. Dans ces 2 derniers cas, l'objectif était d'étudier un phénomène cellulaire en tant que tel ; d'autres équipes se sont d'avantage tourné vers la modulation de mécanismes *in cellulo*, par libération contrôlée de peptides⁷⁴ ou même de protéines⁷⁵.

3. Fréquence d'utilisation des dérivés ester

Comme nous l'avons vu précédemment, les dérivés TML sont très largement utilisés comme espaceurs auto-immolables cyclisants pour des applications très variées, comme la synthèse de nouveaux matériaux, l'imagerie, la chemobiologie et l'administration de substances actives (anticancéreux principalement, mais d'autres classes de composés notamment antibiotiques⁷⁶ ont été envisagés). La nature des processus d'activations est également diversifiée : qu'il s'agisse de réductions ou d'hydrolyses, le phénol résultant est toujours apte à conduire à la libération du composé d'intérêt par cyclisation 6-*exo*-trig.

A la lumière des travaux reportés dans la littérature, on constate également que le carbonyle peut être celui d'une fonction amide, mais très majoritairement il s'agit de celui d'un ester. La réaction de transestérification intramoléculaire semble être privilégiée pour des raisons cinétiques autant que pour d'autres raisons (facilité de synthèse, grand nombres de composés actifs et fluorescents comportant un hydroxyle libre). Cependant, comme dans le cas des 2hydroxyphényles carbamates (cf. schéma 48), la cinétique de ce composé reste méconnue. Bien que considérée comme rapide, la vitesse de lactonisation n'a jamais été déterminée. De

⁷⁴ A. Shigenaga, J. Yamamoto, T. Kohiki, T. Inokumaa, A. Otaka, J. Pept. Sci., 2017

⁷⁵ K. A. Andersen, T. P. Smith, J. E. Lomax, R. T. Raines, ACS Chem. Biol., 2016, 19, 11, 319-23

⁷⁶ C. Ji, M. J. Miller, Biometals, 2015,28, 3, 541-51
ce fait, nous nous sommes particulièrement intéressé à ce dérivé : il semblerait en effet que le TML ester soit considéré comme un dérivé de choix pour les espaceurs auto-immolables aromatiques cyclisants. Il nous a donc apparu important de déterminer la cinétique de ce type de composé afin de positionner les 2-HPC par rapport à ce dérivé très décrit dans la littérature.

II. Synthèses et études cinétiques d'espaceurs auto-immolables basés sur un processus de cyclisation

- A. <u>But de l'étude</u>
- 1. Modèle cinétique et constante de vitesse

Dans un premier temps, nous nous sommes attaché à déterminer les cinétiques de dérivés 2-HPC dans le but de décrire au mieux l'influence de substituants en position *para* sur la vitesse d'auto-immolation. Pour ce faire, nous avons adapté le modèle cinétique que nous avons précédemment exposé, conditionnant la construction des dérivés comme suit (Schéma 57) :

- Le phénol est engagé dans une liaison éther avec le **6-nitrovératryle**, liaison qui peut être sélectivement clivée par irradiation à 365 nm, en révélant le phénol libre et déclenchant l'auto-immolation.
- Le groupement phénol partant choisi est la DDAO (7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9dimethylacridin-2-one) qui montre une fluorescence forte à 660 nm sous sa forme phénol libre ; celle-ci étant négligeable lorsque l'hydroxyle de la DDAO n'est pas libre⁷⁷.



Schéma 57 : Modèle employé pour la détermination de cinétiques des 2-HPC.

L'utilisation de ces 2 entités comme, respectivement, déclencheur et rapporteur d'autoimmolation présente de multiples avantages (comme nous l'avons décrit au paragraphe I.C.3 du chapitre 1).

Dans un second temps, nous avons également synthétisé un composé de type TML sur le même principe, reprenant le 6-nitrovératryle comme activateur et la DDAO comme rapporteur de la cyclisation. Dans l'hypothèse où des groupements donneurs ou attracteurs augmenterait la vitesse de cyclisation, nous avons voulu synthétiser plusieurs analogues de ce dérivé TML ester (Schéma 58).

⁷⁷ H. Gong, B. Zhang, G. Little, J. Kovar, H. Chen, W. Xie, A. Schutz-Geschwender, D. M. Olive, Anal. Biochem., 2009, 386, 59– 64



Schéma 58 : Modèle employé pour la détermination de cinétiques des TML ester.

2. Comparaisons des processus d'élimination et de cyclisation

Depuis que les 2 mécanismes d'auto-immolations (cyclisation et élimination) ont été reportés, l'élimination a toujours été considérée comme étant beaucoup plus rapide que la cyclisation. L'étude cinétique des 2-HPC nous permettra également d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Les processus d'éliminations 1.4 et 1.6 de dérivés phénols tels qu'étudiés antérieurement par notre équipe ont en effet montré des constantes de vitesses élevées, et également très modulables (Tableau 1).



	R = NO2 (pH 5)	R = NO2 (pH 8)	R = Br	R = H	R = OCH₃
рКа	7.6 (protoné)	7.6 (déprotoné)	10.0 (protoné)	10.7 (protoné)	10.8 (protoné)
Effet du substituant	Mésomère attracteur	Mésomère attracteur	Inductif attracteur	Aucun (référence)	Mésomère donneur
k2 élimination (min ⁻¹)	0.45	21.6	0.42	9.6	87
τ élimination (s)	133	2.8	140	6.2	0.7

Tableau 1 : Constantes de vitesses et temps d'auto-immolations en fonction du pH et dessubstituants dans le cadre d'une élimination 1.4 initiée par un phénol

On a en effet pu constater que, dépendant des substituants portés par le cycle aromatique, le temps d'élimination du groupement partant pouvait être lent (de l'ordre de la minute) ou au

contraire très rapide (de l'ordre de la milliseconde). On note également que le pH a une grande influence sur la cinétique, observant une différence dans les cinétiques d'un facteur 40 entre une espèce protonée et une espèce déprotonée. On peut expliquer ce résultat par la disponibilité d'un doublet électronique supplémentaire (celui du phénolate), qui est alors engagé dans le processus d'élimination. On peut aussi relever que les dérivés portant un groupement électroattracteur sur le cycle aromatique (Br, NO₂) tout en étant sous forme protonée (phénol) montraient une cinétique plus lente que celle du composé non substitué, référence car ne présentant aucun effet électronique. Il semblerait que l'effet d'abaissement de pKa, qui influe favorablement la cinétique, soit largement compensé par la perte de disponibilité des électrons de l'oxygène, « drainés » par le cycle aromatique appauvri (L85, sur le schéma 59).



Schéma 59 : Compensation de l'effet électroattracteur par mésomérie, exemple du nitro

A l'inverse, il apparait que l'introduction en *para* d'un groupement donneur comme le methoxy accélère considérablement la cinétique d'auto-immolation. L'hypothèse avancée par notre équipe est que la délocalisation électronique du methoxy permettait une stabilisation supplémentaire du cation benzylique formé au cours de l'élimination (Schéma 60) :



Schéma 60 : Stabilisation du carbocation formé au cours de l'auto-immolation et rôle du methoxy

Pour déterminer avec exactitude si les tendances observées dans le cas de l'élimination se reproduisaient dans les séries cyclisations et pour comparer les cinétiques, nous avons décidé de reproduire les conditions de mesure (pH, température, groupement partant) et surtout de conserver les mêmes substituants (H, Br, NO₂, OMe).

3. Structures cibles et stratégies de synthèses

Comme nous l'avons signifié, l'objectif est autant de conduire une étude systématique sur l'influence de différents effets électroniques sur la cinétique de cyclisation des 2-HPC que de comparer ce mécanisme à celui d'élimination en terme de vitesses d'auto-immolations. Pour synthétiser les 4 dérivés choisis, nous avons tenté d'établir une voie de synthèse commune à tous les composés.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à synthétiser le dérivé nitro en se basant sur les travaux antérieurs de notre équipe⁷⁸. Partant du 4-nitro-2-aminophénol commercial, nous avons cherché à monométhyler la fonction aniline ; ceci afin de répondre à la nécessité de construire un carbamate final tertiaire. Pour ce faire, l'aniline de départ a été mis en présence de triethylamine et d'iodométhane dans le méthanol à 40°C (Composé 1). La température du milieu réactionnel étant très proche de celle d'ébullition du iodométhane, celui-ci a été introduit en excès. L'aniline monométhylée a pu être isolée avec un rendement de 50%. Cependant, la réaction a généré beaucoup de sous-produits difficiles à séparer, notamment le produit de O-alkylation.

De fait, nous avons tenté une autre méthode de méthylation : supposant l'aniline plus réactive que le phénol, nous avons envisagé de changer de base. En effet, une base plus faible serait incapable de déprotoner le phénol (pKa = 7.6) tout en étant capable de déprotoner l'anilinium formé après alkylation de l'aniline. L'hydrogénocarbonate de sodium remplit ces critères (pKa = 6.33).

Nous avons également décider de conduire la réaction à température ambiante, ceci afin d'éviter de travailler en excès d'iodométhane (Composé **2**). On a en effet une diminution quasi-totale de O-alkylation, mais il reste impossible de monométhyler spécifiquement l'azote : l'aniline secondaire formée après la première méthylation réagit rapidement pour former le diméthyle correspondant.

La réaction suivante est la protection de l'aniline par un groupement Boc (Composé **3**). Nous avons en effet constaté que l'alkylation spécifique du phénol par le 6-nitrovératryle (Schéma 61) n'était pas concluante sans protéger au préalable l'aniline, celle-ci réagissant beaucoup plus facilement que le phénol.



Schéma 61 : Alkylation directe du composé 2

Après protection, éthérification par le nitrovératryle (Composé **4**), déprotection de l'aniline (Composé **5**) et couplage final, le carbamate désiré est obtenu avec un rendement global de 20% (Schéma 62).

⁷⁸ S. Desbene, H.D.T. Van, S. Michel, F. Tillequin, M. Koch, F. Schmidt, J.C. Florent, C. Monneret, R. Straub, J. Czech, M. Gerken, K. Bosslet, Anti-Cancer Drug Design, 1999, 14, 96-106



Schéma 62 : Synthèse du dérivé 2-HPC^{NO2}

Le même schéma a été adapté aux autres dérivés (Br, H, OMe), sans succès. Dans ces derniers cas, la méthylation a systématiquement été l'étape limitante, soit de par son rendement faible, soit du fait de la difficulté d'obtenir un produit pur. Le dérivé methoxy s'est révélé être impossible à obtenir par cette méthode, montrant une part importante de produit N-diméthyle ainsi qu'une présence conséquente de dérivé O-alkylé inséparable de l'aniline secondaire désirée. De ce fait, d'autres méthodes de méthylation ont été envisagées (amination réductrice notamment). Ces méthodes n'avaient pas été considérées pour le dérivé nitro, celui-ci étant incompatible avec les conditions utilisées. Nous avons donc préféré nous tourner vers une autre méthode de synthèse, laquelle pourra être généralisée à l'ensemble des dérivés (Schéma 63).

Afin de prévenir tout risque de O-méthylation, il nous a semblé nécessaire d'effectuer la fixation du méthyle sur l'azote après l'alkylation du phénol par le nitrovératryle. Or, comme il n'est pas envisageable d'éthérifier sans avoir au préalable protégé l'aniline, nous avons choisi

de commencer par la protection de l'aniline par un groupement BOC. A la suite de cela, les dérivés protégés ont été engagé dans une réaction d'éthérification avec le 6-nitrovératryle. De tous les solvants de réaction testés (THF, DMF, DCM), le THF est celui qui a donné les meilleurs résultats ; le DCM n'ayant pas permis la solubilisation du phénolate généré et le DMF diminuant sa réactivité.



Schéma 63 : Schéma de synthèse généralisé à l'ensemble des dérivés 2-HPC

Après obtention des éthers de vératryle et déprotection des anilines, celles-ci ont été méthylées par de l'iodométhane en présence de carbonate de potassium. Cette étape constitue encore une fois l'étape limitante de la synthèse. Les monométhylanilines ont toutefois pu être séparées des diméthylanilines correspondantes et obtenues avec des rendements acceptables (42-50%). Enfin, les couplages à la DDAO ont pu être réalisés en utilisant le phosgène pour introduire le carbonyle *via* les chlorures de carbamoyle correspondant. On note toutefois que la réaction a nécessité la présence de DMAP en quantité stœchiométrique, au vu de la faible réactivité des chlorures de carbamoyle. On obtient chacun des carbamates finaux après 5 étapes, avec un rendement global compris entre 32 et 47%, dont 35% pour le dérivé nitro, ce qui est bien supérieur aux 20% de la synthèse précédente.

Une fois les synthèses des dérivés 2-HPC menées à terme, nous avons voulu synthétiser un dérivé TML représentatif des exemples rencontrés dans la littérature. A l'origine, le but était de déterminer la vitesse de lactonisation du dérivé de 3.5-dimethylphénol, qui est le dérivé le plus reporté. Nous avons voulu également introduire différents substituants en position *para* du phénol pour tenter de moduler la cinétique de cyclisation, comme nous l'avons fait pour les 2-HPC. Il nous a semblé intéressant de conduire cette étude pour tenter d'introduire des effets électroniques dans les dérivés TML ; ce qui n'avait jusqu'à présent jamais été reporté. Cependant, les dérivés correspondant sont difficiles d'accès (rareté, prix). En conséquence, il nous aurait fallu les synthétiser, ce qui peut se révéler parfois peu aisé, notamment pour le

nitro (Schéma 64). Il apparait difficile *a priori* de discriminer la position *para* (L86) de la position *ortho* (L87) pour la nitration (voie de synthèse 1). C'est pourquoi nous avons pensé à rendre la position *ortho* non substituable par introduction d'un méthyle en cette position (voie de synthèse 2).



Schéma 64 : Nitrations possibles des dérivé 3.5-dimethyl et 2.3.5-trimethyl phénol

Partant donc du 2.3.5-trimethyl phénol, nous avons voulu commencer par le dérivé non substitué pour établir une méthode de synthèse généralisable par la suite. La solution du phénol est chauffée en présence d'acide 3.3-dimethylacrylique et d'un acide organique fort (acide méthanesulfonique). On obtient ainsi la lactone **6**, laquelle est réduite par du LiAlH₄ pour donner l'alcool **7**. On note par ailleurs que la saponification de la lactone ne mène pas à l'acide correspondant : en effet, l'effet Thorpe-Ingold favorise l'attaque de l'acide par le phénol, conduisant à la refermeture du cycle. L'alcool primaire est ensuite protégé *via* un éther silylé (Composé **8**) avant d'engager le composé dans la réaction d'éthérification avec le nitrovératryle (Schéma 65). Cependant, le vératryle n'a jamais pu être fixé sur la position phénolique, malgré toutes les conditions testées (Tableau 2).

Solvants	Catalyseurs/Activateurs	Bases	Températures
THF	KI	Cs2CO3	t.a
CH₃CN	DMAP	tBuONa	80°C
DMF	Ag ₂ O	NEt ₃	120°C

Tableau 2 : Conditions testés pour l'éthérification du composé 8

Notre hypothèse est que l'encombrement stérique induite par les méthyles en *ortho* rend difficile d'accès le phénol, lequel ne peut réagir. En conséquence de cela, cette voie de synthèse impliquant un phénol triméthylé a été remise à un moment ultérieur : nous nous sommes d'avantage intéressé au dérivé 3.5-diméthyl phénol, le TML le plus reporté dans la littérature.



Schéma 65 : Voie de synthèse à partir du 2.3.5-trimethylphénol

Pour synthétiser le dérivé TML cagé (Schéma 66), nous avons décidé de reprendre les 2 premières étapes de la synthèse précédente (SeAr/lactonisation et réduction). A l'obtention de l'alcool, nous avons décidé de l'engager tel quel dans la réaction d'éthérification sans protection de l'alcool primaire. Il semble que le phénolate est bien plus réactif que l'alcool de la chaine alkyle car nous obtenons le produit d'éthérification phénolique (en présence de K₂CO₃ dans le DMF) avec une pureté satisfaisante et un rendement correct. L'alcool primaire restant ayant pour vocation d'être oxydé en acide carboxylique, nous avons tenté d'oxyder directement l'alcool en acide par le réactif de Jones. Le produit n'a pas pu être obtenu par cette méthode : les conditions « dures » ont mené à la décomposition du produit. De la même manière, l'oxydation par le pyridinium chlorochromate (PCC) dans le DMF n'a pas mené à l'acide. Oxyder par étape (en aldéhyde, puis en acide) s'est avéré nécessaire. Notre premier essai d'oxydation par du PCC, ici dans le DCM, s'est révélé un demi-succès : on a en effet pu obtenir l'aldéhyde souhaité, mais en quantité très faible, celui-ci étant accompagné de nombreux sous-produits de dégradation. A la suite de cela, le pyridinium dichromate (PDC), moins acide, a été préféré. La réaction a permis d'obtenir l'aldéhyde pur avec un haut rendement, celui-ci a été oxydé à son tour en acide par une oxydation de Pinnick (chlorite de sodium en présence d'un acide inorganique et de 2-méthyle-2-butène pour piéger l'acide hypochloreux formé). L'acide carboxylique résultant a finalement été converti en chlorure d'acyle par traitement au phosgène avant d'être couplé à la DDAO pour mener à l'ester souhaité (rendement global : 72%).



Schéma 66 : Synthèse du dérivé TML à partir du 3.5-dimethyl phénol

Une fois les 5 dérivés synthétisés (2-HPC^{H, Br, NO2, OCH3} et TML), les études physico-chimiques ont pu être réalisées.

B. Article: Syntheses and kinetics studies of cyclisation-based self-immolative spacers

Organic & Biomolecular Chemistry



PAPER

Check for updates

Cite this: Org. Biomol. Chem., 2017, **15**, 3435

Syntheses and kinetic studies of cyclisation-based self-immolative spacers†

Steve Huvelle,^a Ahmed Alouane,^{a,b,c,d} Thomas Le Saux,^{b,c,d} Ludovic Jullien*^{b,c,d} and Frédéric Schmidt ^b*^a

Received 17th January 2017, Accepted 21st March 2017 DOI: 10.1039/c7ob00121e rsc.li/obc Kinetic analysis of the disassembly of self-immolative spacers based on cyclisation processes was performed. Five compounds were synthesized belonging to two different series, and their kinetic constants were determined. Electron-donating substituents gave a slight acceleration but the main effect was steric, and the Thorpe–Ingold effect was indeed particularly effective. Comparison with the self-immolative spacers based on elimination processes showed that cyclisations gave comparable or lower rate, but the corresponding spacers are more difficult to modulate.

Introduction

Self-immolative spacers were introduced in 1981 bv Katzellenbogen et al.¹ as an original way to correlate the cleavage of two chemical bonds. In a medicinal chemistry context, this strategy was proposed to overcome limitations of prodrugs, classically made of two moieties: an activator, reacting with an enzyme as a substrate, and a bioactive compound, as a drug or a reporter. The introduction of the spacer core involves the addition of a third moiety designed to release the effector after activation. The second bond is cleaved spontaneously after cleavage of the trigger (Scheme 1). A variety of self-immolative spacers have been introduced over the years in the literature²⁻⁴ and for instance used in cancer chemotherapy (Adcetris®).⁵⁻⁸ In this strategy, the spontaneous release introduces a second step with its own kinetic parameters. For most applications (medicinal chemistry, analytical chemistry, materials or chemical biology), the self-immolative step needs to be fast enough in order to avoid the release too far from the activation site. Our aim has been to obtain comparative data on the kinetics of the self-immolative step so that anyone can choose a spacer suited to their applications. Kinetics of some self-immolative spacers have been studied during the past,



Scheme 1 Cyclisation-based spacers investigated, with (a) trimethyl lock and (b) 2-HPC. PG = 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl; DDAO = 1,3-dichloro-9,9-dimethyl-9*H*-acridin-2(7)-one.

especially for elimination-based releases.^{9–12} This is why we focused our present studies on the other class of spacers exploiting cyclisation in a self-immolative step. In this series of spacers, the activation step generates a nucleophilic heteroatom (like nitrogen or oxygen; less often sulfur¹³) which attacks an electrophilic centre (classically a carbonyl) on another position of the skeleton of the molecule¹⁴ (Scheme 1).

To measure accurately the kinetics of the self-immolation step, a general procedure was set up based on fast and controlled photoactivation; the fluorescence measurement of a reporter then gave access to the kinetic constants.^{9–12} We have already published comparative data on kinetic constants of various elimination-based spacers (1,4 and 1,6) supported by aromatic^{10,11} or heteroaromatic rings.¹² In order to complete our comprehension of rate description of self-immolative spacers, we measured the kinetics of cyclisation-based spacers. Two main questions were addressed, the effect of the nature of

^aInstitut Curie, PSL Research University, CNRS UMR3666, INSERM U1143, 26 rue d'Ulm, F-75005 Paris, France. E-mail: Frederic.Schmidt@curie.fr ^bÉcole Normale Supérieure, PSL Research University, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Département de Chimie, PASTEUR, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France. E-mail: Ludovic.Jullien@ens.fr

^cEcole Normale Supérieure, Département de Chimie, UMR CNRS ENS-UPMC 8640 PASTEUR24 rue Lhomond, 75231 Paris, France

^dSorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, ENS, CNRS, PASTEUR, 75005 Paris, France

 $[\]dagger\, Electronic$ supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/ c7ob00121e

the spacer and the comparison between the elimination and cyclisation processes.

Results and discussion

Molecular design

The structure of the targeted compounds was tripartite: a photocleavable moiety, the self-immolative spacer, and a reporter (fluorophore).

A classical 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (also called 6-nitroveratryl) group was used for the photocleavage step. This protecting group (denoted PG in Scheme 1) has been reported to be selectively cleaved by near-UV irradiation (365 nm), with excellent yield, and allows a millisecond timescale resolution.¹⁰

Self-immolative spacers commonly reported in the literature are mainly based on phenyl cores, as aniline and phenol derivatives. The nitrogen or oxygen atom, typically involved in a bond with various protecting groups, triggers the self-immolation process. Here we used a phenol core, acting as a nucleophile during the elimination step. Two representative series seemed particularly interesting for cyclisation studies (Scheme 1):

Trimethyl-lock derivatives $^{13-18}$ *via* 6-*exo*-trig-cyclisation. These are the most widely used cyclisation-based spacers.

2-Hydroxyphenyl carbamate (2-HPC) derivatives¹⁹ *via* 5-*exo*trig cyclisation. These derivatives are less popular but are good models to study the influence of substituents on the selfimmolation rate (4 substituents were selected: methoxy, nitro, H, bromide).

In order to analyse the stoichiometry and kinetics of cyclisation reactions, we used 1,3-dichloro-9,9-dimethyl-9*H*-acridin-2 (7)-one (DDAO in Scheme 1) as a fluorescent reporter. This moiety does not emit fluorescence in caged precursors, but emits strongly in the red-wavelength region in the free phenol state.

Trimethyl-lock synthesis

The synthesis of the trimethyl-lock derivative (see Scheme 2) began by an esterification and an aromatic electrophilic substitution of 3,5-dimethylphenol with 3,3-dimethylacrylic acid under heating and acidic conditions to form the corresponding dihydrocoumarin. The lactone was then reduced by lithium aluminium hydride, leading to the free alcohol. These two steps are common in trimethyl lock derivative syntheses. The following steps have been adapted to produce our own compound. The phenol was engaged in an etherification reaction with 6-nitroveratryl bromide, and then the primary alcohol was successively oxidized to aldehyde and carboxylic acid by, respectively, pyridinium dichromate and a Pinnick oxidation. The acid was finally converted to acyl chloride by phosgene and esterified by DDAO to give the desired ester with an overall yield of 72%.



Scheme 2 Synthesis of the trimethyl-lock derivative. Reagents and conditions: (a) 3.3-dimethylacrylic acid, methane sulfonic acid, toluene, 85 °C (99%); (b) LiAlH₄, THF, 0 °C to rt (93%); (c) 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide, Cs₂CO₃, THF, rt (93%); (d) pyridinium dichromate (PDC), CH₂Cl₂, rt (95%); (e) NaClO₂, NaH₂PO₄, 2-methyl-2-butene, acetone/tBuOH/water, rt (89%); (f) 1. phosgene, THF, rt; 2. NEt₃, 4-dimethyl-aminopyridine (DMAP), DDAO, THF, rt (quant.).

Phenol-carbamate syntheses

The general synthesis of the 2-HPC (see Scheme 3) derivatives started by the aniline protection of the corresponding commercial 2-aminophenol with a Boc group. The selective protection of the aniline function *versus* phenol came from a metha-



Scheme 3 General synthesis of 2-HPC derivatives, with R as a *para* substituent (H, Br, NO₂, OCH₃). Reagents and conditions: (a) Boc_2O , K₂CO₃, THF, H₂O, rt (96% to quant.); (b) 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide, Cs₂CO₃, THF, rt (71% to quant.); (c) trifluoroacetic acid (TFA), CH₂Cl₂, rt (quant.); (d) CH₃I, K₂CO₃, DMF, rt (42 to 50%); (e) 1. phosgene, THF, rt; 2. NEt₃, DMAP, DDAO, THF, rt (quant.).

Organic & Biomolecular Chemistry

nolysis step that led to carbonate cleavage keeping the carbamate intact. Etherification of the phenol position with 6-nitroveratryl bromide was carried out under basic conditions, and then the Boc protecting group was removed under acidic conditions using a 1:1 TFA: CH_2Cl_2 mixture. This liberated the free aniline which was then monomethylated by iodomethane. Other methods of selective monomethylation (such as reductive amination or use of a soft methylating agent like dimethyl carbonate) showed incompatibilities with our compounds. Finally, the secondary aniline was treated with phosgene, and the resulting carbamoyl chloride reacted with the phenol function of the DDAO to form the desired carbamate (overall yield, from the commercial anilines: 32 to 47%, depending on the substituents). These carbamates consisted of two rotamers (N–C bond).

Cyclisation rates

For the kinetic measurements, our working hypothesis was a two-step process as depicted in Scheme 4. The first step is a photocleavage of the caged precursor, associated with k_1 , the rate constant of uncaging, and the intramolecular cyclisation, where k_2 is the rate constant for the self-immolation step.

We followed the same procedure as previously described.¹¹ The principle is to irradiate the compound at 365 nm and to follow the liberation of the released DDAO by fluorimetry in a quartz cuvette under temperature (293 K) and pH control. The experimental data were then fitted with the kinetic model to retrieve the values of k_1 and k_2 . The results are reported in Table 1.

Discussion

Results showed that cyclisation generally occurs in the minute range, for both trimethyl lock and 2-HPC derivatives; disassembly times were close to each other, showing only a factor of six between the largest and the smallest. For the nitro



Scheme 4 Kinetic models for disassembly from photoactivation to self-immolation of trimethyl-lock (top) and 2-HPC (bottom) derivatives.

Table 1 Kinetic constants of trimethyl lock and 2-HPC derivatives. See the ESI for equations and methods; where $\tau = 1/k_2$, k_2 rate constant of the self-immolation step. pK_a determination was carried out by following absorbance of protected aniline **1**, **2**, **3**, **4** as a function of pH, applying the same method as in Alouane *et al.*^{10,11}

Compound	pK_a of the phenol	$k_2 (\min^{-1})$	$ au_2$ (min)
2-HPC ^{NO2} (pH 5)	7.6 ± 0.1	$(5.2 \pm 0.5)10^{-2}$	19
2-HPC ^{NO2} (pH 8)	7.6 ± 0.1	$(6.6 \pm 0.5)10^{-2}$	15
2-HPC ^{Br} (pH 8)	10.0 ± 0.1	$(1.1 \pm 0.3)10^{-1}$	9
2-HPC ^H (pH 8)	10.7 ± 0.1	$(1.9 \pm 0.2)10^{-1}$	5
2-HPC ^{OCH3} (pH 8)	10.8 ± 0.1	$(2.9 \pm 0.3)10^{-1}$	3.5
TML (pH 8)	10.2 ± 0.1	$(3.3 \pm 0.3)10^{-1}$	3

derivative of 2-HPC, which is the only derivative with a physiological pK_a (7.6), we did not observe any significant dependence on pH: kinetics at pH 5 and pH 8 are close, showing only a 20% difference.

The trimethyl lock was important because of the large number of publications using it. The popularity of the trimethyl-lock is due to the Thorpe–Ingold effect, which is supposed to allow rapid intramolecular cyclisation. This steric effect is induced by the unfavourable interaction between the methyl at the *meta* position on the phenol core and the two geminal methyls on the alkyl chain (β position from the ester). Because of this steric hindrance, a conformation was favoured, making the carbonyl of the ester and the phenol closer. This vicinity was already known to drastically increase the cyclisation rate²⁰ but the kinetics of the process was still unknown. We measured only the rate constant of the **TML**, in line with the huge interest to this linkage compared to other carbonyl species (amide for instance).²⁰ The measured lactonisation time was around 3 min for this ester derivative.

The 2-HPC series was chosen to study the cyclisation rates of carbamates, which are relatively resistant to enzymes such as esterases or peptidases. The spacers have been modulated by variation of the substituents on the phenol core. The results enabled us to determine the effects of the substituent and of the protonation state on the kinetics of cyclisation. By lowering the pK_a via a withdrawing group, the proportion of phenolate is increased; the phenolate anion is more nucleophilic than the phenol and so able to accelerate the cyclisation process. We focused our attention on the nitro derivative, which exhibits a pK_a close to the physiological pH; in order to be *in vivo*/ in vitro deprotonated. We observed that the kinetics of the selfimmolation did not change significantly by deprotonating the nitrophenol, which led us to conclude that the gain of nucleophilicity was partially compensated by the conjugation of the phenolate with the nitro group. More generally, the more electron-donors the cycle has at the para position, the faster the cyclisation occurs in line with an enhanced nucleophilicity of the phenol: compared to the H derivative (*para*-hydrogen), we observed a relative acceleration with electron-donor groups and a moderate slow-down with electron-withdrawing groups. According to the literature, in both aliphatic²¹ and aromatic²² derivatives, nucleophilicity enhancement is a critical factor for



Scheme 5 Numeration for C¹³ and H¹ signals.

the cyclisation rate. Indeed, in every series (including ours, phenol-based ones), electron-donating groups made the nucleophile (oxygen or nitrogen in previously cited works) more reactive. Adding this to other parameters, like decreasing pK_a of the leaving group, changing the heteroatom, promoting cyclisation at high pH, choosing a better electrophilic carbonyl, or increasing temperature, various cyclisation-based spacer can be generated with half-times close to the minute range, or even less.

Eventually, this work and our previous work^{11,12} show that self-immolation in elimination-based spacers is much more rapid and substituent sensitive than in cyclisation-based spacers.

Conclusions

We investigated the self-immolation kinetics of common cyclisation-based self-immolative spacers. They exhibited releasetimes within the range of 1–10 minute at room temperature. Steric effects were more stringent than electronic effects to modulate the self-immolation rate. The comparison between cyclisation and elimination-driven self-immolation rates (as reported by Alouane *et al.*)^{11,12} further suggested that the latter mechanism has more potential for modulating kinetics.

Experimental

The commercially available chemicals were used without further purification. Anhydrous solvents were freshly distilled before use. Low actinic glassware and an aluminium film were used for all experiments involving compounds bearing the nitroveratryl moiety. Column chromatography (CC): silica gel 60 (0.040–0.063 mm) Merck. Analytical and thin layer chromatography (TLC): Merck silica gel 60 F-254 precoated plates; detection by UV (254 and 365 nm). ¹H NMR spectra were recorded at 300 MHz. ¹³C NMR spectra were recorded at 75 MHz with complete proton decoupling; chemical shifts (δ) in ppm related to a protonated solvent as the internal reference (¹H: CHCl₃ in CDCl₃, 7.26 ppm; ¹³C: ¹³CDCl₃ in CDCl₃, 77.0 ppm; coupling constants *J* in Hz; current notations are used for multiplicity (s: singlet; bs: broad singlet; d: doublet; dd: double doublet; t: triplet; q: quadruplet; m: multiplet)) (Scheme 5).

General procedure

Aniline protection (1, 2, 3, 4). To a solution of 2-aminophenol derivative (1 eq.) in THF/water (1:1 proportion) was added K_2CO_3 (5 eq.) and di-*tert*-butyl dicarbonate (2.6 eq.). After stirring for 4 h at room temperature, the mixture was neutralized (acetic acid 100%, until pH 7), the organic layer was diluted with EtOAc and washed with water and brine, then dried on MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was resolubilized in MeOH and we added K_2CO_3 (5 eq.) and stirred at room temperature until no more evolution is observed (as seen on TLC, between 1 h 30 min and 4 h). The same work-up as previously applied to obtain the crude product.

Nitroveratryl coupling (5, 6, 7, 8). 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide (1 eq.) was introduced into a solution containing the carbamate (1 eq.), and Cs_2CO_3 (1.5 eq.) in THF. The mixture was stirred overnight at room temperature, and then neutralized to pH 7 by 1 M HCl, washed with water and then with brine, dried on MgSO₄, filtered and evaporated. After purification on silica gel column chromatography, the corresponding ether was obtained.

Aniline deprotection (9, 10, 11, 12). The protected aniline (1 eq.) was solubilized in dichloromethane/trifluoroacetic acid (1 : 1 volume ratio) and stirred at room temperature for 30 min. After evaporation, the residue was taken up in EtOAc and washed with aqueous K_2CO_3 solution, water, and brine, then dried on MgSO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. The unprotected secondary anilines were isolated without further purification.

Aniline methylation (13, 14, 15, 16). The secondary anilines (1 eq.), K_2CO_3 (1.5 eq.), and iodomethane (1 eq.) in DMF were stirred at room temperature under argon until reaction showed no more evolution on TLC. The solvent was removed and the residue was solubilized in EtOAc. The organic layer was washed with water several times, and then with brine; and finally dried on MgSO₄, filtered and concentrated to dryness. The secondary anilines were obtained after purification by column chromatography on silica gel.

Coupling with DDAO (2-HPC). To a solution of N-methylaniline (1 eq.) in anhydrous THF, was carefully injected an excess of phosgene 30% in toluene (500 µL) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 20 min. The remaining phosgene was eliminated by an argon flux (warning, highly toxic), and then the solution was added to a solution of 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethylacridin-2 (9H)-one (0.055)mmol), 4-dimethylaminopyridine (0.055 mmol) and an excess of triethylamine (1 mL), in THF. The resulting solution was stirred under argon at room temperature overnight. The solvent was evaporated, and then the residue was taken up in dichloromethane; the organic phase was washed with a solution of K₂CO₃, water and brine; dried on MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The final carbamates were purified by HPLC using 80 to 90% gradient of CH₃CN/water/0.1% TFA, Waters XBridge® Prep C18 5 µm OBD[™] 30 × 150 mm Column.

tert-Butyl(2-hydroxy-5-nitrophenyl)carbamate (1). The carbamate **1** was obtained without purification as a dark yellow powder (330 mg, 99%); rf 0.57 (40% EtOAc/cyclohexane); mp 111 °C; IR (cm⁻¹) 3264, 1765, 1530, 1151; $\delta_{\rm H}$ 1.54 (s, 9H, *t*Bu), 3.81 (bs, 1H, OH), 7.9 (dd, 1H, J = 2.67/8.91 Hz, H₆), 8.06 (d, 1H, J = 2.64, H₃), 8.11 (dd, 1H, 2.70/8.94 Hz, H₅), 8.23 (bs, 1H, NH); $\delta_{\rm C}$ 28.2 (*t*Bu), 85.2 (Cq Boc), 117.2 (C₃), 121.1 (C₆), 126.2 (C₅), 126.8 (C₂), 151.8 (C₄), 153.4 (C=O), 158.6 (C₁); *m*/*z* 155, 199, 377 [M + Na]⁺. HRMS, calculated: *m*/*z* 277.0793, found: *m*/*z* 277.0792 ([M + Na]⁺), 278.0825 ([MN¹⁵ + Na]⁺).

tert-Butyl(2-((4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-5-nitrophenyl) carbamate (5). The crude product was purified by column chromatography on silica gel (20% EtOAc/cyclohexane) to give the ether 5 as a dark red solid (548 mg, 94%) rf 0.23 (20% EtOAc/cyclohexane); mp 122 °C; IR (cm⁻¹) 2979, 1785, 1519; $\delta_{\rm H}$ 1.36 (9H, s, *t*Bu), 3.97 (3H, s, OCH₃ (1)), 4.03 (3H, s, OCH₃ (2)), 5.65 (1H, s, H₇), 7.15 (1H, d, 9.12 Hz, H₆), 7.36 (1H, s, H₁₃), 7.81 (1H, s, H₁₀), 8.13 (1H, d, 2.55 Hz, H₃), 8.26 (1H, dd, 2.58/9.06 Hz, H₅); $\delta_{\rm C}$ 27.8 (CH₃ Boc), 56.4–57.2 (OCH₃ (1) & (2)), 67.8 (C₇), 83.4 (Cq Boc), 108 (C₃), 108.5 (C₁₃), 111.9 (C₅), 125.4 (C₆), 125.5 (C₂), 127.4 (C₈), 129.2 (C₁₀), 138.3 (C₉), 141.5 (C₁₁), 148.1 (C₄), 150.8 (C=O Boc), 154.7 (C₁₂), 158 (C₁); *m/z* 196, 472 [M + Na]⁺. HRMS, calculated: *m/z* 472.1334, found: *m/z* 472.1326 ([M + Na]⁺).

2-((4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-5-nitroaniline (9). The aniline 9 was directly obtained pure as a deeply red solid (427 mg, quantitative yield) rf 0.18 (30% EtOAc/cyclohexane); mp 187 °C; IR (cm⁻¹) 3368, 2922, 2851, 1783, 1514; $\delta_{\rm H}$ 3.92 (3H, s, OCH₃ (1)), 3.97 (3H, s, OCH₃ (2)), 5.62 (1H, s, H₇), 7.15 (1H, d, 9.12 Hz, H₆), 7.36 (1H, s, H₁₃), 7.81 (1H, s, H₁₀), 8.13 (1H, d, 2.55 Hz, H₃), 8.26 (1H, dd, 2.58/9.06 Hz, H₅); $\delta_{\rm C}$ 56.6 (OCH₃ (1) & (2)), 68.1 (C₇), 108.2 (C₃), 109.5 (C₅ & C₁₃), 111.1 (C₆), 114.8 (C₈), 127.4 (C₁₀), 136.9 (C₂), 139.5 (C₄), 142.5 (C₉), 148.3 (C₁₁), 150.1 (C₁), 154 (C₁₂); *m/z* 196, 350, 545 [M + H]⁺. HRMS, calculated: *m/z* 350.0910, found: *m/z* 350.0982 ([M + H]⁺).

2-((4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-N-methyl-5-nitroaniline (13). The aniline 13 was obtained after purification by column chromatography on silica gel (15% EtOAc/cyclohexane) as a yellow solid (170 mg, 40%); rf 0.23 (20% EtOAc/cyclohexane); mp 197 °C; IR (cm⁻¹) 3424, 2921, 2851, 1271, 1219; $\delta_{\rm H}$ 2.96 (s, 3H, NCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃ (1)), 3.98 (s, 3H, OCH₃ (2)), 5.62 (s, 2H, H₇), 6.78 (d, 1H, *J* = 9 Hz, H₆), 7.03 (s, 1H, H₁₃), 7.43 (d, 1H, *J* = 3 Hz, H₃), 7.58 (dd, 1H, *J* = 3/9 Hz, H₅), 7.77 (s, 1H, H₁₀); $\delta_{\rm C}$ 30.2 (NCH₃), 56.5 (OCH₃ (1) & (2)), 68.2 (C₇), 103.9 (C₃), 108.3 (C₅), 109.7 (C₁₃), 109.9 (C₆/C₈), 113 (C₁₀), 127.2 (C₂), 139.7 (C₉), 143.1 (C₁₁), 148.4 (C₁₂), 148.9 (C₁), 153.9 (C₄); *m*/z 196, 364 [M + H]⁺. HRMS, calculated: *m*/z 364.1100, found: *m*/z 364.1141 ([M + H]⁺).

6,8-Dichloro-9,9-dimethyl-7-oxo-7,9-dihydroacridin-2-yl(2-((4,5dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-5-nitrophenyl)(methyl)carbamate (2-HPC^{NO2}). The crude product was purified by column chromatography on silica gel (100% dichloromethane) to give the final carbamate 2-HPC^{NO2} (38.4 mg, quantitative yield) as a yellow solid; rf 0.14 (20% EtOAc/cyclohexane); mp 216 °C; IR (cm⁻¹) 2922, 2851, 1787, 1656, 1254, 1220; $\delta_{\rm H}$ 1.67 (s, 6H, CH₃ DDAO), 3.42 (s, 3H, NCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃ (1)), 4 (s, 3H, OCH₃ (2)), 5.71 (s, 2H, H₇), 6.88 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H₆), 6.9 (s, 1H, H₁₃), 7.31 (s, 1H, H₂₂), 7.35 (d, 1H, *J* = 4.32 Hz, H₅), 7.5 (s, 1H, H₂₅), 7.84 (d, 1H, *J* = 4.32 Hz, H₃), 8.34 (s, 2H, H₁₅/H₂₆), 8.37 (s, 1H, H₁₀); $\delta_{\rm C}$ 26.5 (CH₃ DDAO), 30.9 (NCH₃), 56.5/56.9 (OCH₃ 1 and 2), 68.3 (C₃), 108.2 (C₅), 108.3 (C₃), 108.4 (C₁₃), 112.8 (C₁₅), 119.7 (C₆), 121.2 (C₂₅), 124.8 (C₂₆), 125.7 (C₂), 131.8 (C₈), 133 (C₁₀), 135.6 (C₁₉/C₂₁), 138.4 (C₉), 136.8 (C₄/C₂₄), 138.4 (C₁₆), 139.4 (C₁₁/C₁₂), 148.5 (C₁₈), 149.8 (C₁₄), 153.5 (C₂₂), 153.6 (C₂₃), 158.5 (C₁), 173.1 (C₂₀), 207 (C=O carbamate); *m*/*z* 196, 289, 371, 447, 697 [M + H]⁺. HRMS, calculated: *m*/*z* 697.1096, found: *m*/*z* 697.1105 ([M + H]⁺), 699.1088 ([MCl³⁷ + H]⁺).

tert-Butyl(2-*hydroxyphenyl*)*carbamate* (2). The carbamate 2 was obtained as a dark yellow powder (919 mg, 96%); rf 0.7 (40% EtOAc/cyclohexane); mp 142 °C; IR (cm⁻¹) 3284, 1690, 1147; $\delta_{\rm H}$ 1.53 (s, 9H, *t*Bu), 6.77 (bs, 1H, OH), 6.85 (d, 1H, *J* = 14.7 Hz, H₆), 6.94 (d, 1H, 14.6 Hz, H₄), 6.98 (d, 1H, 9.2 Hz, H₅), 7.15 (d, 1H, 7.5 Hz, H₃); $\delta_{\rm C}$ 28.3 (CH₃ Boc), 82.1 (Cq Boc), 118.9 (C₆), 120.8 (C₄), 121.4 (C₂), 125.7 (C_{3/5}), 147.5 (C₁), 155.1 (C=O Boc); *m/z* 176, 232 [M + Na]⁺. HRMS, calculated: *m/z* 232.0917, found: *m/z* 232.0943 ([M + Na]⁺).

tert-Butyl(2-((4,5-*dimethoxy*-2-*nitrobenzyl*)*oxy*)*phenyl*)*carbamate* (6). The crude product was purified by column chromatography on silica gel (20% EtOAc/cyclohexane) to give the ether **6** as a light yellow solid (376.1 mg, quantitative yield); rf 0.3 (20% EtOAc/cyclohexane); mp 137 °C; IR (cm⁻¹) 3452, 2943, 2897, 1730, 1221, 1150; $\delta_{\rm H}$ 1.52 (s, 9H, *t*Bu), 3.92 (s, 3H, OCH₃ (1)), 3.96 (s, 3H, OCH₃ (2)), 5.54 (s, 2H, H₇), 6.84 (dd, 1H, *J* = 1.26/14.7 Hz, H₆), 6.9 (dd, 1H, *J* = 1.3/14.1 Hz, H₄), 6.95 (dd, 1H, *J* = 1.3/14 Hz, H₅), 7.12 (bs, 1H, NH), 7.18 (s, 1H, H₁₃), 7.77 (s, 1H, H₁₀), 8.07 (d, 1H, *J* = 7 Hz, H₃); $\delta_{\rm C}$ 28.5 (CH₃ Boc), 55.9 (OCH₃ (1) & (2)), 67.7 (C₇), 82.3 (Cq Boc), 109.5 (C₁₃), 118.7 (C₈), 119.1 (C₆), 121 (C₄), 121.6 (C₂), 122.2 (C₁₀), 125.9 (C_{3/5}), 136.5 (C₉), 139.1 (C₁₁), 145.7 (C₁₂), 147.7 (C₁), 155.3 (C=O Boc); *m/z* 196, 305, 349, 405 [M + H]⁺, 427 ([M + Na]⁺). HRMS, calculated: *m/z* 405.1617, found: *m/z* 405.1661 ([M + H]⁺).

2-((4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)aniline (10). The aniline 10 was obtained as a yellow solid (137.7 mg, quantitative yield); rf 0.24 (30% EtOAc/cyclohexane); mp 115 °C; IR (cm⁻¹) 3453, 2946, 2907, 1221, 1151; $\delta_{\rm H}$ 3.90 (s, 3H, OCH₃ (1)), 3.93 (s, 3H, OCH₃ (2)), 5.49 (s, 2H, H₇), 6.64 (dd, 1H, *J* = 1.3/14.7 Hz, H₆), 6.69 (dd, 1H, *J* = 1.28/13.7 Hz, H₄), 6.76 (dd, 1H, *J* = 1.3/14 Hz, H₅), 6.8 (dd, 1H, *J* = 1.7/14.2 Hz, H₃), 7.25 (s, 1H, H₁₃), 7.72 (s, 1H, H₁₀); $\delta_{\rm C}$ 56.1 (OCH₃ (1) and (2)), 68.1 (C₇), 109.7 (C₁₃), 118.9 (C₈), 119.5 (C₆), 121.5 (C₄), 122.1 (C₂), 122.3 (C₁₀), 126.4 (C_{3/5}), 136.9 (C₉), 139.3 (C₁₁), 145.9 (C₁₂), 148.1 (C₁); *m*/z 196, 305 [M + H]⁺. HRMS, calculated: *m*/z 305.1093, found: *m*/z 305.1131 ([M + H]⁺).

2-((4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-N-methylaniline (14). The aniline 14 was obtained after purification by column chromatography on silica gel (15% EtOAc/cyclohexane) as an orange solid (60 mg, 48%); rf 0.36 (20% EtOAc/cyclohexane); mp 130 °C; IR (cm⁻¹) 2976, 2999, 1215; $\delta_{\rm H}$ 2.9 (s, 3H, NCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃ (1)), 3.95 (s, 3H, OCH₃ (2)), 4.32 (bs, 1H, NH), 5.51 (s, 2H, H₇), 6.58 (d, 1H, *J* = 1.32 Hz, H₅), 6.61 (d, 1H, *J* = 1.32 Hz, H₄), 6.65 (d, 1H, *J* = 7.62 Hz, H₆), 6.93 (d, 1H, *J* = 7.89 Hz, H₃), 7.21 (s, 1H, H₁₃), 7.44 (s, 1H, H₁₀); $\delta_{\rm C}$ 30.5 (NCH₃), 56.4 (OCH₃ (1) & (2)), 68.1 (C₇), 109.7 (C₁₃), 118.9 (C₈), 119.5 (C₆), 121.5 (C₄), 122.1 (C₂), 122.3 (C₁₁), 126.4 (C_{3/5}), 136.9 (C₉), 139.3 (C₁₁), 145.9 (C₁₂), 148.1 (C₁); *m/z* 196, 319 [M + H]⁺.

HRMS, calculated: m/z 319.1249, found: m/z 319.1288 ($[M + H]^+$).

6,8-Dichloro-9,9-dimethyl-7-oxo-7,9-dihydroacridin-2-yl(2-((4,5dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)phenyl)(methyl)carbamate (2-HPC^H).The crude product was purified by column chromatography on silica gel (100% dichloromethane) to give the carbamate 2-HPC^H (110.4 mg, quantitative yield) as a yellow solid; rf 0.27 (20% EtOAc/cyclohexane); mp 160 °C; IR (cm⁻¹) 3382, 2915, 2850, 2813, 1710, 1502; δ_H 1.58 (s, 6H, CH₃ DDAO), 3.32 (s, 3H, NCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃ (1)), 3.95 (s, 3H, OCH₃ (2)), 5.52 (s, 2H, H_7), 6.58 (d, 1H, J = 1.32 Hz, H_5), 6.61 (d, 1H, J =1.32 Hz, H_4), 6.75 (d, 1H, J = 7.62 Hz, H_6), 6.87 (s, 1H, H_{22}), 6.93 (d, 1H, J = 7.89 Hz, H₃), 7.11 (s, 1H, H₂₆), 7.21 (s, 1H, H₁₃), 7.22 (s, 1H, H₂₅), 7.38 (s, 1H, H₁₅), 7.44 (s, 1H, H₁₀); $\delta_{\rm C}$ 27.8 (CH₃ DDAO), 30.5 (NCH₃), 32.8 (C₁₇), 56.4 (OCH₃ (1) & (2)), 68.1 (C7), 109.7 (C13), 118.8 (C15), 118.9 (C8), 119.5 (C6), 120.1 (C_{26}) , 120.4 (C_{25}) , 121.5 (C_4) , 122.1 (C_2) , 122.3 (C_{10}) , 126.4 (C3/5), 129.4 (C21), 129.9 (C19), 136.9 (C9), 139.3 (C11), 140.8 (C₂₄), 144.6 (C₁₆), 145.9 (C₁₂), 147.2 (C₁₈), 148.1 (C₁), 151.2 (C22), 158.8 (C14), 164.6 (C23), 170.2 (C20); m/z 196, 345, 652 $[M + H]^+$. HRMS, calculated: m/z 652.1146, found: m/z $652.1252 ([M + H]^+), 654.1235 ([MCl³⁷ + H]^+).$

tert-Butyl(2-*hydroxy-5-methoxyphenyl*)*carbamate* (3). The carbamate 3 was obtained as a dark red oil (555.1 mg, quantitative); rf 0.77 (40% EtOAc/cyclohexane); IR (cm⁻¹) 3225, 2857, 1726, 1150; $\delta_{\rm H}$ 3.66 (s, 3H, methoxy), 6.14 (dd, 1H, J = 2.94/8.94 Hz, H₅), 6.36 (d, 1H, J = 2.91 Hz, H₃), 6.58 (d, 1H, J = 8.58 Hz, H₆); $\delta_{\rm C}$ 55.6 (OCH₃ phenol), 106.3 (C₃), 110 (C₆), 118.2 (C₅), 126.3 (C₂), 140.3 (C₁), 153.5 (C₄); *m/z* 140 [M + H]⁺, 206, 262 [M + Na]⁺. HRMS, calculated: *m/z* 262.1091, found: *m/z* 262.1050 ([M + Na]⁺).

tert-Butyl(2-((4,5-*dimethoxy*-2-*nitrobenzyl*)*oxy*)-5-*methoxyphenyl*) *carbamate* (7). The crude product was purified by column chromatography on silica gel (50% dichloromethane/cyclohexane) to give the ether 7 as a red solid (485.5 mg, 71%); rf 0.33 (20% EtOAc/cyclohexane); mp 143 °C; IR (cm⁻¹) 3451, 2975, 2904, 2863, 1712, 1271; $\delta_{\rm H}$ 1.49 (s, 9H, *t*Bu), 3.68 (s, 3H, methoxy), 6.47 (dd, 1H, J = 2.88/8.70 Hz, H₅), 6.78 (d, 1H, J = 8,5 Hz, H₆), 7.12 (d, 1H, J = 2.6 Hz, H₃); $\delta_{\rm C}$ 28.3 (CH₃ Boc), 55.6 (methoxy), 81.8 (Cq Boc), 106.5 (C₃), 110.2 (C₆), 118.4 (C₅), 126.5 (C₂), 140.5 (C₁), 152.5 (C=O Boc), 153.7 (C₄); *m/z* 140, 196, 335, 379 [M + H]⁺, 457 [M + Na]⁺. HRMS, calculated: *m/z* 435.1789, found: *m/z* 435.1763 ([M + H]⁺).

2-((4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-5-methoxyaniline (11). The aniline 11 was obtained as a red solid (m = 639 mg, quantitative yield); rf 0.35 (30% EtOAc/cyclohexane); mp 117 °C; IR (cm⁻¹) 3193, 2918, 2863, 1208; $\delta_{\rm H}$ 3.67 (s, 1H, methoxy), 3.82 (s, 1H, OCH₃ (1)), 3.91 (s, 1H, OCH₃ (2)), 5.4 (s, 2H, H₇), 6.78 (dd, 1H, J = 2.3/8.9 Hz, H₅), 6.85 (d, 1H, 8.9 Hz, H₆), 6.99 (d, 1H, 2.3 Hz, H₃), 7.12 (s, 1H, H₁₃), 7.65 (s, 1H, H₁₀), 11.08 (bs, 2H, NH₂); $\delta_{\rm C}$ 55.5 (methoxy), 56.5 (OCH₃ (1) and (2)), 68.7 (C₇), 102.3 (C₃), 102.5 (C₅), 108 (C₆), 109.5 (C₈), 114.3 (C₁₀/C₁₃), 129.9 (C₂), 139.2 (C₄), 140.2 (C₁), 148.8 (C₉), 153.9 (C₁₂), 155.2 (C₁₁); m/z 154, 182, 196, 335, 357 [M + H]⁺. HRMS, calculated: m/z 335.1165, found: m/z 335.1239 ([M + H]⁺).

2-((4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-5-methoxy-N-methylaniline (15). The aniline 15 was obtained after purification by column chromatography on silica gel (15% EtOAc/cyclohexane) as a yellow solid (148.9 mg, 45%); rf 0.51 (20% EtOAc/cyclohexane); mp 153 °C; IR (cm⁻¹) 3406, 2929, 1516; $\delta_{\rm H}$ 3.87 (s, 3H, NCH₃), 3.76 (s, 3H, methoxy), 3.92 (s, 3H, OCH₃ (1)), 3.96 (s, 3H, OCH₃ (2)), 5.46 (s, 2H, H₇), 6.1 (dd, 1H, *J* = 3.00/9.00 Hz, H₅), 6.24 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, H₃), 6.67 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H₆), 7.24 (s, 1H, H₁₃), 7.75 (s, 1H, H₁₀); $\delta_{\rm C}$ 30.3 (NCH₃), 56.1 (methoxy), 56.4 (OCH₃ (1) & (2)), 70.1 (C₇), 107 (C₃), 110.7 (C₆), 113.4 (C₁₃), 118.9 (C₅), 127 (C₂), 127.8 (C₈), 129.9 (C₁₀), 140.4 (C₉), 140.9 (C₁), 142.4 (C₁₁), 154.2 (C₄), 156.6 (C₁₂); *m/z* 152, 349 [M + H]⁺. HRMS, calculated: *m/z* 349.1355, found: *m/z* 349.1393 ([M + H]⁺).

6,8-Dichloro-9,9-dimethyl-7-oxo-7,9-dihydroacridin-2-yl(2-((4,5dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-5-methoxyphenyl)(methyl)carbamate (2-HPC^{OCH3}). The crude product was purified by column chromatography on silica gel (100% dichloromethane) to give the final carbamate 2-HPC^{OCH3} (44.4 mg, quantitative yield) as a brown solid; rf 0.27 (20% EtOAc/cyclohexane); mp 103 °C; IR (cm⁻¹) 2924, 2801, 1726, 1657, 1235; $\delta_{\rm H}$ 1.58 (s, 6H, CH₃) DDAO), 3.31 (s, 3H, NCH₃), 3.77/3.81 (s, 6H, OCH₃ (1) & (2)), 3.91 (s, 3H, methoxy), 5.46 (s, 2H, H_7), 6.87 (m, 3H, $H_3/H_5/H_6$), 6.97 (d, 1H, J = 3 Hz, H_{15}), 7.03 (s, 1H, H_{25}), 7.38 (s, 1H, H_{13}), 7.44 (d, 1H, J = 9 Hz, H_{26}), 7.51 (s, 1H, H_{22}), 7.74 (s, 1H, H_{10}); $\delta_{\rm C}$ 29.7 (CH₃ DDAO), 39.1 (NCH₃), 56.9/56.5/55.8 (OCH₃ (1)& (2), methoxy), 67.7 (C_7), 106.6 (C_3/C_5), 108 (C_{13}), 108.6 (C_6), 113.4 (C₁₅), 113.9 (C₂₅), 114.9 (C₂₆), 120 (C₂), 121.5 (C₈), 121.5 (C₉), 129 (C₂₁), 132.1 (C₁₉), 132.9 (C₁₀), 135.4 (C₁₆), 137.2 (C₉), 138.2 (C₁₆), 138.6 (C₁₁), 139.2 (C₁₂), 139.4 (C₁), 140.3 (C₁₈), 147.4 (C₁₄), 148 (C₂₂), 149.6 (C₂₃), 154.1 (C₄), 154.4 (C=O carbamate), 173.1 (C=O DDAO); m/z 149, 448, 682 $[M + H]^+$. HRMS, calculated: *m*/*z* 682.1251, found: *m*/*z* 682.1356 $([M + H]^{+})$, 684.1341 $([MCl^{37} + H]^{+})$.

tert-Butyl(5-*bromo-2-hydroxyphenyl*)*carbamate* (4). The carbamate 4 was obtained as a red solid (750 mg, quantitative yield); rf 0.74 (40% EtOAc/cyclohexane); mp 135 °C; IR (cm⁻¹) 3262, 2978, 1691, 1150; $\delta_{\rm H}$ 1.52 (s, 9H, *t*Bu), 6.65 (s, 1H, H₃), 6.82 (d, 1H, *J* = 8.58 Hz, H₆), 7.11 (dd, 1H, *J* = 3.87/8.49 Hz, H₅), 7.33 (s, 1H, OH), 7.87 (bs, 1H, NH); $\delta_{\rm C}$ 28.2 (CH₃ Boc), 82.6 (Cq Boc), 112.4 (C₄), 120 (C₆), 123.8 (C₃), 127.1 (C₂), 128.1 (C₅), 146.4 (C₁), 154.6 (C=O Boc); *m*/*z* 187, 231 [M + H]⁺, 310 [M + Na]⁺. HRMS, calculated: *m*/*z* 310.0037, found: *m*/*z* 310.0048 ([M + Na]⁺), 312.0029 ([MBr⁸¹ + Na]⁺).

tert-Butyl(*5-bromo-2-((4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)phenyl) carbamate (8).* The crude product was purified by column chromatography on silica gel (20% EtOAc/cyclohexane) to give the ether as a brown solid (1.23 g, 94%); rf 0.34 (20% EtOAc/ cyclohexane); mp 148 °C; IR (cm⁻¹) 3452, 2976, 2927, 1726; $\delta_{\rm H}$ 1.52 (s, 9H, *t*Bu), 3.92 (s, 3H, OCH₃ (1)), 3.97 (s, 3H, OCH₃ (2)), 5.53 (s, 2H, H₇), 6.69 (d, 1H, *J* = 8.70 Hz, H₆), 7.03 (dd, 1H, *J* = 2.31/8.61 Hz, H₅), 7.11 (s, 2H, H₃/H₁₃), 7.77 (s, 1H, H₁₀), 8.3 (bs, 1H, NH); $\delta_{\rm C}$ 28.3 (*t*Bu), 56.4 (OCH₃ (1) & (2)), 68.3 (C₇), 81.1 (Cq Boc), 108.2 (C₁₃), 109 (C₄), 113.3 (C₆), 114.7 (C₃), 121.4 (C₂), 125.1 (C₈), 129.6 (C₁₀), 139.1 (C₉), 145.1 (C₁₁), 148.2 (C₁₁), 152.3 (C=O Boc), 154 (C₁₂); *m/z* 196, 385, 427, 483 [M + H]⁺. HRMS, calculated: m/z 483.0668, found: m/z 483.0766 ($[M + H]^+$), 485.0738 ($[MBr^{81} + H]^+$).

5-Bromo-2-((4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)aniline (12). The aniline 18 was obtained as a dark red solid (955.1 mg, quantitative yield); rf 0.23 (30% EtOAc/cyclohexane); mp 142 °C; IR (cm⁻¹) 3366, 2917, 2884, 1271, 1192; $\delta_{\rm H}$ 3.64 (bs, 2H, NH₂); 3.92 (s, 3H, OCH₃ (1)); 3.95 (s, 3H, OCH₃ (2)); 5,49 (s, 2H, H₇); 6,62 (d, 1H, *J* = 8.58 Hz, H₆); 6.75 (1H, dd, 2.19/8.52 Hz, H₅), 6.86 (1H, d, 2.22 Hz, H₃), 7.17 (1H, s, H₁₃), 7.74 (1H, s, H₁₀); $\delta_{\rm C}$ 56.4 (OCH₃ (1) & (2)), 68.0 (C₇), 108.1 (C₁₃), 109.4 (C₄), 114.1 (C₃), 114.4 (C₆), 118.0 (C₅), 121.0 (C₈), 128.9 (C₁₀), 138.0 (C₂), 139.3 (C₉), 144.7 (C₁₁), 148.0 (C₁), 153.9 (C₁₂); *m/z* 196, 383 [M + H]⁺. HRMS, calculated: *m/z* 383.0144, found: *m/z* 383.0234 ([M + H]⁺), 385.0217 ([MBr⁸¹ + H]⁺).

5-Bromo-2-((4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-N-methylaniline (16). The aniline 16 was obtained after purification by column chromatography on silica gel (15% EtOAc/cyclohexane) as a yellow solid (496 mg, 50%); rf 0.26 (20% EtOAc/cyclohexane); mp 170 °C; IR (cm⁻¹) 2922, 28.47, 1209, 1155; $\delta_{\rm H}$ 2.88 (3H, s, NCH₃), 3.91 (3H, s, OCH₃ (1)), 3.96 (3H, s, OCH₃ (2)), 5.50 (2H, s, H₇), 6.60 (1H, d, *J* = 8.46 Hz, H₆), 6.76 (1H, d, *J* = 8.31 Hz, H₅), 6.82 (1H, s, H₃), 7.15 (1H, s, H₁₃), 7.75 (1H, s, H₁₀); $\delta_{\rm C}$ 30.4 (NCH₃), 56.5 (OCH₃ (1) & (2)), 68.3 (C₇), 108.0 (C₁₃), 109.5 (C₃), 113.0 (C₄), 115.4 (C₆), 119.1 (C₅), 129.0 (C₈), 139.4 (C₁₀), 140.6 (C₉), 144.5 (C₂), 148.3 (C₁₁/C₁), 154.1 (C₁₂); *m/z* 196, 397 [M + H]⁺. HRMS, calculated: *m/z* 397.0300, found: *m/z* 397.0392 ([M + H]⁺), 399.0373 ([MBr⁸¹ + H]⁺).

6,8-Dichloro-9,9-dimethyl-7-oxo-7,9-dihydroacridin-2-yl(5-bromo-2-((4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)phenyl)(methyl)carbamate (2-HPC^{Br}). The crude product was purified by column chromatography on silica gel (100% dichloromethane) to give the carbamate 2-HPC^{Br} (24.1 mg, quantitative yield) as a dark green solid; rf 0.31 (20% EtOAc/cyclohexane); mp 146 °C; IR (cm⁻¹) 2923, 1728, 1658, 1222; $\delta_{\rm H}$ 1.67 (s, 6H, CH₃ DDAO), 3.38 (s, 3H, NCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃ (1)), 3.99 (s, 3H, OCH₃ (2)), 5.57 (s, 2H, H_7), 6.93 (d, 1H, J = 9 Hz, H_5), 7.03 (s, 1H, H_{13}), 7.09 (d, 1H, J = 6 Hz, H₃), 7.39 (s, 1H, H₆), 7.52 (m, 3H, H₂₅/H₂₆/ H_{15}), 7.60 (s, 1H, H_{10}), 7.82 (s, 1H, H_{22}); δ_{C} 25.6/26.4 (CH₃) DDAO), 29.7 (NCH₃), 56.5 (OCH₃ (1)), 56.9 (OCH₃ (2)), 67.6 (C_{17}) , 68 (C_7) , 108.2 (C_{13}) , 108.4 (C_4) , 113.5 (C_6) , 114.7 (C_{15}) , 119.8 (C₂₆), 121.4 (C₂₅), 128 (C₃), 131.6 (C₈), 132.3 (C₅), 132.7 (C₂), 135.6 (C₂₁), 137.3 (C₁₉), 138.2 (C₂₄), 138.7 (C₁₆), 139.3 (C_{11}) , 140.2 (C_{12}/C_{23}) , 148.2 (C_{18}) , 149.6 (C_{14}/C_{22}) , 152.6 (C_1) , 153.9 (C₉), 154.4 (C=O carbamate), 173.1 (C₂₀); *m*/*z* 397, 730 $[M + H]^+$. HRMS, calculated: m/z 730.0260, found: m/z730.0358 ($[M + H]^+$), 732.0333 ($[MBr^{81} + H]^+$), 734.0319 $([MCl^{37}Br^{81} + H]^+).$

4,4,5,7-Tetramethyl-2-chromanone (17). 3,5-Dimethylphenol (500 mg, 4.09 mmol) and 3,3-dimethylacrylic acid (409.5 mg, 4.09 mmol) were dissolved in toluene (15 mL). Then methyl sulfonic acid was added (2.92 mL, 20.45 mmol). The mixture was stirred for 4 h under argon at 85 °C. After solvent evaporation, the reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with K_2CO_3 (1 M) solution, water and brine; and finally dried over anhydrous magnesium sulphate. The solvent was removed under vacuum affording a yellow oil (827 mg, 99%); rf

0.72 (30% EtOAc/cyclohexane); IR (cm⁻¹) 2966, 1766; $\delta_{\rm H}$ 1.42 (6H, s, H₁₀/H₁₁), 2.25 (3H, s, H₇), 2.45 (3H, s, H₈), 2.56 (2H, s, H₁₂), 6.72 (2H, d, J = 4.86 Hz, H₄/H₆); $\delta_{\rm C}$ 20.9 (C₇), 23.9 (C₈), 28.2 (C₁₀/C₁₁), 35.5 (C₉), 46.0 (C₁₂), 117.0 (C₆), 126.9 (C₄), 130.1 (C₃), 136.6 (C₂), 138.2 (C₅), 152.0 (C₁), 169.3 (C₁₃); m/z 175, 205 [M + H]⁺. HRMS, calculated: m/z 205.1184, found: m/z 205.1222 ([M + H]⁺).

2-(4-Hydroxy-2-methylbutan-2-yl)-3,5-dimethylphenol (18). To a solution of 4,4,5,7-tetramethyl-2-chromanone (500 mg, 2.45 mmol) in anhydrous THF (10 mL) in an ice bath was added lithium aluminium hydride (766.6 mg, 12.12 mmol) portion wise. The heterogeneous mixture was allowed to warm at room temperature and stirred 1 h 30 min under argon. The excess of LiAlH4 was neutralized with NH4Cl at 0 °C, and then the suspension was filtered on Celite 535; the resulting filtrate was diluted with EtOAc and treated with 1 M HCl, water and brine; and finally dried on MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The crude product was purified by column chromatography on silica gel, giving the alcohol 18 as an off-white powder (479 mg, 94%); rf 0.35 (30% EtOAc/cyclohexane); mp 78 °C; IR (cm⁻¹) 3508; $\delta_{\rm H}$ (CD₃OD) 1.55 (6H, s, H₁₀/H₁₁), 2.17 $(3H, s, H_7)$, 2.27 $(2H, t, J = 6.24 \text{ Hz}, H_{12})$, 2.48 $(3H, s, H_8)$, 3.62 (2H, dd, J = 7.24/14.61 Hz, H₁₃), 6.34 (1H, s, H₄), 6.45 (1H, bs, OH), 6.49 (1H, s, H₆); $\delta_{\rm C}$ (CD₃OD) 20.6 (C₇), 26.0 (C₈), 32.1 $(C_{10}/C_{11}), 45.2 (C_{12}), 61.9 (C_{13}), 113.6 (C_6), 127.2 (C_4),$ 136.7 (C₂), 138.4 (C₃), 139.9 (C₅), 156.1 (C₁); m/z 123, 189, 209 $[M + H]^+$, 231 $[M + Na]^+$. HRMS, calculated: m/z 209.1497, found: m/z 209.1531 ([M + H]⁺).

3-(2-((4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-4,6-dimethylphenyl)-3methylbutan-1-ol (19). K₂CO₃ (559.8 mg, 4.05 mmol, 1.5 eq.) was added to a solution of 2-(4-hydroxy-2-methylbutan-2-yl)-3,5-dimethylphenol (563 mg, 2.7 mmol, 1 eq.) in DMF (12 mL). After 2 min, 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide (740 mg, 2.7 mmol, 1 eq.) was added. The mixture was stirred under argon overnight, and then treated with an aqueous solution of K₂CO₃, water and brine; dried on MgSO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (40% EtOAc/cyclohexane) to give the ether as an orange solid (879 mg, 81%); rf 0.17 (30% EtOAc/cyclohexane); mp 86 °C; IR (cm⁻¹) 3326, 2969, 1274; $\delta_{\rm H}$ 1.58 (6H, s, H_{10}/H_{11}), 2.21 (3H, s, H_7), 2.24 (2H, t, J = 7.24 Hz, H_{12}), 2.51 (3H, s, H₈), 3.57 (2H, t, J = 7.23 Hz, H₁₃), 3.94 (3H, s, OCH₃ (1)), 3.97 (3H, s, OCH₃ (2)), 5.50 (2H, s, H_{14}), 6.58 (2H, s, H_4 / H_6), 7.37 (1H, s, H_{20}), 7.78 (1H, s, H_{17}); δ_C 21.0 (C_7), 26.2 (C_8), 32.7 (C₁₀/C₁₁), 40.5 (C₉), 46.0 (C₁₂), 56.5 (OCH₃ (1) & (2)), 61.5 (C₁₃), 69.4 (C₁₄), 108.5 (C₂₀), 110.6 (C₆), 114.0 (C₄), 129.0 (C₁₅), 130.6 (C₂), 131.4 (C₁₇), 137.1 (C₃), 138.3 (C₅), 139.3 (C₁₆), 148.5 (C_{18}) , 154.3 (C_1) , 158.8 (C_{19}) ; m/z 196, 318, 404, 421 $[M + H]^+$. HRMS, calculated: *m/z* 404.2028, found: *m/z* 404.2069 $([M + H]^{+}).$

3-(2-((4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-4,6-dimethylphenyl)-3methylbutanal (20). To a solution of <math>3-(2-((4,5-dimethoxy-2nitrobenzyl)oxy)-4,6-dimethylphenyl)-3-methylbutan-1-ol (714.9mg, 1.77 mmol, 1 eq.) in 10 mL of dichloromethane was addedpyridinium dichromate (2.66 g, 7.08 mmol, 4 eq.). The mixturewas stirred under argon for 24 h, then treated with NH₄Cl,

Paper

water and brine; dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (20% EtOAc/cyclohexane) to give the aldehyde as an orange solid (675 mg, 95%); rf 0.51 (30% EtOAc/cyclohexane); mp 106 °C; IR (cm⁻¹) 2919, 1721, 1275; $\delta_{\rm H}$ 1.62 (6H, s, H₁₀/ H₁₁), 2.16 (3H, s, H₇), 2.51 (3H, s, H₈), 2.97 (2H, s, H₁₂), 3.90 (3H, s, OCH₃ (1)), 3.94 (3H, s, OCH₃ (2)), 5.47 (2H, s, H₁₄), 6.52 (1H, s, H₄), 6.58 (1H, s, H₆), 7.20 (1H, s, H₂₀), 7.74 (1H, s, H₁₇), 9.54 (1H, s, H₁₃); $\delta_{\rm C}$ 21.0 (C₇), 26.2 (C₈), 32.3 (C₁₀/C₁₁), 39.2 (C₉), 57.1 (OCH₃ (1) & (2)), 69.2 (C₁₄), 108.5 (C₂₀), 110.2 (C₆), 113.9 (C₄), 128.9 (C₁₅), 129.9 (C₂), 130.2 (C₁₇), 137.4 (C₃), 138.0 (C₅), 139.3 (C₁₂), 148.4 (C₁₈), 154.4 (C₁), 157.8 (C₁₉), 204.1 (C₁₃); *m/z* 196, 338, 384, 402, 419 [M + H]⁺. HRMS, calculated: *m/z* 402.1872, found: *m/z* 402.1911 ([M + H]⁺).

3-(2-((4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-4,6-dimethylphenyl)-3methylbutanoic acid (21). 3-(2-((4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl) oxy)-4,6-dimethylphenyl)-3-methylbutanal (116 mg, 0.29 mmol) was dissolved in a 10 mL of acetone/tert-butanol/water (17:12:3) mixture, then 2-methyl-2-butene (208 μL, 1.96 mmol, 6.75 eq.), sodium chlorite (137.7 mg, 1.52 mmol, 5.25 eq.), and sodium dihydrogenophosphate (53 mg, 0.44 mmol, 1.5 eq.) were added. The mixture was stirred overnight, and then neutralized with NH₄Cl. The organic phase was diluted with EtOAc, treated with water and dried on MgSO₄. After filtration, evaporation and purification on silica gel (40% EtOAc/cyclohexane), the acid was obtained as a light yellow powder (107.6 mg, 89%); rf 0.40 (40% EtOAc/cyclohexane); mp 120 °C; IR (cm⁻¹) 2927, 1711, 1275; $\delta_{\rm H}$ 1.79 (6H, s, H₁₀H/₁₁), 2.26 (3H, s, H₈), 2.37 (3H, s, H₇), 3.64 (2H, s, H₁₂), 3.76 (3H, s, OCH₃ (1)), 3.90 (3H, s, OCH₃ (2)), 5.61 (2H, s, H₁₄), 6.65 (1H, s, H₄), 6.68 (1H, s, H₆), 7.40 (1H, s, H₂₀), 7.68 (1H, s, H_{17} ; δ_{C} 19.2 (C₇), 21.4 (C₈), 26.0 (C₉), 32.3 (C₁₀/C₁₁), 40.1 (C₁₂), 57.1 (OCH₃ (1) & (2)), 69.3 (C₁₄), 108.4 (C₂₀), 110.0 (C₆), 114.0 (C₄), 128.8 (C₁₅), 130.4 (C₂), 130.7 (C₁₇), 136.6 (C₃), 138.2 (C₅), 139.2 (C₁₆), 148.3 (C₁₈), 154.3 (C₁), 158.1 (C₁₉), 177.7 (C₁₃); m/z 196, 318, 418 $[M + H]^+$, 435 $[M + NH_4]^+$. HRMS, calculated: m/z418.1821, found: m/z 418.1860 ([M + H]⁺).

6,8-Dichloro-9,9-dimethyl-7-oxo-7,9-dihydroacridin-2-yl-3-(2-((4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-4,6-dimethylphenyl)-3-methylbutanoate (TML). To a solution of 3-(2-((4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-4,6-dimethylphenyl)-3-methylbutanoic acid (15 mg, 0.036 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (5 mL), was injected an excess of 30% phosgene in toluene (300 µL) under an inert atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 45 min. The remaining phosgene was eliminated by an argon flux; this solution was then added to a solution of 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethylacridin-2(9H)-one (11.1 mg, 0.036 mmol), 4-dimethylaminopyridine (4.4 mg, 0.036 mmol) and an excess of triethylamine (1 mL) in THF (5 mL). The resulting solution was stirred under argon at room temperature overnight. The solvent was evaporated, then the residue was taken up in dichloromethane; the organic phase was washed with water and brine; dried on MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The ester was purified by HPLC using 80 to 90% gradient of CH₃CN/water/0.1% TFA, Waters XBridge® Prep C18 5 µm OBD[™] 30 × 150 mm Column, to give

the pure product as a deep dark green solid (25 mg, quantitative yield); rf 0.40 (40% EtOAc/cyclohexane); mp 220 °C; IR (cm⁻¹) 2918, 1754, 1621; $\delta_{\rm H}$ 1.71 (s, 6H, CH₃ DDAO), 2.21 (s, 2H, H₇), 2.57 (s, 2H, H₈), 3.09 (s, 2H, H₁₉), 4.01 (s, 6H, OCH₃ (1) & (2)), 5.56 (s, 2H, H₉), 6.55–7.82 (m, 7H, ArH); $\delta_{\rm C}$ 11 (C₇), 14.1 (C₈), 20.7 (C₁₆), 23 (C₁₇), 23.7/25.8 (CH₃ DDAO), 38.9 (C₁₈), 56.4 (OCH₃ 1 and 2), 68.2 (C₉), 70.1 (C₁₉), 108.1 (C₂), 109.7 (C₃/C₅), 128.5 (C₄), 128.8 (C₁₅/C₂₃), 129.8 (C₁₀), 130.9 (C₁₄/C₁₃), 132.4 (C₆), 147.9 (C₁/C₁₁), 153.7 (C₂₅/C₂₇), 167.8 (C₂₆), 187.8(C=O ester); *m*/*z* 350, 447, 647, 707 [M + H]⁺. HRMS, calculated: *m*/*z* 707.1819, found: *m*/*z* 707.1922 ([M + H]⁺), 709.1911 ([MCl³⁷ + H]⁺).

Analytical solutions

All kinetic experiments have been performed in $CH_3CN/0.1$ M Britton–Robinson buffer²³ 1:1 (v:v). All solutions were prepared using water purified through a Direct-Q 5 (Millipore, Billerica, MA).

UV-Visible absorption. UV/Vis absorption spectra were recorded in 1 cm \times 1 cm quartz cuvettes (Hellma) on a diode array UV/Vis spectrophotometer (Cary 300, Agilent, Thermo Scientific) at 298 K.

Steady-state fluorescence emission

Corrected fluorescence spectra upon one-photon excitation were recorded with a Photon Technology International QuantaMaster QM-1 spectrofluorimeter (PTI, Monmouth Junction, NJ) equipped with a Peltier cell holder (TLC50, Quantum Northwest, Shoreline, WA). Solutions for fluorescence measurements were adjusted to $10 \mu M$.

Irradiation experiments

One-photon irradiation experiments were carried out on the spectrofluorimeter. Irradiation was performed using a filtered 75 W xenon lamp at several slit widths on 400 μ L samples in 0.2 × 1 cm² quartz fluorescence cuvettes (Hellma) under constant stirring.

Acknowledgements

The ComUE Paris Sciences et Lettres (PSL) is acknowledged for financial support to SH. Christine Gaillet and Stéphanie Deville-Foillard are acknowledged for NMR measurements and HPLC, respectively.

Notes and references

- 1 P. L. Carl, P. K. Chakravaty and J. A. Katzellenbogen, *J. Med. Chem.*, 1981, 24(5), 479–480.
- 2 A. Zheng, D. Shan and B. Wang, J. Org. Chem., 1999, 64, 156–161.
- 3 M. Shirangi, M. Najafi, D. T. S. Rijkers, R. J. Kok, W. E. Hennink and C. F. van Nostrum, *Bioconjugate Chem.*, 2016, 27, 576–585.

- 4 J. Sloniec-Myszk, U. Resch-Genger and A. Hennig, *J. Phys. Chem. B*, 2016, **120**, 877–885.
- 5 A. B. Mauger, P. J. Burke, H. H. Somani, F. Friedlos and R. J. Knox, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 3452–3458.
- 6 R. Madec-Lougerstay, J.-C. Florent and C. Monneret, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1999, 1369–1375.
- 7 A. El Alaoui, N. Saha, F. Schmidt, C. Monneret and J.-C. Florent, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 5012–5019.
- 8 Y.-L. Leu, C.-S. Chen, Y.-J. Wu and J.-W. Chern, J. Med. Chem., 2008, 51, 1740–1746.
- 9 A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, F. Schmidt and L. Jullien, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 7492–7509.
- R. Labruère, A. Alouane, T. Le Saux, I. Aujard, P. Pelupessy, A. Gautier, S. Dubruille, F. Schmidt and L. Jullien, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **124**, 9478–9481.
- A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, I. Aujard, S. Dubruille,
 F. Schmidt and L. Jullien, *Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 11717– 11724.
- 12 A. Alouane, R. Labruère, K. J. Silvestre, T. Le Saux, F. Schmidt and L. Jullien, *Chem. – Asian J.*, 2014, 9, 1334– 1340.

- 13 S. Chen, X. Zhao, J. Chen, J. Chen, L. Kuznetsova, S. S. Wong and I. Ojima, *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21, 979–987.
- 14 D. Shan, M. G. Nicolaou, R. T. Borchardt and B. Wang, J. Pharm. Sci., 1997, 86(7), 765–767.
- 15 S. Milstien and L. A. Cohen, J. Am. Chem. Soc., 1972, 94, 9158–9165.
- 16 R. B. Greenwald, Y. H. Choe, C. D. Conover, K. Shum, D. Wu and M. Royzen, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 475–487.
- 17 S. S. Chandran, K. A. Dickson and R. T. Raines, J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 1652–1653.
- 18 M. N. Levine, L. D. Lavis and R. T. Raines, *Molecules*, 2008, 13, 204–211.
- 19 F. Schmidt, J.-C. Florent, C. Monneret, R. Straub, J. Czech, M. Gerken and K. Bosslet, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, 7, 1071–1076.
- 20 M. N. Levine and R. T. Raines, Chem. Sci., 2012, 3, 2412.
- 21 M. A. DeWit and E. R. Gillies, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, 9, 1846–1854.
- 22 G. J. Atwell, B. M. Sykes, C. J. O'Connor and W. A. Denny, *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 371–380.
- 23 C. Frugoni, Gazz. Chim. Ital., 1957, 87, 403-407.

C. Conclusions de l'étude

1. L'apport des données cinétiques au domaine

Les résultats physico-chimiques ont indiqué que les tendances observées dans les cinétiques de cyclisation sont à la fois distinctes et comparables à celle d'élimination. En effet, on note que les dérivés portant des groupements électroattracteurs (bromo et nitro) montrent des cinétiques plus faibles que le dérivé non substitué de référence. Cela tendrait à appuyer à prouver que le faible pKa des dérivés entraine une augmentation de la proportion de phénolate, plus nucléophile; cependant, il n'y a pas d'augmentation de la vitesse de cyclisation car les électrons de l'oxygène sont drainés par le cycle aromatique pauvre (par effet inductif pour le bromo, mésomère pour le nitro). Mais à la différence de l'élimination, le pH ne semble pas jouer un rôle déterminant dans la vitesse de cyclisation, au vu des 2 mesures effectuées sur le nitro. A pH 8, le 2-HPC^{NO2} est majoritairement sous forme phénolate et montre un temps de cyclisation de 15 min. En revanche, à pH 5 où le 2-HPC^{NO2} est exclusivement sous forme phénol, le temps d'auto-immolation est porté à 18 min. On observe ainsi que la différence de cinétique entre les dérivés phénol et phénolate n'est que de 20%. L'écart de vitesse est ainsi 2000 fois moins important ici que dans le même cas en série élimination. On déduit donc que, contrairement à l'hypothèse formulée jusqu'alors, l'introduction d'un substituant électroattracteur en position para n'accélère en rien la vitesse de cyclisation ; c'est même l'effet opposé qui est observé. A l'inverse, la présence du methoxy à la même position semble avoir un impact positif sur la cinétique. Le dérivé 2-HPC^{OCH3} a effectivement montré un τ ($\tau = 1/k_2$) de 3.5 min, contre 5 min pour le dérivé 2-HPC^H. Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse formulée au paragraphe I.3 : l'introduction d'un substituant donneur en para enrichit le cycle aromatique, le phénol en tirant bénéfice et devenant plus nucléophile. On note cependant que cet effet est relativement modeste : le facteur d'accélération n'est que de 1.5, le même facteur en élimination étant de 10. Plus généralement, les effets électroniques ont moins d'influence en cyclisation qu'en élimination, faisant de ce dernier mécanisme le plus modulable. Enfin, on relève que tous les temps de cyclisation sont de l'ordre de la minute, alors que certains espaceurs en série élimination peuvent descendre à l'échelle de la seconde, voire de la milliseconde. L'élimination est donc le processus cinétiquement le plus rapide. Ainsi, nous avons pu démontrer que la cyclisation est en effet plus lente que l'élimination, et que l'hypothèse d'une accélération de la vitesse d'auto-immolation par introduction d'un groupement attracteur n'était pas justifiée. En revanche, cette étude a permis d'établir que le processus se déroule en quelques minutes ; ce qui n'était alors pas clairement démontré. Nous savons aussi à présent que cette cinétique n'est que peu modulable.

Les résultats du trimethyl lock ont montré des résultats similaires : la valeur déterminée est de l'ordre de la minute ($\tau = 3$ min). La cinétique de ce dérivé est par ailleurs très proche de celle relevée pour le 2-HPC^{OCH3} ($\approx 15\%$ de différence en faveur du TML). On a donc pu déterminer que le TML, bien que considéré comme exceptionnellement rapide, possède une cinétique d'auto-immolation proche d'autres dérivés moins courants. On soulignera tout de même que le facteur d'accélération induite par l'introduction des 3 méthyles sur l'acide

hydroxy-dihydrocinnamique (10¹¹ par rapport à la structure sans méthyle) est bien supérieur à celui apporté par les substituants dans le cas des 2-HPC.

2. Travaux complémentaires pour une plus grande compréhension des espaceurs

Bien que cette étude nous ait permis d'élucider certains points essentiels concernant le phénomène d'auto-immolation par cyclisation, d'autres expériences pourraient encore approfondir notre compréhension du processus. En effet, toutes les expériences de déterminations cinétiques ont été effectués à température ambiante (293K). Cela nous a permis d'établir clairement que la cyclisation était plus lente que l'élimination, ce que nous voulions originellement tester. Cependant, les valeurs des constantes cinétiques mesurées ne sont valables qu'à cette température. Il parait logique qu'à 37°C, ces valeurs soient augmentées ; malgré tout une mesure complémentaire à température physiologique est nécessaire pour l'affirmer : pour des applications en milieux biologiques, il faudra déterminer une cinétique à 37°C pour chaque composé.

De même, bien que nous ayons pu déterminer les cinétiques globales des processus de cyclisation, des données plus précise de ce phénomène peuvent être acquises. La cyclisation est en effet la somme de 2 phénomènes : l'étape d'addition et celle d'élimination à partir de l'intermédiaire tétraédrique. Nous tacherons donc de construire les intermédiaires tétraédriques suivants (schéma 67) afin d'établir les cinétiques d'éliminations correspondantes et d'en déduire de fait les vitesses d'additions associées.



Schéma 67 : Formation des intermédiaires tétraédriques 2-HPC et TML pour l'étude des cinétiques d'éliminations

Un autre point à tester pour affiner la connaissance des espaceurs cyclisant basés sur un noyau phénol serait l'étude de la cinétique d'un TML amide (Schéma 68) et sa comparaison avec le dérivé ester correspondant. On peut en effet constater une augmentation du nombre de publications traitant de tels composés, notamment dans les stratégies où un espaceur cyclisant est nécessaire⁷⁹.

⁷⁹ S. U. Hettiarachchi, B. Prasai, R. L. McCarley, J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 7575–7578



Schéma 68 : Modèle envisagé pour l'étude de la cinétique de l'amide, comportant la 7-amino-4trifluoromethyl coumarine comme rapporteur fluorescent

Comme nous l'avons vu, l'apport de ces travaux au domaine des cyclisations est également accompagné de questions complémentaires qu'il conviendra d'éclaircir par la suite. Toutefois, la conclusion personnelle que nous avons tiré de cette étude est de considérer les espaceurs basés sur un mécanisme d'élimination comme plus rapides d'un point de vue cinétique : nous assumons donc avoir choisi de continuer sur ce type d'espaceurs plutôt que de persister sur ces 2 séries.

CHAPITRE 3 : DE LA SIMPLE A LA DOUBLE ACTIVATION, VERS UNE NOUVELLE GENERATION D'ESPACEURS AUTO-IMMOLABLES

I. Limitations des voies d'activation simples et émergence des composés multi-cagés

- A. Molécules masquées à voie d'activations multiples
- 1. Exemples de sondes et prodrogues dans la littérature

Les molécules cagées, que nous définirons comme étant des molécules prodrogues ou profluorophores, ont maintes fois prouvé leur utilité dans les stratégies nécessitant de masquer temporairement l'activité ou la fluorescence de la substance d'origine. Ces composés ne révèlent pleinement leurs propriétés qu'après action d'un signal (chimique, photochimique, enzymatique) spécifique. Pour ces raisons, ces composés ont été largement utilisés par le passé pour permettre de libérer une molécule d'intérêt à un temps donné ou pour permettre une sélectivité accrue pour une cible biologique (capable d'induire le décageage de la molécule cagée) dans le cas de la chimiothérapie. Tout l'enjeu de cette stratégie est de produire une molécule cagée comportant un site activable uniquement (ou tout du moins, essentiellement) au niveau de la cible (bactérie, virus, cellules cancéreuses, ...). Le cas des cancers est particulièrement complexe. En effet, les cellules cancéreuses dérivent des cellules saines et ne diffèrent que de quelques mutations dans le matériel génétique : en résulte un taux de similarité élevé, lequel peut poser un problème dans la recherche de cibles spécifiques. Néanmoins à ce jour, un certain nombre d'enzymes et métabolites surexprimés dans les cellules cancéreuses ont été identifiés dans différentes lignées tumorales, principalement impliqués dans le métabolisme des oses⁸⁰. Plus récemment, les mitochondries des cellules cancéreuses ont retenu l'attention du fait de la concentration élevée de cibles enzymatiques et métaboliques surexprimées au sein de cet organelle⁸¹. Actuellement, les composés cagés se démarquent comme une réelle alternative à l'administration directe de composés actifs, il subsiste encore aujourd'hui un défaut majeur aux stratégies prodrogues appliquées à la chimiothérapie sélective : si certains enzymes et métabolites sont surreprésentés au sein de telles cellules, et donc capable d'activer sélectivement de telles prodrogues, ceux-ci sont parfois exprimés aussi de manière non négligeable par des cellules saines.

La stratégie des molécules cagées ne se limite cependant pas au champs des prodrogues : les stratégies profluorophores ont également suscité l'intérêt des chercheurs ces dernières années⁸². Cette dernière consiste à annihiler (ou bien, à grandement réduire) les propriétés fluorescentes d'un fluorophore pour ne les laisser se dévoiler qu'après activation au site considéré. Cette méthode montre des avantages certains de par sa réponse rapide, sélective et sensible. Actuellement, les profluorophores continuent d'être développés et constituent un outil crucial pour l'imagerie, tant dans le domaine biomédical que dans celui de l'agroalimentaire.

⁸⁰ H. B. Bosmann, T. C. Hall, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 5, 1833-1837

⁸¹ S. Wen, D. Zhu1, P. Huang Future Med Chem. 2013, 5, 1, 53–67

⁸² A. Romieu, Org. Biomol. Chem., 2015, 13, 1294

Un récent exemple témoignant de l'importance accordée aux composés profluorescents concerne l'utilisation d'un profluorophore spécifique des cellules cancéreuses du côlon comme outil pour la chirurgie⁸³. En liant le fluorophore à la N-acétylglucosamine, Urano et son équipe prévoient une activation par hexosaminidase, enzyme surexprimée dans les lysosomes de cellules carcinoïdes, dont celle du côlon. Ainsi, lorsque le tissu sera irradié à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore, les cellules tumorales ayant massivement incorporé et décagé le profluorophore L91 apparaitront fluorescentes (Schéma 69), permettant une meilleure discrimination entre tissus sains et tissus cancéreux.



Schéma 69 : Activation et mode d'action du composé cagé de Urano et al..

Un autre exemple de profluorophore « classique » que nous avons choisi de présenter est celui donné par une équipe du MIT qui s'inscrit clairement dans une démarche de chemobiologie⁸⁴. Radford présente ici le rôle de Zinpyr-1 (dérivé de fluorescéine) dans l'élucidation du devenir du zinc(II) au sein des mitochondries. Par acétylation des 2 fonctions phénols, les auteurs parviennent à neutraliser la fluorescence de Zinpyr-1 (Schéma 70) et prouvent que les esters restent stables au cours du temps. Par ses groupements pyridines, le Zinpyr-1 possède la capacité de lier efficacement les ions Zn²⁺ et donc à s'accumuler dans les compartiments où celui-ci est abondant. Une fois concentré dans un milieu riche en zinc, celui-ci agit comme un acide de Lewis catalysant l'hydrolyse acide des esters protecteurs et libère, de fait, les fonctions phénols menant à l'apparition de la fluorescence. On notera que ce n'est qu'après complexation du zinc que le Zinpyr-1 ne montre pleinement ses propriétés fluorescentes. En comparant l'action de la sonde chez les cellules saines et chez les cellules saines montrent une fluorescence bien supérieure à celles des cellules cancéreuses, qui

⁸³ H. Matsuzaki, M. Kamiya, R. J. Iwatate, D. Asanuma, T. Watanabe, Y. Urano, Bioconjugate Chem. 2016, 27, 973–981

⁸⁴ W. Chyan, D. Y. Zhang, S. J. Lippard, R. J. Radford, PNAS, 2014, 7, 111, 143–148

manifestement perdent la capacité à emmagasiner le zinc. Ce dernier exemple est significatif à plus d'un titre.



Schéma 70 : Mode d'action de la sonde de Radford à double ciblage du zinc (médiateur d'hydrolyse et métal chélaté)

Tout d'abord, il fait appel à une modulation des propriétés physicochimiques du fluorophore (PeT, transfert d'électrons photo-induit) pour augmenter d'avantage le contraste entre la forme non-activée, faiblement fluorescente, et la forme activée, fortement fluorescente. D'autres processus photophysiques peuvent également mis à profil (FRET notamment), mais les systèmes basés sur une conjugaison des électrons π restent privilégiés dans la plupart des cas. D'autres modulations peuvent être considérées pour de tels systèmes afin d'en changer le spectre d'émission : classiquement, les fluorophores utilisés émettent dans le visible (rhodamine⁸⁵, coumarines, fluorescéines) mais d'autres peuvent être modifiés chimiquement

⁸⁵ M. Beija, C. A. M. Afonso, J. M. G. Martinho, Chem. Soc. Rev., 2009, 38, 2410–2433

pour étendre la longueur d'onde d'émission au domaine du proche infra-rouge (BODIPY^{86,87} ou naphthofluorescéines⁸⁸ par exemple).

Le second point à soulever sur les travaux de Radford est l'action double du zinc : celui-ci décage le profluorophore tout en étant substrat de chélation des noyaux pyridines. On peut souligner qu'une seule de ces actions n'est pas suffisante pour obtenir les résultats ici reportés : seul la déprotection des phénols confèrent la fluorescence à la molécule, fluorescence ensuite exacerbée par la suppression de l'effet PeT. Ainsi, même si la sonde ne cible qu'un même substrat (Zn²⁺), la luminescence est conditionnée à la réalisation de 2 conditions.

Un autre point particulièrement étudié dans les sciences biomédicales est la détection de contaminants, notamment les métaux lourds. Le mercure(II) notamment est particulièrement considéré du fait de sa haute toxicité pour bon nombres d'organes. C'est pourquoi des sondes révélant spécifiquement leurs fluorescences en présence de mercure ont été récemment développées. Dans un certain nombre de cas, le mercure est l'unique analyte pris en compte : sa seule présence suffit à induire la fluorescence du composé. Dans l'exemple reporté par Wang et al.⁸⁹, Hg²⁺ induit la désulfuration du profluorophore, formant ainsi un intermédiaire qui aboutit à un dérivé de 7-aminocoumarine par cyclisation. Ce composé semble avoir une réponse spécifique pour le mercure(II) : en effet, sur les 16 métaux lourds testés, seul Hg²⁺ permet une réponse de la sonde. Par ces travaux, Wang et son équipe démontre la possibilité de sonde mercure-spécifique. Sur ce principe, d'autres équipes se sont intéressées à l'élaboration de composés cagés bi-activables, ajoutant une condition supplémentaire à celle imposée par Hg²⁺. Récemment, une équipe a créé une sonde plus spécifique, laquelle complexe sélectivement le mercure(II) et n'émet sa fluorescence que sous irradiation spécifique⁹⁰ : en effet, la complexation du mercure à proximité du fluorophore induit une réponse fluorescente, laquelle est réprimée du fait de l'effet FRET avec le noyau diaryléthène sous forme fermée ; par irradiation, ce cycle peut être ouvert, annihilant le FRET et dévoilant la fluorescence du complexe L92 (Schéma 71). La sonde répond donc bien à 2 conditions que sont le mercure(II) et la lumière, et ce de manière réversible : le changement de longueur d'onde peut permettre de moduler l'ouverture du cycle, activant ou désactivant la fluorescence du complexe. Cela constitue un premier pas vers l'obtention de sondes biactivables pour le suivi de métaux toxiques.

On note une fois de plus que l'effet FRET est insuffisant pour désactiver complètement la fluorescence : celle-ci est atténuée mais toujours présente lorsque le diaryléthène est sous forme fermée.

⁸⁶ H. Lu, J. Mack, Y. Yang, Z. Shen, Chem. Soc. Rev., 2014, 43, 4778

⁸⁷ Y. Ni, J. Wu, Org. Biomol. Chem., 2014, 12, 3774

 ⁸⁸ E. Azuma, N. Nakamura, K. Kuramochi, T. Sasamori, N. Tokitoh, I. Sagami, K. Tsubaki, J. Org. Chem. 2012, 77, 3492–3500
 ⁸⁹ W. Jiang, W. Wang, Chem. Commun., 2009, 3913–3915

⁹⁰ Y. Tang, S. Cui, S. Pu, J Fluoresc, 2016, 26, 1421-1429



Schéma 71 : Principe de la sonde photo-modulable décrite par Pu et al.

Comme nous l'avons vu, la fluorescence potentielle de l'intermédiaire est à prendre en compte, celle-ci créant aussi un signal « parasite ». C'est pour cette raison que plusieurs équipes se sont intéressées à une autre approche consistant à produire in situ la molécule fluorescente rapportrice à partir d'intermédiaires non fluorescence et après une cascade de réactions. En effet, les intermédiaires de réactions ne possèdent pas de fluorescence propre : seule la molécule finale montre les propriétés voulues. Parmi les profluorophores considérés, les dérivés de coumarines et iminocoumarines sont les plus présents dans la littérature : nous nous attarderons donc particulièrement à décrire les travaux les plus représentatifs faisant intervenir ces structures. Song et son équipe⁹¹, par exemple, ont développé une sonde activable en présence d'ions fluorures : le phénol du dérivé profluorophore est en effet protégé en un éther silylé (L93), lequel peut facilement redonner le phénol en présence de F⁻ et ainsi réagir dans une réaction d'addition nucléophile sur le groupement cyano pour donner l'iminocoumarine correspondante (Schéma 72). Notons par ailleurs que bon nombre de structures sont basées sur ce principe. Il en résulte l'apparition d'une forte fluorescence, quasiment absente jusqu'alors, après cyclisation. On a donc ici un système très performant et sensible pour la détection d'ion fluorure, dont une preuve de concept a été réalisée au sein de cellules vivantes.

⁹¹ P. Hou, S. Chen, H. Wang, J. Wang, K. Voitchovsky, X. Song, Chem. Commun., 2014, 50, 320



Schéma 72 : Profluorophore fluoro-sensible menant à la formation de l'iminocoumarine fluorescente

Ce concept a également pu être adapté à d'autres activateurs chimiques, notamment le peroxynitrite⁹², ion oxydant impliqué dans de nombreux phénomènes cellulaires (comme les processus inflammatoires). Dans ce cas, la stimulation de l'inflammation par une toxine bactérienne induit la production de ONOO⁻ qui oxyde le boronate L94, ce qui finit par conduire (après élimination et cyclisation) à la formation d'iminocoumarine fluorescente (Schéma 73). On note que les auteurs ont clairement établi *in vitro* que l'ester de l'acide boronique ne se révèle sensible qu'à l'ion ONOO⁻ et discrimine les autres ROS (par exemple, H₂O₂).



Schéma 73 : Molécule cagée sensible à l'ion péroxynitrite de Kim et al.

Cet aspect est particulièrement pertinent du fait de la difficulté pour un composé cagé répondant à un unique stimulus de rester sélectif ; le signal déclenchant la fluorescence du composé n'étant que rarement propre à la cible. Par exemple, si on considère un profluorophore activable par l'action d'une enzyme particulièrement présente dans une lignée cellulaire donnée, on notera que cette enzyme est seulement surexprimée dans cette lignée : d'autres types cellulaires non cancéreux peuvent également, par action de cette même enzyme, activer le composé cagé et donc libérer le fluorophore. Le contraste entre la cible et son environnement s'en trouvera alors altéré, ce qui peut définitivement

⁹² J. Kim, J. Park, H. Lee, Y. Choi, Y. Kim, Chem. Commun., 2014, 50, 9353

compromettre l'utilisation de la molécule cagée synthétisée. Le domaine des composés cagés s'est donc vu contraint d'évoluer afin de répondre à ces problématiques (Schéma 74), donnant lieu à une diversification des stratégies de cageage/décageage :

- La stratégie d'origine, la plus simple à mettre en œuvre, est celle que nous avons présentée jusqu'ici ; à savoir qu'un signal suffit à recouvrer la fluorescence du composé de départ. Cette stratégie « classique » sera à présent dénommée stratégie de monocageage.
- Une stratégie plus sélective conditionne la révélation du fluorophore à la réalisation de 2 activations : le clivage de A ou de B conduit à un intermédiaire non fluorescent.
 Dans cette stratégie « ET », seule la double activation de A et B libère le composé fluorescent.



Schéma 74 : Différentes stratégies de cageage, avec : 1. Monocageage ; 2. Stratégie « ET », dite aussi de « double activation »

Cette nouvelle stratégie a été créée pour répondre au manque de sélectivité de la méthode de monocageage dans certains cas : en effet, en ne ciblant plus une seule voie d'activation, les composés bi-cagés ont une probabilité plus faible de se voir décager dans un site non spécifique. Au sein de cette classe de molécules masquées récentes, différentes façons de procéder à cette double fonctionnalisation ont été pensées ces quatre dernières années, chacune accompagnées d'une grande variété de voies d'activations associées : nous tacherons de décrire au mieux les exemples les plus significatifs et d'en tirer les conclusions appropriées pour la réalisation de nos propres travaux.

Deux catégories de cageage coexistent actuellement. La première se base sur une modulation des propriétés photophysiques du fluorophore d'origine par des effets PeT et FRET principalement : la présence de ces effets au sein de la molécule cagée annihile la fluorescence tandis que leurs levées permettent aux propriétés fluorescentes de s'exprimer. On dénombre assez peu d'exemples de sondes utilisant ce procédé, mais on peut néanmoins citer l'approche intéressante de Zhang et son équipe publiée en 2015⁹³. Dans cette publication, les auteurs ont décidé de cibler 2 enzymes : d'une part la MMP-2 (matrix metallo-protease), impliquée dans la dégradation du tissu matriciel et reconnue comme jouant un rôle clé dans la formation de métastase ; d'autre part la caspase-3, dont l'expression est caractéristique du stade précoce de l'apoptose. Les substrats enzymatiques correspondant sont liés à des noyaux azobenzènes,

⁹³ S.-Y. Li, L.-H. Liu, H. Cheng, B. Li, W.-X. Qiu, X.-Z. Zhang, Chem. Commun., 2015, 51, 14520

lesquels annihilent par un effet FRET la fluorescence du dérivé de fluorescéine fixé sur un autre site de la molécule (Schéma 75). Sur ce même schéma est illustrée la stratégie mise au point par Zhang : la sonde L95 pénètre dans l'environnement tumoral, ce qui mène à une première activation par MMP-2 et diminue de fait l'effet FRET par perte d'un noyau azobenzène ; dans un second temps, l'intermédiaire est internalisé et activé une deuxième fois par action de la caspase-3, libérant le dernier azobenzène, faisant disparaitre totalement le FRET et révélant la fluorescence de la carbofluorescéine. La caspase-3 n'étant exprimée significativement que lorsque la cellule entre en apoptose, les chercheurs ont stimulé celle-ci par administration de doxorubicine. Les auteurs avancent que leur sonde peut se révéler un précieux atout dans une optique de diagnostic pour identifier les cellules cancéreuses capables de former des métastases et étant sensibles à la doxorubicine. On remarque que l'exploitation des effets FRET et PeT permet de diminuer significativement la fluorescence du composé rapporteur, mais reste cependant incapable de l'éteindre complètement. Particulièrement dans le dernier exemple où la fluorescence de l'intermédiaire est assez importante pour être détectée au microscope, une autre stratégie aurait été possible. En effet, la modulation du FRET est ici le résultat de 2 biotransformations ; ce qui est précisément le principe sur laquelle repose la deuxième catégorie de cageage : la stratégie « turn-on », telle qu'introduite précédemment avec les dérivés de coumarines et iminocoumarines.



Schéma 75 : Profluorophore L95 basé sur un effet FRET, tel que conçu par Zhang et al.

Les profluorophores basés sur cette stratégie utilisent tous des systèmes comprenant une conjugaison des électrons π , lesquels sont générés après une succession de réactions

(bio)chimiques. Dans ce cas, le composé masqué est un fluorophore cagé par 2 groupements sur des positions clés (phénols principalement) interférant ainsi avec la délocalisation des électrons π au sein de cette molécule (Schéma 76).



Schéma 76 : Illustration du concept « turn-on » par l'exemple d'une fluorescéine bi-cagée

Comme on peut le voir sur le schéma ci-dessus, l'avantage de cager un fluorophore en neutralisant la délocalisation de ses électrons π permet de désactiver efficacement la fluorescence jusqu'à la deuxième activation : on a donc bien un système « éteint/allumé », qui présente de nombreux avantages en terme d'augmentation de contraste. Quelques systèmes d'activation en tandem ont été développés ces dernières années pour permettre d'obtenir des profluorophores bi-activables, en accord avec les diverses applications potentielles en imagerie.

Une équipe américaine⁹⁴ a récemment développé une sonde dérivée de la 7-amino-3formylcoumarine pour l'exploration de l'exocytose de neurotransmetteurs sur le principe suivant (Schéma 77) : la sonde L96 internalisée dans les cellules neuronales réagit par sa fonction aldéhyde sur l'amine du glutamate (ici le neurotransmetteur étudié, présent en hautes concentrations) *via* une réaction de Mannich au sein des vésicules de sécrétions, l'adduit ne montrant pas de fluorescence du fait de la fonction sulfamide en position 7 protonée à ce pH (environ 5) ; les vésicules contenant l'adduit sont ensuite excrétées dans la synapse où le pH est neutre et entraine donc la déprotonation du sulfamide, révélant la fluorescence du composé aux paramètres considérées (longueurs d'onde d'excitation et d'émission modifiés après addition du glutamate).

⁹⁴ J. L. Klockow, K. S. Hettie, T. E. Glass, ACS Chem. Neurosci. 2013, 4, 1334–1338



Schéma 77 : Sonde dérivée de 7-aminocoumarine décrite par Glass et al.

Cette approche combinant addition nucléophile et changement d'état de protonation permet une réponse ratiométrique : plus la fluorescence est forte et plus la cellule a exocyté de neurotransmetteurs. On note toutefois que le neurotransmetteur fixé n'est pas nécessairement du glutamate : en effet, même si celui-ci est majoritaire dans la cellule, il n'est pas exclu que d'autres neuromédiateurs (glycine, GABA, ...) puissent réagir par une même réaction de Mannich. Cependant, nous admettrons que la réponse de la sonde reste assez proportionnelle à la concentration de glutamate synaptique, bien qu'une discrimination plus grande pour cette molécule serait souhaitable. C'est en partant de ce constat que les auteurs ont créé une nouvelle molécule cagée, dérivée de la 7-hydroxy-3-formylcoumarine⁹⁵, pour l'étude de la sécrétion de neurotransmetteurs et de zinc(II). Dans cet exemple, Glass et son équipe se sont appuyés sur le dérivé 7-hydroxy de la coumarine, et non le 7-amino : ce choix est justifié du fait que le cycle 5.6.8-trimethylé est commercialement disponible, chaque méthyle apportant une remarquable modification du spectre d'émission et d'absorption ; ce qui a été jugé par les auteurs nécessaire à la sensibilité de la sonde, justifiant le choix du dérivé hydroxycoumarine. Le principe est le même que précédemment (addition du glutamate et déprotonation de la fonction en position 7) mais avec tout de même une différence significative : considérant que seul l'adduit du glutamate est capable de coordonner le Zn²⁺ (Schéma 78), la fluorescence de cet adduit sera particulièrement augmentée ; alors qu'elle restera à un niveau basal pour tout autre adduit, le zinc n'étant pas complexé.

⁹⁵ K. S. Hettie, J. L. Klockow, T. E. Glass, J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 4877-4880



<u>L97</u>

Schéma 78 : Sonde tri-activable pour la détection de co-secrétion Zn²⁺/Glu

Cependant, les auteurs reconnaissent que la déprotonation de la coumarine constitue le principal inconvénient de leur méthode : le phénol est facilement déprotoné et le phénolate résultant montre une forte fluorescence. En définitive, la seule déprotonation de la coumarine suffit à produire un signal sans aucune action du zinc ou du glutamate : avec seulement un facteur 4 entre l'intensité de fluorescence du composé uniquement phénolate et de la molécule tri-activée, l'utilisation de cette sonde ne présente pas une réponse très spécifique. Néanmoins, il reste possible d'acétyler le phénol pour désactiver les propriétés fluorescentes de la coumarine ; le groupement acétyle ayant été reconnu comme sensible à l'hydrolyse catalysée par un acide de Lewis⁹⁶ tel le zinc(II), qui est justement un des activateurs dans la stratégie citée ci-dessus. D'autres exemples de sondes répondant aux pH ont été mises au point par diverses équipes, notamment dans le domaine des matériaux où la sensibilité aux variations de pH est combinée aux changements conformationnels d'azobenzènes induits par irradiation à une longueur d'onde précise^{97,98} ; démontrant ainsi que bien que le pH soit difficilement envisageable comme un signal spécifique *in vivo*, il peut l'être dans d'autres domaines.

On relève également d'autres exemples de sondes mercure-spécifique faisant apparaitre une approche « on/off » cette fois (contrairement à l'approche par modulation des propriétés photophysiques, représenté au schéma 71), associant notamment détection du Hg^{2+} et détection de ROS (espèce réactive de l'oxygène). Les travaux de Churchill sont particulièrement intéressants de ce point de vue. Dans un premier temps⁹⁹, Churchill avait proposé une sonde capable de lier spécifiquement le mercure ; une fois le complexe formé, celui-ci pouvait être aisément oxyder par des espèces réactives de l'oxygène. La méthode, bien que pertinente, possède tout de même quelques faiblesses : la principale étant que le complexe sonde/mercure est oxydé par tous les ROS, mais avait une réponse parfois faible, sauf dans le cas de l'ion superoxyde (O^{2-}) où la réponse est particulièrement forte. Il en découle que la sonde possède une sensibilité faible sauf pour O^{2-} , ion très instable dans nombre de conditions (celui-ci a tendance à réagir pour former d'autres ROS, moins réactif vis-à-vis de la

⁹⁶ K. P. Carter, A. M. Young, A. E. Palmer, Chem. Rev. 2014, 114, 4564–4601

⁹⁷ J. Zhao, Z. He, B. Li, T. Cheng, G. Liu, Materials Science and Engineering C, 2017, 73, 1–7

⁹⁸ J. Broichhagen, J. A. Frank, D. Trauner, Acc. Chem. Res., 2015, 48, 7, 1947–1960

⁹⁹ A. P. Singh, D. P. Murale, Y. Ha, H. Liew, K. M. Lee, A. Segev, Y.-H. Suh, D. G. Churchill, Dalton Trans., 2013, 42, 3285

sonde). Partant de ce constat, Churchill s'est attaché à produire une autre molécule, plus sensible à des espèces réactives de l'oxygène plus commune, comme H₂O₂¹⁰⁰. La sonde L98 repose sur le principe suivant : le dérivé dithiocarbamoyle de fluorescéine est converti en carbamate par l'action de Hg²⁺, lequel est ensuite clivé par l'eau oxygénée pour redonner la fluorescéine native (Schéma 79). On note tout de même quelques sévères défauts à cette stratégie : d'une part, la sélectivité pour le mercure(II) pour cette réaction de désulfuration est ici bien meilleure que pour la plupart des autres métaux, à l'exception du cobalt (tout juste un facteur 3 entre l'intensité de fluorescence entre désulfuration par mercure(II) et cobalt(II)) ; d'autre part, comme montré explicitement sur le schéma, la désulfuration par le biais du mercure produit l'intermédiaire carbamate, mais également une proportion non négligeable de dérivé phénol lequel montre une fluorescence avant même l'action de H₂O₂. On a ainsi une sonde qui peut réagir en l'absence de mercure (par le biais du Co²⁺) ou au contraire sur-réagir avec Hg²⁺ pour donner un intermédiaire à peine moins fluorescent que le composé complètement déprotégé par l'eau oxygéné. On peut donc conclure que cibler spécifiquement le mercure(II) n'est pas toujours aisé ; on remarquera cependant que le ciblage de H₂O₂ est ici très efficace car on observe, fait rare, une sélectivité de la sonde pour l'eau oxygénée par rapport aux autres ROS.



Schéma 79 : Principe de la double activation du dérivé dithiocarbamoyle de Churchill

Pour pousser plus loin le caractère sélectif de l'activation, des profluorophores activables par voie enzymatique ont été développés, notamment par Kim et son équipe^{101,102}. Dans les 2 cas, l'activation se fait par action d'une phosphatase pour cliver le phosphate protégeant le phénol ; la différence venant de la nature de la phosphatase ciblée. Le dernier exemple que nous avons choisi de développer est le travail réalisé par Romieu et Debieu¹⁰³ sur la formation de 7-hydroxy-2-iminocoumarine après une double activation enzymatique. Les auteurs décrivent un précurseur d'iminocoumarine (L99) où l'oxygène en position 2 (en rouge sur le

¹⁰⁰ D. P. Murale, H. Liew, Y.-H. Suh, D. G. Churchill, Anal. Methods, 2013, 5, 2650

¹⁰¹ T.-I. Kim, M. S. Jeong, S. J. Chung, Y. Kim, Chem. Eur. J. 2010, 16, 5297 – 5300

¹⁰² T.-I. Kim, H. Kim, Y. Choi, Y. Kim, Chem. Commun., 2011, 47, 9825–9827

¹⁰³ S. Debieu, A. Romieu, Org. Biomol. Chem., 2015, 13, 10348

schéma 80) est protégé et ne peut pas s'additionner sur le cyano, ce qui est typique de la stratégie discutée jusqu'alors. L'autre point notable est que l'oxygène en position 4 (en bleu) est également protégé : ainsi, il faut à la fois cliver le groupement protecteur en 2-OH pour permettre la formation de l'iminocoumarine ; et il faut également couper le groupement protecteur en 4-OH pour permettre la fluorescence de la coumarine formée *in situ*. Si une seule de ces activations est réalisée, les auteurs ont montré que la fluorescence observée est négligeable. Les auteurs ont ainsi pu montrer la formation de la molécule fluorescente *in vitro* après action de 2 enzymes (nitroréductase et estérase ou peptidase), avançant une potentielle application à la co-détection ou co-localisation enzymatique. On notera par ailleurs la présence dans ce modèle de 2 espaceurs auto-immolables, structures de plus en plus utilisées dans les stratégies de groupements cagés.



Schéma 80 : Précurseurs profluorophores développés par Romieu et Debieu

2. Principales contraintes à la stratégie de bis-activation

Comme nous l'avons vu, de nombreuses stratégies profluorophores ont été mise en place pour pallier les difficultés rencontrées ; la plus notable restant la stratégie de double cageage, autorisant une plus grande sélectivité pour le site ciblé (cellules, tissus, ...). Néanmoins, cette stratégie présente quelques inconvénients en l'état actuel. Comme nous l'avons vu, la modulation indirecte de la fluorescence du composé par des effets PeT et FRET ne se révèle pas toujours suffisante pour désactiver complètement le signal, ce qui cause parfois un bruit de fond assez conséquent. L'approche la plus prometteuse semble être de désactiver totalement la fluorescence de la molécule en neutralisant la délocalisation de ses électrons π . On obtient ainsi un contraste suffisant entre la forme « éteinte », où l'hétéroatome responsable de la fluorescence ne peut plus délocaliser ses électrons du fait du groupement protecteur qu'il porte, et la forme « allumée », où le groupement protecteur est clivé révélant la fluorescence de la molécule. Le décageage du profluorophore est effectué en théorie après une coupure sélective, mais nous avons également vu que ce cas optimal est rarement rencontré : en effet, il semble assez difficile de se contenter d'une seule activation ; un double cageage est souvent profitable. Les deux groupements protecteurs qui vont cager la fluorescence doivent être différents pour ne pas être qu'une stratégie de monocageage, mais là encore se pose la question de ce que doivent être les groupements masquants. A travers les exemples décrits ici, plusieurs voies d'activations ont été mentionnés (Schéma 81), parmi lesquels :

- Le pH : le principe étant de considérer la forme protonée comme la forme protégée de la forme déprotonée fluorescente. On jugera cette approche pas toujours optimale du fait de la difficulté de cibler un pH physiologique particulier.
- L'addition nucléophile : *in cellulo* le nucléophile vient s'additionner sur un carbonyle du fluorophore, modifiant ses spectres d'absorption et d'émission. Comme explicité précédemment, la discrimination se fait surtout par famille (ex : neurotransmetteurs) et devient bien moins apte à sélectionner une structure parmi celle-ci (ex : le glutamate).
- La réaction photochimique : l'irradiation à une longueur d'onde donnée induit un changement de conformation ou une transformation de la molécule. Là encore, malgré des avantages certains (résolution spacio-temporelle, rendement, praticité), l'utilisation dans des systèmes complexes (*in cellulo*) peut se révéler le stade limitant.
- La réaction d'oxydation : particulièrement utilisée pour cibler les ROS, avec une sélectivité pour l'un d'eux (H₂O₂ principalement, par les borates) relativement bonne, et applicable à un certain nombre de types cellulaires (tumorales notamment).
- La réaction enzymatique : l'activateur est un substrat enzymatique, clivé sélectivement par une enzyme particulière. Bien qu'il soit parfois difficile de définir une enzyme caractéristique de la cible et peu présente ailleurs, cette approche est celle montrant la sélectivité la plus élevée.

Les 2 dernières voies d'activations présentent potentiellement les meilleurs avantages en termes de sélectivité et sont assez simples à mettre en œuvre ; ce sont d'ailleurs les stratégies les plus rencontrées à l'heure actuelle du fait des bons résultats qu'elles fournissent¹⁰⁴. Malgré tout, elles impliquent de travailler sur un fluorophore possédant 2 positions cageables, si possible de manière asymétrique et que la neutralisation d'une seule de ces positions supprime la fluorescence. Ce cas est rare ; c'est sans doute la raison qui a amené le développement de l'approche de formation *in situ* du fluorophore, basée notamment sur la formation d'iminocoumarine. Cette méthode constitue sans nul doute l'approche la plus aboutie : elle permet l'introduction de 2 vrais groupements protecteurs orthogonaux, montre un rapport signal/bruit optimal et l'espèce fluorescente formé offre un large déplacement de Stokes ; ce dernier point est très appréciable au vue de la qualité du signal produit. Cependant, la formation *in situ* d'un fluorophore possèdent le désavantage d'être difficile à mettre en œuvre, les synthèses des sondes se révélant parfois peu aisées.

¹⁰⁴ J. B. Grimm, T. D. Gruber, G. Ortiz, T. A. Brown, L. D. Lavis, Bioconjugate Chem. 2016, 27, 474–480



Schéma 81 : Voies d'activations couramment reportées dans la stratégie des groupements cagés ; avec : X, hétéroatome ; GP, groupement protecteur ; R, espèce oxydable

L'inconvénient majeur de cette approche, comme toutes les autres, est sa difficulté à être généralisé : en effet, bien que souvent reportées pour l'imagerie, ces récentes stratégies de cageage sont totalement absentes dans le domaine de la chimie thérapeutique. Ainsi, les exemples ici reportés possèdent un intérêt certain dans l'étude des systèmes biologiques mais cet intérêt se trouve très réduit lorsque l'on considère d'autres champs. En effet, parmi les travaux montrés ci-dessus, des équipes se sont attachés à développer des sondes pour explorer certaines pathologies ; les études ont montré des résultats prometteurs, mais sans possibilités d'y apporter une réponse thérapeutique tout aussi satisfaisante.

Le développement de sondes plus génériques, à la fois utilisables en imagerie et en thérapeutique, est un enjeu actuel du domaine des groupements cagés ; et nous tacherons de proposer une stratégie alternative afin de faire reculer les limitations actuelles.

3. Les espaceurs auto-immolables comme structures polyvalentes

Les espaceurs auto-immolables ont souvent été utilisés pour construire des molécules cagés. On recense ainsi quelques exemples récents d'espaceurs employés comme tel, la plupart monocagés^{105,106}. On dénombre finalement peu de travaux portant sur l'association d'espaceurs auto-immolables à des stratégies de double cageage. Le premier exemple est celui apporté par Chang et son équipe¹⁰⁷ portant sur la double reconnaissance de H₂O₂ et de caspase-8 (Schéma 82). La stratégie des auteurs est de reconstituer *in vivo* la luciférine fluorescente à partir de deux précurseurs : la D-cystéine et l'hydroxy-cyanobenzothiazole. Ces

¹⁰⁵ Y. Meyer, J.-A. Richard, M. Massonneau, P.-Y. Renard, A. Romieu, Org. Lett., 2008, 10, 8, 1517-1520

¹⁰⁶ R. A. Mosey, P. E. Floreancig, Org. Biomol. Chem., 2012, 10, 7980

¹⁰⁷ G. C. Van de Bittner, C. R. Bertozzi, C. J. Chang, J. Am. Chem. Soc., 2013, 135, 1783–1795
deux entités sont elles-mêmes générés après deux stimuli spécifiques (H₂O₂ et caspase-8), induits dans les cellules soumises au processus d'inflammation ; que les auteurs ont ici stimulé par une injection de LPS (lipopolysaccharide, toxine bactérienne).



Schéma 82 : Fluorophore bi-activable dans les tissus subissant inflammation et stress oxydant

Les résultats *in vivo* sont très satisfaisants, mais on notera tout de même le caractère très spécifique de cette sonde : en effet, celle-ci a été construite pour spécifiquement co-détecter ces 2 analytes (l'acide borique pouvant également être remplacé, sans grande incidence), ce qui est précisément le but recherché et celui-ci est par ailleurs parfaitement rempli ; mais cette sonde ne laisse quasiment aucune marge de manœuvre au niveau du fluorophore pour d'autres applications et ne peut de fait pas servir de base à l'élaboration d'autres sondes à partir d'un squelette commun. On remarquera tout de même que ce composé bi-cagé peut très bien être déprotégé par 2 activations, peu importe dans quel ordre celles-ci interviennent. A l'inverse, Hasserodt et Prost¹⁰⁸ ont décidé d'utiliser une approche séquentielle pour leur sonde « pré-pro-fluorescente » (L100), obéissant également à une double activation, enzymatique cette fois. Hasserodt a construit une sonde où le fluorophore est cagé par un substrat enzymatique, lequel cagé par un second substrat d'une autre enzyme (Schéma 83) : ainsi, la première enzyme ciblée (β -galactosidase) doit d'abord cliver la partie glycosidique de l'assemblage pour libérer la leucine afin que celle-ci soit à son tour reconnue par son enzyme (leucine aminopeptidase) ; tout ceci abouti à la libération du fluorophore.

¹⁰⁸ M. Prost, J. Hasserodt, Chem. Commun., 2014, 50, 14896



Schéma 83 : Fonctionnement de la sonde synthétisée par Hasserodt et al.

Cette approche est probablement la plus originale citée jusqu'à présent. Il s'agit de la première stratégie évoquée où le fluorophore peut être modulé en fonction de l'application souhaitée : en effet, la présence du carbamate liant l'espaceur cyclisant à la molécule fluorescente autorise à penser que n'importe quel fluorophore possédant un phénol peut être greffé ; ce qui est un cas beaucoup plus courant que ceux rencontrés jusqu'alors (fluorophore comportant deux fonctions pouvant supporter un activateur chacun, notamment). On note également qu'il n'est pas nécessaire que le phénol provienne d'un fluorophore, Hasserodt et son équipe ont même prédit une possible adaptation au champs des prodrogues. On note néanmoins que si un degré de liberté inédit a pu être obtenu quant à la nature du fluorophore (ou drogue) greffé, il n'en est pas de même pour la nature des activateurs. En effet, l'activation séquentielle oblige l'enzyme 1 (ici la β-galactosidase) à agir avant l'enzyme 2 (ici la leucine aminopeptidase) pour permettre la double activation. Dans l'exemple reporté par Hasserodt, ceci semble être le cas ; cependant, on peut s'interroger sur le cas suivant : si l'ensemble activateur 1/activateur 2 était reconnu par l'enzyme 2, on perdrait alors la double sélectivité au profil d'une seule. De plus, on pointera que la construction d'une sonde comportant 2 activateurs directement liés impose 2 nouvelles conditions : être capable de les lier chimiquement et s'assurer que le clivage du premier donne un deuxième substrat fonctionnel (c'est-à-dire, reconnu par l'enzyme ciblée). On admettra tout de même que cette méthode reste originale et qu'elle introduit au moins la possibilité d'utiliser n'importe quel groupe partant (fluorophore ou drogue), ce qui la rend en ce sens plus générique que les méthodes citées auparavant. En revanche, la double activation séquentielle reste problématique au sens où elle peut s'avérer limitante quant au choix des substrats et à l'existence d'une double sélectivité réelle.

Pour répondre à ces défis et dans le souci d'introduire une diversification des stratégies de bis-activation, nous avons tenté une autre approche en synthétisant une nouvelle classe d'espaceurs auto-immolables.

- B. <u>Conception d'espaceurs auto-immolables à double activation</u>
- 1. Mécanisme d'auto-immolation et hétéroatome initiateur

La base de notre travail repose sur le choix de l'espaceur utilisé. Comme nous l'avions détaillé au commencement, 2 types d'espaceurs sont actuellement décrits : ceux basés sur l'élimination et ceux basés sur la cyclisation. Nous avions également vu au chapitre précédent que la cyclisation offrait une cinétique plus lente ; dans l'optique de produire un espaceur général, et donc adéquat au plus grand nombre de cas possibles (cinétiquement parlant), nous avons donc choisi l'élimination comme mécanisme de nos futurs espaceurs. Parmi les éliminations possibles, la 1.4 et la 1.6 sont les plus courants et ont l'avantage d'être réalisables par le biais d'un unique cycle aromatique (contre 2 minimum pour les éliminations 1.8 et 1.10). Nous avons préféré nous tourner vers l'élimination 1.6 plutôt que 1.4 afin de se prémunir de tout encombrement stérique potentiel entre le rapporteur et les activateurs.

Par rapport à la liaison entre le rapporteur et l'espaceur, nous avons considéré trois fonctions : carbonate, carbamate et éther. Les deux premières ont l'avantage d'être faciles à synthétiser à partir des chloroformates et isocyanates correspondants et sont les fonctions offrant les cinétiques les plus favorables (τ de l'ordre de la seconde) ; elles sont en revanche susceptibles d'être hydrolysées ou dégradées en milieu biologique, c'est pourquoi nous avons choisi de d'abord nous pencher sur la fonction éther, bien plus stable et montrant des cinétiques tout à fait convenables. Le noyau aromatique choisi est le benzène, que nous avons préféré à d'autres noyaux hétéroaromatiques, qui possédaient des vitesses d'élimination plus faibles sans d'autres avantages, tout du moins au moment de la construction de notre modèle.

Enfin, l'hétéroatome sélectionné pour conduire l'auto-immolation sera l'azote. En effet, après le phénol, il est l'initiateur le plus reporté dans la littérature. Le principe de fonctionnement est le même (délocalisation de son doublet électronique sur le cycle aromatique), mais il est capable de former une liaison supplémentaire par rapport à l'oxygène ; on peut donc greffer 2 fonctions à l'aniline correspondant, soit nos 2 activateurs : ceci constituera la base et l'originalité de notre projet. L'ensemble de ces contraintes est récapitulé dans le schéma 84 :



Schéma 84 : Schéma récapitulatif du modèle choisi ; avec R_1/R_2 activateurs, LG groupement partant

2. Fonctions dicarbonylées de l'azote

Partant de la possibilité de préparer des anilines bis N-substituées, nous avons envisager des structures de types dicarbonylées : en effet, à la coupure du premier activateur, on passe d'une aniline tertiaire à une aniline secondaire ; laquelle peut très bien céder son proton et

délocaliser son doublet sur le cycle aromatique, induisant ainsi l'auto-immolation sans la coupure du premier activateur (Schéma 85). Il faudra donc piéger le doublet de cet intermédiaire : comme cela se révèle impossible avec une simple chaine alkyle (cas 1 sur le schéma), nous avons pensé passer par un intermédiaire carbonylé afin de capturer le doublet de l'azote en l'engageant dans une mésomérie avec ce carbonyle (cas 2). On notera que pour respecter l'approche non séquentielle de la bis-activation, où l'ordre de clivage des activateurs n'a aucune conséquence, il est nécessaire que les 2 groupements protecteurs soient des espèces carbonylées : il faudra donc construire un dérivé d'aniline en conséquence.



Schéma 85 : Devenir de l'intermédiaire monoactivé dans le cas 1. de R₂ alkylique ; 2. de R₂, espèce carbonylée

Il existe peu de fonctions carbonylées de l'azote, parmi lesquelles les urées, les amides et les carbamates. Chacune de ces fonctions impose un mécanisme d'activation différent, qu'il nous faudra prendre en compte (Schéma 86) :

- Les carbamates (1 et 2) : l'activation provoque la libération d'un acide carbamique, qui finit par se décarboxyler ; dans ce cas l'activation peut se faire soit directement (1) soit passer par une étape d'élimination (2).
- Les amides et les urées (3) : l'activation ne permet pas de libérer directement l'azote ; une étape de cyclisation est nécessaire.



Schéma 86 : Voies d'activations possibles selon la fonction carbonylée utilisée

Du fait des activations directes basées sur des carbamates, nous avons décidé de retenir ce type d'espèce carbonylé. Il nous a également semblé judicieux d'étudier au moins un espaceur faisant intervenir une étape de cyclisation : comme les amides sont plus répandus, nous avons décidé d'étudier au moins un exemple de bis-amide ; en revanche, les urées ont été écarté du fait que le carbonyle porte deux 2 azotes, nous n'avons aucun moyen de savoir qui de l'azote alkylique ou de l'azote de l'aniline sera le groupement partant dans l'étape de cyclisation.

3. Sélection du groupement partant et des activateurs

Une fois les structures générales des espaceurs déterminées, nous avons dû fixer les groupements protecteurs et le rapporteur de l'auto-immolation. Pour ce faire, nous avons décidé de nous appuyer sur des composés déjà utilisées par notre équipe dans le cadre de la conception d'espaceurs.

Nous avons ainsi considéré 2 rapporteurs (Schéma 87) :

La DDAO, que nous avions déjà employée pour la série cyclisation, et qui présente l'avantage d'avoir un déplacement de Stokes très important (295 nm ; λ_{ex} = 365 nm, λ_{em} = 660 nm), mais dont l'inconvénient est d'être relativement cher. - La 7-hydroxy-4-trifluorométhylcoumarine, qui possède également un déplacement de Stokes conséquent (125 nm ; λ_{ex} = 365 nm, λ_{em} = 500 nm), ce qui est une des raisons de son utilisation intensive (cf. paragraphe I.A.1, iminocoumarine).



Schéma 87 : Rapporteurs de l'auto-immolation ciblés

Parallèlement à leurs avantages respectifs, on notera que les deux fluorophores possèdent une fonction phénol, laquelle peut être engagée dans une liaison éther, voire carbonate si nécessaire.

Pour ce qui est des activateurs, nous avons tout d'abord choisi de conserver le 6-nitrovératryle comme groupement protecteur. En effet, celui-ci présente l'avantage d'être sélectivement clivable rapidement par irradiation à 365 nm, qui est également la longueur d'onde d'excitation de nos fluorophores. Ce dernier point nous permet de fait d'étudier plus en détail la cinétique d'élimination d'un éther à partir de la plateforme 4-aminobenzyle, ce qui n'a encore pas été rapporté. En effet, la coupure rapide du groupement photoactivable permet de générer rapidement l'aniline libre, ce qui devrait nous permettre de déterminer précisément le temps d'initiation de l'élimination, et donc de mesurer la constante d'autoimmolation ; ce raisonnement a déjà été développé, notamment dans le cadre d'autoimmolation des 2-HPC et TML. Pour le second activateur, nous avons décidé d'écarter tout substrat enzymatique pour la preuve de principe pour nous affranchir des problèmes d'activité enzymatique. Nous nous sommes donc tournés vers des activations par voie chimique ou photochimique. En effet, il a été rapporté qu'en introduisant deux groupements photoactivables (clivables à 2 longueurs d'onde différentes), il est possible de couper sélectivement l'un ou l'autre par simple changement de longueur d'onde : c'est le principe de chromoorthogonalité¹⁰⁹. Parmi les différents groupements, deux sont particulièrement compatibles avec une utilisation en tandem avec le nitrovératryle : la 3.5-diméthoxybenzoïne et la 4-méthoxyphénacyle (Schéma 88). En effet, ces 2 groupes sont coupés dans l'UV lointain (respectivement 255 et 283 nm) et ne présentent qu'une faible réponse à la longueur d'onde de photocoupure du vératryle ; ils ont par ailleurs été utilisés avec succès dans l'administration sélective de neurotransmetteurs in vitro¹¹⁰.

¹⁰⁹ P. Klan, T. Solomek, G. G. Bochet, A. Blanc, RI Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, Chem. Rev. 2013, 113, 119–191

¹¹⁰ M. N. Stanton-Humphreys, R. D. T. Taylor, C. McDougall, M. L. Hart, C. T. A. Brown, N. J. Emptage, S. J. Conway, Chem. Commun., 2012, 48, 657–659



Schéma 88 : 2 groupements photoorthogonaux du 6-nitrovératryle

Dans les deux cas, la photolyse libère la fonction engagée dans une liaison avec l'alcool du groupement photoactivable. Considérant l'alcool primaire du 4-méthoxyphénacyle moins encombré que l'alcool secondaire de la benzoïne, nous avons choisi de poursuivre avec ce groupe, qui est de plus commercial.

Parallèlement à cette stratégie de chromoorthogonalité, nous avons décidé de tenter une approche où l'un des groupements serait clivable photochimiquement (nitrovératryle) et l'autre chimiquement. Nous avons logiquement cherché prioritairement dans les groupements protecteurs, capables de masquer un certain nombre de fonctions importantes (alcools, thiols et amines) : notre choix s'est porté sur l'allyle, apte à protéger toutes les fonctions évoquées et à les démasquer efficacement et sélectivement en présence de palladium 0 ou 2.

In fine, nous avons prévu de construire les modèles suivants pour prouver le principe de la double activation utilisant un espaceur auto-immolable (Schéma 89) :



Schéma 89 : Structures générales des bis-carbamates et bis-amides modèles

4. Défis et enjeux

Comme nous l'avions dit, l'enjeu principal est de proposer une alternative aux stratégies précédentes : ainsi, les chercheurs voulant employer une méthode de double cageage pourront choisir la technique la plus adaptée à leur cas. De plus, nous pensons être en mesure

de proposer une approche non séquentielle d'activation, afin de garantir l'indépendance des 2 décageages. On notera également que nous tacherons de décrire un modèle où le groupement partant pourrait être remplacé par un autre aisément ; c'est-à-dire de construire un modèle transposable au concept de prodrogues.

Néanmoins, la stratégie imaginée n'est pas sans poser certains défis. La première difficulté est en série amide : en effet, il faudra s'assurer que l'espaceur cyclisant alkylique est bien fonctionnel ; c'est-à-dire que la cyclisation libère effectivement l'azote par addition du nucléophile sur le carbonyle de l'amide. La seconde et principale difficulté sera de synthétiser les espèces dicarbonylées voulues. Si les bis-amides sont relativement décrits dans la littérature, il en est tout autre pour les bis-carbamates : on trouve principalement des exemples de di-protections d'anilines par 2 groupements BOC¹¹¹. Il nous faudra de plus trouver une voie de synthèse qui nous permettent d'accéder à un bis-carbamate asymétrique, les 2 activateurs étant différents.

Afin de répondre à ces problématiques, de nombreuses voies de synthèses ont été étudiées.

II. Synthèses de dérivés 4-aminobenzyle dicarbonylées

- A. Synthèse de dérivés bis-amides
- 1. Auto-immolation à partir d'un amide aromatique : généralités

Comme dit précédemment, la libération de l'aniline libre à partir de l'amide correspondante sera obtenue après une étape de cyclisation. Il sera donc nécessaire de construire une chaine alkyle capable d'accomplir cette étape de cyclisation. Pour cela, plusieurs options ont été considérées afin de s'assurer du succès de cette étape (Schéma 90) :

- La longueur de la chaine alkyle : ont été principalement utilisés dans la littérature les dérivés d'acide butanoïque et pentanoïque, comportant respectivement 5 et 4 carbones ; qui seront engagés dans une cyclisation formant des cycles, respectivement de 6 et 5 chainons.
- La substitution en α du carbonyle : on a pu voir en effet dans le chapitre précédent que l'introduction d'une gêne stérique avait un effet conséquent sur la vitesse de cyclisation. On tentera donc de moduler cette vitesse en introduisant 2 substituants méthyles en α du carbonyle de l'amide afin d'obtenir l'effet recherché.
- La nature de l'hétéroatome : celle-ci est le point le plus important, et naturellement celui que nous avons considéré en priorité. En effet, il a été maintes fois prouvé que la nature du nucléophile était un point central quant à la vitesse et l'efficacité de la cyclisation dans laquelle il est engagé. De fait, 3 hétéroatomes ont été envisagés : l'oxygène, le soufre et l'azote.

¹¹¹ Y. Basel, A. Hassner, J. Org. Chem., 2000, 65, 20, 6368 - 6380



Schéma 90 : Fonctionnement de l'auto-immolation d'un amide aromatique et modulations de structures envisagées

2. Hétéroatomes nucléophiles

Comme nous l'avions précédemment évoqué, le choix du nucléophile est un paramètre important dans les processus de cyclisation. Nous avons décidé de nous focaliser sur les 3 principales fonctions impliquées dans ce type d'auto-immolation, à savoir : l'alcool, le thiol et l'amine. Chacune de ces fonctions doit pouvoir être générée après une étape d'activation, dont au moins l'une d'entre elles est photochimique. C'est pourquoi nous avons dû dans un premier temps obtenir les 3 dérivés du 6-nitrovératryle contenant ces fonctions. Il est intéressant de noter que n'importe lequel de ces dérivés peut être utilisé pour cager la fonction correspondante ; l'irradiation à 365 nm conduit en effet systématiquement au départ de l'hétéroatome que porte le vératryle^{112,113}, quel qu'il soit (oxygène, soufre ou azote). Le 6-nitrovératryle est donc bien apte à cager et redonner n'importe laquelle des fonctions citées. Nous avons dans un premier temps pensé synthétiser le dérivé bis-amide comportant les 2 groupements photoactivables (vératryle et 4-méthoxyphénacyle) en tant qu'activateurs liés aux chaines alkyles par des liaisons éthers (Schéma 91) ; les 2 dérivés alcools correspondants sont en effet commerciaux.

2 principaux types de réaction seront ainsi exploitées : la substitution nucléophile, pour greffer les dérivés alcools des groupements photosensibles, et l'addition-élimination pour coupler les chlorures d'acyles alkyliques à l'aniline. On note que ce schéma nous impose de passer par l'amide secondaire avant d'arriver au bis-amide : cela nous permettrait d'obtenir l'amide tertiaire substitué par deux groupements distincts.

¹¹² K. Morihiro, T. Kodama, S. Mori, S. Obika, Org. Biomol. Chem., 2014,12, 2468

¹¹³ M. Zindler, B. Pinchuk, C. Renn, R. Horbert, A. Dçbber, C. Peifer, ChemMedChem 2015, 10, 1335 – 1338



Schéma 91 : Schéma rétrosynthétique du dérivés bis-amide diéthers

En prévision de cette étape, nous avons réalisé une expérience modèle pour construire ce type de structure (Schéma 92). Des méthodes de couplage (entre le mono-amide **15** et le chlorure d'acétyle) faisant intervenir des bases faibles (K₂CO₃, NEt₃) et divers catalyseurs (sels d'iode, DMAP) ont été évidemment testées, sans aucun résultat. C'est pourquoi il a semblé nécessaire de déprotoner l'amide afin de le rendre suffisamment réactif et permettre le couplage. Le rendement de la réaction est modeste comparé à ce qui est reporté dans la littérature (50-60% en moyenne), mais elle permet tout de même de former le bis-amide dans des conditions relativement simples à mettre en œuvre.



Schéma 92 : Modèle de formation d'un bis-amide par utilisation d'une base forte

Après la réalisation de ce modèle, nous avons tenté de synthétiser le dérivé bis-amide d'intérêt. Dans un premier temps, nous avons voulu protéger la fonction alcool benzylique par différents groupements afin d'obtenir une variété d'anilines protégées sur l'oxygène (Schéma 93) compatibles avec plusieurs types de conditions expérimentales. On note que la protection par le groupement allyle fournit un rendement très moyen (40% pour la protection du paranitro et la réduction en aniline). La protection par un groupement tert-butyle montre un rendement nettement plus élevé tout en aboutissant à une aniline dont l'alcool benzylique est efficacement protégé : en effet, le groupement tBu est réputé très résistant à de nombreuses conditions et peux être efficacement retiré en présence d'acide de Brønsted ou d'acide de Lewis. On remarque que c'est la raison pour laquelle le composé **11** n'a pas pu être réduit par le chlorure d'étain(II), celui-ci produisant du chlorure d'étain(IV) qui entraine la déprotection de l'alcool benzylique. Il a donc fallu réduire le nitro par d'autre méthode ; seule l'hydrogénation catalytique dans le THF s'est montré efficace. On remarque enfin que le solvant de l'hydrogénation est assez peu commun : en conditions standards (dans le MeOH ou EtOH), le produit obtenu est majoritairement la para-toluidine (réduction de la fonction alcool benzylique en méthyle). Enfin, la dernière protection de la fonction alcool que nous avons testée combine les avantages d'avoir un haut rendement d'être simple à mettre en œuvre. En effet, comme la protection de l'alcool par un éther silvlé est sélective, nous avons pu la réaliser directement à partir de l'alcool 4-aminobenzylique (commerciale). Si la suite de la synthèse ne montre pas de dégradation de cette fonction, c'est a priori avec le dérivé 13 que nous continuerons.



Schéma 93 : Obtention des alcools 4-aminobenzyliques protégés

La première étape de notre synthèse est d'acyler les anilines précédemment obtenues par le chlorure d'acide 4-chlorobutyrique (Schéma 94). Les réactions d'acylations dépassent les 97% de rendements dans tous les cas, permettant l'obtention des mono-amides correspondants. Ainsi, le dérivé acylé de l'aniline **13** reste le composé le plus accessible de la synthèse, avec un rendement quantitatif sur 2 étapes : pour les raisons citées précédemment, il sera notre dérivé privilégié pour les essais de couplage avec l'alcool de 6-nitrovératryle.



Schéma 94 : Acylation des composés 10, 12 et 13

C'est à partir de cette étape que nous avons rencontré nos premières difficultés, la SN2 entre l'alcool du vératryle et le chlorure d'alkyle précédemment obtenu s'étant montrée particulièrement difficile. Le premier essai réalisé est relaté dans le schéma 95 : à une solution d'amide **24**, nous avons introduit l'alcool de 6-nitrovératryle, utilisant la triéthylamine comme base. Devant l'absence d'avancement après 12h, nous avons décidé d'introduire une quantité catalytique d'iodure de potassium pour 12h supplémentaire, sans plus de résultat. Nous avons alors formulé l'hypothèse que l'alcool benzylique n'était pas assez nucléophile pour réagir sur la chaine butyryl. Néanmoins, le remplacement de la triéthylamine par de l'hydrure de sodium (formant ainsi l'alcoolate de vératryle) n'a pas montré non plus l'apparition d'un nouveau produit.



Schéma 95 : Tentative d'éthérification du composé 24

Ensuite, nous avons pensé qu'augmenter la nucléophilie du vératryle n'était pas suffisant : il nous faudrait également augmenter la réactivité de l'électrophile, en changeant le chlore par

un autre halogène ayant un caractère nucléofuge plus marqué. Comme le chlorure d'acide 4bromobutyrique est commercial (contrairement au dérivé iodé), nous avons décidé de tenter la même approche que précédemment à partir du dérivé bromé (Schéma 96). Malgré tout, l'alcoolate de vératryle n'a pas plus réagit sur le dérivé bromé **25** que sur le chloré **24**. Notons que pour les 2 approches citées précédemment, solvants et températures ont été modifiés sans le moindre succès à ce jour.



Schéma 96 : Tentative d'éthérification à partir du bromure de butyryle

Nous avons choisi pour la suite de changer de stratégie pour le couplage entre l'halogénure d'alkyle et le vératryle en optant pour une approche convergente : nous avons cherché à coupler l'alcool vératryle à une chaine alkyle, afin qu'il soit par la suite converti en chlorure d'acyle et mis à réagir avec l'aniline **13** pour donner l'amide désiré. Plusieurs tentatives ont été réalisées (Schéma 97) sans que le résultat ne soit à la hauteur de nos espérances. La plupart des conditions testées n'ont montré aucune réaction, peu importe le solvant, le temps ou la température de réaction. On a pu cependant observer des changements dans des conditions particulières, toutes menant à des produits secondaires : lorsqu'une base forte a été employée (NaH, LDA, *t*BuOK), on obtient une large proportion du produit de transestérification entre le 4-chlorobutyrate de méthyle et l'alcool de 6-nitrovératryle ; de même que l'utilisation de dérivé d'argent(I) (Ag₂O ici) conduit systématiquement à la dégradation du butyrate en une multitude de sous-produits, donc aucun n'est celui attendu, à toutes les températures testées (de 0°C au point d'ébullition du solvant). De même, le remplacement du 4-chlorobutyrate par le 4-bromobutyrate comme réactif n'a pas donné de résultats concluants.

On a tout de même relevé une trace de produit lorsque mis en réaction avec le vératryle à température ambiante dans l'acétonitrile et en présence d'Ag₂O. Partant de l'hypothèse qu'une température plus élevée accélèrerait la vitesse de réaction et fournirait plus de produit, nous avons progressivement chauffé, relevant ainsi une dégradation rapide et conséquente du produit à partir de 60°C, celui-ci n'ayant pu être obtenu pur du fait du nombre de produits secondaires.



Schéma 97 : Tentatives d'éthérifications du 4-chlorobutyrate de méthyle

Devant la difficulté à mener à bien cette réaction d'éthérification, nous avons décidé d'essayer avec un meilleur nucléophile qu'un alcool primaire ; nous avons sélectionné une amine secondaire, la vératrylamine **26**. Celle-ci n'étant pas commerciale, nous avons dû la synthétiser. On notera que, pour éviter toute sur-réaction de l'amine autant que pour éliminer tout proton labile de la structure finale, nous avons choisi de synthétiser la monométhyle vératrylamine (composé **26**, schéma 98). Le bromure de 6-nitrovératryle commercial est ainsi mis à réagir avec une solution de méthylamine en excès, pour donner la monométhyle vératrylamine **26** avec un excellent rendement. On note également la formation de l'alcool de 6-nitrovératryle, produit d'hydrolyse du dérivé bromé. On admettra cependant que cette méthode a l'avantage de produire rapidement et en grande quantité le composé **26** voulu.



Schéma 98 : Synthèse du dérivé 27, portant l'activateur vératryle et la chaine alkylique

Celui-ci réagit ensuite sur le 4-bromobutyrate de méthyle pour former l'amine tertiaire **27**. La présence d'iode s'avère ici nécessaire et préférable à d'autres catalyseurs (DMAP notamment) pour mener la réaction à bien. De même, seul le dérivé bromé du butyrate permet d'obtenir un tel rendement ; la même réaction avec l'équivalent chloré n'ayant donné que des traces de **27**.

Après avoir finalement obtenu un composé issu du couplage entre le dérivé vératryle Nméthylaminé **26** et un bromure d'alkyle, nous avons tenté une saponification pour obtenir l'acide correspondant ; lequel pourrait ensuite être couplé à l'aniline **13** pour donner un premier mono-amide. Cependant, il ne nous a pas été possible d'obtenir l'acide correspondant de **27** par une méthode de saponification classique : en effet, le produit de saponification est amphotère, et ce à n'importe quel pH ; il nous a donc été impossible de l'extraire de la phase aqueuse (Schéma 99).



Schéma 99 : Saponification de l'ester méthylique par hydroxyde de lithium

Devant ce constat, nous avons décidé d'employé une méthode de clivage de l'ester en milieu anhydre (Schéma 100). L'attaque du silanolate (stœchiométrique) produit l'ester de triméthylesilyl correspondant, expulsant le méthanol qui vient ensuite attaquer le groupement TMS pour former le méthoxytriméthylsilane et libérer le carboxylate. On obtient normalement après séchage le carboxylate de potassium voulu ; ce qui n'est pas notre cas. On observe en effet un clivage partiel seulement de l'ester, laissant un excès de TMSOK dans le milieu, non séparable du carboxylate voulu.



Composé 27

Schéma 100 : Tentative de clivage de l'ester par un silanoate

Comme il apparaissait complexe d'obtenir ce carboxylate, nous avons tenté une autre approche pour pallier ce problème; celle déjà tentée auparavant dans les réactions d'éthérifications (Schéma 101). Malgré toutes les conditions testées, aucune n'a donné le produit en quantité significative; seule l'utilisation d'oxyde d'argent(I) dans l'acétonitrile à température ambiante a montré une formation très limitée de produit, qui n'a pas pu être isolé.



Schéma 101 : Essais d'amination du composé 25

Nous avons finalement cherché à synthétiser le dernier dérivé du vératryle, comportant le soufre comme hétéroatome (ou thiovératryle). Pour cela, nous avons procéder en 2 étapes : premièrement, nous avons fait réagir le bromure de 6-nitrovératryle avec du thioacétate de potassium pour former le thioester de benzyle correspondant ; puis nous avons tenté une méthanolyse acide pour récupérer le thiol libre (Schéma 102). Le produit obtenu s'est révélé extrêmement instable, à tel point qu'il s'est rapidement dégradé en une multitude de sous-produits (probablement d'oxydations diverses du thiol) avant que l'on ait eu confirmation de sa structure. Comme il semblait peu probable que les conditions de couplage thiovératryle/halogénure d'alkyle soient déterminées au premier essai, et au vu de l'instabilité de ce dérivé du vératryle, nous n'avons pas insisté davantage dans ce sens.



Schéma 102 : Procédure suivie en vue de l'obtention du thiol de 6-nitrovératryle

3. Conclusions et perspectives rapport aux bis-amides

Nous avons pu voir à travers ces 2 derniers paragraphes que la synthèse d'un dérivé bis-amide n'a pas pu être menée à bien. On a cependant pu relever un certain nombre d'informations relatives à cette série. Il semble en effet que l'obtention de la fonction bis-amide soit relativement aisée à partir des mono-amide et chlorure d'acyle correspondants, sous l'action d'une base dure (Schéma 92) ; cette méthode ayant même conduit à l'obtention d'un hybride N,N-amide-carbamate (Molécule **17**, Schéma 103). De façon surprenante, l'étape limitante dans cette série est l'obtention du mono-amide : dans le cas de l'alcool de vératryle la SN2 n'a pu aboutir, malgré les nombreuses tentatives ; dans le cas de la vératrylamine, le caractère amphotère du produit n'a pas permis d'obtenir la chaine fonctionnelle ; dans le cas du thiol le

dérivé n'a pas pu être stocké suffisamment longtemps pour permettre des essais de couplage. Aucune chaine alkyle n'ayant pu être substituée par un dérivé vératryle, il ne nous a pas semblé utile de modifier celles-ci (longueurs de chaines, introduction de substituants en α du carbonyle de l'amide).



Schéma 103 : Bis-carbonyle hybride synthétisé par notre méthode

N'ayant pas obtenu le précurseur nécessaire, une question demeure : l'effectivité de la cyclisation alkylique. En effet, nous n'avions aucune garantie qu'une chaine alkyle (peu importe l'hétéroatome, la longueur de chaine ou la substitution en α) permette une cyclisation libérant l'azote de l'aniline après déprotection (Schéma 104). N'ayant pas eu la possibilité de pouvoir répondre à cette question, et devant la difficulté d'obtenir une structure qui permettrait d'y répondre, nous avons pragmatiquement décidé de reporter ces problématiques à une date ultérieure.



Schéma 104 : Cas de figure possible après déprotection du précurseur amide

Il reste néanmoins une structure à tester, qui n'avait pas été évoquée jusqu'alors : celle-ci fait intervenir un triméthyl-lock amide en lieu et place de la chaine alkyle. Le TML a l'avantage d'être facile d'accès (le précurseur a d'ailleurs été synthétiser par notre équipe) et d'être reporté dans les processus de cyclisation faisant intervenir un amide aromatique¹¹⁴ (Schéma 105). Un exemple similaire nous permettrait éventuellement de produire un bis-amide fonctionnel, ce que nous nous attacherons à faire prochainement. Nous allons maintenant nous intéresser davantage aux bis-carbamates, autre série que nous avions considéré comme plateforme de double activation.



Schéma 105 : Dérivé 4-aminobenzyl amide faisant intervenir une structure TML, tel que décrit par McCarley et al.

- B. Synthèses de dérivés bis-carbamates
- 1. Obtention du bis-carbamate portant 2 substituants différents

Les bis-carbamates sont des structures peu communes et peu reportées dans la littérature. En effet, très peu d'exemples ont été décrits comme nous l'avions dit ; la plupart concernant le greffage de 2 groupements Boc (Schéma 106). Cette méthode, quoi qu'intéressante, présente le défaut de mener à un bis-carbamate symétrique (L102) ; or, si on veut pouvoir construire un espaceur bi-activable il est nécessaire de construire un carbamate portant 2 substituants différents. Il nous faudra donc trouver une méthode pour pouvoir séquentiellement construire un N,N-bis-carbamate.



Schéma 106 : Réaction de di-protection d'anilines pas un groupement Boc, telle que décrite par Hassner³²

¹¹⁴ S. U. Hettiarachchi, B. Prasai, R. L. McCarley, J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 7575–7578

La première stratégie que nous avons tentée consiste à d'abord construire le mono-carbamate avant de le faire réagir sur un chloroformate (bien plus facile d'accès que l'anhydride correspondant et plus réactif) en présence d'une base et éventuellement d'un catalyseur (Schéma 107).



Schéma 107 : Première voie proposée pour l'accès au motif bis-carbamate

La première étape a consisté à former le mono-carbamate de nitrovératryle à partir du chloroformate correspondant. L'utilisation de DMAP s'est avérée nécessaire du fait du manque de réactivité inattendu du chloroformate de 6-nitrovératryle. Les conditions optimisées permettent néanmoins l'obtention du carbamate 14 avec un rendement très correct (92%). L'étape de seconde carbamoylation a en revanche posé plus de difficultés. On a en effet relevé une absence de réaction même à haute température à laquelle s'ajoute une dégradation du mono-carbamate 14 lorsque le milieu est chauffé au-delà de 80°C. Aucun solvant ne semble apporter un quelconque avantage pour l'avancement de la réaction ; de même que la présence de catalyseur (parfois introduit en quantité stœchiométrique). Si on peut raisonnablement penser que la température et l'addition de catalyseurs nucléophiles sur le chloroformate sont sensés augmenter sa réactivité, il semble que cela soit insuffisant pour permettre la formation du produit. A la suite de cela, nous avons décidé de renverser la stratégie : plutôt que de former le chloroformate de 4-méthoxyphénacyle (MPA) à partir de l'alcool correspondant et de phosgène pour ensuite le faire réagir sur le carbamate 14, nous avons essayé de faire réagir le carbamate sur le phosgène avant d'additionner l'alcool MPA. Supposant le phosgène plus réactif et surtout utilisable en large excès, nous avons espéré former le composé bi-fonctionnel carbamate/chlorure de carbamoyle (Schéma 108). On note qu'un tel intermédiaire est vraisemblablement très sensible à l'hydrolyse, c'est pourquoi nous n'avons pas tenté de l'isoler. Le mono-carbamate 14 a été mis en solution dans du DCM avant qu'un large excès de phosgène ne soit ajouté. Cependant, même après 24h à t.a, puis 24h supplémentaire à 40°C, aucun changement indiquant la conversion du carbamate n'a pu être

observé (par CCM après neutralisation par MeOH), ce qui nous a contraint à renoncer à ajouter la MPA.



Schéma 108 : Essai de bis-carbamoylation passant par un chlorure de carbamoyle de carbamate

N'ayant pas réussi à obtenir le bis-carbamate à partir du mono, nous avons tenté une approche complètement différente pouvant potentiellement permettre la construction de carbamates disubstitués. Il avait été reporté par Barany et son équipe la synthèse de bis-halogénures de carbamoyles¹¹⁵, les 2 chlores pouvant par la suite être éliminés par l'addition d'un nucléophile. Cet exemple de fonction est particulièrement intéressant sur le principe, car elle pourrait en effet permettre d'accéder à une structure bis-carbamate (Schéma 109). Cependant, il n'est pas évident d'obtenir un bis-carbamate asymétrique par cette voie, par ailleurs singulièrement complexe à mettre en œuvre.



Schéma 109 : Synthèse de bis-halogénure de carbamoyle par la méthode de Barany

En cherchant des stratégies analogues à celle-ci, nous avons finalement pu retrouver un protocole décrivant l'accès à un bis-halogénure de carbamoyle mixte, c'est-à-dire dont les 2 halogènes sont différents¹¹⁶ (Schéma 110). En admettant que le chlorure de carbamoyle est plus réactif que le fluorure, on peut s'attendre à d'abord remplacer le chlore par le premier alcool (vératryle ou MPA) avant de remplacer le fluor par le second alcool en les introduisant séquentiellement. L'utilisation d'une source d'ions fluorures nous a contraint à ne pas utiliser l'aniline **13** dont l'alcool benzylique est protégé par un éther silylé : nous avons donc utilisé les dérivés **10** et **12**, comportant respectivement un groupement protecteur allyle et *tert*-butyl. La procédure de formation des bis-halogénures de carbamoyles (Schéma 110) commence par la réaction du phosgène sur l'aniline, l'excès de phosgène étant ensuite évaporé en même

¹¹⁵ G. Barany, A. L. Schroll, A. W. Mott, D. A. Halsrud, J. Org. Chem. 1983, 48, 4750-4761

¹¹⁶ FR2220513DE2311662

temps que le solvant. Le chlorure de carbamoyle résultant est ensuite converti en isocyanate par action d'une base faible (NEt₃) puis mis en réaction avec du fluorure d'hydrogène en solution dans la pyridine, source de F⁻ anhydre. Le fluorure de carbamoyle est ensuite obtenu après séchage puis mis en présence de phosgène et pyridine pour donner le bis-halogénure. Bien qu'ayant suivi cette procédure à la lettre, aucun des 2 dérivés bi-halogénés n'a pu être obtenu : la synthèse à partir de l'aniline **10** ayant montré une dégradation significative à l'étape de fluoration (il s'avèrera que la double liaison de l'allyle a réagi avec le HF qui a abouti à la formation du fluorocarbure correspondant), et le dérivé **12** n'ayant tout simplement pas formé le produit d'intérêt.



Schéma 110 : Procédure suivie pour l'obtention de bis-halogénures de carbamoyles

Nous avions à ce moment supposé que le fait d'isoler les dérivés carbonylés à chaque étape accroissait le risque de perte par hydrolyse, c'est pourquoi nous avons décidé de réaliser les 4 étapes « one-pot » sur l'aniline **12** ; sans plus de succès. Nous avons supposé que la procédure suivie ne présentait pas de difficulté particulière jusqu'à l'obtention du fluorure de carbamoyle ; les étapes de carbamoylation, formation de l'isocyanate et addition du F⁻ sont en effet relativement classiques ou bien décrites dans la littérature¹¹⁷. Nous avions donc incriminé la dernière étape, celle de la fixation de phosgène par le fluorure de carbamoyle. Afin de renforcer la réactivité de la fonction carbamate, nous avons fait le choix d'appauvrir l'aniline en électron ; ce qui dans le même temps augmenterait l'acidité du carbamate, rendant le départ du proton plus aisé. Nous avons donc remplacé l'éther benzylique par une fonction aldéhyde : celle-ci, en tant que groupement attracteur mésomère devrait renforcer la labilité du proton carbamate, tout en restant compatible avec les conditions utilisées (Schéma 111).

Cependant, le produit n'a pas pu être obtenu ; en procédant étape par étape autant qu'en « one-pot ». Nous avons alors considéré cette voie de synthèse comme peu prometteuse pour la réalisation de notre projet.

¹¹⁷ G. A. Olah, J. T. Welch, Y. D. Vankar, M. Nojima, I. Kerekes, J. A. Olah, J. Org. Chem., 44, 22, 1979



Schéma 111 : Tentative de bis-halogénation du 4-aminobenzaldéhyde

2. Nouvelle approche et structure cible

Au travers de ces dernières pages, nous avons souvent remarqué qu'il était extrêmement difficile de faire réagir un mono-carbamate sur un électrophile, du fait de sa faible réactivité. De plus, il apparait que l'emploi d'une base faible s'avère totalement inefficace dans ce genre de réaction. Nous avons donc décidé de reprendre la méthodologie de formation des bisamides à l'aide d'une base forte et de l'adapter aux bis-carbamates. Nous admettons n'avoir pas considéré cette idée dans un premier temps, du fait de l'instabilité potentielle des carbamates secondaires en milieu basique (Schéma 112). En effet, l'anion du carbamate L107 peut potentiellement réagir en éliminant l'alcoolate de R (activateur quelconque) et former un isocyanate (L108).



Schéma 112 : Elimination de l'alcoolate du carbamate sous l'action d'une base forte

Si la réaction est parfaitement réversible, il n'en reste pas moins une question majeure : si on introduit le chloroformate du second activateur, celui-ci sera-t-il attaqué par l'anion carbamate ou par l'alcoolate ?

Cela dépendra en fait de la proportion de l'un et l'autre et de leurs réactivités respectives : si, comme nous le redoutions, l'ajout d'une base entraine le retour à l'isocyanate L108 et la formation d'alcoolate, nous verrons la réaction de celui-ci sur le chloroformate introduit pour donner le carbonate d'activateurs ; si en revanche l'anion carbamate est majoritaire ou plus réactif, celui-ci pourrait réagir sur le chloroformate pour donner le bis-carbamate souhaité L109 (Schéma 113).



Schéma 113 : Cas de figures possibles à partir de l'anion carbamate et son isomère

Nous avons décidé de tester cette méthode sur des structures modèles (schéma 114), en partant de l'aniline **13**. Le carbamate de méthyle **19** a pu être obtenu avec un très bon rendement par réaction de l'aniline sur le chloroformate de méthyle. Ce mono-carbamate a ensuite été engagé dans une première réaction utilisant une quantité stœchiométrique de chloroformate de méthyle et de base forte (LDA). Le milieu a été maintenu à 0°C pendant l'intégralité de la réaction pour prévenir d'éventuelles dégradations. On a ainsi obtenu le bis-carbamate de méthyle **20** avec un rendement tout à fait acceptable (65%).

Etonnamment, aucune trace d'aniline **13** n'a été détectée, signifiant l'absence d'isocyanate de **13** et incitant à penser que la réaction conduisant à la libération de l'alcool n'a pas eu lieu.

Après ce premier succès, nous avons jugé utile de réaliser un essai supplémentaire utilisant un chloroformate plus complexe que le chloroformate de méthyle : pour des raisons évidentes, le chloroformate de 6-nitrovératryle a été choisi pour le second test.

La réaction a été conduite dans les mêmes conditions, excepté pour le temps de réaction (sur une nuit ici, le chloroformate de vératryle se montrant bien peu réactif).

Le composé **21** a ainsi pu être obtenu avec plus de 50% de rendement.



Schéma 114 : Premiers bis-carbamates obtenues grâce à l'utilisation d'une base forte

Ensuite, nous avons désiré obtenir le dérivé bis-carbamate contenant les deux groupements photoactivables. Nous sommes pour cela parti du mono-carbamate de vératryle **14** auquel nous avons appliqué la même méthode (Schéma 115) sans réussir à réitérer le succès des 2 premiers essais : le produit n'a pu être formé dans ces conditions.



Schéma 115 : Réaction de bis-carbamoylation impliquant l'alcool MPA

Cet échec nous a amené à remettre en question les paramètres de la réaction : il nous a été évident que celle-ci devait être améliorée, et c'est pourquoi nous avons décidé d'optimiser chaque point de la réaction. L'alcool MPA étant relativement cher et difficile à obtenir (délai de livraison conséquent), nous avons pris la décision de ne pas le gaspiller dans les nombreux

tests qui ont suivi. Par conséquent, nous nous sommes concentrés sur l'activateur clivable par voie chimique que nous avions imaginé au début de ce chapitre : le carbamate d'allyle. On note par ailleurs que celui-ci peut être facilement formé à partir du chloroformate d'allyle commercial. L'orthogonalité devrait être respectée, l'allyle n'étant pas connu comme photosensible et le vératryle ne réagissant pas avec les espèces de palladium (0 et 2).

- C. <u>Résultats et perspectives</u>
- 1. Synthèse du bis-carbamate modèle

Nous avons donc commencé par synthétiser le mono-carbamate d'allyle **28** par réaction entre l'aniline **13** et le chloroformate d'allyle en présence d'une base organique (DIEA). Une fois **28** obtenu, il nous a fallu mettre au point la réaction permettant d'accéder simplement et efficacement au bis-carbamate fonctionnel (schéma 116).

Pour cette réaction, nous avons décidé dans un premier temps de ne pas essayer d'autre solvant que le THF : en effet, au vu des bases utilisées, la plupart des solvants (DCM, toluène, CH₃CN notamment) ne pourront pas être utilisés ; de plus, nous avons considéré que d'autres solvants ne nous apporteraient pas d'avantage en terme de solubilité (notamment pour le DMF) ou de dispersion de charge (notamment pour l'éther diéthylique et le 1.4-dioxane).

Nous avons focalisé notre attention sur la température de réaction au cours du temps. Il s'est avéré que l'introduction de la base devait nécessairement être faite à -78°C afin d'éviter toute dégradation du produit de départ.

De même, il est également préférable de laisser incuber la solution de mono-carbamate avec la base avant d'introduire le chloroformate de vératryle (l'approche « one-pot » n'ayant rien donné). Notons que le temps d'incubation est différent selon les bases employées, pouvant aller de quelques minutes (*n*BuLi et LDA, en solution) à plus d'une heure (NaH et *t*BuOK, solides), afin de former le maximum d'anion carbamate possible. Un changement de couleur de la solution indique par ailleurs l'avancement de cette étape de déprotonation ; nous avons considéré que l'absence d'évolution de la couleur corrélait à la déprotonation totale du carbamate.

Pour ce qui est de la température de réaction, nous avons remarqué que la réaction était incomplète lorsque conduite intégralement à -78°C, alors qu'on observait une multitude de sous-produits lorsque le milieu était ramené trop rapidement à température ambiante. Pour faire le compromis entre la faible réactivité à -78°C et la préservation des espèces en solution menacée à t.a, nous avons décidé de laisser la suspension revenir à t.a sur plusieurs heures.

Pour ce faire, le milieu a été amené à -78°C par un bain carboglace/acétone et ramené à t.a après sublimation totale de la carboglace. On observe dans ce cas-là un avancement plus important de la réaction. Le corolaire de cette nécessité de réchauffer très lentement la solution est un temps de réaction long (sur une nuit).



Schéma 116 : Formation successive des mono et bis-carbamates 28 et 29

Il nous a fallu après ceci régler la question de la base employée, chacune ayant donné des résultats très différents. Le butyllithium est bien trop nucléophile pour être adapté à la situation, s'ajoutant visiblement sur plusieurs sites du mono-carbamate 28. Ce caractère nucléophile est très largement atténué dans le cas de la LDA, mais pas tout à fait éradiqué (notamment au niveau du chloroformate de vératryle, s'additionnant sur celui-ci). Dans le souci de fournir une base forte non nucléophile, nous avons tenté d'utiliser de l'hydrure de sodium mais son utilisation n'a pas donné les résultats escomptés : de par la faible quantité employée, l'action du NaH insoluble se faisant sur une surface limitée, la déprotonation du carbamate s'est avéré très peu efficace. Après avoir également essuyé un échec avec l'emploi de tBuOK comme base (trop faible), nous avons décidé d'utiliser une base moins commune mais ayant l'avantage de combiner une faible nucléophilie, une bonne solubilité à -78°C et un pKa suffisamment élevé pour déprotoner efficacement le carbamate (pKa = 26) : le bis(triméthylsilyl)amidure de potassium (KHMDS). L'utilisation de cette base a en effet permis d'obtenir systématiquement des quantités significatives de produit. Enfin, nous avons également remarqué que les rendements les plus élevés ont été atteints en travaillant avec un léger excès de mono-carbamate et de KHMDS par rapport au chloroformate de vératryle (1.2 eq) à une concentration comprise entre 0.3 et 0.5 M. Le bis-carbamate 29 a ainsi été obtenu avec un rendement de 60% après purification, ce qui nous a permis de poursuivre la synthèse. L'étape suivante est la déprotection de l'alcool, laquelle a d'abord été réalisée par le biais de fluorure de tetrabutylammonium (TBAF) dans le THF avec des résultats insatisfaisants : on a en effet observé une déprotection incomplète de l'alcool benzylique et l'apparition de sous-produits, que nous n'avons pas pu identifier. La quantité obtenue étant faible après une purification relativement difficile, nous avons cherché une autre méthode qui permettrait de pallier ces défauts. En nous basant sur une voie de méthanolyse acide déjà éprouvé en série bis amide (cf. composé 18), nous avons pu réaliser la coupure du groupement TBDMS de **29** en présence d'une large quantité d'Amberlyst[®] 15 dans le méthanol (et le DCM, pour solubiliser 29) et obtenir la molécule 30 avec un rendement de 89% (Schéma 117).



Schéma 117 : Coupure de l'éther silylé benzylique

Une fois l'alcool benzylique **30** obtenu, nous avons décidé de former le chlorure de benzyle correspondant afin d'obtenir le réactif nécessaire à une réaction d'éthérification avec le fluorophore phénol. La chloration n'a pas été directement réalisée avec succès, les méthodes « classiques » s'étant révélées de façon surprenante inefficaces. Trois réactions ont ainsi été testées : la conversion de l'alcool à l'aide de chlorure de thionyle, par du trichlorure de phosphore et enfin la réaction d'Appel (Schéma 118).



Schéma 118 : Méthodes de chlorations testées sur le dérivé 30

La réaction avec le chlorure de thionyle a engendré un certain nombre de réactions secondaires, de Rf très proches, et nous n'avons pas réussi à obtenir le produit propre.

Les deux dernières méthodes ont eu l'effet opposé, c'est-à-dire que si le produit d'intérêt est bel et bien formé au cours du temps sans autre réaction secondaire, le temps de réaction est anormalement long : on note ainsi la persistance du produit de départ en quantité significative après 48h, le chlorure de benzyle voulu étant encore minoritaire. Notons que ces deux dernières réactions ont été tentées à plus haute température, sans amélioration significative ; de même que les réactifs bromés (tribromure de phosphore PBr₃ et tétrabromure de carbone CBr₄) ont été utilisés sans plus de résultats.

Nous avons donc décidé d'utiliser une autre approche : à une solution de **30** dans le DMF a été ajouté du chlorure de mésyle, le mélange est ensuite porté à 85°C. Ainsi, l'alcool forme le mésylate qui est ensuite lui-même substitué par le chlorure en solution. On obtient de fait le chlorure de benzyle voulu avec un rendement atteignant les 86%, avec une pureté satisfaisante.

Une fois le composé chloré obtenu, nous l'avons engagé dans une réaction d'éthérification avec la DDAO, le rapporteur fluorescent choisi. Nous avons commencé par tester des conditions « classiques », à savoir le couplage entre le phénol DDAO et le dérivé chloré en milieu basique (Schéma 119).

Les 2 bases employées (Cs_2CO_3 et DIEA) sont suffisantes pour arracher intégralement le proton de la DDAO, très acide (pKa = 5). On justifie par ailleurs le choix de telles bases pour l'aptitude à former un phénolate réactif (phénolate de césium) dans le cas du Cs_2CO_3 ou pour le point d'ébullition élevé de la DIEA (par rapport à NEt₃), couplé à une solubilité totale dans les solvants utilisés.

Cependant, cela s'est avéré insuffisant pour permettre la substitution de la position benzylique de **31**, visiblement peu réactive.

On note que l'introduction de catalyseurs nucléophiles (DMAP et KI), même en excès, n'a aucune incidence sur la réaction.

Devant l'apparente absence de réactivité de **31**, nous avons décidé de varier aussi la température, sans plus de résultats ; il en va de même pour la nature du solvant, la solubilité du phénolate de DDAO limitant grandement le choix de ceux-ci (solvants polaires uniquement).

Dans une dernière tentative, nous avons choisi d'utiliser de l'oxyde d'argent dans l'acétonitrile afin de pousser le dérivé chloré à réagir.

Malgré tout, bien qu'ayant monté progressivement la température (de t.a jusqu'au point d'ébullition du solvant), et même après 24h, une formation de produit n'a pas pu être observée.

Nous avons de fait décidé de nous tourner vers une réaction de Finkelstein en vue de produire le dérivé iodé de **31**, supposé bien plus réactif.



Schéma 119 : Tentatives d'éthérification de la position benzylique

La réaction de Finkelstein a permis d'obtenir aisément le dérivé iodé **32** (Schéma 120), à partir duquel de nouvelles tentatives de couplage avec la DDAO ont été réalisées. Nous avons donc utilisé les mêmes conditions que celles mises en place pour le chloré, mais sans succès : il semble que le dérivé iodé **32** et la DDAO ne soit pas suffisamment réactif pour produire une quantité significative de produit. On note toutefois que l'éther désiré a pu être détecté par UPLC, mais à l'état de trace après avoir utilisé des conditions extrêmes (Ag₂O dans l'acétonitrile à reflux, sur 24h). Après avoir tenté de varier légèrement les conditions (temps et concentrations notamment) sans parvenir à produire plus d'éther, cette voie de synthèse a été abandonnée : les quantités de produit étant trop infimes pour espérer mener à bien les tests physico-chimiques à venir.



Schéma 120 : Réaction de Finkelstein sur 31

Devant la difficulté d'obtenir un éther, nous avons donc décidé d'orienter notre synthèse vers l'obtention de dérivés carbonate et carbamate. Nous avons tenté plusieurs approches, qui peuvent être résumées comme suit : soit nous introduisons le carbonyle du carbonate/carbamate par réaction de l'alcool **30** sur une espèce carbonylante, soit nous l'introduisons sur le fluorophore (Schéma 121).

On note par ailleurs que nous voulions former un carbonate ou un carbamate liant l'espaceur au fluorophore : ceci n'aurait pas pu être réalisé facilement avec la DDAO, celle-ci n'étant pas disponible sous la forme aniline. De ce fait, nous avons choisi de poursuivre avec la 4trifluorocoumarine ; celle-ci a l'avantage d'être commercialement disponible sous forme phénol et aniline en position 7.



Schéma 121 : Essais de formation du carbonate/carbamate de 4-trifluorocoumarine

Les tentatives de former le chloroformate de **30** par réaction avec le phosgène ou triphosgène, avec ou sans base et peu importe le solvant ou la température de réaction (0°C ou t.a), se sont toutes révélées peu satisfaisantes : on assiste en effet à la dégradation partielle du produit qui introduit de multiples réactions secondaires lors du couplage avec le fluorophore.

L'utilisation de chloroformate de *para*-nitrophényle s'est également avérée décevante, celuici produisant un intermédiaire peu réactif vis-à-vis du fluorophore. Nous avons donc tenté l'autre approche, en formant les chloroformate et isocyanate de coumarine. On note que l'utilisation d'un équivalent de triphosgène à t.a permet d'obtenir les intermédiaires propres et sans décomposition ; ce qui n'est pas le cas avec le phosgène, à même température. Cependant, l'emploi de phosgène à basse température dans le DCM produit le même effet ; ce qui enlève au triphosgène son avantage, celui-ci devant être introduit en quantité stœchiométrique et pesé (alors que le phosgène est injecté en large excès puis évaporé une fois la conversion terminée). L'introduction d'une base semble particulièrement appropriée dans la conversion de la 7-amino-4-trifluorométhylcoumarine afin de prévenir la protonation de celle-ci au cours de la réaction, ce qui neutralise sa réactivité vis-à-vis du phosgène. Les chloroformate et isocyanate de coumarine ont ainsi pu être obtenus dans le DCM, à froid et injectant pyridine et phosgène en excès. Après évaporation, ceux-ci sont repris dans le THF et injectés à une solution de **30** contenant de la pyridine.

On assiste ainsi à la formation d'un produit majoritaire, mais celui-ci disparait après traitement à l'eau : on peut suggérer que les carbonate et carbamate ont bien été formés (on observe aussi la disparition de **30** et du chloroformate/isocyanate de coumarine) mais que ceux-ci s'hydrolysent rapidement en milieu aqueux. La réapparition des coumarines 7-OH et 7-NH₂ ainsi que de l'alcool **30** après traitement à l'eau confirme cette hypothèse. Si peu de choses peuvent être faite pour améliorer la stabilité du carbonate, on peut en revanche envisager de monométhyler la 7-amino-4-trifluorométhylcoumarine afin d'obtenir *in fine* un carbamate tertiaire, supposé plus stable.

Les tentatives de monométhylation sont encore actuellement en cours pour arriver à ce résultat. Parallèlement à ces tentatives, nous avions conçu une autre stratégie consistant à construire un nouveau produit cagé éther faisant intervenir la 7-hydroxy-4-trifluorométhylcoumarine comme rapporteur. Le dérivé coumarine est un phénol au même titre que la DDAO, mais on note cependant une différence entre ces 2 fluorophores : le pKa de la coumarine est nettement supérieur à celui de la DDAO (7 contre 5), ce qui peut signifier que le phénolate de coumarine peut être plus nucléophile que celui de la DDAO.

On a donc retenté dans les mêmes conditions qu'évoquées précédemment avec la DDAO (Schéma 122).



Schéma 122 : Conditions réalisées en vue du couplage avec le dérivé coumarine

On a pu constater qu'aucune des conditions testées n'a donné de meilleurs résultats qu'avec la DDAO, la SN2 se montrant toujours aussi difficile à réaliser. A la suite de cela, nous avons décidé d'introduire d'essayer d'introduire des sels d'argents sur les halogénures de benzyles **31** et **32** (Schéma 123) ; l'emploi d'espèces à l'argent ayant montré la formation de traces de produit avec la DDAO. Trois sels ont été sélectionnés pour ces essais : l'oxyde d'argent, le plus commun ; le triflate d'argent, le plus soluble ; le carbonate d'argent, particulièrement indiqué lorsque le proton du nucléophile est labile. De même, deux solvants ont été utilisés pour ces réactions : le DMF et l'acétonitrile, les deux plus courants dans les SN2 faisant intervenir des espèces de l'argent(I).



Schéma 123 : Mise au point de la SN2 utilisant des sels d'argent(I)

On remarque avant tout une absence totale de réaction sur le dérivé chloré **31**, ce qui reste cohérent avec nos précédentes observations et nous a encouragé à ne plus tenter d'autres méthodes avec ce dérivé. Les réactions sur le dérivé iodé 32 ont permis de dégager plusieurs conclusions, à commencer par le choix du solvant. On a en effet pu remarquer que la SN2 était bien plus lente dans le DMF que dans l'acétonitrile, ce qui nous a amené à choisir ce dernier comme solvant dorénavant. La température ne semble pas avoir d'impact, positif ou négatif, sur la réaction ; pour des questions d'ordre pratique, celle-ci sera donc conduite à t.a. L'influence du sel d'argent est également intéressante : tandis que le carbonate d'argent semble donner les résultats les moins prometteurs, le triflate et l'oxyde d'argent permettent la formation d'une quantité appréciable de produit. L'oxyde d'argent étant le moins cher et le plus facile à conserver des deux réactifs, nous avons préféré l'oxyde d'argent pour la réaction finale. Nous avons donc finalement réalisé la réaction d'éthérification du dérivé iodé 32 en utilisant Ag₂O comme source d'argent et base, mise en suspension dans le CH₃CN et agité toute la nuit à t.a pour finalement obtenir le composé bi-cagé final avec un rendement de 45%. Ceci fait, la voie de synthèse de l'espaceur auto-immolable bi-activable est finalement complète avec un rendement global de 20% en 7 étapes (Schéma 124).



Schéma 124 : Schéma de synthèse pour l'accès à l'espaceur bis-carbamate fonctionnel

2. Etudes physico-chimiques et preuve de concept

Une fois le composé **33** obtenu, nous avons effectué les tests nécessaires pour prouver le concept de l'auto-immolation obéissant à la réalisation de 2 conditions. Pour ce faire, nous avons commencé par effectuer séparément chacune des activations, c'est-à-dire obtenir les dérivés mono-carbamates de vératryle et d'allyle à partir du bis-carbamate **33**. Ensuite nous avons étudié la stabilité de chacun de ces carbamates pour s'assurer qu'une unique activation n'est pas suffisante pour induire l'élimination de la coumarine. Dans un premier temps, nous avons tenté de couper le nitrovératryle par irradiation. Cette réaction de photocoupure est décrite pour être grandement accélérée en présence d'eau (Schéma 125), celle-ci catalysant le passage de la forme Z du nitro (non apte à poursuivre la réaction) à la forme E (forme active du mécanisme).



Schéma 125 : Mécanisme de photolyse du 6-nitrovératryle, adapté de Bochet et al.

Après avoir effectivement montré que la réaction était trop lente en absence d'eau pour être considérée comme une voie de déprotection viable, nous avons tenté une photolyse dans un milieu contenant de l'eau. Le meilleur compromis entre la solubilité du produit et la teneur en eau a été déterminé comme étant l'utilisation d'un mélange d'acétonitrile et d'eau (4:1) comme solvant. L'irradiation pendant plusieurs heures du produit à la lumière blanche (120 W) n'a pas montrée de bons résultats, le produit photolysé étant encore très minoritaire. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'intensité lumineuse à 365 nm (longueur d'onde de photolyse) devait être relativement faible dans ce système. C'est pourquoi nous avons convenu d'utiliser des lampes normalement dédiées à la visualisation de plaques CCM, certes de plus faible intensité (6 W), mais ayant l'avantage d'irradier spécifiquement à 365 nm : on est ainsi sûr de la puissance déployée lors de la photolyse (3 fois 6 W). Après 48h, le mono-carbamate d'allyle **35** a pu être isolé avec un rendement de 86%.

De même, la coupure de la fonction allyle de **33** a pu être réalisée en présence de Pd^{II} dans un mélange 4:1 acétonitrile/eau pour donner le carbamate de vératryle **34** avec un rendement

de 91% (Schéma 126). Une fois tous les dérivés obtenus (bis et mono-carbamates), des mesures de stabilités ont été réalisées en UV.



Schéma 126 : Accès aux mono-carbamates **34** et **35**

Les mesures de stabilités ont été réalisées par mesure d'absorbance UV au cours du temps (Schéma 127) : on considérera que l'absence d'évolution à 400 nm, longueur d'onde où l'absorbance de la 7-hydroxy-4-trifluorométhylcoumarine est maximale, signifie l'absence d'auto-immolation.

Les trois composés ont été mis en solution dans un mélange 1:1 acétonitrile/tampon Britton-Robinson : ce tampon permet ainsi de fixer le pH (7.6), d'autant qu'il est parfaitement miscible à l'acétonitrile sans montrer de précipitation des sels inorganiques (borates et phosphates) qu'il contient, comme nous l'avons auparavant décrit en séries cyclisations.

Plusieurs mesures ont été effectuées sur 24h, et aucune d'elle ne fait état d'une évolution quelconque à 400 nm, et ce pour les trois composés étudiés. Afin de garantir que les composés **33/34/35** restent intacts au cours du temps, des analyses UPLC/MS ont eu lieu après 24h d'incubation à t.a : aucune dégradation n'a été détectée.

On a ainsi pu montrer que la coumarine était effectivement toujours cagée, indiquant que son élimination n'a pas eu lieu.

Ainsi, une seule activation n'est pas suffisante pour permettre l'auto-immolation de ce genre de structure, ce qui était l'hypothèse formulée au départ par notre équipe.



Schéma 127 : Mesures d'absorbance UV des 3 composés cagés au cours du temps
Après nous être assuré qu'une seule activation n'était pas suffisante pour induire l'élimination de la coumarine, nous avons désiré vérifier que la double activation menait bien à la libération de celle-ci (Schéma 128). Nous avons pour cela soumis le bis-carbamate **33** aux 2 conditions de déprotection simultanément (Pd^{II} et UV).



Schéma 128 : Suivi UPLC de la double déprotection du bis-carbamate 33

Pour réaliser la double déprotection, nous avons simplement reproduit les mêmes conditions de déallylation et de photoclivage que celles décrites dans le schéma 126 : celle-ci ayant été réalisées dans le même solvant, nous avons pu employer les 2 méthodes simultanément sans

difficultés. On voit sur le schéma 128 que la déallylation se produit intégralement et rapidement (moins de 10min) pour donner le mono-carbamate de vératryle **34** (temps de rétention : 1,40 min), ce qui reste cohérent par rapport à nos observations précédentes : la déallylation du bis-carbamate réalisé précédemment a été en effet complétée en moins de 60min. La photolyse a pris beaucoup plus de temps : le produit est encore détectable après 6h d'irradiation pour ne disparaitre complètement qu'après 24h. On note que les temps ici indiqués ne sont valables que pour le modèle considéré et pour les conditions associées (intensité de lumière faible notamment). On remarque que la disparition du mono-carbamate de vératryle s'accompagne d'une apparition d'un pic avec un temps de rétention de 1,08 min : le spectre de masse associé a confirmé que ce produit correspondait à la 7-hydroxy-4-trifluorométhylcoumarine. Ainsi, nous avons démontré que le motif bis-carbamate permet d'imposer une double activation stricte, laquelle conduit à la libération du fluorophore lorsque les deux conditions sont réalisées simultanément.

3. Attentes futures concernant les espaceurs à activation double

Ayant apporté la preuve de concept de la double activation adaptée aux espaceurs autoimmolable, il est actuellement envisagé de remplacer les activateurs modèles allyle et vératryle par des substrats biocompatibles. En effet, même si des cas d'utilisations *in cellulo* du palladium¹¹⁸ ou du vératryle¹¹⁹ ont été décrits, ces derniers ne sont généralement pas considérés comme adaptés pour une utilisation *in vivo*. Nous sommes conscients du fait que le métal en question et la lumière sont des déclencheurs externes, ils ne peuvent donc servir ni de sondes ni de prodrogues ; ces 2 conditions ne sont pas spécifiques à la cible considérée (cellule, organe, microorganisme, ...). Ces 2 activateurs, qui ont néanmoins servi à prouver le principe de double activation, ont donc pour vocation d'être remplacés par des substrats activables en milieux biologiques (par voie enzymatique ou (bio)chimique), lesquels seront idéalement spécifique d'une cible donnée. Nous proposons une nouvelle approche où les 2 activateurs seront clivables en milieu biologique, sous l'action d'un signal spécifique (enzymatique ou biochimique).

Il a été montré ces dernières années que certaines lignées tumorales présentaient une surexpression de la furine, une protéase impliqué dans de nombreux phénomènes cellulaires (mobilité, processus inflammatoire, ...). En outre, une équipe de Stanford a réussi à produire un profluorophore composé de la séquence reconnue par la furine et de luciférine comme rapporteur¹²⁰. La furine présente l'avantage de ne reconnaitre qu'une séquence bien spécifique (Arg-X-Arg/Lys-Arg ; où X est un acide aminé quelconque), ce qui en fait une cible de choix pour une activation ciblée. Ce composé cagé s'est avéré capable d'être activé spécifiquement dans des cellules tumorales du sein (cellules MDA). Parallèlement, une autre équipe a montré que l'inhibition de la furine dans un autre type cellulaire (HT1080, fibrosarcome) a montré une réduction drastique de la mobilité de ces cellules, et donc de leur potentiel invasif¹²¹. Cela illustre bien le potentiel de la furine comme activateur de

¹¹⁸ J. Li, J. Yu, J. Zhao, J. Wang, S. Zheng, S. Lin, L. Chen, M. Yang, S. Jia, X. Zhang, P. R. Chen, Nat Chem. 2014, 6, 4, 352-61 ¹¹⁹ B. Imperiali, B.N. Goguen, A. Aemissegger, J. Am. Chem. Soc., 2011, 133, 11038.

¹²⁰ A. Dragulescu-Andrasi, G. Liang, J. Rao, Bioconjugate Chem. 2009, 20, 1660–1666

¹²¹ J. M. Coppola, M. S. Bhojani, B. D. Ross, A. Rehemtulla, Neoplasia, 2008, 10, 363-370

prodrogue/profluorophore dans les stratégies de groupements cagés, de par sa présence dans de nombreux types cellulaires et de par la spécificité de la séquence qu'elle reconnait.

Pour le second activateur, nous nous sommes intéressés à une particularité métabolique largement répandue au sein de nombreuses lignées tumorales : l'élévation du niveau des ROS du au stress oxydant intense qu'elles présentent. Cela a déjà été illustré comme exemple au début de ce chapitre, certaines équipes ayant choisis une activation par les ROS *via* l'utilisation d'ester de l'acide borique. Nous avons donc décidé de conserver ce motif, du fait de son efficacité établie et sa capacité à être activé dans de nombreuses lignées cancéreuses.

Afin de maximiser les chances de succès de notre stratégie, nous avons également considéré une autre voie d'activation assez commune des cellules tumorales : la réduction d'un groupement nitro par l'action de nitroréductase. Il a en effet été montré qu'un certain nombre de lignées tumorales (incluant les très communes cellules HeLa, modèle de choix en cancérologie) présentaient une élévation du niveau de nitroréductases, conséquence de conditions hypoxiques^{122,123}. Ces conditions sont en effet fréquemment rencontrées dans nombres de cancers, du fait de la faible irrigation sanguine au sein de ceux-ci.

Considérant que l'activation par nitroréductase et l'oxydation d'un ester d'acide borique sont incompatibles, nous avons donc fini par choisir deux structures d'espaceurs bi-activables (Schéma 129) pour l'étude de cellules cancéreuses soumises au stress oxydant (molécule 1 du schéma) ou à des conditions hypoxiques (molécule 2 du schéma). Inspirés par la littérature, nous testerons ces composés sur 3 lignées tumorales :

- Les cellules HeLa : ayant montrées une activité nitroréductase considérablement

élevée ; ces cellules sont parmi les plus répandues dans les tests in cellulo.

- Les cellules MDA : citées précédemment, montrant une surexpression de la furine.
- Les cellules HT29 : cellules utilisées par notre équipe pour les tests de conjugués de la

séquence reconnue par la furine.

 ¹²² B. Huang, W. Chen, Y.-Q. Kuang, W. Liu, X.-J. Liu, L.-J. Tang, Jian-Hui Jiang, Org. Biomol. Chem., 2017, 15, 4383
 ¹²³ S. Luo, R. Zou, J. Wu, M. P. Landry, ACS Sens.



Schéma 129 : Structures des bis-carbamates pour l'imagerie des lignées tumorales considérées

Notons que nous déterminerons au préalable le niveau d'expression de chaque enzyme ciblée (nitroréductase, furine) dans chaque lignée afin de confirmer la pertinence de nos composés cagés pour l'imagerie des types cellulaires considérés. Ces tests, ainsi que l'acquisition des réactifs nécessaires à la synthèse de nos sondes sont actuellement en cours et sera mis en œuvre prochainement.

CHAPITRE 4 : AUTO-IMMOLATION A DECLENCHEMENT MULTIPLE POUR L'AMPLIFICATION DE SIGNAL

- I. De l'activation simple à l'activation multiple : l'apport des polymères et dendrimères
- A. Composés à simple activation pour une sensibilité accrue
- 1. Le rôle des espaceurs auto-immolables dans le domaine

Comme nous l'avons largement décrit jusqu'à présent, les composés cagés sont un moyen efficace de masquer les propriétés d'une molécule (fluorescence, activité biologique) en vue d'améliorer entre autres sa distribution ou sa sélectivité. Un point important n'a cependant pas encore été souligné : en effet, dans tous les cas, nous considérions que l'activation permettant la coupure du groupement protecteur et la régénération de la molécule d'intérêt était rapide et totale. Dans les faits, cet objectif optimal n'est pas toujours atteint : lorsque le stimulus (enzyme, espèce chimique, lumière, ...) est insuffisamment présent dans le milieu, alors l'activation est lente et partielle ; ce qui est d'autant plus critique qu'une activation trop lente entraine inévitablement la diffusion du composé cagé hors du site, et donc son excrétion *in fine.* Ceci peut avoir des conséquences non négligeables sur les propriétés du composé (fluorescence diffuse, concentration en principe actif faible, ...) pouvant aller jusqu'à l'abandon de son utilisation. Pour remédier à ce problème, des composés cagés permettant une amplification du signal ont vu le jour.



Schéma 130 : Illustration des 2 concepts d'amplification de signal

Au sein de cette stratégie, on distingue 2 manières de procéder (Schéma 130) :

- Les composés cagés permettant la libération de plus d'une molécule d'intérêt (cas 1) ;
 le but n'est pas ici d'augmenter la proportion d'activation mais de rendre celle-ci plus efficace en libérant de nombreuses molécules actives (drogue ou fluorophore).
- Les molécules cagées à activations multiples (cas 2) ; ici l'objectif est d'introduire plusieurs voies d'activation, chacune pouvant aboutir à la libération du composé. Cela rend le processus de libération du composé plus efficace.

On notera que, dans les 2 cas, il est nécessaire que l'activation puisse mener à la libération du ou des composés : il est donc obligatoire de passer par la construction d'un espaceur autoimmolable pour corréler ces 2 étapes.

L'utilisation d'un espaceur auto-immolable permet en effet de corréler la coupure de 2 liaisons ou plus. On notera par ailleurs que la plateforme la plus rencontrée dans les stratégies d'amplification de signal est la méthylène quinone¹²⁴ : cette dernière présente en effet l'avantage d'aboutir à la libération de nombreuses fonctions chimiques (acide carbonique/carbamique, phénols) par des mécanismes d'éliminations 1.6 ou 1.4 dans des délais raisonnables (minute ou seconde). Sachant qu'un dérivé de benzylphénol est capable d'initier de multiples phénomènes d'auto-immolation, on obtient aisément et rapidement un dendrimère capable de libérer un nombre conséquent de molécules actives (Schéma 131). Différents mécanismes d'auto-immolation peuvent ainsi être exploités par ces dérivés, principalement une combinaison d'élimination 1.4 et 1.6 (L110, L111 et L112 du schéma), ou plus rarement d'éliminations 1.6 et 1.8 (L113).



Schéma 131 : Différents précurseurs de méthylènes quinones utilisés comme amplificateurs

Un exemple basé sur L111 a été développé par notre équipe¹²⁵ et a montré la capacité de libérer 2 rapporteurs fluorescents différents par 2 éliminations 1.4, et ce quasi simultanément ; les éliminations 1.4 ont en effet montré des cinétiques identiques (Schéma 132). De plus, comme notre équipe l'a également démontré, les éliminations 1.4 et 1.6 montrent également des cinétiques très proches : on peut donc conclure que les espaceurs utilisant la plateforme méthylène quinone et combinant ces 2 mécanismes (notamment L112, schéma 131) sont capables de libérer, à la même vitesse, tous leurs groupements partants. De

¹²⁴ S. Gnaim, D. Shabat, Acc. Chem. Res. 2014, 47, 2970-2984

¹²⁵ R. Labruere, A. Alouane, T. Le Saux, I. Aujard, P. Pelupessy, A. Gautier, S. Dubruille, F. Schmidt, L. Jullien, Angew. Chem. 2012, 124, 9478 –9481

fait, cela signifie que l'amplification de signal induite par une multiplication des voies d'éliminations est une stratégie pertinente.



Schéma 132 : Libération simultanée de DDAO et 7-hydroxy-4-trifluorométhylcoumarine par une double élimination 1.4

Nous tacherons par la suite de citer les exemples les plus significatifs allant dans ce sens.

2. Libération de composés multiples

Comme nous l'avons dit, la plupart des exemples reportés dans la littérature sont des structures capables d'induire plusieurs phénomènes d'auto-immolation après une simple activation. L'avantage de cette stratégie est de permettre la libération de plusieurs molécules d'intérêt pour compenser la faible sensibilité de la molécule cagée pour sa voie d'activation. Certaines équipes se sont intéressées à la synthèse de nanoparticules cagées¹²⁶ : le principe est d'encapsuler une large quantité de substance active au sein de la nanoparticule. La nanoparticule est conçue pour s'accumuler au niveau de tissus tumoraux par effet EPR (enhanced permeability and retention): l'expérience montre que les assemblages macromoléculaires d'une certaine taille (plus de 150 μM) sont particulièrement retenus par les tissus cancéreux, ce qui entraine une accumulation de ces structures au sein des tumeurs ; il s'agit là d'un ciblage passif de la tumeur en exploitant cet effet de rétention. Une fois les nanoparticules accumulées par la tumeur, un signal spécifique (ici : l'oxydation des esters d'acides boroniques par les ROS des cellules tumorales) induit le désassemblage de la structure macromoléculaire garantissant l'intégrité des nanoparticules. De fait, celles-ci se décomposent et libèrent les substances qu'elles contiennent (principe actif, agent de contraste, ...). On note également que le signal déclenchant l'ouverture des nanoparticules peut être un signal externe (non inhérent à la tumeur), comme la lumière : Almutairi et son équipe¹²⁷ ont ainsi synthétisé une nanoparticule répondant à la lumière infrarouge qui a la particularité de pénétrer profondément les tissus ; ainsi, une irradiation au niveau de la tumeur suffirait à délivrer l'agent encapsulé dans les nanoparticules accumulées par effet EPR. Les auteurs argumentent que cela permettrait de nombreuses applications thérapeutiques, allant de l'imagerie à la vectorisation de substance active, en utilisant les propriétés autoimmolables des espaceurs pour désassembler des nanoparticules. Etant donné la quantité de

¹²⁶ Z. Wang, J. Sun, X. Jia, J. Polym. Sci. Pol. Chem., 2014, 52, 1962–1969

¹²⁷ N. Fomina, C. McFearin, M. Sermsakdi, O. Edigin, A. Almutairi, J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 9540–9542

composés pouvant être chargées dans une nanoparticule et l'efficacité de l'effet EPR, nous admettrons que la stratégie reste pertinente dans ce cas. Un inconvénient général pour les nanoparticules est leurs synthèses, qui s'avère parfois peu efficace et reproductible, ainsi que la quantité aléatoire de composés chargées au sein de celles-ci.

Dans l'optique de développer des outils plus fiables, de nombreuses équipes¹²⁸ ont développé des systèmes macromoléculaires non nanométriques (principalement des polymères ou des dendrimères). Tous ces systèmes ont en commun de délivrer un nombre conséquent de molécules actives ou rapporteurs, la nature des activateurs et de la substance délivrée définissant son utilisation. Certaines molécules sont conçues pour répondre à un problème particulier. C'est notamment le cas d'un des nombreux exemples de Shabat et de son équipe¹²⁹ : dans ces travaux, les auteurs ont été confrontés à une solubilité insuffisante dans le milieu biologique considéré, dû au poids moléculaire élevé du dendrimère et de l'absence de fonction polaire. Pour remédier à cela, l'équipe a construit une structure comportant 2 fonctions alcynes (L115) : celles-ci sont ensuite engagé, à la toute dernière étape de la synthèse, dans une réaction de cycloaddition de Huisgen avec un dérivé azoture de PEG5000 (Schéma 133).



Schéma 133 : Dendrimère hydrosoluble de Shabat et al, avec : triazole/PEG, en bleu ; camptothécine en rouge ; substrat de la PGA, en vert

Ainsi, la molécule reste apolaire à toutes les étapes de la synthèse (ce qui est particulièrement pratique d'un point de vue expérimental) ; la polarité étant massivement augmentée au cours de la dernière étape, réalisée par une méthode dont l'efficacité a été maintes fois prouvée. Les résultats sont à la hauteur des attentes de Shabat et son équipe : le dendrimère est

¹²⁸ M. E. Roth, O. Green, S. Gnaim, D. Shabat, Chem. Rev. 2016, 116, 1309–1352

¹²⁹ A. Gopin, S. Ebner, B. Attali, D. Shabat, Bioconjugate Chem. 2006, 17, 1432-1440

parfaitement soluble *in cellulo* et activé par la PGA (Penicillin G Acylase), libérant ses 4 camptothécines.

On note que l'IC50 du dendrimère pour sa cible est 2000 fois plus élevée que celui de la camptothécine seule (4 μ M, contre 2 nM originellement) : cela illustre bien que, malgré la libération de 4 équivalents de principe actif, l'activation partielle de la prodrogue est une limitation importante dans cette stratégie. Shabat a d'ailleurs reconnu qu'un dendrimère plus facilement activable aurait été un atout dans le cas présent, ayant démontré la libération partielle du composé actif. Il semble inévitable dans ce genre de situation d'augmenter la sensibilité de ces composés cagés vis-à-vis de leurs activations, ce qui sera le point abordé par la suite.

- B. Polymères et dendrimères pluri-activables pour l'augmentation de sensibilité
- 1. Augmentation de la proportion d'un même activateur

Comme nous l'avons dit, une alternative à l'amplification de signal telle que décrite précédemment est l'augmentation de la sensibilité du composé cagé pour sa voie d'activation : si l'activation est facilitée, alors le composé sera plus efficacement décagé. Ainsi, dans les mêmes conditions, une sonde ou prodrogue ayant plusieurs voies d'activations devrait mieux réagir qu'une sonde ou prodrogue n'en ayant qu'une. Cette stratégie étant relativement récente, peu d'exemples sont actuellement reportés ; aussi, nous tacherons de dégager les conclusions appropriées à partir des travaux reportés dans la littérature.

Le premier exemple que nous avons choisi de présenter est une sonde (rapporteur : *para*nitrophénol) comportant plusieurs substrats de la PGA (Schéma 134), synthétisée par *Shabat et al*¹³⁰.

Les auteurs s'appuient sur le fragment diéthylènetriamine : celle-ci permet la liaison au carbamate (de *para*-nitrophénol ou du *para*-benzylphénol qui libèrera le rapporteur par élimination 1.6) par son amine secondaire, autant qu'elle permet de former 2 liaisons peptidiques par ses amines primaires terminales.

On obtient ainsi des composés comportant plusieurs activateurs mais dont l'auto-immolation ne dépend que d'une seule d'entre elles.

En effet, la rupture d'une liaison amide après action de l'enzyme ciblée (la PGA) régénère une amine primaire nucléophile ; laquelle s'engagera dans une cyclisation 5-*exo*-trig pour aboutir *in fine* à la libération du *para*-nitrophénol.

¹³⁰ R. J. Amir, D. Shabat, Chem. Commun., 2004, 1614 – 1615



Schéma 134 : Dendrimères mis au point par Shabat et Amir, respectivement : 1. Mono-PGA, 2. Di-PGA, 3. Quadri-PGA

Les résultats montrent bien que le composé L117 libère le *para*-nitrophénol plus rapidement que le composé L116 (2 fois plus vite) : les auteurs justifient ce résultat du fait que la concentration en substrat est 2 fois plus élevée. En revanche, le composé L118 libère le *para*nitrophénol plus lentement que le composé L116 de référence : d'après les auteurs, l'élimination 1.6 induite par le *para*-benzylphénol est l'étape cinétiquement limitante, ce qui explique ce phénomène. On peut néanmoins argumenter que si L117 est plus facilement activé que le mono, alors L118 doit l'être davantage : même si la cinétique de libération est plus faible dans ce cas, il est fortement probable que l'activation d'un tel composé doit être plus efficace que le mono de base ; la présence d'une étape d'auto-immolation supplémentaire nous empêche cependant de confirmer cette hypothèse, celle-ci étant visiblement cinétiquement limitante (d'où un temps de libération observé plus important). A la suite de ces résultats, cette équipe s'est tournée vers une autre variante de polyactivation, que nous détaillerons par la suite. 2. Voies d'activations distinctes pour une unique auto-immolation

Shabat et son équipe ont développé une autre approche d'activations multiples, basés sur le clivage de différents substrats : en effet, bon nombre de cibles (bactéries, cancers, ...) expriment différentes enzymes (ou biomolécules, tels que les ROS), lesquelles constituent autant de voies d'activations possibles. Comme dit précédemment, la concentration en enzymes/biomolécules peut être un facteur limitant : si ceux-ci sont présents en trop faibles quantités, alors l'activation du composé cagé sera inefficace. On admettra également que la concentration, en enzymes comme en biomolécules, peut varier d'une cellule cible à une autre (par exemple, au sein d'une même tumeur) et est donc difficilement quantifiable et prévisible. Plutôt que d'accroitre la concentration en activateurs en multipliant ceux-ci, il est possible de construire une molécule dont l'auto-immolation est conditionnée à 2 activations distinctes (L119) mais dont une unique activation suffit à déclencher l'auto-immolation (Schéma 135) : ainsi, si une voie d'activation est défavorisée (de par la faible expression de l'enzyme correspondante, par exemple), la seconde pourra elle permettre la libération du composé d'intérêt.



Schéma 135 : Dendrimère à 2 voies d'activations distinctes créé par Shabat et al

Les auteurs ont donc synthétisé un dendrimère libérant une doxorubicine (agent anti-tumoral) après activation d'un substrat de la PGA ou celle d'un aldol redonnant la cétone correspondante après action catalytique de (Ab) 38C2 (anticorps à activité rétroaldolase)¹³¹. Les auteurs ont pu vérifier *in vitro* que la présence d'une seule enzyme était suffisante pour induire l'élimination (1.6) de la doxorubicine (DOX).

Ces 2 derniers exemples de Shabat montrent bien que l'augmentation des voies d'activations, qu'elles soient identiques ou différentes, permettent une optimisation du décageage du composé masqué. Ceci permet une alternative à la stratégie d'amplification de signal décrite auparavant. De plus, ces 2 stratégies sont parfaitement compatibles : il est en effet possible

¹³¹ R. J. Amir, M. Popkov, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, D. Shabat, Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 4378 –4381

de conditionner l'auto-immolation d'un dendrimère portant de multiples rapporteurs ou composé bioactif à l'activation d'un dendrimère multi-activable¹³² (Schéma 136).



Schéma 136 : Dendrimère hybride breveté par Shabat et al

3. Adaptation du concept de multi-activation à un espaceur monomérique

Les récents travaux concernant les espaceurs à signal ou activation amplifiés ont permis de développer 2 stratégies, chacune ayant ses avantages et ses inconvénients. En effet, l'amplification de signal, qui repose sur un relargage multiple de rapporteurs/composés bioactifs, montre ses limites en termes d'efficacité : comme rapporté précédemment, l'effet thérapeutique peut être considérable réduit comparé au composé actif utilisé seul. De fait, les dendrimères et polymères libérant de multiples composés ne présentent pas forcément l'avantage de libérer rapidement les nombreux équivalents de substances qu'ils cagent. On ajoutera à ceci que la multiplication des coûts ; certaines des dites substances ayant déjà des prix très élevés, cela impose une limite financière.

A l'inverse, l'amélioration de la sensibilité des espaceurs ne possède pas cette dernière limite : les activateurs, qu'ils soient substrats enzymatiques ou non, sont relativement peu chers ; leur multiplication n'a donc pas grand impact au niveau financier. De même, l'optimisation de l'activation peut visiblement permettre de produire des composés cagés très sensibles ; ce qui est appréciable tant en thérapeutique qu'en imagerie. Mais là encore, cette stratégie rencontre des limitations : comme nous l'avons vu, la taille des dendrimères et polymères (macromoléculaires) induit souvent une solubilité dans l'eau des plus médiocres. Or, on admettra qu'un composé non soluble n'est que faiblement activé *in cellulo*. Une molécule plus compacte serait alors plus appropriée dans ce cas de figure.

C'est pour cette raison que nous avons décidé d'exploiter le concept de polyactivation en utilisant les propriétés d'un unique noyau phénol, de sorte à montrer des effets similaires à ceux rapportés jusqu'à présent tout en miniaturisant le système le plus possible.

¹³² R. J. Amir, D. Shabat, US20060269480 A1

II. Conceptions d'espaceurs auto-immolables polyactivables compacts

- A. Mise au point de dérivés du 2.4.6-trihydroxybenzaldéhyde
- 1. Relations structures-propriétés

Nous avons décidé de nous baser sur le noyau 2.4.6-trihydroxybenzyle afin de construire notre espaceur. Celui-ci présente en effet l'avantage de pouvoir déclencher la libération du groupement partant fixé sur la position benzylique par élimination 1.4 ou 1.6. On note par ailleurs que les 2 éliminations 1.4 sont strictement équivalentes, et l'élimination 1.6 est très comparable : notre équipe a en effet prouvé que ces 2 variantes d'éliminations sont comparables en termes de rendement de relargage, comme en termes de cinétique. On a donc ici un exemple d'espaceur pouvant induire l'élimination du composé par 3 voies comparables en tout point.

Nous avons décidé de substituer ces 3 positions phénols par un même groupement, dans un premier temps, plutôt que par une combinaison d'activeurs divers : nous avons en effet estimé que la synthèse d'un dérivé trisubstitué asymétrique serait plus complexe d'un point de vue expérimental, nous avons donc reporté à une date ultérieure l'élaboration d'un tel composé. L'activateur choisi est le 6-nitrovératryle, que nous avions déjà utilisé auparavant : son clivage rapide et sélectif à 365 nm et sa stabilité sont particulièrement avantageux dans le cas présent.

Le rapporteur choisi sera la 7-hydroxy-4-trifluorométhylecoumarine, que nous avons employé comme fluorophore dans notre bis-carbamate : cette coumarine possède des propriétés photophysiques (déplacement de Stokes élevé, excitation à 365 nm) intéressantes, est peu cher et s'est révélée bien meilleur nucléophile que l'autre fluorophore disponible dans notre laboratoire (DDAO).

Pour prouver l'augmentation de sensibilité de notre composé trisubstitué vis-à-vis de son stimulus (lumière), nous avons décidé de mener des expériences de fluorescence en utilisant des intensités d'irradiations variables : en effet, si plus de vératryles sont présents sur la molécule, plus grande serait la probabilité d'en cliver ne serait-ce qu'un seul ; nous devons donc nous assurer que le dérivé trisubstitué réponde à des intensités lumineuses plus faibles que le dérivé monosubstitué de référence, la faible intensité étant comparable à la faible concentration en biomolécules/enzymes décrite jusqu'à présent. Nous devrions observer une modification de la fluorescence, traduisant l'étape d'auto-immolation, plus rapide si tel est le cas.

Afin de mener une étude complète, nous devrons synthétiser 3 composés : le trisubstitué à analyser, le mono de référence et le disubstitué intermédiaire. Ainsi, si nos prévisions sont exactes, nous devrons observer une augmentation de sensibilité directement corrélée au nombre d'activateurs mis en jeu : le plus sensible serait le trisubstitué, puis le disubstitué, pour finir par le mono. On notera que contrairement au modèle de Shabat, toutes nos molécules dépendent d'un seul mécanisme d'auto-immolation : il nous sera donc plus facile de corréler

vitesse et intensité du signal d'activation, car toutes les auto-immolations sont parfaitement comparables.

2. Liaison entre le(s) groupement(s) photoactivable(s) et l'espaceur

Utilisant le 6-nitrovératryle, 2 fonctions dérivées du phénol sont possibles : l'éther de phénol ou le carbonate de phénol. Nous tiendrons compte du fait que le carbonate, formé par addition/élimination entre le phénol et le chloroformate de vératryle, pourrait être moins stable que l'éther correspondant : nous avons décidé de synthétiser en priorité le dérivé triéther.

Comme nous le disions, nous devrons synthétiser 3 composés. Le nombre de vératryle devrait influencer l'élimination du rapporteur en jouant sur la sensibilité du composé, mais pas uniquement. En effet, il a été montré par notre équipe que la vitesse d'élimination dépendait fortement des effets électroniques en présence sur le cycle aromatique : il est donc impératif que les dérivés mono, di et trivératryles comportent les mêmes fonctions sur le cycle aromatique : trois éthers ou trois carbonates pour tous les dérivés, afin de s'assurer de la comparabilité des composés et que la modification de la cinétique d'élimination soit corréler au nombre d'activateur uniquement.

Il faudra donc synthétiser les 3 composés en s'assurant que les effets électroniques de chacun d'eux sont similaires, ceci afin de ne pas fausser la conclusion de l'étude (Schéma 137).



Schéma 137 : Structures générales des dérivés triéther et tricarbonate

On admettra qu'un triéther ou un tricarbonate présentent les mêmes effets électroniques, qu'il s'agisse d'éther/carbonate de méthyle ou de vératryle ; de fait, nous considèrerons les structures mono/bi/trivératryles comme comparables au sein d'une même série.

3. Nature de la liaison au fluorophore

La nature de la liaison au fluorophore a été déterminée selon la même logique que celle suivie précédemment, à savoir selon la disponibilité du fluorophore commercial correspondant. Pour les dérivés de 4-trifluorocoumarine, 2 substances sont actuellement disponibles : les dérivés 7-hydroxy et 7-amino. Nous pouvons lier l'espaceur au rapporteur par 3 liaisons différentes : carbonate, carbamate et éther. Pour les mêmes raisons qu'invoqué auparavant, nous avons privilégié l'éther. Les carbamate et carbonate correspondants ne seront tentés que si la synthèse de l'éther se montre peu commode. Ajoutons que l'élimination des carbonates et carbamates est déjà très rapide, ce qui n'est pas optimal pour les évaluations physico-chimiques : les variations de cinétiques entre les dérivés mono et polysubstitués seraient plus nettes et facilement analysables dans le cas de l'éther.

Pour résumer, nous nous orienterons prioritairement vers la synthèse d'un triéther de phénol conduisant à l'élimination d'un éther de 7-hydroxy-4-trifluorométhylecoumarine. On notera que l'assemblage, composé uniquement de liaisons éthers, offre des garanties en termes de stabilité. Finalement, nous avons prévu de synthétiser les 3 structures indiquées dans le schéma 138 : la molécule trivératryle étant vraisemblablement la plus difficile à synthétiser, nous commencerons par celle-ci.



Schéma 138 : Structures cibles nécessaires à notre étude

- B. Stratégies de synthèses et obstacles principaux
- 1. Substitutions directes des positions phénols

Dans un premier temps, nous avons cherché à alkyler les positions phénols du 2.4.6trihydroxybenzaldéhyde. Nous justifions le choix de l'aldéhyde de départ par la nécessité d'obtenir *in fine* une position benzylique pouvant supporter le groupement partant. L'alcool benzylique correspondant n'étant pas disponible commercialement et l'acide carboxylique risquant d'apporter plus de difficultés à notre synthèse (notamment pour l'étape de réduction en alcool), nous avons choisi l'aldéhyde. Le dérivé triphénol choisi a été mis en présence de bromure de 6-nitrovératryle, d'une base et éventuellement d'un catalyseur nucléophile afin de conduire à la formation du triéther désiré (Schéma 139).



Schéma 139 : Tentatives de fixation du vératryle sur le 2.4.6-trihydroxybenzaldéhyde

Le produit tribenzylé n'a pas pu être obtenu par cette méthode d'alkylation directe, malgré toutes les conditions utilisées. Tout d'abord, il semblerait que le solvant n'a aucune incidence sur la réaction. Pour ce qui est la base utilisée, nous avons noté que les bases organiques permettaient d'obtenir un mélange homogène ; lequel influe positivement sur la vitesse d'alkylation. Cependant, il a été impossible d'obtenir le dérivé portant 3 vératryles : si la fixation du premier équivalent est en effet relativement rapide, la fixation du deuxième vératryle est bien plus lente et aucune autre substitution n'est observée après ce stade. L'introduction de catalyseur montrent des effets contradictoires selon la nature de celui-ci : la présence d'iodure de potassium est en effet bénéfique sur la vitesse de mono et disubstitution, sans pour autant permettre la formation du composé voulu ; l'ajout de DMAP diminue la vitesse de réaction, probablement dû à l'encombrement stérique généré. L'effet de la température est similaire, tout en étant plus linéaire : plus la température est élevée et plus la vitesse de réaction l'est également ; mais on ne détecte toujours pas la présence du trivératryle désiré, seulement une conversion totale de l'aldéhyde de départ en 2,4-bis((4,5dimethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)-6-hydroxybenzaldehyde (divératryle, fixé en 2 et 4-hydroxy, confirmé par RMN).

Il semble donc que l'alkylation directe des positions phénols ne soit pas la méthode adéquate pour obtenir le composé d'intérêt. Nous avons émis l'hypothèse que la liaison hydrogène entre l'aldéhyde et le groupement hydroxy en *ortho*, formant un pseudo-cycle à 6 chainons (stable), désactivait la position phénol et ne permettait pas sa substitution. Cela pourrait expliquer le fait que la fixation d'un premier équivalent de vératryle soit bien plus rapide que la fixation du deuxième : le 4-hydroxy ne formant pas de liaison hydrogène réagit bien plus vite que le 2-hydroxy ; le 6-hydroxy, exclusivement engagé dans la liaison hydrogène avec l'aldéhyde, devient trop désactivé pour réagir. De fait, nous avons décidé de modifier cette fonction aldéhyde pour éliminer la présence de cette interaction et permettre l'alkylation des positions phénols.

2. Modifications de la fonction aldéhyde

Nous avons naturellement choisi de commencer par tenter la réduction de l'aldéhyde en alcool benzylique (Schéma 140) ; celui-ci devant de toute façon être obtenu au cours de la synthèse, converti en groupement partant et engagé dans l'éthérification du fluorophore 7-hydroxy-4-trifluorométhylecoumarine. Pour ce faire, le benzaldéhyde a été solubilisé dans du THF et du borohydrure de sodium a été ajouté à froid. Nous avons rapidement observé un changement de couleur de la solution (orange à incolore), nous indiquant la réduction de l'aldéhyde. L'alcool benzylique n'a cependant pas pu être extrait de la phase aqueuse, celui-ci s'étant montré bien trop polaire pour être soluble dans les solvants organiques usuels.



Schéma 140 : Réduction du 2.4.6-trihydroxybenzaldéhyde

N'ayant pas réussi à réduire l'aldéhyde en alcool, nous avons décidé de protéger cette fonction, toujours dans le but de réduire son influence supposée sur l'alkylation des positions phénols. Nous avons choisi de former des dérivés acétals correspondants, protection classique des fonctions aldéhydes (Schéma 141). Pour la première acétalysation, nous avons choisi de former le diméthyle acétal à partir de l'aldéhyde en utilisant 10 moles% de diode en solution dans le méthanol. Dans ce cas présent, aucune formation de l'acétal n'a été observée. Nous avons donc décidé d'utiliser une méthode plus courante (2), impliquant un acide fort (acide para-toluène sulfonique). Nous noterons que le 2.4.6-trihydroxybenzaldéhyde n'étant pas soluble dans le toluène, nous n'avons pas pu mettre en œuvre l'élimination de l'eau formée au cours de la réaction par un montage Dean-Stark : nous avons donc introduit de l'orthoformiate de méthyle afin de piéger l'eau et redonner du méthanol, solvant et réactif de l'acétalysation. Cette voie s'est soldé par un échec, c'est pourquoi nous avons tenté une dernière méthode d'acétalysation, anhydre cette fois (3) : en effet, celle-ci produit de l'hexaméthyldisiloxane; lequel n'est pas capable de réagir sur l'acétal pour redonner l'aldéhyde de départ. Si tenté que la réaction devrait être irréversible, il n'en est rien : aucune formation d'acétal n'est ici observée (aucune réaction).



Schéma 141 : Tentatives d'acétalysations réalisées

Nous avons alors supposé que le benzaldéhyde, hyperconjugué avec les 3 fonctions phénols de la molécule, n'était que peu réactif. De la même manière que l'aldéhyde pourrait être à l'origine du manque de réactivité des hydroxyles du cycle, ceux-ci modifient le comportement de l'aldéhyde. Nous avons également vu que la réduction produit un alcool hydrosoluble, qui ne peut être extrait. Il faudrait donc pouvoir moduler la conjugaison du cycle en neutralisant les fonctions phénols ou moduler la polarité du composé pour permettre d'isoler le produit de réduction : nous avons donc cherché par la suite à substituer les 3 hydroxyles par des groupements apolaires et suffisamment réactifs pour outrepasser leur manque de réactivité.

3. Modifications de polarité et de conjugaison des fonctions phénols

Comme nous le disions, l'introduction d'un groupement apolaire sur les positions phénols devra être réalisée en comptant sur la faible réactivité de ceux-ci. C'est pourquoi les réactifs utilisés devront être suffisamment électrophiles pour combler ce handicap.

Nous avons donc choisi de former les acétyles de phénols correspondants à partir du chlorure d'acétyle, celui-ci étant très réactif. La triacétylation du 2.4.6-trihydroxybenzaldéhyde a pu être réalisée en présence d'un excès de triéthylamine et de chlorure d'acétyle pour donner le composé **36**.

L'aldéhyde de celui-ci a ensuite été réduit par NaBH₄ à froid dans le méthanol pour donner l'alcool benzylique **37**. La protection de cette fonction par le TBDMSCI en présence d'imidazole a donné l'éther silylé **38** avec un rendement de 97% (Schéma 142).



Schéma 142 : Première étape de la stratégie de changement de polarité passant par un intermédiaire triacétylé

On notera que le produit de réduction **37** a cette fois pu être isolé et resolubilisé dans le DCM : la modulation de polarité a donc été utile en ce sens. Cependant, la déprotection des acétyles du composé **38** n'a pas pu être réalisée dans les conditions utilisés (Schéma 143). Il n'a en effet pas été possible d'obtenir le triphénol correspondant par hydrolyse acide ou réduction des acétyles, une dégradation ayant été systématiquement observée. On note que, dans ces 2 conditions, la présence du produit désilylé a pu être observé, suggérant une sensibilité du TBDMS à l'égard du méthanol comme du LiAlH₄. Une autre hypothèse pourrait être l'échange de TBDMS entre l'éther silylé benzylique et le phénol en *ortho*, obtenu après déacylation : l'éther silylé phénolique résultant étant bien plus sensible à l'hydrolyse, cela pourrait expliquer la sensibilité inattendue de l'éther.



Schéma 143 : Tentative de déacétylation du composé 38

N'ayant pas réussi à régénérer les fonctions phénols par cette méthode, nous avons décidé de changer de stratégie : en partant du dérivé triacétylé **36**, nous avons protégé la fonction aldéhyde en formant un thioacétal (Schéma 144). Cette fonction a l'avantage d'être facilement déprotégée sans avoir à utiliser des conditions drastiques. De plus, elle a permis de

nous affranchir de la fonction aldéhyde, laquelle était supposé être à l'origine du manque de réactivité des fonctions phénols (par conjugaison et/ou par formation de liaisons hydrogènes). On notera que la formation du O-acétal correspondant par la même méthode n'a pas pu être observée. Le dérivé thioacétal **39** a pu être déacétylé avec succès par méthanolyse basique pour donner le triphénol **40**.



Schéma 144 : Synthèse du dérivé triphénol comportant l'aldéhyde protégé sous forme thioacétal

Celui-ci a été engagé dans une réaction de SN2 avec le bromure de 6-nitrovératryle, en vue de former le dérivé triactivable voulu, sans succès : nous n'avons pu qu'isoler le dérivé 2.4divératrylé, sans détecter une trace de produit trivératrylé (Schéma 145). Il semblerait que l'ajout d'un catalyseur accélère la réaction de benzylation mais sans permettre d'accéder au composé tribenzylé, de même que la température. Nous avons à ce moment supposé que la présence du thioacétal induisait un encombrement stérique empêchant la réaction de se poursuivre au-delà de la di-substitution.



Schéma 145 : Tentative de substitution du composé 40

A la suite de cela, nous avons tenté d'introduire un groupement protecteur sur les positions phénols de taille similaire au nitrovératryle, puis de former l'acétal ou le thioacétal : ainsi, si on confirme la protection de l'aldéhyde, nous pourrons ensuite envisager de couper les groupements protecteurs et tenter de fixer les 6-nitrovératryles sur les positions phénols. Nous avons donc commencé par benzyler le 2.4.6-trihydroxybenzaldéhyde par réaction de celui-ci sur le bromure de benzyle, en présence de Cs₂CO₃ et d'iodure de potassium. On isole, après 48h à 80°C, le composé tribenzylé **41** avec un rendement de 57%. Cette réaction avait

été décrit par le passé, le bromure de benzyle pouvant être considéré plus réactif que le vératryle correspondant (probablement dû à la présence de l'ortho-nitro). Celui-ci a été engagé dans des réactions d'acétalysation/thioacétalysation, sans le moindre succès (Schéma 146). Nous avons alors suggéré que ces groupements protecteurs de l'aldéhyde étaient bien trop volumineux pour permettre la présence d'un groupement benzyle en *ortho/ortho'* : de fait, nous avons décidé de ne pas poursuivre les protections de la fonction aldéhyde par un acétal ou un thioacétal.



Schéma 146 : Formation de III-B-1 et tentative de protection de la fonction aldéhyde

Nous avons poursuivi les protections des phénols, toujours pour permettre de diminuer la polarité de la molécule et permettre ainsi d'isoler le produit de réduction de l'aldéhyde.

Nous avons choisi de protéger les trois hydroxyles par des fonctions allyles, celle-ci étant sélectivement et facilement retirées en présence de palladium. De plus, les éthers d'allyles peuvent être formés par le biais de bromure d'allyle, suffisamment réactif pour outrepasser la faible réactivité des phénols ci présents.

L'allylation du 2.4.6-trihydroxybenzaldéhyde dans le DMF en présence de bromure d'allyle et de carbonate de césium donne le composé triallylé **42** avec un rendement de 65%.

Celui-ci est ensuite réduit pour donner l'alcool benzylique **43** avec un rendement très correct (93%).

Cependant, au cours de la protection de l'alcool par un éther silylé (Schéma 147), nous avons observé de multiples dégradations ; ce qui nous a empêché de poursuivre la suite de la synthèse. Comme rien ne s'était produit au cours de la réaction et que le composé s'est dégradé pendant l'étape de purification, nous en avons déduit que le produit n'était pas stable et nous avons décidé de rechercher les raisons de son instabilité.

Les analyses UPLC/MS ont montré plusieurs produits dont la masse correspondrait à de multiples réarrangement de Claisen.



Schéma 147 : Voie synthèse en vue de l'obtention du composé triallylé comportant un éther silylé benzylique

Nous avons dès lors opté par un groupement plus stable que l'allyle afin de parvenir à achever la synthèse d'un triphénol possédant un alcool benzylique protégé. Le groupement protecteur que nous avons retenu est le méthoxyméthyle (MOM). Celui-ci est introduit sur les trois hydroxyles par réaction entre le 2.4.6-trihydroxybenzaldéhyde et le chlorure de méthoxyméthyle, à froid et en présence de DIEA (Schéma 148). Le composé triprotégé **44** ainsi obtenu a été réduit par du LiAlH₄ (le NaBH₄ s'étant révélé inefficace) pour donner l'alcool **45** avec un rendement modeste de 56%. Les groupements MOM devant être retirés en condition acide, nous avons choisi de protéger l'alcool benzylique par un groupement allyle plutôt que par un éther silylé. Le composé protégé **46** a ainsi pu être isolé avec un rendement de 91%.



Schéma 148 : Obtention du composé 46, en vue de produire un triphénol fonctionnalisable

Néanmoins, la déprotection des groupements MOM ne s'est pas déroulée comme nous l'avions prévu : l'ajout de TFA a été suivi immédiatement par la formation d'un polymère, dont nous proposons un mécanisme de formation (Schéma 149). Le clivage du groupement MOM est accompagné de dégagement d'éthylène et de formaldéhyde. Ce dernier peut à son tour

être protoné et réagir avec les cycles aromatiques en présence pour former les polyphénols correspondants. Chaque phénol pouvant réagir sur une molécule de formaldéhyde, cela entraine inévitablement la formation de polymères.



Schéma 149 : Mécanisme de polymérisation au cours de la déprotection des MOM

Au vue de ce mécanisme, nous pouvons en déduire que la présence d'eau pourrait éviter ce phénomène de polymérisation indésirable, celle-ci piégeant le formaldéhyde sous forme de méthylène glycol partant ensuite dans la phase aqueuse. Nous devrons donc retenter la déprotection en milieu non anhydre.

4. Réaction sur le phloroglucinol

Parallèlement à cette approche, nous avons réfléchi à une méthode alternative pour arriver à la structure finale. Après réflexion sur les causes de nos échecs, nous avons pu déduire que la présence d'une fonction benzylique était la source de nombre de nos problèmes : dans le cas de l'aldéhyde, celui rend impossible la fixation du vératryle sur l'ensemble des fonctions, et doit donc être modifié ; les acétals et thioacétals se sont avérés être de mauvais groupements protecteurs dans notre cas, ceux-ci étant soit non formés soit trop volumineux pour permettre la substitution du vératryle par le phénol *ortho* ; l'alcool benzylique impose une série de protection/déprotection, dont aucune n'a pu aboutir au composé voulu.

De fait, nous avons désiré effectuer la substitution de trois fonctions phénols avant d'introduire l'aldéhyde par une réaction de Vilsmeier-Haack, par exemple. Nous sommes pour cela parti du phloroglucinol (1.3.5-trihydroxybenzène), lequel a été engagé dans une réaction de SN2 avec le bromure de 6-nitrovératryle, en présence d'une base et à température

ambiante (Schéma 150). On note que le bromure de 6-nitrovératryle est rapidement et intégralement consommé, indiquant la fin de la réaction. Cependant, aucun des deux produits du milieu réactionnel n'est le dérivé trisubstitué : il s'agit d'un mélange de disubstitué (sur deux positions phénols) et de quadrisubstitué (sur les trois positions phénols et sur une position du cycle aromatique), produit de SeAr. Afin de défavoriser la SeAr, nous avons diminué la température jusqu'à -20°C, sans pour autant défavoriser la substitution électrophile du bromure de 6-nitrovératryle par ce cycle aromatique extrêmement riche en électrons. Nous n'avons pas continué dans cette voie, jugeant la modulation de polarité par les MOM plus prometteuse.



Schéma 150 : Tentative d'éthérification du phloroglucinol

5. Travaux en cours et perspectives

A la suite de nos observations, nous avons déduit que certaines voies de synthèse pour l'obtention du composé triactivable méritent d'être approfondies. C'est notamment le cas de la synthèse décrite au schéma 148 : cette méthode s'est avérée efficace jusqu'à l'étape de déprotection. Nous pensons avoir identifié la raison de son échec : si notre hypothèse de polymérisation est correcte, alors l'ajout d'eau devrait permettre d'éviter celle-ci et d'obtenir le composé trihydroxyle. Si cette voie ne permet pas d'aboutir au composé désiré, nous choisirons d'appliquer l'autre stratégie que nous avons mentionnée au paragraphe II-A-2 : construire une liaison carbonate entre les phénols et les 6-nitrovératryles par réaction avec les chloroformates de vératryles. Le chloroformate étant une fonction nettement plus réactive que le bromure correspondant, cela pourrait permettre de synthétiser le dérivé trivératryle à partir du 2.4.6-trihydroxybenzaldéhyde.

Conclusions et perspectives

Les projets présentés ici ont été menés en collaboration avec une équipe de l'ENS, dans la lignée des projets antérieurs concernant les espaceurs auto-immolables. Les résultats jusqu'alors obtenus avaient permis une avancée remarquable dans ce domaine. Nous avons voulu par la suite continuer à contribuer au développement des espaceurs auto-immolables, que ce soit en apportant des informations complémentaires relatives à leur fonctionnement ou en développent des structures inédites pour palier leurs éventuels désavantages.

• Etudes cinétiques d'espaceurs cyclisants (Schéma 151)



Schéma 151 : Espaceurs basés sur un processus de cyclisation considérés dans cette étude

- L'étude cinétique du dérivé ester du trimethyl lock (TML) nous a permis de déterminer un temps de cyclisation de l'ordre de la minute, tendant à prouver que la vitesse de désassemblage de ce dérivé est moins élevée que ce qui avait été supposé. Il serait informatif de déterminer la cinétique du dérivé amide (TML-amide) afin de mieux décrire cette série.
- Les études cinétiques réalisées sur les dérivés 2-hydroxyphényl carbamates (2-HPC) ont permis de mettre en évidence des temps de cyclisations relativement indépendants de la substitution du cycle aromatique. De plus, les vitesses de cyclisation sont du même ordre de grandeur que celle du dérivé trimethyl lock. Enfin, on note que ces travaux nous ont permis de réaliser la première étude cinétique comparative des processus de cyclisation et d'élimination.
- Cette étude a donné lieu à une publication (Org. Biomol. Chem., 2017,15, 3435-3443).

• Synthèse d'espaceurs bi-activables

Afin de répondre au manque de sélectivité parfois relaté dans la littérature, nous avons décidé de construire une nouvelle génération d'espaceurs auto-immolables répondant à une double activation. Deux séries ont ainsi été considérées (Schéma 152) :

- Les bis-amides : il n'a, à l'heure actuelle, pas été possible d'obtenir un dérivé fonctionnel bis-amide. Cependant, de nouvelles structures inspirées de la littérature

ont été envisagées : des essais de synthèse sont envisageables pour tenter d'accéder à une structure bis-amide auto-immolable.

Les bis-carbamates : nous avons mis au point une méthode de synthèse permettant d'accéder à ce motif. Celle-ci fait intervenir une base dure (KHMDS), laquelle permet l'obtention de l'aniline dicarbonylée voulue avec un rendement satisfaisant (60%) ; ce qui n'était que peu décrit auparavant, principalement comme di-protection de l'aniline. Nous avons par la suite réussi à prouver le concept de double activation en utilisant 2 conditions simultanées (la lumière pour le groupement vératryle, et le palladium pour l'allyle). Il est intéressant de noter que cette propriété est inscrite dans la structure de notre espaceur auto-immolable, ce qui n'avait jusqu'alors pas été décrit : afin de démontrer l'efficacité de cette nouvelle classe d'espaceurs dans un contexte biologique, nous envisageons de synthétiser un espaceurs dont les deux groupements activateurs seront des substrats spécifiquement activables *in cellulo*.



Schéma 152 : Structures cibles des espèces dicarbonylées ; seul le bis-carbamate a pu être obtenu à ce jour

Phénol multi-branchés hypersensible

Un autre défi dans la construction d'espaceurs auto-immolable est le manque de sensibilité de ceux-ci pour leurs voies d'activations. Or, si l'activation n'est pas efficace, peu de composés d'intérêt seront libérés : ceci rendrait l'espaceur en question peu performant. Dans le but de produire un espaceur plus sensible, nous avons tenté de synthétiser un espaceur triactivable (Schéma 153) : celui-ci, sachant qu'une seule activation suffit à induire l'auto-immolation, aurait été particulièrement sensible à son stimulus activateur. Cependant, ce composé n'a pas encore pu être synthétisé ; les efforts se poursuivent pour parvenir à isoler cette molécule prometteuse.



Schéma 153 : Structure cible du dérivé trisubstitué hypersensible

Annexe

Dans la plupart des cas que nous avons évoqué (à savoir : élimination 1.4 et 1.6, cyclisation 1.5 et 1.6), le processus d'auto-immolation est constitué de deux étapes (Schéma 154) : l'activation photochimique et l'étape d'auto-immolation à proprement parler. Chacune de ces étapes possèdent une constante cinétique, respectivement : k₁, constante cinétique de photolyse et k₂, constante cinétique d'auto-immolation. L'activation du réactif (espaceur avant activation), noté R, donne l'intermédiaire, noté I, avant de donner le produit, noté P, après auto-immolation.



Schéma 154 : Modèle cinétique employé par notre équipe

Les variations des concentrations de chaque espèce (R, I, P) sont données par les équation 1-3 :

$$\frac{dR}{dt} = -k_1 R \tag{1}$$

$$\frac{dI}{dt} = k_1 R - k_2 I \tag{2}$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2 I \tag{3}$$

obéissant à la loi de conservation de la matière, le système étant clos (cuvette) :

$$R_0 = R + I + P \tag{4}$$

Dans le cas général, les constantes k_1 et k_2 sont différentes. De fait, les solutions aux équations 1-3 sont exprimées dans les équations 5-7 :

$$\frac{R(t)}{R_0} = -e^{-k_1 t}$$
(5)

$$\frac{I(t)}{R_0} = \frac{k_1}{k_2 - k_1} \left(-e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t} \right)$$
(6)

$$\frac{P(t)}{R_0} = 1 - \frac{k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}}{k_2 - k_1}$$
(7)

Dans les cas, rares, où k_1 et k_2 seraient identiques, les solutions aux équations 1-3 seraient données par les équations 5,8-9 :

$$\frac{I(t)}{R_0} = k_1 t e^{-k_1 t}$$
(8)

$$\frac{I(t)}{R_0} = 1 - (1 + k_1 t)e^{-k_1 t}$$
(9)

Sachant que la fluorescence totale émise est proportionnelle à la somme de la fluorescence de chaque espèce et que ces fluorescences sont-elles même proportionnelles aux concentrations de chaque espèce, on déduit l'équation 10 :

$$I_{F}^{f}(t) = \alpha [Q_{R}^{f}R(t) + Q_{I}^{f}I(t) + Q_{P}^{f}$$
(10)

où I_F^f , α , et Q_i^f désignent respectivement : l'intensité de fluorescence totale du fluorophore f, le facteur optique proportionnel, et la brillance de l'espèce i dans la gamme de fluorescence du fluorophore f. Après normalisation par la valeur finale de la fluorescence, l'équation 11 est obtenue :

$$\frac{I_F^I(t)}{I_F^f(\infty)} = q_R^f \frac{R(t)}{R_0} + q_I^f \frac{I(t)}{I_0} + \frac{P(t)}{P_0}$$
(11)

Avec q_i^f , la brillance relative de l'espèce i.

Appuyé par nos observations précédentes¹²⁵, nous assumons que la brillance de R peut être négligée, ce qui nous donne l'équation finale 12 :

$$I_F^f(t) = I_F^f(\infty) \left(q_I^f \frac{I(t)}{I_0} + \frac{P(t)}{P_0} \right)$$
(12)

On admettra que, dans les modèles à plus de 2 étapes (éliminations de carbonate et carbamates), la dernière étape (décarboxylation) peut être négligée cinétiquement ; comme nous l'avons dit précédemment, le modèle associé est le modèle à deux étapes que nous venons de décrire.

Références

- 1. P. L. Carl, P. K. Chakravarty, J. A. Katzenellenbogen, J. Med. Chem., 1981, 24, 5, 479-480
- 2. F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke, ChemMedChem, 2008, 3, 20–53
- P. K. Chakravarty, P. L. Carl, M. J. Weber, J. A. Katzenellenbogen, J. Med. Chem., 1983, 26, 5, 638-644
- 4. Y.-L. Leu, C.-S. Chen, Y.-J. Wu, J.-W. Chern, J. Med. Chem., 2008, 51, 1740–1746
- K. Bosslet, R. Straub, M. Blumrich, J. Czech, M. Gerken, B. Sperker, H. K. Kroemer, J.-P. Gesson, M. Koch, C. Monneret, Cancer Res., 1998, 58, 6, 1195-1201
- M. Grinda, J. Clarhaut, B. Renoux, I. Tranoy-Opalinski, S. Papot, Med. Chem. Commun., 2012, 3, 68
- 7. K. Abu Ajaj, F. Kratz, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, 19, 995–1000
- 8. Y. Wang, J. Li, L. Feng, J. Yu, Y. Zhang, D. Ye, H.-Y. Chen, Anal. Chem., 2016, 88, 12403–12410
- 9. V. J. Stella, K. J. Himmelstein, J. Med. Chem., 1980, 23, 12, 1275-1282
- 10. R. B. Greenwald, Y. H. Choe, C. D. Conover, K. Shum, D. Wu, M. Royzen, J. Med. Chem., 2000, 43, 475-487
- 11. S. K. Kumar, S. A. Williams, J. T. Isaacs, S. R. Denmeade, S. R. Khan, Bioorg. Med. Chem., 2007, 15, 4973–4984
- 12. A. K. Sinhababu, D. R. Thakker, Advanced Drug Delivery Reviews, 1996, 19, 241-273
- 13. E. W.P. Damen, T. J. Nevalainen, T. J.M. van den Bergh, F. M.H. de Groot, H. W. Scheeren, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 71–77
- 14. J. L. Major Jourden, S. M. Cohen, Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 6795 6797
- 15. A. B. Mauger, P. J. Burke, H. H. Somani, F. Friedlos, R. J. Knox, J. Med. Chem. 1994,37, 3452-3458
- 16. A. El Alaoui, N. Saha, F. Schmidt, C. Monneret, J.-C. Florent, Bioorg. Med. Chem., 2006, 14, 5012–5019
- 17. J. Wagner, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, Science. 1995, 270,1797-1800
- D. Shabat, H. N. Lode, U. Pertl, R. A. Reisfeld, C. Rader, R. A. Lerneri, C. F. Barbas III, PNAS, 2001, 98, 13, 7528–7533
- K. Haba, M. Popkov, M. Shamis, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, D. Shabat, Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 716 – 720
- 20. H. J. Schuster, B. Krewer, J. Marian von Hof, K. Schmuck, I. Schuberth, F. Alves, Lutz F. Tietze, Org. Biomol. Chem., 2010, 8, 1833–1842
- 21. A. El Alaoui, F. Schmidt, M. Amessou, M. Sarr, D. Decaudin, J.-C. Florent, L. Johannes, Angew. Chem. Int. Ed., 2007, 46, 6469–6472
- 22. C. Batisse, E. Dransart, R. Ait Sarkouh, L. Brulle, S.-K. Bai, S. Godefroy, L. Johannes, F. Schmidt, Eur J Med Chem, 2015, 95, 483-491
- 23. V. Kostova, E. Dransart, M. Azoulay, L. Brulle, S.-K. Bai, J.-C. Florent, L. Johannes, F. Schmidt, Bioorg Med Chem., 2015,23, 22, 7150-7157
- 24. S. Chen, X. Zhao, J. Chen, J. Chen, L. Kuznetsova, S. S. Wong, I. Ojima, Bioconjugate Chem., 2010, 21, 979–987
- 25. R. Perry-Feigenbaum, E. Sella, D. Shabat, Chem. Eur. J., 2011, 17, 12123-12128
- 26. E. Sella, A. Lubelski, J. Klafter, D. Shabat, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 11, 3945–3952
- 27. N.-H. Ho, R. Weissleder, C.-H. Tung, ChemBioChem, 2007, 8, 560 566
- 28. X.-B. Zhang, M. Waibel, J. Hasserodt, Chem. Eur. J., 2010, 16, 792 795

- 29. I. F. Antunes, H. J. Haisma, P. H. Elsinga, R. A. Dierckx, E. F. J. de Vries, Bioconjugate Chem., 2010, 21, 911–920
- T. Chauvin, P. Durand, M. Bernier, H. Meudal, B.-T. Doan, F. Noury, B. Badet, J.-C. Beloeil, E. Tóth, Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47, 4370 –4372
- J. He, C. S. Bonnet, S. V. Eliseeva, S. Lacerda, T. Chauvin, P. Retailleau, F. Szeremeta, B. Badet, S. Petoud, E. Tóth, P. Durand, J. Am. Chem. Soc., 2016, 138, 2913–2916
- 32. H.-Y. Lee, X. Jiang, D. Lee, Org. Lett., 2009, 11, 10, 2065-2068
- 33. I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien, Chem. Eur. J., 2006, 12, 6865 6879
- 34. A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, I. Aujard, S. Dubruille, F. Schmidt, L. Jullien, Chem. Eur. J., 2013, 19, 11717 11724
- 35. C. Frugoni, Gazz. Chim. Ital., 1957, 87, 403-407
- 36. S. L. Johnson, D. L. Morrison, J. Am. Chem. Soc., 1972, 94, 4, 1323-1334
- 37. R. Perry-Feigenbaum, P. S. Baran, D. Shabat, Org. Biomol. Chem., 2009, 7, 4825–4828
- A. Alouane, R. Labruère, K. J. Silvestre, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, Chem. Asian J., 2014, 9, 1334–1340
- 39. K. M. Schmid, L. Jensen, S. T. Phillips, J. Org. Chem., 2012, 77, 4363-4374
- 40. K. M. Schmid, S. T. Phillips, J. Phys. Org. Chem., 2013, 26, 608-610
- 41. A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, Angew. Chem. Int. Ed., 2015, 54, 7492 7509
- 42. A. D. Wong, M. A. DeWit, E. R. Gillies, Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64, 1031–1045
- 43. F. M. H. de Groot, C. Albrecht, R. Koekkoek, P. H. Beusker, H. W. Scheeren, Angew. Chem. Int. Ed., 2003, 42, 4490 4494
- 44. F. M. H. de Groot, W. J. Loos, R. Koekkoek, L. W. A. van Berkom, G. F. Busscher, A. E. Seelen, C. Albrecht, P. de Bruijn, H. W. Scheeren, J. Org. Chem., 2001, 66, 8815-8830
- 45. A. Warnecke, F. Kratz, J. Org. Chem., 2008, 73, 1546-1552
- 46. M. Shamis, H. N. Lode, D. Shabat, J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, 6, 1726–1731
- 47. P. D. Senter, W. E. Pearce, R. S. Greenfield, J. Org. Chem., 1990, 55, 2975-2978
- 48. M. P. Hay, R. F. Anderson, D. M. Ferry, W. R. Wilson, W. A. Denny, J. Med. Chem., 2003, 46, 5533-5545
- 49. C. A. Blencowe, D. W. Thornthwaite, W. Hayes, A. T. Russell, Org. Biomol. Chem., 2015, 13, 8703-8707
- 50. E. L. Schneider, L. Robinson, R. Reid, G. W. Ashley, D. V. Santi, Bioconjugate Chem., 2013, 24, 1990–1997
- 51. W. Seo, S. T. Phillips, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 27, 9234–9235
- 52. A. Satyam, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, 18, 3196-3199
- 53. D. Shan, M. G. Nicolaou, R. T. Borchard, B. Wang, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1997, 86, 7, 765-767
- 54. A. Zheng, D. Shan, X. Shi, B. Wang, J. Org. Chem. 1999, 64, 7459-7466
- 55. A. Zheng, D. Shan, B. Wang, J. Org. Chem. 1999, 64, 156-161
- 56. M. A. DeWit, E. R. Gillies, Org. Biomol. Chem., 2011, 9, 1846-1854
- 57. J.E.C. Hutchins, T.H Fife, J. Am. Chem. Soc. 1973, 95, 2282
- 58. A. Vigroux, M. Bergon, Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995, 5, 427
- 59. A. Vigroux, M. Bergon., C. Zedde, J. Med. Chem. 1995, 38, 3983

- 60. F. Schmidt, J.-C. Florent, C. Monneret, R. Straub, J. Czech, M. Gerken and K. Bosslet, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1997, 7, 1071–1076.
- 61. F. Schmidt, C. Monneret, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2002, 1302–1308
- 62. F. Schmidt, C. Monneret, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2003, 11, 2277–2283
- 63. R. M. Beesley, C. K. Ingold, J. F. Thorpe, J. Chem. Soc., Trans., 1915, 107, 1080.
- 64. M. N. Levine, R. T. Raines, Chem. Sci., 2012, 3, 2412.
- 65. I. Daryaei, K. M. Jones, M. D. Pagel, Chem. Eur. J. 2017, 23, 6514 6517
- 66. D. Shan, M. G. Nicolaou, R. T. Borchardt, B. Wang, J. Pharm. Sci., 1997, 86, 7, 765–767.
- 67. L. J. Small, D. R. Wheeler and E. D. Spoerke, Nanoscale, 2015, 7, 16909-16920
- 68. D. P. Walton, D. A. Dougherty, J. Am. Chem. Soc. 2017, 139, 4655-4658
- 69. C. J. Regan, D. P. Walton, O. S. Shafaat, D. A. Dougherty, J. Am. Chem. Soc., 2017, 139, 13, 4729–4736
- 70. M. G. Nicolaou, C.-S. Yuan, R. T. Borchardt, J. Org. Chem. 1996, 61, 8636-8641.
- 71. Z. Meng, Q. Lv, J. Lu, H. Yao, X. Lv, F. Jiang, A. Lu, G. Zhang, Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 796
- 72. M. N. Levine, T. T. Hoang, R. T. Raines, Chemistry & Biology 20, 614-618
- 73. D. Mustafa, D. Ma, W. Zhou, P. Meisenheimer, J. J. Cali, Bioconjugate Chem., 2016, 27, 1, 87– 101.
- 74. A. Shigenaga, J. Yamamoto, T. Kohiki, T. Inokumaa, A. Otaka, J. Pept. Sci., 2017
- 75. K. A. Andersen, T. P. Smith, J. E. Lomax, R. T. Raines, ACS Chem. Biol., 2016, 19, 11, 319-23
- 76. C. Ji, M. J. Miller, Biometals, 2015, 28, 3, 541-51
- 77. H. Gong, B. Zhang, G. Little, J. Kovar, H. Chen, W. Xie, A. Schutz-Geschwender, D. M. Olive, Anal. Biochem., 2009, 386, 59–64
- 78. S. Desbene, H.D.T. Van, S. Michel, F. Tillequin, M. Koch, F. Schmidt, J.C. Florent, C. Monneret,
 R. Straub, J. Czech, M. Gerken, K. Bosslet, Anti-Cancer Drug Design, 1999, 14, 96-106
- 79. S. U. Hettiarachchi, B. Prasai, R. L. McCarley, J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 7575-7578
- 80. H. B. Bosmann, T. C. Hall, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 5, 1833-1837
- 81. S. Wen, D. Zhu1, P. Huang Future Med Chem. 2013, 5, 1, 53–67
- 82. A. Romieu, Org. Biomol. Chem., 2015, 13, 1294
- 83. H. Matsuzaki, M. Kamiya, R. J. Iwatate, D. Asanuma, T. Watanabe, Y. Urano, Bioconjugate Chem. 2016, 27, 973–981
- 84. W. Chyan, D. Y. Zhang, S. J. Lippard, R. J. Radford, PNAS, 2014, 7, 111, 143-148
- 85. M. Beija, C. A. M. Afonso, J. M. G. Martinho, Chem. Soc. Rev., 2009, 38, 2410–2433
- 86. H. Lu, J. Mack, Y. Yang, Z. Shen, Chem. Soc. Rev., 2014, 43, 4778
- 87. Y. Ni, J. Wu, Org. Biomol. Chem., 2014, 12, 3774
- E. Azuma, N. Nakamura, K. Kuramochi, T. Sasamori, N. Tokitoh, I. Sagami, K. Tsubaki, J. Org. Chem. 2012, 77, 3492–3500
- 89. W. Jiang, W. Wang, Chem. Commun., 2009, 3913–3915
- 90. Y. Tang, S. Cui, S. Pu, J Fluoresc, 2016, 26, 1421-1429
- 91. P. Hou, S. Chen, H. Wang, J. Wang, K. Voitchovsky, X. Song, Chem. Commun., 2014, 50, 320
- 92. J. Kim, J. Park, H. Lee, Y. Choi, Y. Kim, Chem. Commun., 2014, 50, 9353
- 93. S.-Y. Li, L.-H. Liu, H. Cheng, B. Li, W.-X. Qiu, X.-Z. Zhang, Chem. Commun., 2015, 51, 14520
- 94. J. L. Klockow, K. S. Hettie, T. E. Glass, ACS Chem. Neurosci. 2013, 4, 1334–1338
- 95. K. S. Hettie, J. L. Klockow, T. E. Glass, J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 4877-4880
- 96. K. P. Carter, A. M. Young, A. E. Palmer, Chem. Rev. 2014, 114, 4564-4601
- 97. J. Zhao, Z. He, B. Li, T. Cheng, G. Liu, Materials Science and Engineering C, 2017, 73, 1–7

- 98. J. Broichhagen, J. A. Frank, D. Trauner, Acc. Chem. Res., 2015, 48, 7, 1947–1960
- 99. A. P. Singh, D. P. Murale, Y. Ha, H. Liew, K. M. Lee, A. Segev, Y.-H. Suh, D. G. Churchill, Dalton Trans., 2013, 42, 3285
- 100. D. P. Murale, H. Liew, Y.-H. Suh, D. G. Churchill, Anal. Methods, 2013, 5, 2650
- 101. T.-I. Kim, M. S. Jeong, S. J. Chung, Y. Kim, Chem. Eur. J. 2010, 16, 5297 5300
- 102. T.-I. Kim, H. Kim, Y. Choi, Y. Kim, Chem. Commun., 2011, 47, 9825–9827
- 103. S. Debieu, A. Romieu, Org. Biomol. Chem., 2015, 13, 10348
- 104. J. B. Grimm, T. D. Gruber, G. Ortiz, T. A. Brown, L. D. Lavis, Bioconjugate Chem. 2016, 27, 474–480
- Y. Meyer, J.-A. Richard, M. Massonneau, P.-Y. Renard, A. Romieu, Org. Lett., 2008, 10, 8, 1517-1520
- 106. R. A. Mosey, P. E. Floreancig, Org. Biomol. Chem., 2012, 10, 7980
- 107. G. C. Van de Bittner, C. R. Bertozzi, C. J. Chang, J. Am. Chem. Soc., 2013, 135, 1783–1795
- 108. M. Prost, J. Hasserodt, Chem. Commun., 2014, 50, 14896
- 109. P. Klan, T. Solomek, G. G. Bochet, A. Blanc, RI Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, Chem. Rev. 2013, 113, 119–191
- M. N. Stanton-Humphreys, R. D. T. Taylor, C. McDougall, M. L. Hart, C. T. A. Brown, N. J. Emptage, S. J. Conway, Chem. Commun., 2012, 48, 657–659
- 111. Y. Basel, A. Hassner, J. Org. Chem., 2000, 65, 20, 6368 6380
- 112. K. Morihiro, T. Kodama, S. Mori, S. Obika, Org. Biomol. Chem., 2014,12, 2468
- M. Zindler, B. Pinchuk, C. Renn, R. Horbert, A. Dçbber, C. Peifer, ChemMedChem 2015, 10, 1335 – 1338
- 114. S. U. Hettiarachchi, B. Prasai, R. L. McCarley, J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 7575–7578
- 115. G. Barany, A. L. Schroll, A. W. Mott, D. A. Halsrud, J. Org. Chem. 1983, 48, 4750-4761
- 116. FR2220513DE2311662
- 117. G. A. Olah, J. T. Welch, Y. D. Vankar, M. Nojima, I. Kerekes, J. A. Olah, J. Org. Chem., 44, 22, 1979
- 118. J. Li, J. Yu, J. Zhao, J. Wang, S. Zheng, S. Lin, L. Chen, M. Yang, S. Jia, X. Zhang, P. R. Chen, Nat Chem. 2014, 6, 4, 352-61
- 119. B. Imperiali, B.N. Goguen, A. Aemissegger, J. Am. Chem. Soc., 2011, 133, 11038.
- 120. A. Dragulescu-Andrasi, G. Liang, J. Rao, Bioconjugate Chem. 2009, 20, 1660–1666
- 121. J. M. Coppola, M. S. Bhojani, B. D. Ross, A. Rehemtulla, Neoplasia, 2008, 10, 363–370
- 122. B. Huang, W. Chen, Y.-Q. Kuang, W. Liu, X.-J. Liu, L.-J. Tang, Jian-Hui Jiang, Org. Biomol. Chem., 2017, 15, 4383
- 123. S. Luo, R. Zou, J. Wu, M. P. Landry, ACS Sens.
- 124. S. Gnaim, D. Shabat, Acc. Chem. Res. 2014, 47, 2970–2984
- 125. R. Labruere, A. Alouane, T. Le Saux, I. Aujard, P. Pelupessy, A. Gautier, S. Dubruille, F. Schmidt, L. Jullien, Angew. Chem. 2012, 124, 9478 –9481
- 126. Z. Wang, J. Sun, X. Jia, J. Polym. Sci. Pol. Chem., 2014, 52, 1962–1969
- 127. N. Fomina, C. McFearin, M. Sermsakdi, O. Edigin, A. Almutairi, J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 9540–9542
- 128. M. E. Roth, O. Green, S. Gnaim, D. Shabat, Chem. Rev. 2016, 116, 1309–1352
- 129. A. Gopin, S. Ebner, B. Attali, D. Shabat, Bioconjugate Chem. 2006, 17, 1432-1440
- 130. R. J. Amir, D. Shabat, Chem. Commun., 2004, 1614 1615

- 131. R. J. Amir, M. Popkov, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, D. Shabat, Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 4378 4381
- 132. R. J. Amir, D. Shabat, US20060269480 A1
Experimental section

The commercially available chemicals were used without further purification. Anhydrous solvents were freshly distilled before use or obtained from solvent purificator Pure SolvTM. Low actinic glassware and aluminium film were used for all experiments involving compounds bearing the nitroveratryl moiety. Column chromatography (CC): silica gel 60 (0.040-0.063mm) Merck. Analytical and thin layer chromatography (TLC): Merck silica gel 60 F-254 precoated plates; detection by UV (254 and 365 nm). ¹H NMR spectra were recorded at 300 MHz. ¹³C NMR spectra were recorded at 75 MHz with complete proton decoupling; chemical shifts (δ) in ppm related to protonated solvent as internal reference (¹H: CHCl₃ in CDCl₃, 7.26 ppm; ¹³C: ¹³CDcl₃ in CDcl₃, 77.0 ppm; ¹H: CH₃OH in CD₃OD; ¹³C: ¹³CD₃OD in CD₃OD; ¹H: CH₃CN in CD₃CN; ¹³C: ¹³CD₃¹³CN in CD₃CN); Coupling constants *J* in Hz; current notations are used for multiplicity (s: singlet; bs: broad singlet; d: doublet; dd: doublet doublet; t: triplet; q: quadruplet; m: multiplet).

I. Cyclisation series

A. 2-HPC





sodium hydrogenocarbonate (326.8 mg, 3.89 mmoles, 1.2 eq.) and overnight at room temperature. The solution was concentrated *in vacuo* and then extracted by $K_2CO_{3(aq)}$. The aqueous phase was reacidified by $HCl_{(aq)}$ 1M to pH 7 and extracted by EtOAc; the resulting organic phase was washed by distilled water and brine. The organic phase was dried on MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (0 to 20% EtOAc/Cx) to get the product as a red solid (272 mg, 50%).

Rf = 0.21 (20% EtOAc/Cx).

δ_H (CDCl₃) 2.94 (s, 3H), 6.73 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.43 (d, 1H, J = 2.6 Hz), 7.54 (d, 1H, J = 2.6 Hz).

 $\boldsymbol{\delta_{c}\,\text{(CDCl}_3)}\,30.2,\,104.7,\,112.6,\,113.6,\,138.6,\,142.5,\,149.0.$

*m***/z** 169 [M+H]⁺.





To a solution of I-A-2 (240 mg, 1.43 mmoles, 1 eq.) in 5 mL of a blend of THF/water (1:1) were added K₂CO₃ (988.2 mg, 7.15 mmoles, 5 eq.) and di-tert-butyl dicarbonate (812 mg, 3.72 mmoles, 2.6 eq.). After stirring for 4 h at room temperature, the mixture was neutralised (acetic acid 100%, until pH 7), the organic layer was diluted with EtOAc and washed with water and brine, then dried on MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was resolubilized in dry MeOH and we added K₂CO₃ (988.2 mg) and stirred at room temperature until no more evolution is observed (as seen on TLC, between 1 h30 min and 4 h). The same work-up as previously applied to obtain the crude product. (375 mg, quant.). **Rf** = 0.34 (30% EtOAc/Cx). δ_{H} (CDCl₃) 1.52 (s, 9H), 3.28 (s, 3H), 7.03 (d, 1H, J = 8.9 Hz), 8.01 (d, 1H, 2.3 Hz), 8.06 (d, 1h, J = 2.3 Hz).

δ_c (CDCl₃) 28.2, 30.2, 83.4, 104.7, 112.7, 116.7, 121.2, 125.9, 153.2, 157.1. *m*/z 269 [M+H]⁺.



To a solution of **I-A-3** (108 mg, 0.41 mmoles, 1 eq.) in 5 mL of dry DMF were added 4.5dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide (112.4 mg, 0.41 mmoles, 1 eq.) and cesium carbonate (202.1 mg, 0.62 mmoles, 1.5 eq.). After stirring for 2 h at room temperature, the mixture was diluted with EtOAc and treated with water and brine, then dried on MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography and obtained pure as a white solid (76mg, 40%).

Rf = 0.37 (20% EtOAc/Cx).

δ_H (CDCl₃) 1.42 (s, 9H), 3.25 (s, 3H), 3.98 (s, 6H), 5.61 (s, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.42 (d, 1H, J = 8.9 Hz), 7.81 (s, 1H), 8.16 (d, 1H, 2.3 Hz), 8.25 (d, 1h, J = 2.3 Hz)

 δ_{c} (CDCl₃) 29.7, 30.2, 56.5, 68.2, 84.1, 103.9, 108.3, 109.7, 113.0, 126.1, 126.7, 127.2, 139.7, 143.2, 148.4, 149.9, 151.2, 153.9.



A solution of I-A-4 (50 mg, 0.11 mmoles, 1 eq.) in 3 mL of a blend of TFA/DCM (1:1) was stirred 2h at room temperature. The mixture was then treated by $K_2CO_{3(aq)}$, water and brine, dried on MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was obtained without purification as a yellow solid (40 mg, quant.). **Rf** = 0.11 (40% EtOAc/Cx).

δ_H (CDCl₃) 2.96 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 4.54 (ls, 1H), 5.62 (s, 2H), 6.75 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 7.04 (s, 1H), 7.42 (d, 1H, J = 3 Hz), 7.57 (dd, 1H, J = 3/8.8 Hz), 7.77 (s, 1H). **δ_c (CDCl₃)** 30.3, 56.3, 62.0, 104.3, 107.3, 110.2, 110.7, 113.0, 126.4, 148.1, 149.5, 151.6.

B. TML



To a solution of 2.3.5-trimethylphenol (500 mg, 3.67 mmoles, 1 eq.) in 15mL of toluene were added 3.3-dimethylacrylic acid (367.4 mg, 3.67 mmoles, 1 eq.) and methanesulfonic acid (1.76 g, 18.35 mmoles, 5 eq.). The mixture was heated to 85°C and stirred under argon for 5h and then allowed to cool down to room temperature. The solution was diluted by EtOAc treated by $K_2CO_{3(aq)}$, distilled water and brine, dried on MgSO₄, filtrated and evaporated under reduced pressure. The residue was finally purified by column chromatography (10% EtOAc/Cx) to give the ester as a brown/yellow oil (740 mg, 92%). Rf = 0.82 (DCM). δ_{H} (CDCl₃) 1.45 (s, 6H); 2.23 (s, 6H); 2.46 (s, 3H); 2.59 (s, 2H); 6.77 (s, 1H).

 δ_c (CDCl₃) 12.3; 19.9; 28.1; 35.7; 45.6; 123.3; 127.2; 129.9; 132.7; 136.4; 149.8; 169.2.

2-(4-hydroxy-2-methylbutan-2-yl)-3,5,6trimethylphenol (7)



To a solution of **I-B-1** (630 mg, 2.89 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (10 mL) in an ice bath was added lithium aluminium hydride (109.7 mg, 2.89 mmol) portion wise. The heterogeneous mixture was allowed to warm at room temperature and stirred 1 h 30 min under argon. The excess of LiAlH₄ was neutralised with NH₄Cl at 0 °C, and then the suspension was filtered on Celite 535; the resulting filtrate was diluted with EtOAc and treated with 1 M HCl, water and brine; and finally dried on MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The crude product was purified by column chromatography on silica gel, giving the alcohol as an off-white powder (582.8 mg, 91%).

Rf = 0.45 (30% EtOAc/Cx).

δ_H (CD₃OD) 1.5 (s, 6H), 1.54 (s, 6H), 2.2 (s, 3H), 2.28 (s, 2H), 2.53 (s, 2H), 4.04 (sl, 1H), 5.5 (d, 1H, J = 7,86 Hz), 6.66 (s, 1H).

δ_c (CD₃OD) 12.2, 19.6, 22.7, 29.5, 33.5, 47.6, 91.9, 122.7, 125.8, 126.7, 133.5, 135.4, 150.5.

2-(4-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylbutan-2-yl)-3,5,6-trimethylphenol (8)

To a solution of I-B-2 (356.3 mg, 1.60 mmoles, 1 eq.) in 7 mL of dry DCM were added *tert*-Butyldimethylsilyl chloride (265.3 mg, 1.76 mmoles, 1.1 eq.), triethylamine (280 μ L, 2.08 mmoles, 1.3 eq.) and a catalytic amount of dimethylaminopyridine. The mixture was stirred overnight at room temperature and then treated by NH₄Cl_(aq), distilled water and brine. The organic phase was dried on MgSO₄, filtrated and evaporated. The residue was purified on silica gel (10% EtOAc/Cx) to give the product as an off-white powder (488.4 mg, 91%). **Rf** = 0.38 (20% EtOAc/Cx). **\delta_{H} (CDCl_3)** 0.33 (s, 1H, Si(CH_3)₂) ; 1.08 (s, 1H, tBu) 1.5 (s, 6H, CH₃ alkyle) ; 1.54 (s, 6H); 2.2 (s, 3H); 2.28 (s, 2H); 2.53 (s, 2H) ; 4.04 (sl, 1H); 5.5 (d, 1H, J = 7,86 Hz) ; 6.66 (s, 1H).

δ_c (CDCl₃) -4.5; 12.5; 19.7; 22.7; 25.8; 29.5; 33.5; 47.6; 91.9; 122.7; 125.8; 126.7; 135.2; 137.9; 150.9.

- II. Bis-carbonyl series
- A. Common procedures
- 1. Protection of the benzyl alcohol





(d, 2H, J = 9Hz), 7.09 (d, 2H, J = 9 Hz).



put MgSO₄ (1.56 g, 12.96 mmoles, 4 eq.) and *tert*-butanol (1.5 mL, 16.2 mmoles, 5 eq.). The suspension was vigorously stirred as fuming H_2SO_4 was injected under argon. The mixture was still stirred overnight and then neutralised by NaOH_(aq) and filtrated. The organic phase was washed with brine, dried on MgSO₄, filtrated and concentrated *in vacuo* to avoid the product as a dark yellow oil (675 mg, quant.).

Rf = 0.18 (10% EtOAc/Cx).

 δ_{H} (CDCl₃) 1.31 (s, 9H), 4.56 (s, 2H), 7.52 (d, 2H, J = 9 Hz), 8.19 (d, 2H, J = 9 Hz).



without purification as a slightly yellow oil (402 mg, 69%).

Rf = 0.37 (20% EtOAc/Cx).

 δ_{H} (CDCl₃) 1.31 (s, 9H), 4.82 (s, 2H), 6.57 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.11 (d, 2H, J = 9 Hz).



To a solution of 4-aminobenzyl alcohol (2 g, 16.24 mmoles, 1 eq.) in 20 mL of dry DCM under inert atmosphere were added *tert*-Butyldimethylsilyl chloride (2.45 g, 16.24 mmoles, 1 eq.) and imidazole (1.22 g, 17.86 mmoles, 1.1 eq.). The reaction is stirred 1h at room temperature and then treated by $NH_4Cl_{(aq)}$, distilled water and brine. The organic phase was dried on MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (100% DCM) to get the product as dark red oil (3.8 g, 99%). Rf = 0.37 (DCM).

 $\delta_{\rm H}$ (CDCl₃) 0.08 (s, 6H), 0.93 (s, 9H), 3.61 (bs, 2H), 4.62 (s, 2H), 6.66 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.12 (d, 2H, J = 9 Hz); $\delta_{\rm C}$ (CDCl₃) -4.9, 18.7, 26.2, 65.2, 65.2, 115.2, 127.9, 131.7, 145.5. HRMS, *calculated*: *m/z* 238.1549, *found*: *m/z* 238.1622 ([M+H]⁺).

2. Bis-carbonylation of the nitrogen



 δ_{H} (CDCl₃) 0.06 (s, 6H), 0.90 (s, 9H), 3.91 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 4.59 (s, 2H), 4.99 (s, 2H), 6.62 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.08 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.37 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 8.09 (bs, 1H).



To a solution of II-A-5 (300 mg, 1.26 mmoles, 1 eq.) in 5 mL of dry THF were injected acetyl chloride (90 μ L, 1.26 mmoles, 1 eq.) and pyridine (153 μ L, 1.89 mmoles, 1.5 eq.). The resulting suspension was stirred 1h at room temperature and treated by K₂CO_{3(aq)}, HCl 1M, distilled water and brine. After drying on MgSO₄, filtration and evaporation to dryness, the product was obtained pure as brown crystals (321 mg, 91%).

Rf = 0.27 (20% EtOAc/Cx).

 δ_{H} (CDCl₃) 0.05 (s, 6H), 0.89 (s, 9H), 2.11 (s, 3H), 4.65 (s, 2H), 7.21 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.46 (d, 2H, J = 9 Hz), 8.33 (bs, 1H).

N-acetyl-N-(4-(((tertbutyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl)acetamide (16)



To a solution of II-A-7 (321 mg, 1.15 mmoles, 1 eq.) in 6.5 mL of dry THF cooled by an ice bath was injected under argon lithium diisopropylamide 2M in hexane (575 μ L, 1.15 mmoles, 1 eq.) before acetyl chloride (82 uL, 1.15 mmoles, 1 eq.) was added. The solution began immediately orange and the ice bath was removed as the solution was allowed to warm up and be stirred overnight at room temperature. The mixture was then diluted by EtOAc and treated by NH₄Cl_(aq), water and brine. After drying, the residue was purified by column chromatography (20% EtOAc/Cx) to give the bis-amide as a deeply yellow oil (102 mg, 28%).

Rf = 0.47 (20% EtOAc/Cx).

 δ_{H} (CDCl₃) 0.13 (s, 6H), 0.96 (s, 9H), 2.30 (s, 6H), 4.80 (s, 2H), 7.12 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.44 (d, 2H, J = 9 Hz).



To a solution of II-A-7 (321 mg, 1.15 mmoles, 1 eq.) in 6.5 mL of dry THF, cooled to 0°C by an ice bath, was injected lithium diisopropylamide 2M in hexane (575 μ L, 1.15 mmoles, 1 eq.) under argon. After 5 min under stirring, 4.5-dimethoxy-2-nitrobenzyl chloroformate (316.6 mg, 1.15 mmoles, 1 eq.) was added. The solution was stirred overnight before being neutralised by NH₄Cl_(aq), diluted by EtOAc and treated by distilled water and brine. The organic phase was dried on MgSO₄, filtrated and evaporated. The residue was finally purified on silica gel (10 to 30% EtOAc/Cx) to give the product as a yellow powder (345.3 mg, 58%).

Rf = 0.35 (20% EtOAc/Cx).

δ_H (CDCl₃) 0.06 (s, 6H), 0.90 (s, 9H), 2.01 (s, 3H), 3.89 (s, 6H), 4.66 (s, 2H), 5.54 (s, 2H), 7.01 (s, 1H), 7.22 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.36 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.64 (s, 1H).







injected at 0°C lithium diisopropylamide 1M in THF (352 μ L, 0.353 mmoles, 1 eq.) and methyl chloroformate (27 μ L, 0.353 mmoles, 1 eq.). The resulting dark solution was stirred 1h, diluted by DCM and then treated by NH₄Cl_(aq), distilled water and brine. After filtration and concentration, the crude mixture was purified on silica gel (0 to 20% EtOAc/Cx) to obtain the bis-carbamate as a black solid (80 mg, 65%).

Rf = 0.48 (20% EtOAc/Cx).

 δ_{H} (CDCl₃) 0.21 (s, 6H), 0.97 (s, 9H), 3.69 (s,6H), 5.04 (s, 2H), 7.30 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.35 (d, 2H, J = 9 Hz).



 δ_{H} (CDCl₃) 0.10 (s, 6H), 0.94 (s, 6H), 3.68 (s, 3H), 3.96 (s, 6H), 4.70 (s, 2H), 5.61 (s, 2H), 7.05 (s, 1H), 7.27 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.38 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.72 (s, 1H).

B. Bis-amides

1. Acylation of protected 4-aminobenzyl alcohol



To a solution of II-A-2 (170 mg, 1.04 mmoles, 1 eq.) in 3 mL of dry THF were successively injected triethylamine (721 μ L, 5.20 mmoles, 5 eq.) and 4-chlorobutyryl chloride (117 μ L, 1.04 mmoles, 1 eq.). The mixture was stirred 30 min before being diluted by DCM and treated by K₂CO_{3(aq)}, NH₄Cl_(aq), distilled water and brine. The organic phase was dried on MgSO₄, filtrated, evaporated and purified on silica gel (100% DCM) to obtain the amide as a uncoloured oil (270 mg, 97%).

Rf = 0.21 (20% EtOAc/Cx).

 δ_{H} (CDCl₃) 1.95 (m, 2H), 2.39 (t, 2H, J = 6/15 Hz), 3.68 (t, 2H, J = 6/15 Hz), 4.04 (s, 2H), 4.80 (s, 2H), 5.28 (dd, 1H, J = 0/9 Hz), 5.42 (dd, 1H, J = 0/18 Hz), 6.06 (m, 1H), 7.34 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.61 (d, 2H, J = 9 Hz).



To a solution of II-A-4 (100 mg, 0.56 mmoles, 1 eq.) in 2 mL of dry THF were successively injected triethylamine (388 μ L, 2.80 mmoles, 5 eq.) and 4-chlorobutyryl chloride (63 μ L, 0.56 mmoles, 1 eq.). The mixture was stirred 45 min before being diluted by DCM and treated by K₂CO_{3(aq)}, NH₄Cl_(aq), distilled water and brine. The organic phase was dried on MgSO₄, filtrated, evaporated and purified on silica gel (100% DCM) to obtain the amide as an off-white solid (159 mg, quant.).

Rf = 0.28 (20% EtOAc/Cx)

 δ_{H} (CDCl₃) 1.19 (s, 9H), 1.95 (m, 2H), 2.39 (t, 2H, J = 6/15 Hz), 3.68 (t, 2H, J = 6/15 Hz), 4.80 (s, 2H), 7.34 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.61 (d, 2H, J = 9 Hz).



injected triethylamine (320 μ L, 2.32 mmoles, 5 eq.) and 4-chlorobutyryl chloride (52 μ L, 0.463 mmoles, 1 eq.). The mixture was stirred 30 min before being diluted by DCM and treated by K₂CO_{3(aq)}, NH₄Cl_(aq), distilled water and brine. The organic phase was dried on MgSO₄, filtrated, evaporated and purified on silica gel (100% DCM) to obtain the amide as a slightly yellow oil (158 mg, quant.).

Rf = 0.31 (20% EtOAc/Cx).

δ_H (CDCl₃) 0.21 (s, 6H), 0.98 (s, 9H), 2.17 (m, 2H), 2.36 (t, 2H, J = 6/15 Hz), 3.51 (t, 2H, J = 6/15 Hz), 5.05 (s, 2H), 7.34 (d, 2H, J = 9 HZ), 7.61 (d, 2H, J = 9Hz).



6/15 Hz), 5.05 (s, 2H), 7.34 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.61 (d, 2H, J = 9 Hz).

2. Amination of alkyl chains





C. Bis-carbamates



To a solution of **II-A-5** (500 mg, 2.106 mmoles, 1 eq.) in 5mL of dry THF under inert atmosphere and in an ice bath were injected N,N-Diisopropylethylamine (1.8 mL, 10.53 mmoles, 5 eq.) and allyl chloroformate (1.12 mL, 10.53 mmoles, 5 eq.). The bath was removed as precipitation of salts and discoloration of the red solution was observed. After 1h30, the reaction was quenched with an aqueous NH₄Cl solution and the mixture was diluted with DCM. The organic phase was then washed with water and brine, dried on MgSO₄, filtered, evaporated and purified by column (100% DCM) to get the product as slightly brown oil (676 mg, quantitative yield).

Rf = 0.81 (DCM).

δ_H (CDCl₃) 0.01 (s, 6H), 0.85 (s, 9H), 4.56 (d, 2H, J = 6 Hz), 4.59 (s, 2H), 5.14 (d, 1H, J = 12 Hz), 5.24 (dd, 1H, J = 3/15 Hz), 5.85 (m, 1H), 6.98 (bs, 1H), 7.15 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.27 (d, 2H, J = 9 Hz).

δ_c (CDCl₃) -5.2, 18.4, 26.0, 64.7, 65.8, 118.1, 118.7, 126.9, 132.5, 136.4, 136.8, 153.5. HRMS, calculated: *m/z* 322.1760, *found*: *m/z* 322.1831 ([M+H]⁺).



Compound II-C-1 (564.3 mg, 1.755 mmoles, 1.2 eq.) was dissolved in an inactinic flask containing 5mL of dry THF and cooled to -78°C by an acetone/dry ice bath. After temperature was stabilised, potassium bis(trimethylsilyl)amide (350 mg, 1.755 mmoles, 1.2 eq) was introduced in the solution. After the base was completely dissolved, 4.5-dimethoxy-2-nitrobenzyl chloroformate (403.2 mg, 1.463 mmoles, 1 eq.) was added. The resulting solution was allowed to come back very slowly at room temperature by letting dry ice sublimate and stirred overnight. The organic phase was diluted by DCM, treated by $NH_4Cl/water/brine$, dried on $MgSO_4$ and evaporated. The resulting powder was purified on silica gel (0 to 20% EtOAc/Cx) to get the product as a yellow solid (490 mg, 60%).

Rf = 0.47 (30% EtOAc/Cx).

δ_H (CDCl₃) 0.14 (s, 6H), 0.97 (s, 9H), 3.80 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.68 (d, 2H, J = 6 Hz), 4.78 (s, 2H), 5.20 (dd, 2H, J = 3/15 Hz), 5.68 (s, 2H), 5.86 (m, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.25 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.41 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.73 (s, 1H).

 $\delta_{C} \left(\text{CDCl}_{3} \right) \text{-}5.2, \ 18.5, \ 26.1, \ 56.5, \ 56.7, \ 64.4, \ 66.1, \ 67.6, \ 108.1, \ 109.5, \ 118.6, \ 126.7, \ 127.2, \ 128.1, \ 131.3, \ 136.6, \ 139.0, \ 142.1, \ 148.0, \ 152.2, \ 152.6, \ 154.0.$

HRMS, *calculated*: *m/z* 561.2190, *found*: *m/z* 561.2259 ([M+H]⁺), 583.2079 (M+Na]⁺).



Rf = 0.11 (40% EtOAc/Cx).

δ_H (DMSO-d6) 3.71 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 4.52 (d, 2H, J = 6 Hz), 4.62 (d, 2H, J = 6 Hz), 5.12 (s, 1H), 5.17 (d, 1H, J = 3 Hz), 5.29 (t, 1H, J = 6/12 Hz), 5.51 (s, 2H), 5.83 (m, 1H), 6.88 (s, 1H), 7.37 (m, 4H), 7.69 (s, 1H).

δ_c **(DMSO-d6)** 56.1, 56.2, 62.3, 65.1, 66.7, 108.1, 109.5, 117.4, 126.4, 126.9, 127.9, 132.0, 136.4, 138.7, 142.7, 147.6, 151.4, 151.7, 153.4.

HRMS, calculated: *m*/*z* 447.1325, found: *m*/*z* 447.1400 ([M+H]⁺), 469.1218 (M+Na]⁺).



To a solution of the alcohol **II-C-3** (229 mg, 0.513 mmoles, 1 eq.) in 2 mL of dry DMF was added N,N-Diisopropylethylamine (435 μ L, 2.565 mmoles, 5 eq.) under argon. The solution was then cooled by an ice bath and methanesulfonyl chloride (200 μ L, 2.565 mmoles, 5 eq.) was injected. The mixture was heated to 85°C for 2h before being allowed to cool down to room temperature. The organic phase was diluted by DCM and washed with NH₄Cl/water/brine, dried and concentrated. After purification by column chromatography (0 to 30% EtOAc/Cx) the benzyl chloride **26** was obtained as a yellow solid (205 mg, 86%). **Rf** = 0.21 (30% EtOAc/Cx).

δ_H (CDCl₃) 3.77 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 4.54 (s, 2H), 4.58 (d, 2H, J = 6 Hz), 5.07 (dd, 1H, J = 3/9 Hz), 5.12 (d, 1H, J = 3 Hz), 5.60 (s, 2H), 5.76 (m, 1H), 6.98 (s, 1H), 7.19 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.39 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.64 (s, 1H).

 $δ_{c}$ (CDCl₃) 45.3, 56.4, 56.7, 66.1, 67.6, 108.0, 109.6, 118.6, 126.8, 128.5, 129.4, 131.0, 137.8, 139.0, 148.0, 152.0, 152.2, 153.8.

HRMS, *calculated*: *m/z* 465.0986, *found*: *m/z* 487.0879 ([M+Na]⁺), 489.0860 (MCl³⁷+Na]⁺).



Compound II-C-4 (175 mg, 0.376 mmoles, 1 eq.) was dissolved in 5mL of distilled acetone and heated to reflux before sodium iodide (564 mg, 3.765 mmoles, 10 eq.) was added. After 2h, the solution was diluted by DCM and washed with water and brine. The organic layer was dried and concentrated before being purified on silica gel (100% DCM) to give the product **27** as a white solid (341 mg, 89%), containing traces of the benzyl chloride **26**. **Rf** = 0.21 (30% EtOAc/Cx).

δ_H (CDCl₃) 3.88 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 4.45 (s, 2H), 4.64 (d, 2H, J = 6Hz), 5.14 (dd, 1H, J = 3/15 Hz), 5.17 (dd, 1H, J= 3/9 Hz), 5.65 (s, 2H), 5.82 (m, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.18 (d, 2H, J = 6 Hz), 7.43 (d, 2H, J = 6 Hz), 7.69 (s, 1H).

 $\delta_{\text{C}} \text{(CDCl}_3 \text{)} 4.0, 56.4, 56.7, 66.0, 67.5, 108.0, 109.8, 118.5, 126.9, 128.5, 129.7, 131.0, 137.2, 139.0, 139.7, 148.0, 152.1, 152.2, 153.8.$

HRMS, *calculated*: *m*/*z* 557.0343, *found*: *m*/*z* 557.0418 ([M+H]⁺), 579.0235 (M+Na]⁺).





Compound II-C-5 (181.4 mg, 0.326 mmoles, 1 eq.) was dissolved in 5mL of dry acetonitrile and put under inert atmosphere before 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin (187.6 mg, 0.815 mmoles, 2.5 eq.) and silver(I) oxide (377.7 mg, 1.630 mmoles, 5 eq.) were added. The suspension was stirred overnight, then filtrated on celite and washed several times with DCM. The resulting organic solution was treated by an aqueous solution of NaHCO₃, then water and brine. After drying on MgSO₄, evaporation and purification on silica gel (0 to 40% EtOAc/Cx), the ether **28** was obtained (96.7 mg, 45%) as an off-white solid. For physical chemistry experiments, another purification was done by HPLC using 80 to 90% gradient of CH₃CN/water/0.1% TFA, Waters XBridge[®] Prep C18 5 μ m OBD^m 30 x 150mm Column. **Rf** = 0.29 (40% EtOAc/Cx).

δ_H (CDCl₃) 3.80 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 4.58 (d, 2H, J = 6 Hz), 5.06 (d, 2H, J = 6 Hz), 5.10 (s, 2H), 5.60 (s, 2H), 5.76 (m, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.88 (d, 1H, J = 3 Hz), 6.93 (dd, 1H, J = 3/9 Hz), 7.07 (s, 1H), 7.23 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.43 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.59 (dd, 1H, J = 3/9 Hz), 7.64 (s, 1H). **δ_c (CDCl₃)** 56.4, 56.6, 66.1, 67.6, 69.9, 102.4, 107.5, 108.1, 110.1, 112.6, 113.8, 118.6, 118.7, 126.6, 126.7, 128.2, 128.6, 131.0, 135.9, 138.0, 139.2, 148.1, 152.2, 153.8, 156.3, 159.2, 162.3.

HRMS, calculated: *m*/*z* 659.1410, found: *m*/*z* 681.1304 (M+Na]⁺).



Compound **II-C-6** (12 mg, 0.018 mmoles, 1 eq.) was dissolved in 5mL of a blend of acetonitrile and water (4:1) before palladium (II) acetate (0.1 mg, 0.0004 mmoles, 2 moles%), triphenylphosphine *m*-trisulfonate (0.4 mg, 0.0008 mmoles, 4 moles%) and diethylamine (4 μ L, 0.04 mmoles, 2.2 eq.) were added. The solution was stirred 1h, then diluted by DCM and treated by water and brine. After drying on MgSO₄, evaporation and purification on silica gel (0 to 100% DCM/EtOAc), the monocarbamate **28** was obtained (9.3 mg, 91%) as an slightly yellow solid. For physical chemistry experiments, another purification was done by HPLC using 80 to 90% gradient of CH₃CN/water/0.1% TFA, Waters XBridge[®] Prep C18 5 μ m OBDTM 30 x 150mm Column.

Rf = 0.29 (40% EtOAc/Cx).

δ_H (**CDCl**₃) 3.89 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 5.04 (s, 2H), 5.53 (s, 2H), 6.55 (s, 1H), 6.76 (bs, 1H), 6.86 (d, 1H, J = 3 Hz), 6.91 (dd, 1H, J = 3/9 Hz), 6.97 (s, 3H), 7.32 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.39 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.56 (dd, 1H, J = 3/9 Hz), 7.65 (s, 1H).

δ_c (CDCl₃) 48.4, 56.4, 56.5, 64.1, 70.3, 102.4, 107.2, 108.3, 11.0, 112.4, 114.0, 119.0, 126.4, 126.9, 128.7, 130.7, 137.8, 140.2, 141.4, 141.8, 148.5, 152.8, 153.4, 156.3, 159.3, 162.4. HRMS, calculated: *m/z* 575.1199, *found*: *m/z* 579.1269 ([M+H]⁺), 597.1095 (M+Na]⁺).

allyl (4-(((2-oxo-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-7-yl)oxy)methyl)phenyl)carbamate (35)



Compound II-C-6 (23 mg, 0.035 mmoles, 1 eq.) was dissolved in 20mL of a blend of acetonitrile and water (4:1), stirred and irradiated by 3 TLC lamps 6W for 48h. The solution began red/orange over the time. After no more starting material was observed by TLC, the solution was diluted by DCM and then washed by water and brine. After drying on MgSO₄, evaporation and purification on silica gel (0 to 40% EtOAc/Cx), the mono carbamate **28** was obtained (13 mg, 86%) as an off-white solid. For physical chemistry experiments, another purification was done by HPLC using 80 to 90% gradient of CH₃CN/water/0.1% TFA, Waters XBridge[®] Prep C18 5 μ m OBDTM 30 x 150mm Column.

Rf = 0.29 (40% EtOAc/Cx).

δ_H (CD₃CN) 4.40 (d, 2H, J = 3 Hz), 4.91 (s, 2H), 5.02 (dd, 1H, J = 3/12 Hz), 5.14 (dd, 1H, J = 3/18 Hz), 5.77 (m,1H), 6.44 (s, 1H), 6.80 (dd, 2H, J = 3/9 Hz), 7.18 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.27 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.43 (dd, 1H, J = 3/9 Hz), 7.63 (bs, 1H).

δ_C (CD₃CN) 65.9, 71.0, 103.3, 107.8, 113.8, 113.9, 114.4, 117.6, 119.3, 120.8, 124.5, 126.9, 129.6, 131.2, 133.9, 139.8, 140.6-141.9 (q, CF₃), 154.1, 157.0, 159.9, 163.3.

HRMS, *calculated*: *m*/*z* 420.0981, *found*: *m*/*z* 420.1051 ([M+H]⁺).

III. Tri-branched phenols

A. Acylated phenols





2-(((tert-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)benzene-1,3,5triyl triacetate (38)

Alcohol **III-A-2** (185 mg, 0.649 mmoles, 1 eq.) in solution in 2 mL of dry DCM was strirred under argon and then *tert*-Butyldimethylsilyl chloride (97 mg, 0.649 mmoles, 1 eq.) and imidazole (53 mg, 0.779 mmoles, 1.2 eq.) were added. The resulting suspension was stirred vigorously for 3h. The organic phase was washed by water and brine, dried on MgSO₄, filtrated and evaporated. The residue was finally purified by column chromatography (100% DCM) to give the silyl ether as a slightly yellow oil (250 mg, 97%). **Rf** = 0.33 (DCM).

δ_H **(CDCl**₃) 0.27 (s, 6H), 1.00 (s, 9H), 2.26 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.34 (s, 3h), 5.08 (s, 2H), 6.58 (d, 1H, J = 3 Hz), 6.63 (d, 1H, J = 3 Hz).



(33 mg, 0.13 mmoles, 0.1 eq.). The resulting solution was stirred at room temperature before 1.3-propanedithiol (140 μ L, 1.428 mmoles, 1.1 eq.) was injected under argon. After 1h30 min of stirring, the reaction was quenched by Na₂S₂O_{3(aq)} and treated by water and brine. The organic phase was dried on MgSO₄, filtrated and evaporated. The crude residue was purified on silica gel (30% EtOAc/Cx) to give the product as a brown oil (480 mg, quant.). **Rf** = 0.48 (30% EtOAc/Cx).

δ_H (CDCl₃) 2.03 (m, 2H), 2.34 (s, 6H), 2.46 (m, 4H), 2.63 (s, 3H), 4.89 (s, 1H), 6.87 (s, 2H).

2-(1,3-dithian-2-yl)benzene-1,3,5-triol (40)



OAc

AcO[^]

OTBDMS

OAc

Dithiane III-A-4 (480 mg, 1.298 mmoles, 1 eq.) was dissolved in a suspension of K_2CO_3 in dry MeOH (5 mL) and stirred 2h at room temperature. The solution was then acidified by NH₄Cl and diluted by EtOAc. The organic phase was washed by water and brine, dried on MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The triphenol was finally purified by column chromatography (40% EtOAc/Cx) to give the desired product as a strongly yellow solid (260 mg, 83%).

Rf = 0.30 (40% EtOAc/Cx).

δ_H (CDCl₃) 2.02 (m, 2H), 2.43 (m, 4H), 4.86 (s, H), 6.08 (s, 2H).

B. Ether derivatives of phenols

2,4,6-tris(benzyloxy)benzaldehyde (41)



2.4.6-trihydroxybenzaldehyde (300 mg, 1.947 mmoles, 1 eq.) was dissolved in 10 mL of dry DMF before potassium iodide (catalytic quantity) and cesium carbonate (2.1 g, 6.424 mmoles, 3.3 eq.) were added. The mixture was stirred under argon and heated to 80°C as benzyl bromide (763 μ L, 6.424 mmoles, 3.3 eq.) was injected. The solution was stirred 48h more, diluted by DCM, and treated successively by an aqueous solution of NaOH (5%), water and brine. The organic phase was dried on MgSO₄, filtrated, concentrated and purified by column chromatography (0 to 30% EtOAc/Cx) to obtain the tribenzyl phenol as an orange solid (471 mg, 57%).

Rf = 0.51 (30% EtOAc/Cx).

δ_H (CDCl₃) 5.07 (s, 2H), 5.15 (s, 4H), 6.27 (s, 2H), 7.44 (m, 15H), 10.60 (s, 1H); *m/z* 425, 447.



0/18 Hz), 6.01 (m, 3H), 6.10 (s, 2H), 10.43 (s, 1H).



2,4,6-tris(methoxymethoxy)benzaldehyde (44)

2.4.6-trihydroxybenzaldehyde (200 mg, 1.298 mmoles, 1 eq.) was suspended in 5 mL of dry DCM and put in an ice bath. N,N-diisopropylethylamine (1.1 mL, 6.490 mmoles, 5 eq.) and methoxymethyl chloride (493 μ L, 6.490 mmoles, 5 eq.) are then injected slowly under inert atmosphere. After 2h the solution was perfectly clear and showed no more starting material on TLC. The organic phase was treated by NH₄Cl_(aq), water and brine before being drying on MgSO4. After filtration, evaporation and purification on silica gel (0 to 100% EtOAc/DCM), the tri-substituted phenol was obtained as an orange oil (340 mg, 91%). **Rf** = 0.20 (40% EtOAc/Cx).

 $δ_{H}$ (CDCl₃) 3.40 (s, 3H), 3.42 (s, 6H), 5.11 (s, 2H), 5.17 (s, 4H), 6.43 (s, 2H), 10.32 (s, 1H).





Compound **III-B-5** was added to a suspension of sodium hydride (60% in oil; 42 mg, 1.041 mmoles, 1.5 eq.) in 5 mL of dry THF under argon at 0°C. After 1h of stirring at this temperature, allyl bromide (90 μ L, 1.041 mmoles, 1.5 eq.) was injected. The ice bath was removed and the mixture was stirred overnight at room temperature. The excess of sodium hydride was neutralised by NH₄Cl_(aq), the organic phase was diluted by DCM and washed several times with water and brine. After drying, filtration and concentration, the residue was purified on silica gel (100% DCM) to give the product as a red solid (207 mg, 91%). **Rf** = 0.59 (DCM).

δ_H (CDCl₃) 3.46 (s, 3H), 3.48 (s, 6H), 4.03 (s, 2H), 4.59 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 5.19 (s, 4H), 5.29 (dd, 2H, J = 3/18 Hz), 5.95 (m, 1H), 6.52 (s, 2H).

Résumé

Introduit originellement par Katzenellenbogen en 1980, les espaceurs auto-immolables sont définis comme des assemblages covalents capable de corréler la coupure de deux liaisons. La première coupure intervient au niveau du groupement protecteur A, générant un intermédiaire qui conduit spontanément à la rupture de la liaison entre l'espaceur et l'espèce B (par exemple, un composé bioactif). Katzenellenbogen avanca que les espaceurs auto-immolables pourraient permettre d'outrepasser les limitations des thérapies classiques (administration directe de composés bioactifs, notamment) et conduiraient à l'émergence d'une nouvelle génération de prodrogues. Ayant effectivement amené une innovation considérable dans ce domaine, ces espaceurs ont depuis trouvé nombres d'applications dans des domaines plus variés (chimie analytique, matériaux, ...); dont nous présenterons un aperçu.

Nous avons taché également de décrire plus en détail les mécanismes d'auto-immolation, conduisant l'intermédiaire à se désassembler et à libérer la molécule B. En effet, chacun de ces mécanismes confèrent des propriétés particulières à l'espaceur en termes de cinétique d'auto-immolation et de compatibilités chimiques possibles principalement. Il est donc primordial d'établir les avantages et les inconvénients de chaque type d'espaceur afin de déterminer au mieux quel genre de structure employer pour l'utilisation choisie.

Notre travail a consisté dans un premier temps à compléter certaines données de la littérature afin d'approfondir notre connaissance des espaceurs autoimmolables.

De plus, si ces espaceurs ont été introduits pour dépasser les limitations des stratégies préexistantes, ils ne sont pas toujours aptes à répondre à certaines problématiques particulières (sélectivité et sensibilité de leurs activations notamment) ; ce qui nous a amené à proposer une nouvelle génération d'espaceurs auto-immolables capable de mieux répondre à ces attentes.

Abstract

Originally introduced by Katzenellenbogen in 1981, self-immolative spacers are defined as covalent assemblies that are able to correlate cleavage of two chemical bonds. First, the protecting group is cleaved, generating an intermediary which spontaneously leads to the rupture of the bond between the spacer and the released molecule (bioactive compound for instance). Katzenellenbogen planned that self-immolative spacers could allow to overcome limitations of classic therapies (especially direct administration of drugs) and constitute a novel and efficient alternative to actual prodrug strategies. Effectively, spacers have opened many possibilities in this field, but also in other domains (like analytical chemistry, material sciences, ...) which will be presented in this manuscript.

We also took care to detail self-immolation mechanisms (the step leading to the release of the leaving group from the intermediary): indeed, the mechanism is the most important factor of the spacer, determining its properties (kinetic of the process, chemical links allowed). Therefore, it is crucial to determine advantages and drawbacks of each mechanism in order to permit a rational choice of the spacer depending on the application we choose.

Our work consisted to complete known kinetic data, leading us to acquire an overview of existing spacers.

Self-immolative spacers have been introduced to overcome limits of actual strategies, but they are not always able to answer particular problems (sensitivity and selectivity of their triggering events principally): this leads us to propose a new generation of spacers capable of resolving these problematics.

Mots Clés

Espaceurs auto-immolables, Composés cagés, Prodrogues, Imagerie, Cinétique chimique, Fluorescence.

Keywords

Self-immolative spacers, Caged compounds, Prodrugs, Imaging, Chemical kinetic, Fluorescence.

