

Conception et synthese de nouvelles sondes ciblees pour l'imagerie moleculaire

Claire Beauvineau

▶ **To cite this version:**

Claire Beauvineau. Conception et synthese de nouvelles sondes ciblees pour l'imagerie moleculaire. Chimie thérapeutique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : . pastel-00644998

HAL Id: pastel-00644998
https://pastel.hal.science/pastel-00644998

Submitted on 25 Nov 2011

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 Pierre et Marie Curie

Préparée à
l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris

Spécialité
Chimie Moléculaire

Présentée par
Claire BEAUVINEAU

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Conception et synthèse de nouvelles sondes ciblées pour l'imagerie moléculaire

Soutenue le 30 septembre 2011, devant le jury composé de :

Mme Eva Jakab Tóth	Directeur de recherche, CNRS, Orléans	Rapporteur
M. Pierre-Yves Renard	Professeur à l'Université de Rouen	Rapporteur
M. Frédéric Dardel	Professeur à l'Université Paris Descartes	Examinateur
M. Fabrice Chemla	Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie	Examinateur
M. Jean Herscovici	Directeur de recherche, CNRS, Paris	Directeur de thèse
M. Daniel Scherman	Directeur de recherche, INSERM, Paris	Directeur de l'unité

Ce travail a été réalisé dans
l'Unité de Pharmacologie Chimique & Génétique et d'Imagerie (UPCGI)
U 1022 / UMR 8151

Dirigée par le Dr Daniel Scherman

Sous la direction du Dr Jean Herscovici

Équipe de Synthèse Organique, Imagerie et Electrochimie (SOIE)
École Nationale Supérieure de Chimie de Paris

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement le Docteur Jean Herscovici pour la confiance qu'il m'a accordée en me proposant de réaliser cette thèse. Son soutien, sa grande disponibilité et ses conseils m'ont permis d'aborder ce travail avec sérénité. Je lui suis extrêmement reconnaissante de la liberté et de la confiance qu'il m'a accordée et des responsabilités qu'il a su me confier pendant ces années.

Je remercie le Docteur Daniel Scherman, qui dirige l'Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique & d'Imagerie, d'avoir accepté la réalisation de cette thèse en parallèle de mon travail d'ingénieur d'études au sein de son unité et d'avoir encouragé mes recherches notamment lors de nos réunions d'unité.

Je voudrais remercier le Dr. Eva Tóth et le Pr. Pierre-Yves Renard pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de porter ce jugement sur ce travail de thèse. Je suis extrêmement reconnaissante au Pr. Frédéric Dardel et au Pr. Fabrice Chemla d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Je ne voudrais pas oublier tous ceux qui ont participé à ce travail : le Docteur Filiz Esra Önen qui m'a initié à la manipulation des lames, le Docteur Sophie Beauvière qui m'a soutenu pendant toute ma thèse même éloignée du laboratoire et le Docteur Amira Mbarek qui m'a fourni une grande aide dans la synthèse C-glycosidique, le docteur Bich-Thuy Doan qui a consacré du temps à m'expliquer l'art de l'IRM et à évaluer mes petits « bébés », le Docteur Serge Bouaziz qui a accepté d'effectuer des tests de criblage secondaire par RMN sur des ligands potentiels. Mais aussi tous les stagiaires qui ont contribué à ce projet avec sourire et efficacité. Je pense notamment à Baptiste, Farah, Emilie, Thibault, Guillaume, Céline, Sara…

Je remercie aussi, du fond du cœur, tous les membres de l'équipe SOIE : Patrick (merci pour ta gentillesse, ta disponibilité pour une petite discussion), le Docteur Christian Girard d'une immense compétence et toujours disponible pour des questions même si elles sont bêtes, le Docteur Bich-Thuy Doan, le Docteur Féthi Bédioui, le Docteur Sophie Griveau (merci pour votre bonne humeur et tous les bons conseils que vous m'avez chacun prodigués). Et je ne peux pas oublier Damien, cet « électrochimiste » qui a partagé mon bureau et quelques délires pendant ces 3 ans, Loan qui nous a apporté un peu d'exotisme au laboratoire avec ces bons petits plats vietnamiens, Ibtissem, Amira, Hichem et bien sûr Sophie qui restera toujours associée à ce début de thèse et même plus !!!!!

Mes sincères remerciements vont aussi à tous les membres de l'unité pour leur accueil, leur bonne humeur et pour d'autres : Michel Bessodes, Cyrille Richard, merci pour les précieux conseils dans la synthèse des ligands polyaminocarboxylates, Céline Largeau, Virginie Escriou, Pascak Bigey pour leur aide dans la manipulation des protéines.

Je ne peux pas clore cette page sans remercier mes parents, qui, même si éloignés physiquement et ma sœur, Laura, m'ont apportée leur soutien moral et affectif au quotidien, ainsi que ma belle-famille en me demandant comment avançaient mes recherches…. Mille mercis à Erwan, l'homme de ma vie pour son soutien de chaque instant aussi bien moral que technique et théorique et pour la confiance qu'il me donne. Mille mercis (pas de jaloux) au deuxième homme de ma vie, mon petit bonhomme Ethan, ma plus belle « synthèse », pour sa joie de vivre, son innocence qu'il m'apporte à chaque instant…

CONCEPTION ET SYNTHESE DE NOUVELLES SONDES CIBLEES POUR L'IMAGERIE MOLECULAIRE

Résumé :

Le développement d'une médecine personnalisée nécessite la mise au point de sondes permettant la détection des marqueurs d'une pathologie au stade le plus précoce possible.

Ce mémoire décrit la synthèse et l'évaluation de sondes ciblées permettant de réaliser des images en IRM ou en scintigraphie. Ces sondes sont construites par fonctionnalisation d'un châssis moléculaire préparé par une réaction à trois composants. La propargylamine résultante possède plusieurs points d'ancrage pour introduire les ligands destinés au ciblage et deux groupes chélatants pour l'imagerie. Ce châssis possède aussi en position terminale un groupement réactif pour le fixer sur des petites molécules polyfonctionnelles, des dendrimères ou des protéines.

Une technique de criblage à flux rapide, basée sur l'utilisation des puces à petites molécules, a été utilisée pour la détection des ligands. Les molécules déposées sur la puce proviennent soit des C-glycosides complexes préparés selon le concept de la synthèse orientée vers la diversité, soit de la chimiothèque du laboratoire. Ces puces ont permis l'identification de ligands de plusieurs protéines comme la protéine VPR de la capside du virus du sida. Un criblage secondaire par RMN a confirmé l'interaction protéine-petite molécule. Les sondes portant un flavonoïde pour cibler les cellules tumorales de l'endothélium ont été traitées par une solution de sel de gadolinium puis leurs propriétés ont été évaluées par IRM. Les premiers résultats indiquent que ces composés offrent un contraste de 2 à 4 fois supérieurs aux agents de contraste usuellement utilisés. Leur évaluation biologique sera réalisée prochainement.

Mots clés : *réaction à composants multiples, cycloaddition d'Huisgen, propargylamine, synthèse orientée vers la diversité, macrocycles polyaminocarboxylates, C-glycoside, support fluoré, imagerie moléculaire, agent de contraste, génétique chimique inverse, criblage, protéine fluorescente*

DESIGN AND SYNTHESIS OF NEW TARGETED PROBES FOR MOLECULAR IMAGING

Abstract :

Advance in personalized medicine requires probes development for the detection of pathology markers at the earliest possible stage.

This thesis describes the synthesis and the evaluation of targeted probes to produce images in MRI or scintigraphy. These probes are constructed by functionalizing a molecular scaffold prepared by a three-component reaction. The resulting propargylamine has the necessary structure to introduce targeting ligands and two chelating agents for imaging. It also has a group in the terminal position to connect it on structures like small polyfunctional molecules, dendrimers or proteins.

A high throughput screening technique based on small molecule microarrays was used for the detection of ligands. Molecules spotted on the chip came from either complex C-glycosides prepared according to the concept of diversity-oriented synthesis or from the laboratory chemical library. These microarrays have enable ligand identification for several proteins such as Vpr a protein from the capsid of AIDS virus. A secondary screening by NMR confirmed the interaction between protein and small molecules. Probes carrying a flavonoid for targeting tumor endothelial cells were treated with a gadolinium salt solution and MRI evaluated their properties. Initial results indicated that these compounds does offer of two to four folds contrast than the contrast agents usually used. Their biological evaluation will be conducted soon.

Keywords : *multicomponent reaction, Huisgen cycloaddition, propargylamine, polyaminocarboxylate macrocycle, C-glycoside, fluorous tag, molecular imaging, contrast agent, reverse chemical genetic, screening, fluorescent protein*

Liste des abréviations et des acronymes

A	A^3	Réaction à 3 composants
	Ac	Acétate
	AcOEt	Acétate d'éthyle
	AcOtBu	Acétate de *tert*-butyle
	ADN	Acide désoxyribonucléique
	AP	Alkaline phosphatase
	APTES	3-aminopropyltriéthyloxysilane
	ARN	Acide ribonucléique
B	BCA	Acide bicinchoninique
	Bn	Benzyle
	Boc	*Tert*-butoxycarbonyle
	BSA	Bovine Serum albumine / Sérum d'albumine bovin
	Bu	Butyle
C	C_4	Chaîne aliphatique $-(CH_2)_4-$
	C_6	Chaîne aliphatique $-(CH_2)_6-$
	Cat.	Catalytique
	Cbz	Benzyloxycarbonyle (ou Z)
	CCM	Chromatographie sur couche mince
	COSY	Spectroscopie de corrélation (correlation spectroscopy)
	cRGD	Tripeptide cyclique arginine-glycine-aspargine
	Cy5	Cyanine 5
	Cy5.5	Cyanine 5.5
	CYT	Domaine cytoplasmique
D	DBU	1,8-Diazabicycloundéc-7-ène
	DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
	DCU	Dicyclohexylurée
	DCM	Dichlorométhane
	DIPEA	Diispropyléthylamine
	DMAP	Diméthylaminopyridine
	DMF	N,N'-diméthylformamide
	DMSO	Diméthylsulfoxyde
	DOTA	Acide tétraazacyclododecanetétraacétique
	DTPA	Acide diéthylènetriaminepentaacétique
	dTMP	5'-monophosphate de désoxythymidine
	dUMP	5'-monophosphate de désoxyuridine
E	EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
	EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
	EDU	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)urée
	ee	Excès énantiomérique
	ELISA	Enzyme-linked immunsorbent assay
	ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
	Eq	Equivalent
	Et	Ethyle
F	FAA	Acide 8-flavone acétique
	FDG	2-fluoro-2-déoxy-D-glucose

	Fmoc	9-fluorénylméthoxycarbonyle
G	g	Gramme
	GdL	Complexe Gadolinium-Ligand
H	h	Heure
	HDAC	Histone désacétylase
	HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-1-éthanesulfonique
	Hept	Heptane
	HFE	Solvant fluoré - Méthoxyperfluorobutane
	HOBt	1-hydroxybenzotriazole
	HPLC	Chromatographie liquide haute performance
I	IR	Infrarouge
	IR820	Indocyanine 820
	IRM	Imagerie par résonance magnétique
	IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
J	j	Jour
L	λ	Longueur d'onde
	L	Ligand
	LC-MS	Liquid Chromatography – Mass spectrometry
	$LiAlH_4$	Tétrahydroaluminate de lithium
	Lys	Lysine
M	M	Masse molaire
	M	$mol.L^{-1}$
	Me	Méthyle
	MHz	Mégahertz
	Min	Minute
	mmol	millimole
	MS	Spectrométrie de masse
	Ms	Mésyle
	MW	Micro-ondes
N	NHS	N-hydroxysuccinimide
	NOE	Effet nucléaire Overhauser
	Ns	Nosyle – Nitrophenylsulfonyle
	NPC	Pore nucléaire
O	*o*-	Ortho
P	*p*-	Para
	PBR	Récepteur périphérique des benzodiazépines
	PBS	Tampon Phosphate – Phosphate Buffer Saline
	PCC	Pyridinium ChloroChromate
	Pd/C	Palladium sur charbon
	pdt	Pendant
	PEG	Polyéthylène glycol
	PIC	Complexe de préintégration
	PPh_3	Triphénylphosphine
	Ppm	Partie par million
	PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

Q	Qtf	Quantitatif
R	RCM	Réaction à composants multiples
	Rdt	Rendement
	Rf	Rapport frontal
	RGD	Arginine-glycine-aspargine
	RMN	Résonance magnétique nucléaire
	R_t	Temps de rétention
	RT	Reverse transcriptase
S	s	Seconde
	SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
	SOC	Synthèse orientée vers une cible
	SOD	Synthèse orientée vers la diversité
	SPECT	Single photon emission computed tomography
	SPR	Résonance plasmonique de surface
T	T	Tesla (1 T = 42 MHz)
	TA	Température ambiante
	TBAF	Fluorure de tétra-*n*-butylammonium
	TBDMS	*Tert*-butyldiméthylsilyle
	*t*Bu	*Tert*-butyle
	TDMS	Thexyldiméthylsilyle
	TEMP	Tomographie d'émission monophotonique
	TEP	Tomographie d'émission de positons
	Tf	Triflate – Trifluorométhanesulfonate
	TFA	Acide trifluoroacétique
	TFA	Groupement trifluoroacétamide
	TGFβ	Facteur de croissance transformant bêta
	THF	Tétrahydrofurane
	Thy A	Thymidylate synthase A
	ThyX	Thymidylate synthase X
	TM	Domaine transmembranaire
	TMS	Triméthylsilyle
	TMSE	Triméthylsilyléthyle
	Ts	Tosyle – *p*-toluènesulfonyle
	TOS	Targeted oriented synthesis
	TS	Thymidylate synthase
	TSA	Trichostatine A
U	UV	Ultraviolet
V	VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

SOMMAIRE

Introduction générale 11

Chapitre 1 : Les agents de contraste et leur chimie 21
I. IMAGERIE MOLECULAIRE 25
A. Définition 25
B. Les caractéristiques d'un agent d'imagerie moléculaire 26
C. Les différentes modalités d'imagerie moléculaire 26
D. Multimodalité 45
E. Enjeux en cancérologie 48
II. LA GENETIQUE CHIMIQUE 52
A. Principe de la génétique chimique 52
B. Obtention des chimiothèques 55
C. Méthodes de criblage 62

Chapitre 2 : Synthèse d'une chimiothèque de composés hautement diversifiés 75
I. INTERETS DES C-GLYCOSIDES 77
II. REALISATION DE LA CHIMIOTHEQUE 79
III. SYNTHESE D'ALDO-C-GLYCOSIDE FLUORE 80
A. Travaux antérieurs de formation d'aldo-C-glycoside 80
B. Formation d'aldo-C-glycoside sous activation micro-ondes 82
C. Formation d'aldo-C-glycoside à partir d'autres catalyseurs 87
D. Formation d'aldo-C-glycoside fluoré[120] de type I 92
IV. SECOND SCHEMA REACTIONNEL REALISE POUR LA SYNTHESE DE LA CHIMIOTHEQUE 103
A. Synthèse de synthons C-glycosidiques de structure IV 104
B. Formation de propargylamine de structure V 106
C. Greffage d'étiquette fluorée sur la structure V 115
D. Diversification des structures VI par Chimie Click 116

Chapitre 3 : Criblage sur puces à petites molécules 133
I. FIXATION PAR LIAISONS NON COVALENTES 135
A. Principe 135
B. Préparation des lames fluorées 136
II. FIXATION PAR LIAISONS COVALENTES 137
A. Principe 139
B. Préparation des chimiothèques miniaturisées sur lame 139
III. MISE AU POINT DE LA METHODE D'INCUBATION 145
A. La streptavidine 145
B. Incubation avec la streptavidine 147
IV. CONSTITUTION DE LA CHIMIOTHEQUE 152
V. CRIBLAGE DE PROTEINES CIBLES FLUORESCENTES 153
A. Les Thymidylate Synthase 153
B. Endogline 158
C. Vpr 164

Chapitre 4 : Synthèse de nouveaux agents de contraste multimodaux et bifonctionnels (détection et ciblage) 183
I. OBJECTIFS DU PROJET 185
II. SYNTHESE DE CHELATANTS DE SEL METALLIQUE 187
A. Dérivé amino du DTPA 189
B. Dérivé amino du DO3A 191
III. SYNTHESE D'UN CHROMOPHORE IR 192
A. Dérivé azoture de l'IR 820 193
B. Dérivé azoture de la cyanine 5.5 196
IV. LIGANDS 197
A. Acide 8-flavone acétique 197
B. Galactose 203
V. SYNTHESE DU CHASSIS VIII 209
A. Formation de l'aldéhyde bifonctionnel 210
B. Amine secondaire 213
C. Réaction A³ 216
D. Saponication/Déprotection de l'alcyne 217
VI. COUPLAGE PEPTIDIQUE ENTRE LES CHASSIS VIII ET LES CHELATANTS DE SEL METALLIQUE 222
VII. CHIMIE CLICK SUR LA STRUCTURE IX 223
A. Mise au point de la cycloaddition d'Huisgen sur un squelette modèle 224
B. Synthèse d'une bibliothèque d'agents de contraste issus de la chimie click 225
C. Formation de l'agent bimodal de structure X 230
D. Formation des agents bifonctionnels de structure XI 231
VIII. DEPROTECTION DES ACIDES CARBOXYLIQUES DES CHELATANTS 235
IX. COMPLEXATION AVEC GD(III) 237
X. PERSPECTIVES DE SYNTHESE : AGENTS MULTIMODAUX POUR L'IMAGERIE MOLECULAIRE 242
XI. ÉVALUATION DES AGENTS DE CONTRASTE 244

Conclusion générale 253

Partie expérimentale 259
I. GENERALITES 261
II. MATERIEL 261
A. Réactifs de départ et solvants 261
B. Appareillages 261
III. METHODES DE PURIFICATION ET D'ANALYSE 262
A. Chromatographie sur Couche Mince (CCM) 262
B. Chromatographies sur silice 263
C. Résonance Magnétique Nucléaire 263
D. Point de fusion 264
E. Analyses LC-MS 264
F. Spectrométrie de masse 264
G. ICP-MS 264
IV. PRECAUTIONS PRISES 264
V. MODES OPERATOIRES ET ANALYSES 264

Bibliographie 399

Introduction générale

Au cours des années 2000, un effort international a abouti au séquençage du génome humain. Il permet aujourd'hui d'envisager un grand nombre d'applications médicales innovantes. Parmi ces applications une des plus importantes, la **médecine personnalisée**[1] représente un enjeu majeur pour les 20 prochaines années. Celle-ci a pour objectif d'administrer le traitement le plus adéquat pour chaque pathologie en fonction du patrimoine génétique du patient.

Le développement de la médecine personnalisée passe par celui de tests diagnostiques et pronostiques utilisant des **biomarqueurs moléculaires et/ou cellulaires**. Ces biomarqueurs sont des outils essentiels pour évaluer la progression de la pathologie. L'utilisation de ces biomarqueurs en médecine personnalisée permet d'obtenir des résultats plus efficaces pour chaque traitement.

Parallèlement au développement de la médecine personnalisée, les diverses **techniques d'imagerie non invasives** sont devenues des outils majeurs pour la clinique, notamment en cancérologie. La connaissance du fonctionnement moléculaire des cellules et des tissus a augmenté significativement au cours de ces dernières décennies. La combinaison de ces deux avancées a conduit au développement d'une nouvelle discipline, **l'imagerie moléculaire**. Cette nouvelle discipline est vite apparue comme indispensable à la médecine personnalisée, car elle permet de visualiser les molécules présentes à l'intérieur des cellules et de comprendre leur rôle dans le fonctionnement cellulaire, jusqu'au niveau du génome. Dans ce dessein, elle a recours à la fois aux techniques d'imagerie et à des sondes spécifiques de toutes sortes de cibles.

La combinaison de plusieurs modalités d'imagerie constitue une stratégie d'avenir. L'une d'entre elles, l'IRM, permet de caractériser un tissu pathologique au niveau tissulaire, cellulaire et subcellulaire, de réaliser un suivi dans le temps d'une pathologie et d'étudier l'efficacité d'un traitement afin d'établir des stratégies thérapeutiques. L'IRM fournit des images 3D des tissus biologiques d'une qualité exceptionnelle en termes de résolution et de contraste grâce à l'utilisation d'ions paramagnétiques chélatés et vectorisés. L'imagerie multimodale basée d'une part sur l'IRM ou la scintigraphie avec l'utilisation de complexes de sel métallique et d'autre part sur des méthodes optiques permet d'allier les avantages inhérents des unes et des autres : ceci permet d'améliorer l'interprétation des images par comparaison. Les propriétés recherchées de ces agents d'imagerie moléculaire sont : (i) leur

[1] (a) D. Gurwitz, G. Livshits, Personalized medecine Europe : health, genes and society, *European Journal of Human Genetics*, **2006**, *14*, 376-380 ; (b) K. K. Jain, From molecular diagnostics to personalized medecine, *Expert review of molecular diagnostics*, **2002**, *2*, 299-301 ; (c) J. H. Thrall, Personalised medecines : hopes and realities, *Radiology*, **2004**, *231*, 613-616

efficacité en tant qu'agent de contraste (ii) leur efficacité à atteindre la cible biologique et à s'accumuler en quantité détectable (iii) leur absence de toxicité.

Les agents d'imagerie moléculaire ciblants résultent de la combinaison :

- d'un groupe ciblant (un anticorps, un peptide[2] ou un sucre[3] ou encore un ligand comme celui du récepteur périphérique des benzodiazépines[4] (PBR)) ;
- et d'un groupement pour la détection (un fluorophore, un radioisotope, l'ion Gd^{3+}…).

La potentialité de cette stratégie est mise en évidence par l'exemple récent de la cartographie des intégrines à l'aide d'agents liposomiaux bimodaux chez des souris greffées avec une tumeur.[5]

La **génétique chimique** utilise la chimie comme un outil pour comprendre et explorer le vivant. Dans cette approche, des petites molécules de structures diverses sont synthétisées pour identifier les protéines-clés impliquées dans les processus cellulaires fondamentaux et comprendre au niveau moléculaire comment ces protéines exécutent leurs fonctions biologiques. La génétique chimique peut être divisée en deux catégories (Figure 1). La première est la génétique chimique directe qui utilise des petites molécules (les "mutations") pour identifier l'effet phénotypique recherché sur un système biologique étudié. Une fois qu'une petite molécule a été identifiée, la protéine que la petite molécule module doit être identifiée. La seconde est la génétique chimique inverse qui implique l'utilisation de petites molécules pour cribler une protéine d'intérêt. Une fois qu'un ligand a été identifié, cette petite molécule est étudiée pour déterminer l'effet phénotypique dû à l'addition de ce modulateur.

---

[2] H. R. Wolfe, M. Mendizabal, E. Lleong, A. Cuthbertson, V. desai, S. Pullan, D. K. Fujii, M. Morrison, R. Pither, S. A. Waldman, In Vivo Imaging of Human Colon Cancer Xenografts in Immunodeficient Mice Using a Guanylyl Cyclase C–Specific Ligand, *J. Nuclear Med*., **2002**, *18*, 321-325

[3] G. A. Lemieux, K. J. Yarema, C. L. Jacobs, C. R. Bertozzi, Exploiting Differences in Sialoside Expression for Selective Targeting of MRI Contrast Reagents *J. Am. Chem. Soc*., **1999**, *121*, 4278-4279

[4] A. P. Kozikowski, M. Kotoula, D. W. Ma, N. Boujrad, W. Tuckmantel, V. Papadopoulos, Synthesis and Biology of a 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl Derivative of 2-Phenylindole-3-acetamide: A Fluorescent Probe for the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor, *J. Med. Chem*., **1997**, *40*, 2435-2439

[5] (a) W. J. Mulder J, Strijkers GJ, Habets JW, Bleeker EJ, van der Schaft DW, Storm G, Koning GA, Griffioen AW, Nicolay K. MR molecular imaging and fluorescence microscopy for identification of activated tumor endothelium using a bimodal lipidic nanoparticle, *FASEB J.,* **2005**, *19*, 2008-2010 ; (b) W. J. M. Mulder, K. Castermans, J. R van Beijnum, M. G. A oude Egbrink, P. T. K. Chin, Z. A. Fayad, C. W. G ; M ; Löwik, E. L. Kaijzel, I. Que, G. Storm, G. J. Strijkers, A. W. Griffioen, K. Nicolay, Molecular imaging of tumor angiogenesis using αvβ3-integrin targeted multimodal quantum dots, *Angiogenesis*, **2009**, *12*, 17-24

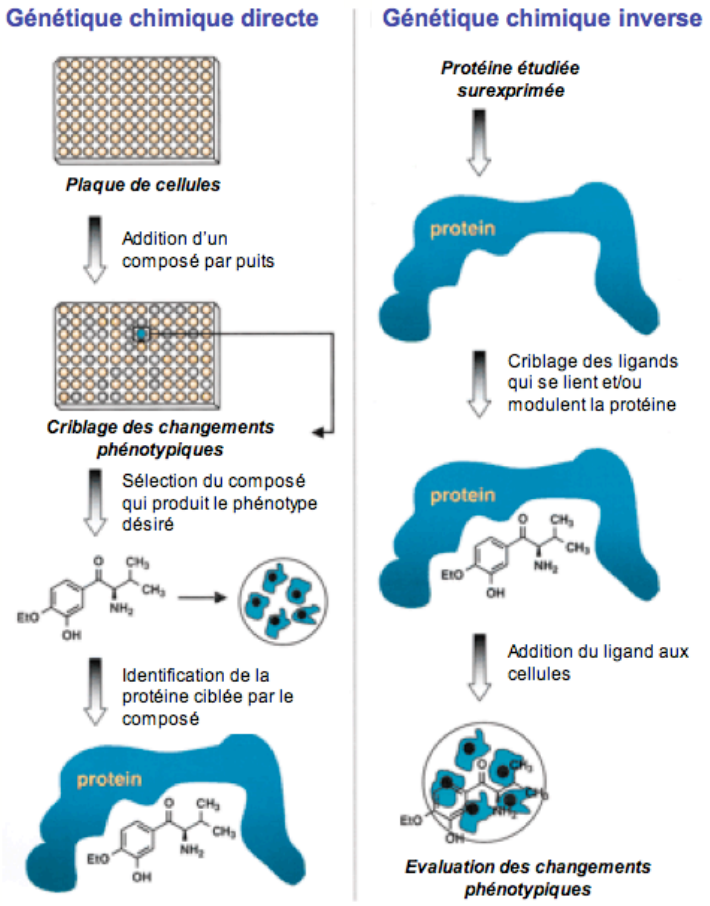


Figure 1 : *Génétique chimique*[6]

Ainsi, la génétique chimique dans le sens direct va du phénotype aux protéines et en sens inverse, elle va de la protéine au phénotype. Les molécules organiques capables d'interagir avec une protéine en perturbant, de manière différentielle, ses diverses fonctions et permettant ainsi de comprendre son rôle sont qualifiées de molécules "bioactives". L'identification de tels composés requiert le criblage d'un grand nombre de petites molécules.

Celles-ci sont préparées suivant la **synthèse orientée vers la diversité** (SOD).[7] Contrairement à la synthèse orientée vers une cible biologique (Targeted oriented synthesis TOS), la synthèse orientée vers la diversité a pour but la préparation de chimiothèques capables de trouver des ligands sur le plus grand nombre de protéines possibles. Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire de créer des collections de composés présentant un maximum de diversité structurale (Figure 2). La diversité accroît la probabilité de trouver un ligand pour le plus grand nombre possible de protéines.

[6] H. E. Blackwell, Y. Zhao, Chemical Genetic Approaches to Plant Biology, *Plant Physiology*, **2003**, *133*, 448-455
[7] S. L. Schreiber, Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery, *Science,* **2000,** *287*, 1964-9

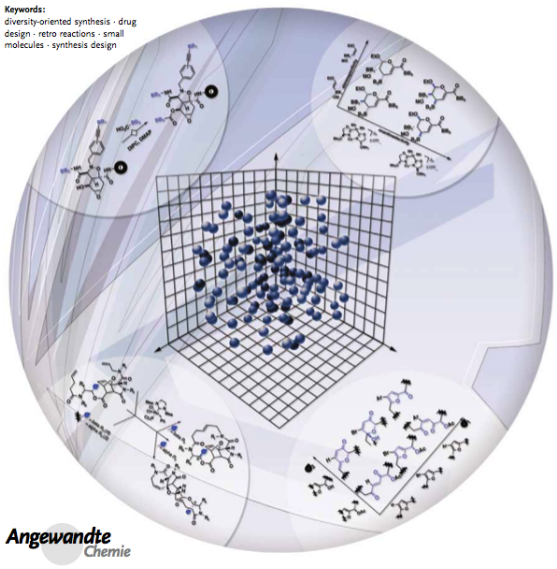


Figure 2 : *Population de molécules issues de la SOD dans l'espace chimique*[8]

Les banques préparées selon cette méthode consistent en un ensemble de molécules tridimensionnelles qui possèdent de multiples centres asymétriques et qui ressemblent aux produits naturels.[9] Le concept de la SOD est basé sur l'utilisation de séquences réactionnelles courtes afin de générer en peu de temps des chimiothèques présentant des structures diverses et complexes tout à la fois.

Les **réactions à composants multiples** (RCM)**,** qui visent à synthétiser des produits hautement fonctionnalisés, s'inscrivent précisément dans ce contexte. En effet, elles sont économes en atomes et faciles à mettre en œuvre, donc facilement automatisables. Les réactifs mis en jeu "one-pot", sont assemblés par création de plusieurs liaisons carbone-carbone ou carbone-hétéroatome suivant un schéma réactionnel bien précis. Les divers exemples de condensation à composants multiples reportés dans la littérature font des RCM de bons modèles de réactions complexes pour la SOD. Elles constituent une approche synthétique attractive qui a largement contribué au développement de la génétique chimique.[10]

---

[8] M. D. Burke, S. L. Schreiber, A planning strategy for diversity-oriented synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2004***, 43,* 46-58

[9] F. E. Koehn, G. T. Carter, The evolving role of natural porducts in drug discovery, *Nature Reviews,* **2005***, 4,* 206-220

[10] (a) M. Syamala M, *Org Prep* Proceed *Int,* **2009**, *41*,1 (b) J. D. Sunderhaus, S. F. Martin, Applications of Multicomponent Reactions to the Synthesis of Diverse Heterocyclic Scaffolds ,*Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 1300 (c) J. Biggs-Houck, A. Younai, J. T. Shaw, Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *14*, 371 (d) J. Wei, J. T. Shaw, Diastereoselective Synthesis of γ-Lactams by a One-Pot, Four-Component Reaction*, Org. Lett.,* **2007**, *9*, 4077

C'est donc dans cet axe général que se situe le travail décrit dans ce mémoire. Nous avons pour objectif de concevoir et d'étudier de **nouveaux complexes d'imagerie moléculaire possédant un caractère bifonctionnel**. Ils devront allier une fonction de ciblage et un groupe complexant les dérivés métalliques (Gd, Tc, Ln ,Lu…) pour la détection (IRM, imagerie optique, scintigraphie…). Nous développerons aussi des **sondes bimodales** pour l'IRM et l'imagerie optique avec des applications dans le proche infrarouge. Afin de répondre aux besoins inhérents de l'obtention de sondes ciblantes, c'est-à-dire possédant un ligand capable de cibler une protéine d'intérêt, nous rechercherons des ligands originaux en criblant une chimiothèque de petites molécules aux structures diversifiées explorant des parties peu peuplées de l'espace chimique. Ce travail se découpe en 3 parties : la synthèse d'une chimiothèque de petites molécules, le criblage de cette dernière, la conception et l'évaluation de nouveaux agents d'imagerie moléculaire.

Nous nous sommes basés sur le concept de la **SOD pour générer une collection de molécules** et plus précisément sur une stratégie appelée « ***Build-Couple-Pair*** »[11] (Figure 38). Cette stratégie est innovante car elle permet d'anticiper les problèmes pouvant survenir à chaque étape du développement pharmaceutique d'un médicament (criblage de milliers de composés de structures diverses, optimisation des propriétés biologiques du composé « lead », synthèse d'analogues, synthèse du composé optimal à bas prix et en grande quantité). Son secret repose sur un schéma réactionnel modulable de SOD, plusieurs modifications peuvent être faites pour chaque squelette en utilisant différentes variantes de réactifs à la première étape. Ainsi, la synthèse comporte seulement un petit nombre d'étapes qui pourra être adaptée facilement à la synthèse à grande échelle.

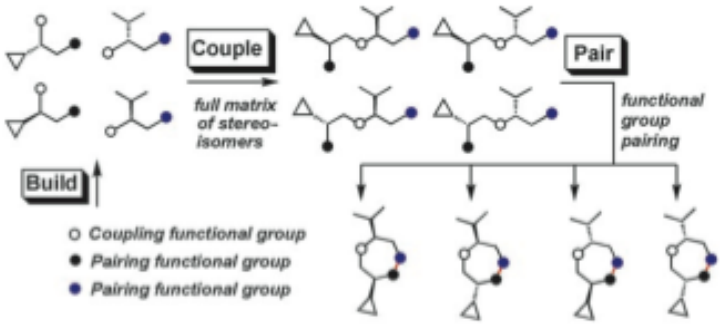


Figure 3 : *Génération de diversité stéréochimique par la stratégie « Build/Couple/Pair »*

[11] S. L. Schreiber, Molecular diversity by design, *Nature*, **2009**, *458*, 153-154 ; D. Morton, S. Leach, C. Cordier, S. Warriner and A. Nelson, Synthesis of natural-product-like molecules with over eighty distinct scaffolds, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2009**, *48*, 104-109

La structure commune choisie est basée sur un sucre tridimensionnel le « **C-glycoside** » (Schéma 1, structure **I**) portant une **propargylamine** sur l'aglycone (Schéma 1, structure **II**). Elle est obtenue par une réaction à 3 composants entre un aldéhyde, un alcyne et une amine. Afin de faciliter l'obtention de cette chimiothèque, toutes ces synthèses sont réalisées sur **lipide fluoré**. Cette approche a deux avantages :

- la chaîne polyfluorocarbonée est inerte chimiquement et compatible avec un grand nombre de groupements fonctionnels ;
- l'utilisation d'une étiquette fluorée permet de faire de la synthèse en parallèle en solution et de purifier les produits par des méthodes classiques telles que l'extraction liquide-liquide fluoré ou l'extraction solide fluoré/liquide.[12]

À partir de ce synthon, on peut envisager la formation de **composés polycycliques complexes** par des réactions de cycloaddition d'Huisgen (chimie click – structure **III**) ce qui nous permettra d'augmenter la diversité structurale de notre chimiothèque.

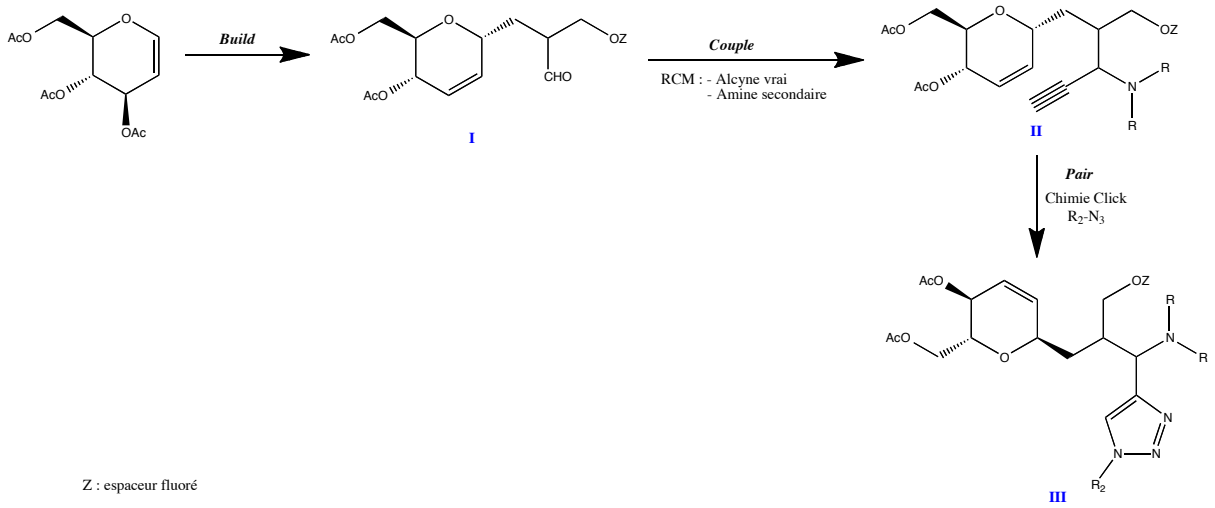


Schéma 1 : *Préparation d'une librairie de petites molécules fluorées à partir d'une propargylamine*

L'identification de nouveaux modulateurs d'activité de système biologique constitue le 2ème objectif de cette thèse. Afin d'évaluer rapidement et efficacement les activités biologiques de notre banque de molécules et de découvrir des petites molécules capables de moduler la fonction des protéines, la méthode de criblage développée repose sur **la préparation de puces à petites molécules**. Notre chimiothèque est fixée par l'intermédiaire d'une liaison covalente sur des lames de verre fonctionnalisées ou par des interactions Fluor/Fluor (Figure 4). L'avantage de cette méthode par rapport aux techniques

[12] R. L. Nicholson, M. L. Ladlow, D. R. Spring, Fluorous tagged small molecule microarrays, *Chem. Commun*, **2007**, DOI 10.1039/b712906h

de criblage classique est la possibilité de cribler un grand nombre de systèmes protéiques avec la même puce à petites molécules. La banque miniaturisée, comprenant généralement entre 10^2 et 10^4 molécules est ensuite incubée avec une protéine d'intérêt marquée par un agent fluorescent de type Cyanine 5. L'incubation de ces puces avec des **protéines fluorescentes d'intérêt** permettra d'identifier des **ligands originaux qui seront couplés aux agents d'imagerie** décrits ci-dessous.

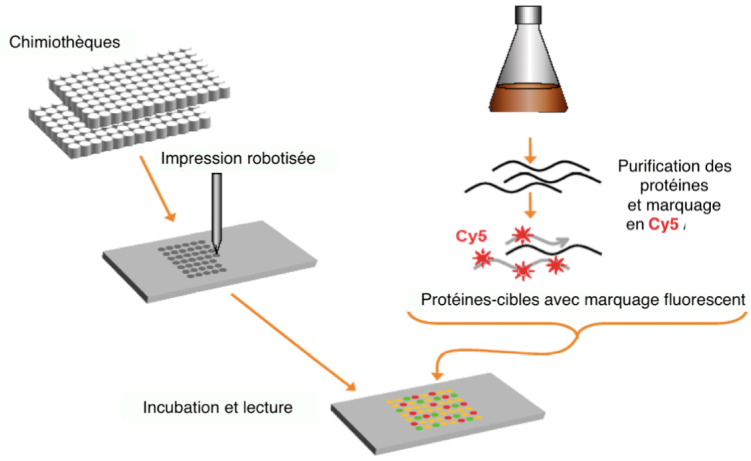


Figure 4 : *Principe du criblage sur puces à petites molécules*

La **synthèse des sondes bimodales et bifonctionnelles** constitue la dernière partie de ces travaux de recherche. La structure des agents de contraste repose sur un squelette propargylamine obtenu à partir d'une réaction à 3 composants. Nous avons développé un modèle à partir d'un aldéhyde polyfonctionnel qui nous permettra d'obtenir en une seule étape le squelette **2** offrant plusieurs points d'ancrage pour permettre le couplage (Schéma 2) :

- de cages complexantes (par couplage peptidique – molécule 3) ;
- de sondes optiques, fluorescant dans le proche IR, dérivées par un groupement azoture (greffage par chimie clic – molécule 4) ;
- de tout ligand d'intérêt comme du galactose, des flavonoïdes ou des ligands originaux obtenus par la technique de criblage sur puces à petites molécules (greffage par chimie clic – molécule 4).

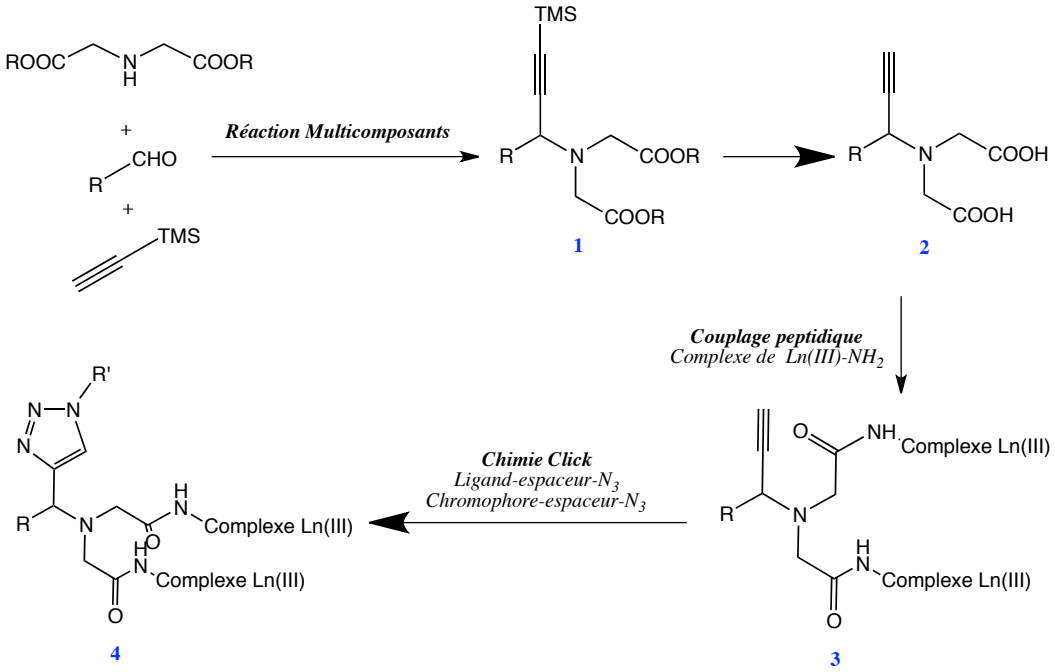


Schéma 2 : *Schéma réactionnel des agents de contraste multimodaux et bifonctionnel*

La partie introductive de ce manuscrit explique dans un premier temps les principes de l'imagerie moléculaire et illustre, en quelques exemples récents, ses domaines d'application. Dans un second temps, elle présente les bases de ce nouveau concept qu'est la génétique chimique par l'illustration d'applications de cette technique. Dans un troisième temps, elle expose les différentes façons d'obtenir une chimiothèque et de la cribler. Nous développons, dans le chapitre **II**, les stratégies permettant d'accéder à la libraire de C-glycosides fluorées. Le chapitre **III** est, quant à lui, consacré à la mise au point du criblage sur puces à petites molécules. Enfin, le 4ème chapitre de ce mémoire est consacré à la synthèse et à l'évaluation de nouveaux complexes d'imagerie moléculaire.

Chapitre **I**

Les agents de contraste et leur chimie

I. IMAGERIE MOLECULAIRE 25
A. Définition 25
B. Les caractéristiques d'un agent d'imagerie moléculaire 26
C. Les différentes modalités d'imagerie moléculaire 26
1. L'imagerie radionucléaire 26
2. L'imagerie optique 29
3. L'imagerie de résonance magnétique IRM 32
a. Principe de la résonance magnétique nucléaire 34
b. Applications 36
c. Les agents de contraste en IRM 39
d. Les agents de contraste paramagnétiques du gadolinium pour l'imagerie moléculaire 41
D. Multimodalité 45
E. Enjeux en cancérologie 48

II. LA GENETIQUE CHIMIQUE 52
A. Principe de la génétique chimique 52
1. Définition 52
2. Avantages et limites de la génétique chimique 54
B. Obtention des chimiothèques 55
1. Chimie combinatoire 55
2. Synthèse orientée vers la diversité - SOD 56
a. Introduction de complexité structurelle 57
b. Introduction de diversité 60
c. Stratégie « Build/couple/pair » 60
C. Méthodes de criblage 62
1. Génétique chimique directe 62
a. Criblage phénotypique 62
b. La méthode de « cytoblot » 63
c. Les gènes rapporteurs 64
2. Génétique chimique inverse 65
a. Le criblage in vitro 65
b. Criblage sur billes 66
c. Criblage sur lames 68

La médecine personnalisée[1] est aujourd'hui un enjeu majeur pour la recherche médicale. En effet, grâce au développement de nouveaux outils d'analyse plus sensibles, rapides et fiables et à la connaissance précise du génome, nous avons encore davantage pris conscience que chaque individu est unique et qu'il a besoin d'un traitement individualisé, adapté à son propre organisme, en fonction de son âge et de son environnement.

Les tests diagnostiques et pronostiques utilisant des biomarqueurs moléculaires et/ou cellulaires occuperont une place centrale dans le système de soin et devraient devenir incontournables dans les prochaines années pour réduire les dépenses de santé qui ont tendance à croître en particulier avec l'émergence des traitements coûteux. De part sa définition, un biomarqueur est un élément clé pour diagnostiquer une pathologie, déterminer son niveau de progression et évaluer le ratio efficacité/toxicité des traitements. La médecine personnalisée utilisant ces biomarqueurs rechercher un traitement adapté à chaque personne, à la bonne dose et au bon moment. Pour cela, il faut pouvoir associer des tests diagnostiques à chaque stratégie thérapeutique. Au cours des développements de ces dernières stratégies thérapeutiques, ces tests ont pour objectif majeur de rendre le traitement plus efficace en ciblant la population susceptible de répondre positivement au traitement. Autre effet bénéfique, en ciblant la bonne population, il sera possible de diminuer la dose efficace, améliorant encore le rapport efficacité/toxicité du traitement. D'ailleurs, un premier médicament issu de la médecine personnalisée, l'*Herceptin*, est actuellement sur le marché. Ce médicament cible une protéine, HER2, surexprimée dans 25 à 30 % des cancers du sein.[13]

Parallèlement au développement de la médecine personnalisée, il est important de noter celui des techniques d'imagerie non invasives. Les plus fréquentes sont basées sur l'utilisation des rayons X, ultrasons et champs magnétiques (en particulier l'Imagerie par Résonance Magnétique, l'IRM). Ces techniques d'imagerie appliquées au domaine médical ont révolutionné la détection de disfonctionnements du corps humain. La visualisation des organes, sans nécessiter de gestes chirurgicaux ou de rayonnement ionisant, a constitué un progrès considérable pour le diagnostic. Depuis les premières images obtenues par IRM en 1973, son utilisation s'est développée au point de devenir routinière.

[13] P. R. Reilly, Personalized medicine and pharmacogenetics : new tools for disease management, *Disease Management*, **2002**, *5*, 69-75

La connaissance des évènements moléculaires intrinsèques au fonctionnement normal des cellules et des tissus ont augmenté significativement au cours de ces dernières décennies. En même temps, les avancées technologiques de l'instrumentation ont permis de grandes améliorations dans la qualité des images radiologiques. La combinaison de ces deux avancées en collaboration avec la créativité des chimistes a conduit au développement d'une nouvelle discipline, l'imagerie moléculaire. Cette nouvelle discipline est vite apparue comme indispensable à la médecine personnalisée. Car au-delà de la structure des organes et des tissus, elle permet de visualiser les molécules présentes à l'intérieur des cellules et de comprendre leur rôle dans le fonctionnement cellulaire, jusqu'au niveau du génome. Pour ceci, elle a recours à la fois aux techniques d'imagerie et à des radiomarqueurs moléculaire ou des sondes spécifiques de toutes sortes de cibles.

La médecine personnalisée s'appuyant sur l'imagerie moléculaire et le développement de nouveaux biomarqueurs permet d'assurer une meilleure prise en charge de la maladie dont souffre un patient. Elle vise l'atteinte de résultats médicaux optimaux en aidant les médecins et les patients à choisir, parmi les diverses options thérapeutiques, celles qui seront susceptibles de donner les meilleurs résultats selon le profil génétique du patient.

I. Imagerie moléculaire

A. Définition

Issue, à l'origine, de techniques d'imagerie de l'expression génique,[14] la notion d'imagerie moléculaire[15] s'est vite généralisée à l'imagerie non invasive in vivo de processus moléculaires. L'imagerie moléculaire permet d'identifier des processus moléculaires et cellulaires *in vivo* en réalisant une détection anatomique du lieu d'interaction entre des molécules spécifiques et un tissu vivant. Elle permet ainsi de visualiser le composant ou le mécanisme moléculaire responsable de la maladie.[16]

On peut donc regrouper, sous le concept d'imagerie moléculaire, différentes techniques qui mettent en relief des biomarqueurs des activités cellulaires ou tissulaires, au moyen de véritables vecteurs « modificateurs d'images ». Ces vecteurs agissent par interaction locale avec des cibles « moléculaires » en altérant par exemple l'image dans la zone ciblée ou en révélant l'expression de gènes fonctionnels ou thérapeutiques. Mais ils interagissent également avec des voies métaboliques en reflétant leur fonctionnement normal ou pathologique, ouvrant ainsi la voie de la détection et/ou du traitement précoce de certaines maladies.

Ce type d'imagerie moléculaire concerne donc en pratique autant les approches par RMN (IRM, Spectroscopie de résonance magnétique) et optique (infrarouge, fluorescence) que nucléaires (Tomographie d'Emission Monophotonique, Tomographie d'Emission de Positons, auto-radiographie). Il reste que, chez l'homme, ce sont les techniques nucléaires qui, avec leur sensibilité proche de la femtomole et leur bonne résolution temporelle, sont de loin les mieux adaptées. Elles sont, de ce fait, très employées en imagerie moléculaire du petit animal et humaine. L'imagerie optique est quant à elle d'avantage destinée à l'exploration « de surface », sur cellules ou petit animal. Elle permet par exemple de vérifier, sans pratiquer de biopsie ni tuer l'animal, si un médicament anti-cancéreux se fixe ou non sur une tumeur.

[14] AF. Chatziioannou, *et al*., Molecular imaging of small animals with dedicated PET tomographs. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2002**, *29,* 98-114

[15] M. Zanca, Les techniques d'imagerie moléculaire et métabolique en imagerie par résonance magnétique nucléaire, *Médecine Nucléaire***, 2007**, *31*, 173-182

[16] GM. Lanza, R. Lamerichs, S. Caruthers, SA. Wickline, Molecular Imagingin MR with targeted paramagnetic nanoparticles, *Medicamundi*, **2003**, *47*, 34-9

Quant à la RMN, elle contribue aux avancées dans le domaine grâce à sa capacité à fournir conjointement des informations anatomiques, fonctionnelles et métaboliques.

B. Les caractéristiques d'un agent d'imagerie moléculaire

Tous les agents utilisés pour l'imagerie moléculaire quelque soit la modalité de détection répondent aux mêmes exigences. Chaque agent doit avoir un composant ciblant qui lui permette d'être localisé dans les tissus cibles et un composant qui lui permette d'être détecté par une source extérieure .

Il existe 3 types d'agents d'imagerie moléculaire (Figure 5)[17] :

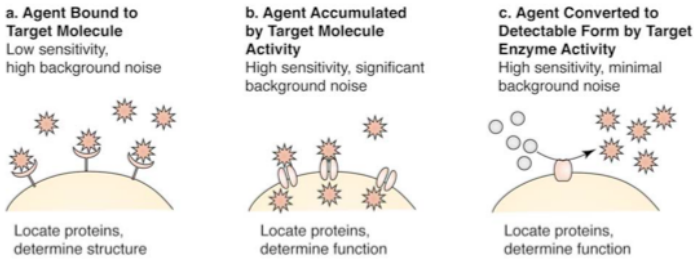


Figure 5 : *Classes des agents d'imagerie moléculaire*

- les agents de contraste se liant directement à la molécule cible ;
- ceux s'accumulant par le biais de l'activité enzymatique ou moléculaire de la cible ;
- ceux dépendant de l'activité enzymatique, on parle alors d'agents « intelligents ». Par exemple, certains agents d'imagerie moléculaire sont activés par des protéases qui clivent spécifiquement des peptides, relarguant des composés fluorescents qui sont visibles dans le proche infrarouge.[18]

C. Les différentes modalités d'imagerie moléculaire

1. L'imagerie radionucléaire

Comme cela a été décrit précédemment, les premiers agents d'imagerie moléculaire ont été développés pour la tomographie d'émission monophotonique (TEMP), dite aussi SPECT (de l'anglais *Single Photon Emission Computed Tomography*), et la tomographie d'émission de positons (TEP).

La TEMP est une technique d'imagerie médicale nucléaire tomographique basée sur la scintigraphie qui consiste à injecter un radiotraceur dont on connaît le comportement et les

[17] J. C. Miller, J. H. Thrall, Clinical Molecular Imaging, *J. Am. Coll. Radiol*, **2004**, *1*, 4-23

[18] (a) V. Ntziachristos, CH. Tung, C. Bremer, R. Weissleder, Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo, *Nature Med.,* **2002**, *8*, 757-760 ; (b) U. Mahmood, CH. Tung, A. Bogdanov, R. Weissleder, Near infrared optical imaging of protease activity for cancer detection, *Radiology*, **1999**, *213,* 866-870

propriétés biologiques pour obtenir une image du fonctionnement d'un organe en trois dimensions au moyen d'un ensemble de gamma caméras qui tournent autour du patient. Les radiopharmaceutiques longtemps utilisés comme agent d'imagerie moléculaire sont des radionucléides émetteurs de rayons gamma, comme le ^{123}I ou le ^{99m}Tc[19] qui ont des temps de demi-vie compris entre 6 et 8 h. Ces radionucléides ont été incorporés à beaucoup d'agents pour différentes maladies, comme le cancer ou le suivi de thérapie génique, ainsi que pour le traitement de troubles hépatiques ou encore d'infections.[20]

Traitement des troubles hépatiques

L'utilisation de nanoparticules[21] complexées avec du ^{99m}Tc en tant que sonde pour l'imagerie des hépatocytes a été développée afin d'optimiser les traitements médicaux des troubles hépatiques. Ces nanoparticules (Figure 6) sont construites à partir d'une chaîne fluorée, d'un sucré dérivé de l'acide lactobionique et d'un chélatant dérivé du DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique) pour complexer le ^{99m}Tc.

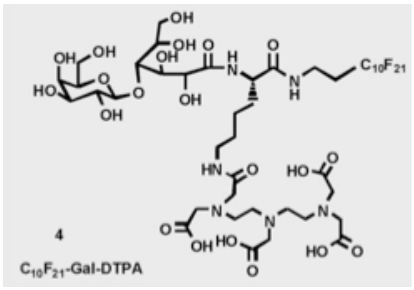


Figure 6 : *Carbohydrate perfluoroalkylé $C_{10}F_{21}$-Gal-DTPA*

La scintigraphie a permis de montrer que l'accumulation dans le foie de ces nanoparticules marquées (Figure 7) et leur interaction avec les récepteurs des asialoglycoprotéines leur confèrent une fonction de ciblage du foie via les hépatocytes.

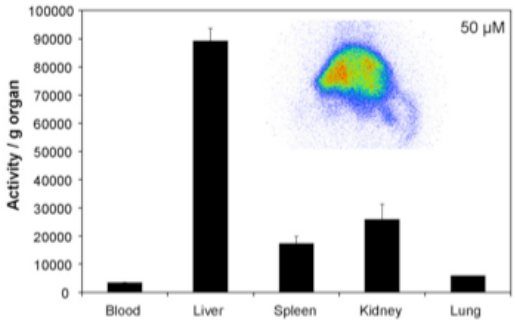


Figure 7 : *Biodistribution des nanoparticules marquées ^{99m}Tc chez le rat, Image scintigraphique (50 µm)*[21]

[19] Liu Shuang, Chakraborty Sudipta, 99mTc-centered one-pot synthesis for preparation of 99mTc radiotracers , *Dalton Transactions*, **2011**, *40*, 6077-6086

[20] C. M. F. Gomes, A. J. Abrunhosa, E. K. J. Pauwels, Molecular imaging with SPECT and PET in exploratory investigational new drug studies, *Drugs of the Future*, **2011**, *36*, 69-77

[21] C. Richard, P. Chaumet-Riffaud, A. Belland, A. Parat, C. Contino-Pepin, M. Bessodes, D. Scherman, B. Pucci, N. Mignet, Amphiphilic perfluoroalkyl carbohydrates as new tools for liver imaging, *International Journal of Pharmaceutics*, **2009**, *379*, 310-308

Traitement d'une infection pulmonaire

L'Aspergillose bronchopulmonaire, infection parasitaire pulmonaire, est une des principales causes d'infection associée à la mort des patients immunodéprimés. Une détection et une administration plus rapides d'un antifongique permettraient d'améliorer l'état de ces patients. L'équipe de Chun Li a montré que l'utilisation d'un peptide cyclique marqué par ^{111}In (Figure 8) permettait de cibler *l'Aspergillus fumigatus,* responsable de l'aspergillose et de délimiter la zone infectieuse (Figure 9).[22]

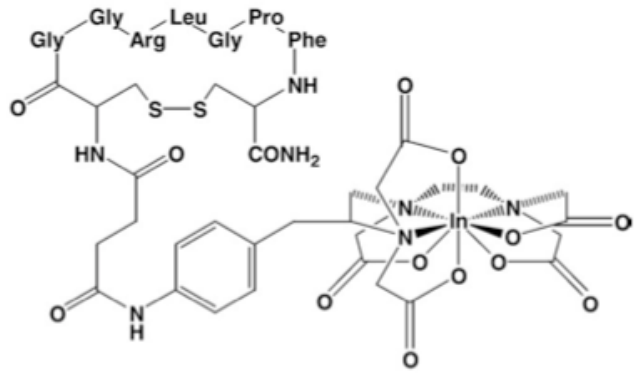


Figure 8 : *Structure du peptide cyclique marqué ^{111}In-DTPA-c(CGGRLGPFC)-NH$_2$*

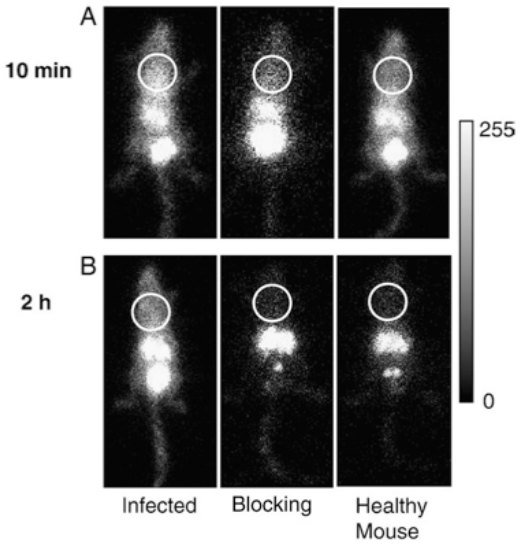


Figure 9 : *Images de γ-scintigraphie d'une souris infectée, une souris co-injectée avec un peptide non marqué et d'une souris saine. Acquisitions (A) à 10 min et (B) à 2h après l'injection de ^{111}In-DTPA-c(CGGRLGPFC)-NH$_2$. Les cercles indiquent la zone des poumons*

En TEP, on utilise des radiopharmaceutiques (carbone, fluor, azote, oxygène...) émetteurs de positons. Ceux-ci donnent naissance à une paire de photons émis à 180° et il est possible de localiser l'émission grâce à leur détection simultanée. Le radionucléide émetteur de positons ^{18}F a été incorporé à de nombreux agents d'imagerie moléculaire pour la TEP. Le plus utilisé est un dérivé de glucose, le 2-[^{18}F]fluoro-2-déoxy-D-glucose ([^{18}F]-FDG) qui est véhiculé dans les cellules par des transporteurs de glucose puis phosphorylé en FDG-6-P par hexokinase.[23] Le FDG est communément utilisé pour suivre la cinétique de glycolyse dans les maladies du cerveau et du cœur, mais aussi le cancer[24].

[22] Z. Yang, D. P. Kontoyiannis, X. Wen, C. Xiong, R. Zhang, N. D. Albert, C. Li, Gamma scintigraphy imaging of murine invasive pulmonary aspergillosis with a ^{111}In-labeled cyclic peptide, *Nuclear Medicine and Biology*, **2009**, *36,* 259-266

[23] M. E. Phelps, Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **2000**, *97*, 9226-9233

[24] A. Moller, A. Loft, A. Berthelsen, P. Damgaard, J. Graff, C. Christensen, K. Perell, B. Petersen, G. Daugaard, 18F-FDG PET/CT as a diagnostic tool in patients with extracervical carcinoma of unknown primary site: a literature review, *The oncologist*, **2011**, *16*, 445-451

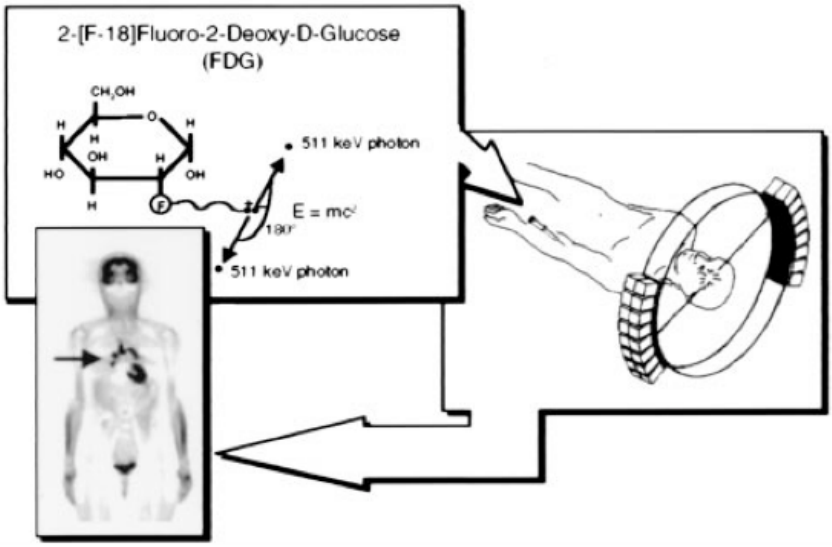


Figure 10 : *Principes du TEP : Injection en intraveineuse de [^{18}F]-FDG, distribution et détection*[23]

2. L'imagerie optique

L'imagerie optique est très utilisée comme technique d'imagerie cellulaire et moléculaire, car elle permet de détecter des interactions protéine-protéine, de suivre la régulation des gènes en analysant la propagation de radiations non-ionisantes (infrarouge proche) à travers les tissus.[25] L'utilisation de sondes optiques fluoresçant dans l'infrarouge proche permet d'améliorer la pénétration des photons à travers les tissus et de minimiser les effets d'autofluorescence des tissus.[26] Il existe deux types de sondes d'imagerie optique soit des petites molécules couplées à un fluorochrome soit des sondes subissant l'activité enzymatique de la cible pour être fluorescent.

Les agents d'imagerie optique obtenus par couplage

L'équipe de Weissleder[27] a développé en 2002 un agent d'imagerie émettant dans l'infrarouge proche ciblant les récepteurs au folate qui sont surexprimés dans de nombreux types de cancer et en particulier le cancer ovarien. Ce chromophore ciblant a été obtenu après couplage peptidique entre un bras espaceur amino couplé à l'acide folique et le fluorochrome NIR2 (λ_{ex}=665 nm / λ_{em}=686 nm) (Schéma 3).

[25] Luo Shenglin, Zhang Erlong, Su Yongping, Cheng Tianmin, Shi Chunmeng, A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging, *Biomaterials*, **2011**, *32*, 7127-7138
[26] S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, Near-infrared fluorescence : application to *in vivo* molecular imaging, *Curr. Op. Chem. Biol*., **2009**, *14*, 1-9
[27] C-H. Tung, U. Mahmood, S. Bredow, R. Weissleder, A receptor-targeted near-infrared fluorescence probe for *in vivo* tumor imaging, *Cancer Res.,* **2000**, *60*, 4953-4958

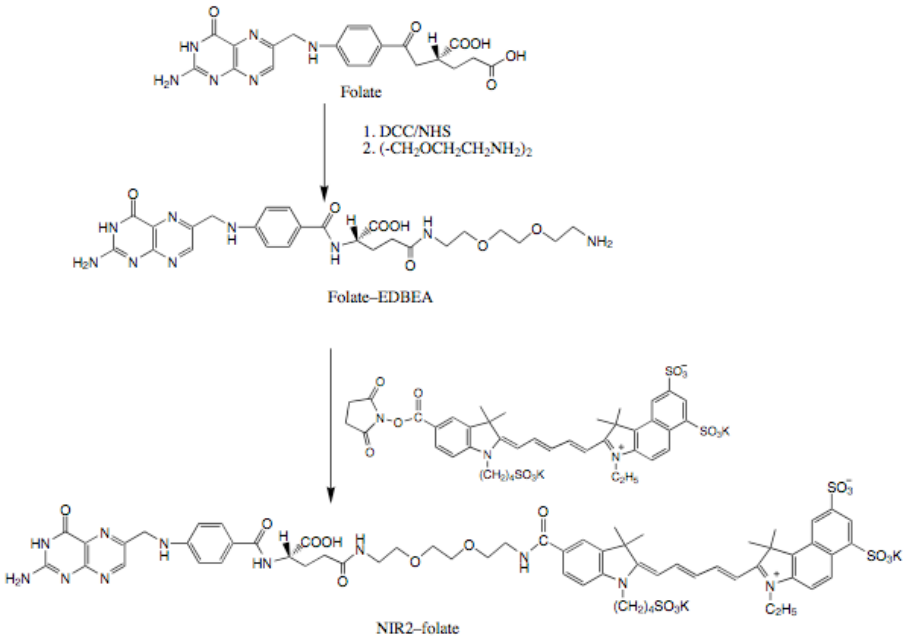


Schéma 3 : *Synthèse du conjugué NIR2-Folate*

Cette équipe a montré que la visibilité des tumeurs ovariennes chez la souris était nettement améliorée après l'administration de cette sonde. Cette amélioration était bien provoquée par l'accumulation du conjugué NIR2-Folate en interaction avec les récepteurs au folate de la tumeur (Figure 11).

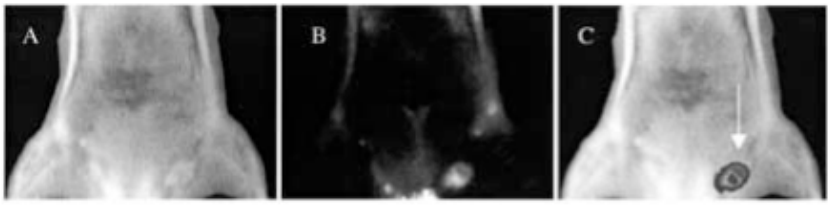


Figure 11 : *Images d'une tumeur ovarienne chez une souris (A) sous lumière blanche (B) sous infrarouge proche (C) superposition de A et B*[27]

Une autre approche pour l'imagerie optique ciblant les tumeurs est l'utilisation du peptide cyclique contenant la séquence tripeptidique Arg-Gly-Asp (cRGD). Le RGD est bien connu pour sa reconnaissance et son interaction avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ surexprimées dans les cellules endothéliales pendant l'angiogénèse et dans beaucoup de cellules cancéreuses. C'est pourquoi des sondes ont été développées à partir de RAFT-c(RGDfK-)$_4$ pour cibler dans des modèles *in vivo* des tumeurs $\alpha_v\beta_3$ positives ou négatives.[28] La petite molécule RAFT-c(RGDfK-)$_4$ a été marquée par de la cyanine 5 (λ_{ex}=649 nm/λ_{em}=670 nm). Les études *in vivo*

[28] Z-H. Jin, V. Josserand, S. Foillard, D. Boturyn, P. Dumy, M-C. Favrot, J-L. Coll, In vivo optical imaging of intergrin $\alpha_v\beta_3$in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors, *Mol. Cancer*, **2007**, *6*, 41-49

ont permis d'obtenir une plus grande spécificité et une meilleure définition d'image qu'en utilisant l'analogue monomérique cRGD (Figure 12).

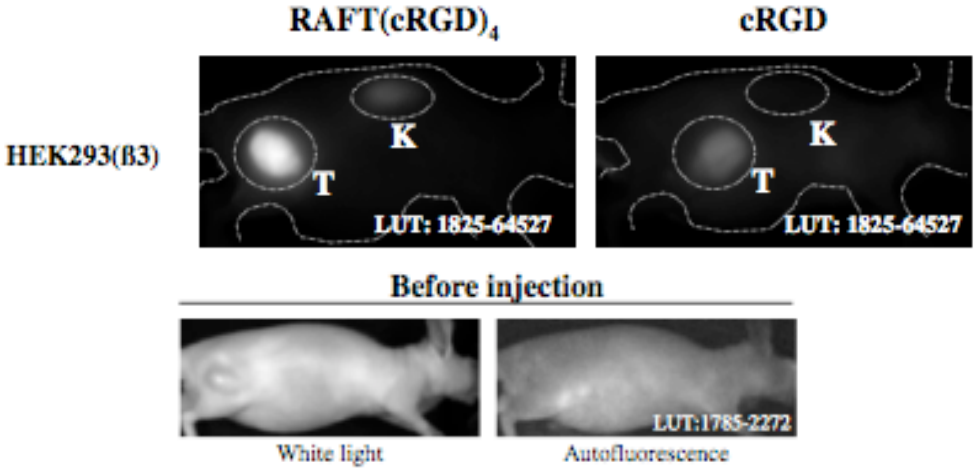


Figure 12: *Images de fluorescence de souris Swiss ayant des cellules HEK293 exprimant très fortement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ après injection de Cy5-RAFT-c(RGDfK-)$_4$ et de Cy5-cRGD*[28]

Les agents d'imagerie optique obtenus par activation enzymatique

Le développement de sondes d'imagerie optique activables pour mesurer spécifiquement les activités enzymatiques *in vivo* permet d'illustrer le concept d'agent d'imagerie moléculaire. Un exemple qui a été développé par les collaborateurs de Ralph Weissleder, permet de suivre l'activité enzymatique protéolytique.[29] Ils ont synthétisé un copolymère comportant de la cyanine Cy5.5 (λ_{ex}=674 nm/λ_{em}=694 nm) positionnée sur un substrat clivable par action enzymatique de la protéase cathepsine D. Dans son état natif, la sonde est essentiellement non fluorescente à 700 nm par quenching et est rendue fluorescente quand la cathepsine D permet le relarguage de la Cy5.5 (Schéma 4).

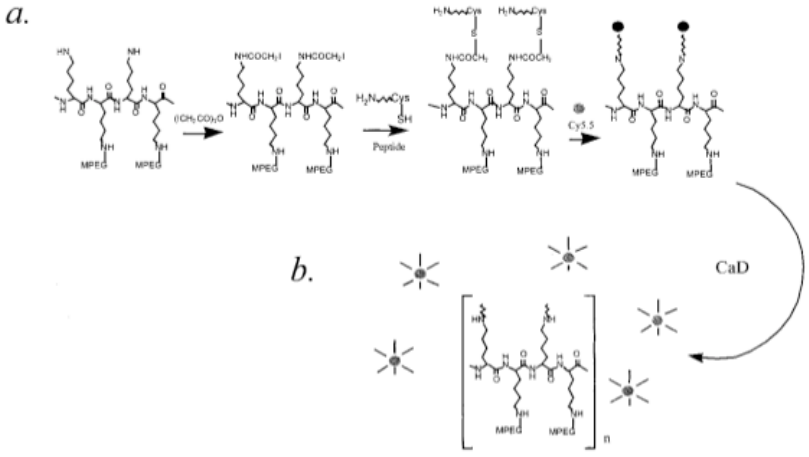


Schéma 4 *: (a) Synthèse de la sonde activable et (b) Activation sous l'interaction avec CaD*

[29] C-H. Tung, Y. Lin, W. K. Moon, R. Weissleder, *In vivo* imaging of proteolytic enzyme activity using a novel molecular reporter, *ChemBioChem*, **2002**, *8*, 784-786

En réalisant des injections de cette sonde sur des souris ayant des tumeurs exprimant ou non la protéase (Figure 13), ils ont montré que le signal émis dans le proche infrarouge était suffisant pour être détecté et était significativement différent en comparaison avec les tumeurs de contrôle négatif. Le développement de ce type de sonde permettrait de concevoir de nombreuses applications cliniques dans l'imagerie des protéases, comme la détection de l'activité protéolytique endogène dans les maladies, de suivre l'efficacité des inhibiteurs de protéases ou encore d'imager l'expression des gènes.

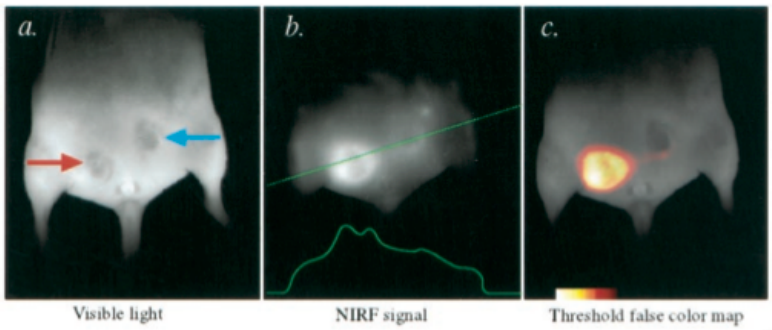


Figure 13 : *Images optiques d'une souris implantée avec une tumeur CaD+ (flèche rouge) et une tumeur CaD- (flèche bleue). (a) Lumière blanche 24h après l'injection de la sonde activable (b) Image à 700 nm (c) Image avec seuillage en couleur*[29]

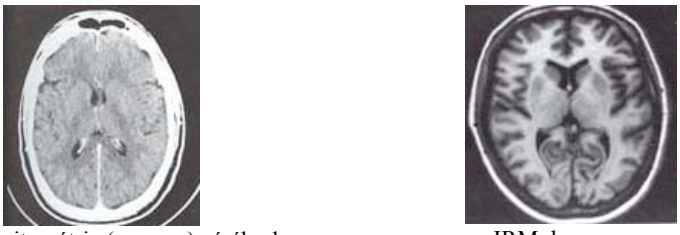
3. L'imagerie de résonance magnétique IRM

La résonance magnétique nucléaire est une technique en développement depuis une cinquantaine d'années. Le phénomène physique a été conceptualisé en 1946 par Felix Bloch et Edward Purcell, qui a reçu le prix Nobel de physique en 1952. Cette technique a depuis été largement utilisée par les chimistes, puis les biologistes. En 1969, Raymond Damadian pose les premières pierres de l'imagerie par résonance magnétique en observant que les propriétés magnétiques des tissus tumoraux sont différentes des tissus normaux. Il obtient des images du thorax en 1977. Parallèlement, Paul Lauterbur travaille sur le même sujet et publie ses travaux dans *Nature* en 1973. Peter Mansfield de son côté affina les méthodes permettant d'utiliser les signaux émis par les noyaux atomiques pour former des images.

Aujourd'hui, après 40 ans d'évolution, l'IRM est devenue une technique de diagnostique médical qui fournit des images tridimensionnelles et en coupe de grande précision anatomique. C'est une technique radiologique récente, non invasive et sans effets secondaires connus, basée sur l'observation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons de l'eau contenus dans l'organisme,[30] c'est-à-dire la réponse des noyaux soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique. Elle permet d'obtenir des images dans n'importe quel plan de l'espace et de localiser précisément des lésions. L'IRM

[30] D. Stark, W. Bradley, *Magnetic Resonance Imaging*, 2nd ed, Vol. 1, Chapter 5, Mosby Year Book, St. Louis, **1992**

permet de discriminer les différents types de tissus mous ce qui lui confère une excellente sensibilité de contraste. Pour se convaincre de la sensibilité de contraste de l'IRM, il suffit de comparer des coupes de scanner et d'IRM du cerveau (Figure 14) produites par ces deux techniques et d'observer les détails anatomiques.



Tomodensitométrie (scanner) cérébrale IRM du cerveau

Figure 14 *: Comparaison d'images entre le scanner et l'IRM*

En IRM, l'intensité du signal est souvent insuffisante pour permettre d'observer une différence convenable entre les parties saines ou affectées de l'organisme. Une façon très simple d'influencer le signal en IRM est d'augmenter le contraste, soit en augmentant le temps de l'examen pour permettre d'enregistrer plus d'acquisitions si le contraste initial est suffisant, soit en utilisant un agent de contraste spécifique ou non spécifique.

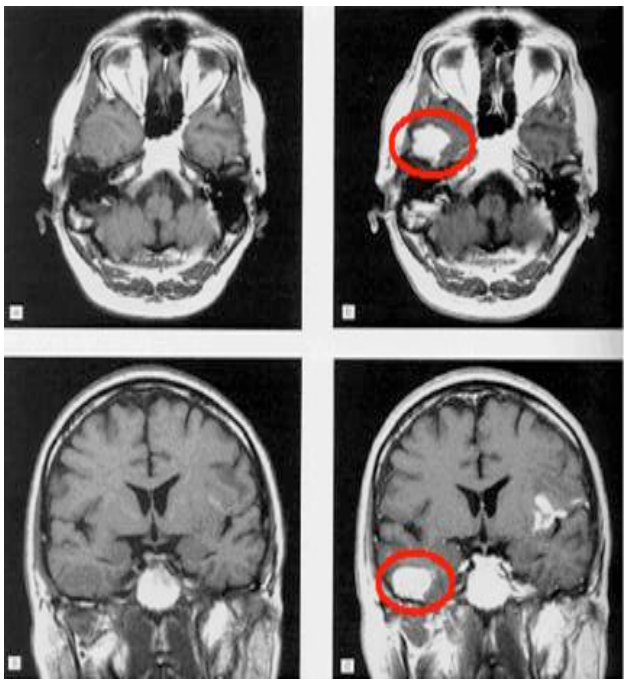


Figure 15 : *Exemples de clichés IRM*

Ces clichés IRM de la tête (Figure 15) d'un patient nous montre la différence entre une IRM sans (clichés à gauche), et une IRM avec agent de contraste (clichés à droite). On peut voir clairement la présence d'une tumeur, tache claire à la base de l'hémisphère gauche du cerveau après l'injection d'un agent de contraste qui s'introduit dans le tissu tumoral plus vascularisé et perméable.

a. Principe de la résonance magnétique nucléaire

L'IRM est une technique basée sur l'observation de la résonance magnétique nucléaire des noyaux des protons de l'eau. En effet, l'eau constitue environ 70 % du corps humain et le proton ^{1}H est naturellement abondant et très sensible en RMN.

Le principe de la mesure de résonance magnétique nucléaire est de mettre le moment magnétique μ des noyaux H en mouvement de précession autour d'un champ B_0 puis de perturber ce mouvement à l'aide d'un deuxième champ magnétique B_1 appliqué pendant un court instant. Cela dévie la trajectoire de μ, mais une fois B_1 stoppé, il retrouve son mouvement initial en présence de B_0 seul (Figure 16). Ce retour à l'équilibre s'accompagne d'une émission d'ondes électromagnétiques que l'on peut détecter : c'est le signal mesuré en RMN et IRM. Ce retour à l'équilibre s'effectue selon un phénomène de relaxation que l'on peut décomposer en deux, la relaxation longitudinale et la relaxation transversale.

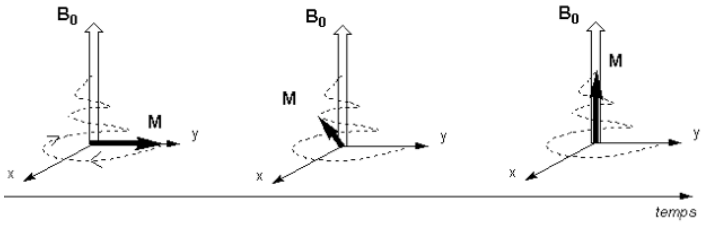


Figure 16 *: Retour à l'équilibre sous B_0 seul*[31]

La relaxation longitudinale

Le temps que mettent les moments magnétiques nucléaires à retrouver leur alignement longitudinal (i.e., sur la direction *z*) est baptisé *temps de relaxation longitudinale* et est noté T_1. Le retour de Mz à sa valeur de départ Mo suit une fonction exponentielle : $Mz(t) = Mo(1 - e^{-t/T1})$. Cette relaxation longitudinale, dite relaxation "spin-réseau", correspond au retour à l'équilibre énergétique du système après l'excitation. Elle dépend en fait de l'agitation moléculaire des atomes d'hydrogène dans le tissu que l'on observe. Si l'agitation moléculaire est très faible, les atomes d'hydrogène mettront du temps à revenir à l'équilibre (c'est le cas des tissus durs comme les os). Si l'agitation des molécules d'eau est très forte, comme c'est le cas dans les liquides comme le liquide céphalo-rachidien, la repousse est aussi lente. Par contre, si l'agitation est modérée (c'est-à-dire avec une constante de temps autour de la

[31] Site CultureSciences – Chimie de l'ENS- http://culturesciences.chimie.ens.fr. Article rédigé par Hagop Demirdjian (professeur agrégé responsable du site ENS-DGESCO *CultureSciences-Chimie*), relu par J.-B. Baudin (Sous-Directeur du Département de Chimie de l'ENS)

fréquence de Larmor[32]) comme dans la graisse ou dans la substance blanche, alors le temps T_1 est relativement court. T_1 sera d'autant plus court que ces hydrogènes seront liés à de grosses molécules.

La relaxation transversale

Ce phénomène apparaît lorsque que les atomes ne vont pas être dans un environnement magnétique homogène et donc leur fréquence de Larmor va elle aussi n'être pas parfaitement égale à la fréquence de Larmor théorique. Par conséquent, les différents moments magnétiques vont avoir tendance à se désynchroniser au lieu de tourner de façon cohérente autour de l'axe *z*. Cela se traduit par une diminution du signal lié à leur rotation asynchrone au cours du temps, dit temps de relaxation T_2 (encore appelé temps de relaxation "spin-spin"). Il s'agit du retour vers 0 de la composante transversale XY du champ M qui se fait de manière exponentielle $Mxy\ (t) = Mo\ e^{-t/T2}$. Ce temps de relaxation T_2 est toujours inférieur au temps de relaxation T_1. Il dépend lui aussi de la mobilité des atomes ou des molécules sur lesquelles ces protons sont engagés et traduit l'état de liaison des noyaux au niveau moléculaire. Ce temps de relaxation va varier pour un tissu donné selon l'organisation physico-chimique de l'eau dans ce tissu, et c'est sur ces variations que l'on s'appuie pour détecter au sein d'un tissu les modifications liées à la présence d'une lésion. Voici quelques valeurs de T_1 et de T_2 dans un champ de 1 Tesla (Tableau 1).

Tissus	T_1	T_2
Graisse	240 ms	84 ms
Muscle	730 ms	47 ms
Substance blanche	680 ms	92 ms
Substance grise	809 ms	101 ms

Tableau 1 *: T_1 et T_2 de certains tissus dans un champ de 1 Tesla*

Un autre paramètre intervient dans la modulation du signal RMN, il s'agit de la concentration de l'eau dans l'échantillon que l'on appelle aussi densité en protons. La densité d'hydrogène, le T_1 et le T_2 pour un tissu donné lors d'une affection aiguë, varie dans le même sens. En effet, un processus lésionnel aigu s'accompagne dans la plupart des cas de phénomènes inflammatoires et oedémateux qui ont pour résultat d'augmenter la quantité d'eau dans ces tissus. Dans un tissu cicatriciel par contre, ce sera le contraire.

[32] Pour qu'il ait résonance, le champ magnétique tournant doit avoir la même fréquence de rotation que celle du moment de spin du noyau. Cette fréquence est appelée fréquence de Larmor.

L'IRM visualise la relaxation des protons de l'eau d'un tissu et sa densité après une impulsion radio-fréquence. Suivant la composition du tissu, il aura des temps de relaxation T_1 ou T_2 plus ou moins longs. Les différences de relaxation sont "traduites" en différence d'intensité lumineuse, ce que l'on qualifie de contraste, ce qui permettra de former des images anatomiques. Il est possible de moduler l'intensité des images selon les temps de relaxation des différents tissus, c'est ce qu'on appelle la pondération de l'image en T_1, T_2.

b. Applications

IRM anatomique

Pour réaliser des images par résonance magnétique, il est indispensable de pouvoir localiser précisément le signal RMN. En IRM, la localisation spatiale du signal fait appel à l'utilisation de gradients. Les gradients de champs magnétiques réalisent une variation graduelle de champ magnétique dans l'espace 3D, permettant le codage spatial de l'image. Le résultat de cette opération est que, en présence de ces gradients de champ magnétique, chaque point du tissu biologique étudié possède sa propre fréquence de Larmor. Il suffira alors d'émettre une onde radiofréquence, dont la fréquence sera ajustée sur la fréquence de Larmor à l'endroit du tissu observé, pour récupérer en retour le signal RMN provenant de cet endroit. En répétant cette opération, en sélectionnant des plans de coupes successifs, on peut reconstruire une image par IRM anatomique 3D de la structure désirée. Les spectromètres IRM délivrent des images en quelques minutes avec des résolutions spatiales typiques de quelques centaines de microns pour des intensités de champ variant entre 4.7 et 9.4 T (Figure 17).

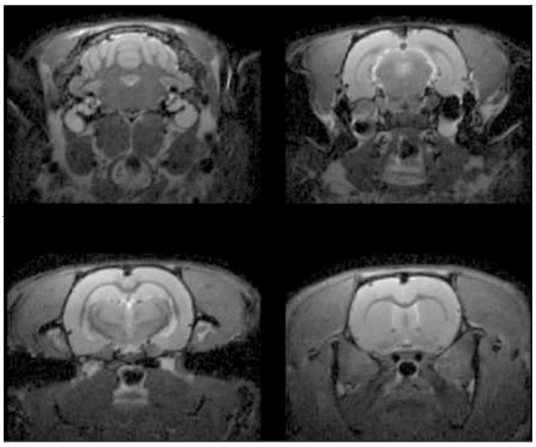


Figure 17 : *Coupes de cerveau de rat obtenues par IRM 7 Tesla (117*117*500µm)*[33]

[33] Thèse de Aurélie Desbree soutenue le 27/09/2005 s'intitulant « Nouvelle approche multimodale et quantitative pour les études in vivo chez le petit animal : couplage de la β-MicroProbe aux techniques magnétiques et développement de fantômes de rat et de souris voxelisés » de l'université Paris VII

L'IRM anatomique permet de voir en grands détails les structures du corps humain (Figure 18) et en particulier du cerveau, elle utilise la différence entre la proportion d'eau, de graisse et des temps de relaxation des différents tissus du cerveau pour en construire une image 3D. Selon le mode d'analyse des signaux IRM, on obtient une information spatiale de très haute résolution permettant de caractériser la forme, le volume ou encore la structure des tissus. L'IRM présente d'ailleurs pour les tissus mous un contraste largement supérieur à celui observé pour l'imagerie de rayons X.

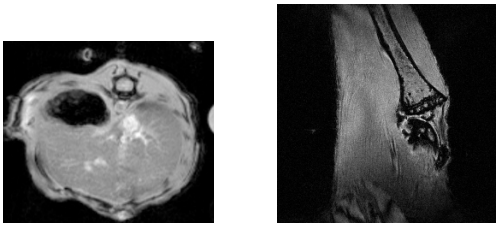


Figure 18 : *Coupes de foie et d'une articulation de souris*[33]

IRM fonctionnelle

On peut également acquérir des informations fonctionnelles caractérisant des paramètres physiologiques comme la diffusion de l'eau (IRM de diffusion)[34] ou le taux d'oxygénation du sang (IRM fonctionnelle).[35] Cette dernière variante s'appuie sur la modification de propriétés magnétiques locales liées au taux d'oxygénation de l'hémoglobine (l'oxyhémoglobine est diamagnétique, la désoxyhémoglobine est paramagnétique) (Figure 19). Lorsque l'on exerce un stimulus cérébral par exemple, l'activation neuronale entraîne une consommation locale d'oxygène, compensée par une augmentation du flux sanguin riche en oxyhémoglobine et donc une modification de la susceptibilité magnétique locale entraînant une variation du signal enregistré. En effectuant une soustraction de l'image au repos par rapport à l'image d'activation, on peut réaliser des cartes d'activation cérébrale avec une résolution temporelle de quelques secondes. Ainsi, ces techniques permettent de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents à l'activité neuronale.

[34] D. Yang, Q. Ye, D. Williams, T. Hitchens, and H. C, Normal and Transplanted Rat Kidneys: Diffusion MR Imaging at 7 T, *Radiology*, **2004,** *231*, 702-709

[35] Q. Shen, H. Ren, H. Cheng, M. Fisher, and T. Duong., Functional, perfusion and diffusion MRI of acute focal ischemic brain injury*, J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2005,** *25*, 1265–1279

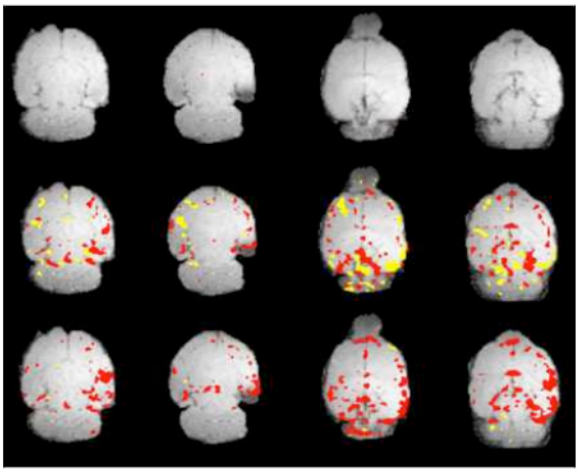


Figure 19 : *IRMf de l'évolution (haut en bas) de l'épilepsie chez le rat pour différentes coupes (gauche à droite)*[33]

L'IRM fonctionnelle ou IRMf permet donc d'étudier quelles régions du cerveau sont impliquées dans des activités comme : regarder des objets, entendre de la musique, faire des calculs, mémoriser une liste de mots, ou ressentir des émotions...

Applications in vivo sur petit animal

L'IRM est une modalité d'investigation extrêmement riche qui, outre une information anatomique de très haute résolution, permet de mesurer de nombreux paramètres physiologiques et de connaître les possibles altérations cellulaires ou moléculaires. Ainsi, l'IRM permet de caractériser des pathologies *in vivo* sur petit animal. Il est possible d'évaluer des thérapies sur des modèles de souris ou de rat, comme par exemple l'évaluation de nouveaux antiangiogéniques sur des modèles de cancer chez la souris, l'étude de la structure de l'os pour une application à l'ostéoporose ou encore la détection des nodules tumoraux du poumon chez la souris dans le cadre d'une thérapie immunitaire du cancer.

Cette technique présente cependant une résolution temporelle limitée par sa sensibilité relativement faible (10^{-3}-10^{-5} mol/l). En effet, le signal dépendant de la taille du voxel étudié (représention d'espace en 3D par traitement numérique de coupes 2D), il est nécessaire de faire un compromis entre la durée de l'acquisition et les dimensions des structures sondées afin de conserver une sensibilité de détection raisonnable. Toutefois, le développement et la caractérisation de molécules exogènes, les agents de contraste comme le Gadolinium (Gd), permettent d'augmenter significativement la sensibilité de détection.

c. Les agents de contraste en IRM

Les agents de contraste ont pour caractéristique d'influencer le signal IRM en augmentant la vitesse de relaxation magnétique des protons. Ils sont classés selon leur comportement magnétique, leur biodistribution et leur effet sur l'image (Tableau 2). Tous les agents de contraste IRM ont pour objectif de réduire le ou les temps de relaxation T_1 et T_2 du tissu cible.

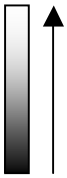
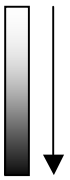
Propriétés magnétiques	Paramagnétique	Superparamagnétique
Amélioration de l'image	 Contraste positif (Réduction de T_1)	 Contraste négatif (Réduction de T_2)

Tableau 2 : *Classement des agents de contraste IRM*

Les agents paramagnétiques sont des ions métalliques qui ont des électrons non appariés et donc un moment magnétique permanent. En milieu aqueux, il y a une interaction dipolaire entre le moment magnétique de l'ion paramagnétique et les faibles moments magnétiques des protons des molécules d'eau environnantes. Les fluctuations de cette interaction magnétique dipolaire (qui résultent de mouvements moléculaires) réduisent à la fois les temps de relaxation longitudinale (T_1) et transversale (T_2) des protons de l'eau. Le Gadolinium (Gd^{3+}) et le Manganèse (Mn^{2+}) sont des exemples d'ions paramagnétiques utilisés comme agents de contraste IRM. Ces atomes, utilisés sous forme ionique, appartiennent à la classe des métaux de transition (Chrome, Manganèse, Fer) ou des lanthanides (Gadolinium, Dyprosium). Les agents actuellement commercialisés utilisent l'ion Gadolinium (III) dont l'efficacité sur le signal est la plus élevée. Sa couche électronique comporte en effet 7 électrons célibataires qui le rendent 2 fois plus efficace en terme de paramagnétisme que l'ion Fe^{3+}. Les métaux paramagnétiques ne peuvent pas être utilisés sous leur forme ionique en raison d'une biodistribution indésirable et d'une grande toxicité des ions métalliques, c'est pourquoi, pour être utilisés en tant qu'agent de contraste, ils sont chélatés.

Les agents superparamagnétiques[36] sont constitués par des nanoparticules d'oxyde de fer (diamètre compris entre 5 et 200 nm) qui, en présence d'un champ magnétique, ont un

[36] Le **superparamagnétisme** est un comportement des matériaux ferromagnétiques ou ferrimagnétiques qui apparaît lorsqu'ils sont sous la forme de petits grains ou nanoparticules. Dans des grains de taille suffisamment

moment dipolaire très important (supérieur à un chélate de Gd). En raison de leur taille et de leur moment magnétique, les particules d'oxyde de fer superparamagnétiques ont été développées en tant qu'agent de contraste pour réduire le temps de relaxation T_2.[37]

La capacité des agents à réduire les temps de relaxation T_1 ou T_2 des protons de l'eau reposent donc sur l'interaction dipolaire entre les moments magnétiques des ions paramagnétiques et les protons de l'eau. Un agent de contraste IRM peut être vu comme un catalyseur qui augmente les taux de relaxation R_1 (=1/T_1) et R_2 (=1/T_2) des protons de tissus. L'efficacité d'un agent de contraste à réduire les temps de relaxation des protons est défini par les valeurs de relaxivité r_1 et r_2, comme suit :

$$\text{Pour } r_1 \text{ (mM}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}, \; R_1 = r_1[\text{CA}] + R_{1_\text{tissu}}$$

$$\text{Pour } r_2 \text{ (mM}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}, \; R_2 = r_2[\text{CA}] + R_{2_\text{tissu}}$$

où [CA] est la concentration de l'agent de contraste en mmol/L et R_{1_tissu} : valeur du taux de relaxation en absence de l'agent de contraste.[38]

La relaxation des protons nécessite que les protons rentrent en contact avec l'agent de contraste. Pour les agents paramagnétiques de faible poids moléculaire, la moitié des relaxations r_1 et r_2 est due à un effet de sphère interne qui résulte d'un échange chimique d'une molécule d'eau entre la première sphère de coordination de l'ion paramagnétique et l'eau environnante. La contribution de la sphère interne dépend de plusieurs temps caractéristiques[39] :

- T_1 et T_2 les temps de relaxation longitudinale et transversale ;
- le temps de résidence d'une molécule d'eau en première sphère de coordination du cation τ_M;
- le temps de corrélation rotationnel τ_R (Figure 20).

Plus il y aura de molécules d'eau coordinées au métal et plus le temps de relaxation diminuera ce qui aura pour conséquence l'augmentation du signal. La Figure 20 est, par

petite, l'aimantation peut se renverser spontanément sous l'influence de la température. Le temps moyen entre deux renversements est appelé temps de relaxation de Néel. En l'absence de champ magnétique appliqué, si le temps utilisé pour mesurer l'aimantation de ces grains est beaucoup plus grand que le temps de relaxation de Néel, leur aimantation apparaît nulle : on dit qu'ils sont dans un état superparamagnétique. Dans cet état, un champ extérieur peut aimanter les grains, comme dans un matériau paramagnétique. Néanmoins, la susceptibilité magnétique de grains superparamagnétiques est beaucoup plus grande que celle des matériaux paramagnétiques.

[37] I. Solomon, N. Bloembergen, Nuclear magnetic interactions in the HF molecule, *J. Chem. Phys*., **1956**, *25*, 261

[38] A. E. Merbach and E. Tóth, The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging, Wiley, **2001**

[39] I. Solomon, Relaxation processes in a system of two spins, *Phys. Rev.,* **1955**, *99*, 559

exemple, une représentation des paramètres dynamiques du complexe Gadolinium – DOTA (Acide tétraazacyclododécanetétraacétique).

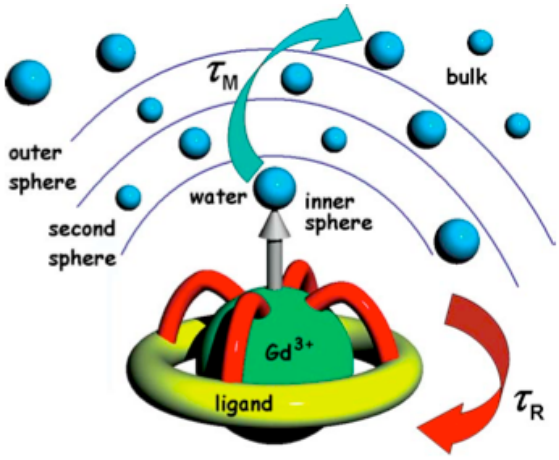


Figure 20: *Schéma de [Gd(DOTA)(H₂O)]⁻ en solution et paramètres dynamiques agissant sur la relaxivité*[40]

L'autre moitié des relaxations r_1 et r_2 est due à une diffusion des molécules à travers la sphère de coordination externe de l'ion paramagnétique. La contribution de sphère externe est moins importante que celle de la sphère interne. Cependant, l'utilisation en IRM de ligands multidentates pour assurer la stabilité des complexes *in vivo*, réduit le nombre de molécules d'eau coordinnées, donc la contribution par sphère interne. La relaxation par sphère externe n'est alors plus négligeable. Elle est la conséquence des interactions à longue portée avec les protons de molécules d'eau libres. Par conséquent, la diffusion des molécules d'eau au voisinage du complexe cause des fluctuations du champ magnétique local ressenti par les protons. Un résultat important de cette théorie de la sphère externe est que le rapport r_2/r_1 augmente avec la taille des particules, donc une petite particule aura une plus grande influence sur le temps T_1 qu'une grande.

d. Les agents de contraste paramagnétiques du gadolinium pour l'imagerie moléculaire

Le but d'utiliser un agent de contraste en IRM est d'accélérer la relaxation des protons de l'eau dans les tissus environnants. Cet objectif comme nous venons de le voir peut être accompli avec des substances paramagnétiques. En 1948, Bloch *et al.*[41] a décrit l'utilisation de sels paramagnétiques de nitrate ferrique pour améliorer les taux de relaxation de l'eau. 30

[40] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubıcek, I. Lukes, Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes, *Dalton Trans.,* **2008**, 3027–3047
[41] F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, The nuclear induction experiment, *Phys. Rev.,* **1948**, *70*, 474-485

ans plus tard, Lauterbur *et al.*[42] ont utilisé des sels de manganèse (II) pour différencier des tissus en se basant sur des temps de relaxation différents, ce qui a conduit à la première image IRM. Actuellement, les complexes de Gadolinium (III) sont de loin les plus utilisés comme agent de contraste lors des examens cliniques. Les sept électrons non appariés du Gd(III) en font l'ion métallique paramagnétique le plus stable. De plus, le Gd(III) a une relaxation électronique relativement lente ce qui lui confère une bonne efficacité en tant qu'agent de contraste IRM.

Agents de contraste non spécifiques

Le rayon ionique de Gd^{3+} (1,02 Å) est très proche de celui du calcium (0,99 Å). Ainsi, il peut entrer en compétition avec les systèmes calcium dépendants et bloquer le système réticuloendothélial. C'est pourquoi sous forme libre, l'ion Gd^{3+} est toxique.[38] La solution consiste à enfermer ces cations dans des ligands, linéaires ou cycliques pour former des complexes non toxiques, inertes et stables dans l'organisme. En effet, cet ion a besoin de sept voire huit atomes donneurs pour accomplir la sphère de coordination et former un complexe stable et non toxique. Enfermé dans la sphère de coordination, Gd^{3+}, cation toxique, ne s'exprime que par son effet paramagnétique. Pour augmenter la relaxation du proton de l'eau et donc sa stabilité, le gadolinium laisse également, au moins un emplacement ouvert pour l'échange d'un ligand d'eau. Les polyaminocarboxylates de gadolinium (III) se sont révélés les plus appropriés et 4 sont actuellement utilisés dans le domaine médical[43] :

- $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2+}$ou Gadopentétate de diméglumine (*Magnevist, Schering*)
- $[Gd(DTPA\text{-}BMA)(H_2O)]$ (*Omniscan, Nycomed Amersham*)
- $[Gd(DOTA)(H_2O)]^{-}$ ou Gadotérate de méglumine (*Dotarem, Guerbet*)
- $[Gd(HP\text{-}DO_3A)(H_2O)]$ ou Gadotéridol (*Prohance, Squibb*)

[42] P. C. Lauterbur, M. H. Mendoca-Dias, A. M. Rudin in Frontiers of Biological Energetics, Dutton P. L., Leigh L. S., *Scarpa A. (Eds), Academic Press*, New York, **1978**, 752

[43] H. U. Kauczor, X. J. Chen, E. J. R. Van Beek, W. G. Schreiber, Pulmonary ventilation imaged by magnetic resonance: at the doorstep of clinical application, *Eur. Respir. J.*, **2001**, 17, 1008-1023

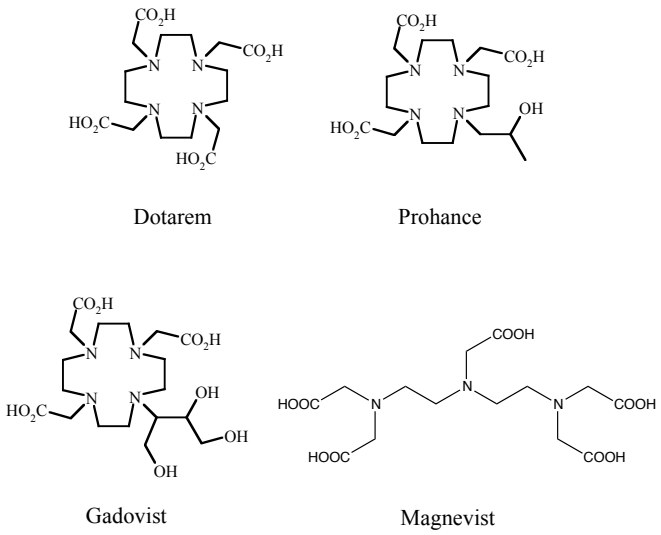


Figure 21 : *Ligands de gadolinium commercialisés*

Les propriétés de renforcement de contraste sont sensiblement identiques pour ces quatre produits. Ils diffèrent surtout par le caractère macrocyclique ou linéaire du chélate et par le nombre de charges électrostatiques du complexe. Le principal enjeu pour ces produits de contraste est de pouvoir allier l'efficacité (propriétés paramagnétiques) de l'ion gadolinium, la spécificité de son action sur les molécules d'eau, tout en assurant la sécurité du patient. Le type du chélate conditionne la stabilité du complexe qui est dans tous les cas élevée, encore qu'elle le soit plus avec les produits macrocycliques. Elle s'exprime par une constante d'affinité K, d'autant plus élevée que la dissociation est faible ($K_{Gd\text{-}DTPA}=10^{22.5}$, $K_{Gd\text{-}DOTA}=10^{25}$). D'autre part, les complexes paramagnétiques étant hydrophiles par leur fonction carboxylate ne se lient pas aux protéines et donc ne passent pas la barrière hémato-encéphalique saine. Peu résorbés par voie orale, ces complexes se distribuent rapidement dans l'eau extracellulaire de l'organisme sans organe cible. Ces traceurs des espaces extracellulaires sont ensuite excrétés rapidement dans l'urine sous forme inchangée (demi-vie de l'ordre de 80 à 100 minutes). L'agent de contraste clinique, le plus répandu connu sous le nom commercial *Magnevist*, est un agent administré par perfusion qui donne des informations sur la vascularité et le transport fluidique mais manque de spécificité pour cibler des tissus.

Agents de contraste spécifiques

Lorsque ces agents de contraste sont associés à des ligands,[44] le produit de contraste devient spécifique et il est alors possible d'obtenir des images de cibles biologiques qui se

[44] P. Caravan, Protein-targeted gadolinum-based magnetic resonance imaging (IRM) contrast agents : design and mechanism of action, *Accounts of chemical research*, **2009**, *42*, 851-862

trouvent par exemple dans des zones de néovascularisation des tumeurs, mais aussi de l'angiogénèse et de l'apoptose.

Le premier exemple d'agent de contraste IRM spécifique répondant aux critères de l'imagerie moléculaire permettait de cibler des hauts niveaux de fibrine, protéine qui apparaît au moment de la coagulation sous l'action de la thrombine.[45] Ces agents ont été utilisés avec succès dans différents modèles de thrombrine artérielle et veineuse. Il s'agit de nanoparticules de Gd-DTPA conjuguées à des fragments d'anticorps antifibrine permettant, en se fixant sur la fibrine (antigène thrombique) la visualisation du thrombus.

Les complexes linéaires ou cycliques de Gd^{3+} liés à un peptide β amyloïde adéquat permettent la détection de plaques d'Alzheimer.[46] Inclus dans des nanoparticules ciblées contre le facteur de croissance endothélial qui est l'$\alpha_v\beta_3$ intégrine, ils permettent de mesurer le niveau de (néo) angiogénèse dont l'expression est corrélée au grade tumoral.[47] Une autre classe d'agents de contraste basés sur le gadolinium sont les liposomes, qui sont formés à partir d'encapsidation de chélates de gadolinium à l'intérieur d'une vésicule formée par une bicouche lipidique. L'incorporation de conjugués du glucose à l'intérieur de la bicouche de vésicule non-ionique (niosomes) a permis d'obtenir des images ciblées de tumeurs qui surexprimaient des récepteurs du glucose[48] (Figure 22).

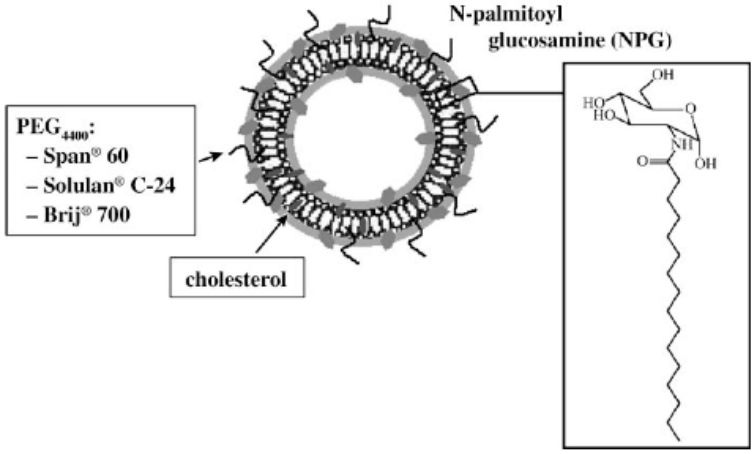


Figure 22 : *Représentation schématique du niosome PEG 4400 glycosylé*[48]

[45] RM Botnar, AS Perez, S Witte, AJ Wiethoff, J Laredo, J Hamilton, W Quist, EC Parsons, A Vaidya, A Kolodziej et al., In vivo molecular imaging of acute and subacute thrombosis using a fibrin-binding magnetic resonance imaging contrast agent, *Circulation*, **2004**, *109*, 2023-2029

[46] JF. Poduslo, TM. Wengenack, GL Curran, et al., Molecular targeting of Alzheimer's amyloid plaques for contrast-enhanced magnetic resonance imaging, *Neurobiol Dis*, **2002**, *11*, 315-329

[47] DA Sipkins, DA Cheresh, MR Kazemi, Detection of tumor angiogenesis in vivo by avb3-targeted magnetic resonance imaging, *Nature Medecine*, **1998**, *4*, 623-626

[48] A. Liciani, JC. Olivier, O. Clement, N. Siauve, PY. Brillet, B. Bessoud, F. Gazeau, IF Uchegbu, E. Kahn, G. Fija, *et al.,* Glucose-receptor MR imaging of tumors : study in mice with PEGylated paramagnetic niosomes, *Radiology*, **2004**, *231*, 135-142

D. Multimodalité

Les différentes imageries précédemment développées ont toutes des résolutions spatiales et temporelles différentes, des profondeurs de pénétration de tissus différentes, des sensibilités variant en fonction de la méthode utilisée. Chaque type d'imagerie a des inconvénients et des limites. C'est pourquoi avec une approche multimodale,[49] les avantages de chaque technique peuvent être accrus et les faiblesses réduites offrant la perspective d'améliorer les diagnostiques, le suivi thérapeutique et la recherche pré-clinique. Les différentes imageries peuvent être divisées en deux groupes : celles qui fournissent des informations structurelles (comme l'IRM, les ultrasons) et celles qui offrent des informations fonctionnelles ou moléculaires (comme la scintigraphie, la PET, l'imagerie optique[50]). Le but est alors de combiner les informations fonctionnelles avec des informations anatomiques.

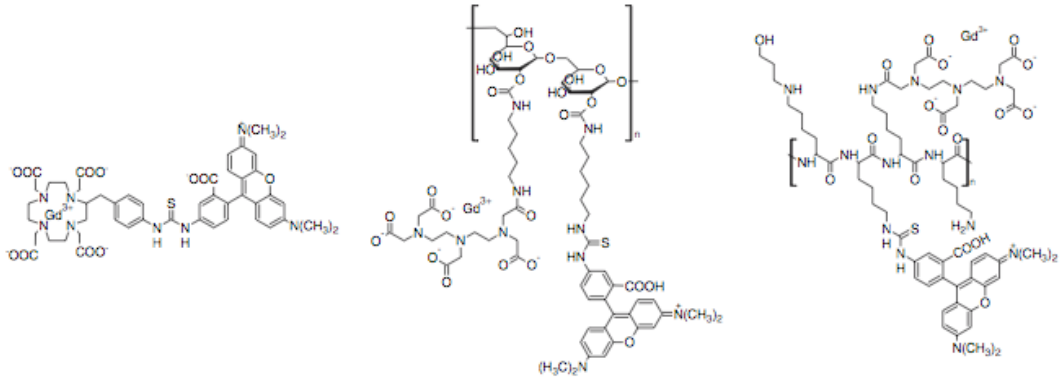
IRM/Imagerie optique

Le premier agent de contraste bimodal alliant l'IRM et l'imagerie optique a été préparé en 1998 par Hueber[51] *et al.* pour étudier les lignées cellulaires embryonnaires des embryons *Xenopus laevis*. Ces sondes ont été construites autour du complexe chélatant Gd^{3+}, le DTPA et la tétraméthylrhodamine. Le premier agent obtenu monomérique Gd(Rhoda-DOTA) a pu être détecté uniquement par microscopie à fluorescence, car la molécule s'adsorbaient dans les tissus gras qui ne possèdent pas ou peu d'eau à échanger pour la détection en IRM. C'est pourquoi ils ont développé des agents de contraste à partir d'une polylysine (GRIP – molécule C) et d'un polydextran (GRID – molécule B) couplé par liaison thiourée avec la tétraméthylrhodamine et par liaison peptidique avec le DTPA. Ils ont montré que ces derniers étaient capables de tracer les cellules durant le développement embryonnaire par IRM et microscopie à fluorescence (Figure 23).

[49] L. Frullano, TJ. Meade, Multimodal MRI contrast agents, *J. Biol. Inorg. Chem.,* **2007**, *12*, 939-949

[50] He Xiaoxiao, Gao Jinhao, Gambhir Sanjiv Sam, Cheng Zhen, Near-infrared fluorescent nanoprobes for cancer molecular imaging: status and challenges, *Trends in Molecular Medicine*, **2010**, *16,* 574-583

[51] MM. Hueber, AB. Staubli, K. Kustedjo, MHB. Gray, J. Shih, SE. Fraser, RE. Jacobs, TJ. Meade Fluorescently Detectable Magnetic Resonance Imaging Agents*, Bioconjug. Chem*., **1998**, *9*, 242-249



A B C

Figure 23 : *Structures des agents de contraste multimodaux (A) Gd(Rhoda-DOTA) (B) GRID et (C) GRIP*

L'utilisation de Quantum dots[52], nanocristaux semiconducteurs, s'est fortement développée ces dernières années comme outil d'imagerie optique à cause de leur fluorescence et de leur photostabilité. L'équipe de Nicolay[53] a développé une nanoparticule de quantum dot spécifique des $\alpha_v\beta_3$ intégrines qui a été optimisé pour la détection optique et IRM de l'angiogénèse tumorale.

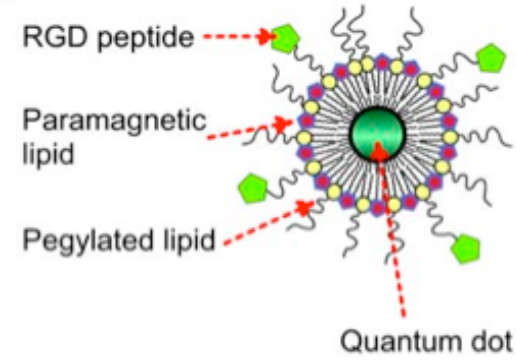


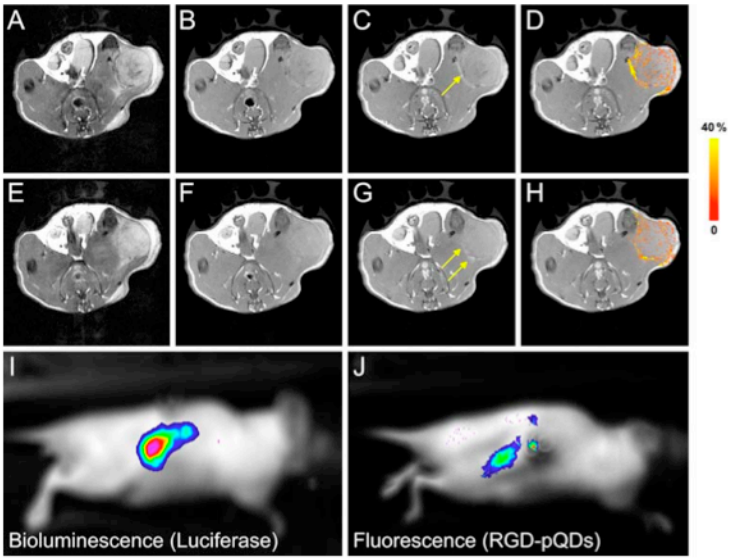
Figure 24 : *Agent de contraste RGD-PQDs*[53]

L'agent de contraste nanoparticulaire (Figure 24) est constitué d'un cœur de quantum dot recouvert par une enveloppe micellaire composée de phospholipide pegylé (PEG-DSPE), de lipides couplés de Gd-DTPA (Gd-DTPA-BSA) et de lipides couplés au RGD cyclique pour le ciblage de l'$\alpha_v\beta_3$ intégrine. Après l'injection en intraveineuse de RGD-PQDs dans une souris porteuse de tumeur, la microscopie à fluorescence a permis la détection de l'activité endothéliale angiogénique au niveau cellulaire (image J). L'IRM a été utilisée pour visualiser l'angiogénèse au niveau anatomique en délimitant la tumeur (images C et G après 45 min de l'injection de RGD-PQDs en comparaison des images B et F sans injection). Cette

[52] A. Ragusa, A. Zacheo, A. Aloisi, T. Pellegrino, Quantum dots designed for biomedical applications, *Inorganic Nanoparticles*, **2011**, *24,* 257-311

[53] Klaas Nicolay *et al.*, Molecular imaging of tumor agiogenesis using $\alpha_v\beta_3$-integrin targeted multimodal quantum dots, *Angiogenesis*, **2008**

nanoparticule pourrait être utilisée pour l'imagerie multimodale de maladies qui seraient liées à l'activation de cellules endothétiales.



(a-h) images IRM : (a et e) images pondérées en T_2 obtenues avant injection de l'agent montrant le contour de la tumeur sur le flanc droit (b,c,f,g) images pondérées en T_1 (b et f) avant injection (c et g) après 45 min de l'injection du RGD-PQDs.
(i et j) Image de bioluminescence et de fluorescence d'une souris exprimant la luciférase dans une tumeur rénale après injection de luciférine (i) Le fort signal de bioluminescence indique la taille de la tumeur dans le rein. Ce signal est colocalisé par le fort signal de fluorescence (j) provenant de l'accumulation de RGD-pQDs dans la tumeur.

Figure 25 : *Imagerie moléculaire par résonance magnétique et optique de l'angiogénèse tumorale*[53]

Imagerie optique/Imagerie nucléaire

Un agent d'imagerie combinant l'imagerie optique et l'imagerie nucléaire appelé DLIA-IL11Rα a été développé pour cibler les récepteurs d'interleukine 11, cytokine multifonctionnelle.[54] L'interleukine 11 et son récepteur alpha-chain (IL-11Rα) sont reliés au développement et à la progression du cancer du sein et pourraient jouer un rôle significatif dans les métastases osseuses du cancer du sein. Cet agent bimodal ^{111}In-DTPA-Bz-NH-SA-K(IR-783-S-Ph-CO)-c(CGRRAGGSC)NH_2 est construit autour du radionucléide ^{111}In-DTPA-Bz-NH-SA, du chromophore émettant dans l'infrarouge proche IR-783-S-Ph-COOH et du peptide cyclique c(CGRRAGGSC), qui est connu pour cibler les récepteurs de l'interleukine 11 (IL-11Rα) afin de distribuer l'agent d'imagerie à sa cible (Figure 26).

[54] W. Wang, K. Shi, K. Sunkunk, Y. Sasidhar, A. G. Cameron, E. K. Adams, M. E. Mawad, E. M. Sevick-Muraca, A new optical and nuclear dual-labeled imaging agent targeting interleukin 11 receptor alpha-chain, *Bioconjugate Chem.,* **2007**, *18*, 397-402

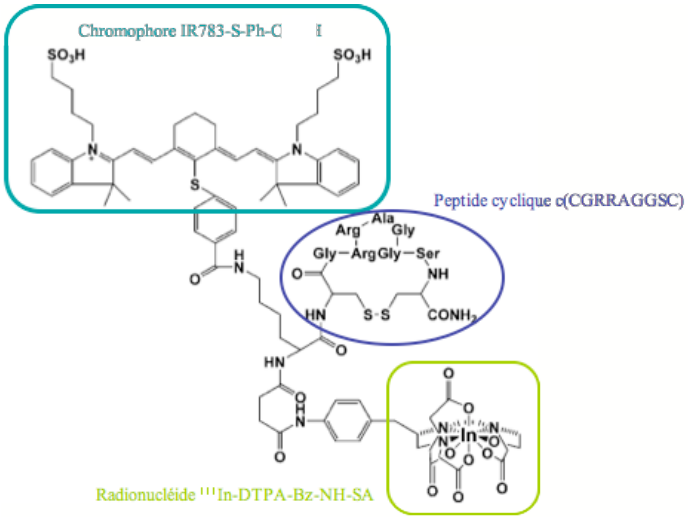


Figure 26: *Structure de l'agent bimodal DLIA-IL11Rα*

Les expériences ont révélé que le peptide cyclique c(CGRRAGGSC) était toujours capable de cibler le IL-11Rα après conjugaison avec les sondes optiques et nucléaires. De plus, une seule injection de cet agent DLIA-IL11Rα a permis d'obtenir des images d'une tumeur cancéreuse du sein en imagerie optique et en imagerie nucléaire. Ces tests ont montré que l'agent bimodal était capable de cibler les tumeurs in vivo (Figure 27).

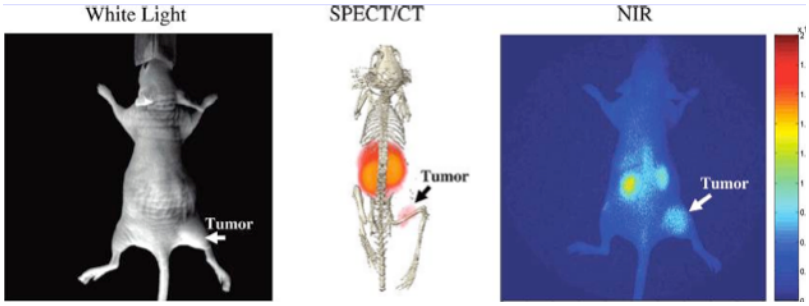


Figure 27: *Images après 24h de l'injection du DLIA-IL11Rα dans une souris porteuse du cancer humain du sein*[54]

La combinaison de la grande sensibilité et la résolution de la microscopie optique avec la capacité de l'IRM d'obtenir des images d'échantillons opaques permet d'étudier des structures biologiques avec de très bonnes résolutions et à des profondeurs différentes. L'acquisition de ces informations moléculaires et physiologiques a fait de cette nouvelle discipline, l'imagerie moléculaire, un outil essentiel pour l'innovation thérapeutique en cancérologie.

E. Enjeux en cancérologie

Le cancer est le plus souvent lié à la prolifération de cellules devenues étrangères à un organe, suite à des mutations génétiques. N'obéissant plus aux signaux de contrôle, ces

cellules se mettent à vivre beaucoup plus longtemps que leurs "consœurs" saines. Sans intervention thérapeutique, elles détruisent les tissus valides et peuvent envahir les tissus voisins et éloignés via les vaisseaux lymphatiques ou sanguins. On parle alors de métastases.

Pour diagnostiquer et traiter un cancer, le médecin doit pouvoir évaluer l'importance de la maladie, administrer le traitement adéquat et mesurer son efficacité. Plus la maladie est détectée tôt, plus elle peut être soignée efficacement. L'évolution des techniques d'imagerie a déjà permis d'améliorer la détection et le suivi de ces pathologies, de manière non invasive. Mais le contraste des images est longtemps resté insuffisant pour une détection précise des cellules malades. C'est là que l'imagerie moléculaire prend toute sa place. Elle permet non seulement aux cliniciens de voir où se situe la tumeur dans le corps, mais aussi de visualiser l'expression et l'activité de molécules spécifiques (protéases, protéine kinase…). Par cette visualisation de l'activité biologique, l'imagerie moléculaire met en avant les processus biologiques (apoptose, angiogénèse et métastase) qui ont une influence sur le comportement tumoral et la réponse d'une thérapie sur ces processus.

Le produit d'imagerie moléculaire actuellement utilisé en médecine pour le diagnostic précoce de nombreux cancers est le radiopharmaceutique fluoro-désoxyglucose (^{18}F-FDG) comme cela a été vu au paragraphe ***I.3.a***. En effet, on sait que les cellules cancéreuses consomment plus de glucose que les cellules saines environnantes. On injecte le ^{18}F-FDG qui s'accumule dans les cellules cancéreuses. Grâce à une caméra à positons dans laquelle est placé le patient, un traitement informatique permet d'enregistrer ces émissions et de les retranscrire en images en trois dimensions. Les anomalies métaboliques liées au fonctionnement anormal des cellules cancéreuses sont ainsi rendues visibles bien souvent avant l'apparition d'anomalies anatomiques. L'imagerie FDG-TEP est particulièrement utilisée pour le lymphome, le cancer de l'œsophage, du cou, de la tête et des ovaires.[55]

De même, l'efficacité d'un traitement par chimiothérapie se traduit par un changement de métabolisme de la tumeur, visible en imagerie avant la réduction de la taille de cette tumeur. Le patient peut ainsi bénéficier plus rapidement du traitement le plus adéquat (Figure 28).

[55] (a) A. Quon, S. S. Gambhir, FDG-PET and beyond: molecular breast cancer imaging , *J. Clin. Oncol*., **2005**, *23*, 1664-1673 ; (b) H. A. Wieder et al., Time course of tumor metabolic activity during chemoradiotherapy of esophageal squamous cell carcinoma and response to treatment , *J. Clin. Oncol*., **2004**, *22*, 900-908

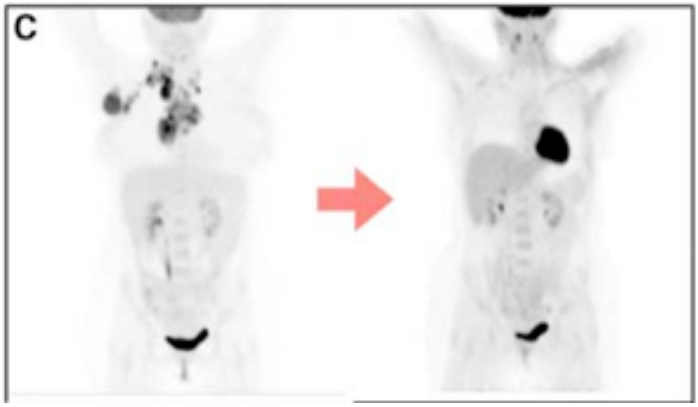


Figure 28 : *Image FDG-TEP d'un patient avec un lymphome avant (gauche) et après (droite) traitement*[55]

L'IRM permet de fournir des informations importantes sur la classification des cancers. Par exemple, des nanoparticules magnétiques (Figure 29) ciblant les macrophages des ganglions lymphatiques ont été utilisées pour détecter des métastases ganglionnaires chez des patients ayant des cancers occultes. Grâce à l'excellente résolution spatiale de l'IRM, des métastases de quelques millimètres ont pu être détecté dans des ganglions lymphatiques,[56] une taille qui n'est pas détectable par les autres techniques d'imagerie (Figure 30).

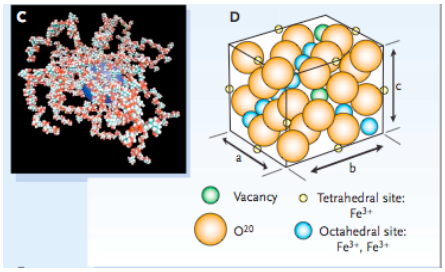


Figure 29 : *Nanoparticule ayant un cœur d'oxyde de fer superparamagnétique de monocristal à spinelle inverse et une enveloppe dense de dextran*

Figure 30 : *IRM montrant les métastases d'un cancer de la prostate (G) une image IRM axiale du bassin, dans le carré, les ganglions lymphatiques (H) IRM après injection de nanoparticules : visualisation de micrométastates (zone noire) (I) reconstruction des métastates ganglionnaires chez 34 patients par cette technique*

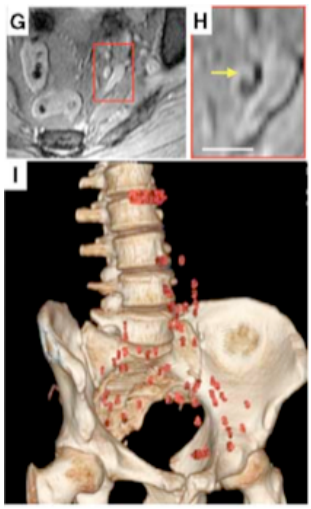


Figure 30

Malgré les progrès récents dans l'imagerie moléculaire, il y a très peu d'agents d'imagerie moléculaire sur le marché, car la plupart ne parvienne pas jusqu'aux études pré-cliniques. La synthèse de nouveaux agents d'imagerie doit tenir compte de plusieurs facteurs : avoir une très bonne affinité avec la cible, une absorption ou rétention non-spécifique très faible et une demi-vie assez longue pour être détecté à des concentrations à l'état de traces. L'utilisation de méthodes combinatoires, de la génétique chimique, de petites molécules

[56] M. G. Harisinghani *et al.,* Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer, *N. Engl. J. Med*., **2003**, *348*, 2491-2499

synthétiques[57] et de nouveaux nanomatériaux[58] a permis déjà d'améliorer le comportement pharmacologique de ces agents de contraste.

Nous venons de voir que les agents d'imagerie moléculaire résultent de la combinaison :

- d'un groupe ciblant ;
- et d'un ou plusieurs groupement(s) pour la détection.

Or, la **génétique chimique** utilise la chimie comme un outil pour comprendre et explorer le vivant. Elle permet d'identifier des petites molécules capables de moduler les activités biologiques de protéine et d'en faire de bons ligands pour l'imagerie moléculaire.

[57] R. Weissleder, K. Kelly, E. Y. Sun, T. Shtatland, L. Josephson, Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules*, Nat. Biotechnol*., **2005**, *23*, 1418

[58] D. G. Anderson, S. Levenberg, R. Langer, Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells, *Nat. Biotechnol.,* **2004**, *22*, 863

II. La génétique chimique

La finalisation du séquençage du génome humaine en 2003[59] a conduit à l'émergence d'un nouveau domaine de recherche : la protéomique.[60] Il s'agit de l'étude du protéome,[61] c'est-à-dire de l'ensemble des protéines produites par le génome dans des conditions données, en les isolant, les identifiant, les quantifiant et en analysant leurs fonctions cellulaires.[62] L'analyse des fonctions protéiques permet non seulement de mieux comprendre les mécanismes régissant les différents métabolismes cellulaires, mais également de faciliter la conception de nouveaux médicaments. Pour mieux appréhender ces fonctions, de nouvelles technologies, comme la **génétique chimique**, ont été développées. Il s'agit là d'une méthode qui utilise un **grand nombre de molécules** en tant que sondes, pour déterminer, suite à une étape d'évaluation ou de **criblage**, les structures capables d'interagir avec le système biologique étudié.

La médecine personnalisée va ainsi s'appuyer sur la génétique chimique pour identifier de nouveaux composés (molécules naturelles ou synthétiques) qui soient actifs sur des cibles biologiques spécifiques à chaque maladie. Cette identification permettra le développement d'agents d'imagerie moléculaire plus efficaces en termes de ciblage et de détection par accumulation sur la cible étudiée.

A. Principe de la génétique chimique

1. Définition

La génétique chimique[63] est une alternative aux méthodes classiques de génomique. Elle consiste à étudier la fonction d'un gène en modulant l'activité de la protéine dont il contrôle l'expression, grâce à de petites molécules organiques. La génétique se divise en deux

[59] L. D. Stein, Humane genome : End of the beginning, *Nature,* **2004***, 431*, 915-916
[60] M. Tyers, M. Mann, From genomics to proteomics, *Nature,* **2003,** *422*, 193-197
[61] M. R. Wilkins, C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K. L. Williams, D. F. Hochstrasser, From proteins to proteomes : large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis, *Biotechnology,* **1996,** *14*, 61-65
[62] S. Mocellin, C. R. Rossi, P. Traldi, D. Nitti, M. Lise, Molecular oncology in the post-genomic era : the chalenge of proteomics, *TRENDS Mol.Med.,* **2004,** *10*, 24-32
[63] (a) L. S. Schreiber, Chemical Genetics Resulting from a passion for synthetic organic chemistry, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1127. (b) T.J. Mitchison, Toward a pharmacological genetics, *Chem. Biol.* **1994**, 1, 3. (c) C. M. Crews, U. Splittberger, Chemical Genetics : Exploring and controlling cellular processes with chemical probes, *Trends Biochem. Sci.* **1999***, 24*, 317

approches exploratoires[64] : directe[65] et inverse[66] (Figure 31). La génétique chimique directe cherche à trouver une molécule capable d'induire une éventuelle modification phénotypique. Pour ceci, elle explore les effets d'une banque de molécules sélectionnées pour leur activité sur un phénotype, avec pour objectif l'identification des cibles biologiques pertinentes responsables du phénotype. La molécule est alors modifiée pour être utilisée comme un « hameçon » permettant d'isoler la cible. La seconde approche, qualifiée d'inverse, part d'une cible biologique (protéine) déjà connue et recherche des molécules qui sont actives sur cette protéine afin d'en analyser ultérieurement l'impact sur le phénotype. Cette approche permet d'identifier la fonction de la protéine étudiée.

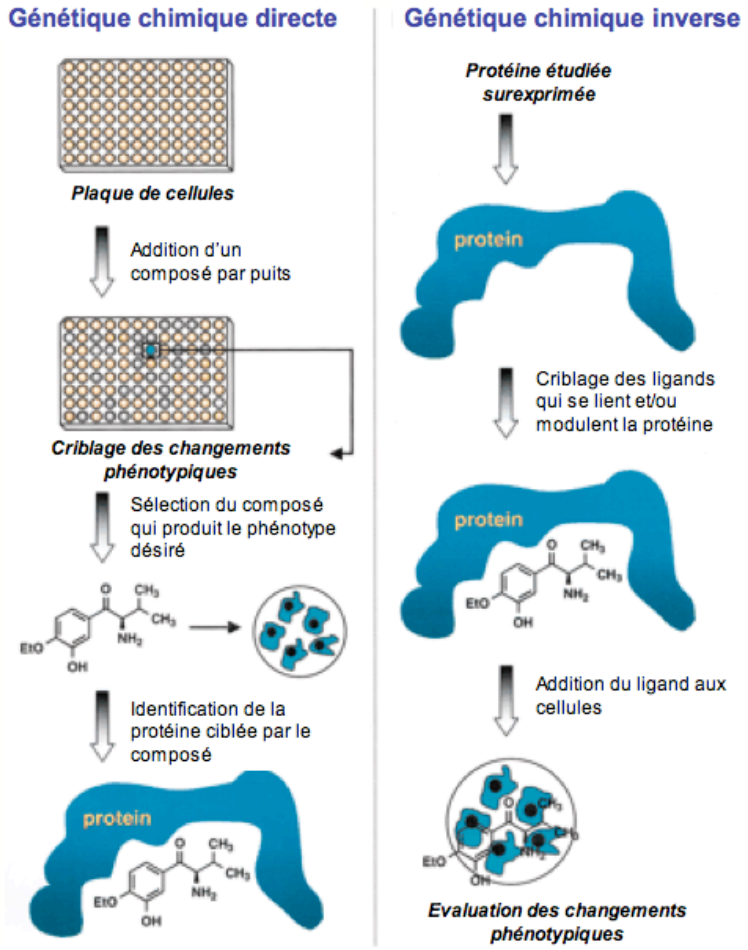


Figure 31 : *Principe de la génétique chimique*[6]

[64] D. P. Walsh, Y. T. Chang, Chemical Genetics, *Chem.Rev.* **2006**, *106*, 2476

[65] (a) J. L. Peters, F. Cnudde , T. Gearts, Forward Genetics and map-based cloning approaches, *Trends Plant Sci.* **2003**, *8*, 484. (b) J. Malicki, Harnessing the power of forward genetic analysis of neuronal diversity and patterning in the zebrafish retina , *Trend Neuro. Sci.* **2000**, *23*, 531. C) Lokey R. S., Forward chemical genetics : Progress and obstacles on the path of a new pharmacopoeia, *Current Opin. Chem. Biol.,* **2003**, *7,* 91-96

[66] (a) J. S. Takahashi, L. H. Pinto, M. H. Vitaterna, Forward and reverse genetic approaches to behaviour in the mouse, *Science,* **1994**, 264, 1724 ; (b) T. Mayer, Chemical genetics : tailoring tools for cell biology, *TRENDS in Cell. Biol.,* **2003**, *13(5)*, 270-277 ; (c) J-R. Yeh, C. M. Crews, Chemical genetics : adding to the developmental biology toolbox, *Developmental Cell,* **2003**, *5,* 11-19

2. Avantages et limites de la génétique chimique

La génétique chimique offre de nombreux avantages par rapport à la génétique classique. En effet, les techniques de génétique classique sont très difficiles d'emploi chez les cellules humaines du fait, notamment, de la taille des cellules ou encore d'une vitesse de croissance assez lente.[64] La génétique chimique peut répondre à ces limites car les méthodes de criblage des chimiothèques peuvent être menées sur ce type de cellules dans les conditions physiologiques.[67] Par ailleurs, la génétique chimique offre la possibilité d'évaluer les systèmes biologiques de façon réversible, en obtenant l'impact phénotypique attendu plus rapidement qu'avec les techniques existantes en génétique classique, à savoir le knockout, les allèles thermosensibles (exprimant le phénotype attendu uniquement à haute température), ou encore les oligonucléotides antisens qui bloquent la transcription du gène d'intérêt.[68]

De plus, une des principales limites en génétique classique est l'aspect définitif d'un knockout. Lorsqu'une manipulation génétique conduit au KO d'un gène, la protéine qui correspond à l'expression de ce gène n'est plus synthétisée. Ainsi, l'effet biologique observé suite à cette manipulation est un résultat dû à l'absence de la protéine et non à l'absence d'une fonction spécifique de celle-ci. Or, la plupart des protéines comportant diverses fonctions, il n'est pas possible de conclure quant à la fonction protéique mise en jeu lors de la modification phénotypique observée. L'utilisation de la génétique chimique permet de pallier ce problème : si l'interaction ligand/protéine est suffisamment spécifique, une fonction peut être modifiée sans que les autres ne soient altérées par la présence de la molécule. Ainsi, l'étude menée permet de conclure sur une fonction protéique spécifique.[69]

Cependant, cette nouvelle approche connaît également quelques limites. La disponibilité d'un grand nombre de structures étant limitée, la méthode ne peut pas être utilisée de façon aussi systématique que la génétique classique. En effet, la mutation ou l'invalidation d'un gène peut être obtenu en utilisant les mêmes méthodologies quel que soit le gène étudié, alors que l'étude d'une fonction protéique par la génétique chimique nécessite l'identification d'une molécule ayant des affinités spécifiques avec celle-ci.[70]

---

[67] T. K. Kim, Chemical genomics and medicinal systems biology : Chemical control of genomic networks in human systems biology for innovative medicine, *J. Biochem. Mol. Biol.*, **2004**, *37*, 53-58

[68] M. A. Shogren-Knaak, P. J. Alaimo, K. M. Shokat, Recent advances in chemical approaches to the study of biological systems, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.,* **2001***, 17*, 405-433

[69] P. J. Alaimo, M. A. Shogren-Knaak, K. M. Shokat, Chemical genetic approaches for the elucidation of signalling pathways, *Curr. Op. Chem. Biol.,* **2001***, 5,* 360-367

[70] G. MacBeath, Chemical genomics : what will it take and who gets to play ?, *Genome Biology*, **2001***, 2(6)*, 1-6

La génétique chimique requiert deux éléments principaux :

- la synthèse de banques de molécules de structures diverses ;
- le criblage à haut-débit de la banque de petites molécules pour sélectionner des molécules capables de moduler les fonctions protéiques des cellules.

B. Obtention des chimiothèques

L'analyse des systèmes biologiques par la génétique chimique nécessite le criblage d'un grand nombre de molécules. Les groupes pharmaceutiques disposent d'ores et déjà de ce type de bibliothèques dans la mesure où ils ont la possibilité de rassembler toutes les structures qu'ils ont pu développer au cours du dernier siècle. Quant aux groupes de recherche du monde académique, ils se sont investis dans la mise au point de nouvelles méthodologies permettant un accès rapide et aisé à de larges gammes de structures. Nous développons dans cette partie les outils de synthèse qui sont ainsi apparus.

1. Chimie combinatoire

Les méthodes de chimie combinatoire ont été développées à partir des années 1980[71] essentiellement pour réduire le temps de synthèse des molécules ainsi que le coût engendré. Il s'agit de mettre en œuvre des procédés de synthèse qui permettent d'aboutir à un grand nombre de structures, en quelques étapes, en utilisant des ensembles de composés de même réactivité. En effet, si l'on prend un ensemble de n composés de réactivité A (A_1,...,A_n) et un ensemble de n' composés de réactivité B (B_1,...,$B_{n'}$), la synthèse de type A+B conduit n.n' produits différents en une seule étape (Figure 32).[72]

Figure 32 : *Principe de la synthèse combinatoire*[72]

[71] H. M. Geysen, R. N. Meloen, S. J. Barleling, Use of peptides to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amoni acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **1984**, *81*, 3998-4002

[72] R. F. Service, Combinatorial chemistry hits the drug market, *Science,* **1996**, *272*, 1266-1268

La synthèse peut être effectuée suivant deux différentes stratégies. Les molécules peuvent êtres obtenues dans un même réacteur sous forme de mélange, on parle alors de synthèse combinatoire, ou chaque molécule peut être synthétisée dans un réacteur qui lui est propre, il s'agit dans ce cas de la synthèse en parallèle. Quelle que soit la stratégie utilisée les synthèses sont miniaturisées et robotisées.

Cependant, la génération de bibliothèques par ces méthodes ont rarement conduit à des structures biologiquement actives.[73] En effet, l'inconvénient majeur de ce système consiste en la synthèse d'entités structurellement très proches. Afin de pallier à ce problème, plusieurs équipes se sont investies dans le développement de nouvelles réactions compatibles avec les conditions de la chimie combinatoire de façon à élargir le panel de structures que l'on peut obtenir *via* cette méthode.[74] En effet par le biais de la synthèse combinatoire, il est alors possible d'obtenir un grand nombre de composés issus d'un squelette chimique commun et de parcourir rapidement les modifications stériques et/ou fonctionnelles qui pourraient accroître l'activité biologique.

2. Synthèse orientée vers la diversité - SOD

Etant donné le succès peu convaincant des molécules synthétisées par chimie combinatoire et le potentiel des produits naturels à être des agents pharmacologiques, on assiste actuellement à un retour d'intérêt vers les produits naturels mais par le biais de la synthèse organique. Cela se traduit par la formation de librairies de composés ressemblant aux produits naturels (natural product-like) qui présentent une grande diversité et complexité structurelle. Ce résultat se comprend aisément si dans une molécule, on considère que le squelette contrôle la bonne orientation des groupes fonctionnels qui assurent l'interaction avec la macromolécule d'intérêt. Dans ces conditions, on comprend que dans une chimiothèque, c'est la diversité des squelettes qui accroît la chance d'identifier des ligands des macromolécules criblées. C'est pour répondre à cette constatation que le groupe de Schreiber[7] a développé le principe de la Synthèse Orientée vers la Diversité (SOD).[75] Le but

[73] H. M. Geysen, F. Schoenen, D. Wagner, R. Wagner, Combinatorial compound libraries for drug discovery : an ongoing challenge, *Nature Rev. Drug. Disc.,* **2003,** *2*, 222-230
[74] F. Darvas, G. Dorman, L. Urge, I. Szabo, Z. Ronai, M. Sasvari-Szekely, Combinatorial chemistry. Facing the challenge of chemical genomics, *Pure Appl. Chem.,* **2001***, 73,* 1487-1498
[75] M. D. Burke, S. L. Schreiber; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 46

premier de cette approche est de peupler au mieux l'espace chimique[76] à l'opposé de la synthèse ciblée (Synthèse Orientée vers une Cible ou SOC). En effet, cette dernière consiste à synthétiser une structure cible obtenue à partir de données cristallographiques du système biologique que l'on souhaite perturber. Toutefois, lors de cette synthèse ciblée, seule une région très précise de l'espace chimique est visée (Figure 33).

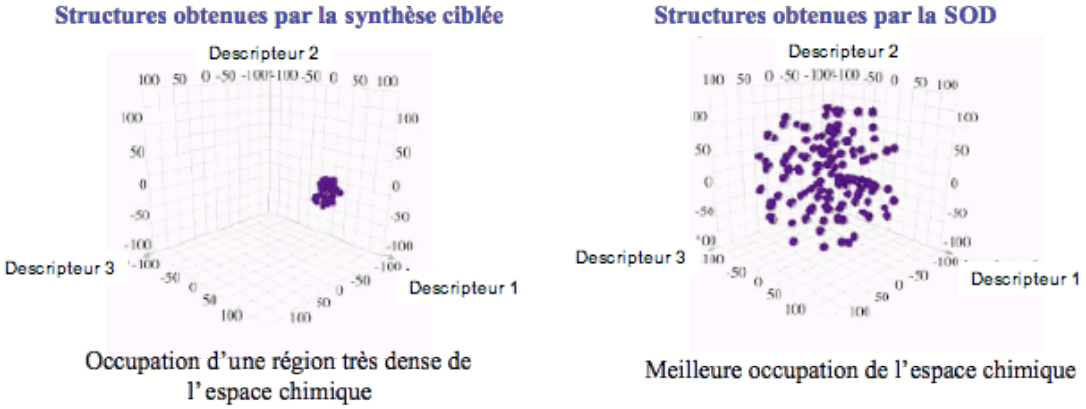


Figure 33 : *Population des molécules dans l'espace chimique (SOC et SOD)*[8]

Dans le cas de la SOD, il n'existe pas de structure cible : les voies d'accès ne peuvent pas être définies à partir d'une analyse rétrosynthétique comme pour la SOC. Il s'agit cette fois de déterminer les réactions permettant l'accès à des bibliothèques de petites molécules complexes et diversifiées, et ce, à partir d'entités de structures simples.[77]

a. Introduction de complexité structurelle

Ces bibliothèques doivent être générées le plus rapidement possible et en minimisant le nombre d'étapes de synthèse. De ce fait, il est nécessaire d'utiliser dans cette approche des réactions qui, en une seule étape, conduisent à une complexité importante. L'idéal consiste à combiner plusieurs réactions de ce type tel que les produits issus d'une première manipulation puissent constituer les réactifs de l'étape suivante.

[76] Espace à n dimensions qui permet de classifier les molécules suivant n descripteurs. Les descripteurs définissent un caractère de la molécule, comme la masse moléculaire, le pKa ou le log P, par une valeur qui peut être déterminée expérimentalement ou *in silico*

[77] L. Weber, High-diversity combinatorial libraries, *Curr. Op. Chem. Biol.,* **2000***, 4*, 295-302

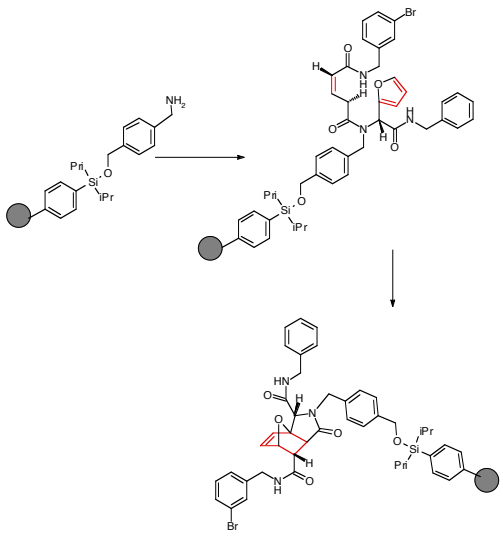


Figure 34 : *Paires de réactions introduisant rapidement de la complexité*

Ce concept peut être illustré par l'exemple de la Figure 34. La première réaction à 4 composants, de type Ugi,[78] permet de générer une molécule assez complexe. Cette structure est également le précurseur d'une réaction de type Diels-Alder dans la mesure où elle comporte à la fois un diène et un diènophile. Dans ces conditions, cette paire de réaction conduit à un composé tricyclique qui peut à son tour constituer le réactif de réactions complexes. En effet, l'introduction de deux groupements allyliques ainsi que la présence de l'alcène *cis* permet d'envisager une réaction de métathèse d'oléfine (Figure 35). Ainsi, en quatre étapes, les auteurs[78] ont réussi à développer des structures polycycliques complexes qui peuvent être utilisées en tant que substrat pour les étapes de diversification.

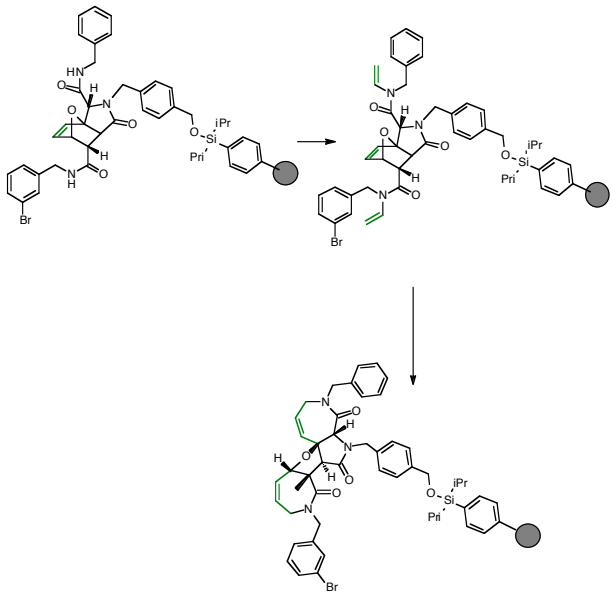


Figure 35 : *Obtention d'un composé quadricyclique en 4 étapes*[78]

[78] I. Ugi, The α-addition of immonium ions and anions to isonitriles accompanied by secondary reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **1986**, *1,* 8

Les réactions à plusieurs composants (RCM)[79] sont devenues un outil efficace pour créer des chimiothèques destinées au criblage à haut débit. Elles sont réalisées en mélangeant « one pot » plusieurs réactifs de départ (3 ou plus), qui réagissent en une séquence ordonnée de réactions, pour aboutir à la formation d'un seul produit complexe, incorporant la plupart des atomes initiaux (Figure 36). Une grande diversité de structures est donc facilement accessible, après variation d'un des composés de départ.[80]

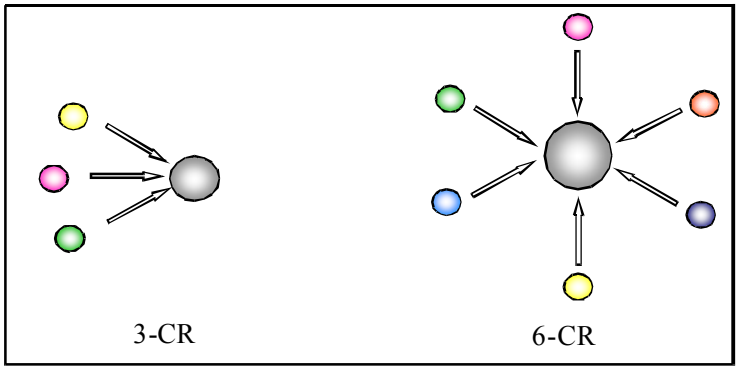


Figure 36 : *Principe d'une réaction multicomposant*

Dandapani[81] et ses collaborateurs ont appliqué cette stratégie de SOD pour la synthèse de lactames diversifiés par le biais d'une condensation à 4 composés (4-CC). Par cette approche synthétique, une chimiothèque de 400 lactames carboxamides a été générée. Le criblage de cette chimiothèque a permis l'identification un lactame inhibiteur de l'interaction d'un facteur de transcription (HOXA13) avec l'ADN.[82]

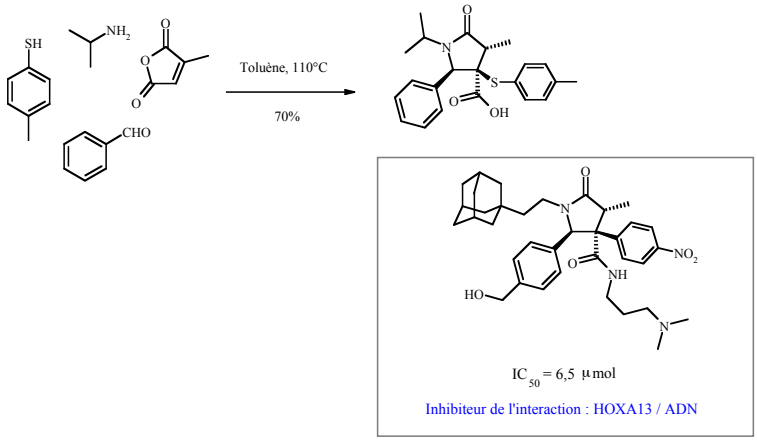


Schéma 5 *: Synthèse de γ-lactames via une 4-CC.*[82]

[79] J. Zhu, H. Bienaymé, *Multicomponent Reactions*, eds., Wiley-VCH: Weinheim, **2005**

[80] J. Biggs-Houck, A. Younai and J. T. Shaw, Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis, *Curr Opin Chem Biol,* **2010,** 14, 371-382

[81] S. Dandapani, L. Marcaurelle, Current strategies for diversity-oriented synthesis , *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *14*, 362.

[82] P. Y. Ng, Y. Tang, W. M. Knosp, H. S. Stadler, J. T. Shaw, Synthesis of diverse lactam carboxamides leading to the discovery of a new transcription-factor inhibitor , *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 5352-5355

b. Introduction de diversité

Plusieurs méthodes peuvent être envisagées pour les étapes de diversification. La plus simple, celle largement exploitée en chimie combinatoire, consiste à utiliser des groupements de même réactivité en différents points d'ancrage de la structure commune.[83] (Figure 37)

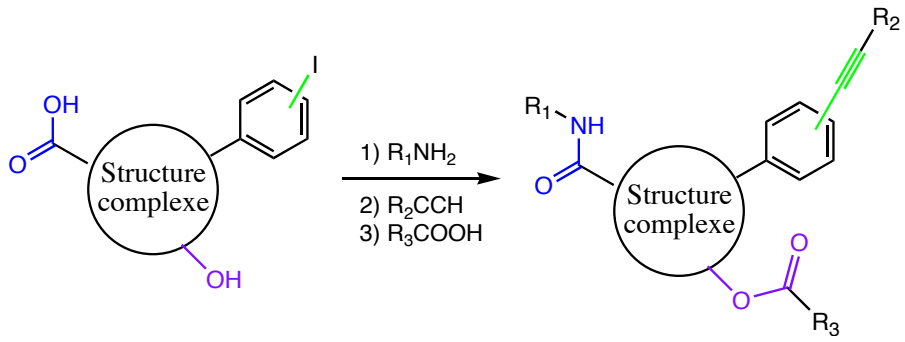


Figure 37 : *Introduction de groupements de même type de réactivité*

Les réactions stéréospécifiques, quant à elles, permettent d'introduire une diversité précieuse dans la mesure où le criblage des molécules pour la détermination d'une éventuelle interaction de type ligand/protéine chirale est sensible à la disposition spatiale des entités chimiques.[84, 85]

c. Stratégie « Build/couple/pair »

Il faut aussi prendre en compte l'émergence de nouvelles cibles biologiques[11] mises en évidence par la génomique pouvant être à l'origine des maladies humaines telles que les facteurs de croissance ou encore les ARN interférents. Actuellement, il y a très peu d'éléments guidant à la conception de molécules modulant leur activité biologique. Afin de pouvoir trouver un futur modulateur, il est important de disposer de banques de petites molécules de grande diversité structurale. Comme nous venons de le voir, la SOD nous permet de répondre à ces critères, mais il est important d'anticiper les problèmes pouvant survenir à chaque étape du développement pharmaceutique d'un médicament. Morton et ses collaborateurs[11] ont développé une stratégie de SOD qui serait susceptible de faire progresser chacune des étapes de la découverte d'un médicament. Son principe repose sur un schéma

[83] O. Kwon, S. B. Park, S. L. Schreiber, Skeletal diversity via a branched pathway : efficient synthesis of 29400 discrete, polycyclic compounds and their arraying into stock solutions, *J. Am. Chem. Soc.,* **2002**, *124,* 13402-13404

[84] R. A. Stavenger, S. L. Schreiber, Assymetric catalysis in diversity-oriented organic synthesis : enantioselective or 4320 encoded and spatially segregated dihydropyrancarboxamides, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2001**, *40 (18)*, 3417-3421

[85] M. M.-C. Lo, C. S. Neumann, S. Nagayama, E. O. Perlstein, S. L. Schreiber, A library of spirooxindoles based on a stereoselective three-component coupling reaction, *J. Am. Chem. Soc.,* **2004**, *126*, 16077-16086

réactionnel modulable de SOD, plusieurs modifications peuvent être faites pour chaque squelette en utilisant différentes variantes de réactifs à la première étape. Ainsi, la synthèse comporte seulement un petit nombre d'étapes qui pourront être adaptées facilement à la synthèse à grande échelle. Ils ont utilisé une stratégie de synthèse organique appelée « *Build-Couple-Pair* » qui miment la biosynthèse des produits naturels tridimensionnels (Figure 38).

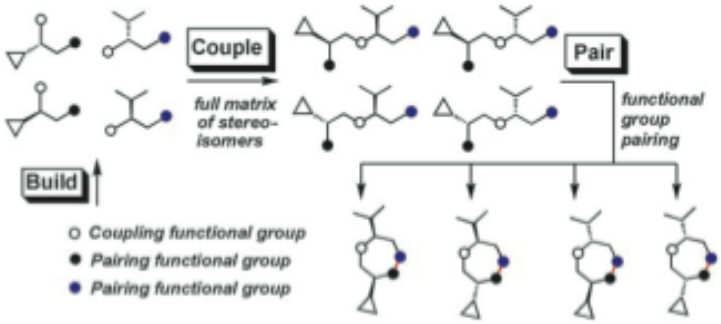


Figure 38 : *Génération de diversité stéréochimique par la stratégie « Build/Couple/Pair »*[11]

La première étape « *Build* » consiste à préparer des blocs moléculaires chiraux possédant plusieurs groupements fonctionnels. Cette étape, avec celle du couplage, fournit les bases de la diversité stéréochimique. Ensuite, certains de ces groupements réagissent entre eux pour coupler les blocs ensembles sans affecter la stéréochimie ou en la contrôlant parfaitement. Dès que les différents blocs ont été couplés, les groupements restants réagissent avec les autres se trouvant sur la même structure intermédiaire. Cette étape fournit les bases de la diversité structurelle.

Morton[11] *et al.* ont obtenu 80 squelettes de grande diversité structurale à partir de 4 blocs (étape a) couplés ensemble par une réaction de Fukuyama-Mitsunobu ou par un intermédiaire diisopropylsilyléne (étape b). La dernière étape repose sur une métathèse entre l'alcène terminal et les autres substrats des intermédiaires obtenus à l'étape b (Figure 39).

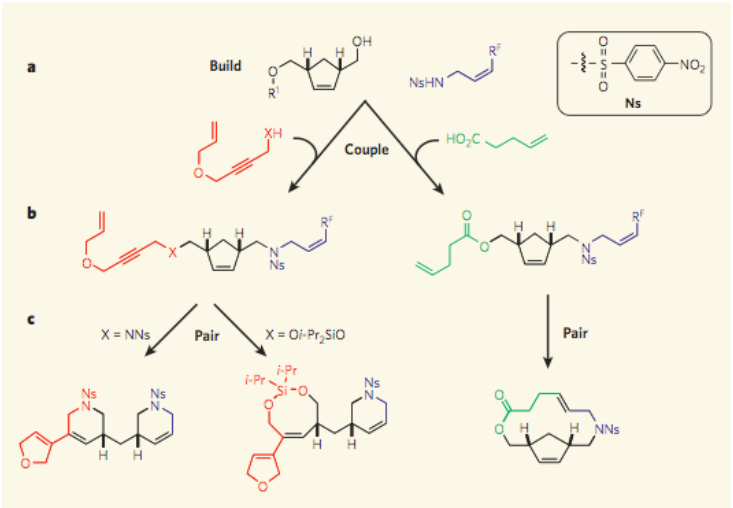


Figure 39 : *Stratégie « Build/Couple/Pair » appliquée par Morton et al.*[11]

L'élaboration de librairies par cette stratégie permettrait de combler le manque de diversité structurelle et stéréochimique des chimiothèques commerciales ou obtenues par synthèse combinatoire. Ainsi, il serait possible d'obtenir rapidement et à faible coût des petites molécules qui permettraient de moduler l'activité de ces nouvelles cibles.

C. Méthodes de criblage

Le criblage désigne les techniques qui évaluent des chimiothèques pour identifier une molécule ayant des propriétés biologiques intéressantes. Étant donné le grand nombre de structures à tester, il est nécessaire de développer des techniques automatisées. On parle alors de criblage à haut débit puisque le système permet l'analyse de plusieurs centaines voire milliers de molécules par jour. Cette technologie est issue des progrès de la biologie moléculaire, de l'informatique, de la robotique, de la miniaturisation et de la chimie. Depuis le début des années 90, il est devenu une technique clé de l'industrie pharmaceutique (Figure 40).

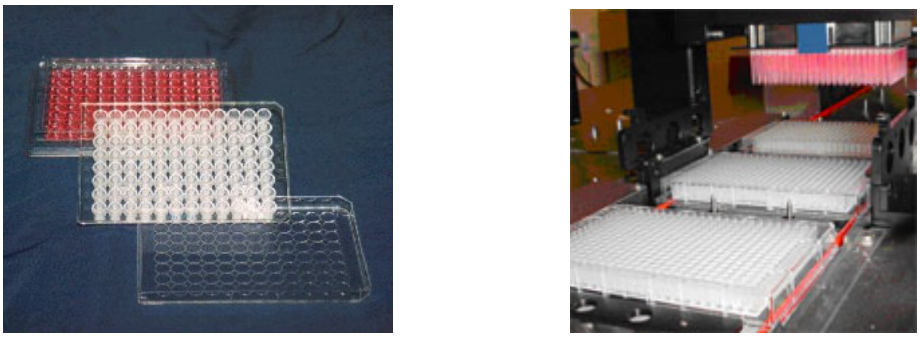


Figure 40 : *(1) Plaque 96 puits permettant le criblage à haut débit (2) Exemple de robot de criblage*

La mise au point des tests biochimiques ou sur cellules tient compte de la miniaturisation et de la rapidité d'exécution du test imposé par le criblage à haut débit. Les tests doivent donc être rapides, simples à mettre en œuvre et reproductibles. Ils doivent donner l'information la plus juste possible afin de limiter le nombre de faux positifs et de faux négatifs.

Nous présenterons dans cette partie, les méthodes développées spécifiquement pour la génétique chimique directe d'une part, et indirecte de l'autre.

1. Génétique chimique directe

a. Criblage phénotypique

Le criblage phénotypique consiste en l'identification d'une molécule bioactive en analysant les changements morphologiques ou l'inhibition de croissance des cellules suite à

l'ajout de celle-ci dans le milieu de culture. Ce type de méthodologie nécessite des procédures systématiques et fiables permettant d'effectuer des comparaisons entre les résultats provenant de diverses équipes de recherche. Il s'agit à chaque analyse de se concentrer sur un seul paramètre phénotypique caractéristique du système biologique étudié.

b. La méthode de « cytoblot »

Une autre méthode permettant le criblage d'un grand nombre de molécules en génétique chimique directe consiste en l'utilisation du procédé de « cytoblot » développé par Schreiber et ses collaborateurs.[86,87] Il s'agit d'une méthode d'immunodétection qui s'inspire de l'ELISA (**e**nzyme-**l**inked **i**mmun**s**orbent **a**ssay)[88] et du western blotting, procédés d'identification d'antigènes, très couramment utilisés en biologie moléculaire. Dans ce cas, le criblage se fait par la détection d'un antigène d'intérêt, le résultat phénotypique d'une interaction de type protéine/ligand, en utilisant un anticorps spécifique de l'antigène. Cet anticorps, appelé également anticorps primaire, est mis en présence d'un second anticorps qui lui est spécifique (anticorps secondaire), conjugué à un marqueur capable de générer un signal quantitatif à l'utilisateur (Figure 41).

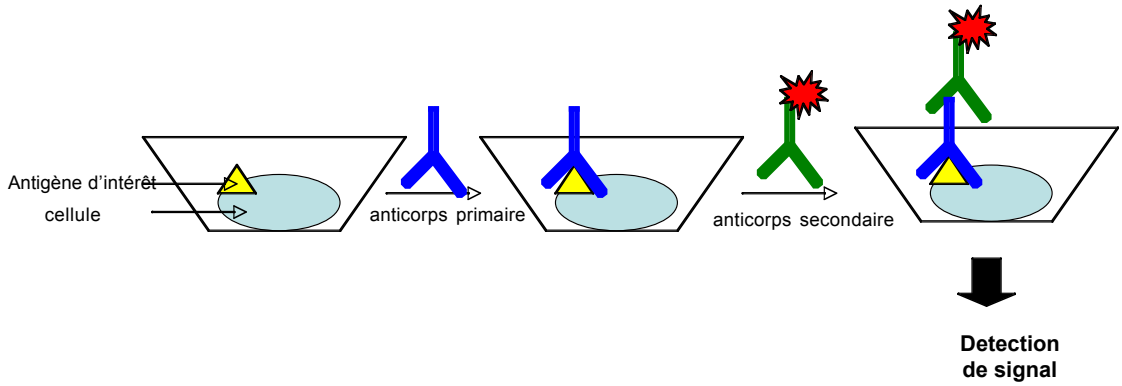


Figure 41 : *Principe du cytoblot*

L'absence de signal informe l'utilisateur de l'absence de l'antigène d'intérêt et donc de l'absence d'interaction entre le système biologique et l'entité chimique criblée.

[86] B. R. Stockwell, S. J. Haggarty, S. L. Schreiber, High-throughput screening of small molecules in miniaturized mammalian cell-based assays involving post-translational modifications, *Chem. Biol*., **1999**, *6*, 71-83

[87] B. R. Stockwell, J. S. Hardwick, J. K. Tong, S. L. Schreiber, Chemical genetic and genomic approaches reveal a role for copper in specific gene activation, *J. Am. Chem. Soc.,* **1999***, 121*, 10662-10663

[88] R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne, J. Kuby,Enzyme-linked immunosorbent assay, *Immunology*, **2003**, **5th Ed.**, *Freeman*, New-York

Après avoir mis au point la méthode, l'équipe de Schreiber s'est particulièrement intéressée aux phénomènes d'acétylation.[89] Il s'agit de phénomènes réversibles contrôlés par les acétylases et les désacétylases (HDAC pour histone déacétylase). Alors qu'il a été montré que l'acétylation des histones influence la régulation de l'expression des gènes, la différenciation cellulaire ou encore la division cellulaire,[90] le rôle de cette même modification apportée à d'autres protéines, notamment à l'α-tubuline, reste encore inconnu. Un inhibiteur connu des HDACs, la trichostatine A (TSA),[91] favorise l'acétylation de cette protéine. Mais son action reste non spécifique, puisqu'une augmentation de l'acétylation des histones nucléaires est également observée. De ce fait, il est très difficile d'interpréter les résultats issus de travaux menés avec la TSA. [92]

Pour pouvoir répondre à cette problématique, l'équipe s'est proposée d'identifier un nouvel inhibiteur, spécifique, par une approche de génétique chimique.[89] L'acétylation induite par l'inhibition des HDACs a été suivie par cytoblot :[93] le groupe a développé deux anticorps, l'un spécifique de l'α-tubuline acétylée et l'autre spécifique des histones nucléaires acétylées. Ainsi, en soumettant une banque de molécules à deux tests de cytoblots en parallèle, ils ont pu identifier des structures conduisant à l'acétylation sélective de l'α-tubuline, dont l'inhibition peut permettre à terme de conduire à une thérapie antimétastasique et antiangiogénique.

La méthode cytoblot a également été validée par d'autres groupes, notamment pour l'élaboration de thérapies anticancéreuses.[94]

c. Les gènes rapporteurs

Un gène rapporteur est un gène-témoin codant pour une protéine d'activité connue qui est facilement détectable. Il s'agit d'un marqueur utilisé soit pour confirmer l'incorporation

[89] S. J. Haggarty, K. M. Koeller, J. C. Wong, C. M. Grozinger, S. L. Schreiber, Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deactylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* **2003***, 100(8)*, 4389-4394

[90] P. A. Marks, V. M. Richon, T. Miller, W. K. Kelly, Histone deacetylase inhibitors, *Adv. Cancer Res.,* **2004***, 91*, 137-168

[91] P. A. Marks, V. M. Richon, R. Breslow, R. A. Rifkind, Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs, *Curr. Op. Oncol.,* **2001***, 13 (6)*, 477-483

[92] K. M. Koeller, S. J. Haggarty, B. D. Perkins, I. Leykin, J. C. Wong, M-C. J. Kao, S. L. Schreiber, Chemical genetic modifier screens : small molecule trichostatin suppressors as probes of intracellular histone and tubulin acetylation, *Chem. Biol.,* **2003***, 10*, 397-410

[93] S. J. Haggarty, K. M. Koeller, J. C. Wong, R. A. Butcher, S. L. Schreiber, Multidimensional Chemical Genetic Analysis of diversity-oriented synthesis-derived deacetylase inhibitors using cell-based assays, *Chem. Biol.,* **2003***, 10*, 383-396

[94] C. L. Antos, T. A. McKinsey, M. Dreitz, L. M. Hollingworth, C. L. Zhang, K. Schreiber, H. Rindt, R. J. Gorczynski, E. N. Olson, Dose-dependent blockade to cardiomyocyte hypertrophy by histone deacetylase inhibitors, *J. Biol. Chem***., 2003***, 278*, 28930-28937

d'un transgène dans une cellule et de visualiser les produits de l'expression de celui-ci, soit pour analyser l'efficacité des promoteurs de gènes. Lorsque l'on souhaite détecter la localisation cellulaire des protéines, le gène d'intérêt est couplé à un gène qui permet de synthétiser une protéine fluorescente ou bioluminescente.

Pour mesurer l'activité d'un promoteur, on utilise un gène codant pour une enzyme dont l'activité peut être facilement évaluée. Ainsi, l'éventuelle répression du promoteur peut être suivie *via* la baisse d'activité de l'enzyme pour laquelle code le gène rapporteur. Les gènes couramment utilisés à cet effet sont ceux codant pour la luciférase, la β-galactosidase ou la β-glucosidase.

Divers groupes de recherche ont exploité ces systèmes de gènes rapporteurs pour évaluer les interactions protéine/ligand. La méthodologie consiste le plus souvent en la recherche d'un élément perturbant une voie de signalisation, dont on cherche à comprendre le mécanisme, et d'évaluer la répression d'un promoteur activé spécifiquement par le produit final de la voie étudiée. Ainsi, dans le cas où une molécule interagirait avec une des protéines intervenant dans la voie, le produit final n'est pas obtenu et par conséquent le promoteur spécifique étant réprimé, le gène rapporteur n'est pas exprimé et donc aucune activité enzymatique associée n'est détectée.[95,96,97]

2. Génétique chimique inverse

a. Le criblage in vitro

Une des principales méthodes de criblage en génétique chimique inverse consiste à apprécier l'interaction ligand/protéine, lorsqu'il s'agit d'une enzyme, en évaluant l'activité enzymatique de la protéine purifiée. Plusieurs méthodes ont été mises au point à cet effet. La plus commune utilise la spectrophotométrie par absorption. Il s'agit de suivre la concentration en substrat ou produit (en choisissant l'entité qui comporte un maximum d'absorbance à une longueur d'onde spécifique) pour quantifier l'activité de la macromolécule que l'on cherche à

[95] S-S. Tian, P. Lamb, A. G. King, S. G. Miller, L. Kessler, J. I. Luengo, L. Averill, R. K. Johnson, J. G. Gleason, L. M. Pelus, S. B. Dillon, J. Rosen, A small, nonpeptidyl mimic of granulocyte-colony stimulating factor, *Science*, **1998,** *281*, 257-259

[96] J. I. Armstrong, S. Yuan, J. M. Dale, V. N. Tanner, A. Theologis, Identificaiton of inhibitors of auxin transcriptional activation by means of chemical genetics in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Sci. Acad.,* **2004,** *101*, 14978-14983

[97] P. G. Komarov, E. A. Komarova, R. V. Kondratov, K. Christov-Tselkov, J. S. Coon, M. V. Chernov, A. V. Gudkov, A chemical inhibitor of p53 that protects mice from side effects of cancer therapy, *Science,* **1999,** *285*, 1733-1737

inhiber. Une seconde approche relativement analogue utilise un marquage radioactif du substrat transformé. Ainsi, l'évaluation de la quantité de radioactivité libérée par un des sous-produits permet de quantifier l'activité enzymatique. Cette méthode a également été utilisée lors de nombreux criblages *in vitro*, et a récemment été appliquée pour un criblage sur microplaque par Steinkühler et ses collaborateurs.[98] Dans cette approche, les chercheurs ont immobilisé le substrat marqué sur la surface d'une lame et ont évalué l'activité enzymatique en mesurant la radioactivité détectable en solution, issue de la dégradation du substrat marqué par l'enzyme active.

Des difficultés de miniaturisation de ces deux méthodes, cependant extrêmement robustes et fiables, ont conduit à l'utilisation des techniques de fluorescence, plus adaptées à plus petite échelle, pour le suivi de l'activité enzymatique lors des criblages à haut-débit.

Une autre méthode de criblage *in vitro* développée récemment consiste en l'utilisation de l'analyse des interactions en spectroscopie de masse.[99] Cette technique comporte un avantage majeur dans la mesure où le criblage ne nécessite pas la connaissance de la fonction de la protéine que l'on cherche à perturber.[100, 101] Il s'agit dans ce cas de détecter le complexe formé par les interactions non-covalentes entre la protéine et la molécule testée, et ce, en optimisant les conditions d'analyses afin de reconstituer en phase gazeuse (phase d'analyse) les interactions qui existent en solution.[102] Mais les temps d'analyse sont plus longs et c'est une technique plus délicate à mettre en œuvre que l'utilisation de techniques de fluorescence.

b. Criblage sur billes

Étant donnée l'importance de la synthèse en phase solide pour l'obtention de larges bibliothèques de petites molécules, des méthodologies ont été développées pour permettre un criblage de ces structures sans qu'il ne soit nécessaire de procéder à une étape de dégreffage

[98] C. Nardella, C. Steinkühler, Radiolabeled heparan sulfate immobilized on microplate as substrate for the detection of heparanase activity, *Anal. Biochem.,* **2004,** *332*, 368-375

[99] M. A. Kelly, T. J. McLellan, P. J. Rosner, Strategic use of affinity-based mass spectrometry in early stages of target based drug discovery, *J. Pharm. Biomed. Anal.,* **2002,** *40 (3),* 528-538

[100] D. Falb, S. Jindal, Chemical genomics : bridging the gap between the proteome and therapeutics, *Curr. Opin. Drug Disc. Devel.,* **2002,** *5(4)*, 532-539

[101] A. D. Annis, C.-C. Chuang, M. P. Scott, H. M. Nash, A general technique to rank protein-ligand binding affinities and determine allosteric versus direct binding site competition in compound mixtures, *J. Am. Chem. Soc.,* **2004,** *126,* 15495-15503

[102] G. Deng, G. Sanyal, Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery, *J. Pharm. Biomed. Anal.,* **2006,** *40 (3)*, 528-538

de celles-ci de leur support solide.[103] Il a cependant été nécessaire de mettre au point au préalable des résines biocompatibles avant de développer de telles méthodologies.[104, 105]

Une fois la chimiothèque synthétisée sur un support convenable, les billes sont incubées en présence de la protéine d'intérêt conjuguée à une structure permettant la détection de l'interaction ligand/protéine. La technologie la plus répandue consiste à incuber les billes avec une protéine marquée à la biotine. Ainsi, les billes présentant une interaction suffisamment forte avec la protéine peuvent être déterminées par une seconde incubation de celles-ci en présence de stréptavidine-alkaline phophatase (AP), cette enzyme se liant spécifiquement à la biotine. L'incubation conduit à la formation d'un complexe de type bille-AP et l'activation de l'enzyme AP en présence de son substrat chromogénique conduit à la coloration des billes. Les billes ainsi colorées peuvent être identifiées et analysées pour la détermination de la structure conduisant à l'interaction souhaitée (Figure 42).[106]

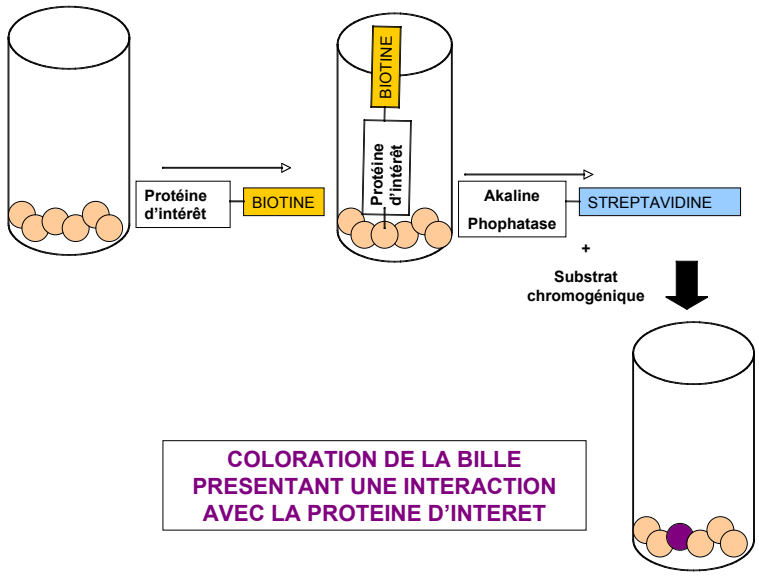


Figure 42 : *Utilisation de la biotine pour le criblage sur billes*

[103] J. Rademann, G. Jung, Integrating combinatorial synthesis and bioassays, *Science,* **2000,** *287*, 1947-1948

[104] M. Meldal, Pega : a flow stable polyethylene glycol dimethylacrylamide copolymer for solid phase synthesis, *Tetrahedron Lett.,* **1992,** *33*, 3077-3080

[105] S. Leon, R. Quarell, G. Lowe, Evaluation of resins for on-bead screening : a study of paparin and chymotrypsin specificity using pega-bound combinatorial peptide libraries, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **1998,** *8(21)*, 2997-3002

[106] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity, *Nature,* **1991,** *354*, 82-84

De nombreuses études ont utilisé cette méthode pour déterminer des ligands peptidiques de diverses protéines comme le domaine SH_3 de la kinase Src,[107] la Mdm2 et la GST[108] ou le facteur Xa[109] pour le développement d'anticoagulants.

c. Criblage sur lames

Le criblage par cette technologie nécessite dans un premier temps d'immobiliser les petites molécules sur des lames de verre pour pouvoir générer des bibliothèques sur lame. Ces lames sont alors incubées avec la protéine d'intérêt préalablement marquée par fluorescence. La détection de signal après incubation et lavage de la lame indique une interaction entre la molécule immobilisée et la protéine marquée (Figure 43).

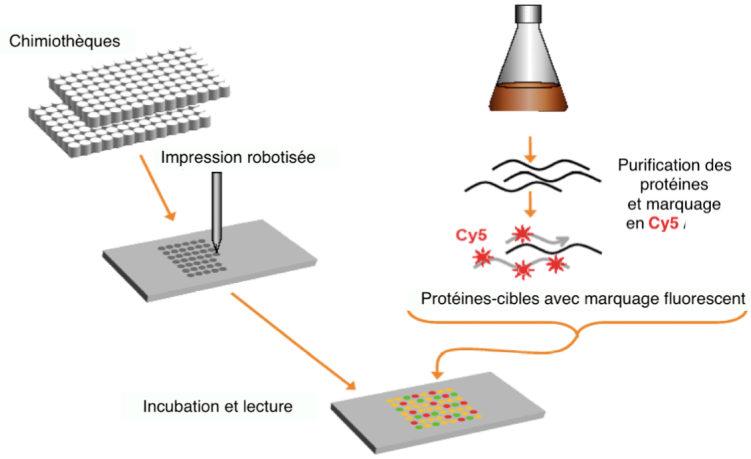


Figure 43 : *Principe du criblage sur lame*

Pour obtenir les librairies sur lame, il est possible de synthétiser les structures à cribler directement sur la surface de la lame en utilisant les techniques de photolithographie. Cette technologie reste cependant assez difficile à mettre en œuvre car elle requiert le développement d'outils permettant de faire réagir la lame localement et de manière spécifique. Bien que sophistiquée, la photolithographie a été utilisée pour le développement de lames de peptides,[110] d'oligocarbamates,[111] de nucléotides [112,113] ou encore de peptoïdes.[114]

---

[107] J. Morken, T. Kapoor, S. Feng, F. Shirai, S. L. Schreiber, Exploring the leucine-proline binding pocket of the Src SH3 domain using structure-based, split-pool synthesis and affinity based selection, *J. Am. Chem. Soc.,* **1998,** *120(1)*, 30-36

[108] P. G. Alluri, M. Reddy, K. Bachhawat-Sikder, H. J. Olivos, T. Kodadek, Isolation of protein ligands from peptoic large libraries, *J. Am. Chem. Soc.,* **2003,** *125*, 13995-14004

[109] J. A. Ostrem, F. Al-Obeidi, P. Safar, A. Safarova, S. K. Stringer, M. Patek, M. T. Cross, J. Spoonamore, J. C. Locascio, P. Kasireddy, D. S. Thorpe, N. Sepetov, M. Lebl, P. Wildgoose, P. Strop, Discovery of a novel, potent, and specific family of factor Xa inhibitors via combinatorial chemistry, *Biochemistry,* **1998,** *37*, 1053-1059

[110] S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis, *Science,* **1991,** *251*, 767-773

Il est également possible d'obtenir des bibliothèques de petites molécules sur lame par fixation des structures une fois qu'elles ont été synthétisées. Il s'agit cette fois d'utiliser un microdéposeur commercial afin de créer à la surface de la lame des spots de 50 à 500 µm de diamètre à partir de solutions contenant les molécules de concentration de l'ordre de 1 mM (Figure 44).

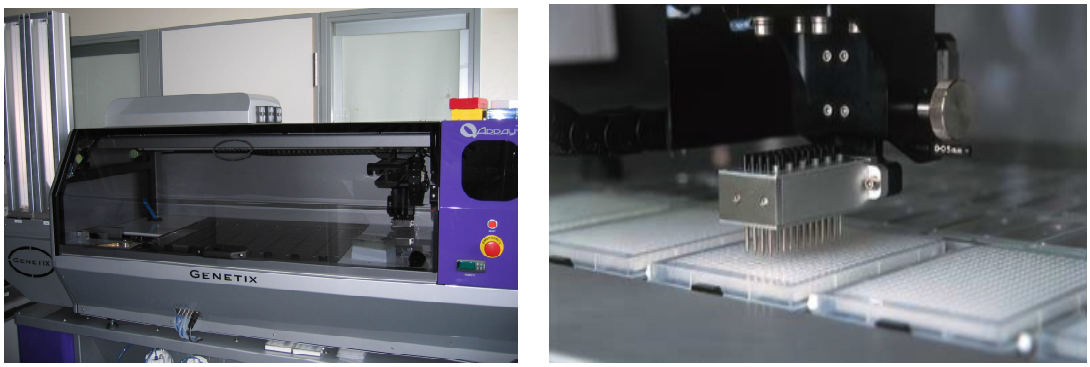


Figure 44 : *Microdéposeur permettant de spotter les molécules sur la lame de verre*

La stratégie la plus commune pour la fixation des molécules à la surface de la lame consiste à le faire par des liaisons covalentes. Dans ce cas, la lame nécessite une fonctionnalisation au préalable telle qu'après dépôt de la molécule l'interaction spécifique puisse avoir lieu. Schreiber et ses collaborateurs[115] ont développé des lames activées par des groupements chlorure de façon à fixer une banque d'alcools (Figure 45).

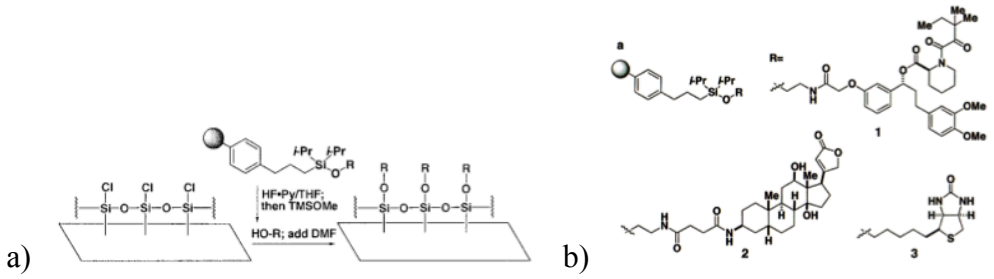


Figure 45 : *a) Fixation covalente d'alcools sur les lames activées b) Type d'alcools attachés*

[111] C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J.C. Stephans, S. P. Fodor, S. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. J. Schultz, An unnatural bioploymer, *Science,* **1993,** *261*, 1303-1305

[112] A.C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin C. P., Holmes, S. P . Fodor, Light-generated oligonucleotide arrays for rapide DNA sequence analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **1994**, *91(11)*, 5022-5026

[113] S. Singh-Gasson, R. D. Green, Y. Yue, C. Nelson, F. Blattner, M. R. Sussman, F. Cerrina, Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array, *Nat. Biotechnol.,* **1999,** *17(10)*, 974-978

[114] S. Li, D. Bowerman, N. Marthandan, S. Klyza, K. Luebke, H. R. Garner, T. Kodadek, Photolithographic synthesis of peptoids, *J. Am. Chem. Soc.,* **2004,** *126*, 4088-4089

[115] Méthode décrite dans (a) G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interaction, *J. Am. Chem. Soc.,* **1999,** *121*, 7967-7968 ; (b) P. J. Hergenrother, K. M. Depew, S. L. Schreiber, Small-molecule microarrays : covalent attachment and screening of alcohol-containing small molecules on glass slides, *J. Am. Chem. Soc.,* **2000,** *122,* 7849-7850

Le même groupe a également mis au point des lames comportant des groupements de type maléimide afin d'immobiliser une banque de thiols (Figure 46).[115]

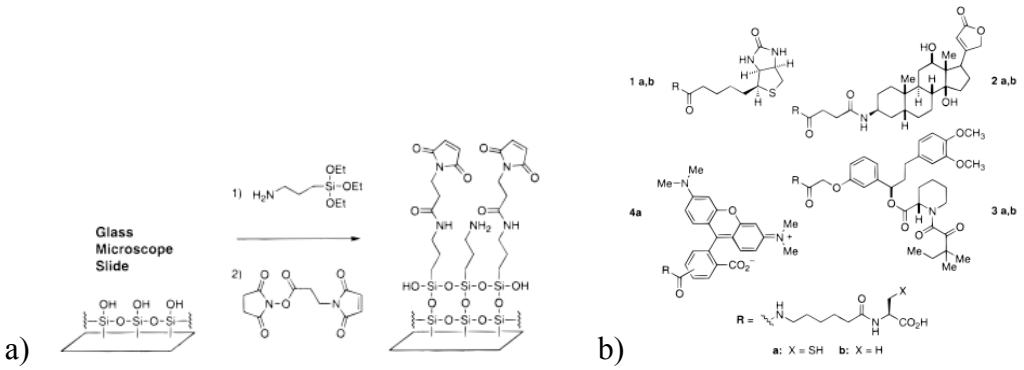
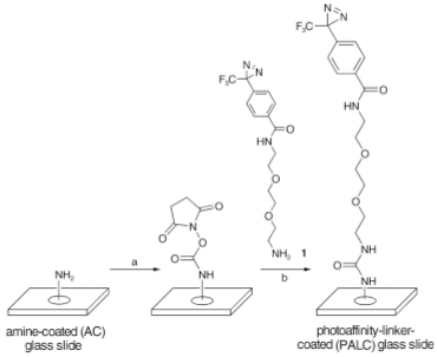


Figure 46 : *a) Préparation des lames dérivées « maléimide » b) Composés utilisés pour le dépôt*

Enfin, une dernière méthode utilise un répartiteur photoactivable à la surface de la lame telle qu'une fois activé, celui-ci puisse réagir avec n'importe quelle structure (Figure 47).[116]



a) immersion dans une solution de carbonate de N,N-disuccinimidyle (1 M) and de DIPEA (1 M) dans du DMF à TA pendant une nuit puis lavage de la lame

b) immersion dans une solution de 1 (100 mM) et de DIPEA (500 mM) dans du DMF à TA pendant une nuit puis lavage de la lame

Figure 47 : *Introduction d'un répartiteur photoactivable sur des lames « amino »*

Cette méthode présente un avantage majeur dans la mesure où il n'est plus nécessaire dans ce cas de fonctionnaliser la banque de molécules à déposer. De plus, il est également possible de présenter la molécule à la cible biologique sous une forme tridimensionnelle différente de ce que l'on pourrait avoir si la fixation a été faite par une fonction introduite spécialement pour la fixation.[117,118]

[116] H. Kanoh, S. Kumashiro, S. Simizu, Y. Kandoh, S. Hatakeyama, H. Tashiro, H. Osada, Immobilization of natural products on glass slides by using a photoaffinity reaction and the detection of protein-small-molecule interactions, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2003,** *42*, 5584-5587

[117] M. Uttamchandani, D. P. Walsh, S. Q. Yao, Y.-T. Chang, Small-molecule microarrays : recent advances and applications, *Curr. Op. Chem. Biol.,* **2005,** *8*, 4-13

[118] M. Uttamchandani, J. Wang, S. Q. Yao, Protein and small molecule microarrays : powerful tools for high-throughput proteomics, *Mol. Biosyst.,* **2006,** *2*, 58-68

Une méthodologie récemment développée utilise les interactions fluor-fluor pour réaliser la fixation des petites molécules à la surface de la lame.[119] Il s'agit dans un premier temps de fonctionnaliser la lame par une queue perfluorée, puis d'introduire une étiquette fluorée aux différentes structures. Le support et les molécules peuvent alors interagir pour conduire à l'immobilisation de ces derniers par une interaction fluorophobe non-covalente (Figure 48).

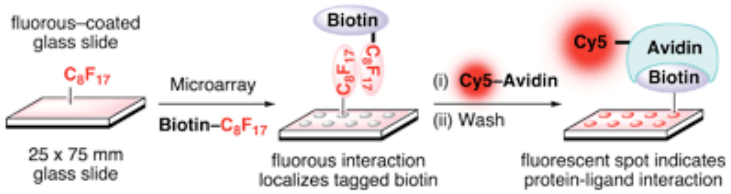


Figure 48 : *Utilisation des interactions fluor-fluor pour l'obtention de puces chimiques*

Des études menées par l'équipe de Nicholson ont montré que l'interaction fluor-fluor était assez forte pour permettre la détection d'interactions entre une protéine (ici la biotine) et une petite molécule (ici l'avidine marquée par le fluorophore Cy5.5) (spots D sur la Figure 49).[12]

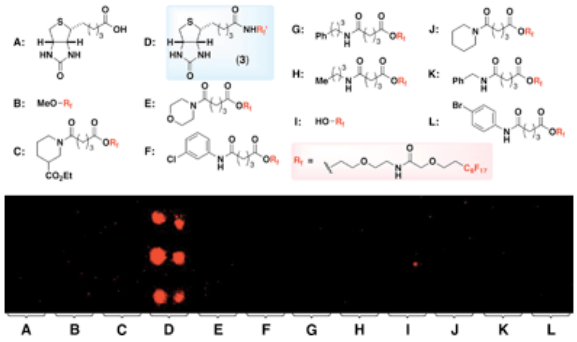


Figure 49 : *Détection spécifique de l'interaction Biotine-Avidine parmi une librairie de petites molécules portant une étiquette fluorée*

L'introduction d'une étiquette fluorée sur les petites molécules permet par ailleurs d'utiliser les techniques spécifiques à la synthèse en phase fluorée.[120,121,122] Cette méthode présente donc un double avantage puisque le marquage par l'étiquette fluorée facilite la synthèse de la bibliothèque et conduit à l'immobilisation des structures sur lame.

[119] K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, Fluorous-based carbohydrate microarrays, *J. Am. Chem. Soc.,* **2005,** *127*, 13162-13163

[120] J. A. Gladysz, D. P. Curran, Fluorous chemistry : from bi-phasic catalysis to a parallel chemical universe and beyond, *Tetrahedron,* **2002,** *58*, 3823-3825

[121] W. Zhang, Fluorous technologies for solution-based high-throughput organic synthesis, *Tetrahedron,* **2003,** *59*, 4475-4489

[122] W. Zhang, Fluorous tagging strategies for solution-phase synthesis of small-molecules, peptides and oligosaccharides, *Curr. Op. Drug Disc. Dev.,* **2004,** *7*, 784-797

Les lames ainsi préparées peuvent alors être incubées avec la protéine d'intérêt marquée par fluorescence pour la détermination d'un ligand par cette méthode de criblage à haut-débit[123] (Figure 50). Cette approche reste très prometteuse puisqu'elle a déjà permis de comprendre certaines voies de signalisation ainsi que l'identification d'inhibiteurs spécifiques de systèmes enzymatiques.[124]

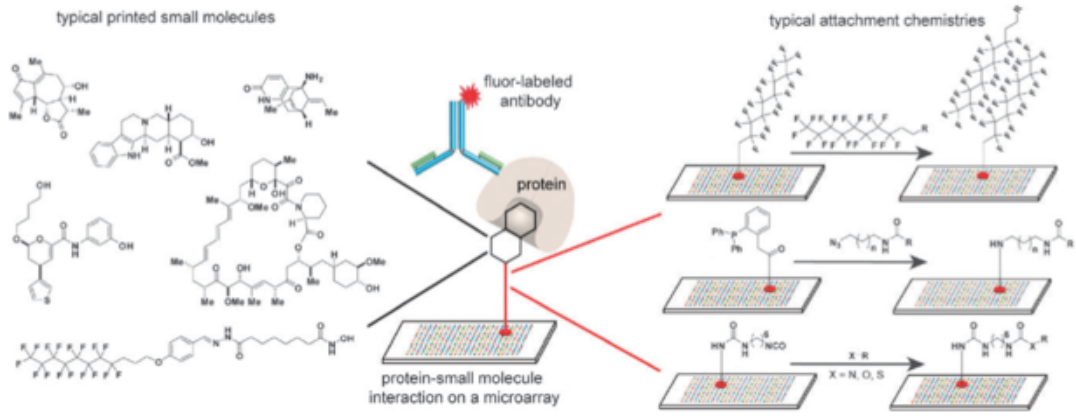


Figure 50 : *Préparation et criblage de puces à petites molécules*[123]

[123] A. J. Vegas, J. H. Fuller, A. N. Koehler, Small-molecule microarrays as tools in ligand discovery, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 1385-1394

[124] K. M. Specht, K. M. Shokat, The emerging power of chemical genetics, *Curr. Op. Cell Biol.,* **2002***, 14(2)*, 155-159.

C'est donc dans ce contexte de médecine personnalisée que s'inscrit les travaux de recherche de cette thèse. La préparation de **nouvelles sondes d'imagerie moléculaire** constitue l'objectif majeur de cette thèse. Pour réaliser cet objectif, nous nous proposons de développer une **chimiothèque de molécules fluorées structurellement diverses** en se basant sur l'approche de la synthèse orientée vers la diversité. La stratégie de synthèse utilisée fera largement appel à des méthodologies modernes telles que les réactions « one pot » et les synthèses assistées par micro-ondes. Pour une efficacité maximale, la synthèse doit proposer un niveau de complexité structurale important afin d'augmenter la probabilité de découverte de composés modulateurs de l'expression des protéines. L'identification de ces modulateurs d'activité protéique sera réalisée par la mise au point d'une méthode de criblage basée sur la **génétique chimique inverse**. Ce **criblage à haut débit** repose sur la technique des puces à ADN, il s'agit d'un criblage sur lame où les petites molécules de la chimiothèque sont immobilisées par interactions covalentes ou non sur une lame de verre. L'incubation de ces **puces** avec des **protéines fluorescentes** d'intérêt permettra d'identifier des ligands originaux qui seront couplés aux squelettes des agents d'imagerie moléculaire. Le **squelette de ces agents** repose sur une **propargylamine** obtenue à partir d'une réaction à 3 composants qui nous offre plusieurs points d'ancrage pour permettre le couplage de **groupements de détection** (IRM/scintigraphie/optique) et de **ligands** connus ou originaux.

Chapitre **2**

Synthèse d'une chimiothèque de composés hautement diversifiés

I. INTERETS DES C-GLYCOSIDES 77
II. REALISATION DE LA CHIMIOTHEQUE 79
III. SYNTHESE D'ALDO-C-GLYCOSIDE FLUORE 80
A. Travaux antérieurs de formation d'aldo-C-glycoside 80
B. Formation d'aldo-C-glycoside sous activation micro-ondes 82
1. Préparation de l'alcool β-méthallylique silylé 82
2. Synthèse assistée par micro-ondes 83
3. Synthèse d'aldo-C-glycoside sous irradiation MW 84
C. Formation d'aldo-C-glycoside à partir d'autres catalyseurs 87
D. Formation d'aldo-C-glycoside fluoré de type I 92
1. Synthèse des espaceurs allyliques fluorés A 93
a. Espaceur allylique fluoré A-C1 93
b. Espaceur allylique fluoré A-C2 95
2. Synthèse des espaceurs allyliques fluorés B 98
a. Espaceur allylique fluoré B-C1 99
b. Espaceur allylique fluoré B-C2 99
3. Bilan de la synthèse des espaceurs allyliques fluorés 101
4. Condensation des espaceurs allyliques fluorés avec le tri-O-acétyl-D-glucal 102
IV. SECOND SCHEMA REACTIONNEL REALISE POUR LA SYNTHESE DE LA CHIMIOTHEQUE 103
A. Synthèse de synthons C-glycosidiques de structure IV 104
B. Formation de propargylamine de structure V 106
1. Les propargylamines 106
a. Intérêt 106
b. Méthodes de synthèse 108
c. Mécanisme 110
d. Synthèse de propargylamines sous irradiations micro-ondes 110
2. Étape de couplage par l'intermédiaire d'une réaction A^3 111
C. Greffage d'étiquette fluorée sur la structure V 115
D. Diversification des structures VI par Chimie Click 116
1. Chimie click 117
a. Concept de Chimie click 117
b. Cycloaddition 1,3-dipolaire d'Huisgen 117
c. Mécanisme 119
d. Synthèse supportée sur résine 120
2. Formation d'une librairie d'azotures 121
3. Chimiothèque à partir d'un squelette V modèle 123
a. Formation du squelette V modèle 123
b. Formation de la banque de petites molécules modèles 125
4. Chimiothèque à partir de la structure V déprotégée 127
5. Chimiothèque à partir de la structure VI fluorée 130

La préparation de nouvelles molécules qui seraient biologiquement actives constitue un des objectifs de cette thèse. Pour réaliser cet objectif, nous nous proposons de développer une chimiothèque de molécules structurellement diverses en se basant sur l'approche de la synthèse orientée vers la diversité. Les stratégies de synthèse utilisées feront largement appel à des méthodologies modernes telles que les réactions « one pot » et les synthèses assistées par micro-ondes. Elles doivent répondre aux critères suivants :

- une chimiothèque facile à synthétiser et rapidement accessible ;
- une complexité structurale importante afin d'augmenter la probabilité de découverte de composés modulateurs de l'expression des protéines.

Les C-glycosides, robustes vis-à-vis de l'hydrolyse, sont choisis comme structure commune car ils possèdent des propriétés chimiques et biologiques particulièrement intéressantes.

I. Intêrets des C-glycosides

Les glycosides (ou hétérosides) sont des analogues d'hydrates de carbone résultant de la condensation d'oses et de substances non glucidiques (appelées aglycones). On parle de O-glycosides quand la liaison avec le groupement non glucidique se fait sur un atome d'oxygène. Les C-glycosides sont des composés dans lesquels l'unité glucidique est liée par la position 1 à une partie aglycone via une liaison carbone-carbone.

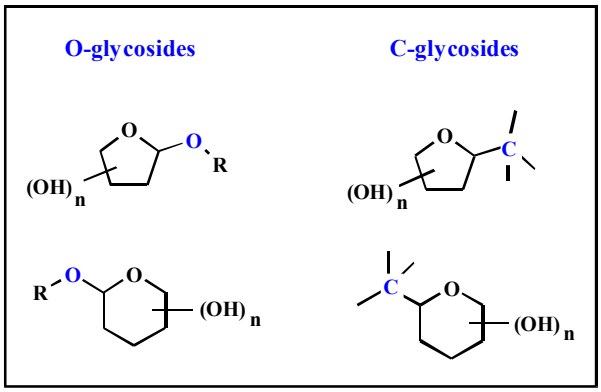


Figure 51 : *Définition des C-glycosides*

L'absence d'atome d'oxygène entre la partie osidique et l'aglycone aromatique confère à la famille des C-glycosides une très grande stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse acide comparés à leurs analogues O-glycosidiques. Cette stabilité accrue est due au fait que l'acétal au niveau du carbone anomère est supprimé et que la liaison C-O exocyclique est remplacée

par une liaison C-C.[125] Leurs propriétés physiques (Tableau 3) sont aussi un atout car on supprime l'effet exoanomère (Figure 52) qui confère une structure rigide aux O-glycosides. Ainsi sans cet effet anomère, les C-glycosides sont moins rigides et permettent d'avoir une reconnaissance plus facile avec les cibles protéiques. De plus, le moment dipolaire et l'électronégativité de la liaison anomérique s'en trouvent diminués (plus le moment dipolaire est grand, plus cela destabilise la structure). Tout ceci favorise une certaine stabilité réactionnelle en milieu biologique. Toutefois, les C-glycosides ne sont pas à l'abri d'autres enzymes dégradantes s'ils doivent être éliminés par l'organisme.

	O-glycoside	***C-glycoside***
Longueur de liaison	O-C : 1,43 Å	C-C : 1,54 Å
Electronégativité (Pauling)	O : 3,44	C : 2,55
Moment dipolaire	O-C : 0,74 D	C-C : 0,3 D
Liaison hydrogène	2	0
Effet anomère[126]	Oui	Non
Stabilité	Coupé par les acides et des enzymes	Stable en présence d'acides et des enzymes
Conformation	$C_{1'}$-$C_{2'}$ et O_1-C_1 antiperiplanaires	$C_{1'}$-$C_{2'}$ et C_1-C_2 antiperiplanaires

Tableau 3 : *Propriétés des O- et C-glycosides*

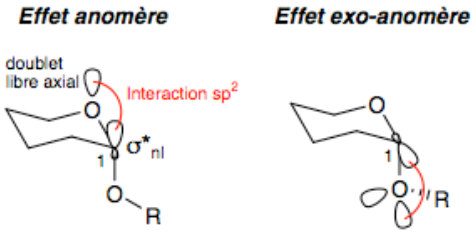


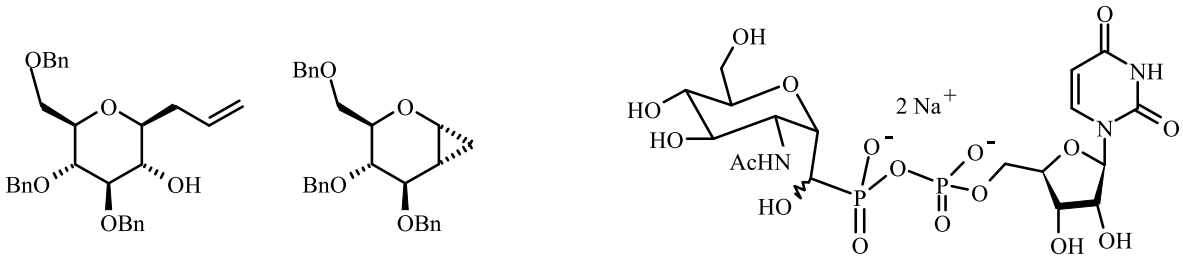
Figure 52 : *Effet anomère et exo-anomère*

Toutes ces propriétés expliquent l'intérêt porté aux C-glycosides. Les C-glycosides sont des candidats biologiquement intéressants pour mimer les O-glycosides dans le milieu cellulaire. Ces composés constituent une classe de synthons chiraux clés utilisés dans de

[125] C. Jaramillo, S. Knapp, Synthesis of C-Aryl Glycosides, *Synthesis,* **1994**, *1*, 20

[126] Effet anomère : Tendance d'un groupement alkoxy sur le carbone anomérique C_1, à s'orienter en position axiale plutôt qu'en position équatoriale, malgré les interactions stériques défavorables. (Terme introduit par Lemieux R. U. *Abstracts of papers, Am. Chem. Soc.* **1958**, *133*, 31). En terme orbitalaire, il existe un recouvrement entre un des doublets non liants de l'oxygène endo-cyclique et l'orbitale anti-liante σ* de la liaison C_1-OR.
Effet exo-anomère : Effet exo-anomère : orientation privilégiée de la liaison O-R du groupe alkoxy sur le centre anomérique. (Terme également introduit par Lemieux R. U. *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 4427)

nombreuses synthèses de produits naturels dont les activités biologiques sont variées (antivirales[127], antimicrobiennes[128], cytotoxiques[129] et inhibitrices d'action enzymatique[130]).



Anticancéreux contre la leucémie (cellules HL60)

β-N-acétyl-D-glucosaminyle transferase

Figure 53 : *C-glycosides reconnus comme cytotoxiques et inhibiteurs d'enzymes*

II. Réalisation de la chimiothèque

Les C-glycosides sont donc choisis comme squelette de base pour créer notre librairie de petites molécules tridimensionnelles et hautement diversifiées (Schéma 1).

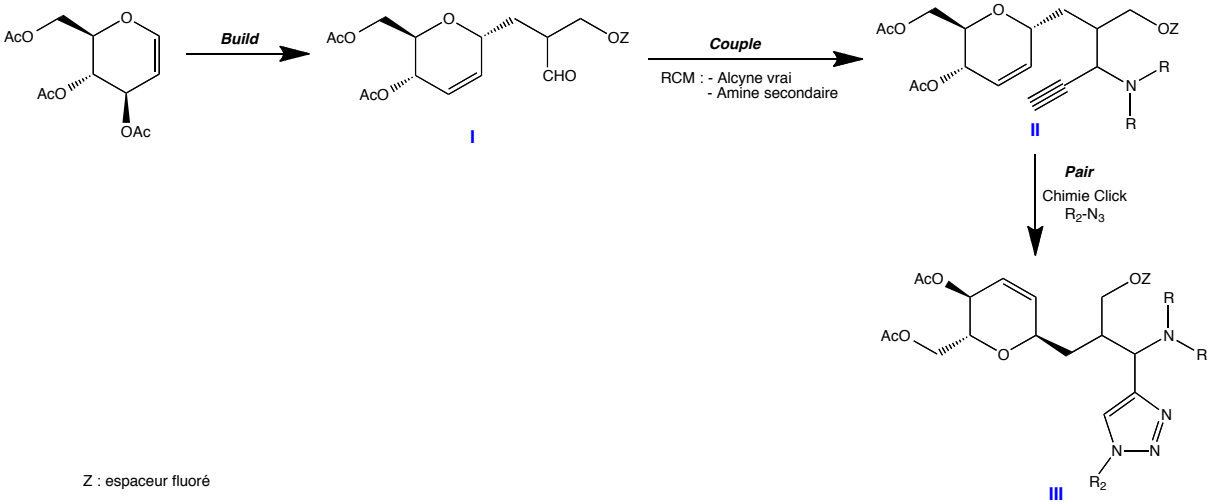


Schéma 1 : *Préparation d'une librairie de petites molécules fluorées à partir d'une propargylamine*

---

[127] S. Q. Cai, R. Wang, W. Yang, M. Shang, C. Ma, Y. Shoyama, Antiviral Flavonoid-Type *C*-Glycosides from the Flowers of *Trollius chinensis***,** *Chemistry & Biodiversity,* **2006**, *3*, 343-38

[128] B. Dinda, A. Bhattacharya, U. De Chandra, S. Arima, H. Takayanagi, Y. Harigaya, Antimicrobial C-glucoside from aerial parts of Diospyros nigra, *Chem. Pharm. Bull.,* **2006**, *5*, 679-681

[129] (a) C. A. Sanhueza, C. Mayat, M. Garcia-Chicano, R. Diaz-Penate, R. L. Dorta, J. T. Vazquez, Antiproliferation and apoptosis induced by C-glycosides in human leukemia cancer cells**,** *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2006**, *16*, 4223-4227 (b) M. R. Chaulagain , M. H. D. Postema, F. Valeriote, H. Pietraszkewicz, Synthesis and anti-tumor activity of β-*C*-glycoside analogs of the immunostimulant KRN7000, *Tetrahedron Lett.,* **2004**, *41*, 7791

[130] (a) R. R.Schmidt, H. Dietrich, Amino-substituted ß-Benzyl-*C*-glycosides; Novel ß-Glycosidase Inhibitors**,** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30,* 1328-1329 (b) W. Zou**,** C-glycosides and aza-C-glycosides as potential glycosidase and glycosyltransferase inhibitors**,** *Current Topics in Medicinal Chemistry,* **2005**,*14*, 1363-1391 (c) F. Stolz, A. Blume, S. Hinderlich, W. Reutter, R. R. Schmidt, *C*-Glycosidic UDP-GlcNAc Analogues as Inhibitors of UDP-GlcNAc 2-Epimerase**,** *Eur. J. Org. Chem.,* **2004**, *15*, 3304-3312

Afin d'opérer suivant la stratégie «Build-Couple-Pair » décrite au chapitre **1**, nous allons synthétiser un aldo-C-glycoside **I** portant une étiquette fluorée qui sera considéré comme notre *premier bloc*. Ce squelette tridimensionnel va permettre d'apporter la diversité stéréochimique à notre chimiothèque. D'autre part, le greffage d'un lipide fluoré facilitera le traitement réactionnel des différents couplages. Il nous permettra aussi d'obtenir une librairie de petites molécules fluorées pouvant être fixées par interaction fluor-fluor à la surface d'une lame en vue d'un criblage en génétique chimique inverse. Les C-glycosides **I** sont par la suite engagés dans l'étape « *Couple* » par des réactions à plusieurs composants (couplage A^3 entre un aldéhyde, une amine *(bloc 2*) et un alcyne (*bloc 3*)) qui donnent accès aux composés de structure **II**. L'utilisation d'une amine chirale telle que la L-proline permet de réaliser une version asymétrique de ce couplage. Les produits ainsi obtenus portent une double et une triple liaison en position ε sur l'aglycone qui peuvent être engagées pour la préparation d'un éventail de nouvelles structures polycycliques ayant une architecture tridimensionnelle complexe *via* des réactions de cyclisation. Lors de l'étape « *Pair* », nous utiliserons le composé **II** pour générer des structures hautement diversifiées de type **III** *via* des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire.

III. Synthèse d'aldo-C-glycoside fluoré[131]

Il est tout d'abord nécessaire de préparer le synthon C-glysosidique portant sur son aglycone une fonction aldéhyde et une étiquette fluorée (structure **I**).

A. Travaux antérieurs de formation d'aldo-C-glycoside

Une réaction de C-glycosidation a été mise au point dans notre laboratoire : elle consiste en la condensation d'alcools méthallyliques protégés avec des glycals per-O-acétylés en présence d'un acide de Lewis (Schéma 6). Selon cette procédure, les aldo-C-glycosides sont obtenus avec de bons à excellents rendements.[132]

[131] Afin de faciliter la lecture de ce manuscrit, nous avons choisi d'utiliser la dénomination d'aldo-C-glycoside fluoré ou de C-glycoside fluoré pour les synthons C-glycosidiques portant sur leur aglycone une étiquette lipidique perfluorée. Il ne s'agit pas ici de substituer les protons du C-glycoside par des fluors.

[132] J. Herscovici, S. Delatre, K. Antonakis, Lewis acid induced homoallylic C-alkylation. A new approach to C-glycosides**,** *J. Org. Chem.,* **1987**, *52*, 5691-5695

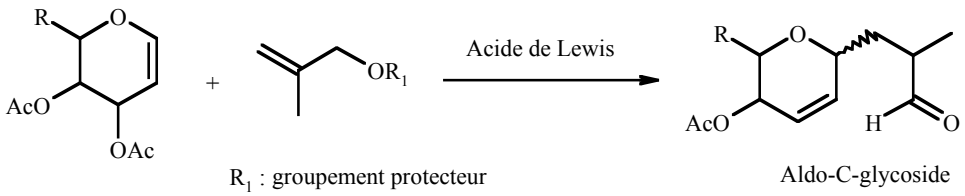


Schéma 6 : *Synthèse de C-glycosides*[132]

Afin de déterminer les conditions expérimentales optimales de cette réaction, plusieurs paramètres ont été examinés. Tout d'abord, une étude de l'activité des différents acides de Lewis sur la réaction de condensation du L-rhamnal et de l'alcool β-méthallylique protégé par un tétrahydropyrane a été réalisée. Ainsi, du L-rhamnal, 1,2 équivalent d'éther allylique et 1 équivalent de catalyseur sont mis en réaction, à différentes températures. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 4.

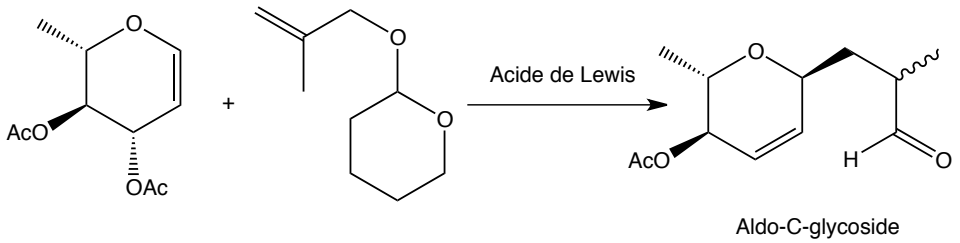


Schéma 7 : *C-glycosidation au départ du L-rhamnal et d'un alcool méthallylique protégé*

Entrée	*Cat. (1 eq.)*	*T. (°C)*	*Rdt*
1	$AlCl_2Me$	-30	Faible
2	$AlCl_2Et$	-30	Faible
3	$SnCl_4$	-30	Faible
4	$SnCl_4$	0 - TA	Trace
5	BF_3,EtO	-30	15 %
6	$TiCl_4$	-30	Très faible
7	$TiCl_4$	0 – TA	-
8	$ZnCl_2$	TA	15 %
9	$ZnBr_2$	0 – TA	38 %
10	$FeCl_3/SiO_2$	TA	38 %
11	ZnI_2	TA	O-glycoside
12	$MgBr_2$	TA	O-glycoside
13	TmSOTf	-70	Faible

Tableau 4 : *Etude de la variation des conditions expérimentales*

Le bromure de zinc s'avère le catalyseur le plus efficace pour cette condensation (entrée 9). Le chlorure de fer porté sur silice mène au même rendement que le bromure de zinc, mais la formation de produits secondaires a été noté. Toutefois, la réactivité des

catalyseurs dépend énormément de la température de la réaction ; en effet, les basses températures favorisent la C-glycosidation aux dépens de la O-glycosidation (entrées 11 et 12).

Les manipulations d'optimisation ont porté, par la suite, sur l'étude de l'impact de différents groupements protecteurs sur la réaction de C-glycosidation. Le bromure de zinc étant choisi comme catalyseur.

Entrée	*Groupement protecteur*	*Rdt (%) de la C-glycosidation*
1	H	29
2	THF	38
3	TMS	66
4	TBDMS	84
5	TDMS	82

Tableau 5 : *Étude de la variation des groupements protecteurs*

Il est clair que les alcools allyliques silylés sont de bons partenaires pour cette réaction de condensation. Plus le groupement silylé est encombrant, meilleurs sont les résultats puisque la réaction de O-glycosidation est défavorisée et le rendement en C-glycoside est nettement amélioré. L'étude RMN ^{1}H (constantes de couplage et intégration - Figure 55) démontre que seulement l'anomère α est obtenu sous forme d'un mélange de diastéréoisomères.

C'est cette voie de C-glycosidation qui permet une introduction directe d'un aglycone à fonction aldéhyde qui a été utilisée pour l'élaboration des structures **I**.

B. Formation d'aldo-C-glycoside sous activation micro-ondes

1. Préparation de l'alcool β-méthallylique silylé

Les chloroalkylsilanes sont de bons électrophiles qui peuvent facilement alkyler les alcools pour former des éthers silylés. Les chloroalkylsilanes encombrés tel que le *ter*-butyldiméthylchlorosilane (TBDMS) ou le thexyldiméthylchlorosilane (TDMS) confèrent aux éthers d'alcools allyliques obtenus une meilleure stabilité vis-à-vis des réactions d'oxydation, de réduction ou des réactions acido-basiques.[133]

[133] H. Wetter, K. Oertle, *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 5515

L'alcool β-méthallylique est silylé à l'aide d'un excès de chlorure de thexyldiméthylsilyle et d'imidazole dans le DMF (Schéma 8) sous activation micro-ondes. Le produit est isolé avec un rendement de 80 % après purification sur cartouche de gel de silice.

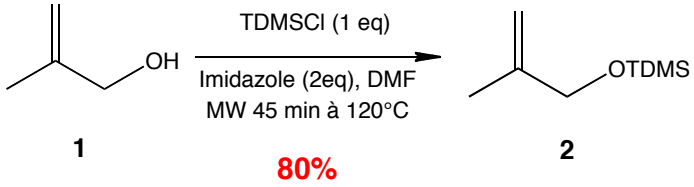


Schéma 8 : *Synthèse de l'alcool β-méthallylique silylé* ***2***

2. Synthèse assistée par micro-ondes

La synthèse organique assistée par micro-ondes a connu un essor considérable ces dernières années. Les irradiations micro-ondes ont un effet bénéfique sur certaines réactions qui nécessitent des températures élevées et des temps de réaction importants, aboutissant très souvent à une pureté accrue des produits finaux et des rendements supérieurs.[134]

Les effets des micro-ondes sont attribués à une combinaison de deux facteurs :

- les effets thermiques, résultant de l'agitation moléculaire causée par l'inversion des dipôles avec les alternances du champ électrique ;
- les effets spécifiques des ondes, d'origine électrostatique. Il s'agit d'une interaction dipôle-dipôle entre les molécules polaires et le champ électrique. Ce sont ces effets qui sont à l'origine de la différence de résultat avec des conditions uniquement thermiques à la même température.

Ces effets sont dépendants des conditions réactionnelles. Lorsque le solvant utilisé est polaire tel que le DMF, l'interaction principale a lieu entre les micro-ondes et le solvant, et un transfert d'énergie se produit entre les molécules du solvant et les réactifs. Ainsi, par exemple, il est possible de porter 50 mL de DMF à 130°C en moins d'une minute, ce qui a pour avantage de réduire le séjour à haute température. Par contre, lorsque le solvant est apolaire comme le toluène par exemple, le contraire se produit, avec transfert d'énergie des réactifs (s'ils sont polaires) vers le solvant.

De plus, sous irradiation, les molécules polaires vont s'aligner dans la direction du champ électrique, entraînant une diminution de l'entropie initiale (création d'un ordre

[134] (a) C. O. Kappe, Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6250-6284 (b) J. P. Tierney, P. Lidström, *Microwave Assisted Organic Synthesis*, Eds., Blackwell Publising, **2005**

moléculaire), provoquant une accélération de la vitesse de réaction. Ces effets sont également dépendants du mécanisme réactionnel. En effet, l'apparition de charges dans l'état de transition entraîne une stabilisation sous irradiation micro-onde. Ainsi, un effet direct sur la cinétique a lieu par la diminution de l'énergie d'activation (Ea), ce qui entraîne l'accélération de la réaction (Figure 54).

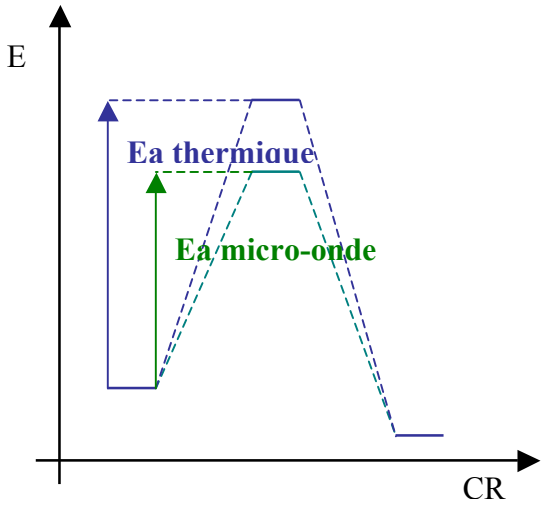


Figure 54 : *Comparaison des énergies potentielles en fonction des coordonnées réactionnelles entre une réaction thermique et une réaction sous MW*

3. Synthèse d'aldo-C-glycoside sous irradiation MW

La réaction d'aldo-C-glycosidation avec un catalyseur acide de Lewis est extrêmement sensible aux conditions opératoires qui doivent être rigoureuses pour une meilleure reproductibilité (travail sous atmosphère inerte, solvants et réactifs anhydres). L'addition des réactifs doit se faire goutte-à-goutte durant une heure. L'aldo-C-glycoside **4** formé par voie thermique à partir de l'alcool β-méthallylique silylé **2** et du tri-O-acétyl-D-glucal **3** est obtenu selon le Schéma 9 avec un rendement de 81 %.[132]

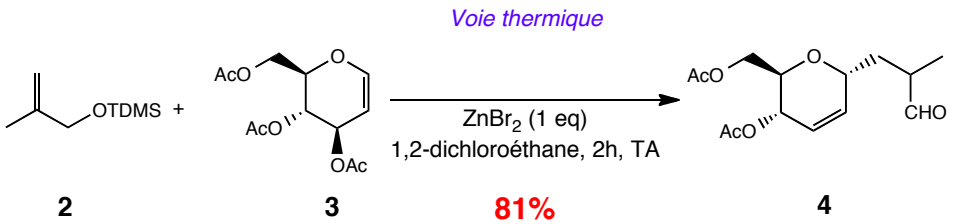


Schéma 9 : *Synthèse thermique de l'aldo-C-glycoside 4*

Le mécanisme de cette réaction d'alkylation par un équivalent d'homoénolate passe par deux étapes. Tout d'abord, il convient de préciser que le bromure de zinc, acide de Lewis permet de faire une assistance électrophile sur l'oxygène du groupement acétate et d'activer

l'électrophilie de la double liaison du glucal **3**. L'oléfine **2** attaque sur le carbone anomérique du glucal **3** par un mécanisme de S_N2' suivi d'une élimination. On forme donc deux centres stéréogènes lors de cette réaction, C6 et C8. Le nouveau centre du cycle C6 est contrôlé par un mécanisme S_N2'. Le deuxième carbone asymétrique C8 se forme, en revanche, par réarrangement. C'est pourquoi on obtient le mélange racémique.

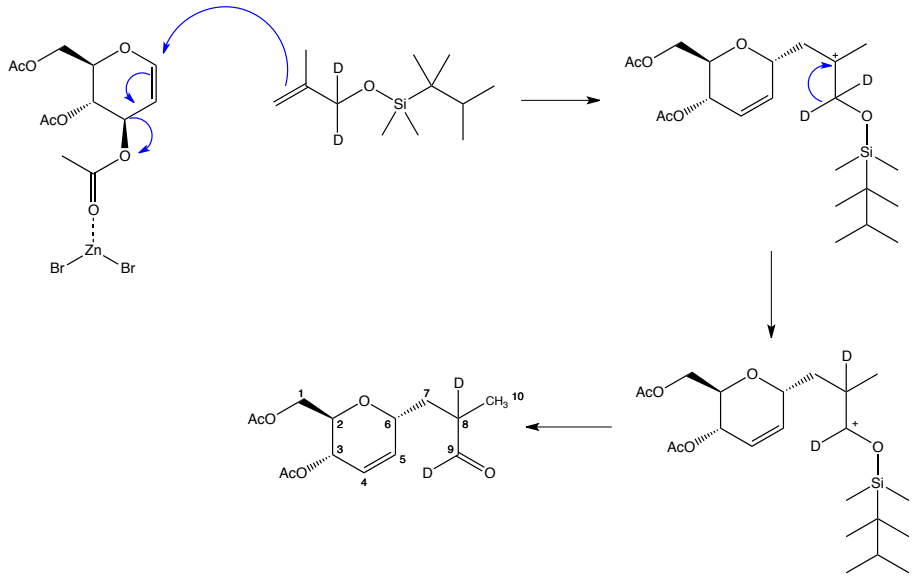


Schéma 10 : *Mécanisme de condensation du D-glucal **3** avec l'éther silylé allylique **2***

Les conditions laborieuses de la voie thermique ont conduit à réaliser cette synthèse sous irradiation micro-ondes. L'optimisation de cette réaction sous irradiation MW a été réalisée par une doctorante de notre laboratoire.[135] Les conditions opératoires optimales trouvées pour la synthèse d'aldo-C-glycoside sous irradiation micro-ondes sont les suivantes : l'éther allylique légèrement en excès (1,2 eq.), le glycal (1 eq.) et le bromure de zinc (0,6 eq.) sont introduits successivement dans un réacteur micro-onde. Le milieu réactionnel est dilué avec du 1,2-dichloroéthane puis irradié durant sept minutes à 100°C.

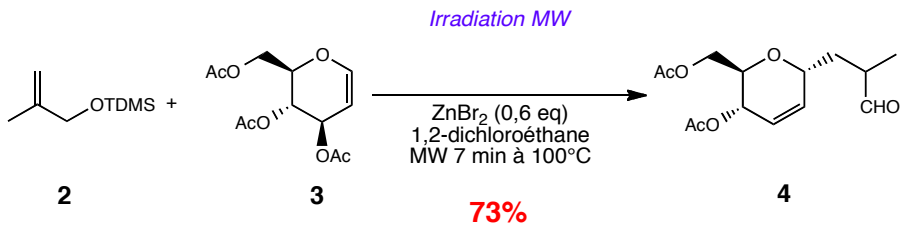


Schéma 11 : *Synthèse sous irradition MW de l'aldo-C-glycoside **4***

[135] Thèse d'Amira Mbarek soutenue en Mai 2011 s'intitulant « Conception et synthèse d'une chimiothèque diversifiée à partir de synthons C-glycosidiques »

Ces conditions ont permis d'obtenir l'aldo-C-glycoside **4** avec un rendement comparable à l'approche thermique mais avec l'avantage d'éviter les conditions opératoires laborieuses de la synthèse classique et de raccourcir la durée de la réaction.

L'étude du spectre RMN ^{1}H révèle que l'aldo-C-glycoside **4** est obtenu sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères non séparables sur une colonne chromatographique sur gel de silice classique avec un rapport diastéréoisomérique 3:2. Le proton aldéhydique est mis en évidence par la présence d'un doublet de doublets à 9,7 ppm. Les protons oléfiniques résonnent sous forme d'un multiplet entre 5,61 et 5,84 ppm, alors que le groupement méthyle lié au carbone 8 apparaît sous forme d'un doublet dédoublé. L'étude du spectre COSY démontre que les protons H-7 sortent sous forme de 4 doublets de doublets de doublets (ddd):

- Un ddd à 1,36 ppm intégrant pour 0,6H qui corrèle avec un ddd à 2,15 ppm intégrant pour 0,6H.
- Un ddd à 1,75 ppm intégrant pour 0,4H qui corrèle avec un ddd à 1,86 ppm intégrant pour 0,4H.

Tandis que le proton 6 sort sous forme un doublet dédoublé à 5,75 ppm nous indiquant la formation d'un seul stéréoisomère pour le carbone anomérique.

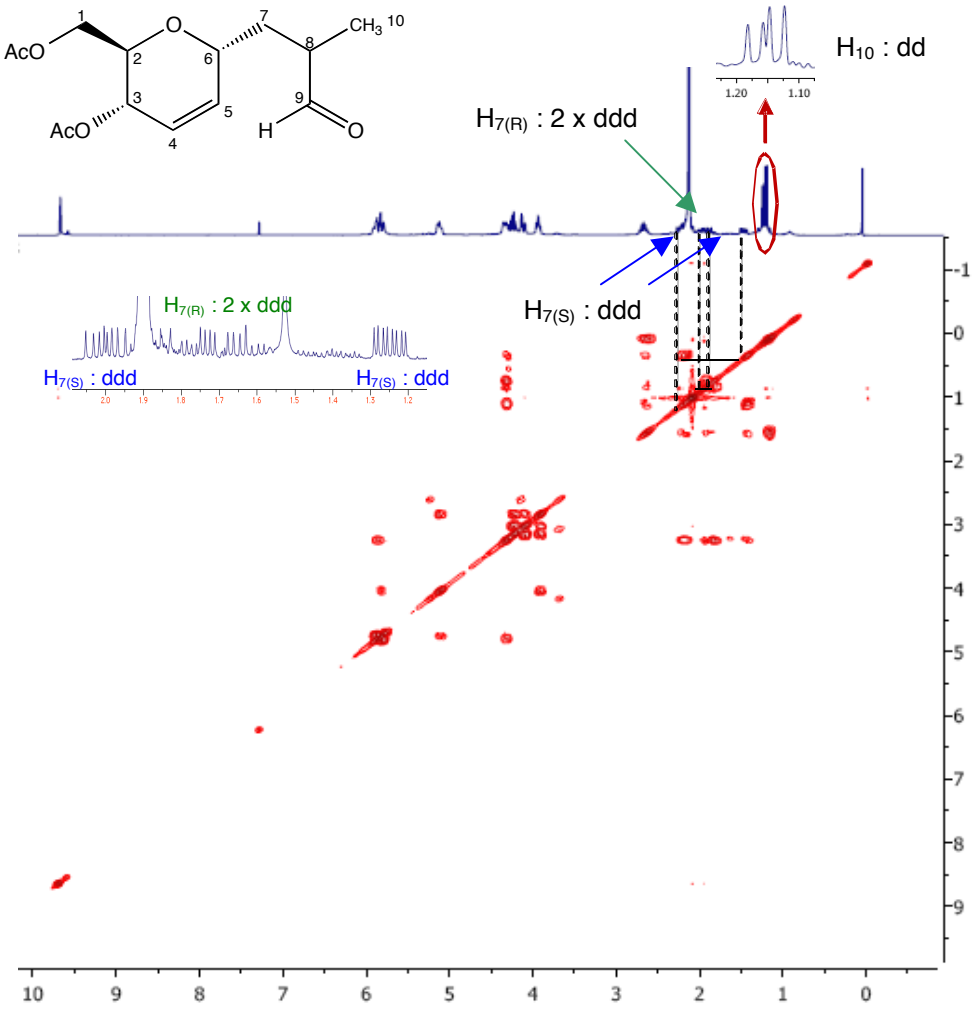


Figure 55 : *Spectre COSY de l'aldo-C-glycoside* ***4***

C. Formation d'aldo-C-glycoside à partir d'autres catalyseurs

Lors de cette réaction de condensation entre un éther allylique silylé et un glycal per-O-acétylé, il se forme deux centres stéréogènes C_6 et C_8. Or, dans les conditions citées précédemment, si la formation du C_6 est totalement maîtrisée, pour C_8, c'est le mélange de R/S en proportion 40/60 qui est obtenu comme nous venons de le voir sur le spectre RMN ^{1}H. Il est ainsi obtenu un mélange de diastéréomères qui ne sont séparables ni par purification sur colonne de silice classique ni par cristallisation. C'est pourquoi nous avons réalisé une étude afin de pouvoir contrôler la formation du second centre stéréogène C_8. Ainsi, cette réaction étant catalysée en temps normal par du bromure de zinc, notre objectif a été de trouver d'autres catalyseurs susceptibles d'augmenter l'excès diastéréoisomérique de l'aldo-C-glycoside tout en conservant un rendement et une pureté corrects.

Dans les années 90, des études ont montré que certains acides de Lewis pouvaient catalyser des réactions mettant en jeu des réactifs proches de ceux de notre synthèse tout en contrôlant la stéréosélectivité de la réaction. Notamment, le trifluorométhanesulfonate de

scandium catalyse de manière très efficace les acylations des alcools à partir d'anhydride acétique[136] ou encore les triflates de lanthanides (surtout $Yb(OTf)_3$) catalysent l'aldolisation des éthers silylés en solution aqueuse.[137] De plus, dans les années 2000, les acides de Lewis ont été utilisés comme catalyseur asymétrique lors de l'allylboration.[138]

Il a donc été envisagé de tester les complexes suivants en tant que catalyseur de la réaction de condensation avec un glycal peracétylé et un éther allylique :

- Triflate de Scandium(III) : $Sc(SO_3CF_3)_3$
- Triflate d'Ytterbium(III) : $Yb(SO_3CF_3)_3$
- Triflate de Lanthane(III) : $La(SO_3CF_3)_3$
- Triflate de Cerium : $Ce_n(SO_3CF_3)$ x H_2O
- Triflate de Cuivre(II) : $Cu(SO_3CF_3)_2$

La quantité optimale de catalyseurs nécessaires au bon déroulement de la réaction dans les mêmes conditions que celles du Schéma 12 a tout d'abord été testée pour chacun des complexes.

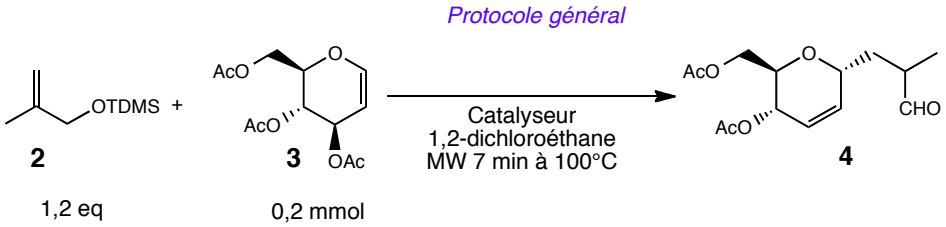


Schéma 12 : *Protocole général appliqué avec les complexes de triflate comme catalyseur*

Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 6. On peut constater qu'aucun des complexes de triflate n'a permis d'améliorer l'excès diastéréoisomérique par rapport à celui de 20 % obtenu avec le bromure de zinc. Le meilleur rendement de 81 % est obtenu avec seulement à 0,4 équivalent de triflate de lanthane, mais un très mauvais excès diastéréoisomérique lui est associé. Dans la plupart des cas, les meilleurs rendements sont associés à des excès diastéréoisomériques très faibles.

[136] K. Ishihara, M. Kubota, H. Kurihara, H. Yamamoto, Scandium Trifluoromethanesulfonate as an Extremely Active Lewis Acid Catalyst in Acylation of Alcohols with Acid Anhydrides and Mixed Anhydrides**,** *J. Org. Chem.,* **1996**, *61*, 4560-4567

[137] S. Kobayashi, I. Hachiya, Lanthanide Triflates as Water-Tolerant Lewis Acids. Activation of Commercial Formaldehyde Solution and Use in the Aldol Reaction of Silyl Enol Ethers with Aldehydes in Aqueous Media**,** *J. Org. Chem.,* **1994**, *59*, 3590-3596

[138] J.W.J. Kennedy, D. G. Hall, Lewis Acid Catalyzed Allylboration: Discovery, Optimization, and Application to the Formation of Stereogenic Quaternary Carbon Centers**,** *J.Org. Chem.* **2004**, *69*, 4412-4428

Catalyseur	*% de catalyseur*	*Rendement (%)*	*Excès diastéréoisomérique (%)*
$La(SO_3CF_3)_3$	100	47	18
	70	30	6
	40	81	4
	10	45	10
	5	33	6
	1	31	4
$Yb(SO_3CF_3)_3$	100	8	8
	70	9	0
	40	18	0
	10	37	6
	5	32	6
	2	16	6
$Cu(SO_3CF_3)_2$	10	35	0
	5	63	2
	2	49	0
	1	30	16
$Sc(SO_3CF_3)_3$	100	5	0
	70	5	0
	40	10	4
	10	26	10
	5	30	14
	2	28	10
$Ce_n(SO_3CF_3)\,x\,H_2O$	40	9	14
	10	16	6

Tableau 6 : *Etude de la variation des complexes de triflate*

Cette étude préliminaire ne nous a ni permis d'améliorer l'excès diastéréoisomérique de la réaction ni de trouver un catalyseur plus efficace que le bromure de zinc. Cependant, il a été noté au cours des réactions où étaient employées le triflate de scandium et le triflate de cérium que la réaction débute à température ambiante sans avoir recours à l'activation micro-ondes. Cette observation pourrait expliquer les faibles rendements obtenus pour ces deux derniers complexes, car il est fort probable qu'une partie du composé formé à température ambiante est carbonisée une fois irradiée. Nous avons donc ensuite réalisé cette réaction à température ambiante, mais notre étude s'est limitée à l'emploi du triflate de scandium. Nous avons constaté que la réaction était complète en seulement 10 min soit un gain de temps par rapport à l'emploi du bromure de zinc à TA.

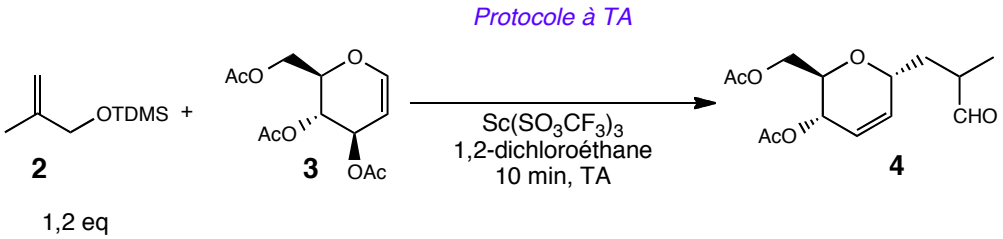


Schéma 13 : *Protocole à TA utilisant le triflate de scandium comme catalyseur*

Comme précédemment, nous avons testé différentes quantités de catalyseurs pour étudier son influence sur le rendement et le rapport diastéréoisomérique en suivant le protocole du Schéma 13. Ces résultats sont regroupés dans le tableau suivant (Tableau 7) :

Entrée	*Quantité de D-Glucal 3 utilisée*	*% Catalyseur*	*Rendement (%)*	*Excès diastéréoisomérique (%)*
1	*0,1 mmol*	100	56	6
2		80	74	20
3		60	70	20
4		40	77	16
5		20	74	20
6		10	74	20
7	*5 mmol*	**10**	**76**	**18**
8		5	71	16

Tableau 7 : *Etude de la variation de la quantité de $Sc(SO_3CF_3)_3$ employée*

On peut noter que l'utilisation de triflate de scandium à TA nous permet de maintenir un excès diastéréoisomérique comparable à celui des conditions classiques avec $ZnBr_2$ et d'obtenir des rendements du même ordre de grandeur (entrée **4**). Les avantages de l'utilisation de $Sc(SO_3CF_3)_3$ sont d'une part un temps réactionnel réduit à 10 min au lieu de 2 h et d'autre part une quantité catalytique de 10 % de $Sc(SO_3CF_3)_3$ permet d'obtenir l'aldo-C-glycoside avec de bons rendements quelque soit la quantité de tri-O-acétyl-D-glucal employée (entrées **6** et **7**). Voyant que la quantité de catalyseur n'avait pas d'influence sur l'excès diastéréoisomérique, nous avons étudié l'influence de la température lors de l'ajout des réactifs (Tableau 8).

Entrée	*Température*	*% Catalyseur*	*Rendement (%)*	*Excès diastéréoisomérique (%)*
1	TA	10	74	20
2	0°C	40	17	26
3		80	81	20
4		100	67	30
5	-20°C	60	70	26
6		80	74	24
7		100	70	22
8	-40°C	5	25	44
9		10	53	40
10	-78°C	5	-	-
11		10	18	50

Tableau 8 : *Etude de la variation de la température*

L'analyse des résultats du tableau précédent permet de voir que la température semble joue un rôle prédominant dans la formation des deux diastéréoisomères. Le meilleur excès diastéréoisomérique de 50 % (entrée **11**) est obtenu à -78°C. À basse température, on formerait plus facilement le composé de configuration S (produit cinétique de la réaction). Malheureusement, les rendements décroissent avec la diminution de la température (entrées **1**, **9** et **11**). Ces rendements peuvent être tout de même améliorés en augmentant la quantité de catalyseur mis en jeu (entrées **2**, **3** et **4**).

Cette étude ne nous a pas permis pour l'instant de trouver un catalyseur plus efficace que le bromure de zinc en ce qui concerne le rendement de la réaction, mais nous ouvre une voie pour la formation d'aldo-C-glycoside énantiopure en contrôlant la température de la réaction.

D. Formation d'aldo-C-glycoside fluoré[131] de type I

Afin d'obtenir les synthons C-glycosidiques de structure **I** qui possèdent sur leur aglycone en position γ une fonction aldéhyde et en position δ une étiquette fluorée (structure **I**), nous nous sommes inspirés de la condensation entre le tri-O-acétyl-D-glucal **3** et l'éther allylique **2** pour construire les aldo-C-glycosides fluorés. Pour ceci, la première voie envisagée a été d'utiliser un alcool allylique silylé qui posséderait une chaîne fluorée en position β (molécule **5**).

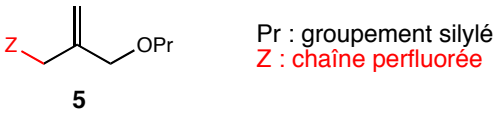


Figure 56 : *Ether allylique fluoré envisagé*

En appliquant les conditions développées au Schéma 11, la condensation du tri-O-acétyl-D-glucal avec les alcools allyliques perfluorés **5** permettrait d'aboutir à la structure **I** recherchée suivant le Schéma 14.

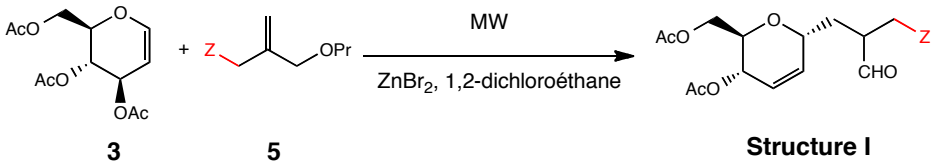


Schéma 14 : *Synthèse d'aldo-C-glycoside perfluoré **I***

Pour obtenir ce résultats, 2 types d'alcools allyliques fluorés **5** sont envisagés (Schéma 15) : le premier où la chaîne perfluorée est greffée par une fonction urée espacée de l'alcène par 1 ou 2 carbones (Espaceur allylique fluoré **A**) et le deuxième où la chaîne perfluorée est greffée par une fonction carbamate espacée de l'alcène par 1 ou 2 carbones (Espaceur allylique fluoré **B**).

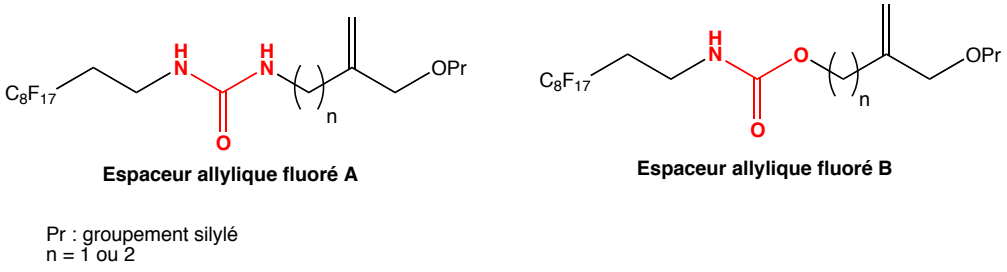


Schéma 15 : Espaceurs allyliques fluorés envisagés

1. Synthèse des espaceurs allyliques fluorés A

Les espaceurs allyliques fluorés **A** sont obtenus à partir du 2-méthylène-propane-1,3-diol qui est monoprotégé par un groupement silyle (composé **C**) (Schéma 16). L'alcool libre est ensuite bromé pour conduire au composé **D**. L'amine primaire du composé **E** est obtenue après réduction d'un groupement azoture ou cyanure, préparé par substitution nucléophile de l'halogénure du composé **D**. Enfin la chaîne perfluorée est greffée à l'espaceur allylique par la formation d'une liaison urée entre l'amine du composé **E** et un isocyanate lipidique perfluorée.

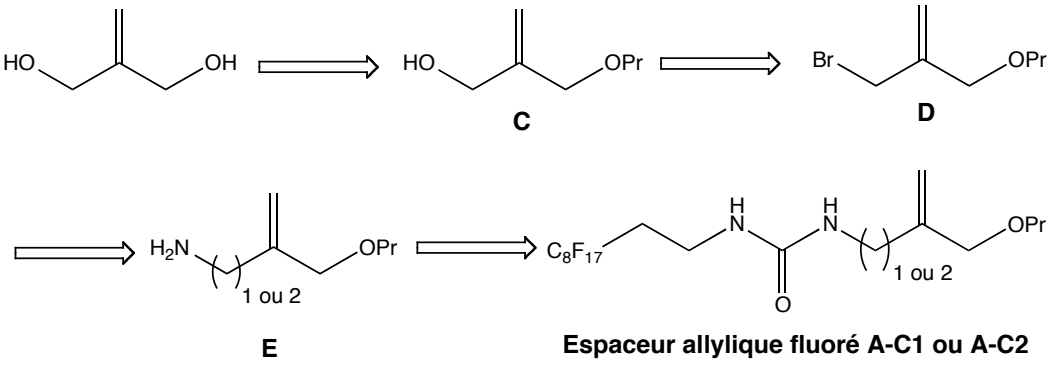


Schéma 16 : *Schéma de synthèse globale des espaceurs allyliques fluorés A*

a. Espaceur allylique fluoré A-C1

Nous avons synthétisé l'espaceur allylique fluoré **11** où la chaîne lipidique perfluorée est espacée de l'alcène par un groupement méthyle en 5 étapes à partir du 2-méthylène-propane-1,3-diol (**6**).

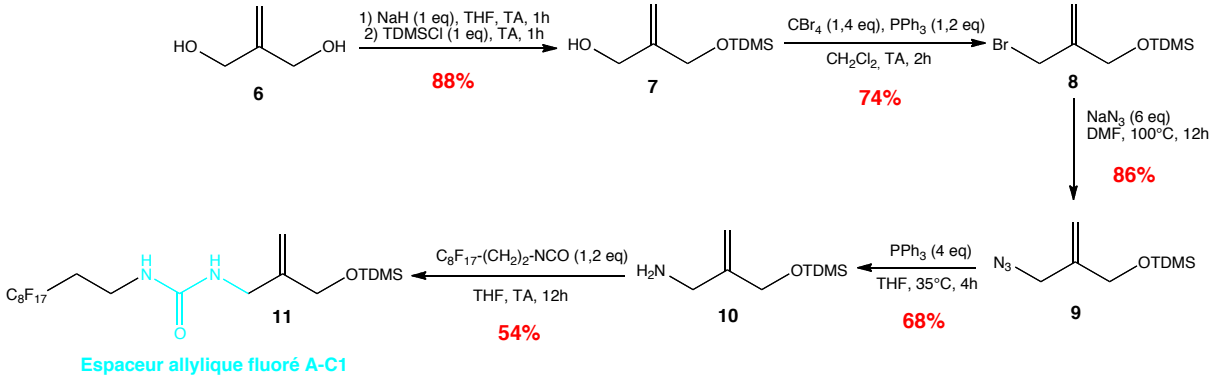


Schéma 17 : *Synthèse de l'espaceur allylique fluoré A-C1*

Le diol symétrique **6** a été monoprotégé par un groupement thexyldiméthylsilyle avec un bon rendement (88 %). Pour obtenir ce rendement en n'utilisant qu'un seul équivalent d'agent silylant, nous avons appliqué une méthode développée par l'équipe de P. McDougal[139] qui repose sur la précipitation du sel monosodique **6'** du diol. L'addition de l'agent silylant entraîne la dissolution de petites quantités de sels d'alcoolate qui sont silylés. Comme le sel se dissout lentement, le taux de silylation de l'alcoolate **6'** est plus rapide que le transfert de proton entre le sel d'alcoolate **6'** et l'alcool silylé **7** déjà formé n'entraînant pas la silylation du second alcool (Schéma 18).

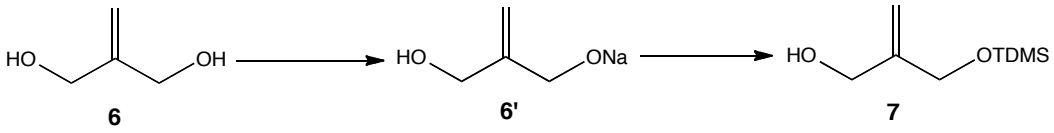


Schéma 18 : *Principe de monosilylation sélective de diol symétrique*

Afin d'obtenir l'azoture **9**, nous avons préalablement activé l'alcool **7** par un groupement mésylate (Schéma 19). Le mésylate formé **8'** est obtenu avec un rendement de 18 % après purification sur cartouche de gel de silice. Il est caractérisé en RMN ^{1}H par la présence d'un singulet à 3.02 ppm correspondant aux protons portés par le méthyle du groupement mésyle. Il est ensuite engagé dans la réaction d'azidation qui consiste en une substitution nucléophilie du mésylate en présence d'excès d'azoture de sodium. Malheureusement, cette substitution ne nous a pas permis d'obtenir l'azoture **9**.

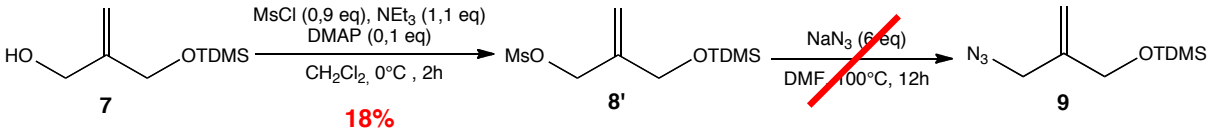


Schéma 19 : *Passage par un mésylate*

Donc nous avons décidé de former le dérivé halogéné **8** qui sera engagé par la suite dans la réaction d'azidation. Pour réaliser cette réaction, nous avons engagé l'alcool **7** dans une réaction de bromation en présence de tétrabromure de carbone et de triphénylphosphine (Schéma 17).[140] Le dérivé bromé **8** est obtenu avec un rendement de 74 % après purification. Sa formation a été déterminée par RMN ^{13}C par la disparition du signal des protons de l'hydroxyméthyle vers 65 ppm et l'apparition d'un signal vers 33 ppm correspondant aux

[139] (a) P. G. McDougal, J. G. Rico, Y-I. Oh, B. D. Condon, A convenient procedure for the monosilylation of symmetric 1,n-diols, *J. Org. Chem*., **1986**, *51*, 3388-3390, (b) H-Y. Lee, H. Seop Yae, B. Guy Kim, H-M. Choo, A practical total synthesis of gelastatins, *Tetrahedron lett.,* **2003**, 44, 5803-5806

[140] J. Ju, DH. Kim, L. Bi, Q. Meng, X. Bai, Z. Li, X. Li, MS. Marma, S. Shi, J. Wu, JR. Edwards, A. Romu, NJ. Turro, Four-color DNA sequencing using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators, *PNAS*, **2006**, *103*, 19635-19640

protons méthyliques bromés. Nous avons ensuite généré l'azoture **9** par substitution nucléophile de l'halogénure en présence d'un excès d'azoture de sodium.[141,142,143] Cet azoture est obtenu avec un rendement de 86 %. Ce résultat est confirmé par RMN ^{1}H par un blindage des protons en α de l'azoture.

L'azoture du composé **9** est réduit en présence de triphénylphosphine pour conduire au composé aminé **10** avec un rendement de 68 %. La structure est confirmée par RMN ^{1}H par un blindage des protons en α de l'amine à 3,32 ppm et l'apparition d'un singulet large à 1,78 ppm correspondant aux protons NH_2. La molécule **10** est ensuite couplée par une fonction urée avec un dérivé lipidique fluoré en C_8F_{17}. Il a été montré qu'une chaîne fluorée possédant 8 carbones perfluorés permettait d'obtenir des interactions fortes entre l'étiquette fluorée de la molécule et la chaîne fluorée greffée sur une lame fonctionnalisée lors d'un criblage de protéine fluorescente. Cette fonction urée est obtenue entre la réaction de l'amine de la molécule **10** et une fonction isocyanate située en β de la chaîne fluorée. L'espaceur fluoré **A-C1** (molécule **11)** est obtenu avec un rendement de 54 % après purification sur cartouche de gel de silice. La structure est confirmée par RMN ^{1}H par l'apparition d'un doublet à 3,74 ppm correspondant aux protons méthyliques en α de la fonction urée et par RMN ^{13}C par l'apparition d'un signal à 158 ppm correspondant au carbonyle de la fonction urée. Donc l'espaceur fluoré ***A-C1*** a été obtenu en 5 étapes à partir du 2-méthylène-propane-1,3-diol (**6**) avec un rendement de total de 20 %.

b. *Espaceur allylique fluoré A-C2*

La synthèse de l'espaceur allylique fluorée **A-C2** où la chaîne fluorée est située en β de l'alcool allylique a débuté par la protection de l'alcool β-méthallylique par un groupement thexyldiméthylsilyle comme on l'a vu précédemment au Schéma 8.

[141] S. G. Alvarez, M. T. Alvarez, A practical procedure for the synthesis of alkyl azides at ambiant temperature in dimethyl sulfoxide in high purity and yield, *Synthesis,* **1997,** *4*, 413-414

[142] N. Hooper, L. J. Beeching, J. M. Dyke, A. Morris, J. S. Ogden, A. A. Dias, M. L. Costa, M. T. Barros, M. H. Cabral, A. M. C. Moutinho, A study of the thermal decomposition of 2-azidoethanol and 2-azidoethyl acetate by ultraviolet photoelectron spectroscopy and matrix isolation infrared spectroscopy, *J. Phys. Chem.,* **2002,** *106*, 9968-9975

[143] A. J. Scheel, H. Komber, B. I. Voit, Novel hyperbranched poly[1,2,3]-triazoles derived from AB2 monomers by 1,3 dipolar cycloaddition, *Macromol. Rapid Comm.,* **2004,** *25*, 1175-1180

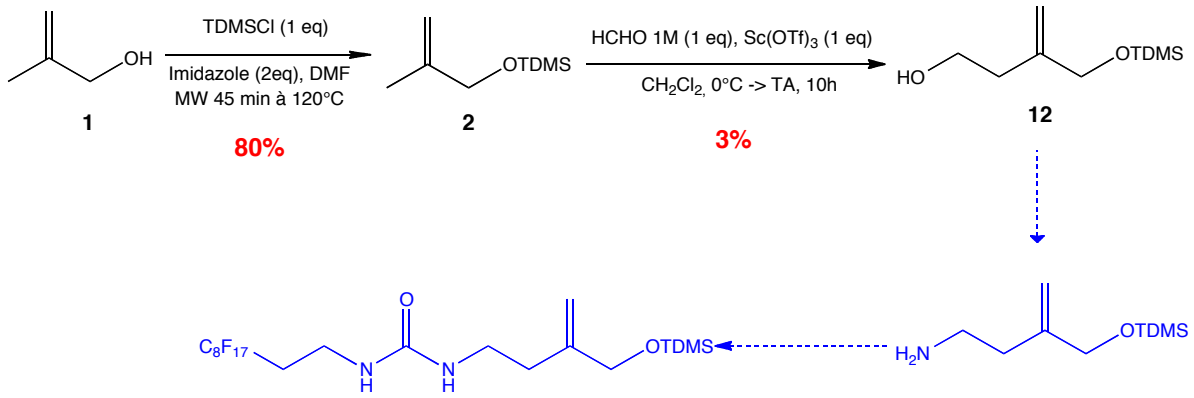


Schéma 20 : *Synthèse à partir de l'alcool β-méthallylique*

L'éther silylé méthallylique **2** est ensuite engagé dans une réaction Alder-ène.[144] La réaction Alder-ène est l'addition concertée d'un hydrogène allylique (liaison $\sigma_{C\text{-}H}$) d'une molécule (**ène**) sur une liaison π multiple d'un composé partenaire, l'**énophile**, électroniquement déficitaire avec formation d'une nouvelle liaison entre les deux extrémités des deux doubles liaisons en vis-à-vis et déplacement de concomitant de la double liaison allylique (Schéma 21).

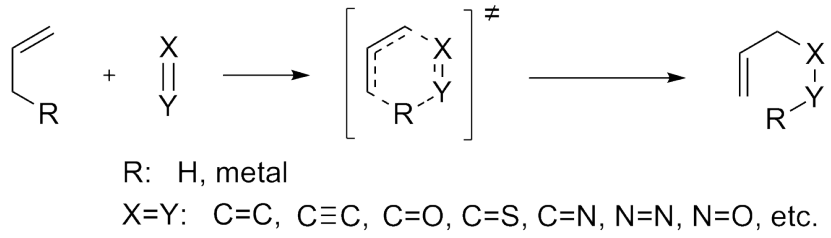


Schéma 21 : *Réaction Alder-ène*

Les réactions Alder-ène s'effectuent généralement à température relativement élevée en utilisant des acides de Lewis conduisant à des isomérisations. Ces réactions nécessitent en effet de grandes énergies d'activation et des exigences stéréoélectroniques pour casser la liaison $\sigma_{C\text{-}H}$ allylique. L'équipe de Nakagawa[145] a récemment montré qu'un mélange de triflate d'ytterbium et de chlorure de triméthylsilyle permettait de réaliser efficacement des réactions imino-ène avec de bons rendements.

[144] K. Alder, F. Pascher, A. Schmitz, Substituting additions. I. Addition of maleic anhydride and azodicarboxylic esters to singly unsaturated hydrocarbons. Substitution processes in the allyl position *Ber. Dtsch. Chem.* **1943**, *76*, 27

[145] M. Yamanaka, A. Nishida, M. Nakagawa, Ytterbium (III) triflate/TMSCl : Efficient catalyst for Imino Ene reaction, *Org. Lett.,* **2000**, *2*, 159-161

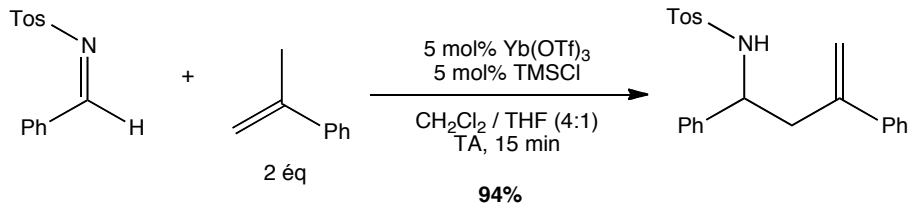


Schéma 22 : *Réaction Imino-ène catalysé par du triflate d'Ytterbium*

D'autre part, l'équipe de Nakai[146] a montré que l'introduction d'un groupement alkoxy silylé en position allylique sur le composé ène permettait d'obtenir des réactions carbonyl-ène régiospécifiques, même en utilisant du formaldéhyde. C'est autour de cette dernière étude que nous avons développé notre composé **12** en faisant réagir l'éther silylé méthallylique **2** avec du formaldéhyde pour pouvoir introduire un groupement éthyle en position α de l'allyle. Cette réaction formaldéhyde-ène a été catalysé par un acide de Lewis, ici il s'agit du triflate de scandium. Malheureusement, seulement 3 % du produit **12** a pu être isolé. L'alcool **12** aurait ensuite été engagé en suivant le même schéma réactionnel que pour le composé **11** (passage par un dérivé bromé puis un azoture réduit en amine pour être couplé au dérivé lipidique fluoré), mais le faible rendement de la réaction Alder-ène nous a poussé à envisager une seconde voie de synthèse.

Cette seconde voie de synthèse (Schéma 23) est dérivée du schéma réactionnel de l'espaceur fluoré **11** et se différencie à partir de l'éther silylé méthallylique **8.** Le brome situé en β de l'éther allylique est substitué par une fonction nitrile en présence de cyanure généré *in situ* par du cyanure de triméthylsilyle et du fluorure de tétrabutylammonium.[140]

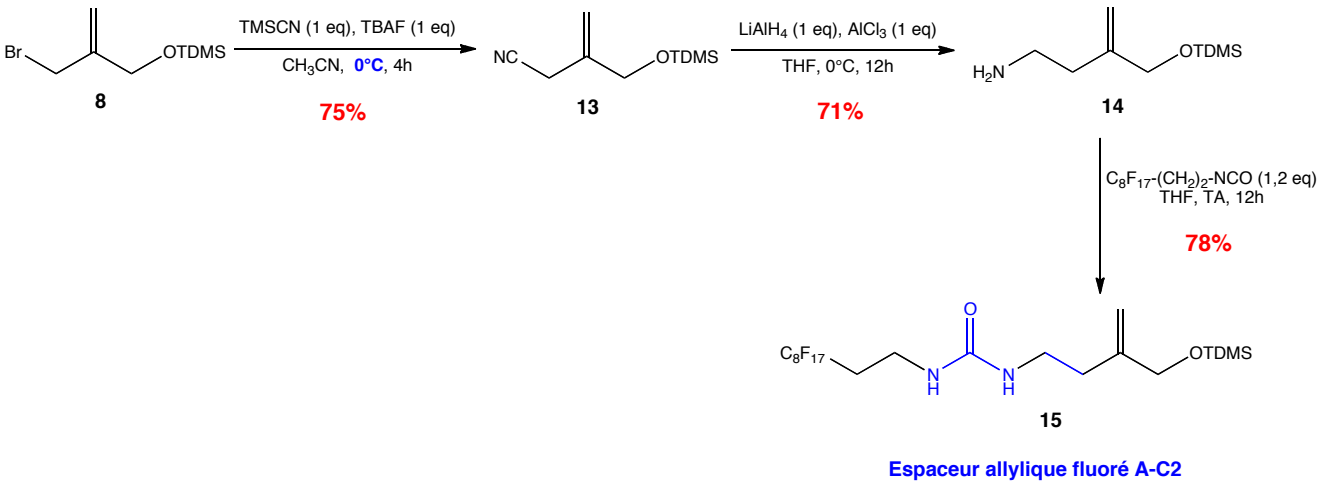


Schéma 23 : *Synthèse de l'espaceur fluoré allylique A-C2*

[146] (a) K. Mikami, H. Ohmura, M. Yamanaka, (2,5)-ene cyclization by mesoporous solid acids : isotope labeling studu and ab initio calculation for continuum from concerted to stepwise ene mechanism, *J. Org. Chem*., **2003**, *68*, 1081-1088 ; (b) K. Mikami, M. Shimjzu, T. Nakai, Highly regio and stereocontrolled glyoxyalte-ene reaction with (homo)allylic ethers : remarkable alkoxy effect in regio- and stereocontrol, *J. Org. Chem*., **1991**, *56*, 2952-2953

Cette étape de substitution a tout d'abord été réalisée dans les mêmes conditions décrites dans la littérature, c'est-à-dire à température ambiante pendant 4 h. Cependant, le produit **13** attendu n'a pas été formé, mais nous avons isolé 2 isomères, un où l'alcool est protégé par groupement silyle **13'** et un où l'alcool est non protégé **13''** (Schéma 24). Pour remédier à ce problème de réarrangement de position, nous avons réalisé la substitution du brome par le cyanure à 0°C pendant 4 h, ce qui a conduit à la formation du composé **13** avec un rendement de 75 %. La structure du composé **13** est confirmée par RMN ^{1}H et RMN ^{13}C, on observe un blindage des signaux des protons méthyliques en α de la fonction nitrile (3,12 ppm –C*H*$_2$-CN et 21 ppm –*C*H$_2$-CN).

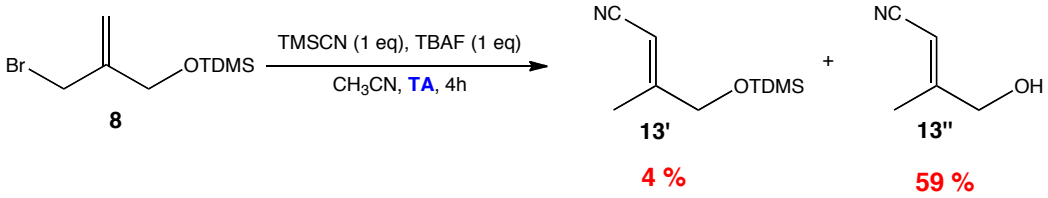


Schéma 24 : *Produits secondaires issus de la substitution nucléophile du bromure à TA*

La fonction nitrile du composé **13** est ensuite réduite par $LiAlH_4$ pour former le composé amino **14** avec un rendement de 71 % (Schéma 23). Sa formation a été déterminée par RMN ^{1}H par l'apparition d'un triplet à 2,48 ppm intégrant pour les protons méthyliques en β de l'amine terminale et par RMN ^{13}C par l'apparition de deux signaux à 32 ppm et à 39 ppm correspondant respectivement aux carbones méthyliques en α et en β de l'amine. La molécule **15** a été obtenue de la manière que la molécule **11** par un couplage entre l'amine **14** et l'isocyanate lipidique fluoré avec un rendement de 78 % après purification sur cartouche de gel de silice. La structure est confirmée par RMN ^{1}H par l'apparition d'un triplet à 3,24 ppm correspondant aux protons méthyliques en α de la fonction urée et par RMN ^{13}C par l'apparition d'un signal à 158 ppm correspondant au carbonyle de la fonction urée. Donc l'espaceur fluoré ***A-C2*** a été obtenu en 5 étapes à partir du 2-méthylène-propane-1,3-diol (**6**) avec un rendement de total de 27 %.

2. Synthèse des espaceurs allyliques fluorés B

Les 2 types d'espaceurs fluorés **B** comportant une fonction carbamate ne sont pas obtenus à partir du même schéma réactionnel, le dérivé **C1** a été obtenu à partir du 2-méthylène-propane-1,3-diol et le dérivé **C2** a été quant à lui obtenu à partir du bromométhacrylate.

a. Espaceur allylique fluoré B-C1

Nous avons synthétisé l'espaceur allylique fluoré **16** où la chaîne perfluorée est espacée de l'alcène par un groupement méthyle en 2 étapes à partir du 2-méthylène-propane-1,3-diol (**6**). Le diol symétrique **6** a été monoprotégé par un groupement de thexyldiméthylsilyle sous forme d'éther avec un bon rendement de 88 % puis couplé avec l'isocyanate lipidique fluoré pendant 3 jours pour conduire à la molécule **16** avec un rendement de 38 % après purification (Schéma 25). Ce résultat est confirmé par RMN ^{1}H avec l'apparition d'un singulet intégrant pour 2 protons à 4,60 ppm correspondant au méthyle situé entre la fonction carbamate et l'alcène.

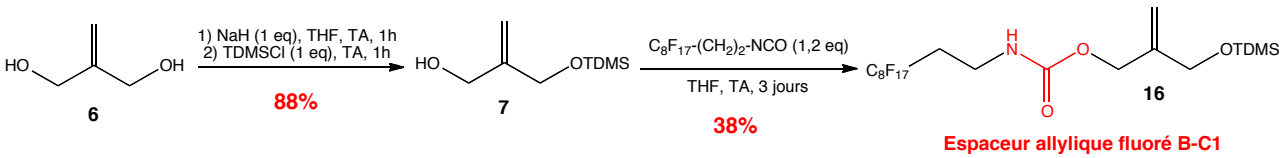


Schéma 25 : *Synthèse de l'espaceur allylique fluoré B-C1*

Donc l'espaceur fluoré ***B-C1*** a été obtenu en 2 étapes à partir du 2-méthylène-propane-1,3-diol (**6**) avec un rendement total de 33 %.

b. Espaceur allylique fluoré B-C2

La synthèse de l'espaceur allylique fluoré **22,** où la chaîne perfluorée est espacée de l'alcène par un groupement éthyle, a été envisagée à partir du bromométhacrylate **17 (**Schéma 26**)**.

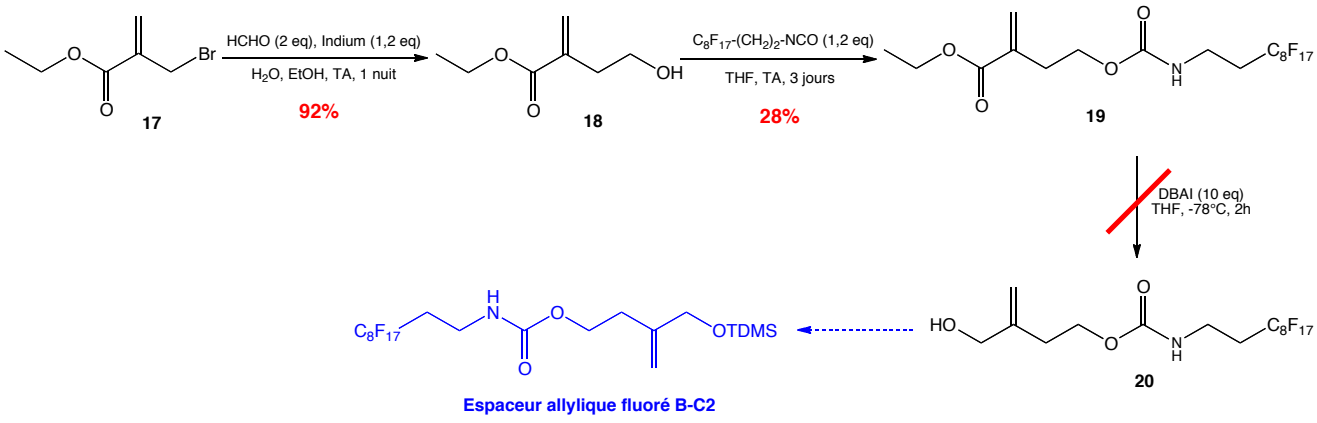


Schéma 26 : *Première voie testée*

Le dérivé bromé **17**[147] a été engagé dans une réaction de Reformatsky avec du formaldéhyde catalysée par l'indium[148] pour conduire à l'alcool **18** avec un rendement de 92 % permettant ainsi d'introduire un groupement éthyle en α de l'alcène (Schéma 27).

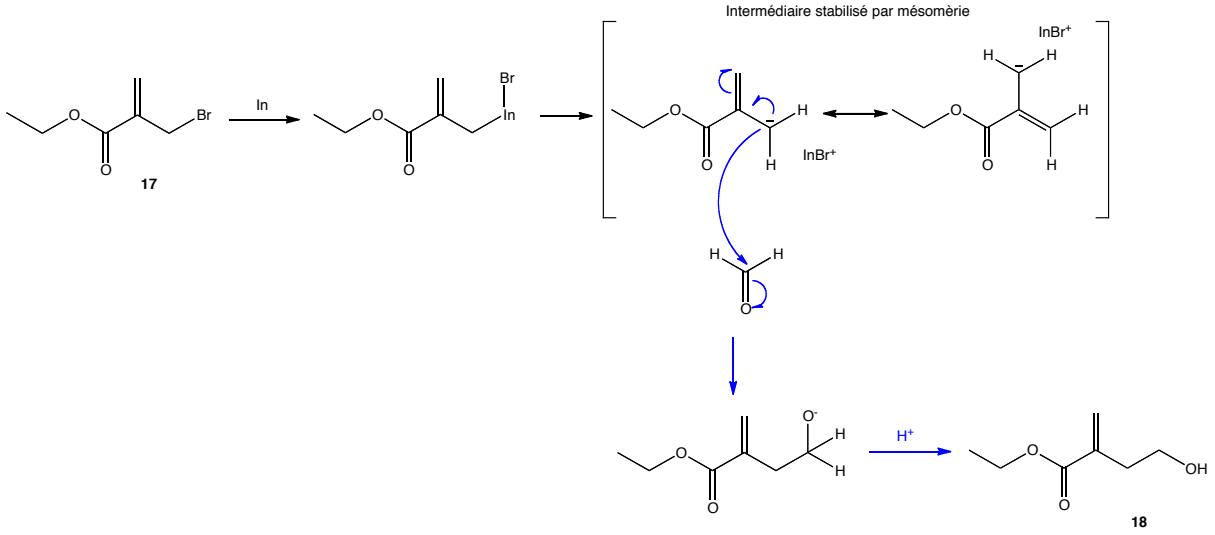


Schéma 27 : *Mécanisme de la réaction de Reformatsky entre le bromométhacrylate et le formaldéhyde*

La structure **18** est confirmée par RMN ^{1}H par le blindage des protons en α et en β de l'alcool (3,72 ppm (t) et 2,59 ppm (t)) par rapport aux protons méthyliques bromés (4,15 ppm).

L'alcool **18** réagit ensuite avec l'isocyanate lipidique fluoré pendant 3 jours formant une fonction carbamate entre le lipide fluoré et l'acrylate. Le composé **19** a été obtenu avec un rendement modéré de 28 % après purification et est confirmé par RMN ^{13}C par un déblindage du carbone méthylique en α de la fonction carbamate (60 ppm à 64 ppm) et par LC-MS avec la formation d'un pic à 11,22 min de m/z = 634 $[M+H]^+$ et 656 $[M+Na]^+$. L'acrylate **19** est ensuite réduit pour conduire à l'alcool correspondant **20** par de l'hydrure de diisobutylaluminium à -78°C. Ce processus n'a pas permis d'isoler l'alcool **20** attendu qui aurait ensuite été protégé sous forme d'éther fluoré pour former l'espaceur allylique fluoré **B-C2**. Donc nous avons envisagé par la suite de saponifier l'ester **19** par une solution d'hydroxyde de sodium 2 M pour conduire à l'acide carboxylique correspondant **21** (Schéma 28). La formation du composé **21** a été confirmée par LC-MS avec l'apparition d'un pic à 10,5 min de m/z = 606 $[M+H]^+$ et 628 $[M+Na]^+$, mais sa purification n'a pas permis de l'isoler. Donc le mélange **21** a ensuite été réduit par $LiAlH_4$, mais n'a pas abouti à la

[147] S. Hanessian, H. Park, R-Y Yang, Zinc-mediated allylation of N-protected –amino aldehydes in aqueous solution. Stereoselective synthesis of Phe-Phe hydroxyethylene dipeptide isosteres, *Synlett*, **1997**, 351-352

[148] H. Nagano, R Kuwahara, F. Yokoyama, Radical mediated stereoselective synthesis of meso-7,11-dimethylheptadecane, a female sex pheromone component of the spring hemlock looper and the pitch pine looper, *Tetrahedron*, **2007**, *634*, 8810-8814

formation de l'alcool **20**. Ceci s'explique certainement par la présence de nombreuses impuretés dans le milieu qui ont rendu inactif le réducteur. Cette seconde de voie synthèse ne nous a pas permis d'obtenir l'espaceur allylique fluoré **B-C2**.

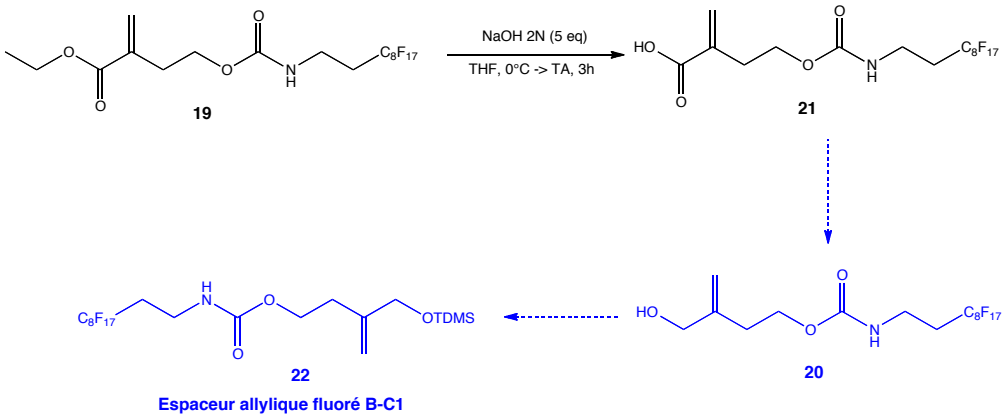


Schéma 28 : *Deuxième voie testée*

3. Bilan de la synthèse des espaceurs allyliques fluorés

À l'issue de cette première étape de préparation des éthers silylés allyliques fluorés, nous avons obtenu 3 types d'espaceur fluoré dérivé du 2-méthylène-propane-1,3-diol (**6**) (Schéma 29). Les espaceurs allyliques fluorés de type **A** où le lipide fluoré est greffé à l'alcool allylique par une fonction urée ont été obtenus en 5 étapes avec un rendement total de 20 % où un groupement méthyle sépare la fonction urée et l'allyle et de 27 % où un groupement éthyle sépare la fonction urée et l'allyle. L'espaceur allylique fluoré de type **B** où le lipide fluoré est greffé à l'alcool allylique par une fonction carbamate espacé d'un méthyle a été obtenu en 2 étapes avec un rendement total de 33 %.

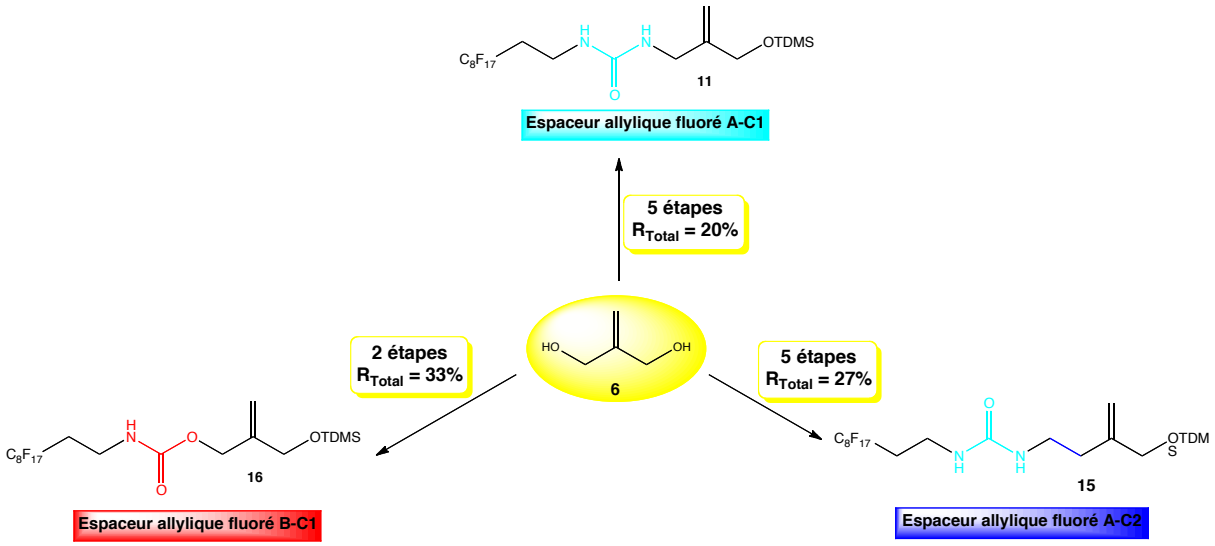


Schéma 29 : *Bilan*

4. Condensation des espaceurs allyliques fluorés avec le tri-O-acétyl-D-glucal

Ces différents éthers silylés allyliques fluorés ont été engagés dans la réaction de condensation avec le tri-O-acétyl-D-glucal **3** afin d'obtenir nos synthons C-glycosidiques de structure **I** qui possèdent sur leur aglycone en position γ une fonction aldéhyde et en position δ une étiquette fluorée (structure **I**).

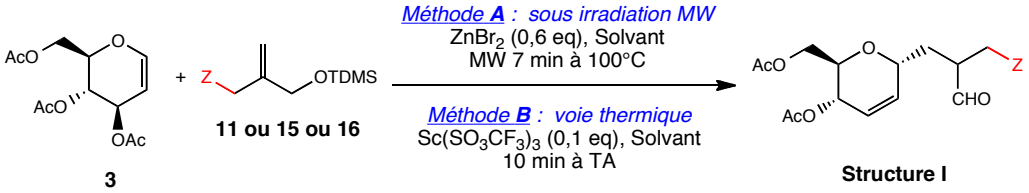


Schéma 30 : *Construction du bloc **I** à partir d'espaceurs allyliques fluorés*

Deux protocoles (Schéma 30) ont été testés pour cette condensation, celui catalysé par du bromure de zinc sous activation micro-onde développé au Schéma 11, et celui catalysé par 10 % de triflate de scandium à température ambiante développé au Schéma 13. Un second paramètre a été testé lors de ces expériences concernant la combinaison d'un solvant fluoré, ici le HFE-7100 avec le 1,2-dichloroéthane mis en jeu lors de la condensation. Les différents résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 9 ci-dessous.

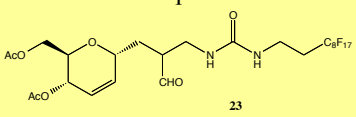
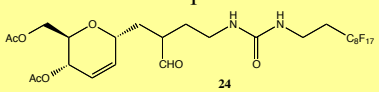
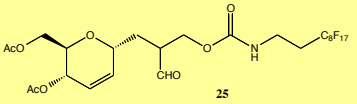
Espaceur allylique fluoré	*Méthode utilisée*	*Solvant(s)*	*Résultats*
11	A	1,2-dichloroéthane	Pas de produit
	A	1,2-dichloroéthane + HFE	Traces du produit **23** 
	B	1,2-dichloroéthane + HFE	Traces du produit **23**
15	A	1,2-dichloroéthane	Pas de produit
	A	1,2-dichloroéthane + HFE	Traces du produit **24** 
	B	1,2-dichloroéthane	Pas de produit
	B	1,2-dichloroéthane + HFE	Traces du produit **24**
16	A	1,2-dichloroéthane	Traces du produit **25** 

Tableau 9 : *Résultats issus de la condensation du Schéma 30*

Le premier résultat issu de ces expériences est qu'il est nécessaire de travailler dans un mélange de solvants organique et fluoré pour observer la formation des C-glycosides fluorés voulus. En effet, les espaceurs allyliques fluorés **11**, **15** et **16** ne sont pas solubles dans le 1,2-dichloroéthane ou très peu solubles. Les C-glycosides fluorés **23**, **24** et **25** ont été obtenus avec les 2 protocoles testés, mais uniquement sous forme de traces dans les 2 cas qui n'ont pas pu être isolés par purification sur cartouche de gel de silice classique ou de silice fluorée. Leur formation a été confirmée par LC-MS : pour le composé **23** avec un pic à 10,5 min de 5 % pureté et de m/z = 789 $[M+H]^+$ et 812 $[M+Na]^+$, pour le composé **24** avec un pic à 10,5 min de 5 % de pureté et de m/z = 803 $[M+H]^+$ et 826 $[M+Na]^+$ et pour le composé **25** avec un pic à 10,5 min de m/z = 813 $[M+Na]^+$. Ces faibles rendements peuvent s'expliquer soit par l'encombrement stérique occasionné par la chaîne fluorée lors de l'attaque S_N2' de l'oléfine sur la carbone anomérique du D-glucal ou lors du réarrangement du carbocation (migration 1,2) conduisant à la formation du carbonyle, soit par la présence de l'étiquette fluorée et dans ce cas tous les réactifs ne sont pas solubles dans la même phase ce qui modifie la réactivité de la réaction. Donc devant le faible succès de cette condensation du glucal peracétylé avec les espaceurs allyliques fluorés, nous avons envisagé une seconde voie de synthèse pour l'obtention de la chimiothèque de C-glycosides fluorés et diversifiés.

IV. Second schéma réactionnel réalisé pour la synthèse de la chimiothèque

Lors de cette seconde stratégie de synthèse (Schéma 31), il a été envisagé de greffer la chaîne lipidique fluorée une fois que le synthon aldo-C-glycoside soit formé. Ce greffage se fera par formation d'une liaison carbamate entre un alcool situé en γ de l'aldéhyde (situé lui-même en γ du carbone anomérique) et l'isocyanate lipidique fluoré. Afin d'opérer toujours suivant la stratégie «*Build-Couple-Pair* » décrite au chapitre 1, nous allons synthétiser un aldo-C-glycoside **IV** portant une fonction alcool protégé sous forme d'éther silylé qui sera considéré comme notre *premier bloc*. Les C-glycosides **IV** seront engagés dans l'étape « *Couple* » par une réaction à 3 composants (couplage A^3 entre un aldéhyde, une amine *(bloc 2*) et un alcyne (*bloc 3*)) qui donnent accès aux composés de structure **V**. La déprotection de l'alcool **V** permettra de greffer la chaîne lipidique fluorée afin de générer notre chimiothèque de petites molécules fluorées. Les produits **VI** ainsi obtenus portent une triple liaison en position ε sur l'aglycone qui peut être engagée dans l'étape « *Pair* » via des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire pour générer des structures hautement diversifiées de type **VII**.

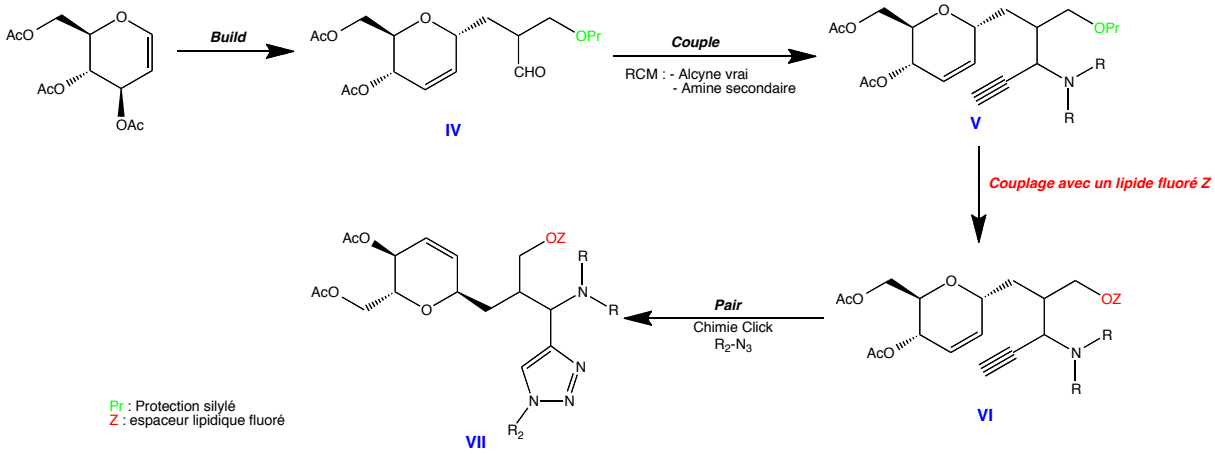


Schéma 31 : *Seconde stratégie « Build/Couple/Pair » envisagée*

A. Synthèse de synthons C-glycosidiques de structure IV

Afin d'obtenir nos synthons C-glycosidiques de structure **IV** qui possèdent sur leur aglycone en position γ une fonction aldéhyde et en position δ un éther silylé, nous nous sommes inspirés de la condensation entre le tri-O-acétyl-D-glucal **3** et des éthers allyliques fluorés développée au Schéma 30. Pour réaliser ce type d'aldo-C-glycoside **IV**, le diol symétrique **6** a été protégé sous forme d'éther silylé puis engagé dans la réaction de condensation avec le D-glucal per-O-acétylé (**3**).

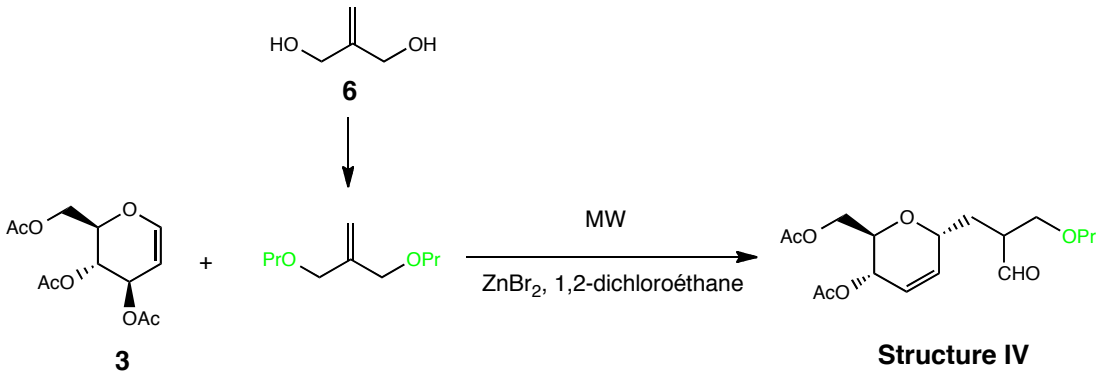


Schéma 32 : *Schéma réactionnel général de formation de la structure **IV***

Le diol symétrique **6** a tout d'abord été protégé par un groupement thexyldiméthylsilyle (TDMS) sous forme d'éther (**26'**) avec un rendement quantitatif puis engagé dans la condensation avec le tri-O-acétyl-D-glucal **3** catalysée par $ZnBr_2$ sous activation micro-onde. L'aldo-C-glycoside **IV** résultant (**27'**) a été obtenu après purification avec un rendement de 62 %. Malheureusement lors de l'étape de déprotection de l'alcool par action des ions F^- sur le groupement thexyldiméthylsilyle, le produit hydroxyle **V'** n'a pas été

obtenu (alcool non déprotégé). Pour remédier à ce problème, nous avons utilisé un groupement silyle plus labile : le tert-butyldiméthylsilyle (TBDMS).

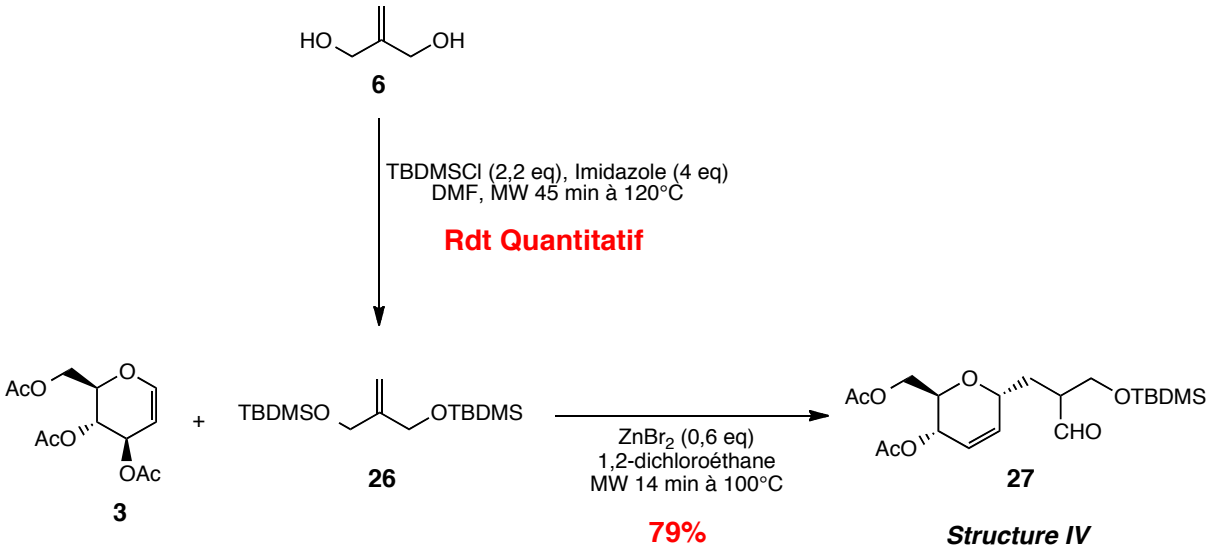


Schéma 33 : *Construction du bloc **IV***

Le 2-méthylène-propane-1,3-diol (**6**) a cette fois-ci été protégé par un groupement tert-butyldiméthylsilyle sous forme d'éther par activation micro-onde avec un rendement quantitatif. La structure a été confirmée par RMN ^{1}H par la disparition du triplet à 4,6 ppm des protons hydroxyles et la transformation du doublet des protons méthyliques en α de l'alcène par un singulet à 4,09 ppm. L'éther allylique **26** réagit ensuite sous activation micro-onde pendant 14 min avec le tri-O-acétyl-D-glucal **3** pour conduire à l'aldo-C-glycoside **27** de structure **IV** avec un rendement de 79 % après purification. L'étude du spectre RMN ^{1}H révèle que l'aldo-C-glycoside **27** est obtenu sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères avec un rapport diastéréoisomérique 3:2. Le proton aldéhydique est mis en évidence par la présence d'un doublet de doublets à 9,75 ppm. Les protons oléfiniques résonnent sous forme d'un multiplet entre 5,77 et 5,86 ppm. L'étude du spectre COSY démontre que les protons méthyliques en α du carbone anomérique sortent sous forme de 2 doublets de doublets de doublets (ddd) pour la conformation S intégrant pour 1,2H (1,65 ppm et 2,12 ppm) et sous forme de 2 multiplets pour la conformation R intégrant pour 0,8H (1,75 ppm et 2,01 ppm).

B. Formation de propargylamine de structure V

La structure **V** est issue de l'étape de couplage de 3 blocs (un aldéhyde de structure **IV**, une amine secondaire, un alcyne vrai) *via* un processus multicomposant qui nous permet d'accéder à des molécules structurellement diverses de type propargylamine. Les réactions à composants multiples sont des réactions convergentes partant d'au moins trois réactifs de départ et permettant d'obtenir en une seule étape des produits divers et complexes.[149] Beaucoup de réactions à composants multiples existent, notamment la réaction à quatre composants d'Ugi[150] conduisant à des α-aminoacylamides, la réaction à trois composants de Passerini conduisant à des α-cétoamides[151] et bien d'autres.[152]

Nous avons choisi d'étudier une réaction à trois composants entre un aldéhyde, un alcyne et une amine pour conduire à une amine propargylique introduisant une triple liaison et créant ainsi de la diversité au niveau de ce bras. Dans ce chapitre, nous préciserons l'intérêt des propargylamines et nous exposerons la voie de synthèse de ces composés **V**.

1. Les propargylamines

a. Intérêt

On désigne par propargylamine tout composé organique contenant une fonction amine en β d'un alcyne. Les propargylamines offrent un potentiel synthétique important grâce à la présence de cinq sites de diversité (de R_1 à R_5) d'une part, et à la triple liaison d'autre part, qui pourra être exploitée dans des processus de cycloadditions ou encore des réactions en cascade pour la préparation de produits biologiquement actifs tels des β-lactames, des peptides, des analogues des produits naturels ou encore des produits à usage thérapeutique.[153]

---

[149] A. Dömling, Recent advances in isocyanide-based multicomponent chemistry, *Curr. Opin. Chem. Biol.,* **2002,** *6*, 306-313

[150] I. Ugi, C. Steinbrückner, Isonitrile 2 : reaktionen von isonitrilen mit carbonylverbindungen, aminen und stickstoffwasserstoffsäure, *Chem. Ber.,* **1961,** *39*, 3168-3210

[151] L. Banfi, G. Guanti, R. Riva, Passerini multicomponent reaction of protected a-aminoaldehydes as tool for combinatorial synthesis of enzyme inhibitors, *Chem. Commun.,* **2000,** 985-986

[152] A. Dömling, I. Ugi, Multicomponent reactions with isocyanides, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2000,** *39*, 3168-3210

[153] (a) G. S. Kauffman, G. D. Harris, R. L. Dorow, B. R. P. Stone, R. L. Parsons, J. A. Pesti, N. A. Magnus, P. N. Confalone, W. A. Nugent, An Efficient Chiral Moderator Prepared from Inexpensive (+)-3-Carene: Synthesis of the HIV-1 Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor DPC 963**,** *Org. Lett.,* **2000**, *2*, 3119-3121 (b) M. A. Huffman, N. Yasuda, A. E. De Camp, E. J. Grabowski, Lithium Alkoxides of Cinchona Alkaloids as Chiral Controllers for Enantioselective Acetylide Addition to Cyclick N-Acyl Ketimines**,** *J. Org. Chem*., **1995**, *60*, 1590-1594 (c) B. Nilsson, H. M. Vargas, B. Ringdahl, U. Hacksell, Phenyl-substituted analogues of oxotremorine as muscarinic antagonists.,*J. Med. Chem.,* **1992**, *35*, 285-294 (d) K. Hattoi, M. Miyata, H. Yamato, Highly selective and operationally simple synthesis of enantiomerically pure .beta.-amino esters via

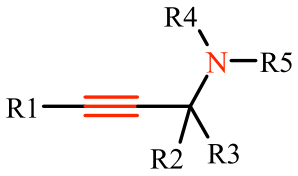


Figure 57 : *Structure d'une propargylamine*

La structure des propargylamines est présente dans divers systèmes biologiques tels que l'oxotrémorine,[154] ou la dynémicine, appartenant à la famille des enediynes macrocycliques, qui présente un caractère anticancéreux.[155] Cette structure est présente également dans certains antidépresseurs à action inhibitrice de la monoamine oxydase comme le L-deprenyl, la clorgyline et le ladostigil.[156] Un anti-VIH, inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse virale,[157] comporte un motif propargylamine (Figure 58).

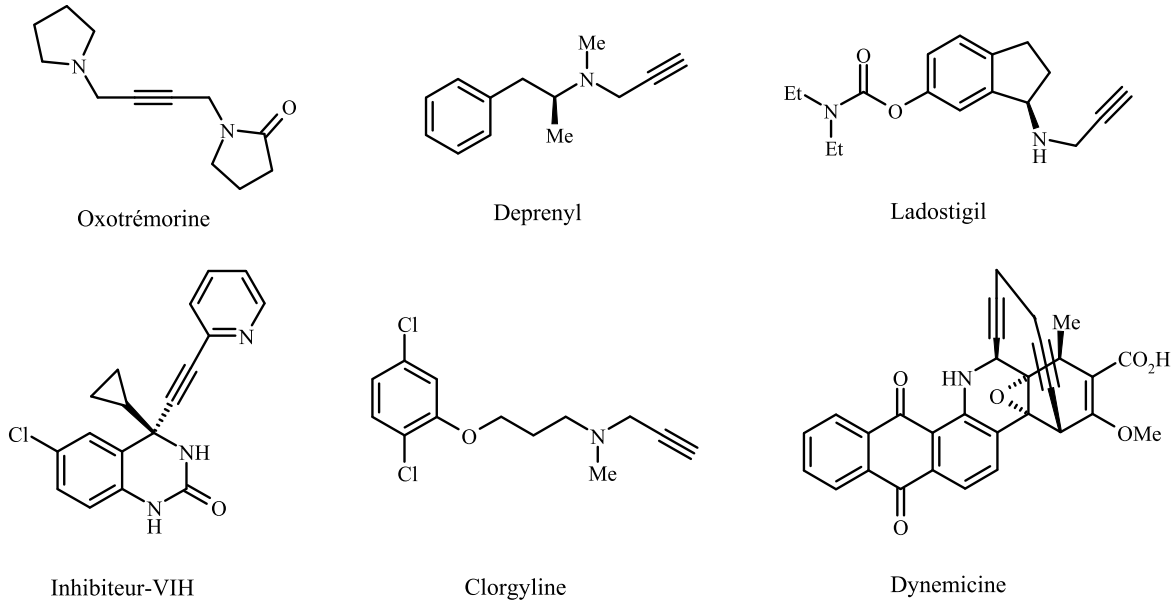


Figure 58 : *Exemples de biomolécules à motif propargylamine*

double stereodifferentiation**,** *J. Am. Chem. Soc.,* **1993**, *115*, 1151-1152 (e) G. Dyker, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 1698

[154] Agoniste des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine à utilisation uniquement expérimentale. Elle provoque par action centrale des effets semblables aux symptômes de la maladie de Parkinson (tremblements, ataxie et spasticité).

[155] M. Konishi , H. Ohkuwa , T. Tsuno , T. Oki**,** Crystal and molecular structure of dynemicin A: a novel 1,5-diyn-3-ene antitumor antibiotic**,** *J. Am. Chem. Soc*., **1990**, *112*, 3715-3716

[156] Y. Herzig , L. Lerman , W. Goldenberg , D. Lerner , H. E. Gottlieb , A. Nudelman, Hydroxy-1-aminoindans and derivatives: preparation, stability, and reactivity**,** *J. Org. Chem.,* **2006**, *71*, 4130-4140

[157] T. J. Tucker, T. A. Lyle, C.M. Wiscount, S. F. Britcher, S. D. Young, W. M. Sanders, W. C. Lumma, M. F. Goldman, G. A. O'Brien, R. G. Ball, C. F. Homnick, W. A. Schleif, E. A. Emini, J. R. Huff, P. S. Anderson, Synthesis of a Series of 4-(Arylethynyl)-6-chloro-4-cyclopropyl-3,4-dihydroquinazolin-2(1H)-ones as Novel Non-nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors**,** *J. Med. Chem*., **1994**, *3* , 2437-2444

b. Méthodes de synthèse

Peu de méthodes de synthèse de propargylamines ont été reportées dans la littérature. Les réactions classiques de synthèse de telles structures sont basées sur l'amination d'halogénures de phosphates ou de triphtalates propargyliques.[158] Cependant, ces procédés font appel à des quantités stœchiométriques de catalyseurs organométalliques tels que les organolithiens ou les réactifs de Grignard qui sont fortement sensibles à l'humidité et exigent des conditions strictement contrôlées.

Récemment, plusieurs équipes ont décrit des synthèses de propargylamines par la réaction d'un aldéhyde avec une amine secondaire et un alcyne vrai (Schéma 34).[159] Cette réaction à trois composants (réaction A^3) est réalisée en présence de catalyseurs métalliques. Elle fait intervenir l'addition d'un alkynylmétal sur l'imine intermédiaire produite par la réaction de l'amine avec l'aldéhyde.

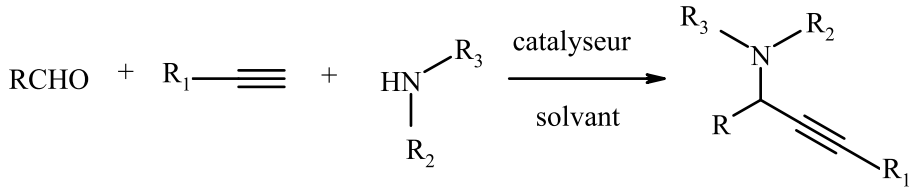


Schéma 34 : *Synthèse de propargylamines via une réaction A^3*

L'avantage de ce procédé de synthèse réside dans l'utilisation de quantités catalytiques de métaux d'une part (moins de déchets, avantage écologique) et d'autre part ne nécessite pas l'isolation de l'imine qui présente un problème inhérent pour le chimiste. De nombreux catalyseurs métalliques ont été utilisés pour cette synthèse (Tableau 10).

[158] (a) I. E. Kopka, Z. A. Fataftah, M. W. Rathke, Preparation of a series of highly hinderered secondary amines, including bis(triethyl-carbinyl)amine, *J. Org. Chem.,* **1980**, *45*, 4616. (b) Y. Imada, M. Yuassa, I. Nakamura, S. I. Murahashi, Copper(I)-Catalyzed Amination of Propargyl Esters. Selective Synthesis of Propargylamines, 1-Alken-3-ylamines, and (Z)-Allylamines**,** *J. Org. Chem.,* **1994**, *59*, 2282-2284 (c) S. Czernecki, J. M. Valery, **A** Stereocontrolled Synthesis of a Lincosamine Precursor**,** *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, *9*, 767-770

[159] (a) C. J. Li, C. Wei, Highly efficient Grignard-type imine additions *via* C–H activation in water and under solvent-free condition, *Chem. Commun.* **2002**, 268. (b) J. J. McNally, M. A. Youngman, S. L. Dax, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 967. (c) J. Zhang, C. Wei, C. J. Li, Cu(I)Br mediated coupling of alkynes with *N*-acylimine and *N*-acyliminium ions in water, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 5731-5733

RCHO	*R^2R^3NH*	*R^1* ≡	*Catalyseur*	*Rendement*	*Référence*
Aryle, alkyle	- Pipéridine - Benzyle, allyle	Phényle, Silyle	$AuBr_3$	53-99 %	*161*
Aryle, alkyle	Amine cyclique	Aryle	AgI	47-95 %	*162*
Aryle, t-butyle	Amine aromatique	Phényle	$RuCl_3$ CuBr	64-96 %	*159a*
Aryle, alkyle, hétéroaryle	Benzyle, Allyle	Aryle, alkyle, Silyle	CuBr (R)-quinap	43-99 % ee = 32-96 %	*163*
Aryle, alkyle	R^2 = Aryle + R^3 = H	Silyle	$[IrCl(COD)]_2$	69-85 %	*160*

Tableau 10 : *Addition d'alkynylmétaux sur des imines*

Carreira et Fischer ont démontré la préparation de propargylamine par réaction d'aldimines avec le triméthylsilylacétylène moyennant l'utilisation d'iridium.[160] Li et ses collaborateurs ont utilisé l'or,[161] l'argent,[162] le ruthénium et le cuivre[163] pour la synthèse de propargylamines. Knochel et ses collaborateurs ont publié une synthèse d'alkynylamines énantiosélectives en employant un complexe de cuivre et du (R)-quinap. Ils ont obtenu de bons rendements et une bonne énantioséléctivité (plus que 96 % ee).[163] Le formaldéhyde a aussi été utilisé pour la synthèse de propargylamines non substituées.[164] Des synthèses en phase solide ont aussi été développées.[165]

Les aldéhydes aliphatiques et aromatiques sont de bons partenaires pour ce couplage. Aucune réaction avec les cétones n'a été citée dans la littérature. L'encombrement stérique ou la moindre réactivité peuvent être la cause de l'échec de la réaction.

Ces synthèses d'amines propargyliques peuvent avoir lieu dans des solvants organiques polaires tels que le dichlorométhane ou l'eau (l'utilisation de solvants aprotiques tel que le DMF ou le DMSO est moins courante mais possible) ou encore dans les solvants

[160] C. Fischer, E. M. Carreira, Direct Addition of TMS-acetylene to Aldimines Catalyzed by a Simple, Commercially Available Complex. *Org. Lett.,* **2001**, *3*, 4319

[161] C. Wei, C.-J. Li, A Highly Efficient Three-Component Coupling of Aldehyde, Alkyne, and Amines via C-H Activation Catalyzed by Gold in Wate, *J. Am. Chem. Soc*., **2003**, *125*, 9584-9585

[162] C. Wei, Z. Li, C.-J. Li, *Org. Lett.*, The first silver-catalyzed three-component coupling of aldehyde, alkyne, and amine, **2003**, *5*, 4473

[163] N. Gommermann, C. Koradin, K. Polborn, P. Knochel, Enantionselective, Copper (I)-catalysed three component reaction for the preparation of propargylamines, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2003**, *42*, 5763

[164] (a) G. W. Kabalka, L. Wang, R. M. A Microwave-Enhanced Solventless Mannich Condensation on CuI-Doped Alumina, **2001**, 676. (b) S. L. Dax, S. C. Cook, Cyclick urea HIV protease inhibitors containing alkynyl- and alkenyl-tethered heterocycles in the P2 region**,** *Bioorg. Med. Chem.Lett.,* **1996**, *6*, 797

[165] (a) J. J. McNally, M. A. Youngman, S. L. Dax, Mannich reactions of resin-bound substrates: 2. A versatile three-component solid-phase organic synthesis methodology**,** *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 967. (b) A. B. Dyatkin, R. A. Rivero, The solid phase synthesis of complex propargylamines using the combination of sonogashira and mannich reactions, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3647-3650

apolaires tels que le toluène. Notons aussi que des synthèses de propargylamines *via* des réactions de couplage A^3 sans solvant ont été reportées dans la littérature.[165, 166]

c. Mécanisme

Le mécanisme généralement proposé met en jeu la formation d'un intermédiaire iminium par réaction de l'amine sur le carbonyle de l'aldéhyde. La condensation de l'iminium avec l'alcyne conduit au produit final. L'addition d'un catalyseur métallique est nécessaire pour la formation d'un complexe π entre le métal et la triple liaison afin d'activer l'alcyne et le déprotoner plus facilement.[167]

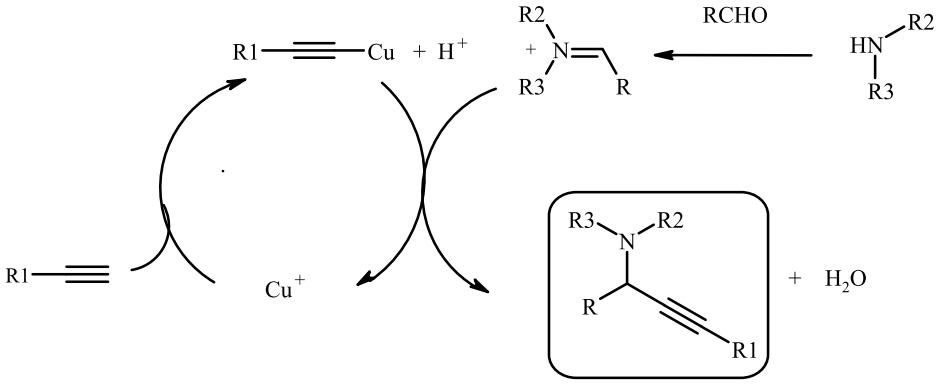


Schéma 35 : *Mécanisme de synthèse catalysée par Cu(I)*

d. Synthèse de propargylamines sous irradiations micro-ondes

Un des plus grands avantages de l'utilisation des irradiations micro-ondes est la réduction considérable du temps de réaction : passant de quelques jours ou heures à quelques minutes ou secondes.[168] De plus, beaucoup de réactions de chimie organique sont faites sous irradiations micro-ondes telles que les réactions de couplage en présence de métaux de transition (Heck, Suzuki, …), la synthèse d'hétérocycle ou encore des cycloaddition de Diels-Alder.[169,170] Les synthèses assistées par micro-ondes sont plus rapides et plus reproductibles

[166] Y. Ju, C. J. Li, R. S. Varma, Microwave-Assisted Cu(I)Catalyzed Solvent-free Three Component Coupling of Aldehyde, Alkyne and Amine**,** *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 891

[167] F. Bohlmann, H. Schoenowsky, E. Inhoffen, G. Grau, Polyacetylenverbindungen, LII. Über den Mechanismus der oxydativen Dimerisierung von Acetylenverbindungen, *Chem. Ber.,* **1964**, *97*, 794

[168] C.O. Kappe,Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry, *Chem. Soc. Rev.,* **2008,** *37,* 1127-1139

[169] D. Dallinger, C.O. Kappe,Microwave-assisted synthesis in water as solvent, *Chem. Rev.,* **2007,** *107,* 2563-2591

[170] A. R. Katritzky, S. K. Singh, Microwave-assisted heterocyclick synthesis**,** *ARKIVOC* **2003**, *13*, 68-86

que celles réalisées par chauffage conventionnel. De plus, elles offrent la simplicité de manipulation et de traitement[171] ainsi qu'une pollution moindre.

D'après Fan et *al*.,[172] l'utilisation des micro-ondes permet plus facilement et plus rapidement l'accès aux composés de la réaction à trois composants. Les micro-ondes vont alors activer la liaison C-H de l'alcyne vrai (Schéma 36). Elles favorisent la formation de l'ion iminium afin que ce dernier puisse réagir avec le complexe Cu-Alcyne pour donner le produit de couplage.

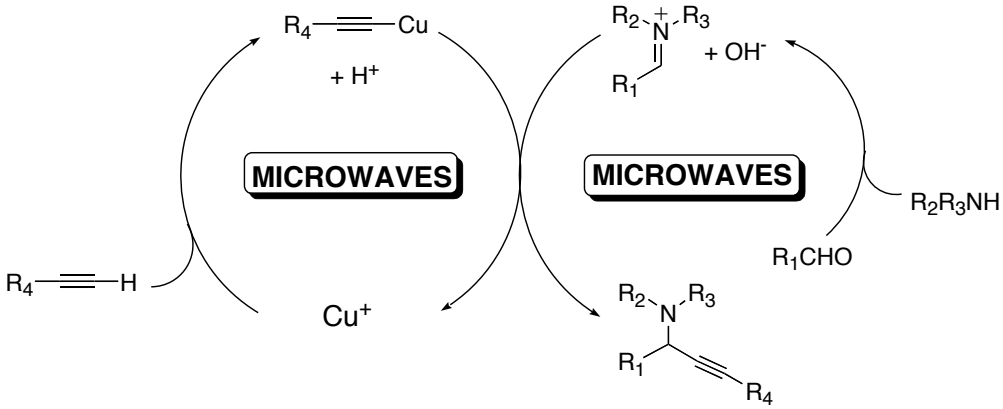


Schéma 36 : *Réaction à 3 composants par activation de la liaison C-H par micro-ondes*

Ju[166] et ses collaborateurs ont rapporté une synthèse A^3 de propargylamine assistée par les micro-ondes avec une puissance d'irradiation de 600 W. Ils ont été en mesure de synthétiser une bibliothèque de 22 composés, en utilisant une variété d'aldéhydes et d'amines aryle, hétéroaryle et alkyle. Les intermédiaires alcynes sont le phénylacétylène et le TMS-acétylène.

2. Étape de couplage par l'intermédiaire d'une réaction A^3

La facilité de la procédure A^3, la compatibilité avec les différents groupes fonctionnels, la disponibilité commerciale des réactifs, les conditions sans solvant, les temps de réaction courts et les excellents rendements, ont fait de cette synthèse une procédure facile pour la préparation des librairies combinatoires de propargylamines. D'autre part, ces réactions à composants multiples souvent utilisées dans les stratégies « *Build/Couple/Pair* » décrites au premier chapitre, nous ont incité à poursuivre cet axe de recherche pour l'élaboration d'une chimiothèque de propargylamines à unité C-glycosidique. Pour réaliser

[171] K. Tanaka, F. Toda, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1025

[172] Shi L., Tu Y.-Q., Wang M., Zhang F.-M, Fan C.-A., Microwaves-promoted three-component coupling of aldehyde, alkyne, and amine via C-H activation catalyzed by copper in water, *Org. Lett.,* **2004,** *6,* 1001-1003

cette étude, nous venons de voir la préparation du synthon C-glycosidique (structure **IV**) portant sur son aglycone une fonction aldéhyde afin de l'engager dans le processus A^3. Une fois la propargylamine formée (Figure 59), le but sera, par la suite, de profiter des sites d'ancrage disponibles pour une fonctionnalisation ultérieure en utilisant par exemple la chimie « click ». C'est pourquoi nous utilisons comme alcyne vrai lors de cette réaction à 3 composants, le TMS-acétylène, dont le groupement silyle est facilement clivable après le couplage A^3.

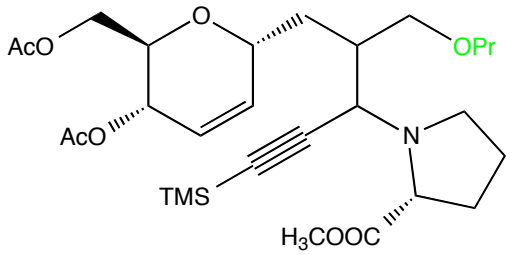


Figure 59 : *Structure de la propargylamine visée*

En ce qui concerne l'amine secondaire, nous avons opté pour un chlorhydrate d'ester méthylique de la L-proline[173]. En effet, les acides aminés, composés bifonctionnels, sont des intermédiaires intéressants dans la mesure où les produits obtenus par le couplage A^3 offrent la possibilité d'introduire de la diversité. La proline est une molécule chirale abondante, peu couteuse et disponible sous ses deux formes énantiomériques. De plus, elle possède une amine secondaire cyclique dont la valeur du pK_A est élevée (10,6) par rapport aux acides aminés primaires (9 à 9,8). Sa plus grande qualité réside dans sa capacité à effectuer l'aminocatalyse qui est une catalyse de type base de Lewis. La réactivité nucléophile de la proline est surtout due à la partie pyrrolidine qui forme très facilement des ions iminiums et des énamines avec des composés carbonylés plus aisément que la plupart des autres amines, même celles qui sont cycliques telle que la pipéridine.[174]

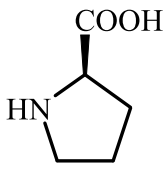


Figure 60 *: Structure de la L-proline*

[173] (a) P. I. Dalko, L. Moisan, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2001**, *40*, 3726. (b) P. I. Dalko, L. Moisan, *Angew. Chem. Int. Ed*., **2004**, *40*, 5138. (b) A. Cordova, S. Watanabe, F. Tanaka, W. Notz, C. F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 1866. (c) W. Notz, F. Tanaka, C. F. Barbas, *Acc. Chem. Res*., **2004,** *37*, 580

[174] P. W. Hickmott, Enamines: recent advances in synthetic, spectroscopic, mechanistic, and stereochemical aspects-I *, Tetrahedron*, **1982**, 38, 1975-2050

L'optimisation de cette réaction A^3 avec la L-proline a été réalisée par une doctorante[135] du laboratoire avec comme précurseur l'aldo-C-glycoside **4** et le TMS-acétylène.

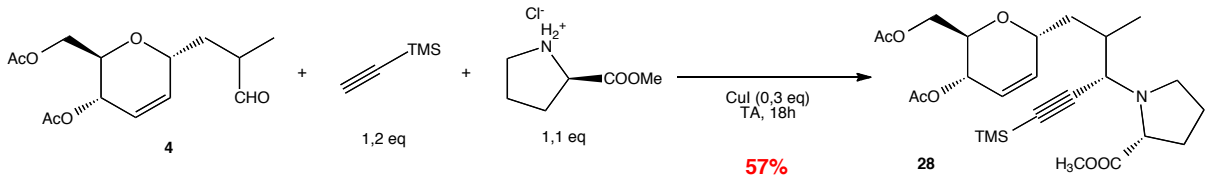


Schéma 37 : *Couplage A^3 moyennant la L-proline*

Les premiers essais de couplage ont été réalisés sous activation micro-ondes selon la méthode de Ju[166] qui consiste à réaliser 6 cycles d'irradiation de 15 s et de refroidissement de 1 min à une puissance de 300 W et en utilisant 30 % d'iodure de cuivre comme catalyseur. Cependant, à une puissance de 300 W, la température dépasse 105°C et le milieu réactionnel est carbonisé. Il a été réalisé plusieurs essais d'irradiations au micro-onde avec une puissance inférieure à 300 W mais la formation de la propargylamine correspondante n'a jamais été observée. C'est pourquoi cette réaction a été réalisée à température ordinaire. Au bout de 18 heures, la conversion est totale et la propargylamine **28** a été isolée avec un rendement de 57 %.

D'après la littérature, la L-proline favorise une attaque Si-faciale de l'iminium (la face Re est encombrée dans notre cas par l'acide protégé).[119b] Lors de l'optimisation de cette réaction par notre doctorante, elle a pu montrer que l'état de transition préféré est celui où le groupement ester de la proline serait en anti par rapport à la nouvelle liaison C-C qui se forme et que le nouveau carbone asymétrique formé admet la configuration S.

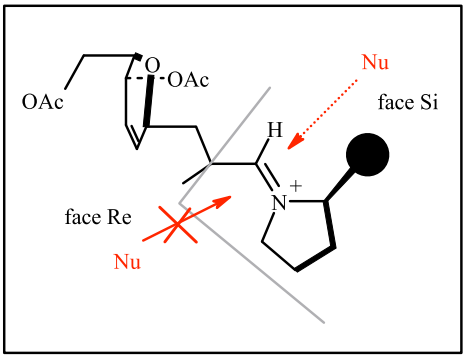


Figure 61 : *Régiosélectivité de la réaction A^3 dans le cas de la L-proline*

Cette hypothèse a été prouvée par les résultats RMN ^{1}H du composé **28**. En effet, le proton H-3'' sort vers 3,33 ppm sous forme d'un doublet (superposition des 2 doublets

obtenus entre le proton H-3'' et les H-4'' S et R). On note également que le méthyle sur C-4'' résonne sous forme de deux doublets vers 1,1 ppm.

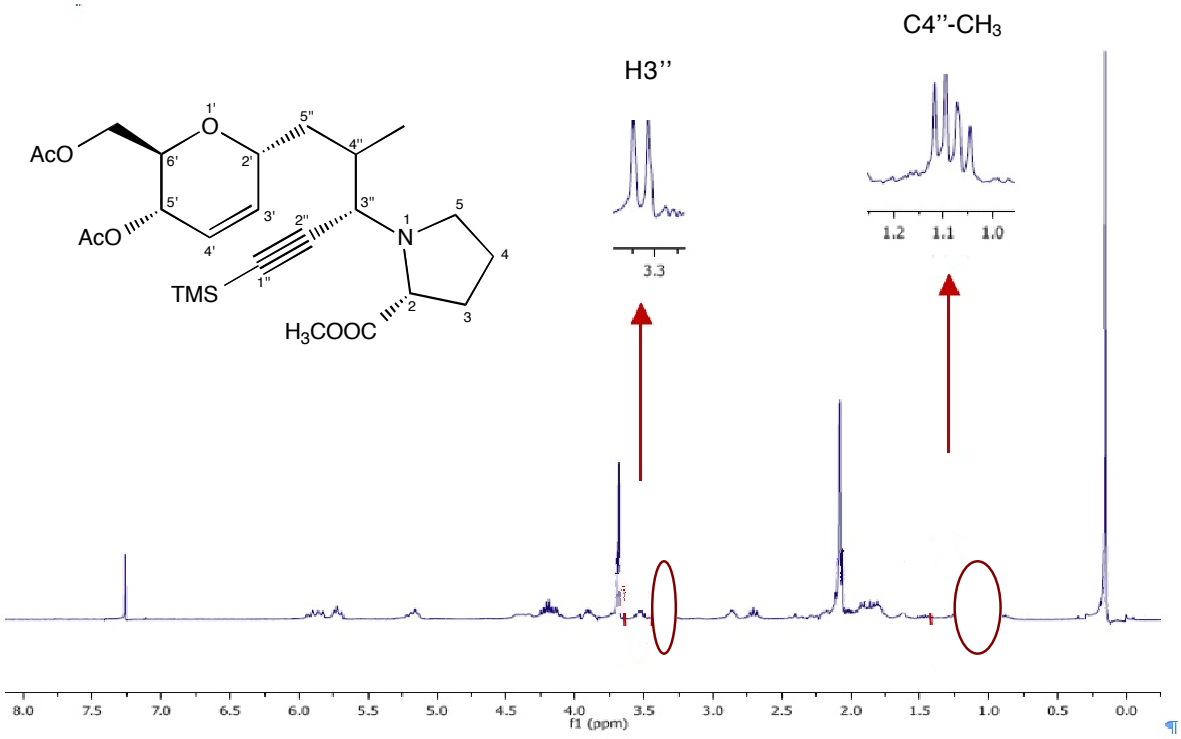


Figure 62 : *Spectre RMN ^{1}H de la propargylamine **28***

Ce protocole optimisé permettant d'obtenir une version asymétrique de la réaction A^3 a donc été employé pour former la propargylamine **V** à partir de l'aldo-C-glycoside **27** (Schéma 38).

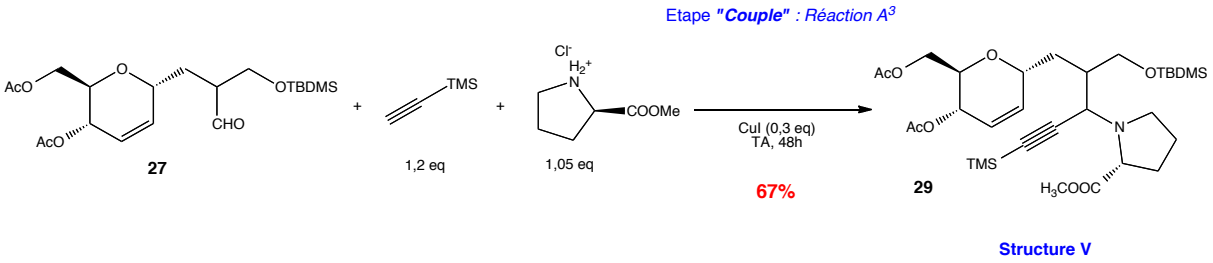


Schéma 38 : *Couplage A^3 avec la structure **27***

La structure propargylamine **29** a été obtenue avec un rendement de 67 % après purification sur cartouche de gel de silice. Sa structure a été confirmée par LC-MS avec la formation d'un pic à 10 min de m/z = 624 $[M+H]^+$ et 646 $[M+Na]^+$ et déterminée sur le spectre RMN ^{1}H par la disparition du proton aldéhydique à 9,75 ppm et l'apparition du proton en α de l'alcyne sous forme de multiplet à 3,57 ppm. Ce dernier signal et celui du méthyle en α de l'alcool protégé (3,76 ppm) sortent sous forme de multiplet et non plus sous forme de doublets comme nous l'avons vu pour la propargylamine **28**. Donc cette réaction avec l'aldo-

C-glycoside **27** conduit à un mélange d'isomères et la L-proline n'a pas joué sur la stéréosélectivité de la réaction.

C. Greffage d'étiquette fluorée sur la structure V

L'étape suivante est la déprotection de l'alcool sur la structure propargylamine **V** pour permettre le greffage la chaîne lipidique fluorée afin de générer notre chimiothèque de petites molécules fluorées.

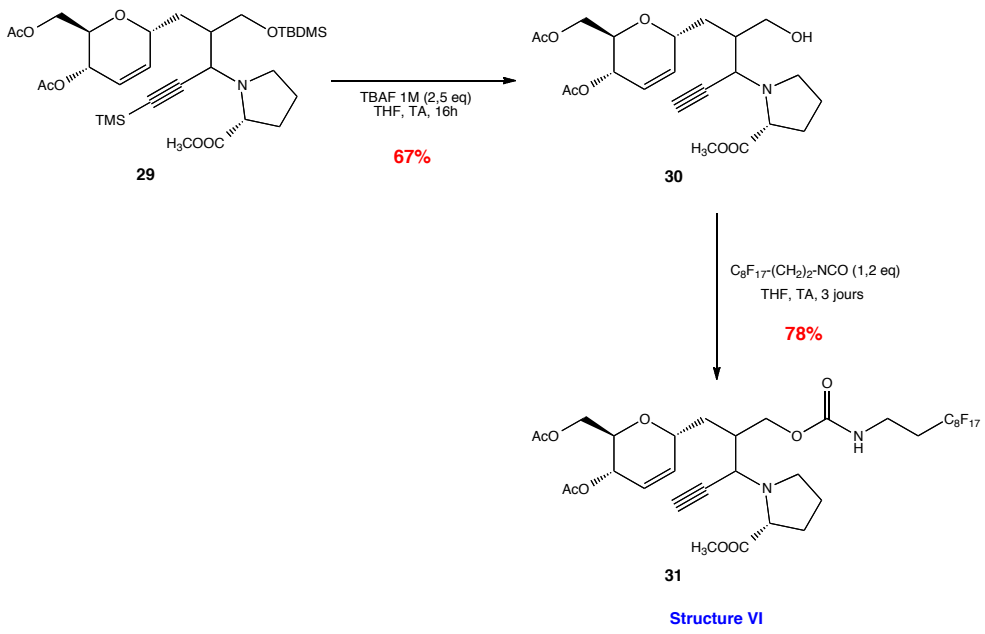


Schéma 39 : *Synthèse de la propargylamine fluorée **31** de structure **VI***

L'alcool **29** protégé sous forme d'éther silylé est déprotégé en présence de fluorure de tétrabutylammonium (Schéma 39). Cette étape nous permet d'obtenir en même temps l'alcyne terminal par la coupure du groupement triméthylsilyle. Ainsi, nous avons obtenu le composé **30** avec un rendement de 67 % après purification. Cette structure a été déterminée par RMN ^{1}H avec la disparition des protons méthyliques du groupement TMS à 0,03 ppm et ceux du groupement TBDMS à 0,14 ppm et l'apparition du proton alcynique sous forme de singulet à 2,33 ppm. Le spectre RMN ^{13}C nous permet de visualiser le déblindage du carbone alcynique vrai qui passe de 70 ppm à 80 ppm sur la structure déprotégée.

L'alcool **30** est couplé avec un isocyanate lipidique fluoré pendant 2 jours pour former le composé **31** avec un rendement de 78 % après purification. Ce résultat a été confirmé par LC-MS avec la formation d'un pic à 11,1 min de m/z = 928 $[M+H]^{+}$. Le spectre RMN ^{1}H nous permet de déterminer la structure du composé et surtout la formation de la liaison

carbamate avec un déplacement chimique des protons méthyliques en α du carbamate de 3,7 ppm à 4,1 ppm et l'apparition de deux multiplets à 2,25 ppm et 1,72 ppm intégrant chacun pour 2 protons correspondant aux groupements méthyle en α et en β de la chaîne lipidique fluorée.

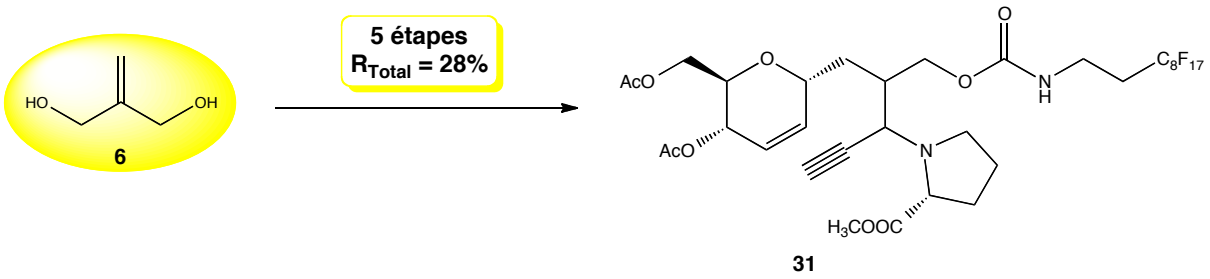


Schéma 40 : *Bilan de la synthèse de la structure **VI***

À l'issue de l'étape de « *couple* » dans notre stratégie de SOD, la structure **VI** a été obtenue en 5 étapes avec un rendement total de 28 % fournissant ainsi une structure tridimensionnelle globulaire pour l'élaboration de notre chimiothèque qui se rapprochera ainsi de la structure des produits naturels.

D. Diversification des structures VI par Chimie Click

La préparation de la propargylamine **31** fournit une base pour la préparation de C-glycoside complexe. Ainsi, nous pouvons augmenter la diversité structurelle de notre librairie en faisant réagir une banque d'azotures sur l'alcyne terminal de la structure **31** par chimie click.

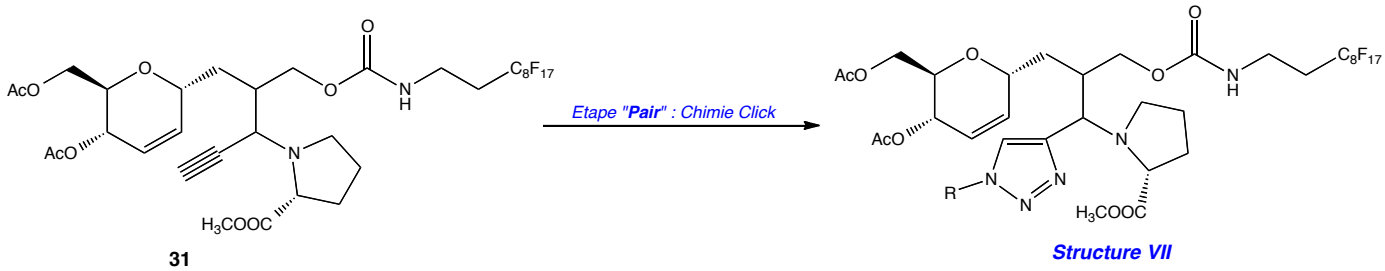


Schéma 41 : *Préparation des C-glycosides complexes*

1. Chimie click

a. Concept de Chimie click

La chimie click est une méthodologie développée par Sharpless[175] pour accéder rapidement à une grande diversité de composés. Cette chimie est ainsi qualifiée en référence aux jeux de construction où des pièces simples s'emboîtent les unes sur les autres, donnant accès à une large gamme de structures (Figure 63).

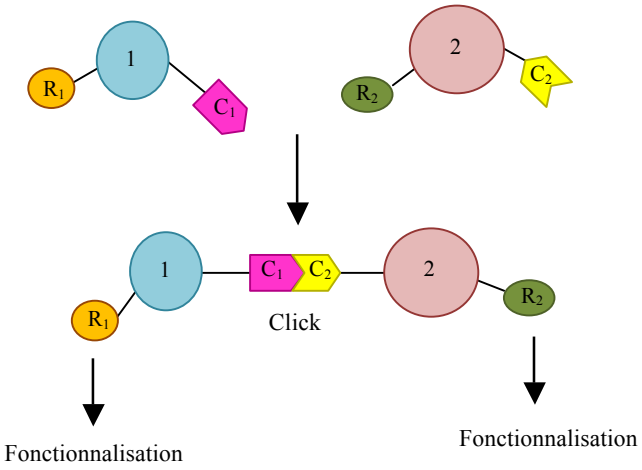


Figure 63 : *Principe de la chimie « Click »* [176]

On regroupe sous le terme de « chimie click » des réactions permettant de produire rapidement et irréversiblement des molécules, en joignant des petites unités élémentaires. On assiste généralement à la formation de liaisons hétéroatomiques (C-X-C) ou des liaisons carbone-carbone (C-C) entre ces unités. Ces réactions répondent également à un certain nombre de critères : elles doivent avoir de hauts rendements, doivent être insensibles à l'eau et l'oxygène, compatibles avec les conditions biologiques et doivent avoir des modes opératoires simples.[177]

b. Cycloaddition 1,3-dipolaire d'Huisgen

Les cycloadditions sont des réactions largement étudiées en chimie click. La cycloaddition 1,3-dipolaire est une méthode de choix pour obtenir de manière rapide,

[175] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, The growing impact of click chemistry in drug discovery, *Drug Discov. Today*, **2003**, *8*, 1128
[176] H. Nandiva, X. Jiang, J. Lahann, Click Chemistry: Versatility and control in the hands of materials scientists, *Advanced Materials*, **2007**, *19*, 2197
[177] P. Wu, A. K. Feldmann, C. J. Hawkew, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. Frecher, K. B. Sharpless,V. V. Fokin, Efficiency and fidelity in a click-chemistry route to triazole dendrimers by the copper(I)-catalyzed ligation of azides and alkynes, *Angew Chem Int Ed.,***2004**, *43,* 3928-3932.

reproductible et quantitative une grande variété d'hétérocycles à cinq membres.[178] Les molécules aptes à effectuer une cycloaddition 1,3-dipolaire sont les dipôles 1-3 possédant 4 électrons π répartis sur 3 atomes adjacents, elles sont isoélectroniques de l'anion allyle (Figure 64).

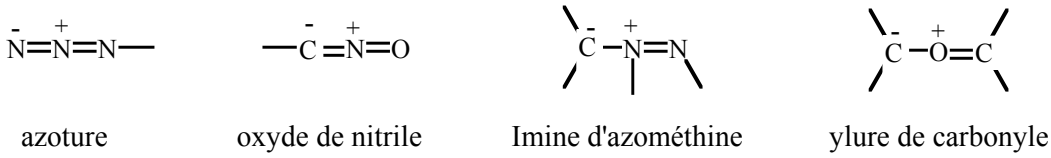


Figure 64 : *Exemples de molécules aptes à la cycloaddition 1,3-dipolaire*

La plus connue des réactions de cycloadditions 1,3-dipolaires est celle d'Huisgen[179] qui permet de lier deux réactifs insaturés : un alcyne terminal et un azoture, pour générer des triazoles. Toutefois, cette réaction nécessite de hautes températures et des temps de réaction prolongés. Elle conduit invariablement à des mélanges de régioisomères disubstitués 1,4 et 1,5 dans le cas d'un alcyne non symétrique (Schéma 42).[180]

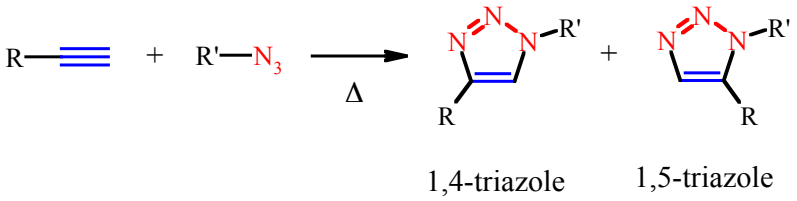


Schéma 42 : *Cycloaddition d'Huisgen*

La mise en évidence en 2002 des propriétés catalytiques au cuivre (I) par les groupes de Sharpless[181] et de Meldal[182] a amélioré de façon spectaculaire la régiosélectivité et la cinétique de cette réaction. En présence de ces catalyseurs, la cycloaddition conduit exclusivement à des triazoles l,4-disubstitués (Schéma 43).[183] De plus, la grande tolérance de

[178] (a) A. Padwa, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, *Wiley, New York*. **1984**. (b) D. P. Curran, Stereochemical and Synthetic Studies of the Intramolecular Diels- Alder Reaction, *Ed. Advances in Cycloaddition*, **1990**, 2. (c) A. Padwa, I. M. Fleming, B. Trost, Intermolecular 1,3-Dipolar Cycloadditions, *Comprehensive Organic Synthesis*, **1991**, *4*, 1069

[179] R. Huisgen, Kinetics and reaction mechanisms: selected examples from the experience of forty year**,** *Pure Appl. Chem.,* **1989,** *61*, 613

[180] R. Huisgen, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry,* Wiley, New York, **1984**,1, 1

[181] V. Rostovtsev, G. Green, V. Fokin, B. Sharpless, A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes**,** *Angew. Chem., lnt. Ed.,* **2002,** *41*, 2596.

[182] W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,30-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides, *J. Org. Chem.,* **2002,** *67*, 3057.

[183] P. Wu, V. V. Fokin, Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications, *Aldrichim. Acta*., **2007**, *40*, 7

cette réaction aux conditions réactionnelles et ses rendements quasi quantitatifs ont conduit à des applications dans tous les domaines allant de la biologie jusqu'au domaine des matériaux.

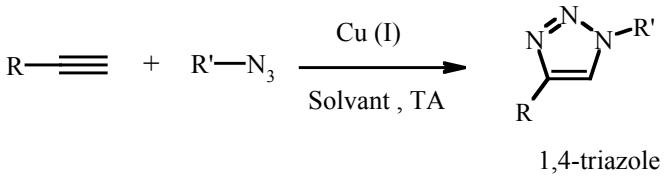


Schéma 43 : *Cycloaddition sélective catalysée au Cu(I)*

c. Mécanisme

C'est la polarisation de la triple liaison terminale par la formation d'un acétylénure et la liaison covalente au Cu(I) qui catalyse la cycloaddition (Schéma 44). Cette insertion est facilitée en présence de base (comme lors d'un couplage de type Sonogashira).

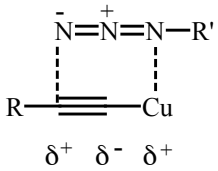


Schéma 44 : *Activation de la triple liaison par le cuivre*

En 2005, l'équipe de Sharpless publia une proposition du mécanisme réactionnel de la réaction.[184] Le cycle catalytique (Schéma 45) débute par la formation d'un acétylénure de cuivre (étape **A**). Celui-ci prendrait place via l'activation de l'alcyne terminal par le cuivre (l) sous forme d'un complexe-π. Cette formation induirait une chute du pK_A d'environ dix unités. Elle permettrait une déprotonation par une base faible du milieu, telle qu'une molécule d'eau. Le postulat d'une cycloaddition 1,3-dipolaire directe entre cet intermédiaire et un dérivé azoture a été rejeté à cause de la barrière d'énergie potentielle élevée (99 kJ/mol). Ce serait au travers d'une coordination avec l'acétylénure de cuivre que l'azoture serait activé (étape **B**), permettant une cyclisation subséquente afin de former un métallocycle à six membres (étape **C**). Cette étape déterminante nécessiterait un investissement de 78 kJ/mol, ce qui est considérablement plus faible que la barrière énergétique de la réaction non catalysée (109 kJ/mol), expliquant l'énorme gain que confère l'utilisation du cuivre sur la cinétique de la réaction. D'autre part, la complexation du dérivé azoture et du cuivre ne se ferait seulement qu'à l'aide de l'atome d'azote proximal au carbone, étant le plus riche électroniquement, ce qui

[184] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. Rostovtsev, L. Noodleman, B. Sharpless, V. Fokin, Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates, J. *Am. Chem. Soc.,* **2005**, *127*, 210

permet de rationaliser la régiosélectivité de la réaction. Un réarrangement 1,2 s'en suivrait (étape **D**), conduisant à un intermédiaire cyclique à cinq membres doué d'un caractère aromatique, suivi d'une protéolyse (étape **E**), régénérant le cuivre au degré d'oxydation I et libérant l'hétérocycle formé dans le milieu réactionnel.

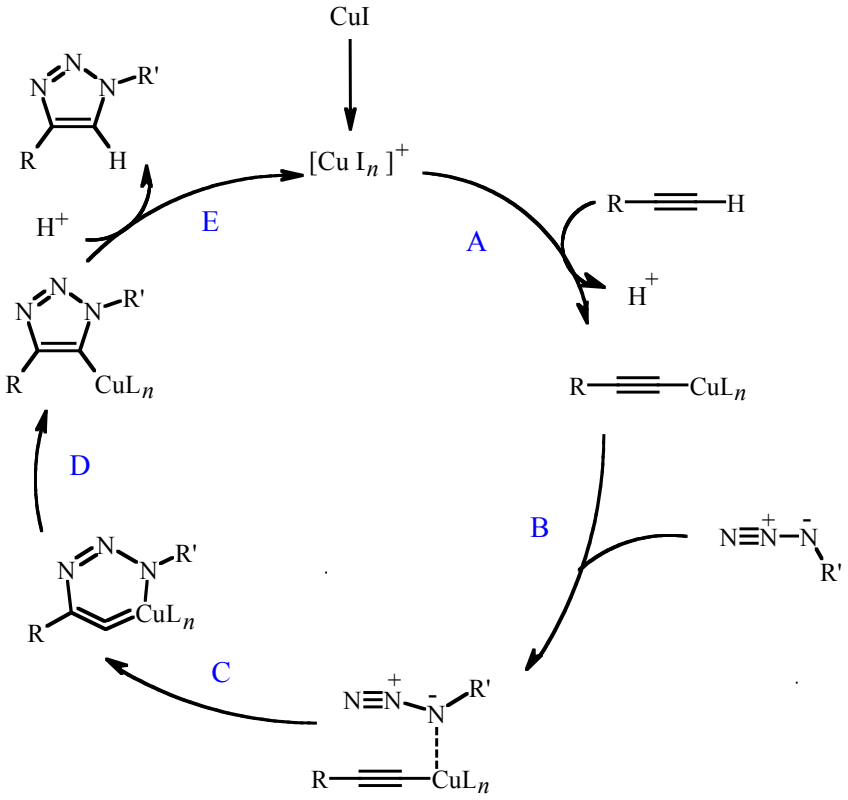


Schéma 45 : *Proposition d'un cycle catalytique pour la cycloaddition [3+2] catalysée au Cu(I)*[184]

Des azotures primaires, secondaires ou tertiaires ont été employés dans cette cycloaddition ainsi que des azotures aromatiques. La réaction est compatible avec un grand nombre de groupes fonctionnels comme les esters, les acides, les alcènes, les alcools ou encore les amines. En outre, probablement à cause de son grand moment dipolaire (5 Debye), l'élément triazole est un pharmacophore agressif, se liant fortement et de diverses manières aux protéines.

d. Synthèse supportée sur résine

Plusieurs études ont été récemment publiées sur la synthèse organique sur support solide. Cette méthodologie consiste à lier l'un ou tous les réactifs à un polymère (résine), suivi par un traitement pour détacher le produit final. La réaction d'Huisgen a été récemment un bon exemple développé en chimie supportée. Dans ce cas, le triazole est formé soit au départ d'un azoture supporté sur résine soit au départ d'un alcyne supporté. Les étapes

de purifications laborieuses ne sont alors plus nécessaires et les produits de synthèse sont obtenus par simple filtration. Cependant, des inconvénients sont également à considérer lors de l'élaboration de ces synthèses supportées. Tout d'abord, doit être pris en compte le coût du support. D'autre part, l'étape de clivage peut parfois être incomplète ou peut endommager le support. Notons également que la caractérisation des produits supportés peut être difficile, étant donné que les techniques classiques utilisées en synthèse en solution ne sont pas applicables pour la plupart de ces produits.

Afin de pallier les inconvénients cités précédemment de la synthèse supportée, notre équipe a mis au point un nouveau catalyseur au cuivre (I) supporté sur une Amberlite aminée. Il s'agit d'une résine formée de diméthylaminométhyles greffés sur le polystyrène où l'amine joue le rôle d'un chélate et d'une base.[185] Dans ce cas, les produits de synthèse sont récupérés par simple filtration.

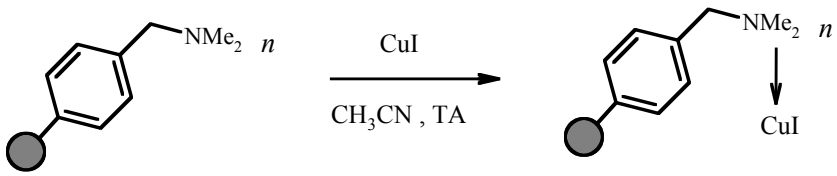


Schéma 46 : *Synthèse d'un catalyseur au Cu(I) supporté sur A-21*

L'A-21.Cu (I) s'avère un catalyseur supporté très efficace et utile pour la synthèse des 1,4-triazoles. Cette méthodologie a permis de réaliser une synthèse automatisée d'un lot de 96 triazoles[186]. Les résultats sont très satisfaisants, non seulement au niveau de la production effective de ce catalyseur, mais aussi au niveau des produits eux-mêmes dont les tests biologiques ont permis d'identifier certains triazoles à activité antibiotique.[187]

2. Formation d'une librairie d'azotures

Selon les protocoles décrits dans la littérature, la synthèse des azotures est réalisée par substitution nucléophile sur les halogénures appropriés, au moyen de l'azoture de sodium

[185] C. Girard, E. Onen, M. Aufort, S. Beauviere, E. Samson, J. Herscovici, Reusable polymer supported catalyst for the [3+2] Huisgen cycloaddition in automation protocols, *Org. Lett.,* **2006**, *8*, 1689.
[186] I. Jlalia, C. Beauvineau, S. Beauvière, E. Önen, M. Aufort, A. Beauvineau, E. Khaba, J. Herscovici, F. Meganem and C. Girard, Automated Synthesis of a 96 Product-Sized Library of Triazole Derivatives Using a Solid Phase Supported Copper Catalyst, *Molecules* **2010**, *15*, 3087-3120
[187] M. Aufort, J. Herscovici, P. Bouhours, N. Moreau, C. Girard, Synthesis and antibiotic activity of a small molecules library of 1,2,3-triazole derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2008**, *18*, 1195.

dans du DMF ou du DMSO.[188] Dans une démarche de synthèse orientée vers la diversité, nous sommes partis du 1,3-dibromopropane dont la substitution nucléophile, dans le DMF, avec un excès d'azoture de sodium conduit au 1,3-diazidopropane **32** avec 93 % de rendement. Ensuite, une monoréduction de l'azoture à l'aide de la triphénylphosphine dans un mélange HCl/AcOEt aboutit à l'azido-amine **33** avec un rendement de 33 % (Schéma 47). Cette reproductibilité modérée s'explique par la solubilité partielle du produit dans l'eau, compte tenu du grand volume de phase aqueuse à incorporer dans la phase organique.

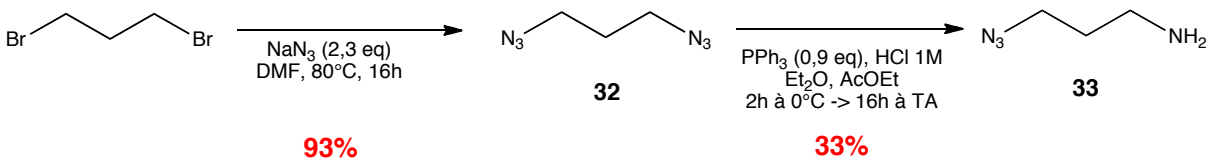


Schéma 47 : *Synthèse de l'azidoamine **33***

La monoréduction est démontrée en RMN ^{1}H par l'apparition d'un singulet relatif aux protons de l'amine vers 1,14 ppm et par le blindage du triplet correspondant aux protons en α de l'amine (de 3,37 ppm à 2,89 ppm). La fonction amine nous permettra de modifier aisément le substituant porté par le cycle triazole que nous voulons installer sur la propargylamine.

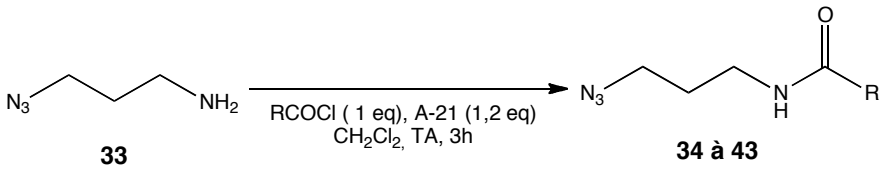


Schéma 48 : *Introduction de la diversité par acylation*

Ainsi, diverses extensions sont introduites sur le bras **33** par acylation avec différents chlorures d'acyles. La synthèse est réalisée dans le dichlorométhane en présence de l'amberlite A-21 qui sert à neutraliser l'acide formé au cours de la réaction.[189] Après purification par chromatographie flash (éluant : Hept / AcOEt), les produits sont obtenus avec des rendements variant entre 45 et 83 % (Tableau 11). L'acylation est vérifiée en RMN ^{1}H par la présence d'un singulet vers 6,3 ppm correspondant au proton amide. En RMN ^{13}C, la fonction amide est mise en évidence par la présence du pic du carbonyle vers 165 ppm.

[188] (a) S. G. Alvarez, M. T. Alvarez, A pratical procedure for the synthesis of alkyl azides at ambient temperature in diemthyl sulfoxide in high purity and yield, *Synthesis,* **1997**, 413. (b) N. Hooper, L. J. Beeching, J. M. Dyke, A. Morris, J. S. Ogden, A. A. Dias, M. L. Costa, M. T. Barros, M. H. Cabral, A. M. C. Moutinho, A study of the thermal decomposition of 2-azidoethanol and 2-azidoethyl acetate bu ultraviolet photoelectron spectroscopy and matrix isolation infrared spectroscopy, *J. Phys. Chem. A*., **2002,** *106*, 9968. (c) A. J. Scheel, H. Komber, B. I. Voit, Novel hyperbranched poly[1,2,3]-triazoles derived from AB2 monomers by 1,3-dipolar cycloaddition, *Macromol. Rapid Comm.,* **2004**, *25*, 1175. (d) P. Appukkuttan, W. Dehaen, V. V. Fokin, E. V. Eycken, *Org. Lett*., **2004**, *6*, 4223.

[189] C. Girard, I. Tranchant, P. Nioré, and J. Herscovici, *Synlett*, **2000**, 11, 1577-1580

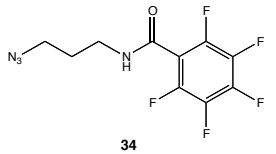
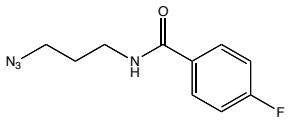
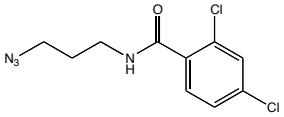
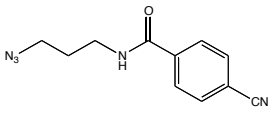
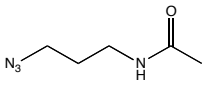
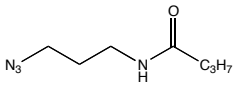
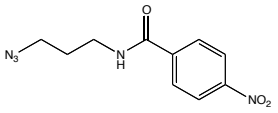
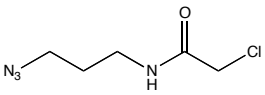
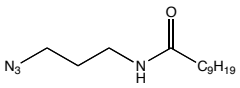
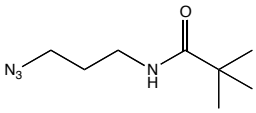
Azotures	*Rdt (%)*	*Azotures*	*Rdt (%)*
 **34**	55	 **39**	67
 **35**	59	 **40**	45
 **36**	77	 **41**	81
 **37**	60	 **42**	66
 **38**	83	 **43**	71

Tableau 11 : *Azotures générés après acylation*

3. Chimiothèque à partir d'un squelette V modèle

Cette étape d'appariement a tout d'abord été réalisée sur un squelette **V** modèle issu de la réaction A^3 avec l'aldo-C-glycoside **4** et la 2,2'-dichlorodiéthylamine **45**.

a. Formation du squelette V modèle

L'amine secondaire dichlorée **45**, nécessaire au couplage A^3 a été obtenue par halogénation des alcools primaires de la diéthanolamine **44** par un agent halogénant, ici le chlorure de thionyle avec un rendement de 60 %. Ce résultat est confirmé par RMN ^{1}H avec l'apparition de deux triplets à 3,73 ppm et 3,95 ppm intégrant respectivement pour les protons méthyliques en α et en β de l'amine.

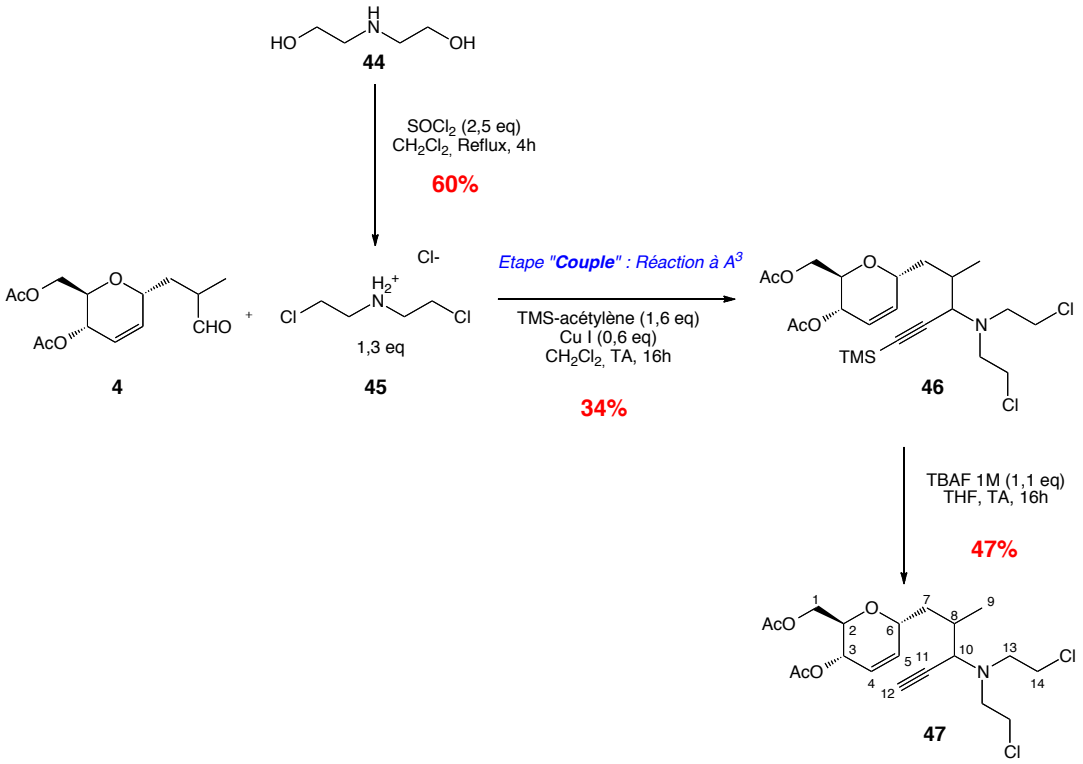


Schéma 49 : *Synthèse de la propargylamine modèle 47*

Par la suite, nous avons procédé au couplage A^3 entre l'aldo-C-glycoside **4**, l'amine secondaire **45** et le TMS-acétylène selon le même mode opératoire décrit précédemment. Les conditions opératoires, où la réaction est catalysée par 0,6 équivalents de CuI et réalisée à température ambiante sont les conditions optimales trouvées pour cette étape. Elles conduisent à la formation de propargylamine **46** avec un rendement de 34 %. En effet, l'ajout d'une base comme la DIPEA ou le remplacement du catalyseur par du bromure de cuivre n'ont pas permis d'améliorer le rendement. La structure **46** a été confirmée par LC-MS par l'apparition d'un seul pic à 11,3 min de m/z = 507 $[M+H]^+$ et par RMN ^1H avec l'apparition d'un multiplet à 3,01 ppm correspondant au nouveau proton du carbone *10* formé lors du couplage A^3. Le spectre RMN ^{13}C nous indique que nous avons formé un mélange de 4 diastéréoisomères (R_8/R_{10}, R_8/S_{10}, S_8/R_{10}, S_8/S_{10}) car le carbone *10* sort sous 4 signaux (53.81, 54.06, 54.13, 54.18 ppm). Malheureusement les différents isomères n'ont pas pu être séparés par chromatographie flash afin de pouvoir déterminer leurs proportions relatives. L'alcyne protégé par un groupement TMS est déprotégé en traitant la propargylamine **46** avec un excès de TBAF dans du THF pendant 16h. La propargylamine **47** ayant un alcyne vrai a été obtenue avec un rendement de 47 % après purification. La disparition du singulet à 0,14 ppm des protons méthyliques du TMS et l'apparition d'un singulet à 2,25 ppm correspondant au proton alcynique sur le spectre RMN ^1H confirment la formation de l'alcyne vrai **47**.

Le squelette **V** modèle construit autour du C-glycoside portant sur son aglycone une propargylamine simple a été obtenu en 3 étapes avec un rendement total assez faible de 9 %.

b. Formation de la banque de petites molécules modèles

À partir des azotures précédents, nous avons réalisé la cycloaddition d'Huisgen à l'aide du catalyseur A-21.Cu(I). La méthode adoptée consiste à coupler la propargylamine **47** de structure **V** aux huit azotures présentés au Tableau 11. La synthèse a lieu à température ambiante durant 18 heures dans du dichlorométhane anhydre.

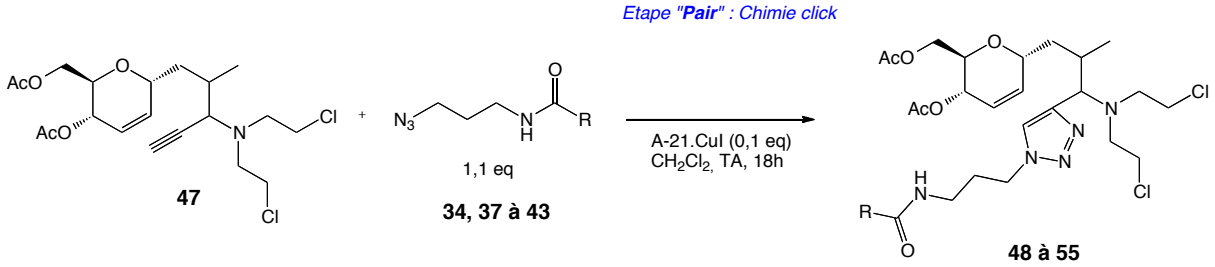


Schéma 50 : *Cycloaddition de Huisgen sur le squelette V modèle **47***

L'analyse LC-MS des milieux réactionnels a permis de conclure au succès de cette synthèse. En effet, les différents triazoles ont été formés quantitativement au bout des 18 h de réaction. Les produits sont ensuite récupérés par simple filtration et concentrés à l'évaporateur rotatif. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 12. Malheureusement, nous avons bien identifié les triazoles formés, mais sous l'effet de la chaleur et de la concentration du milieu, nous avons réalisé une réaction intramoléculaire qui a conduit à la formation d'un sel d'aziridinium au niveau de l'amine tertiaire (moutarde azotée). On observe la cyclisation intramoléculaire d'une des deux chaînes chloroéthyle avec libération d'un ion chlorure conduisant à l'ion aziridinium normalement très instable, mais ici stable sans la présence de nucléophile. L'étude RMN nous a permis de confirmer la formation du sel d'aziridinium avec l'apparition d'un multiplet à 2.5 ppm intégrant pour les 4 protons méthyliques de l'aziridinium et on observe toujours la présence d'un multiplet à 2.8 ppm intégrant pour les 2 protons N-CH_2 du groupement chloroéthyle. D'autre part, la formation du triazole est confirmée sur les spectres RMN ^{1}H par l'apparition d'un singulet à 7.4 ppm intégrant pour le proton de l'alcène du triazole. Une banque de 8 triazoles dichlorés structurellement diversifiés a été obtenue avec des rendements allant de 3 à 15 % et en parallèle une banque de 8 triazoles possédant un sel d'aziridinium sur son squelette avec des rendements allant de 73 à 96 % (Tableau 12).

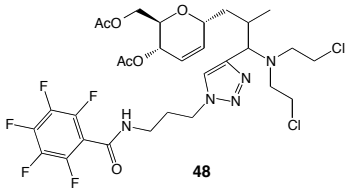
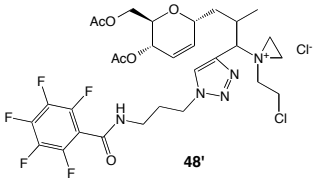
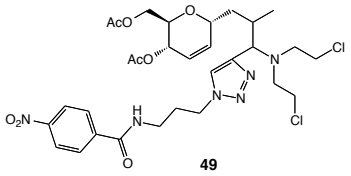
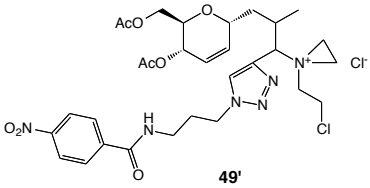
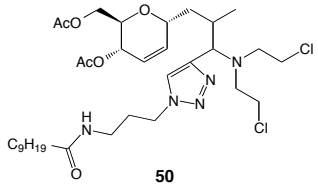
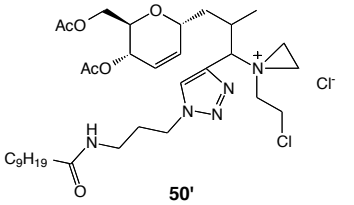
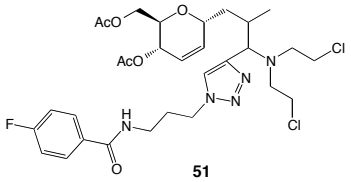
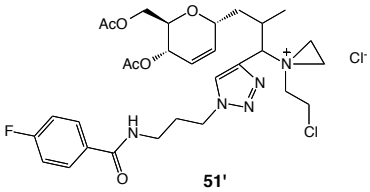
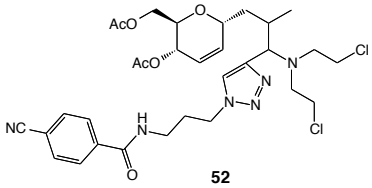
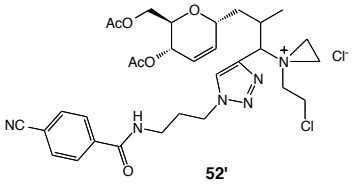
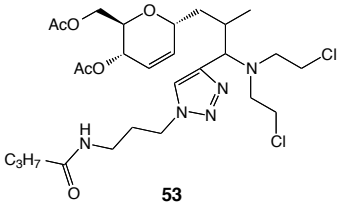
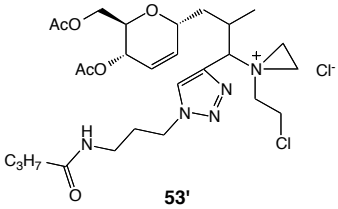
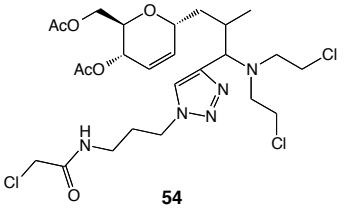
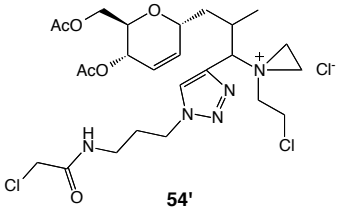
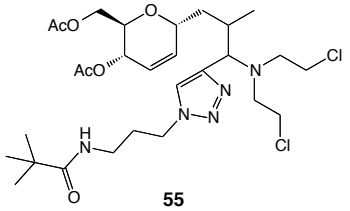
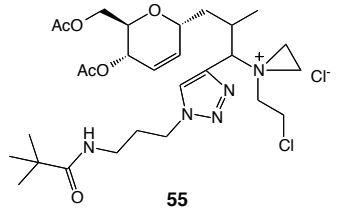
Squelette VII modèle	*Résultats*	*Squelette VII modèle*	*Résultats*
 **48**	R = 15 % 729,60 $[M+H]^+$	 **48'**	R = 81 % 692,10 $[M(^{35}Cl)+H]^+$ 694,15 $[M(^{37}Cl)+H]^+$
 **49**	R = 5 % 683,75 $[M+H]^+$ 705,60 $[M+Na]^+$	 **49'**	R = 83 % 647,65 $[M(^{35}Cl)+H]^+$ 649,65 $[M(^{37}Cl)+H]^+$
 **50**	R = 14 % 688,85$[M+H]^+$ 710,90 $[M+Na]^+$	 **50'**	R = 86 % 652,75 $[M(^{35}Cl)+H]^+$ 654,85 $[M(^{37}Cl)+H]^+$
 **51**	R = 12 % 656,70$[M+H]^+$ 678,70 $[M+Na]^+$	 **51'**	R = 84 % 620,60 $[M(^{35}Cl)+H]^+$ 622,65 $[M(^{37}Cl)+H]^+$
 **52**	R = 3 % 663,60$[M+H]^+$ 685,70 $[M+Na]^+$	 **52'**	R = 76 % 627,65 $[M(^{35}Cl)+H]^+$ 629,65 $[M(^{37}Cl)+H]^+$
 **53**	R = 4 % 606,55 $[M+H]^+$ 628,65 $[M+Na]^+$	 **53'**	R = 96 % 568,55 $[M(^{35}Cl)+H]^+$ 570,60 $[M(^{37}Cl)+H]^+$
 **54**	R = 8 % 612,45 $[M+H]^+$ 634,60 $[M+Na]^+$	 **54'**	R = 73 % 574,55 $[M(^{35}Cl)+H]^+$ 576,60 $[M(^{37}Cl)+H]^+$
 **55**	R = 14 % 618,60 $[M+H]^+$ 640,65 $[M+Na]^+$	 **55**	R = 86 % 582,60 $[M(^{35}Cl)+H]^+$

Tableau 12 : *Librairie de petites molécules **VII** modèles générées par chimie click*

Afin d'augmenter et de pouvoir cribler cette petite chimiothèque, il est envisageable de faire réagir une nucléophile tel que l'hydroxyde de sodium ou une amine lipidique fluorée pour rouvrir le cycle et ainsi obtenir une fonction alcool primaire ou une amine lipidique fluorée. Cette fonction alcool primaire ou cette chaîne fluorée peuvent nous permettre d'immobiliser ces petites molécules sur des lames afin d'évaluer leur activité biologique comme nous le verrons au chapitre suivant. D'autre part, il serait envisageable d'utiliser le chlorure pour réaliser une synthèse d'Hofmann avec une banque de composés amino commerciaux (Schéma 51).

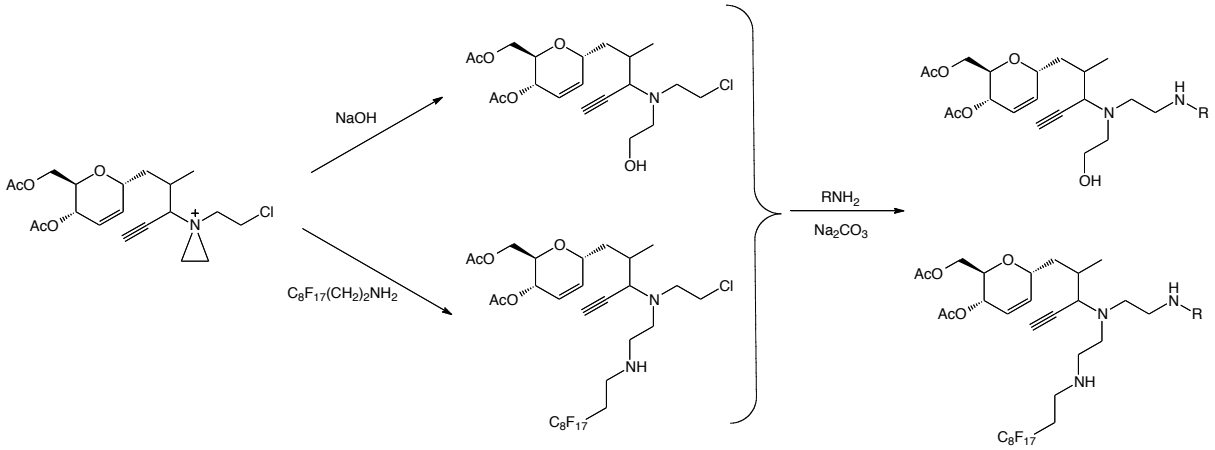


Schéma 51 : *Diversification du squelette VII modèle*

4. Chimiothèque à partir de la structure V déprotégée

Comme nous venons de le voir sur le modèle précédent, il nous est tout à fait possible de réaliser facilement et efficacement une chimiothèque de structures plus diversifiées en utilisant la chimie click sur les squelettes C-glycosides. Donc, nous avons réalisé la cycloaddition d'Huisgen sur la propargylamine **30** de structure **VI**. Cette dernière a été couplée aux dix azotures synthétisés précédemment avec le même opératoire développée lors de la réaction modèle. La synthèse a lieu à température ambiante durant 48 heures dans du dichlorométhane anhydre.

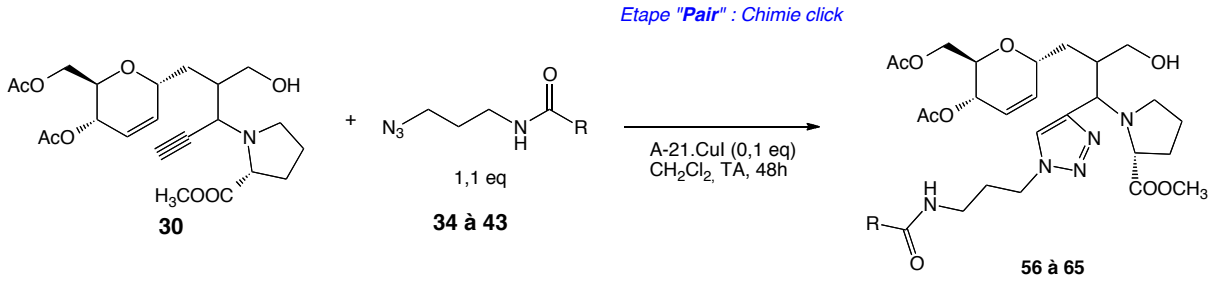
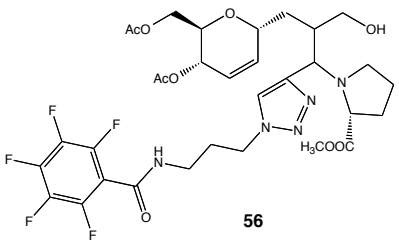
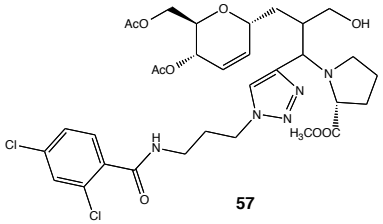
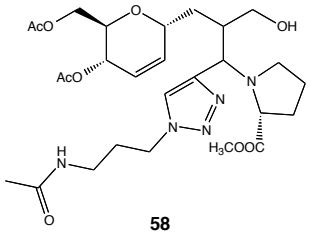


Schéma 52 : *Cycloaddition d'Huisgen sur le squelette **30***

La synthèse s'est déroulée avec un succès modéré. Une banque de 10 triazoles a été obtenue avec des rendements allant de 24 à 66 % (Tableau 13). Ces rendements modérés peuvent s'expliquer par l'encombrement stérique de l'alcyne par le C-glycoside et l'ester méthylique de la L-proline. Comme le produit **30** a été engagé sans purification chirale au préalable, il est possible que la configuration de certains diastéréoisomères bloque l'accès du cuivre à l'alcyne pour former l'acétylénure de cuivre (étape A) et donc ne réagisse pas lors de la cycloaddition 1,3-dipolaire faisant chuter le rendement final calculé par rapport à la somme des 4 isomères. Vu la complexité des châssis moléculaires obtenus et les rendements modérés engendrant la formation de très petites quantités, l'étude structurale par RMN n'a pu être menée, mais la structure et la pureté des produits ont été déterminées par LC-MS. Il ne se dégage pas de règles concernant la formation des triazoles. En effet, que les azotures portent des groupements aromatiques donneurs ou des groupements alkyles donneurs, les rendements restent voisins.

Squelette VII – série Alcool	*Rendement*	*Résultats LC-MS*
 **56**	**66 %**	R_t = 2,8 min, ELSD 64 %, m/z = 732,15 $[M+H]^+$ et 754,90 $[M+Na]^+$ R_t = 3,73 min, ELSD 36 %, m/z = 858,70 $[2M+4Cu]^{2+}/2$
 **57**	**28 %**	R_t = 3,594 min, ELSD 54 %, m/z = 710,85 $[M+H]^+$ et 732,80 $[M+Na]^+$ R_t = 4,014 min, ELSD 46 %, m/z = 836,80 $[2M+4Cu]^{2+}/2$
 **58**	**57 %**	R_t = 2,083 min, ELSD 100 %, m/z = 580,75 $[M+H]^+$, 602,85 $[M+Na]^+$, 706,90 $[2M+4Cu]^{2+}/2$

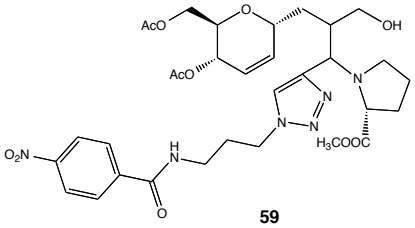
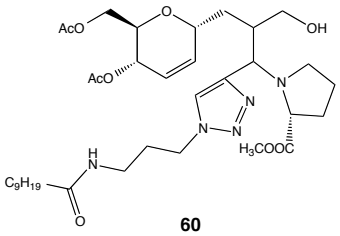
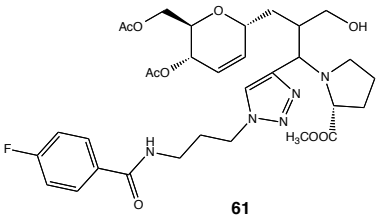
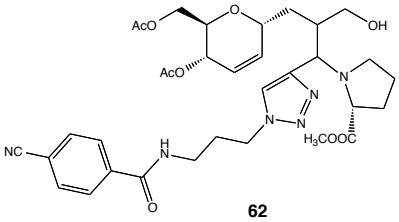
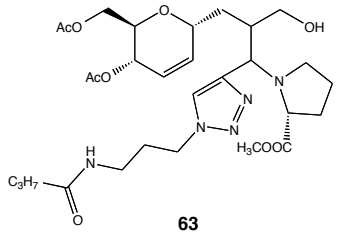
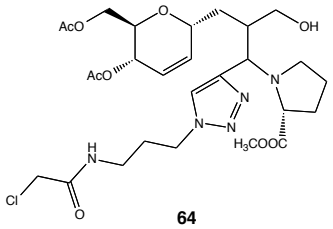
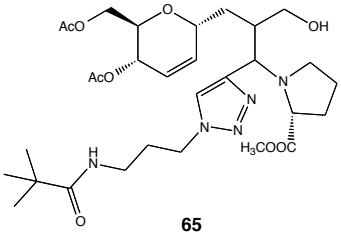
Squelette VII – série Alcool	*Rendement*	*Résultats LC-MS*
 **59**	**32 %**	R_t = 2,160 min, ELSD 64 %, m/z = 688,20 $[M+H]^+$ et 709,95 $[M+Na]^+$ R_t = 3,317 min, ELSD 36 %, m/z = 813,75 $[2M+4Cu]^{2+}/2$
 **60**	**24 %**	R_t = 3,713 min, ELSD 67 %, m/z = 693,00 $[M+H]^+$ et 715,25 $[M+Na]^+$ R_t = 4 min, ELSD 33 %, m/z = 819,00 $[2M+4Cu]^{2+}/2$
 **61**	**48 %**	R_t = 2,01 min, ELSD 79 %, m/z = 660,90 $[M+H]^+$ et 683,00 $[M+Na]^+$ R_t = 2,9 min, ELSD 21 %, m/z = 786,90 $[2M+4Cu]^{2+}/2$
 **62**	**50 %**	R_t = 2,079 min, ELSD 83 %, m/z = 667,85 $[M+H]^+$ et 689,90 $[M+Na]^+$ R_t = 2,813 min, ELSD 17 %, m/z = 793,90 $[2M+4Cu]^{2+}/2$
 **63**	**56 %**	R_t = 2,091 min, ELSD 100 %, m/z = 608,65 $[M+H]^+$, 631,10 $[M+Na]^+$, 734,85 $[2M+4Cu]^{2+}/2$
 **64**	**46 %**	R_t = 2,083 min, ELSD 100 %, m/z = 614,80 $[M+H]^+$, 636,75 $[M+Na]^+$, 741,05 $[2M+4Cu]^{2+}/2$
 **65**	**49 %**	R_t = 2,076 min, ELSD 80 %, m/z = 622,90 $[M+H]^+$ et 644,90 $[M+Na]^+$ R_t = 2,606 min, ELSD 20 %, m/z = 748,90 $[2M+4Cu]^{2+}/2$

Tableau 13 : *Librairie de squelettes **VII** – série Alcool*

Ainsi, nous avons formé une petite librairie de 10 petites molécules tridimensionnelles hautement diversifiées à partir de synthons C-glycosidiques qui possèdent une fonction hydroxyle libre. Cette fonction alcool primaire va nous permettre d'immobiliser ces petites molécules sur des lames de façon covalente afin de pouvoir évaluer leur activité biologique lors de criblage avec des protéines fluorescentes comme nous le verrons au chapitre suivant.

5. Chimiothèque à partir de la structure VI fluorée

La déprotection de l'alcool **29** nous a permis de greffer une chaîne lipidique fluorée sur nos synthons C-glycosidiques. Les produits **VI** ainsi obtenus portent une triple liaison en position ε sur l'aglycone qui peut être engagée dans l'étape « *Pair* » *via* des réactions de cycloaddition 1,3 pour générer des structures hautement diversifiées de type **VII**. Donc, nous avons réalisé la cycloaddition d'Huisgen à l'aide du catalyseur A-21.Cu(I) entre la propargylamine **31** de structure **VI** et trois azotures présentés au Tableau 11. La synthèse a lieu à température ambiante durant 72 heures dans un mélange de dichlorométhane anhydre et de solvant fluoré HFE (Schéma 53).

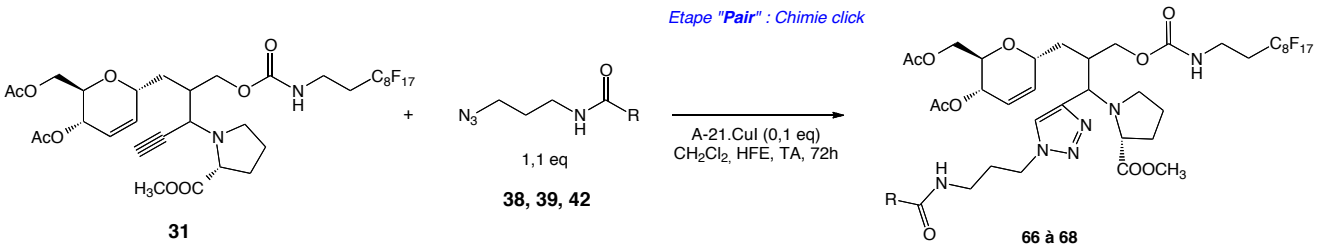


Schéma 53 : *Cycloaddition de Huisgen sur le squelette **31***

Une banque de 3 triazoles structurellement diversifiés a été obtenue avec des rendements allant de 13 à 17 % (Tableau 14). Ces faibles rendements peuvent s'expliquer par les mêmes raisons qui ont été évoquées dans le cas de la molécule hydroxyle **30**. De plus, il est important de prendre en compte que ces faibles résultats peuvent résulter aussi d'une mauvaise dissolution des produits fluorés malgré l'ajout de solvant fluoré et nous avons noté une détérioration du produit de départ **31** au cours de la réaction. La résolution des spectres RMN étant de très mauvaise qualité due à la complexité des châssis moléculaires **VI**, nous n'avons pas été en mesure de confirmer la structure complète de ces triazoles par RMN, mais la structure et la pureté des produits ont été déterminées par LC-MS.

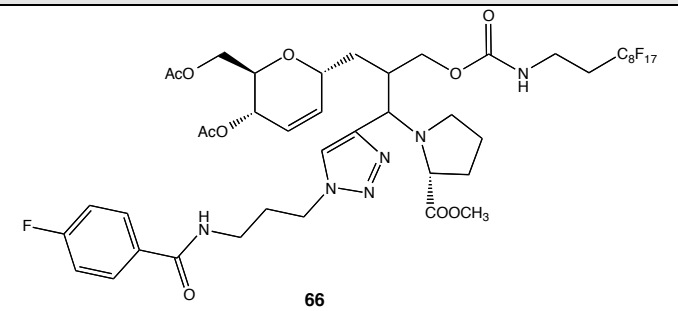
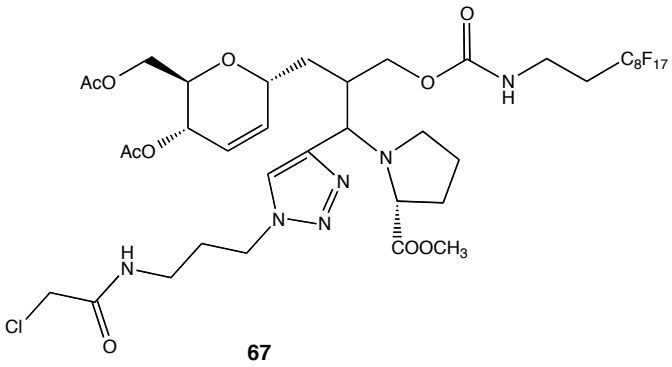
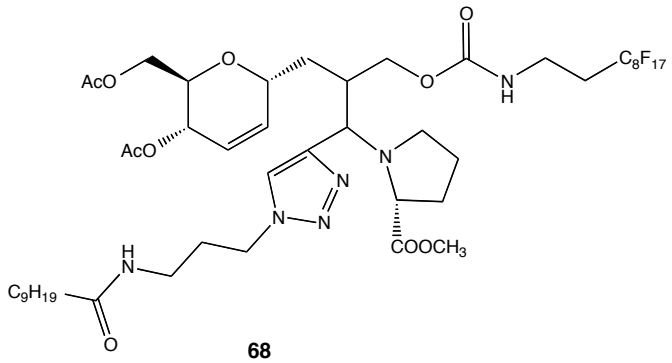
Squelette VII – série Fluorée	*Résultats*
 **66**	**16 %** LC-MS : R_t = 5,807 min, ELSD 100 %, m/z = 1149,90 $[M+H]^+$ et 1172,15 $[M+Na]^+$
 **67**	**17 %** LC-MS : R_t = 5,565 min, ELSD 100 %, m/z = 1103,20 $[M+H]^+$ et 1125,95 $[M+Na]^+$
 **68**	**13 %** LC-MS : R_t = 6,719 min, ELSD 100 %, m/z = 1182,05 $[M+H]^+$ et 1204,25 $[M+Na]^+$

Tableau 14 : *Librairie de squelettes **VII** – série Fluorée*

Ainsi, nous avons formé une petite librairie de 3 molécules fluorées tridimensionnelles hautement diversifiées à partir de synthon C-glycosidique. Cette étiquette fluorée permettra d'immobiliser ces petites molécules sur des lames fluorées par des interactions non-covalentes de type F-F afin d'évaluer leur activité biologique lors de criblage avec des protéines fluorescentes comme nous le verrons au chapitre suivant.

Chapitre **3**

Criblage sur puces à petites molécules

I. FIXATION PAR LIAISONS NON COVALENTES 135
A. Principe 135
B. Préparation des lames fluorées 136

II. FIXATION PAR LIAISONS COVALENTES 137
A. Principe 139
B. Préparation des chimiothèques miniaturisées sur lame 139
1. Les lames « amino » 140
2. Détermination des meilleurs paramètres de fonctionnalisation pour l'obtention des lames isocyanates 141
3. Dépôt de la chimiothèque sur les lames « isocyanate » 144

III. MISE AU POINT DE LA METHODE D'INCUBATION 145
A. La streptavidine 145
B. Incubation avec la streptavidine 147

IV. CONSTITUTION DE LA CHIMIOTHEQUE 152

V. CRIBLAGE DE PROTEINES CIBLES FLUORESCENTES 153
A. Les Thymidylate Synthase 153
1. Marquage par Cy5 des TS 155
2. Incubation des puces à petites molécules avec les TS 156
3. Résultats 156
B. Endogline 158
1. Importance du ciblage de l'endogline à des fins thérapeutiques 160
2. Marquage par Cy5 et incubation avec la chimiothèque miniaturisée 161
3. Résultats 162
C. Vpr 164
1. VIH 164
2. Choix de Vpr comme cible thérapeutique 166
3. Marquage de Vpr par Dy light 649 et Incubation 168
4. Résultats 169
5. Criblage secondaire par RMN 174

Afin d'identifier de nouveaux modulateurs d'activité de système biologique, nous avons choisi d'évaluer les molécules précédemment synthétisées par une méthode de criblage basée sur la préparation de **puces à petites molécules** présentée au chapitre **I**.

Le criblage par cette technologie nécessite dans un premier temps d'immobiliser les petites molécules sur des lames de verre pour pouvoir générer des bibliothèques sur lame. Ces lames sont alors incubées avec la protéine d'intérêt préalablement marquée par fluorescence. La détection de signal après incubation indique une interaction entre la molécule immobilisée et la protéine marquée (Figure 65)[123].

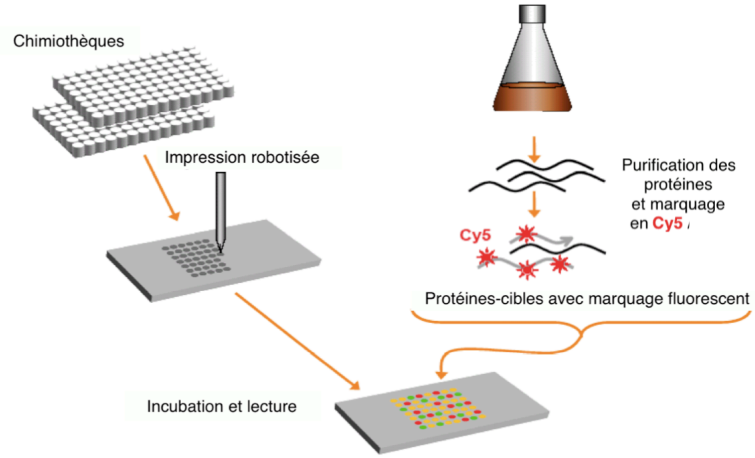


Figure 65 : *Principe du criblage sur lame*

Pour préparer les chimiothèques sur lame, nous avons choisi d'effectuer l'immobilisation des structures soit par des interactions fluor-fluor, soit par des liaisons covalentes.

I. Fixation par liaisons non covalentes

A. Principe

Cette méthode de génération de chimiothèques sur puce consiste à effectuer une fixation en établissant des liaisons fluor-fluor, non-covalentes mais suffisamment fortes pour assurer le maintien des structures à la surface. L'interaction est créée entre les groupements fluorés greffés à la surface des lames et l'étiquette fluorée des molécules à tester (Figure 66).

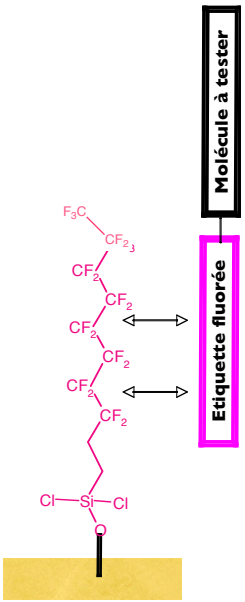


Figure 66 : *Génération de chimiothèques sur puce par interactions F-F*

Une publication de l'équipe de David Spring[8] a montré à travers plusieurs expériences d'incubation et de lavage que les interactions fluor-fluor ne diminuaient ou ne disparaissaient pas au cours ces traitements. Afin d'obtenir les meilleurs résultats, il est préférable d'utiliser des chaînes fluorées en C_8F_{17} pour marquer les petites molécules.

Il est donc nécessaire de mettre au point à la fois les méthodes de fonctionnalisation des lames et les méthodes d'introduction des groupements perfluorés sur les structures que l'on souhaite évaluer sur les systèmes biologiques.

B. Préparation des lames fluorées

La fonctionnalisation se fait par silanisation de lames de microscope ordinaires. Il est nécessaire de traiter au préalable les lames par une solution d'éthanol à 60 % contenant une solution d'hydroxyde de sodium à 10 g/ml afin de dégraisser la surface de la lame et de libérer toutes les fonctions hydroxyles. Une fois nettoyées, les lames sont mises en solution en présence de Rf8-éthyl-$SiCl_3$, un trichlorosilane comportant une queue perfluorée de huit atomes de carbone, dans l'éthanol (Schéma 54).

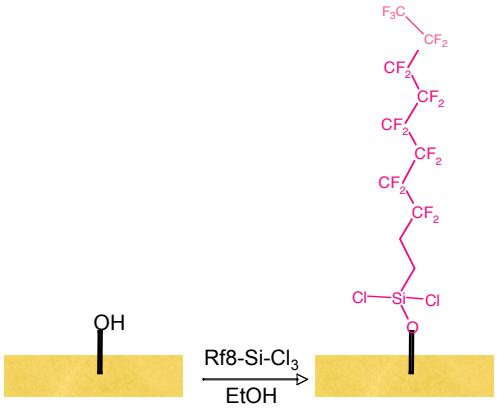


Schéma 54 : *Fonctionnalisation des lames*

Les étapes de lavage des lames confirment bien la fonctionnalisation puisque les gouttes d'eau formées perlent sur la surface modifiée, hydrophobe. Ainsi, les lames préparées peuvent être utilisées en tant que support pour la bibliothèque sur puce.

La banque de petites molécules comportant une étiquette fluorée synthétisées au chapitre 2 peut maintenant être déposée sur ces lames « fluorées » et former une chimiothèque miniaturisée nécessaire au criblage par protéine fluorescente (Figure 67).

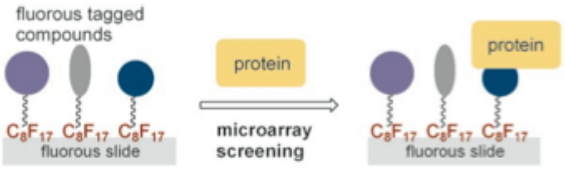


Figure 67 : *Principe du criblage par protéine fluorescente sur lame fluorée*[190]

À ce jour, nous n'avons pas pour l'instant effectué de criblage avec ce type de support, car nous possédons à l'heure actuelle une librairie très restreinte de petites molécules fluorées. Cette librairie ne couvrant pas entièrement l'espace chimique ne nous permettrait pas d'identifier un nouveau modulateur d'activité protéique. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au développement d'une approche plus globale par immobilisation par liaisons covalentes qui met en jeu des librairies de structures diverses et complexes.

II. Fixation par liaisons covalentes

La stratégie la plus commune pour la fixation des molécules à la surface de la lame consiste en la formation de liaisons covalentes. Dans ce cas, une fonctionnalisation préalable

[190] N. L. Pohl, Fluorous tags catching on microarrays, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 3868-3870

de la lame est nécessaire. Les stratégies d'immobilisation développées doivent tenir compte de la stabilité moléculaire de la surface de la lame fonctionnalisée et de l'orientation des molécules sur cette dernière.

La plupart des approches d'immobilisation mettent en jeu des réactions de couplage sélectives. Schreiber et ses collaborateurs ont développé des lames activées par des groupements chlorure de façon à fixer une banque d'alcools.[191] Le même groupe a également mis au point des lames comportant des groupements de type maléimide afin d'immobiliser une banque de thiols.[192] Or, beaucoup de composés provenant de la chimie combinatoire et des collections de produits naturels contiennent des amines et des groupements hydroxyles. Ces composés peuvent être fixés à une lame fonctionnalisée par l'intermédiaire d'une liaison amide ou ester. Le groupe de Chang a choisi de spotter une librairie de molécules amino sur des lames fonctionnalisées par un ester activé par un groupement N-hydroxysuccinimide (NHS).[193] Cette approche nécessite cependant l'ajout d'un catalyseur pour le couplage. Plusieurs autres stratégies d'immobilisation chimiosélectives ont été décrites[194] : on trouve des immobilisations par la formation d'oximes, d'hydrazones, de thiazolidines, par des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire, de Diels-Alder ou encore de réduction par la méthode de Staudinger. Ces approches ont l'avantage de nécessiter un groupement fonctionnel réactif qui doit être introduit lors de la synthèse des petites molécules et de permettre ainsi de contrôler l'orientation de la petite molécule sur la surface de la lame. L'inconvénient majeur de ces lames est qu'un seul type de fonctionnalité peut être fixé dessus. Motivés par le besoin d'augmenter la diversité moléculaire des petites molécules à cribler, nous avons choisi de développer une approche non-sélective pour fixer les composés.

En nous appuyant sur les travaux de l'équipe de Schreiber,[195] nous avons développé une méthode d'immobilisation sur lame permettant de greffer des petites molécules ayant des groupements fonctionnels différents. La capture des composés se fait par l'intermédiaire d'un isocyanate, ce qui permet de greffer sur la même lame des banques très diverses, des produits commerciaux et des produits naturels.

---

[191] A. N. Koehler, A. F. Shamji, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.,* **2003**, *125*, 8420-8421

[192] G. MacBeath, A. N. Koehler and S. L. Schreiber, J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 7967-7968

[193] M. Uttamchandani, D. P. Walsh, S. M. Kheronsky, X. Huang, S. Q. Yao, Y. T. Chang*, J. Comb. Chem.*, **2004**, *6*, 862-868

[194] A. J. Vegas, J. H. Fuller, A. N. Koehler, Small-molecule microarrays as tools in ligand discovery, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 1385-1394

[195] J. E. Bradner, O. M. McPherson, R. Matzitschek, D. Barnes-Seeman, J. P. Shen, J. Dhaliwal, K. E. Stevenson, J. L. Duffner, S. B. Park, D. S. Neuberg, P. Nghiem, S. L. Schreiber and A. N. Koehler, A robust small-molecule microarray platform for screening cell lysates, *Chemistry & Biology*, **2006**, *13*, 4933-504

A. Principe

Le principe du couplage de la molécule sur le support solide repose sur l'utilisation d'une fonction isocyanate introduite à la surface de la lame. Le groupement NCO réagit avec un grand nombre de fonctions nucléophiles (alcool, acide carboxylique, amine...). L'équipe de Schreiber a mis en évidence différents degrés d'immobilisation en fonction des groupements fonctionnels présents sur les molécules (Tableau 15).

Bonne immobilisation	*Immobilisation significative*	*Immobilisation faible*
Amine primaire Amine aryle Thiol	Alcool primaire Phénol Amine secondaire Indole	Alcool secondaire / tertiaire Acide carboxylique

Tableau 15 : *Degré d'immobilisation en fonction des groupements fonctionnels*

L'avantage de ce type de surface est son application à une grande variété de produits sans introduction de fonction particulière au cours de la synthèse des petites molécules. Ces lames ainsi fonctionnalisées peuvent être utilisées avec des librairies de petites molécules issues de la SOD, mais aussi des librairies commerciales de composés bioactifs, incluant les produits naturels. D'autre part, la réaction avec l'isocyanate ne génère pas de produits secondaires. Des composés possédant plusieurs groupements fonctionnels vont pouvoir s'orienter différemment sur la surface de la lame pour un spot donné et ainsi permettre aux petites molécules de se présenter sous différents angles à la protéine cible. Ainsi, lors du criblage avec la protéine, ces multiples orientations seront testées. D'autre part, des études ont montré que la présence d'eau dans les échantillons n'affectait pas la réactivité des lames et avait peu ou pas d'influence sur l'intensité de la fluorescence. Ainsi, nous avons pu stocker nos librairies de petites molécules en solution dans le DMSO et les conserver au congélateur.

B. Préparation des chimiothèques miniaturisées sur lame

La méthodologie que nous avons adoptée pour la préparation des chimiothèques sur puce, nécessite l'utilisation de lames « amino », *i.e.* des lames comportant des fonctions amines à la surface. En effet, ces fonctions amines permettent le greffage d'un espaceur polyéthylène glycol (PEG) dont le groupement amine terminal est protégé par un groupement

Fmoc. La déprotection de cet espaceur lors de l'étape 2 par de la pipéridine permet de libérer la fonction amine, disponible pour la formation de la liaison urée avec le 1,6-diisocyanatohexane à l'étape 3 (Schéma 55).[195]

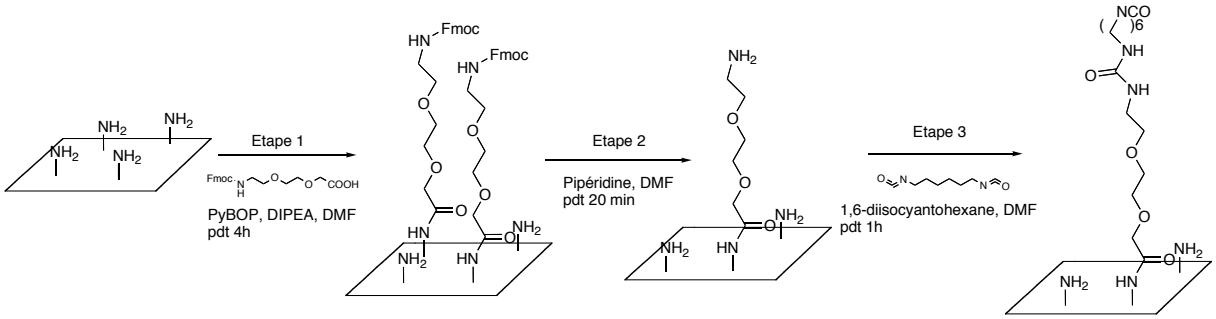


Schéma 55 : *Préparation des lames « Isocyanate »*

1. Les lames « amino »

Bien qu'il existe des lames « amino » commerciales, il est possible de les préparer à partir de lames de verre classiques (lames de microscope). Il est cependant nécessaire de procéder à une activation de celles-ci au préalable, c'est-à-dire libérer toutes les fonctions hydroxyle présentes en surface, par un traitement avec une solution aqueuse d'ammoniac et de peroxyde d'hydrogène. Une fois les lames activées, elles sont silanisées par une solution de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES, 3 % (*V/V*)) dans de l'éthanol absolu.

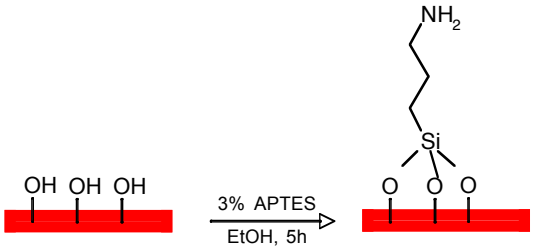


Figure 68 : *Préparation des lames « amino »*

La vérification de la silanisation s'effectue par un dosage des fonctions amines d'une lame « témoin ». Il s'agit d'un dosage en retour du complexe « bleu de bromophénol – sel de pipéridine ». Il s'agit de faire réagir les sites comportant ces fonctions avec une solution à 10 % (*m/V*) de bleu de bromophénol dans le DMF. Après une étape de lavage permettant d'éliminer l'excès de colorant n'ayant pas réagi, les lames sont placées dans une solution à 20 % de pipéridine. Ainsi, le bleu de bromophénol ayant réagi, et donc fixé à la surface sous forme de complexe, est à nouveau mis en solution par réaction avec la pipéridine. La pipéridine vient alors se substituer aux aminosilanes engagés dans le complexe avec le bleu de bromophénol. Au final, le complexe « bleu de bromphénol – pridinium », soluble dans le DMF est récupéré et la solution bleue obtenue est analysée par spectrométrie UV à 605 nm.

L'absorbance déterminée nous permet de connaître S_{NH2}, la quantité de fonction amine par cm^2 de lame, comme le montre la démonstration ci-dessous.

Par la loi de Beer-Lambert, on a :

$A = l.\ \varepsilon\ .\ C$ où l est la longueur de lame,

ε le coefficient d'absorption

C la concentration en bleu de bromophénol

ainsi,

$$A = l.\ \varepsilon.\ n_{\text{bleu de bromophénol}}/\ Vcuve = l.\ \varepsilon.\ n_{NH2}/\ Vcuve$$

on a par ailleurs :

$S_{NH2} = n_{NH2}/(S_{lame}.N_A)$ où S_{lame} correspond à la surface totale de la lame en cm^2

et N_A au nombre d'Avogadro

d'où,

$$S_{NH2} = (A.V_{cuve})/(l.\ \varepsilon\ .S_{lame}.\ N_A)$$

Les valeurs de S_{NH2}, déterminées par dosage des lames silanisées à l'APTES, sont de l'ordre de $1{,}00.10^{14} \pm 0{,}19.10^{14}$ fonctions NH_2 par cm^2 de lame alors que les lames « amino » commerciales de chez Corning (GAPS II) sont de l'ordre de 3.10^{13} fonctions NH_2 par cm^2 de lames. Les valeurs étant relativement proches pour des raisons de coût et d'approvisionnement, les expériences de fonctionnalisation ont été réalisées sur des lames « amino » préparées par silanisation avec l'APTES.

2. Détermination des meilleurs paramètres de fonctionnalisation pour l'obtention des lames isocyanates

Toutes les expériences suivantes ont été réalisées sur plusieurs lots de lames afin de vérifier la reproductibilité des résultats et les valeurs données sont les moyennes de ces derniers.

Nous avons tout d'abord testé si la concentration des solutions dans lesquelles étaient plongées les lames « amino » avait une influence sur le taux de conversion de ces dernières en dérivé « isocyanate ».

En se basant sur le protocole établi par l'équipe de Schreiber dans la publication *« A Robust Small-Molecule Microarray Platform for Screening Cell Lysates »*[195], nous avons testé une gamme de concentrations des différents réactifs mis en jeu au cours de la

fonctionnalisation (Tableau 17), puis établi le taux de conversion des lames « amino » en lames « isocyanate » par dosage du complexe bleu bromophénol/pipéridine comme décrit précédemment.

	Greffage de l'espaceur PEG	*Déprotection de l'espaceur*	*Formation de la fonction NCO en surface*
Concentrations initiales (C_0)	10 mM d'acide Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoique 10 mM de PyBOP 20 mM de DIPEA	10% (vol/vol) de pipéridine	10% (vol/vol) de 1,6-diisocyanatohexane

Tableau 16 : Concentrations établies par l'équipe de Schreiber[195]

	C_0	*C_0 x 1,5*	*C_0 x 2*	*C_0 x 3*
Taux de conversion	35 %	33 %	27 %	18,5 %

Tableau 17 : Différentes concentrations testées et résultats

Les résultats nous montrent que c'est en gardant les concentrations initiales que l'on obtient le meilleur taux de conversion.

Un protocole plus précis a été décrit par l'équipe d'Angela N. Koehler, collaboratice de Stuart L. Schreiber dans *Nature Protocols,*[196] cet article regroupe tout le matériel nécessaire et un mode opératoire un peu différent de celui établi précédemment. Dans le Schéma 56, on trouve les principales différences entre les 2 protocoles. Dans le nouveau protocole, on trouve des temps de réactions beaucoup plus longs et des concentrations très faibles.

[196] J. E. Bradner, O. M. McPherson and A. N. Koehler, A method for the covalent capture and screening of diverse small molecules in a microaaray format, *Nature Protocols*, **2006**, 1, 2344-2352

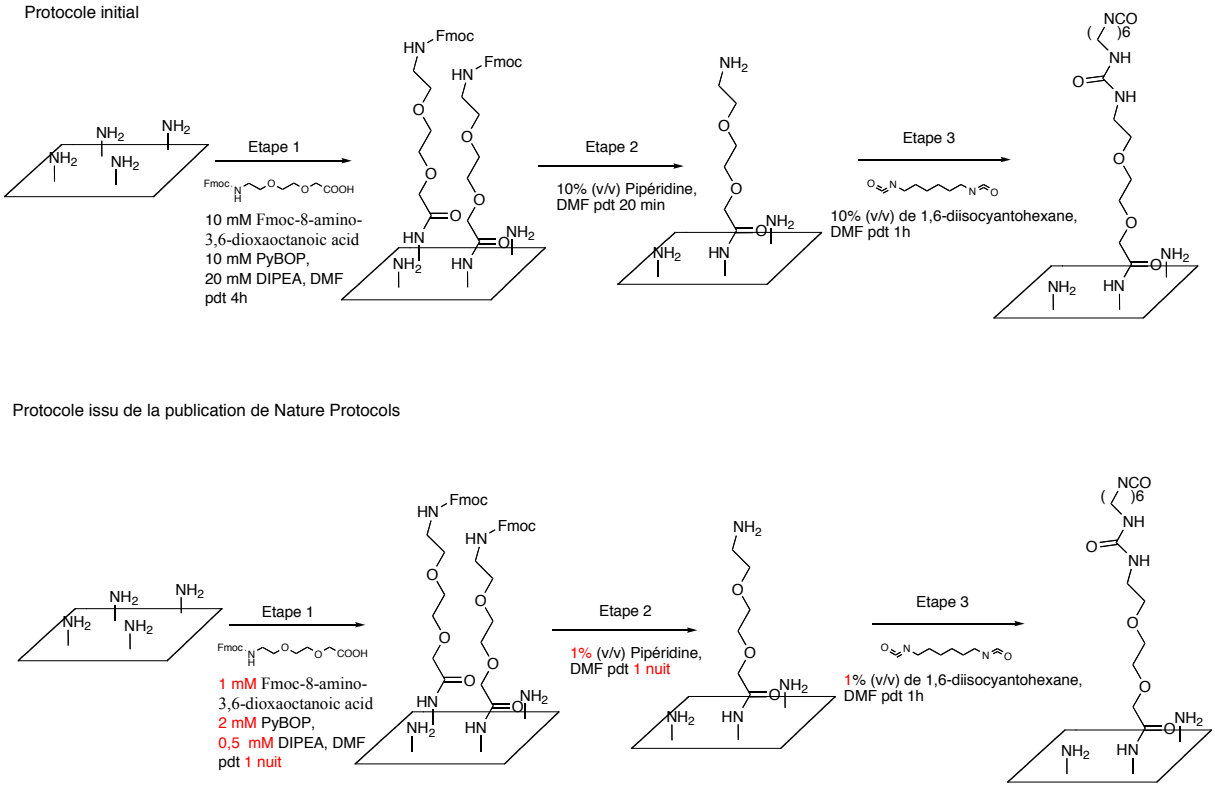


Schéma 56 : *Schémas de synthèse de la fonctionnalisation des lames « amino »*

Nous avons voulu comparer les 2 méthodes en termes de conversion de lame « amino » en lame « isocyanate » (Tableau 18).

	Lame isocyanate obtenue par le protocole initial	*Lame isocyanate obtenue par le 2ème protocole*
Taux de conversion	35 %	35 %

Tableau 18 : *Résultats obtenus avec les 2 protocoles*

Ces résultats nous montrent que le nouveau protocole permet d'obtenir le même taux de conversion mais avec des quantités de réactifs beaucoup plus faibles.

Nous avons voulu ensuite comparer les 2 méthodes mais en transposant les temps de réaction du 2ème protocole au 1er protocole (Tableau 19).

	Lame isocyanate obtenue par le protocole initial + temps de réaction du 2nd	*Lame isocyanate obtenue par le 2ème protocole*
Taux de conversion	45 %	35 %

Tableau 19 : *Comparaison entre le 1er protocole modifié et le 2ème protocole*

Cette modification nous a permis d'obtenir un meilleur taux de conversion. Par la suite, **nous utiliserons donc un mode opératoire alliant les quantités mises en jeu dans le premier protocole et les temps de réactions du 2ème protocol**e (Schéma 57).

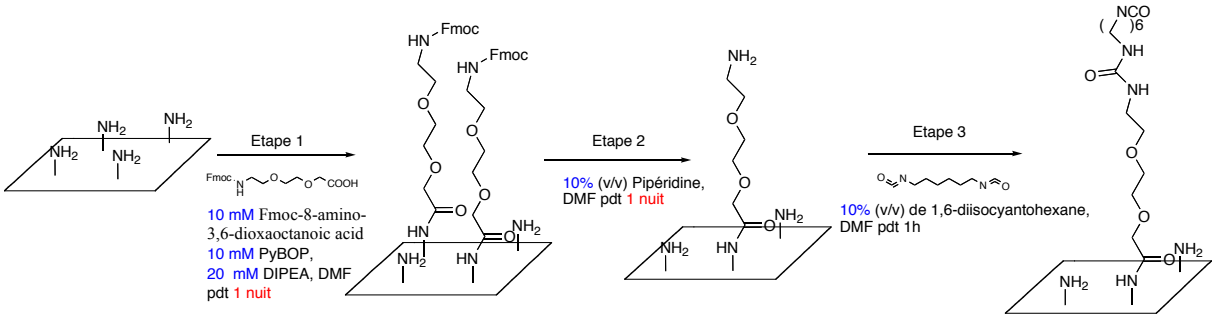


Schéma 57 : *Préparation des lames « Isocyanate »*

3. Dépôt de la chimiothèque sur les lames « isocyanate »

La chimiothèque miniaturisée est obtenue après le dépôt de la librairie de petites molécules sur la lame fonctionnalisée par un groupement isocyanate. Ces dépôts sont réalisés par un microdéposeur commercial afin de créer à la surface de la lame des spots de 50 à 500 µm de diamètre à partir de solutions contenant les molécules de concentration de l'ordre de 10 mM ou 10 mg/ml (Figure 69).



Figure 69 : *Microdéposeur permettant de spotter les molécules sur la lame de verre*

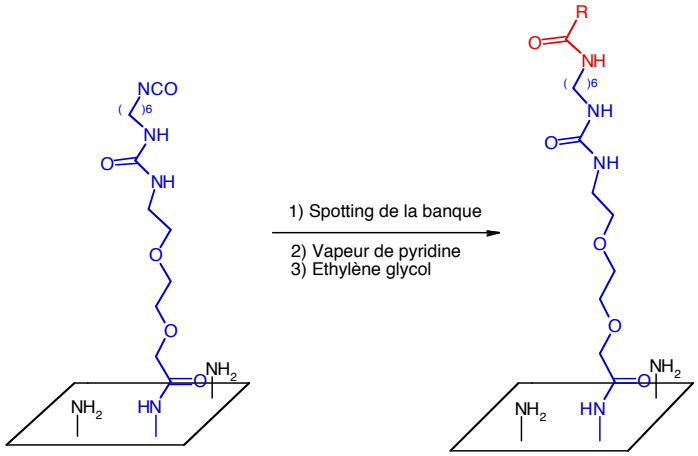


Figure 70 : *Formation de la banque miniaturisée*

Après avoir déposé la bibliothèque de molécules suivant un patron défini à l'aide du microdéposeur, on place les puces au contact de vapeur de pyridine pendant une nuit afin d'activer la formation de la liaison covalente entre l'isocyanate et la fonction réactive de la petite molécule. Puis les lames sont immergées dans un bain d'éthylène glycol à 5% (*V/V*) pour quencher toutes les fonctions isocyanate encore libres. Après lavages et séchage par centrifugation des lames, on obtient alors une banque miniaturisée qui peut être conservée 6 mois au congélateur.

III. Mise au point de la méthode d'incubation

Afin de déterminer les conditions opératoires optimales pour l'incubation avec une protéine cible, nous avons tout d'abord choisi de travailler avec une protéine marquée connue, la streptavidine ainsi que 2 substrats connus de cette dernière : la biotine et la biotine cadaverine.

A. La streptavidine

La streptavidine est une protéine homotétramérique (Figure 71) provenant de la bactérie *streptomyces avidinii*, *actinobacteria* (bactérie Gram positive), produisant un antibiotique : la streptomycine. Sa très grande capacité à se lier à la biotine est bien connue (l'affinité de la biotine pour la streptavidine en solution est de l'ordre de $2{,}5.10^{13} M^{-1}$).[197]

[197] L. Välimaa, K .Pettersson, J. Rosenberg, M. Karp, T. Lövgren, Quantification of streptavidin absorption in microtitration wells, *Anal. Biochem.,* **2004,** *331*, 376-384

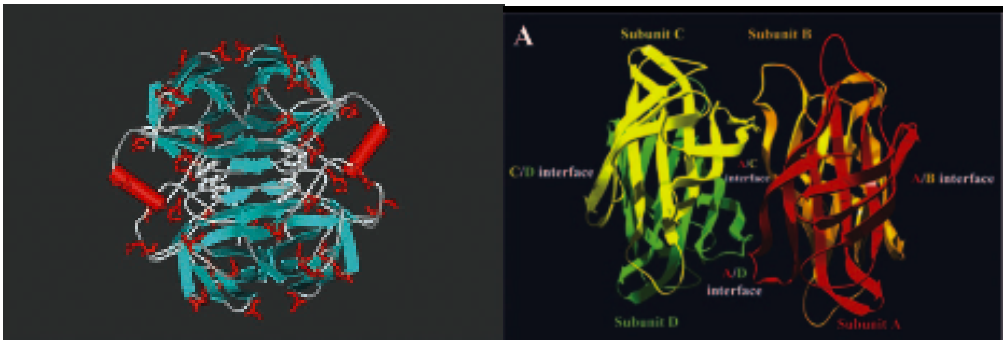


Figure 71 : *Homotétramère streptavidine*[198,199]

La streptavidine est l'équivalent bactérien de l'avidine présente dans le blanc d'œuf de poule et qui possède une structure tétramérique similaire et une plus grande affinité avec la biotine que l'avidine. Néanmoins, la streptavidine est préférée pour les applications biotechnologiques grâce à son caractère de liaison non-spécifique plus faible que celui de l'avidine.

De plus, la biotine possédant une très forte affinité pour l'avidine ou la streptavidine est une vitamine hydrosoluble appelée vitamine B_8 ou H nécessaire à l'homme. Elle est la coenzyme de carboxylases qui catalysent l'incorporation du CO_2 dans différents substrats de réactions de carboxylation ou de transcarboxylation. Elle intervient dans le catabolisme du glucose, des acides gras, de certains acides aminés et dans la synthèse des vitamines B_9 et B_{12}. La biotine peut être fonctionnalisée sur sa chaîne acide et couplée à différentes molécules comme des protéines, de l'ADN ou encore des médicaments potentiels. L'affinité entre la streptavidine et la biotine est un bon outil en biotechnologie moderne et elle est notamment utilisée pour l'immobilisation de molécules sur phase solide,[200] l'amplification des signaux dans les tests de bioaffinité[201,202] et le choix de médicaments pour des cellules ciblées.[203,204]

---

198 S. Burazerovic, J. Gradinaru, J. Pierron, T. R. Ward, Hiererchical self-assembly of one-dimensional streptavidin bundles as a collagen mimetic for the biomineralization of calcite, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2007,** *46*, 5510-5514

199 S.-C. Wu, S.-L. Wong, Engineering soluble monomeric streptavidin with reversible biotin binding capacity, *J. Biol. Chem.,* **2005,** *280*, 23225-23231

200 H. Schetters, Avidin and streptavidin in clinical diagnostics, *Biomol. Eng.,* **1999,** *16*, 73-76

201 A. Scorilas, A. Bjartell, H. Lilja, C. Moller, E. P. Diamandis, Streptavidin-polyvinylamine conjugates labeled with europium chelate : applications in immunoassay, immunohistochemistry, and microarrays, *Clin. Chem.,* **2000,** *46*, 1450-1455

202 Q. P. Qin, T. Lövgren, K. Pettersson, Development of highly fluorescent detection reagents for the construction of ultrasensitive immunoassays, *Anal. Chem.,* **2001,** *73*, 1521-1529

203 K. Ohno, B. Levin, D. Meruelo, Cell-specific, multidrug delivery system using streptavidin-protein a fusion protein, *Biochem. Mol. Med.,* **1996,** *58*, 227-233

204 D. S. Wilbur, P. M. Pathare, D. K. Hamlin, P. S. Stayton, R. To, L. A. Klumb, K. R. Buhler, R. L. Vessella, Development of new biotin/streptavidin reagents for pretargeting, *Biomol. Eng.,* **1999,** *16*, 113-118

La streptavidine est une protéine de choix du point de vue expérimental car elle nous permet d'observer des interactions avec des petites molécules sur lame et de quantifier ces interactions par rapport aux interactions qu'elle possède avec la biotine et la biotine cadaverine (Schéma 58).

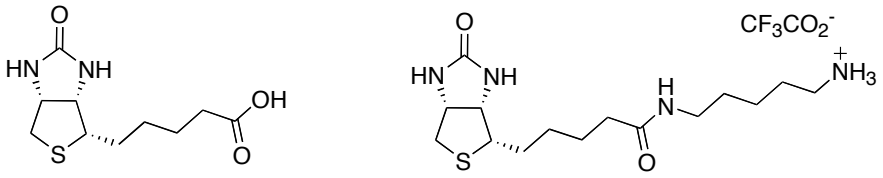


Schéma 58 : *Structure de la biotine et de la biotine cadaverine*

B. Incubation avec la streptavidine

La streptavidine est marquée par le fluorophore Alexa Fluor 647. Cette protéine marquée est commerciale et ne nécessite donc pas de purification. Afin de pouvoir optimiser les paramètres de l'étape d'incubation en visualisant les interactions protéine-petite molécule, les substrats de la streptavidine, à savoir la biotine et la biotine cadaverine ont été déposés sur des lames « isocyanate » à des concentrations différentes (10 mM, 7,5 mM, 5 mM, 2,5 mM, 1 mM).

Lors du spotting, nous avons créé 2 x 2 champs identiques sur la lame contenant pour le 1er lot la gamme de concentrations de biotine et pour le 2ème lot celle de la biotine cadaverine. Chaque champ est réalisé sous forme de carré (16x16 spots) suivant le patron décrit suivant (Figure 72).

1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

1,7,8 : DMSO (contrôle négatif)
2 : 10 mM
3 : 7,5 mM
4 : 5 mM
5 : 2,5 mM
6 : 1 mM

Figure 72 : *Patron de spotting de la gamme de concentrations*

La 1ère expérience d'incubation a été réalisée dans une chambre d'hybridation (Figure 73) en recouvrant la lame avec une solution de streptavidine à 5 µg.ml^{-1} dans du tampon PBS pH = 7,4.



Figure 73 : *Chambre d'hybridation, Corning*

Après lavage et séchage, la lame est analysée par le scanner de fluorescence (Figure 74) à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore, ici l'Alexa Fluor 647, soit λ = 635 nm (Figure 75).



Figure 74 : *Scanner Genepix Personnal 4100A*

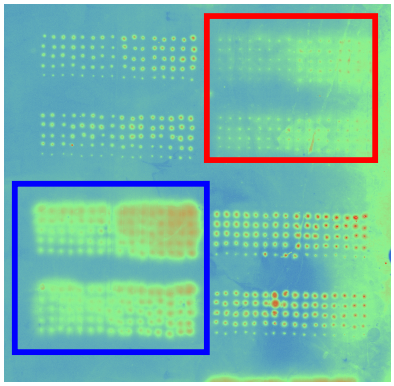


Figure 75 : *Visualisation des interactions Streptavidine – Substrats*
(Rouge : Biotine, Bleu : Biotine cadaverine)

On visualise l'interaction entre les substrats et la streptavidine par l'apparition de fluorescence au niveau des différents spots des substrats. On peut noter aussi que l'intensité des spots dépend de la concentration des substrats déposés (décroissance de l'intensité avec diminution de la concentration). D'autre part, la streptavidine présente une affinité plus grande pour la biotine cadaverine (spots beaucoup plus intenses) que pour la biotine. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la biotine cadaverine a mieux réagi avec les fonctions isocyanates que son homologue acide carboxylique, la biotine, donc l'accrochage de la biotine cadeverine serait plus efficace que celui de la biotine. Cette première expérience nous permet de valider la méthode d'incubation avec une protéine marquée par un fluorophore sur plusieurs points :

- le greffage des petites molécules ne subit pas de détérioration au cours de l'étape d'incubation ;
- on est capable de quantifier l'interaction entre la protéine et les substrats.

Cependant, comme on peut le voir sur la Figure 75, par cette méthode, on n'obtient pas un bruit de fond uniforme. En effet, la streptavidine semble adhérer à certains endroits. Ceci peut être dû à l'adhésion de la protéine sur les parois de la chambre. Pour éliminer ce problème, nous avons réalisé une pré-incubation avec une protéine non-spécifique, l'albumine de sérum bovin (BSA) ou la caséine qui interagirait avec les parois de la chambre et permettrait de diminuer le bruit de fond sur la lame. Cette étape supplémentaire nous a permis d'obtenir un bruit de fond un peu plus faible et plus homogène, mais qui n'est pas encore optimal pour une bonne analyse des spots de fluorescence.

Pour pouvoir éliminer le plus possible le bruit de fond, des plaques rectangulaires compartimentées en 4 puits ont été privilégiées pour l'incubation des chimiothèques miniaturisées (Figure 76). Ces plaques permettent une meilleure homogénéisation de la solution de protéine marquée lors de l'incubation des lames.

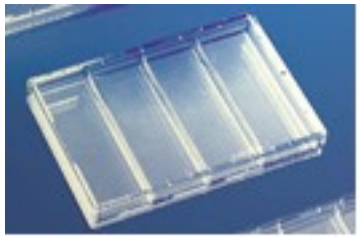


Figure 76 : *Plaque QuadriPERM*

Avec ces nouvelles cuves, quelques paramètres intervenant lors de l'incubation ont été testés tels que la pré-incubation avec une protéine non–spécifique, l'agitation et la température (Tableau 20, Figure 77).

Agitation orbitalaire	*Température d'incubation*	*Pré-incubation avec la Caséine à 10 mg.mL^{-1}*	*Incubation avec la Streptavidine à 5µg.mL^{-1}*
Avec	**TA**		Lame 1
		Lame 2	Lame 2
	4°C		Lame 3
		Lame 4	Lame 4
Sans	**TA**		Lame 5
		Lame 6	Lame 6
	4°C		Lame 7
		Lame 8	Lame 8

Tableau 20 : Plan d'expériences réalisé

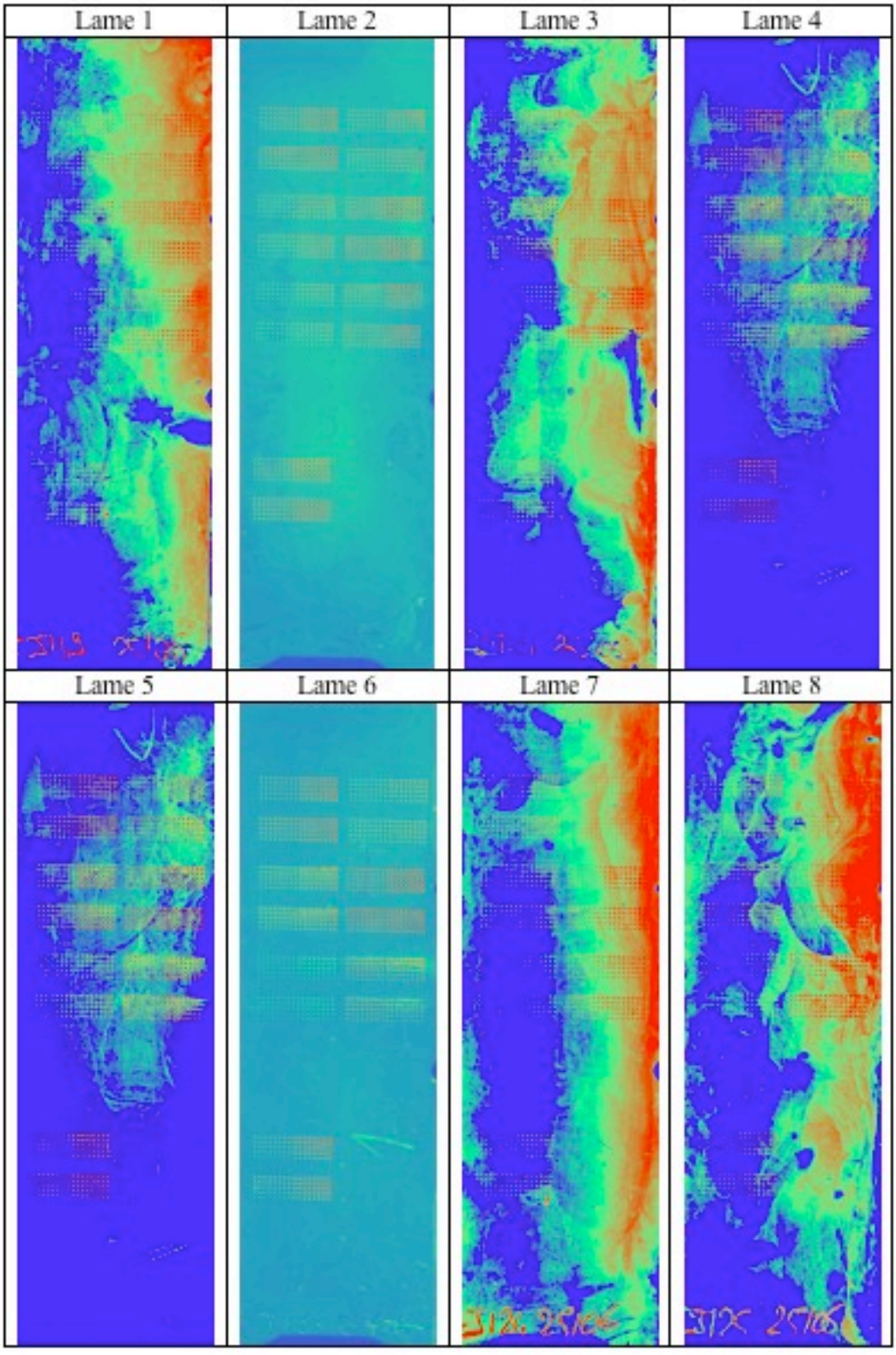


Figure 77 : *Images obtenues par lecture de fluorescence*

On constate d'après les images de la Figure 77 qu'une pré-incubation (comparaison entre la lame **1** et la lame **2**) permet de diminuer le bruit de fond. L'agitation des cuves permet de jouer sur l'uniformité du bruit de fond (comparaison entre la lame **4** et la lame **8**). Par

contre, la température n'a pas d'influence visible sur l'intensité des spots ni sur le bruit de fond.

Aux vues de ces résultats, le protocole d'incubation de notre chimiothéque miniaturisée sur lame avec les protéines d'intérêt est le suivant :

- **dans une plaque compartimentée à 4 puits ;**
- **une pré-incubation avec une protéine non-spécifique en forte concentration ;**
- **avec agitation orbitalaire ;**
- **à température ambiante.**

D'autre part, afin d'obtenir des résultats reproductibles lors des criblages avec les protéines d'intérêt, nous avons décidé d'utiliser des lames « amino » commercialisées par la société CORNING sous le nom de GAPS II qui ont une sensibilité supérieure due à un bruit de fond à fluorescence extrêmement faible.

IV. Constitution de la chimiothèque

La chimiothèque criblée est constituée de petites molécules ayant une fonction nucléophilie réactive vis-à-vis du groupement isocyanate. Les fonctions ciblées sont les alcools primaires ou secondaires, les amines, les thiols et les acides carboxyliques. Elle est actuellement constituée par 609 molécules aux structures variées et complexes, puisqu'elle résulte de l'union de plusieurs librairies de petites molécules (Tableau 21).

Laboratoire	*Nombre de molécules*	*Type(s) de molécule*
UPCGI - UMR8151/U1022	334	Thiazolidine, dérivé d'acide quinique, lipide monothiourée et dithiourée, dérivé de sucre, triazole, macrocyclique
IPMC - UMR7201	150	Alcool allylique, vinylique, sulfoxide, disulfoxide, propargylamine, dithiane, polyoxometallate
Laboratoire Charles Friedel - UMR7223	63	Dérivés de l'acide 2-amino-3-hydroxybutanoïque, polyol protégé
PPSM – UMR8531	62	Dérivés de sucre

Tableau 21 : *Constitution de la chimiothèque*

Ces molécules sont issues, en ce qui concerne notre laboratoire, de la synthèse orientée vers la diversité. Ainsi combinée aux autres librairies, on accroît la diversité structurale et la complexité de la chimiothèque afin d'augmenter nos chances d'identifier un modulateur d'activité biologique.

V. Criblage de protéines cibles fluorescentes

Comme cela a été décrit précédemment, la chimie biologique utilise la chimie comme un outil pour comprendre et explorer le vivant. Dans cette approche, des petites molécules de structures diverses sont utilisées pour identifier les protéines-clés impliquées dans les processus cellulaires fondamentaux et comprendre au niveau moléculaire comment ces protéines exécutent leurs fonctions biologiques.

C'est pour répondre à ces besoins que nous avons développé cette méthode de criblage qui repose sur la préparation de puces à petites molécules. C'est une méthode d'identification rapide de composés ciblant des protéines d'intérêt. Celle-ci est transposable à l'étude de toute protéine contre laquelle de nouvelles molécules à visée thérapeutique sont nécessaires.

Nous nous sommes investis dans la recherche de ligands de trois différentes familles de protéine : la thymidylate synthase, intervenant dans la biosynthèse de l'ADN, l'endogline, marqueur associé à la prolifération des cellules endothéliales tumorales et Vpr, protéine accessoire du VIH-1 impliquée dans différentes étapes de la réplication virale.

A. Les Thymidylate Synthase

La thymidylate synthase (TS) est une protéine supramoléculaire qui catalyse la méthylation réductrice en position 5 de la dUMP (5'-monophosphate de désoxyuridine) en dTMP (5'-monophosphate de désoxythymidine), précurseur essentiel de la biosynthèse de l'ADN (Figure 78).[205, 206]

[205] M. P. Costi, S. Ferrari, A. Venturelli, S. Calo, D. Tondi, D. Barlocco, Thymidylate synthase stucture, function and implication in drug discovery, **2005,** *Curr. Med. Chem., 12*, 2241-2258

[206] W. R. Monfort, A. Weichsel, Thymidylate synthase : Structure, inhibition and strained conformations during catalysis, *Pharm. Ther.,* **1997,** *76,* 29-43

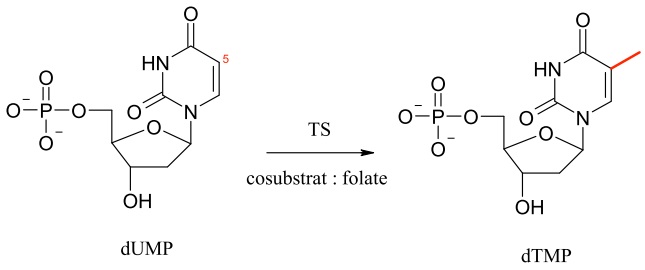


Figure 78 : *Méthylation réductrice de la dUMP en dTMP*

La thymidylate synthase est présente chez presque tous les organismes vivants : bactéries, adénovirus, protozoaires et animaux. Outre la forme ThyA connue depuis longtemps, il a été récemment mis en évidence une seconde forme de thymidylate synthase, la ThyX,[207] qui agit selon un mécanisme différent de ThyA.[208,209] Ces deux formes de TS ne présentent pas d'homologies de séquence[210] ni de structure tertiaire[211], mais ont pourtant la même fonction de méthylation réductrice de la dUMP (Figure 79). Cette absence d'homologies, ainsi que les différences dans leur mécanisme d'action semblent suggérer une origine indépendante pour ces deux formes de la TS.[212]

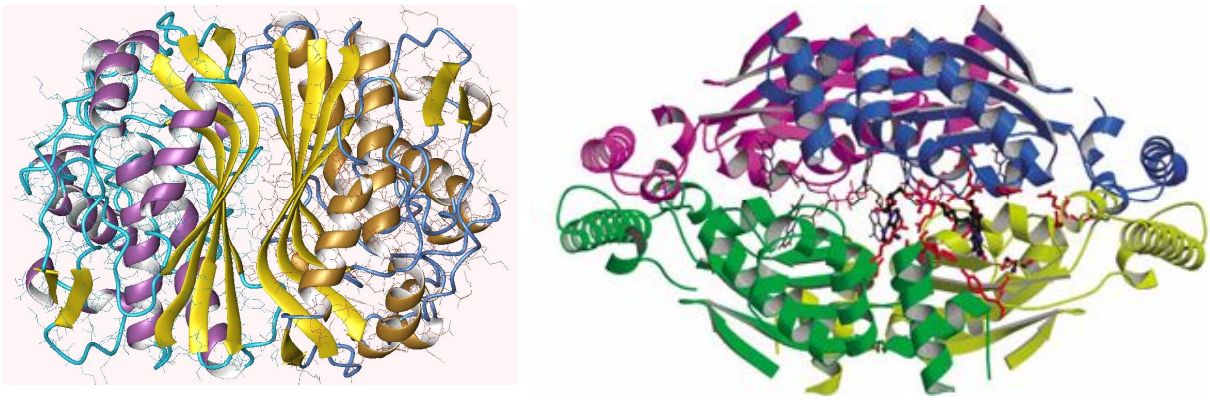


Figure 79 : *(à gauche) l'homodimère ThyA ; (à droite) l'homotétramère ThyX*

[207] H. Myllykallio, G. Lipowski, D. Leduc, J. Filee, P. Forterre, U. Liebl, An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis, *Science,* **2002,** *297*, 105-107

[208] S. Graziani, Y. Xia, J. R. Gurnon, J. L. Van Etten, D. Leduc, S. Skouloubris, H. Myllykallio, U. Liebl, Functional analysis of FAD-dependent thymidylate synthase ThyX from *Paramecium bursaria* chorella Virus-1, *J. Biol. Chem.,* **2004,** *279*, 54340-54347

[209] S. Graziani, J. Bernauer, S. Skouloubris, M. Graille, C.-Z. Zhou, C. Marchand, P. Deconttignies, H. van Tielbeurgh, H. Myllykallio, U. Liebl, *J. Biol. Chem,* **2006,** *281*, 24048-24057

[210] M. Giladi, G. Bitan-Banin, M. Mevarech, R. Ortengerg, Genetic evidence for a novel thymidylate synthase in the halophilic archaeon *Halobacterium salinorum* and *Campilobacter jejuni*, *FEMS Micro. Lett.,* **2002,** *216*, 105-109

[211] P. Kuhn, S. A. Lesley, I. I. Mathews, J. M. Canaves L. S., Brinen, Dai X, A. M. Deacon, M.A. Esliger, R Eshaghi, R. Floyd, Crystal structure of Thy1, a thymidylate synthase complementing protein from *Thermotoga maritima* at 2.25A resolution, *Proteins Struct. Funct. Genet.,* **2002,** *49*, 142-145

[212] A. G. Murzin, DNA building block reinvented, *Science,* **2002,** *297*, 61-62

La forme ThyX est présente dans plus de 30 % des séquences de génomes microbiens aujourd'hui décrits. On la retrouve en particulier chez un grand nombre de bactéries pathogènes humaines, mais elle est absente du génome humain. Elle constitue donc une cible intéressante pour la conception d'inhibiteurs spécifiques de la croissance microbienne.[213]

1. Marquage par Cy5 des TS

Les protéines ThyA et ThyX[214] sont marquées par un agent fluorescent qui est la Cyanine 5 (λ_{ex}=649 nm/λ_{em}=670 nm) (à l'aide d'un kit de marquage Amersham Biosciences). Les cyanines sont des agents fluorescents très intenses et facilement solubles dans l'eau. La Cyanine 5 (Figure 80) possède un acide carboxylique activé par un ester N-hydroxysuccinimide qui va réagir par couplage peptidique avec les amines libres présentes sur les protéines (lysine, arginine).

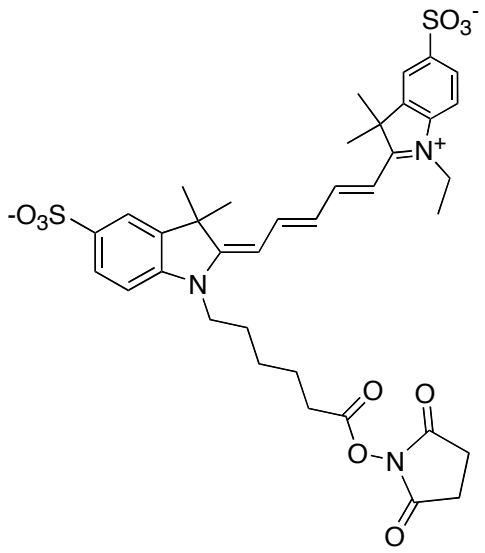


Figure 80 : *Cyanine 5*

Le marquage s'effectue dans un tampon carbonate/bicarbonate à pH = 9,3 pendant une heure à température ambiante. Une fois la protéine marquée, le fluorophore libre et le fluorophore qui s'associe à la protéine sont séparés par chromatographie d'exclusion stérique (éluant : tampon PBS). Plusieurs fractions sont collectées puis dosées pour déterminer leur concentration en protéine. Le dosage des fractions est effectué par la méthode de Bradford.[215]

[213] P. Sampathkumar, S. Turley, C. H. Sibley, W. G. J. Holl, NADP $^{+}$ expels both the co-factor and a substrate analog from the *Mycobacterium tuberculosis* ThyX active site: Opportunities for anti-bacterial drug design, *J. Mol.. Biol.,* **2006,** *360*, 1-6

[214] Protéines ThyA et ThyX fournies par l'équipe de Hannu Myllykallio - Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS UMR 8621, Université Paris Sud, Orsay, France

[215] (a) M. M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*, **1976**, *72*, 248-254 (b) W.J. Kilkowski, G.G.

Cette méthode est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après complexation avec les acides aminées aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la protéine. La forme anionique (liée) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé historiquement à 595 nm. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorants liés, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

Les fractions obtenues après la chromatographie ont en moyenne, que ce soit pour la ThyA ou la ThyX, des concentrations comprises entre 70 et 150 µg/mL.

2. Incubation des puces à petites molécules avec les TS

Les puces à petites molécules sont pré-incubées avec du lait écrémé (protéines non-spécifiques) à forte concentration dans un tampon HEPES (l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-1-éthanesulfonique) puis incubées avec la protéine cible (ThyA ou ThyX) diluée dans du tampon HEPES (C_{ThyA} = 3 µg/mL et C_{ThyX} = 4 µg/mL). Auparavant, des essais d'incubation avaient été réalisés en diluant la protéine dans un tampon PBS, mais ce dernier créait un bruit de fond important, très diminué lors de son remplacement par le tampon HEPES. Après incubation, les lames spottées sont lues par le scanner de fluorescence (λ_{ex} = 635 nm).

3. Résultats

Le criblage de la banque a permis d'identifier une petite molécule (Figure 81) parmi toute la chimiothèque qui présentent une affinité pour la ThyX, il s'agit d'une thiazolidine portant un groupement hydroxyle en position 5 et un propionyle sur l'amine.

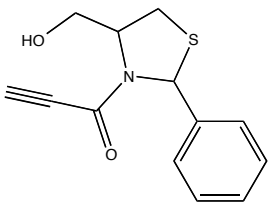


Figure 81 : *4-hydroxyméthyl-2-phenyl-thiazolidine-3-propionyle*

Gross, Color reaction of hydrolyzable tannins with Bradford reagent, Coomassie brilliant blue. *Phytochemistry*, **1999**, *51*, 363-366

Le criblage de la banque avec ThyA-Cy5 (Figure 82) a permis d'identifier 8 petites molécules parmi toute la chimiothèque (Figure 83).

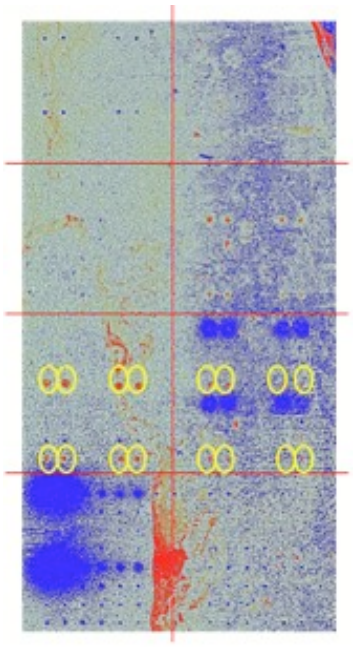
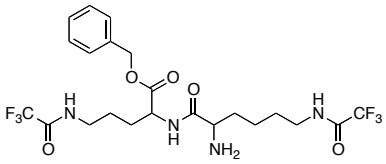
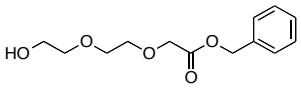


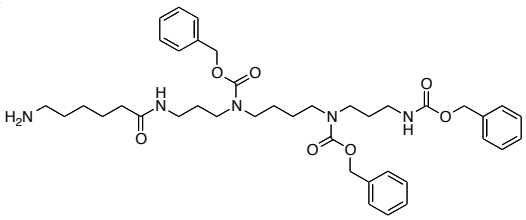
Figure 82 : *Exemple d'une lame incubée avec la ThyA-Cy5 (λ_{ex}=635 nm)*



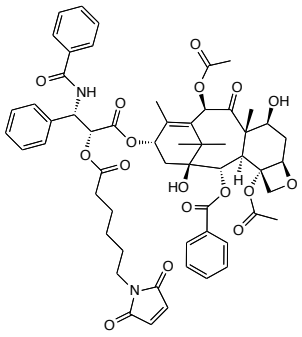
Molécule 69
La plus affine



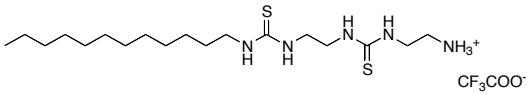
Molécule 70
72% d'affinité (par rapport à la molécule 69)



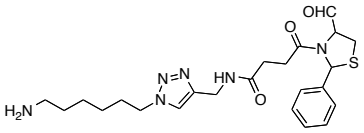
Molécule 71
70% d'affinité (par rapport à la molécule 69)



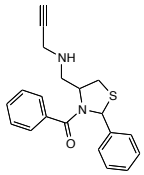
Molécule 72
70% d'affinité (par rapport à la molécule 69)



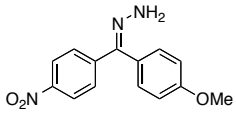
Molécule 73
36% d'affinité (par rapport à la molécule 69)



Molécule 74
32% d'affinité (par rapport à la molécule 69)



Molécule 75
30% d'affinité (par rapport à la molécule 69)



Molécule 76
26% d'affinité (par rapport à la molécule 69)

Figure 83 *: Petites molécules « positives » issues du criblage avec ThyA-Cy5*

Plusieurs types de structures se dégagent de ce criblage avec la ThyA. On y trouve par exemple des thiazolidines (molécules **74** et **75**), un lipide dithiourée (molécule **73**), un dérivé du taxol (molécule **72**) et la plus affine (molécule **69**) qui est issue du couplage peptidique entre la lysine et l'ornithine.

Les criblages réalisés sur la ThyA et la ThyX n'ont pas conduit à l'heure actuelle à l'identification de modulateurs d'activité biologique, mais nous donne quelques éléments pour la synthèse de futurs ligands.

B. Endogline

L'endogline humaine ou CD105[216] est une glycoprotéine transmembranaire homodimérique de 180 kDa découverte en 1985 par le groupe de Letarte (Figure 84).[217]

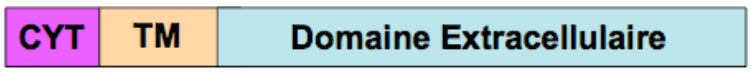


Figure 84 : *Structure de l'endogline humaine. CYT : domaine cytoplasmique (15 acides aminés), TM : domaine transmembranaire (25 acides aminés), Domaine extracellulaire (586 acides aminés).*

[216] J.P. Dales, et al., CD105 expression is a marker of high metastatic risk and poor outcome in breast carcinomas. Correlations between immunohistochemical analysis and long-term follow-up in a series of 929 patient,. *Am. J. Clin. Pathol.,* **2003**, *119*, 374-380

[217] E.J. Quackenbush and M. Letarte, Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. *J. Immunol.,* **1985**, *134*, 1276-1285

L'endogline humaine est phosphorylée de manière constitutive dans les cellules endothéliales. La phosphorylation se retrouve essentiellement au niveau des sérines et des thréonines. La liaison du TGFβ[218] (facteur de croissance transformant bêta) à l'endogline entraîne une régulation négative de sa phosphorylation.

Des études utilisant des anticorps dirigés contre l'endogline ont montré qu'elle est exprimée essentiellement à la surface des cellules endothéliales vasculaires dans les tissus angiogéniques, à la surface des cellules endothéliales microvasculaires et des syncytiotrophoblastes du placenta à terme. L'endogline est d'autre part surexprimée à la surface des cellules de l'endothélium angiogénique des zones tumorales et inflammatoires. D'ailleurs, le promoteur de l'endogline est actif spécifiquement dans les cellules endothéliales.[219]

La plupart des fonctions de l'endogline sont associées à la voie du TGFβ. Le niveau d'expression de l'endogline régule l'expression des différents composants de la matrice extracellulaire. L'endogline joue un rôle crucial dans la transmigration des cellules.
Même si sa fonction n'est pas très claire, l'endogline est impliquée dans les processus suivants :

1. l'angiogénèse : l'endogline est surexprimée à la surface des cellules endothéliales soumises à une angiogénèse d'origine tumorale ou induite par l'hypoxie.[216] Par exemple, le turn-over de l'endogline dans les cellules endothéliales autour des zones tumorales est 20 à 2000 fois plus rapide que dans les tissus normaux.[220] L'expression de l'endogline est corrélée avec l'activation et la prolifération des cellules endothéliales tumorales.[221] Elle est un composant pro-angiogénique dans les cellules endothéliales ;

2. la protection des cellules contre les effets inhibiteurs du TGFβ1[222] ;

[218] **Le Facteur de croissance transformant bêta** (TGF-β) contrôle la prolifération, la différenciation cellulaire, et d'autres fonctions dans la plupart des cellules. Il joue un rôle dans l'immunité, le cancer. Certaines cellules sécrètent des TGF-β, et ont aussi des récepteurs pour le TGF-β. C'est ce qu'on appelle la signalisation autocrine. Les cellules cancéreuses augmentent leur production de TGF-β, qui agit également sur les cellules environnantes. TGF-β est une protéine qui existe sous trois isoformes appelé TGF-β1, TGF-β2 et TGF-β3.

[219] W. Graulich, et al., Cell type specificity of the human endoglin promoter. *Gene*, **1999**, *227*, 55-62

[220] S. Cheifetz, et al., Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells*, J. Biol. Chem*., **1992**, *267*, 19027-19030

[221] L. Jonker and H.M. Arthur, Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mech Dev*, **2002**, *110*,193-196

[222] (a) P. Lastres, et al., Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1, *J. Cell. Biol.,* **1996**, *133*, 1109-1121 ; (b) C. Li, et al., CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells, *FASEB J.,* **2000**, *14*, 55-64

3. le développement du système vasculaire : des souris invalidées pour le gène de l'endogline souffrent de multiples problèmes vasculaires et cardiaques qui entraînent leur mort au stade embryonnaire précoce. A partir du 9ème jour embryonnaire, le plexus vasculaire primitif du sac jaune n'est pas capable de former de vaisseaux matures, ce qui aboutit à une dilatation des vaisseaux, des ruptures et hémorragies. L'endogline est donc nécessaire à la formation des vaisseaux sanguins matures dans la vascularisation extra-embryonnaire[221] ;

4. la protection contre l'apoptose.[223]

1. Importance du ciblage de l'endogline à des fins thérapeutiques

Utilisation de l'endogline pour le pronostic tumoral

De nombreuses études ont identifié l'endogline comme un outil potentiel dans le diagnostic, le suivi de la progression de la maladie et la prédiction des réponses aux traitements en clinique.

Une étude de Takahashi et son équipe a montré une corrélation entre le taux d'endogline soluble dans le sérum et les métastases chez des patients atteints de tumeurs colorectales ou du sein.[224] Or les métastases constituant la cause majeure de mort par cancer, leur détection précoce est fondamentale. De manière intéressante, la chimiothérapie diminue le taux d'endogline soluble dans le sérum. Ces résultats montrent que le taux d'endogline circulant permet de détecter les patients ayant une maladie à un stade avancé et de prédire les risques de métastases.

Utilisation d'anticorps anti-endogline pour l'imagerie tumorale

Les intérêts de l'imagerie consistent à pouvoir suivre, à travers une méthode non invasive, l'évolution de la maladie et évaluer l'efficacité de médicaments en essais cliniques. La surexpression de l'endogline dans l'endothélium en prolifération et sa localisation à la face luminale des vaisseaux en font une cible idéale pour la détection de tumeurs avec un anticorps. Les premières études ont été réalisées avec des anticorps radiomarqués dirigés contre l'endogline (dans un modèle de tumeur B16 chez la souris[225] et dans un modèle

[223] B. Guo, et al., CD105 (endoglin), apoptosis, and stroke. *Stroke*, **2004**, *35*, 94-95

[224] N. Takahashi, et al., Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suprressive effect of chemo therap on the serum endoglin, *Clin. Cancer Res*., **2001**, *7*, 524-532

[225] S. Bredow, et al., Imaging of tumour neovasculature by targeting the TGF-beta binding receptor endoglin. *Eur. J. Cancer*, **2000**, *36*, 675-681

spontané d'adénocarcinome mammaire chez le chien[226]) et ont permis de réaliser une immunoscintigraphie des tumeurs. Ces essais ont montré que l'endogline est une bonne cible pour l'imagerie et qu'elle pourrait être utilisée dans le cadre d'autres maladies angiogéniques.

En conclusion, l'endogline constitue une cible intéressante pour le ciblage de la vascularisation tumorale dont la faisabilité a été démontrée. Dans notre étude, nous avons utilisé la technologie des puces à petites molécules pour rechercher des ligands de l'endogline.

2. Marquage par Cy5 et incubation avec la chimiothèque miniaturisée

L'endogline est marquée par de la Cyanine 5 (λ_{ex} = 649 nm / λ_{em} = 670 nm) (à l'aide d'un kit de marquage Amersham Biosciences).[227] Le protocole de marquage est identique à celui des thymidylate synthase. Les fractions d'endogline marquée récupérées (Figure 85) après la chromatographie d'exclusion ont été dosées par la méthode BCA. La méthode BCA, ou BC Assay, est un dosage colorimétrique des protéines, basé sur l'acide bicinchonique. Les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu(II) en Cu(I) en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cu(I) : il forme un complexe pourpre ayant une absorption optique maximale à 562 nm (peut être lue entre 540 et 590 nm). L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines. Les concentrations obtenues pour les fractions 3 et 4 sont respectivement de 80 µg/ml et 52 µg/ml.

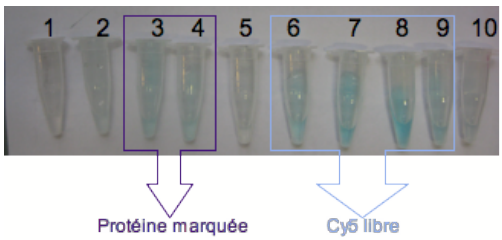


Figure 85 : *Fractions récupérées après la purification sur gel d'exclusion stérique*

D'autre part, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide a permis de vérifier que les fractions 3 et 4 contenaient bien de l'endogline (Figure 86).

[226] E. Fonsatti, et al., Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model, *Clin. Cancer Res*., **2000**, *6*, 2037-2043

[227] Endogline marquée fournie par l'équipe de Virginie Escriou – UPCGI – UMR8151/U1022 - Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, 4 av. de l'Observatoire 75270 Paris cedex 06

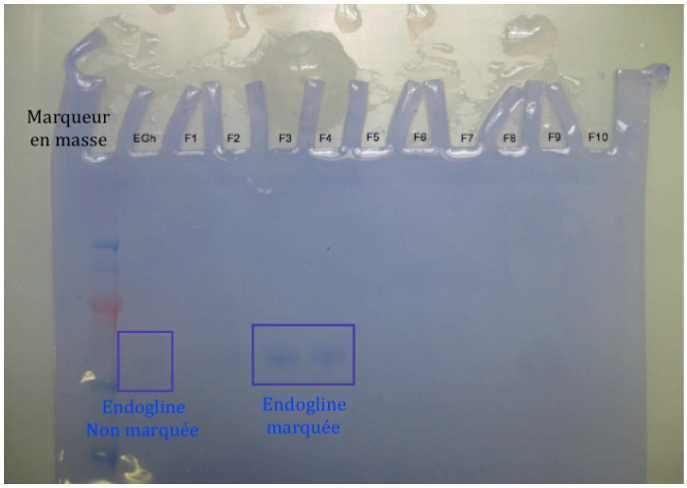


Figure 86 : *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide*

Les puces à petites molécules obtenues sont ensuite incubées avec l'endogline marquée à une concentration de 2 µg/ml dans du tampon PBS pendant 1 heure à l'abri de la lumière. Après élimination de l'excédant de protéine, la banque miniaturisée incubée est ensuite directement analysée à l'aide d'un scanner à fluorescence à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore, soit λ = 635 nm.

3. Résultats

Le criblage de la banque a permis d'identifier 7 petites molécules parmi toute la chimiothèque qui présentent une affinité pour l'endogline (Figure 87).

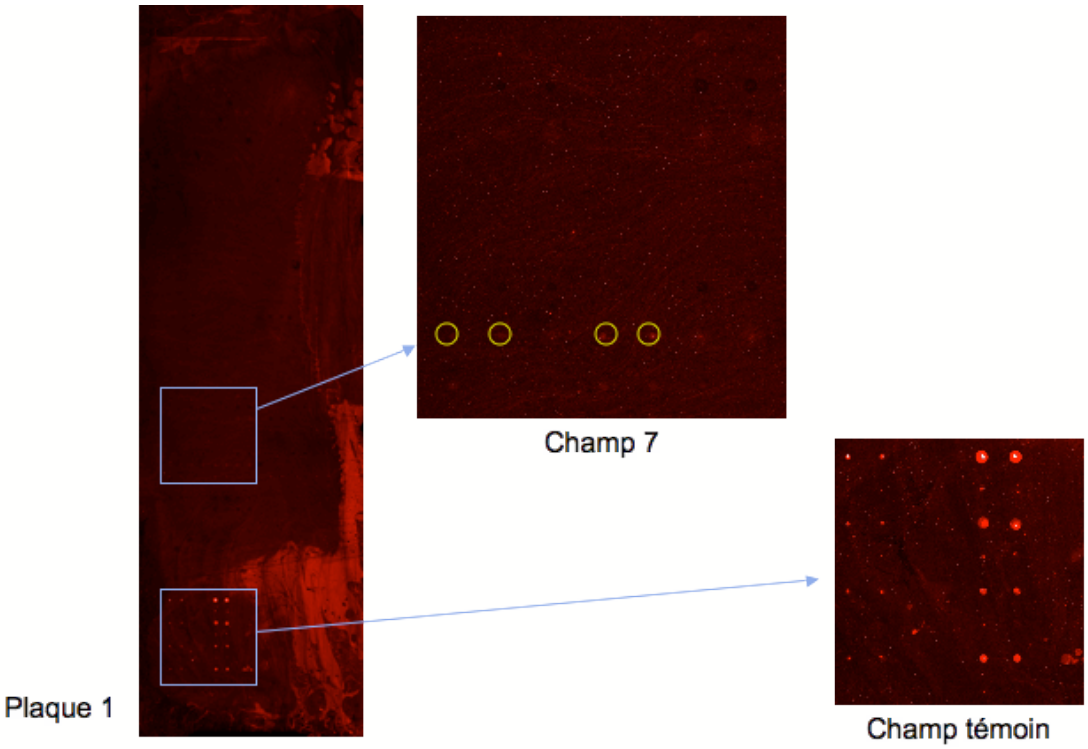
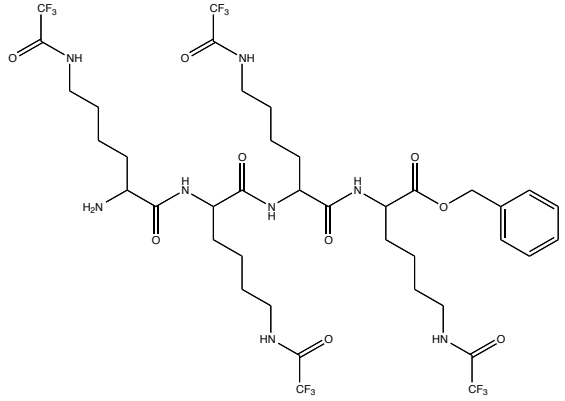
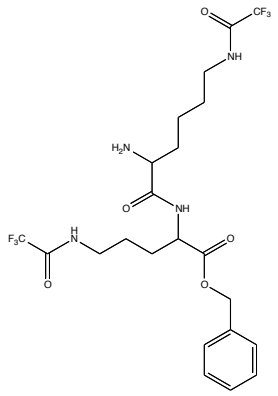


Figure 87 : *Exemple d'une lame incubée avec l'endogline-Cy5 (λ_{ex}=635 nm)*

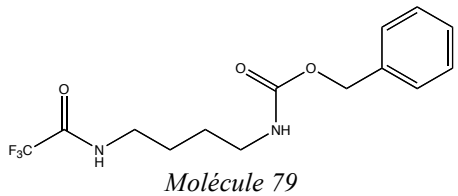
Deux types de familles de petites molécules ont été mises en évidence : des polylysines protégées par un groupement TFA et par un benzyle, des dérivés d'acides carboxyliques protégés par un benzyle (Figure 88) et des dérivés aliphatiques d'acide α-hydroxylé et β-azidé (Figure 89).



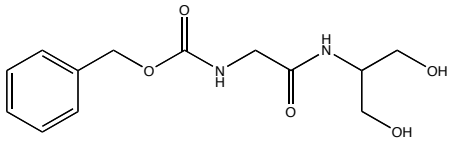
Molécule 77
La plus affine



Molécule 78
95 % d'affinité (par rapport à la molécule 77)

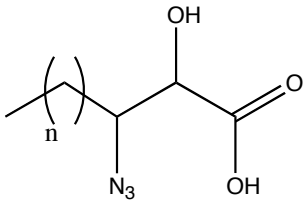


Molécule 79
65 % d'affinité (par rapport à la molécule 77)



Molécule 80
75 % d'affinité (par rapport à la molécule 77)

Figure 88 : *Famille de polylysines et d'intermédiaires issus de la synthèse de la polylysine*



N = 4 ➔ **42 %** d'affinité *(par rapport à la molécule 77)*
N = 5 ➔ **50 %** d'affinité *(par rapport à la molécule 77)*
N = 7 ➔ **79 %** d'affinité *(par rapport à la molécule 77)*

Figure 89 : *Famille d'acide α-hydroxylé et β-azidé*

Une première constatation a pu être obtenue parmi la famille des polylysines, plus il y a de groupements attracteurs et plus l'affinité pour l'endogline est grande. Une deuxième constatation a pu être mise en évidence parmi la seconde famille, plus la chaîne alkyle est longue et plus l'affinité est grande. Ce criblage n'a pas abouti à la mise en évidence de réels modulateurs d'activité biologique ciblant l'endogline, mais nous donne quelques éléments pour la synthèse de futurs ligands. Ils doivent posséder des groupements attracteurs de type TFA et de longues chaînes alkyles.

Les difficultés rencontrées lors de ce criblage sont dues au faible marquage de la protéine, les spots étaient trop peu intenses pour réellement confirmer les affinités mesurées.

Afin d'obtenir de meilleurs résultats, nous travaillons actuellement à marquer l'endogline avec un fluorophore plus efficace, le DyLight 649 NHS Ester (chromophore dérivé de cyanine qui a été sulfonatée). Ce marquage nous permettra de travailler avec des concentrations assez faibles en endogline, qui est le produit limitant dans ce criblage.

C. Vpr

Vpr est une protéine accessoire du VIH-1 impliquée dans différentes étapes de la réplication virale.

1. VIH

Le VIH (Figure 90), agent étiologique du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) chez l'homme, prend pour cible toutes cellules exprimant à sa surface, le CD4 (dont principalement les lymphocytes T CD4+). Cette protéine membranaire lui permet de sélectionner l'hôte, de s'adsorber, puis de fusionner avec la membrane cellulaire, permettant ainsi l'entrée de la capside dans le cytoplasme. Arrivée dans le milieu intracellulaire, la capside se dissocie en libérant son contenu (le génome sous forme de deux ARN monocaténaires, des enzymes, des protéines). Le VIH appartient à la famille des *Retrovidae*, donc son ARN doit être rétrotranscrit au préalable en ADN proviral double brin complémentaire à l'aide de la transcriptase inverse (une enzyme non fidèle) avant l'incorporation dans le génome de l'hôte. L'ADN proviral synthétisé s'associe au complexe de préintégration (PIC), formé par l'intégrase (enzyme catalysant l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de l'hôte), Vpr (une protéine de régulation virale), et d'autres protéines virales autres que celles citées ci-dessus, pour s'introduire dans le noyau et fusionner avec l'ADN de l'hôte.

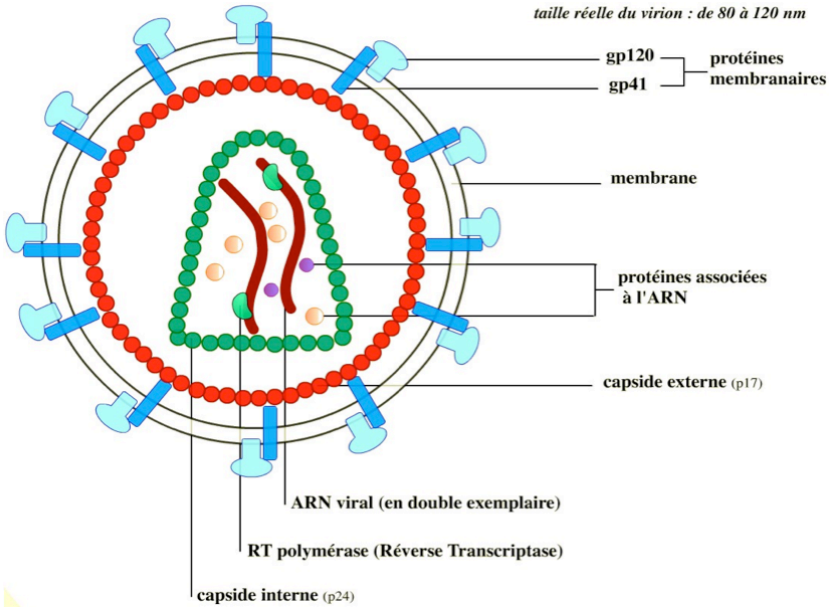


Figure 90 : *Structure du VIH*[228]

Le génome viral est alors transcrit en ARN prémessager (à l'aide de l'ARN polymérase), qui après excision des introns, permettent la synthèse de protéines rétrovirales (grâce aux ribosomes). Lorsqu'elles sortent de l'appareil de Golgi (étape de maturation), les différentes protéines ne sont pas encore clivées (polyprotéine Gag) et sont transportées au niveau de la membrane plasmique où elles rejoignent les glycoprotéines virales membranaires, laissées lors de la fusion de l'enveloppe virale. Pendant l'étape suivante, deux copies d'ARN sont encapsidées et dimérisent au niveau de leurs extrémités par la formation de ponts hydrogènes. Les protéines de structure s'assemblent alors pour former la capside, la matrice, englobant le matériel nécessaire à l'infection d'une cellule saine. Ce pré virion bourgeonne alors en emportant une partie de la membrane cellulaire et devient infectieux après le clivage des différentes protéines de structure (Figure 91).

[228] Site internet "Vie", site ressource en Sciences de la Vie - ENS / DGESCO / UPMC 1999-2011

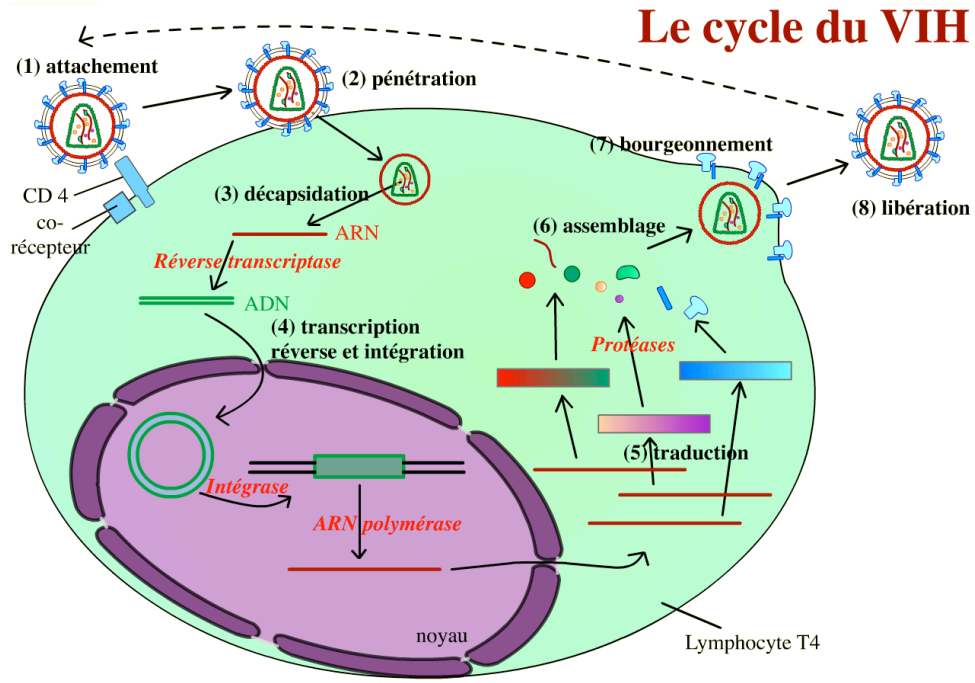


Figure 91 : *Schéma simplifié du cycle réplicatif du VIH*[228]

Il existe des molécules pouvant compromettre ce cycle de réplication : les antiviraux. Cependant leur efficacité est controversée de par le développement d'effets secondaires chez le patient, l'incapacité d'éradiquer les virions et l'apparition de résistances. C'est pourquoi il est nécessaire de rechercher une cible d'origine virale qui est conservée à travers les générations telle que la protéine de régulation Vpr.

2. Choix de Vpr comme cible thérapeutique

Vpr est une protéine, de 96 acides aminés (soit 12 kDa) (Figure 92), fortement conservée à travers les générations de par sa position centrale dans le génome virale (Figure 93), et qui est de plus présente en grande quantité dans le virion (environ 275 copies).[229]

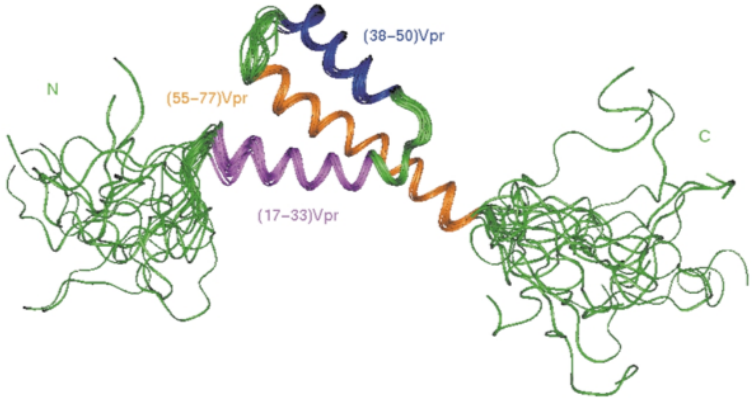


Figure 92 : *Structure de Vpr : Segment N terminal non structuré, 3 hélices α, Segment C terminal non structuré*

[229] N. Morellet, S. Bouaziz, P. Petitjean, B. P. Roques, NMR Structure of the HIV-1 Regulatory Protein VPR, *J. Mol. Biol.*, **2003**, *327*, 215-227

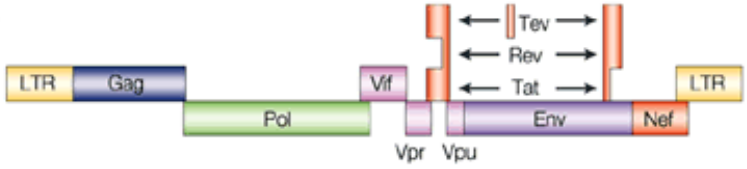


Figure 93 : *Génome du VIH*[230]

Cette protéine de régulation est impliquée dans plusieurs étapes primordiales de la réplication, se déroulant au début du cycle réplicatif, au niveau de la rétrotranscription, de l'importation nucléaire du complexe de préintégratoin viral (PIC), de l'arrêt en phase G2/M ainsi que dans la régulation de l'apoptose.[231]

Rétrotranscription

Sa présence est en effet requise lors des étapes précoces de l'infection car elle participe à la rétro-transcription de l'ARN viral en ADN, puis intervient dans le transport de l'ADN viral vers le noyau.[232] Après l'entrée du virus, l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme où la reverse transcriptase (RT) catalyse la synthèse de l'ADN viral au sein du complexe de rétro-transcription. La présence de Vpr permet alors de réduire les erreurs introduites par la RT.

Importation nucléaire

L'ADN viral issu de la rétro-transcription est ensuite transporté dans le noyau puisque son intégration au génome cellulaire constitue une étape obligatoire à la réalisation du cycle viral. Le VIH-1 a développé un mécanisme actif de transport de son ADN dans le noyau de la cellule infectée. L'import de cet ADN s'effectue au sein du complexe de pré-intégration (PIC), complexe nucléoprotéique dont Vpr représente l'un des constituants. Vpr, étant de nature karyophilique possède une forte affinité pour l'enveloppe nucléaire résultant de sa capacité à interagir avec la nucléoporine hCG1, constituant du pore nucléaire (NPC). Cette interaction est responsable de l'ancrage de Vpr au NPC, et assure le recrutement du PIC à l'enveloppe nucléaire pour permettre ensuite sa translocation dans le noyau.

Arrêt en phase G2/M

La cellule se duplique selon un cycle ordonné en quatre phases : G1 (préparation à la

[230] M. Burkrinsky, A. Adzhubei, Viral Portein R of HIV-1, *Rev. Med. Virol*., **1999**, *9*, 39-49
[231] N. Morellet, B. P. Roques, S. Bouaziz, Structure-function relationship of Vpr : biological implications, *Current HIV Research*, **2009**, *7*, 184-210
[232] E. Le Rouzic, S. Benichou, The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle, *Retrovirology,* **2005**, 2-11

multiplication cellulaire), S (réplication), G2 (intense activité de biosynthèse), M (mitose). Cependant il n'est pas rare que des erreurs se produisent au cours de ces étapes et c'est pour cette raison, qu'existe dans la cellule un système voué à la réparation, qui est activé durant l'arrêt du cycle, au niveau d'un point de contrôle, par exemple G2/M. Le cycle cellulaire est alors stoppé de façon à permettre au système de réparation de l'ADN de se mettre en place. Vpr peut bloquer le cycle cellulaire dans l'état de transition G2/M en inhibant la kinase ATR, qui est capable de réparer l'ADN par reconnaissance de toute altération anormale du mécanisme de réplication : inhibition de la synthèse d'ADN, cassure double brins (lésions)... Cet arrêt du cycle cellulaire en phase G2 aurait pour but de favoriser la réplication du matériel génétique viral.

Apoptose déclenchée par Vpr

L'apoptose est une mort cellulaire programmée pour éliminer les cellules oncogènes (anormales) et limiter la perturbation du fonctionnement tissulaire. Lorsque la protéine de régulation Vpr est traduite en grande quantité dans le cytoplasme, cette dernière prend pour cible la mitochondrie. Vpr est capable de provoquer l'apoptose en altérant la perméabilité des membranes mitochondriales.

De par ses nombreuses interactions avec des ligands de nature cellulaires ou virales, son importante conservation, sa présence en grande quantité, Vpr constitue une cible privilégiée pour la recherche de nouveaux antiviraux. Principalement aux premières étapes du cycle viral (transcription inverse et transport de l'ADN bicaténaire au noyau), où son implication est prépondérante pour le bon déroulement. C'est pourquoi nous avons utilisé cette méthode de criblage par puces à petites molécules pour identifier un nouveau modulateur d'activité de la protéine Vpr.

3. Marquage de Vpr par Dy light 649 et Incubation

La protéine Vpr a été couplée au fluorophore « *DyLight 649 NHS Ester* » par ses amines primaires soit en N terminal et sur les lysines présentes dans la séquence peptidique suivante : MEQAPEDQGP QREPYNDWTL ELLEELKNEA VRHFPRIWLH SLGQHIYETY GDTWTGVEAL IRILQQLLFI HFRIGCRHSR IGIIQQRRTR NGASKS[233].

[233] Protéine Vpr marquée fournie par l'équipe de Serge Bouaziz - UMR 8015 - Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, 4 av. de l'Observatoire 75270 Paris cedex 06

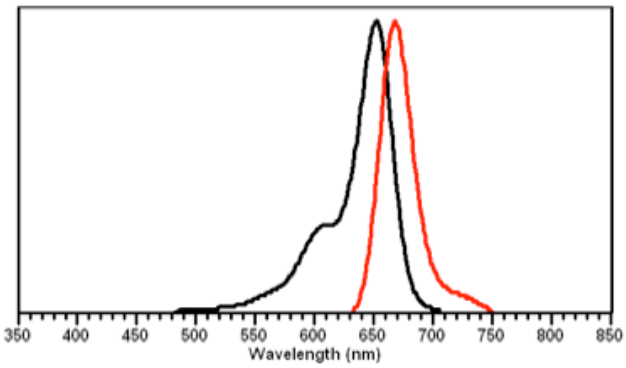
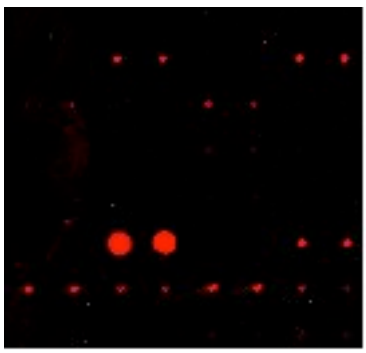


Figure 94 : *Spectres d'absorption et d'émission du DyLight 649 NHS Ester*

Les puces à petites molécules obtenues (4 lames – dépôt de 4 réplicats par molécule) sont ensuite incubées avec la protéine Vpr marquée à une concentration de 1 µg/ml dans un mélange H_2O MilliQ/CH_3CN (70/30). Après élimination de l'excédant de protéine, la banque miniaturisée incubée est ensuite directement analysée à l'aide d'un scanner à fluorescence à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore, soit λ = 635 nm.

4. Résultats

Le premier criblage de la banque a permis d'identifier 96 molécules réparties sur 4 lames après élimination des molécules autofluorescentes et en ne gardant que les molécules dont au moins 3 des réplicats étaient positifs (Figure 95).



A	A	B	B	A	A	B	B
C	C	D	D	C	C	D	D
E	E	F	F	E	E	F	F
G	G	H	H	G	G	H	H
I	I	J	J	I	I	J	J
K	K	L	L	K	K	L	L
M	M	N	N	M	M	N	N
O	O	P	P	O	O	P	P

Figure 95 : *Agrandissement d'une lame incubée avec Vpr associé au patron de réplication des petites molécules*

Afin de pouvoir comparer ces petites molécules entre elles, une chimiothèque réduite à ces 96 touches a été déposée sur une seule lame, puis incubée à nouveau avec la protéine Vpr et a permis d'établir un classement d'affinité de ces petites molécules avec la protéine Vpr (Figure 96). En effet, nous avons montré au paragraphe III.B qu'il existait une corrélation entre l'intensité des spots et l'affinité entre la petite molécule greffée et la protéine cible.

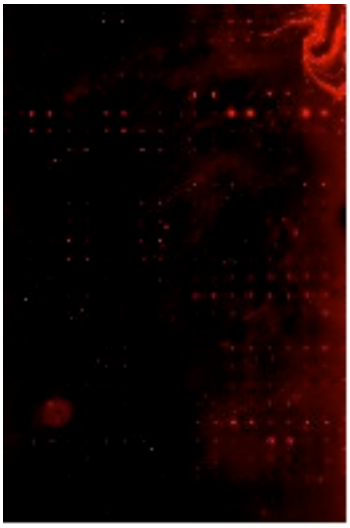
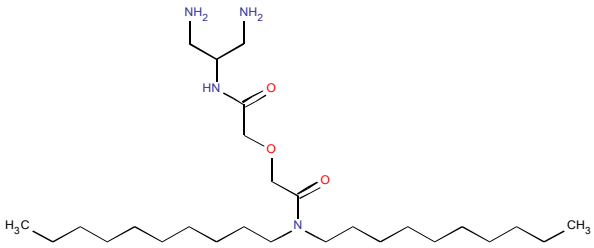
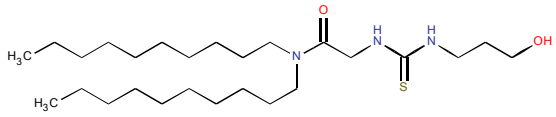


Figure 96 : *Image de la banque de 96 molécules après incubation*

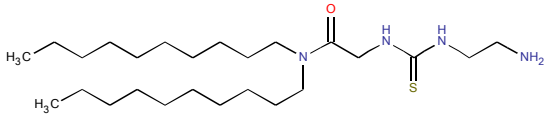
Les molécules les plus affines avec Vpr sont principalement des lipides soit couplés à l'acide diglycolique (*molécule **81***), soit dérivés de monothiourée ou dithiourée (*molécules **82 à 87***) (Figure 97).



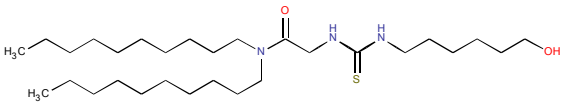
*Molécule 81 – **la plus affine***



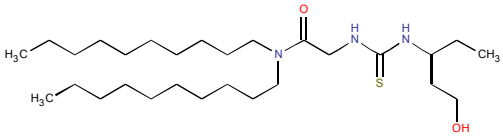
Molécule 82
***98% d'affinité** (par rapport à la molécule 81)*



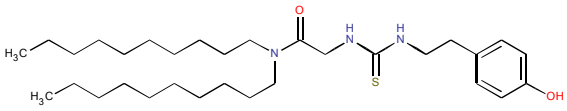
Molécule 85
***50% d'affinité** (par rapport à la molécule 81)*



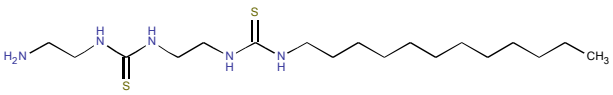
Molécule 83
***98% d'affinité** (par rapport à la molécule 81)*



Molécule 86
***65% d'affinité** (par rapport à la molécule 81)*



Molécule 84
***60% d'affinité** (par rapport à la molécule 81)*

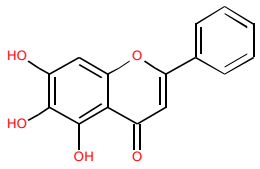


Molécule 87
***88% d'affinité** (par rapport à la molécule 81)*

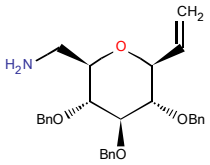
Figure 97 : *Famille de lipides les plus affins avec la protéine VPR*

Or il a été démontré que la protéine VPR interagissait avec des lipides[234] pour faciliter sa réplication. Donc, il nous est apparu que ces touches ne pourraient pas constituer de potentiels modulateurs d'activité. C'est pourquoi un second classement a été obtenu en éliminant les petites molécules ayant une structure proche de lipides (Figure 98). Nous avons pu identifier des sucres ayant des fonctions alcénique ou nitrile (***molécules 88 à 90***) comme de potentiels modulateurs d'activité. On retrouve aussi dans ce classement des petites molécules de type flavonoïdes comme la ***Baïcaléine*** ou la ***Quercétine***. Cette dernière touche est intéressante car il a été montré que la quercétine[235] inhibait efficacement les fonctions de Vpr sans affecter son expression permettant ainsi d'inhiber la réplication du VIH.

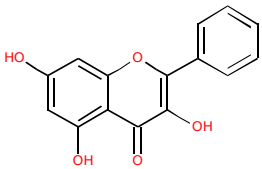
[234] G. Salgado, A. Vogel, R. Marquant, S. E. Feller, S. Bouaziz, I. D. Alves, *J. Med. Chem*, **2009**, *52*, 7157-7162
[235] M. Shimura, Y. Zhou, Y. Asada, T. Yoshikawa, K. Hatake, F. Takaku, Y. Ishizaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **1999**, *261*, 308-316



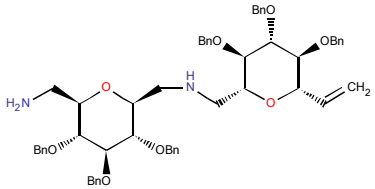
Baïcaléine
75% d'affinité *(par rapport à la molécule 81)*



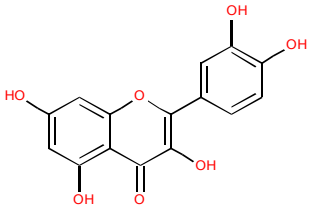
Molécule 88
52% d'affinité *(par rapport à la molécule 81)*



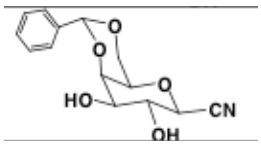
Galangine
30% d'affinité *(par rapport à la molécule 81)*



Molécule 89
54% d'affinité *(par rapport à la molécule 81)*



Quercétine
60% d'affinité *(par rapport à la molécule 81)*



Molécule 90
70% d'affinité *(par rapport à la molécule 81)*

Figure 98 : *Exemples de petites molécules non-lipidiques « positives »*

D'autre part, une étude de docking moléculaire (Autodock4)[236] a été réalisée permettant de prédire le site de fixation de la quercétine dans la protéine Vpr. Le docking moléculaire repose sur un algorithme qui évalue la capacité d'interaction de plusieurs inhibiteurs potentiels sur une cible (pharmaceutique), le plus souvent une protéine. La sélection du meilleur candidat est basée sur l'évaluation énergétique de l'association ligand/récepteur traduisant l'affinité réciproque des deux partenaires.

La quercétine est adsorbée à la surface du récepteur sur la première et la troisième hélice α avec une énergie de liaison équivalente à -14.14 kJ/mol pour la meilleure modélisation (Figure 99). Cette association est maintenue par des interactions hydrophobes, une liaison hydrogène entre l'hydroxyle du carbone 4' de la quercétine (donneur) et la fonction carboxyle de l'acide glutamique 25 (accepteur). Le site actif a été déterminé avec un pourcentage de 70 %.

[236] Rapport de stage de LARGEN Robert 2ème année BTS Biotechnologies 2008/2009

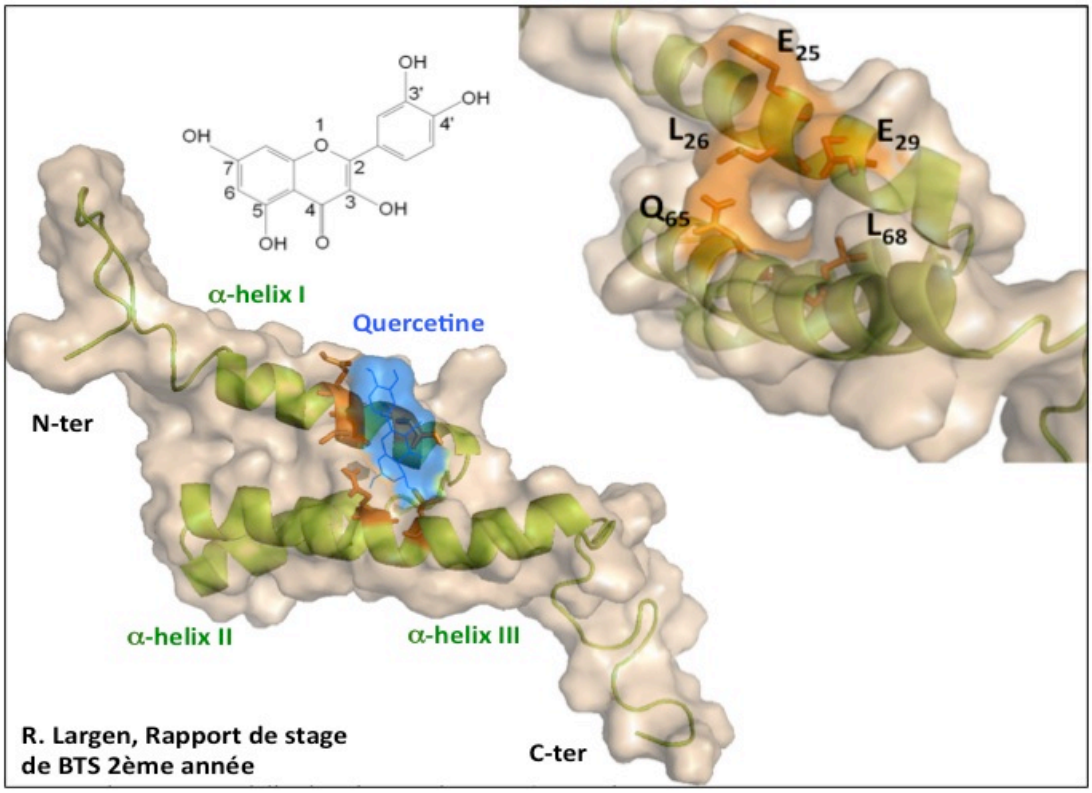


Figure 99 : *Modélisation du complexe Vpr/Quercétine*

Les résultats de cette étude ainsi que ceux obtenus par l'équipe de Shimura qui décrivent la quercétine comme interagissant avec Vpr lors d'un crible de produits naturels nous permettent de valider notre méthode de criblage de protéine fluorescente par les puces à petites molécules.

Cependant, l'intensité de fluorescence des spots positifs n'étant pas un indicateur direct de l'affinité entre ladite petite molécule et la protéine cible, un second criblage d'affinité est nécessaire pour confirmer les interactions des candidats et mesurer le niveau d'affinité. En effet, la fluorescence peut varier en fonction de la concentration des composés (***Figure 95 – molécule L***), la réactivité de la surface de la lame et l'hétérogénéité des spots causés par la multitude d'orientation des petites molécules spottées. Un de ces criblages secondaires peut consister à déterminer par RMN l'influence des complexes petite molécule-protéine sur les effets NOE par rapport à la protéine seule. Il existe aussi d'autres méthodes en mesurant les interactions entre un complexe protéine-métal et un ligand spécifique par des mesures de résonance plasmonique de surface (SPR Biacore ®), ou détectant les interactions protéine-ligand en mesurant la stabilisation thermique des complexes protéine-ligand (ThermoFluor ®).

5. Criblage secondaire par RMN

Le criblage par RMN est une technique de criblage structural basée sur la détermination de la structure des complexes ligand-récepteur. Cette technique permet de savoir si l'échantillon interagit avec la cible étudiée et, si oui, comment et avec quelle affinité. Dans le domaine de la RMN à haut champs en particulier, l'apparition de nouvelles séquences d'impulsions qui permettent de simplifier les spectres, de marquer de manière orientée ou indifférenciée les atomes d'azote et de carbone des protéines, a grandement facilité le criblage par RMN.[237]

Le criblage par RMN est basé sur la différence de temps de relaxation entre une petite molécule et une protéine. Les petites molécules que sont en général les médicaments sont caractérisées par des temps de relaxation longs, tandis que les molécules volumineuses présentent des temps de relaxation court.

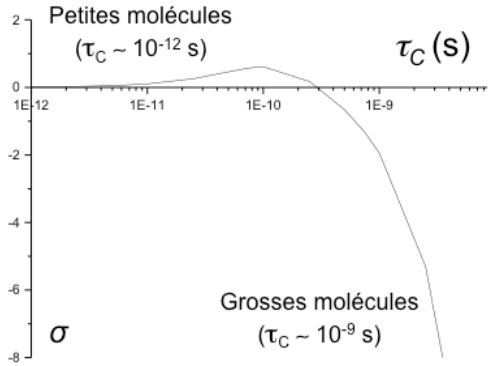


Figure 100 : *Temps de corrélation des molécules en fonction de la relaxation croisée*

Ceci est la clef de l'évaluation de l'ancrage d'une substance à une protéine. La technique consiste à mesurer le spectre RMN d'une protéine en présence de différentes concentrations de petites molécules. La présence d'un ligand modifie l'environnement des noyaux atomiques de la protéine, dont les déplacements chimiques sont perturbés. La mesure de ces perturbations à plusieurs concentrations de ligand permet de déterminer le Kd du ligand. Si le spectre de la protéine a été attribué, on peut en outre repérer les zones d'interaction entre le ligand et la protéine, hypothèse étant faite que les acides aminés en contact avec le ligand sont ceux dont les déplacements chimiques sont perturbés.

[237] (a) P. J. Hajduk, T. Gerfin, J. M. Boehlen, M. Haberli, D. Marek, S. W. Fesik, High-trhoughput nulcear magnetic resonance-based screeening, *J. Med. Chem*., **1999**, *42*, 2315-2317 ; (b) H. Widmer, W. Jahnke, Protein NMR in biomedical research, *Cell Mol. Life Sci*., **2004**, *61*, 580-599 ; (c) C. Smet, J-F. Duckert, J-M. Wieruszeski, I. Landrieu, L. Buee, G. Lippens, B. Deprez, Control of protein-protein interactions : structure-based discovery of low molecular weight inhibitors of the interactions between Pin1 WW domain an phosphopeptides, *J. Med. Chem*., **2005**, *8*, 4815-4823

Ce procédé permet d'identifier des petites molécules ayant de très faibles affinités, mais aussi qui se fixent sur des portions peu étendues du site de reconnaissance du récepteur. Le criblage par RMN est complémentaire du criblage à haut débit. Cette dernière technique peut donner de faux résultats positifs. Un contrôle subséquent par RMN permet de s'assurer que les composés retenus se fixent bien dans le site de reconnaissance étudié.

Suite au criblage par puces à petites molécules, deux familles de molécules ont été identifiées comme interagissant avec Vpr : des flavones et des molécules dérivées de sucres. Malheureusement, les flavones sont quasiment insolubles dans les conditions d'étude de la protéine Vpr. Nous avons donc choisi de confirmer l'interaction entre Vpr et les molécules dérivées de sucres, telle que la molécule **90** (Figure 98), par RMN et en particulier par des expériences de type WaterLogsy (*water–ligand observed via gradient spectroscopy*).

Les expériences WaterLOGSY[238] constituent un outil intéressant pour le criblage par RMN de chimiothèques. Elles permettent de discriminer aisément entre des molécules se liant la protéine et celles ne se liant pas à la protéine en fonction de l'intensité des pics. La méthode repose sur l'excitation du complexe protéine/ligand à travers une excitation sélective du pic de l'eau.

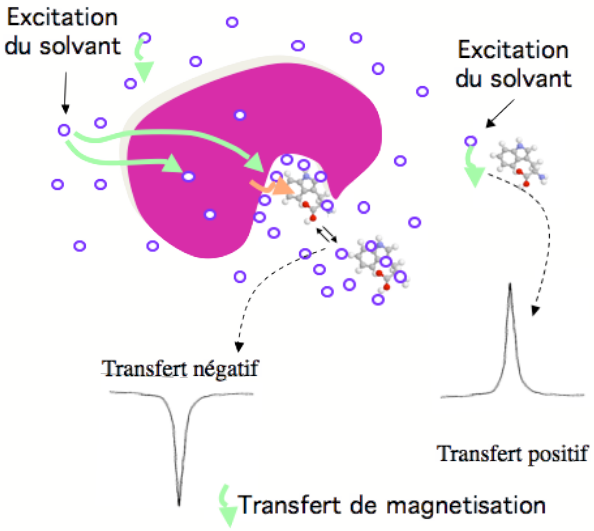


Figure 101 : *Principe de l'expérience de WaterLOGSY*

L'aimantation de l'eau est transférée, *via* le complexe ligand-cible, à un ligand libre en solution. En inversant de manière sélective la résonance de l'eau, l'aimantation de l'eau est

[238] (a) Dalvit *et al*., *J. Biomol. NMR*, **2001**, *21*, 349-359 ; (b) C. Dalvit, *J. Magn. Reson.*, **1996**, *112*, 282-288 ; (c) C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tatï, M. Veronesi, A. Vulpetti and M. Sundstroem, *J. Biomol. NMR*, **2000**, *18*, 65-68

donc transférée à la cible et puis finalement au ligand. Cette expérience repose sur la différence de relaxation croisée observée entre l'eau et les ligands liés à la protéine cible d'une part et les composés libres ne se liant pas à la protéine d'autre part. En ce qui concerne les composés libres ne se liant pas à la macromolécule, les phénomènes de relaxation sont dominés par un temps de corrélation court conduisant à un signal de relaxation croisée de signe positif. Pour les ligands se liant à la protéine, on observe une vitesse de relaxation croisée négative en raison du temps de corrélation de la petite molécule assimilée maintenant au temps de corrélation élevé de la macromolécule. Les composés liant la protéine donneront sur le spectre un signal de signe opposé aux composés ne liant pas la protéine.

Nous avons cherché à étudier l'interaction entre la molécule **90** et Vpr lors de l'expérience WaterLogsy (Figure 102), dont le principe a été décrit ci-dessus.

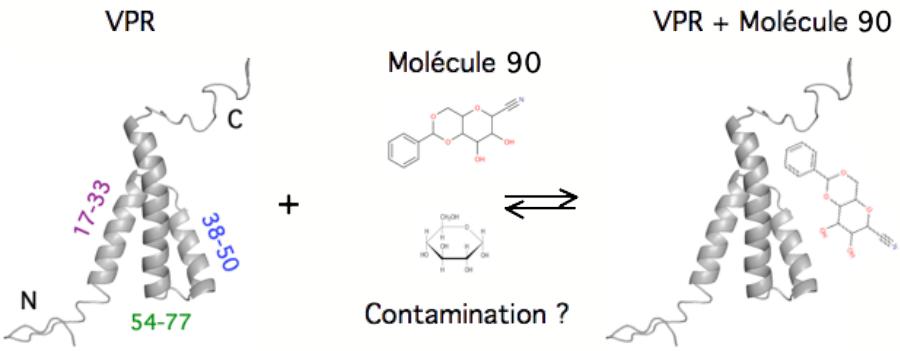


Figure 102 : *Partenaires de l'interaction étudieé lors de l'expérience WaterLogsy*

L'observation de la molécule **90** seule (expérience de référence ZGESGP) et en interaction avec Vpr entraîne des modifications au niveau de ses propriétés de diffusion et de relaxation.

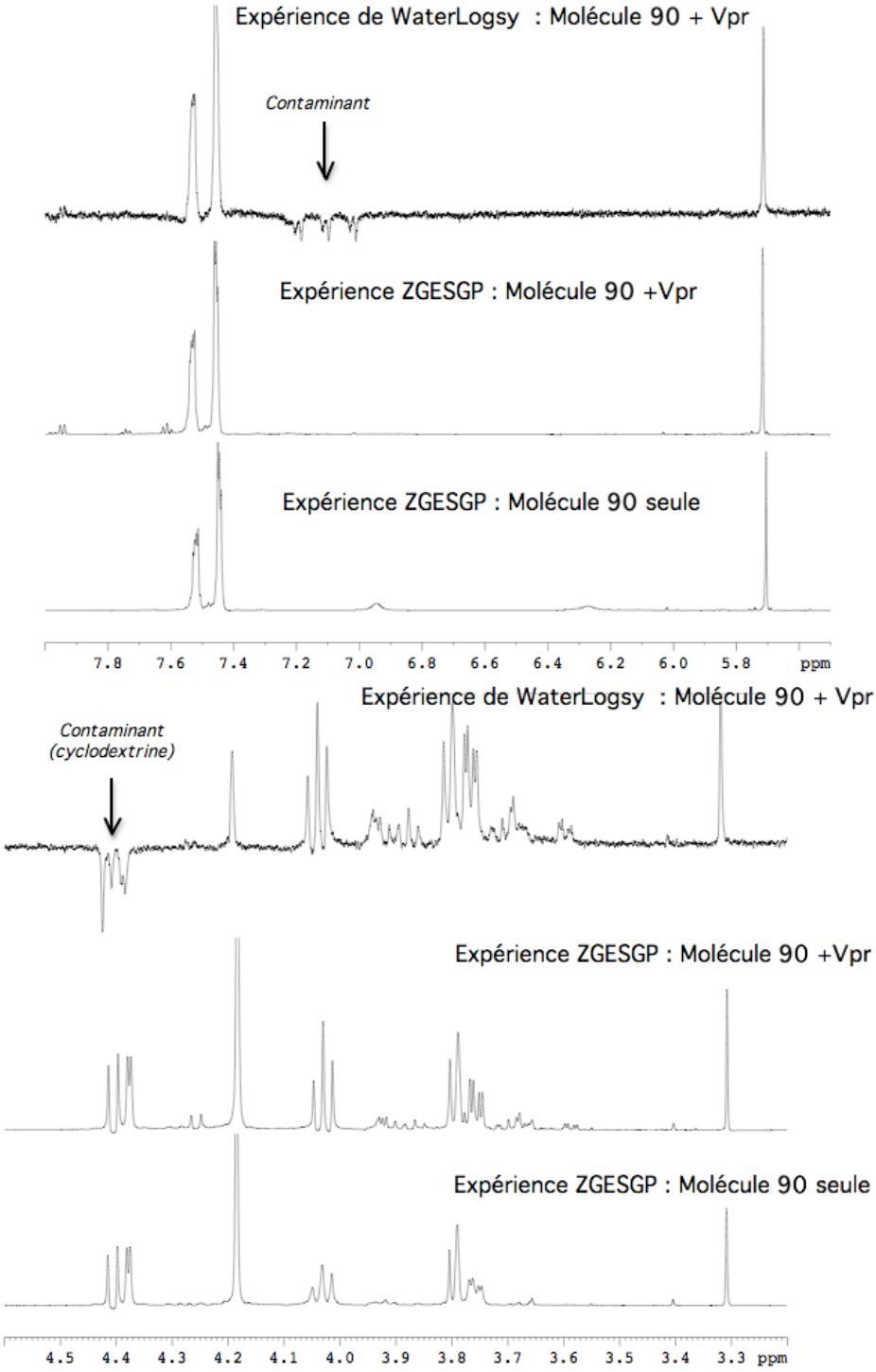
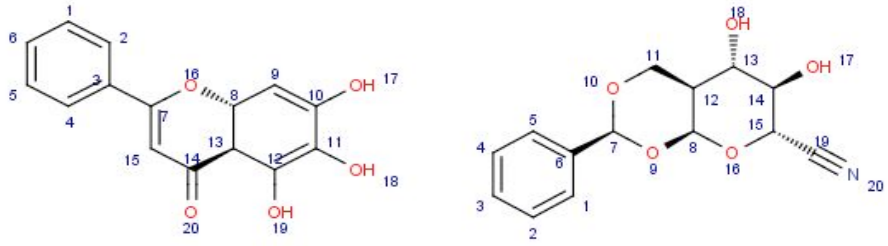


Figure 103 : *Spectres RMN de l'expérience WaterLogsy avec la molécule* ***90***

L'interprétation de l'expérience de WaterLogsy (Figure 103) nous permet de confirmer que la molécule **90** interagit bien avec Vpr. En effet, son signal est positif sur le spectre WaterLogsy (arbitraire) comme le signal de la macromolécule Vpr. Nous avons pu déceler aussi des composés apparaissant en signe opposé et donc n'interagissant pas avec Vpr. Il s'agit d'un composé ammonium qui résonne à 7 et 7.2 ppm et des protons de sucres ayant

servi à la synthèse de la molécule **90** (cyclodextrine) sont observables à 4.4 ppm. Quoique le composé **90** présentait quelques traces d'impuretés, ces dernières n'ont pas empêché de confirmer l'interaction entre la structure principale du composé **90** et la protéine Vpr. Ce criblage secondaire par RMN nous permet valider ainsi la potentialité de notre méthode de criblage à haut-débit par la technique des puces à petites molécules.

Au vue de ces résultats, une étude de docking moléculaire (Autodock4) a été réalisée permettant de prédire le site de fixation de la molécule **90** dans la protéine Vpr et d'autre part celui de la baïcaléine issue de la famille des flavones.



Baïcaléine Molécule **90**

Figure 104 : *Structures utilisées pour l'étude de docking moléculaire*

Ce processus est effectué *via* le programme de docking Autodock4, qui prédit les conformations en faisant varier (par exemple) les angles de torsions, que l'on aura judicieusement choisi parmi les nombreuses liaisons du ligand et les chaînes latérales de la protéine dans le but de calculer les complexes qui auront les meilleures affinités.

La baïcaléine et le composé **90** ont tout d'abord été construits avec un logiciel permettant d'obtenir les conformères ayant la plus basse énergie. Il est possible grâce au logiciel Autodock4 de fixer une grille dans laquelle évolue notre ligand. Cette « boîte » est alors placée sur le site de liaison présumé du récepteur, qui contient tous les atomes susceptibles d'interagir avec l'hypothétique inhibiteur, de plus elle doit être suffisamment large pour augmenter le nombre de complexes réalisables et ainsi acquérir une base de données suffisante pour établir une critique objective sur la localisation du site actif.

Dans un premier temps, le récepteur est placé dans une grille 3D et un atome sonde est placé en chaque point de la grille. L'énergie d'interaction de cet atome avec la protéine est calculée et attribuée à chaque point de la grille. Dans un second temps, on évalue chaque énergie créée par chaque configuration prise par le ligand. Le docking, proprement dit, est fait en utilisant l'algorithme génétique[239] de Lamarck. Les poses sélectionnées sont celles

[239] Un **algorithme génétique** est essentiellement un algorithme d'exploration utilisant les mécanismes de la sélection naturelle et de la génétique.

comportant le plus de structures sauf pour un cas (expliqué plus loin).

Pour la baïcaléine, dans un premier temps, le ligand est laissé libre de se placer n'importe où sur le récepteur. 160 structures ont été générées : 3 poses majoritaires ont été trouvées (21,8 %, 13,75 % et 8,75 %). 2 d'entre elles concernaient la même zone du récepteur. C'est pourquoi un deuxième calcul a été réalisé en positionnant la grille dans la zone trouvée. 200 structures ont été générées et 101 complexes générés localisent la flavone dans un même site actif. La baïcaléine est adsorbée à la surface du récepteur au niveau de la région N terminale avec une énergie de liaison équivalente à -26.2 kJ/mol pour la meilleure modélisation (Figure 105). Cette association est maintenue par des interactions hydrophobes, deux liaisons hydrogènes entre la fonction hydroxyle 19 de la baïcaléine (donneur) et la fonction carbonyle de la proline 10 (accepteur), d'une part et entre la fonction hydroxyle 19 de la baïcaléine et la fonction amine de l'arginine 12 (accepteur), d'autre part. Le site actif a été déterminé avec un pourcentage de 50,5 %. Ces résultats devront être confirmés par différentes techniques expérimentales.

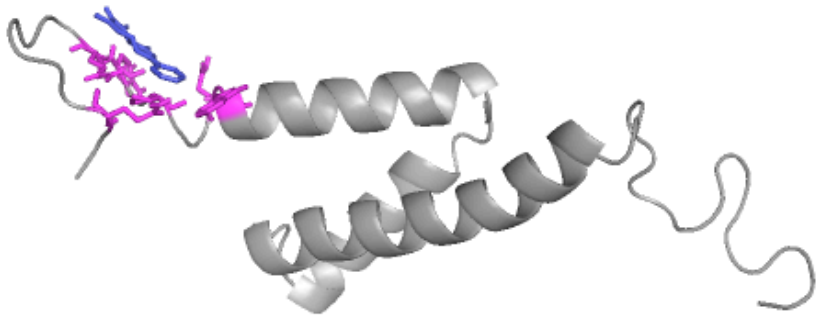


Figure 105 : *Vpr docké avec la baicaleine (bleu) ; les résidus proche du ligand (magenta) sont représentés*

Pour la molécule **90**, 200 structures ont été générées et 2 poses ont été retenues. Le premier site actif (Figure 106), majoritaire parmi les poses obtenues, a été déterminé avec un pourcentage de 17 % et le deuxième site actif (Figure 107) obtenu avec un pourcentage de 10 % n'est pas majoritaire, mais il a été étudié car il se trouve au même endroit que la pose majoritaire de la baïcaléine. Le composé **90** est adsorbé dans la conformation majoritaire à la surface du récepteur au niveau de la troisième hélice avec une énergie de liaison équivalente à -23.6 kJ/mol pour la meilleure modélisation. Cette association est maintenue d'une part par des interactions hydrophobes, une liaison hydrogène entre l'atome d'oxygène 10 du composé

90 (donneur) et l'atome d'hydrogène de la fonction carbonyle de la glutamine 65 de Vpr (accepteur), d'autre part par des interactions de π–stacking entre le composé **90** et le groupement phényle de la phénylalanine 69 de Vpr.

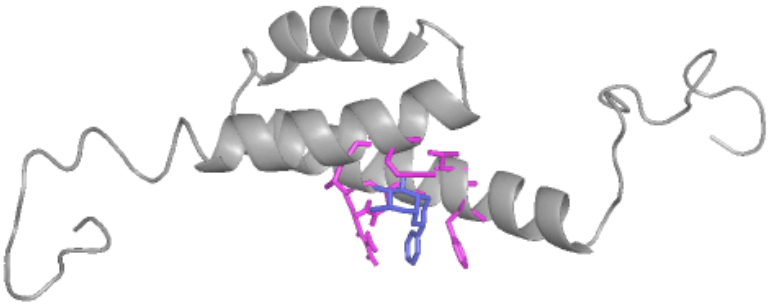


Figure 106 : *Structure majoritaire où Vpr est docké avec le composé **90** (bleu) ; les résidus proche du ligand (magenta) sont représentés*

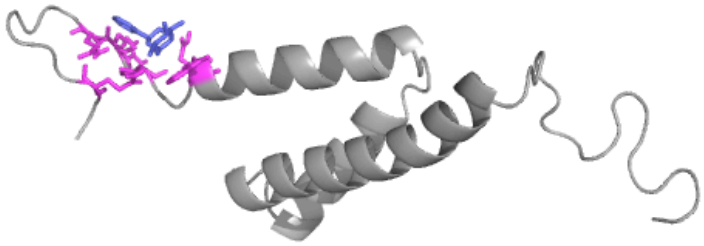


Figure 107 : *Structure minoritaire où Vpr est docké avec le composé **90** (bleu) ; les résidus proche du ligand (magenta) sont représentés*

Le composé **90** est adsorbé dans la conformation minoritaire à la surface du récepteur au niveau de la région N terminale avec une énergie de liaison équivalente à -19.6 kJ/mol pour la meilleure modélisation. Cette association est maintenue par des interactions hydrophobes, une liaison hydrogène entre l'azote 20 du nitrile du composé **90** (donneur) et la fonction amide de la glutamine 3 de Vpr (accepteur).

L'objectif de ce projet était de mettre en place une méthode d'identification rapide de composés ciblant les protéines virales. Celle-ci est transposable à l'étude de toute protéine contre laquelle de nouvelles molécules à visée thérapeutique sont nécessaires. Cette méthode se décompose en 3 étapes : (i) identification de composés par criblage primaire de chimiothèques sur puces à petites molécules, (ii) confirmation par RMN de la capacité de ces composés à interagir avec leur cible protéique, (iii) test d'activité de ces molécules contre l'infection de cellules afin d'évaluer leur capacité à inhiber leur cible protéique. Le concept de faisabilité de cette démarche a été évalué sur la protéine rétrovirale Vpr du VIH. Ainsi, ce

protocole nous a permis d'identifier de nouvelles molécules potentiellement inhibitrices de l'activité de Vpr. En effet, le composé **90,** dont l'interaction a été mise en évidence sur puces, a été confirmée par RMN. Il reste désormais à le tester en cellules afin d'évaluer son activité inhibitrice contre la réplication virale. Si ce composé montre une telle activité, il pourra par la suite être étudié au sein de complexes avec la cible protéique. Dans un futur proche, les autres sucres identifiés lors du criblage sur puces seront évalués lors d'un criblage secondaire par RMN. Ainsi, les composés identifiés constitueront un outil d'investigation puissant pour l'étude des mécanismes d'action liés à la protéine Vpr.

Chapitre 4

Synthèse de nouveaux agents de contraste multimodaux et bifonctionnels (détection et ciblage)

I. OBJECTIFS DU PROJET 185
II. SYNTHESE DE CHELATANTS DE SEL METALLIQUE 187
A. Dérivé amino du DTPA 189
B. Dérivé amino du DO3A 191
III. SYNTHESE D'UN CHROMOPHORE IR 192
A. Dérivé azoture de l'IR 820 193
1. Greffage d'un lipide azoturé par formation d'une amine secondaire 193
2. Greffage d'un lipide azoture par formation d'un thioéther 194
B. Dérivé azoture de la cyanine 5.5 196
IV. LIGANDS 197
A. Acide 8-flavone acétique 197
1. Intérêt de l'acide 8-flavone acétique 197
2. Synthèse des bras espaceurs amino-azoture 200
3. Couplage peptidique sur la FAA 201
B. Galactose 203
1. Intérêt du galactose 203
2. Synthèse des bras espaceurs azidoalcool 204
3. Glycosidation directe par $SnCl_4$ 204
4. Passage par un imidate 206
V. SYNTHESE DU CHASSIS VIII 209
A. Formation de l'aldéhyde bifonctionnel 210
B. Amine secondaire 213
1. Choix du type d'amine secondaire 213
2. Amines secondaires commerciales 214
3. Synthèse de l'iminodiacétate de di-2-(triméthylsilyl)éthyle 215
C. Réaction A³ 216
D. Saponication/Déprotection de l'alcyne 217
VI. COUPLAGE PEPTIDIQUE ENTRE LES CHASSIS VIII ET LES CHELATANTS DE SEL METALLIQUE 222
VII. CHIMIE CLICK SUR LA STRUCTURE IX 223
A. Mise au point de la cycloaddition d'Huisgen sur un squelette modèle 224
B. Synthèse d'une bibliothèque d'agents de contraste issus de la chimie clic 225
1. A partir du squelette IX où R = Tosyle (165) 226
2. A partir du squelette IX où R = (*o*)-Nosyle (167) 228
C. Formation de l'agent bimodal de structure X 230
D. Formation des agents bifonctionnels de structure XI 231
VIII. DEPROTECTION DES ACIDES CARBOXYLIQUES DES CHELATANTS 235
IX. COMPLEXATION AVEC GD(III) 237
X. PERSPECTIVES DE SYNTHESE : AGENTS MULTIMODAUX POUR L'IMAGERIE MOLECULAIRE 242
XI. ÉVALUATION DES AGENTS DE CONTRASTE 244

Durant ces 25 dernières années, les diverses techniques d'imageries sont devenues des outils majeurs pour la médecine personnalisée (personnalisation du traitement médical selon les caractéristiques individuelles de chaque patient). Parmi ces méthodes, l'IRM fournit des images 3D des tissus biologiques d'une qualité exceptionnelle en termes de résolution et de contraste grâce à l'utilisation d'agents d'imagerie ciblés. Ces agents d'imagerie définissent une nouvelle discipline en plein essor : l'imagerie moléculaire qui regroupe les méthodes de diagnostic in vivo de processus pathologiques au niveau subcellulaire. On peut donc regrouper, sous le concept d'imagerie moléculaire, différentes techniques qui mettent en relief des biomarqueurs des activités cellulaires ou tissulaires, au moyen de véritables vecteurs « modificateurs d'images ». Ces vecteurs agissent par interaction locale avec des cibles « moléculaires » en altérant, par exemple, l'image dans la zone ciblée ou en trahissant l'expression de gènes fonctionnels ou thérapeutiques. Mais ils interagissent également avec des voies métaboliques en reflétant leur fonctionnement normal ou pathologique, ouvrant ainsi la voie de la détection et/ou du traitement précoce de certaines maladies. De plus, la combinaison de plusieurs modalités d'imagerie (IRM, optique, nucléaire) constitue une stratégie d'avenir. L'imagerie multimodale basée d'une part sur l'utilisation de complexes de sels métalliques et d'autre part sur des méthodes optiques, permet d'allier les avantages inhérents des unes et des autres. L'emploi de ces sondes a pour but d'améliorer l'interprétation des images.

C'est donc dans ce contexte de médecine personnalisée que s'inscrit les travaux de recherche de cette dernière partie. La préparation et l'évaluation de **nouvelles sondes d'imagerie moléculaire** constituent l'objectif majeur de cette thèse. Le **squelette de ces agents** repose sur une **propargylamine** obtenue à partir d'une réaction à 3 composants qui nous offre plusieurs points d'ancrage permettant le couplage de **groupements de détection** (IRM/scintigraphie/optique) et de **ligands** connus ou originaux, obtenus par le criblage des puces à petites molécules.

I. Objectifs du projet

Notre projet porte sur la synthèse de complexes d'imagerie moléculaire possédant un caractère bifonctionnel. Ces complexes allient une fonction de ciblage et un chélatant de sels métalliques (Gd, Tc, Ln, Lu) pour la détection en IRM ou en scintigraphie. Il porte aussi sur le développement de sondes bimodales pour l'IRM et l'imagerie optique. La structure de ces agents de contraste repose sur un squelette propargylamine obtenu en « one pot » à partir

d'une réaction à 3 composants entre un aldéhyde, une amine secondaire et un alcyne vrai (Schéma 59). Nous avons privilégié ce type de réactions à composants multiples, dont le savoir-faire est bien maîtrisé au laboratoire et nous permet d'obtenir en une seule étape le châssis **VIII**. Ce châssis offre trois points d'ancrage pour permettre le couplage des différents éléments de détection et de ciblage. Les groupes chélatants des sels métalliques seront greffés au châssis **VIII** par couplage peptidique entre les acides carboxyliques des groupements R_2 et les fonctions amines primaires portées par les groupes chélatants pour conduire au squelette **IX**. L'alcyne vrai du squelette **IX** pourra être engagé dans une réaction de chimie click, la cycloaddition d'Huisgen en faisant réagir des dérivés azotures pour aboutir à des structures de type triazole. Des sondes optiques, fluorescant dans le proche IR, modifiées pour comporter un groupement azoture seront greffées par chimie click au squelette **IX** pour conduire à des agents de contraste bimodaux de type **X**. D'autre part, des ligands connus comme le galactose ou des flavonoïdes seront greffés par chimie click au squelette **IX** pour conduire à des agents de contraste bifonctionnels (détection et ciblage) de type **XI**.

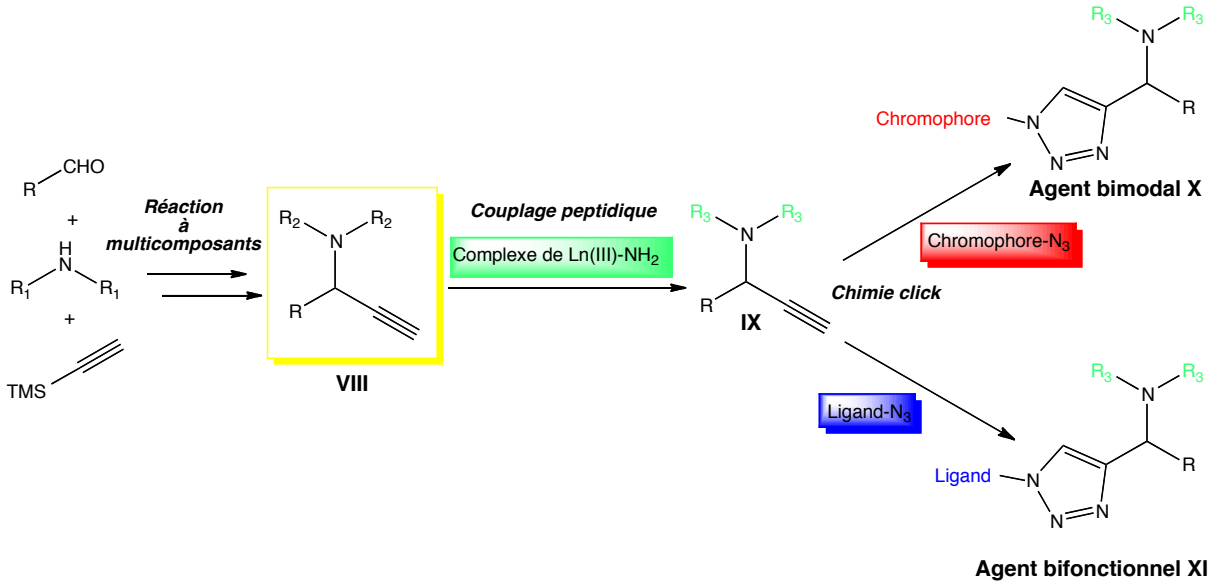


Schéma 59 : *Stratégie de synthèse des agents de contraste bimodaux et bifonctionnels*

D'autre part, une des originalités de ce projet est de pouvoir coupler ces deux types d'agents d'imagerie bimodaux **X** et bifonctionnels **XI** sur une même structure afin d'obtenir de véritables agents d'imagerie moléculaire multimodaux et ciblants (Schéma 60). Ceci sera réalisé par l'intermédiaire du choix de l'aldéhyde engagé dans la réaction A^3 et plus précisément du choix du groupement R porté par cet aldéhyde, groupement réactif vis-à-vis par exemple de fonctions hydroxyles portées par un bras espaceur. Ainsi, nous pourrons obtenir un agent multimodal et ciblant qui possède deux éléments différents de détection (des

chélatants de l'ion Gd^{3+} pour une détection en IRM, un chromophore émettant dans le proche infrarouge pour une détection en imagerie optique) et un ligand pour cibler l'endothélium tumoral.

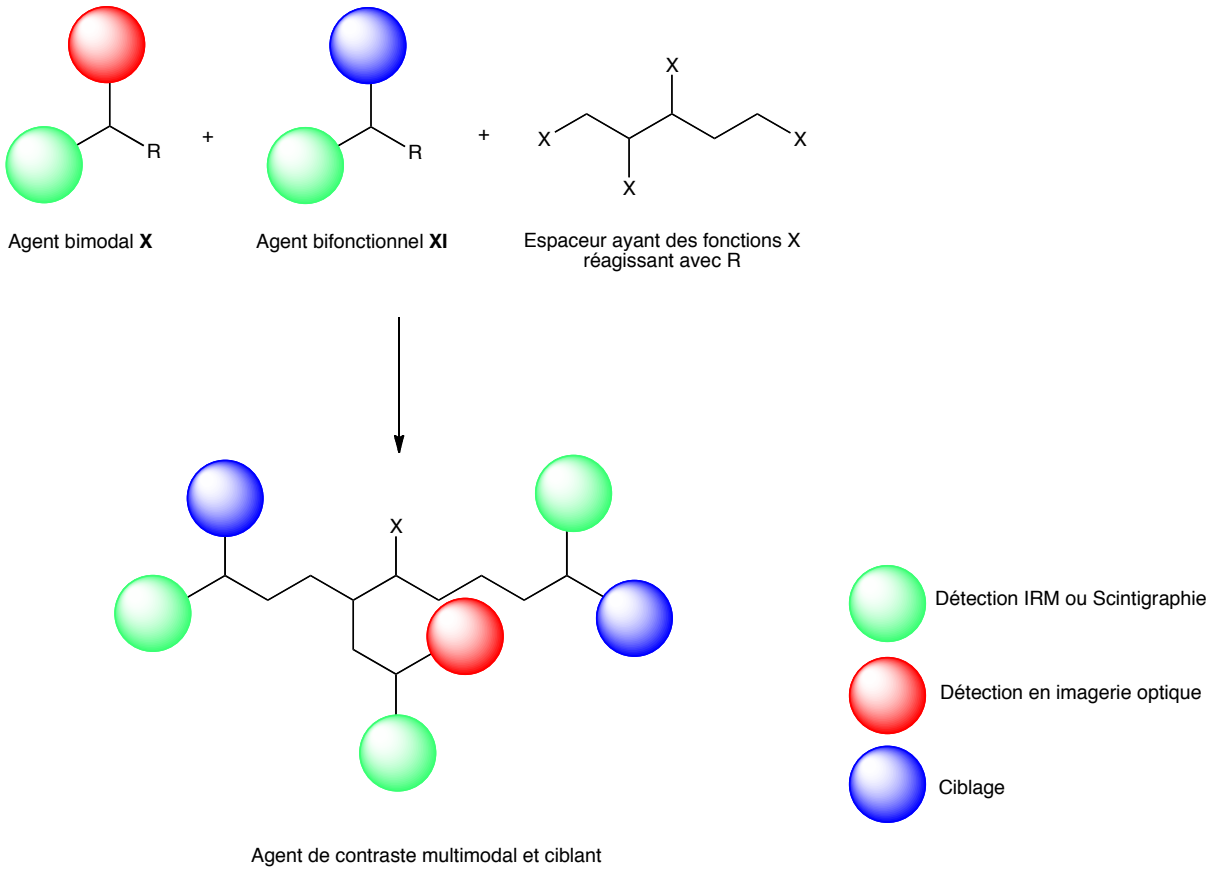


Schéma 60 : *Stratégie d'obtention d'agents d'imagerie moléculaire multimodaux et bifonctionnels*

Nous verrons tout d'abord dans ce chapitre la synthèse des différents blocs à greffer sur le châssis **VIII**, c'est-à-dire les chélatants de sels métalliques pour la détection en IRM ou en scintigraphie, les dérivés de chromophore pour le proche infrarouge et différents dérivés de ligands pour le ciblage. Nous développerons ensuite la synthèse du châssis **VIII** en lui-même et le couplage des différents éléments cités précédemment. Puis nous terminerons par l'évaluation de l'un de ces agents de contraste.

II. Synthèse de chélatants de sel métallique

Comme nous l'avons vu au chapitre **1**, l'utilisation d'espèces paramagnétiques telles que l'ion Gd^{3+} ou de radionucléides émetteurs de gamma, comme le ^{123}I ou le ^{99m}Tc en tant qu'agent de contraste permet d'améliorer l'interprétation des images respectivement en IRM ou en scintigraphie.

Or, sous forme libre, l'ion Gd^{3+} est toxique car il peut entrer en compétition avec les systèmes calcium dépendants et bloquer le système réticuloendothélial. La solution consiste à enfermer ces cations dans des ligands, linéaires ou cycliques, pour former des complexes non toxiques, inertes et stables dans l'organisme. En effet, cet ion a besoin de sept voire huit atomes donneurs pour accomplir la sphère de coordination et former un complexe stable et non toxique. Enfermé dans la sphère de coordination, Gd^{3+}, cation toxique, ne s'exprime que par son effet paramagnétique. Pour augmenter la relaxation du proton de l'eau et donc sa stabilité, le gadolinium laisse également au moins un emplacement ouvert pour l'échange d'un ligand eau. Il est donc important de le chélater dans des complexes polyaminocarboxylates linéaires de type DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique) ou macrocycliques de type DOTA (acide tétraazacyclododécanetétraacétique) ou de type DO3A (Figure 108).

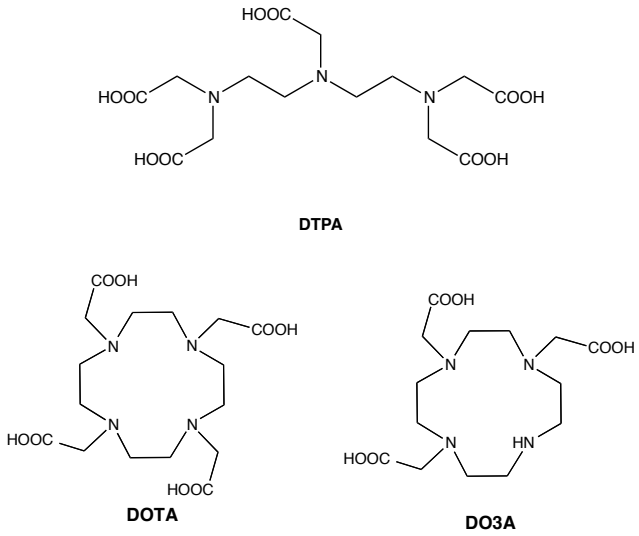


Figure 108 : *Ligands polyaminocarboxylates*

Les propriétés de relaxivité sont sensiblement identiques pour ces trois produits. Ils diffèrent surtout par le caractère macrocyclique ou linéaire du chélate et par le nombre de charges électrostatiques du complexe. Le type du chélate conditionne la stabilité du complexe qui est dans tous les cas élevée, encore qu'elle le soit plus avec les produits macrocycliques. Elle s'exprime par une constante de stabilité K, d'autant plus élevée que la dissociation est faible ($K_{Gd\text{-}DTPA=}10^{22.5}$, $K_{Gd\text{-}DOTA}=10^{25}$, $K_{Gd\text{-}HP\text{-}DO3A}=10^{23,8}$)[38].

D'autre part, le technétium 99 métastable (^{99m}Tc) est le radioisotope le plus utilisé en imagerie médicale nucléaire en tant que traceur. Ses caractéristiques physiques sont presque idéales pour cet usage. La demi-vie de 6 heures est assez longue pour permettre de suivre les processus physiologiques d'intérêt, mais assez courte pour limiter l'irradiation inutile. De plus, il est facilement disponible dans les hôpitaux grâce à un générateur de technétium (de la taille

d'une batterie d'automobile). Fixé à de nombreuses molécules présentant un intérêt biologique, le ^{99m}Tc permet d'en suivre la distribution dans le corps humain grâce à la scintigraphie. En particulier, il est souvent chélaté dans des complexes polyaminocarboxylates de type DTPA.

Nous nous sommes donc intéressés au développement d'agent de contraste ayant comme chélatant de dérivé métallique (Gd^{3+} ou ^{99m}Tc) des complexes dérivés de DTPA et de DO3A. Afin de coupler par liaison peptidique ces complexes sur le châssis **VIII** qui possède des fonctions acides carboxyliques, il est nécessaire de synthétiser ou d'acheter des dérivés amino de DTPA ou de DO3A (Schéma 61).

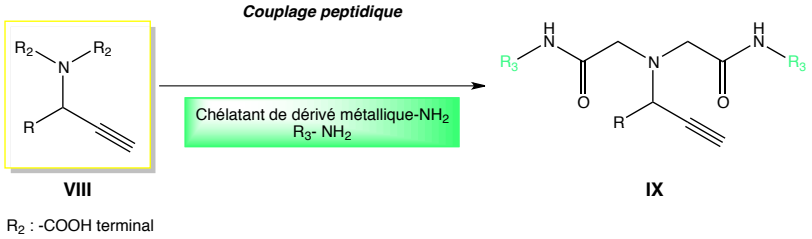


Schéma 61 : *Couplage peptidique entre les acides carboxyliques du châssis **VIII** et les amines primaires des chélatants de dérivé métallique*

A. Dérivé amino du DTPA

L'acide diéthylènetriaminepentaacétique, DTPA, est un agent chélatant très efficace pour la complexation de l'ion gadolinium, mais il a aussi été utilisé en association avec des ligands pour la chélation de radionucléides (^{111}In(III), ^{212}Bi(III), ^{90}Y(III)).[240] Nous avons choisi d'utiliser une liaison amide pour la préparation de conjugué contenant des complexes chélatants, car elle possède une grande stabilité chimique *in vivo*. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la préparation de ligands DTPA portant un groupement amino disponible pour la conjugaison (couplage peptidique avec le châssis **VIII**). Nous avons trouvé dans la littérature[241] qu'utiliser la L-lysine, après des protections adaptées, permettait d'obtenir des pentaesters de DTPA fonctionnalisés qui seraient des intermédiaires polyvalents pour la préparation de conjugés de complexes métalliques. Afin d'obtenir le dérivé pentaester DTPA avec un groupe amino libre, la N'-Cbz-L-Lysine commerciale est estérifiée avec de l'acétate

[240] (a) O. A. Gansaiw, M. W. Brechbiel, S. Mirzadeh, D. Coclher, M. Roselli, Chelates and antibodies : current methods and new directions, Cancer imaging and radiolabeled antibodies, Ed. D. M. Goldebenberg, 153-171, Kkuwers Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands ; (b) C. H. Cummins, E. W. Rutters, W. A. Fordyce, A convenient synthesis bifunctional chelating agents based on diethylenetriamine pentaacetic acid and their coordination chemistry with yttrium(III), *Bioconjugate Chem*., **1991**, *2*, 180-186

[241] P. L. Anelli, F. Fedeli, O. Gazotti, L. Lattuada, G. Lux, F. Rebasti, L-glutamic acid and L –lysine as useful building block for the preparation of bifunctional DTPA-like ligands, *Bioconjugate Chem*., **1999**, *10*, 137-140

de tert-butyle en présence d'acide perchlorique pour conduire au composé **92** avec un rendement de 78 % (Schéma 62). L'obtention de la L-Lysine **92** est confirmée par l'apparition sur le spectre RMN ^{13}C des pics à 28 et 80,9 ppm correspondant respectivement aux carbones méthyliques et au carbone quaternaire du groupement t-butyle. En parallèle, l'éthanolamine est traitée par du bromoacétate de t-butyle dans du DMF avec du $NaHCO_3$ pour donner l'alcool N-alkylé **93**. Le spectre RMN ^{1}H nous permet de déterminer la structure du composé **93** par l'apparition d'un triplet à 2,81 ppm intégrant pour les deux protons en β de l'alcool. L'alcool **93** n'a pas été isolé mais directement engagé dans l'étape de bromation. Le produit brut **93** est bromé avec le N-bromosuccinimide en présence de triphénylphosphine pour conduire au dérivé bromé **94** avec un rendement de 81 %.[242] L'obtention du dérivé bromé **94** est confirmée par le blindage du triplet des protons en α du brome qui passe de 3,46 à 3,38 ppm sur le spectre RMN ^{1}H et le blindage du déplacement chimique du carbone en α du brome sur le spectre RMN ^{13}C qui passe de 59,2 à 30,2 ppm.

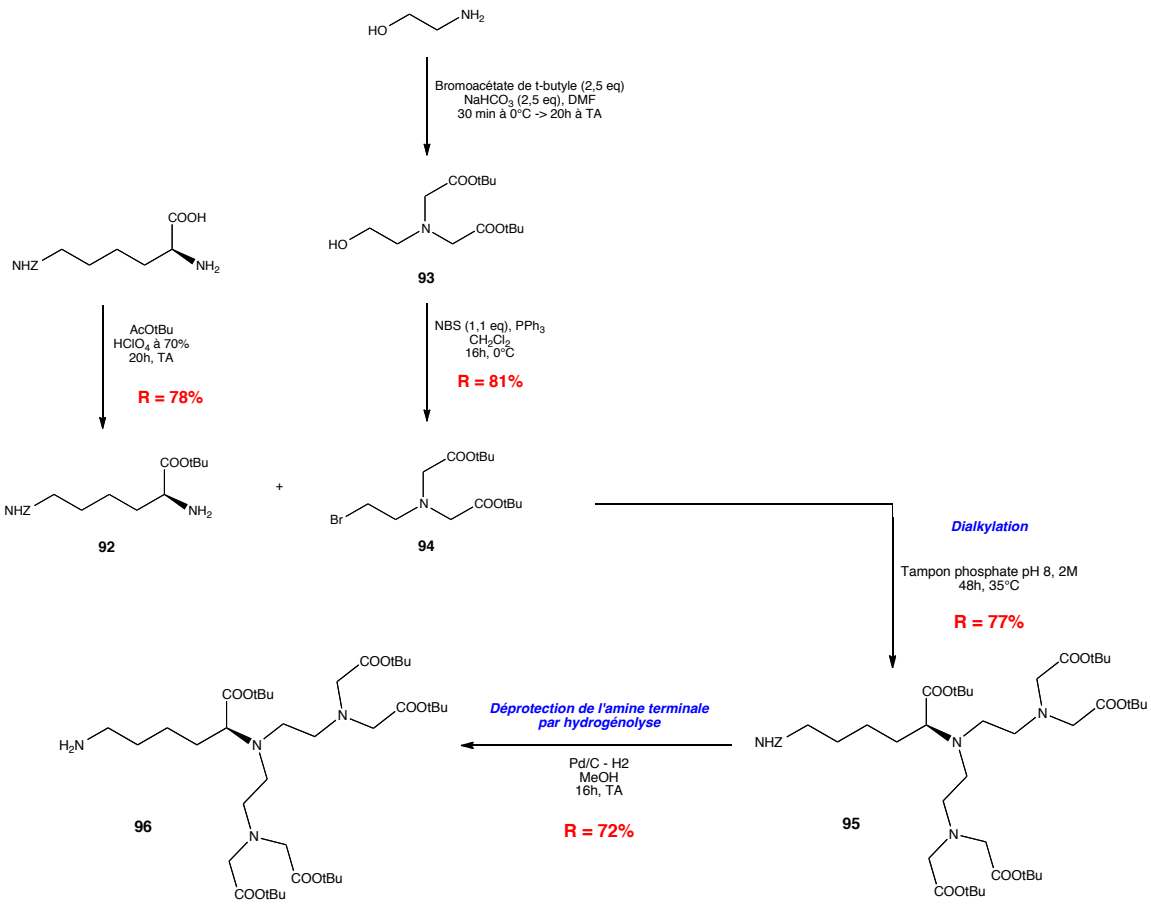


Schéma 62 : *Synthèse du dérivé DTPA-Lysine **96***

[242] M. A. Williams, H. Rapoport, Synthesis of enantiomerically pure diethylenetriamine pentaacetic acid analogues. L-phenylalanine as the educt for substitution at the central acetic acid, *J. Org. Chem*., **1993**, *58*, 1151-1158

L'étape suivante est la réaction de dialkylation de l'amine primaire libre de la L-lysine partiellement protégée **92** par le dérivé bromé **94** dans un milieu CH_3CN/ Tampon phosphate pH = 8. Le composé pentaester protégé **95** est alors obtenu avec un rendement de 77 %. Le spectre RMN ^{13}C nous permet de déterminer la structure du composé pentaester **95** par le déblindage du carbone en α de l'amine dialkylée à 63,9 ppm au lieu de 54,8 ppm pour le carbone en α de l'amine primaire. L'intégration des protons en α et en β de l'amine dialkylée correspond à 8H nous prouvant ainsi que nous avons greffé deux chaînes. La dernière étape est la déprotection de l'amine terminale de la L-Lysine. Pour cela, on effectue une hydrogénolyse catalytique, ce qui permet d'éliminer le groupement protecteur carboxybenzyle (Cbz ou Z) et d'obtenir le dérivé amino du pentaester DTPA **96** avec un rendement de 72 % après purification sur cartouche de gel de silice. L'obtention du composé **96** est confirmée sur le spectre RMN ^1H par la disparition des signaux des protons aromatiques (7,3 à 7,4 ppm) et du singulet à 5,1 ppm correspondant aux protons du groupement méthyle benzylique et par le blindage des protons méthyliques en α de l'amine primaire (3,1 ppm à 1,6 ppm). Le dérivé amino DTPA **96** a donc été obtenu en 3 étapes à partir de la N'-Cbz-L-Lysine avec un rendement total de 43 %.

L'amine primaire du composé amino **96** pourra alors être engagée par la suite dans le couplage peptidique avec les acides carboxyliques du châssis **VIII**, puis les acides carboxyliques seront déprotégés pour conduire au pentaacide carboxylique du DTPA, chélatant de sels métalliques (Schéma 63).

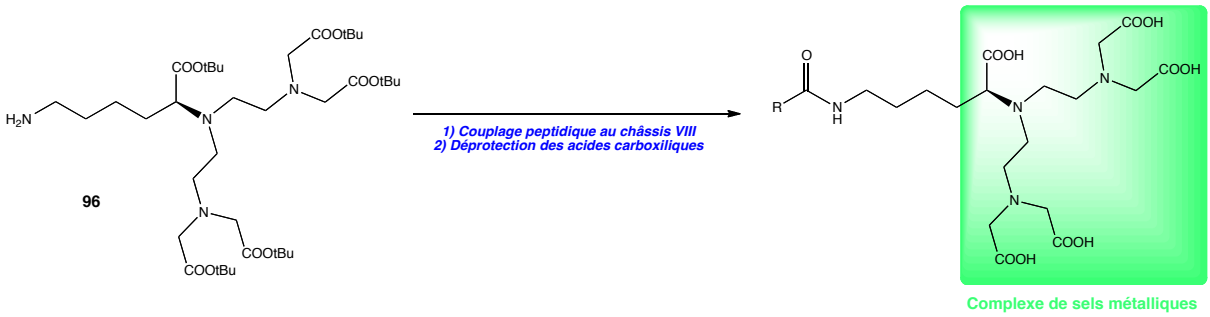


Schéma 63 : *Préparation des complexes de sels métalliques de type DTPA*

B. Dérivé amino du DO3A amide

Nous avons choisi de travailler aussi avec un polyaminocarboxylate macrocyclique de type DOTA (acide tetraazacyclododecanetetraacétique) (Figure 108) qui est connu pour être un très bon chélatant des ions gadolinium pour une application en IRM. Afin de pouvoir greffer ces complexes sur nos châssis, de la même manière que pour le dérivé DTPA, il nous

faut travailler avec un complexe DOTA portant un groupement amino disponible pour le couplage peptidique. En général, une des quatre fonctions acides carboxyliques est fonctionnalisée pour permettre le greffage d'autres fonctions réactives, et dans ce cas, on parle de polyaminocarboxylate macrocyclique de type DO3A amide. Nous avons pu trouver commercialement un dérivé amino du triester t-butylique du DO3A, le composé **97** ou encore le DO3AtBu-N-(2-aminéthyl)-éthanamide (Schéma 64).

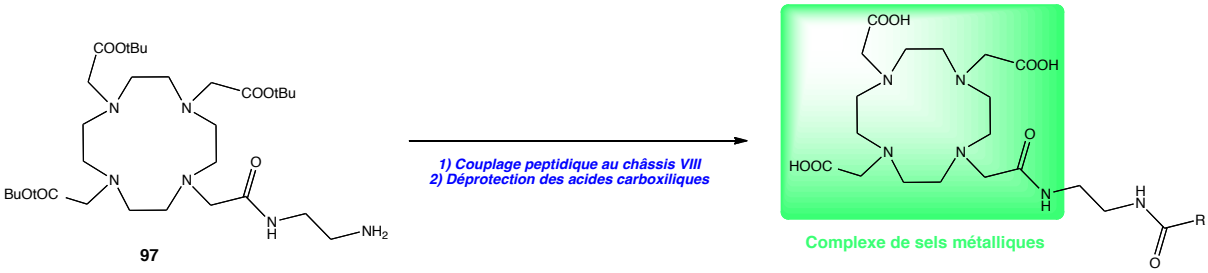


Schéma 64 : *Préparation des ligands de sels métalliques de type DO3A amide*

L'amine primaire portée par la chaîne éthylique du composé **97** pourra être engagée par la suite dans le couplage peptidique avec les acides carboxyliques du châssis **VIII**, puis les esters t-butyliques seront saponifiés pour conduire au triacide carboxylique du DO3A.

III. Synthèse d'un chromophore IR

La structure des agents de contraste envisagée repose sur un squelette propargylamine obtenu « one pot » à partir d'une réaction à 3 composants entre un aldéhyde, une amine secondaire et un alcyne vrai. Afin d'obtenir des agents bimodaux, l'alcyne vrai du squelette **IX**, qui possède déjà les chélatants de sel métallique (R_3), sera engagé dans une réaction de cycloaddition d'Huisgen avec des dérivés azotures pour aboutir à des structures de type triazole **X**. Pour réaliser cette opération, nous utiliserons des sondes optiques, fluorescant dans le proche IR, qui seront au préalable couplées à un espaceur azoture. L'utilisation de l'imagerie optique dans le proche infrarouge permettra d'obtenir des images à des profondeurs de tissus comprises entre 500 µm et 1 cm. De plus, l'hémoglobine et l'eau ont des coefficients d'absorption bas dans la région du proche infrarouge (650 – 900 nm).

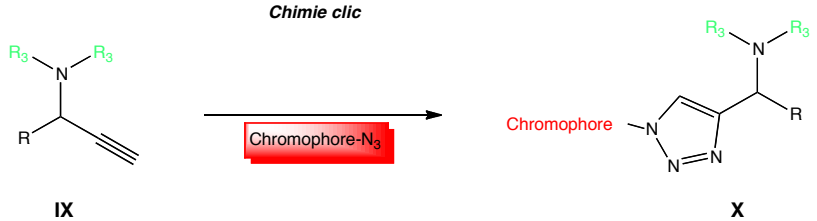


Schéma 65 : *Chimie click sur l'alcyne du châssis **IX***

Nous nous sommes intéressés au développement d'agents de contraste bimodaux pour l'IRM ou la scintigraphie d'une part et l'imagerie optique d'autre part, en utilisant un chromophore de type indocyanine, l'IR 820 et un chromophore de type cyanine, la Cy5.5. Afin de coupler par chimie click ces chromophores sur le châssis **IX**, il est nécessaire de synthétiser ou d'acheter des dérivés azotures de l'IR 820 ou de la Cy5.5.

A. Dérivé azoture de l'IR 820

L'indocyanine IR820 (Figure 109) a pour longueur d'onde d'excitation 710 nm et d'émission 820 nm. C'est un chromophore photostable grâce à la présence de deux groupements sulfonates portés par les atomes d'azote des hétérocycles. De plus, ces groupements sulfonates empêchent le chromophore de s'agréger car ils créent une sphère de solvatation dans l'eau.

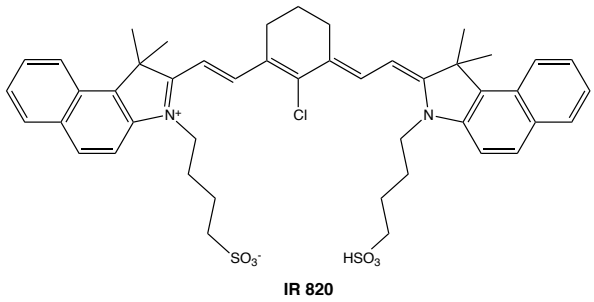


Figure 109 : *Indocyanine IR 820*

1. Greffage d'un lipide azoture par formation d'une amine secondaire

Afin d'obtenir le dérivé azoture de l'IR820, nous avons décidé de réaliser une réaction de subsitution nucléophile entre le chlorure de l'IR820 et un bras espaceur amino-azoture.

Comme nous l'avons déjà vu au chapitre **2** pour la synthèse du 3-azidopropan-1-amine **33**, nous avons réalisé la synthèse de l'espaceur amino-azoture **99** à partir du 1,6-dibromohexane dont la substitution nucléophile dans le DMF avec un excès d'azoture de sodium conduit au 1,3-diazidopropane **98** avec 98 % de rendement. Ensuite, une monoréduction de l'azoture à l'aide de la triphénylphosphine dans un mélange HCl/AcOEt aboutit à l'azido-amine **99** avec un rendement de 72 % (Schéma 66).

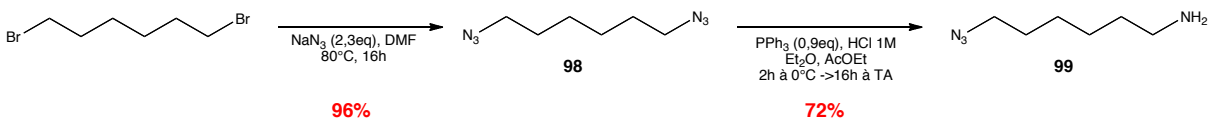


Schéma 66 : *Synthèse d'un bras espaceur Amino-azoture **99***

Le remplacement du méso-chlorure de l'IR820 **100** par le groupement amino du bras espaceur amino-azoture **99** est réalisé à une température 85°C en présence de triéthylamine et permet d'aboutir au bout de 4 h à un solide bleu foncé après purification sur gel de silice avec un rendement de 18 % pouvant correspondre au dérivé azoture de l'IR820 **101**.[243] Les spectres RMN du proton, du carbone et de COSY, du produit **101** sont difficilement interprétables car il semblerait que malgré la purification réalisée, il y ait plusieurs sous-produits présents dans le lot où nous avons détecté le produit attendu. Une analyse LC-MS nous a permis de confirmer la présence du produit de m/z = 966 $[M+CH_3CN]^+$ mais aussi la présence d'autres produits en faible quantité. Nous avons pu confirmer la formation du composé **101** par l'apparition sur le spectre IR d'une bande à 2086 cm^{-1} correspondant au groupement N_3 et ainsi confirmer le greffage de la chaîne azoture sur le chromophore IR820.

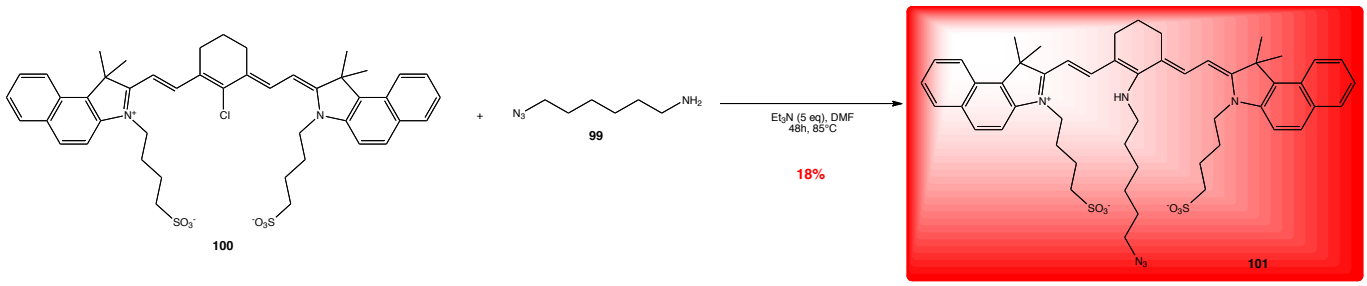


Schéma 67 : *Greffage du bras espaceur Amino-azoture **99** sur l'IR820*

Le couplage d'un bras espaceur azoture sur IR820 par l'intermédiaire d'une fonction amine secondaire ne nous a pas permis d'aboutir à un chromophore propre. C'est pourquoi nous avons envisagé de greffer le bras espaceur azoture par l'intermédiaire d'une fonction thioéther qui est obtenue plus facilement lors de la substitution nucléophilie du chlore sur le composé **100**.

2. Greffage d'un lipide azoture par formation d'un thioéther

Afin d'obtenir le dérivé azoture de l'IR820, nous allons réaliser cette fois-ci une réaction de substitution nucléophile entre le chlorure de l'IR820 et un bras espaceur thiol-azoture.

Les espaceurs thiol-azotures sont obtenus à partir de composés dihalogénés : le 1,6-dibromohexane, le 1,8-dibromooctane et le 1-chloro-2-[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthane (Schéma 68). La substitution nucléophile des composés dihalogénés avec un équivalent d'azoture de sodium conduit à la formation des espaceurs azido-halogénures (**102** à **104**) avec

[243] A. Masotti, P. Vicennati, F. Boschi, L. Calderan, A. Sbarbati, G. Ortaggi, A novel near-infrared indocyanine dye-polyethylenimine conjugate allows DNA delivery imaging in vivo. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 983-987

de bons rendements (Tableau 22). Ensuite, les halogénures **102** à **104** sont substitués par de la thiourée pour conduire aux composés thiol **105** à **107** après un passage par un ion isothiouronium qui, en milieu basique, est transformé en thiol.[244]

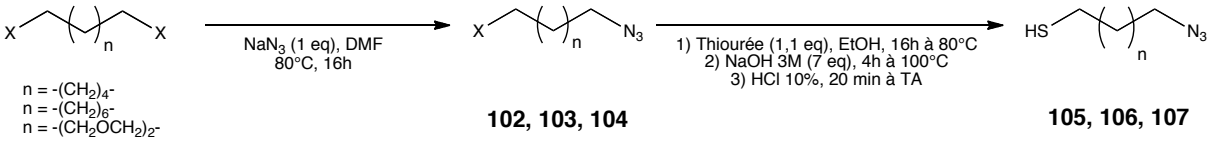


Schéma 68 : *Synthèse des bras espaceurs thiol-azotures*

Les bras espaceurs thiol-azotures **105** à **107** sont obtenus avec des rendements compris 48 et 78 %, soit en 2 étapes avec des rendements globaux allant de 40 à 78 % (Tableau 22).

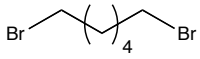
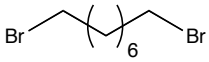
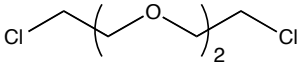
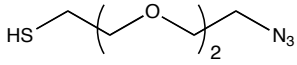
Composé dihalogéné	*Rendement de l'azidation*	*Rendement de la SN*	*Rendement total*	*Bras espaceur thiol-azoture formé*
	83 % (**102**)	48 %	**40 %**	 **105**
	83 % (**103**)	65 %	**54 %**	 **106**
	Qtf (**104**)	78 %	**78 %**	 **107**

Tableau 22 : *Résultats de la synthèse des différents bras espaceurs thiol-azoture*

En milieu basique, les bras espaceurs thiol-azoture se retrouvent sous forme d'ions thiolates qui se comportent comme un réactif nucléophile susceptible d'effectuer des réactions de substitution, en particulier en présence de dérivé halogénure et plus particulièrement notre chromophore IR820. On obtient alors les dérivés azotures de l'IR820 sous forme de thioéther **108** à **110** après purification sur cartouche en phase inverse (Schéma 69).

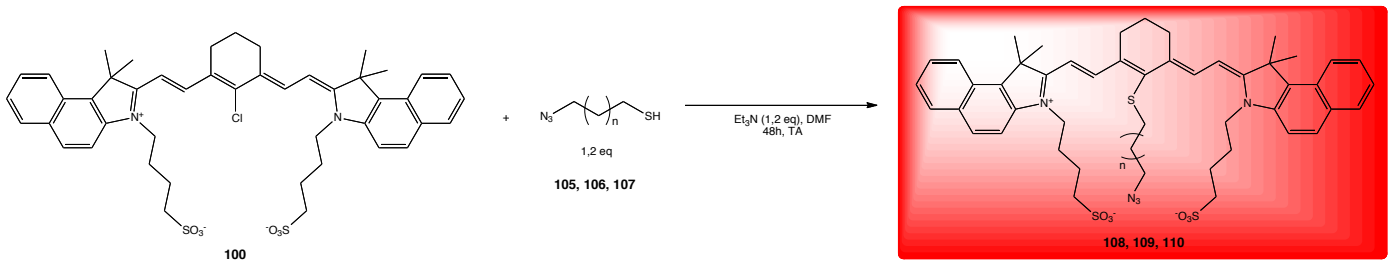


Schéma 69 : *Greffage des bras espaceurs Thiol-azoture sur l'IR820*

[244] Y-Y. Lin, S-C. Tsai, S. J. Yu, Highly efficient and recyclable Au nanoparticle-supported palladium(II) interphase catalysts and microwave-assisted alkyne cyclotrimerization reactions in ionics liquids, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 4920-4928

Le dérivé azoture de l'IR820 issu du couplage avec le 6-azidohexane-1-thiol **105**, soit le composé **108** n'a pas été obtenu dans ces conditions. Par contre, nous avons pu détecter la formation des composés **109** et **110** dans les lots isolés par l'apparition d'un mulitplet déblindé intégrant pour les protons méthyliques en α du groupement thioéther (Tableau 23).

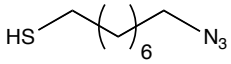
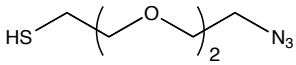
Bras espaceur thiol-azoture	*Résultats*	*Analyse RMN*
 **105**	Solide bleu foncé (**108**)	Ne correspond pas au produit attendu
 **106**	Solide vert, R = 14% (**109**)	multiplet à 3,7 ppm correspondant au méthyle en α de la fonction thioéther
 **107**	Solide vert, R = 29 % (**110**)	multiplet à 3,8 ppm correspondant au méthyle en α de la fonction thioéther

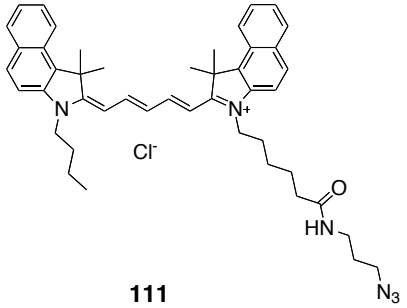
Tableau 23 : *Résultats de la synthèse des différents chromophores IR-820-N_3*

Ces deux dérivés ont été obtenus avec de faibles rendements et la structure complète n'a pas pu être déterminée par l'analyse conjointe des différents spectres RMN. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le produit commercial IR820 utilisé au départ était constitué d'un mélange de produits qui n'ont peut-être pas tous la même réactivité lors des réactions mises en jeu précédemment. Donc il reste quelques doutes quant à la formation des dérivés azotures de l'IR820. C'est pourquoi nous sommes orientés par la suite vers l'utilisation d'un chromophore de type cyanine 5.5.

B. Dérivé azoture de la cyanine 5.5

Les cyanines sont le nom non-systématique d'une famille de marqueurs synthétiques appartenant au groupe des polyméthines. Les cyanines ont de nombreuses utilisations comme marqueurs fluorescents, particulièrement en imagerie biomédicale. Selon la structure, elles couvrent un spectre allant de l'IR à l'UV. Les cyanines sont utilisées pour augmenter la gamme de sensibilité des absorptions de photons, *i.e.*, pour augmenter la gamme de longueur d'ondes qui formera une image sur le film. Nous avons trouvé commercialement un dérivé azoture de cyanine, il s'agit de la cyanine Cy5.5 azoture **111** de chez Lumiprobe qui a pour longueur d'onde d'excitation 673 nm et comme longueur d'émission 707 nm (Figure 110). Ce composé est pur à 95% en RMN ce qui nous permettra de réaliser la cycloaddition d'Huisgen sur la structure **IX** dans de meilleurs conditions que si nous avions utilisé les lots d'IR820

dévivés azotures.

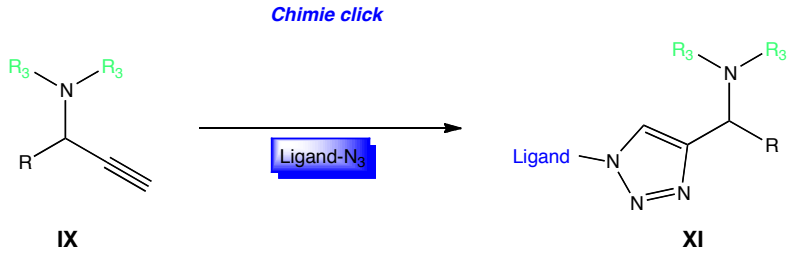


111

Figure 110 : *Dérivé azoture de la cyanine 5.5*

IV. Ligands

Afin d'obtenir des agents bifonctionnels (détection et ciblage), nous allons procéder de la même façon que pour la formation des agents bimodaux, c'est-à-dire que nous ferons réagir des dérivés azoturés de ligands par chimie click sur l'alcyne vrai du squelette **IX**, qui possède déjà les chélatants de sel métallique (R_3) pour aboutir à des structures de type triazole **XI** (Schéma 70).



IX **XI**

Schéma 70 : *Chimie click sur l'alcyne du châssis **IX***

Comme nous n'avons pas pour l'instant identifié de ligands originaux par la méthode des puces à petites molécules, nous avons concentré notre étude sur la synthèse de dérivés azoturés de ligands connus : l'acide 8-flavone acétique issu de la famille des flavonoïdes et le D-galactose.

A. Acide 8-flavone acétique

1. Intérêt de l'acide 8-flavone acétique

L'agent ciblant que nous allons tout d'abord greffer sur les squelettes **IX** appartient à la famille des flavonoïdes qui est constituée de plus 4 000 composés que l'on retrouve dans la

majorité des plantes.[245] Ces composés constituent les pigments responsables de la coloration jaune, orange et rouge observées chez les végétaux.[246] Les légumes et les fruits constituent la principale source de flavonoïdes. Les boissons telles que le vin rouge, le café, le thé et la bière sont également riches en flavonoïdes.

Les flavonoïdes présentent un squelette de base de 15 atomes de carbone, constitué de deux cycles aromatiques reliés par une chaîne de 3 carbones (C_2 à C_4) (Figure 111). Le pont à 3 carbones entre les deux noyaux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone. Les flavonoïdes présentent tous un enchaînement benzo-γ-pyrone et sont souvent classés d'après la nature des substituants rencontrés sur les différents cycles, et le degré de saturation du noyau benzo-γ-pyrone. On peut distinguer 3 grandes classes de flavonoïdes : les flavonoïdes proprement dit (ou 2-phénylbenzopyranes), les isoflavonoïdes (ou 3-phénylbenzopyranes) et les néoflavonoïdes (ou 4-phénylbenzopyranes) (Figure 111).[247]

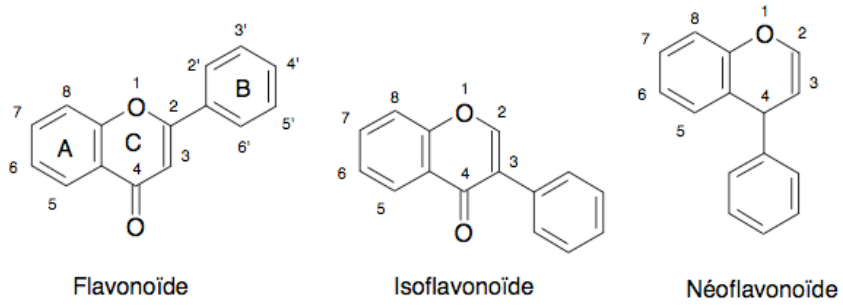


Figure 111 : *Principales classes de flavonoïdes*

Selon la nature de l'hétérocycle C, on distingue les principaux groupes de flavonoïdes suivants : les flavones, les flavanones, les flavanes, les flavonols, les chalcones et les aurones (Figure 112). Les composés dont le noyau benzénique est situé en position 2 sont appelés flavonoïdes, lorsque ce dernier est en position 3 il s'agit d'isoflavonoïdes.

[245] (a) JB Harborne, Nature, distribution, and function of plant flavonoids. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine - Biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*, Cody V, Middleton EJr, Harborne JB (eds), **1986**, 15-24. Alan R. Liss, Inc.: New York ; (b) Ghedira K, Flavonoids: structure, biological activities, prophylactic function and therapeutic uses, *Phytothérapie,* **2005***, 4*, 162-169

[246] BH . Havsteen, The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther,* **2002***, 96*, 67-202

[247] JPJ. Marais, B. Deavours, RA. Dixon, D. Ferreira, The stereochemistry of flavonoids. *In The Science of Flavonoids*, Grotewold E (ed), **2006**, 1-46. Springer Science, Inc.: New York

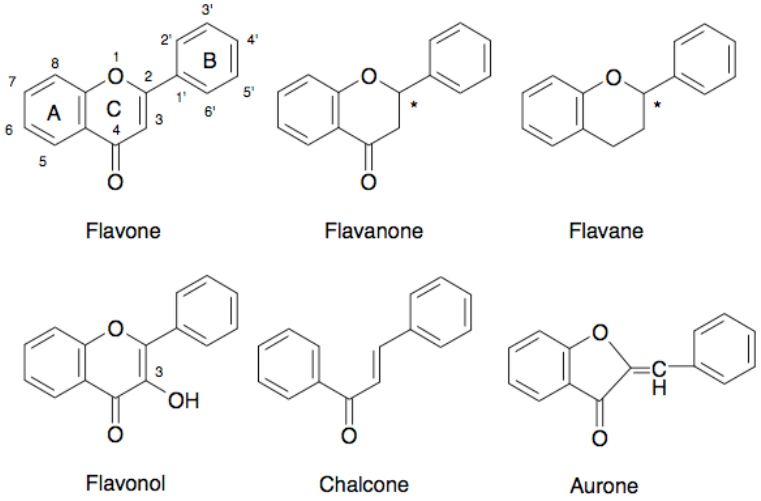


Figure 112 : *Principaux groupes de flavonoïdes*

Notre intérêt s'est porté sur cette famille de composés, car elle présente de nombreuses activités *in vitro* et *in vivo* comme des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques ou encore anti-cancéreuses. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'acide flavone-8-acétique (FAA)[248] (Figure 113) qui est considéré comme un composé antivasculaire et antitumoral puissant chez la souris, mais n'a pas montré d'activité anticancéreuse chez l'homme. La destruction de la vascularisation tumorale observée après l'administration de la FAA *in vivo* chez la souris indique que cette molécule possède une activité antivasculaire marquée. Cependant, contrairement aux agents antivasculaires antitumoraux (p. ex., combrétastatine A4), la FAA ne laisse pas de cellules viables à la périphérie de la tumeur. Le mode d'action de ce ligand n'est pas direct : il est tout d'abord métabolisé par des microsomes murins (chez la souris), puis a une action qui n'est pas encore bien définie sur les cellules tumorales mais qui fait intervenir principalement ces métabolites. En greffant la FAA sur nos sondes d'imagerie moléculaire, nous pourrions ainsi cibler les cellules tumorales de l'endothèlium et mieux comprendre l'activité antitumorale de la FAA chez la souris, mais aussi contribuer au développement de nouvelles molécules antitumorales qui pourraient s'avérer actives chez l'homme.

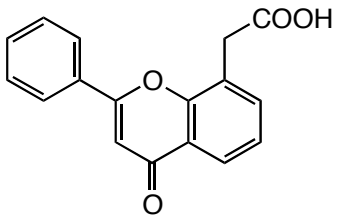


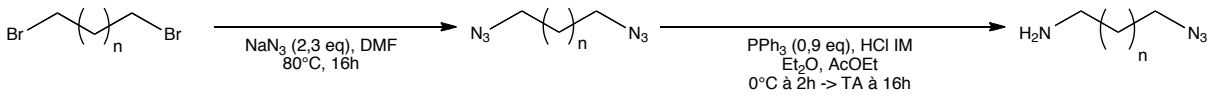
Figure 113 : *Acide 8-flavone acétique – « 8-Flavone acetic acid » FAA*

[248] Dans cette thèse, nous avons délibérément utilisé le féminin pour évoquer l'abréviation "FAA", en référence à la "flavone acétique", appellation qui lui a été attribuée par l'ensemble des chercheurs francophones qui ont travaillé sur cette molécule.

Afin d'obtenir le dérivé azoture de la FAA, nous allons greffer par couplage peptidique des bras espaceur amino-azotures. Trois bras espaceurs de longueurs différentes seront testés : un à 4 carbones, l'autre à 6 ainsi qu'un dérivé pégylé. Ceci nous permettra de jouer sur le caractère hydrophile et la rigidité de l'agent de contraste bifonctionnel à synthétiser. Il s'agit d'un paramètre important à prendre en compte, car cela détermine la capacité de la molécule à passer les différentes barrières de l'organisme.

2. Synthèse des bras espaceurs amino-azoture

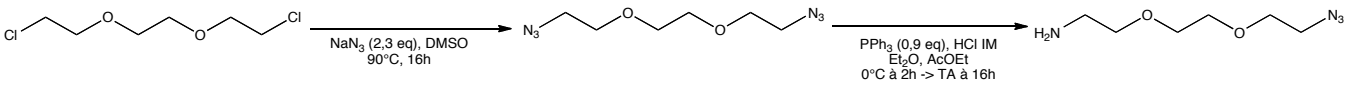
Pour réaliser le dérivé azoture de la flavone, trois bras de longueur de chaîne différente possédant un azoture ont été synthétisés à partir des dihalogénés correspondants par diazidation puis monoréduction (Schéma 71 et Schéma 72) comme nous l'avons déjà vu au chapitre 2.[249,250]



112 (n = 2)
98 (n = 4)

113 (n = 2)
99 (n = 4)

Schéma 71 : *Bras espaceurs alkyles amino-azoture*



114

115

Schéma 72 : *Bras espaceur PEG amino-azoture*

Les deux bras alkyles sont synthétisés à partir du 1,4-dibromobutane et du 1,6-dibromohexane. Ces derniers ont été traités par un excès d'azoture de sodium au reflux dans du DMF pendant 16h et ont conduit aux produits diazidés **112** et **98** avec des rendements de 88 et 96 % (pour n = 2 et 4). Le dérivé PEG a quant à lui été traité par un excès d'azoture de sodium au reflux du DMSO pendant 16h et a conduit au produit diazidé **114** avec un rendement quantitatif (Tableau 24). La formation de ces composés est confirmée par RMN ^{1}H et ^{13}C par le blindage des protons et carbones en α des azotures. Une des fonctions azoture a ensuite été réduite sélectivement par la triphénylphosphine en milieu acide. Cette réaction en

[249] B. Carboni, A. Benalil, M. Vaultier (**1993**) Aliphatic amino azides as key building blocks for efficient polyamine syntheses, *J. Org. Chem., 58,* 3736-3741

[250] J. W. Lee, S. I. Jun, K. Kim (**2001**) An efficient and pratical method for the synthesis of mono-N-protected a,w-diaminoalkanes, *Tetrahedron Lett., 42,* 2709-2711

milieu acide a permis d'éliminer le sous-produit (Ph_3PO) qui lui est resté dans la première phase organique alors que les produits formés **113, 99** et **115**, sous forme protonée, sont passés dans la phase aqueuse. Pour les récupérer, il a alors suffi de traiter cette phase par une solution d'hydroxyde de sodium. Ce traitement a permis de régénérer la fonction amine de ces composés qui sont alors passés dans la phase organique. La réduction a été réalisée avec des rendements de 95, 72 et 83 % respectivement. Les produits **113, 99** et **115** ont donc été obtenus avec des rendements globaux de 84% pour n = 2, 69 % pour n = 4 et 83 % pour n = -$(CH_2CH_2O)_2$-. La structure de ces amino-azotures est confirmée par RMN ^1H et ^{13}C par la différenciation des signaux des protons et des carbones en α de l'azoture et de l'amine.

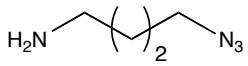
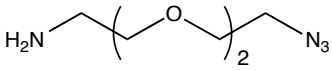
Bras espaceur amino-azoture formé	*Rendement de l'azidation*	*Rendement de la réduction*	*Rendement total*
 **113**	88 % (**112**)	95 % (**113**)	**84 %**
 **99**	96 % (**98**)	72 % (**99**)	**69 %**
 **115**	Qtf (**114**)	83 % (**115**)	**83 %**

Tableau 24 : *Résultats de la synthèse des différents bras espaceurs amino-azoture*

3. Couplage peptidique sur la FAA

Pour réaliser les dérivés azotures de la FAA, l'acide carboxylique de l'acide 8-flavone acétique a été couplé aux différents bras amino-azoture **99**, **113** et **115** en présence d'EDC et d'HOBt pour obtenir respectivement les composés **116**, **117** et **118** (Schéma 73).

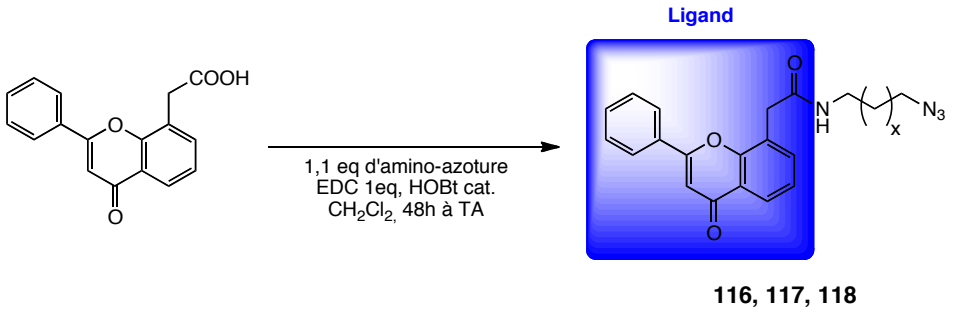


Schéma 73 : *Couplage peptidique entre FAA et les bras espaceurs amino-azoture*

Dans cette réaction, l'acide carboxylique de la FAA est activé par l'EDC pour donner l'intermédiaire **A**. Puis l'hydroxyle de l'HOBt attaque le carbonyle du complexe **A** pour former le composé **B**. Finalement, l'amine réagit avec le composé **B** par substitution nucléophile pour donner l'amide **116, 117** ou **118** et régénérer l'HOBt (Schéma 74).

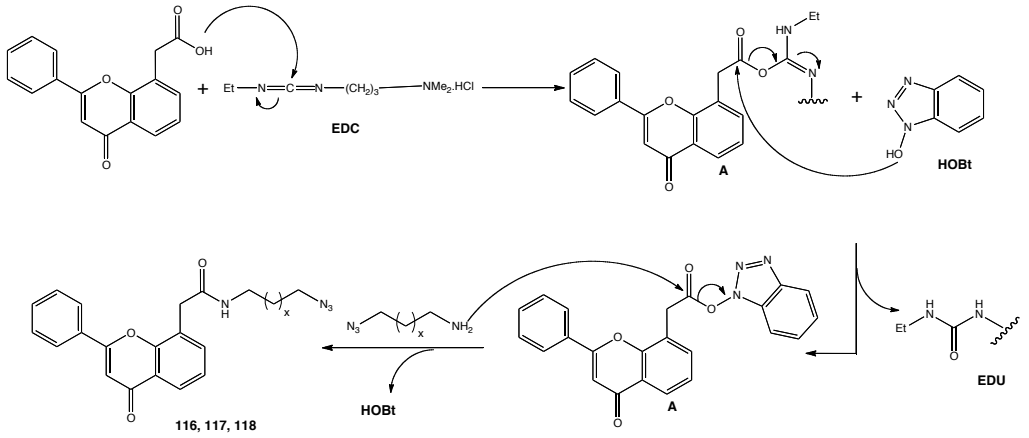


Schéma 74 : *Mécanisme du couplage peptidique*

Nous avons choisi l'EDC comme agent de couplage plutôt que le DCC car le produit secondaire résultant (l'urée correspondante) est facilement éliminé du produit de couplage par simple extraction à l'eau contrairement au DCU.

Les produits de couplage **116** à **118** ont été obtenus avec de bons rendements compris entre 72 % et 83 % et avec des rendements globaux de 62 % pour n = 2, 57 % pour n = 4 et 60 % n = -$(CH_2CH_2O)_2$- (Tableau 25). Les composés ont été caractérisés par l'apparition d'un pic à 169,6 ppm sur le spectre RMN ^{13}C correspondant au carbonyle de l'amide et le blindage du singulet des protons méthyliques du benzyle en α de l'amide.

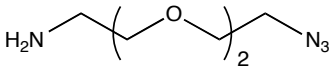
Bras espaceur amino-azoture	*Rendement*	*Rendement total*	*Ligand azoturé formé*
 **113**	74 %	**62 %**	**116**
 **99**	83 %	**57 %**	**117**
 **115**	72 %	**60 %**	**118**

Tableau 25 : *Résultats du couplage peptidique du Schéma 73*

B. Galactose

1. Intérêt du galactose

Les récepteurs de la surface cellulaire sont un excellent choix pour le ciblage sélectif de médicaments, d'oligonucléotides ou de sondes moléculaires en utilisant leurs ligands specifiques. En effet, un grand nombre de cellules animales possède des sites de fixation protéines/sucres, appelés aussi « lectines membranaires ». C'est pourquoi les sucres ont été utilisés comme signaux de reconnaissance pour délivrer spécifiquement des composés biologiquement actifs.

Les glyconjugués à la surface des cellules sont associés à un grand nombre de fonctions biologiques telles la reconnaissance des cellules, l'adhésion cellulaire, les régulations de la croissance, la fixation spécifique de virus, de bactéries ou d'hormones. Des protéines membranaires ayant la capacité de fixer ces glyconjugués ont été caractérisées dans de nombreux types de cellules. Il s'agit de « lectines », protéines ou glycoprotéines d'origine non immunogénique qui se lient spécifiquement par affinité à un ose ou oligoside (présents sur des carbohydrates, glycoprotéines ou glycolipides), de façon similaire aux enzymes et aux immunoglobulines. Ce ne sont ni des anticorps, ni des enzymes, ni des protéines de transport. Ces lectines membranaires sont impliquées dans l'élimination de glycoprotéines sériques désialylées (lectine du foie), dans l'internalisation des enzymes du lysosome (lectine des fibroblastes), elles interviennent probablement dans les phénomènes de reconnaissance cellule-cellule et cellule-matrice, telles les interactions virus-cellule cible ou bactérie-hôte.[251]

Nous nous sommes plus intéressés aux lectines existant à la surface des cellules du foie, des hépatocytes (encore appelées récepteur d'asialoglycoprotéine) qui reconnaissent le galactose et qui servent de récepteur pour éliminer certaines glycoprotéines de la circulation sanguine. La présence de ces lectines membranaires ayant la capacité d'internaliser le ligand spécifiquement reconnu, ici le galactose, nous ouvre une voie de ciblage des cellules du foie et donc d'obtenir un agent de contraste bifonctionnel nous permettant d'obtenir des images moléculaires du foie.

Afin d'obtenir des agents de contraste capables de cibler les récepteurs membranaires via les lectines du foie, nous devons préparer des dérivés azotures du galactose pour pouvoir les greffer sur nos squelettes **IX** possédant déjà les complexes de sel métallique servant à la détection. Pour ceci, nous avons réalisé une glycosidation du D-galactose par un azidoalcool en position anomérique (position 1).

[251] K. Drickamer, M. E. Taylor, Biology of animal lectins, *Ann. Rev. Cell. Biol.*, **1993**, *9*, 237-264

2. Synthèse des bras espaceurs azidoalcool

La première étape a consisté en la synthèse des bras espaceurs azidoalcool en réalisant une azidation sur des halogénoalcools (Schéma 75).[252]

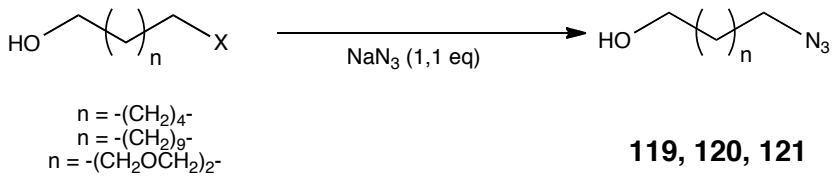


Schéma 75 : *Synthèse des bras espaceurs azidoalcool*

Trois azidoalcools ont été synthétisés : le 6-azidohexanol **119**, le 11-azidoundécanol **120** et le 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthanol **121**. L'azidoalcool **119** est obtenu par azidation du 6-bromohexanol dans un mélange eau/DMF avec un rendement de 85 %. Les azidoalcools **120** et **121** sont obtenus par azidation dans de l'acétonitrile en présence d'iodure de sodium à partir du 11-bromoundécanol et du 2-(2-(2-chloroéthoxy)éthoxy)éthanol avec des rendements quantitatif pour n = 9 et de 81 % pour n = $-(CH_2CH_2O)_2-$ (Tableau 26). La structure des différents azidoalcool a été confirmée par l'étude des spectres RMN ^1H et plus précisément par le blindage des protons méthyliques en α de l'azoture par rapport à ceux en α de l'alcool.

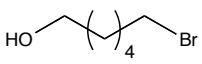
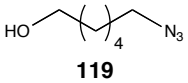
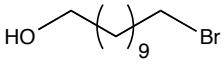
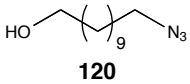
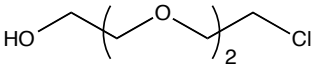
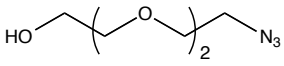
Composé halogénoalcool	*Protocole opéré*	*Rendement*	*Bras espaceur azidoalcool formé*
	DMF/Eau 85°C, 16h	**85 %**	 **119**
	NaI (1 eq), CH_3CN 60°C, 16h	**Qtf**	 **120**
	NaI (1 eq), CH_3CN 60°C, 16h	**81 %**	 **121**

Tableau 26 : *Résultats de la synthèse des bras azidoalcool*

3. Glycosidation directe par $SnCl_4$

Nous avons ensuite réalisé la glycosidation du β-D-galactose peracétylé commercial par les bras espaceurs azidoalcool **119** à **121**. Nous avons choisi d'utiliser une variante de la

[252] (a) S. G. Alvarez, M. T. Alvarez, *Synthesis*, **1997**, 413-414 ; (b) A. J. Scheel, H. Komber, B. I. Voit, *Macromol. Rapid Commun*., **2004**, *25*, 1175-1180 ; (c) N. Hooper, L. Beeching, J. M. Dyke, A. Morris, J. S. Ogden, A. A. Dias, M. L. Costa, M. T. Barros, M. H. Cabrell, A. M. C. Moutinho, *J. Phys. Chem. A*., **2002**, *106*, 9968-9969

procédure de Lemieux.[253] Dans ce procédé, on condense le sucre peracétylé avec un alcool en présence de tétrachlorure d'étain. La configuration du glycoside formée est liée à la nature du groupement participant en position 2 (en α de la position 1). Ici, le groupement protecteur est un groupement acétate qui va former un acétoxonium par participation de groupe encombrant le carbone anomérique en position α et donc privilégiant une attaque exclusivement par la face β du D-galactose. Le β-D-galactose peracétylé est traité par du tétrachlorure d'étain à 0°C pendant 30 minutes, puis on additionne l'azidoalcool **119**, **120** ou **121** à température ambiante en solution dans du dichlorométhane anhydre (Schéma 76).

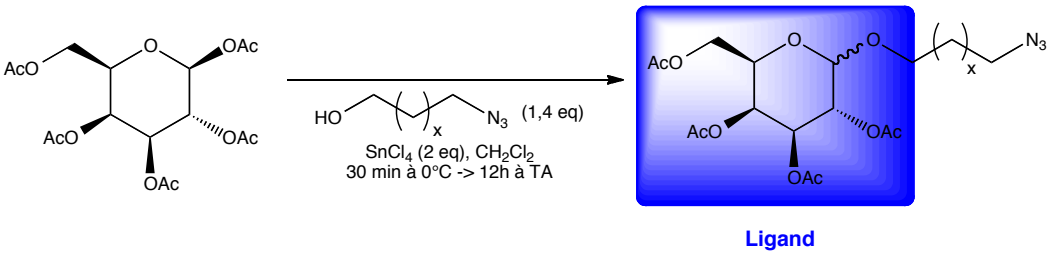


Schéma 76 : *Glycosidation directe du per-O-acétylé D-galactose*

Après purification sur gel de silice, nous n'avons obtenu que le dérivé azoture du galactose **124** issu de la condensation avec le 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthanol avec un rendement faible de 6,5 %.

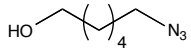
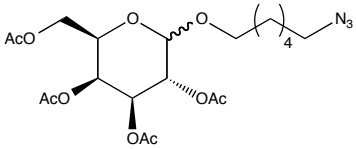
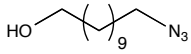
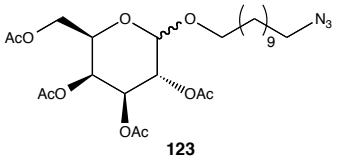
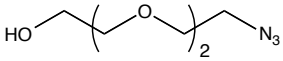
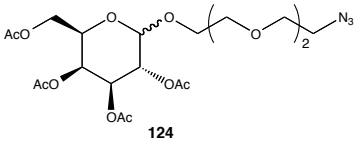
Bras espaceur azidoalcool utilisé	*Rendement*	*Dérivé azoturé du galactose*
 **119**	/	 **122**
 **120**	/	 **123**
 **121**	**6,5 %**	 **124**

Tableau 27 : *Résultats de la glycosidation du Schéma 76*

[253] (a) P. M. Collins, H. Eder, Preparation of 3-methoxycarbonylpropyl α-D- and 7-methoxycarbonylhexyl β-D-galactopyranosides : spacer-arm glycosides for branched oligosaccharide synthesis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1984**, 1525, (b) R. U. Lemieux, W. P. Shyluk, *Can. J. Chem.*, **1953**, *31*, 528

4. Passage par un imidate

Afin d'améliorer les rendements de cette glycosidation, nous avons choisi une autre voie réactionnelle conduisant aussi à la formation de O-glycosides. Il s'agit dans cette méthode d'utiliser un imidate[254] ou un trichloroacétimidate[255] comme donneur de glycosides. La réaction est catalysée par les acides de Lewis (BF_3-OEt_2, TMSOTf ou $ZnBr_2$). La configuration du glycoside formée est liée à la nature du groupement participant en position 2 comme pour les O-glycosides de la voie de synthèse du Schéma 76. La synthèse du trichloroacétimidate du galactose est obtenue en deux étapes par une méthode développée par l'équipe de Schmidt.[256] L'emploi de catalyseurs acides forts, comme le TMSOTf, transforme le trichloroacétimidate en un ion carbénium présentant une conformation demi-chaise dont la face α est encombrée par le groupement acétate en position 2, donc le produit de configuration β est formé majoritairement.

La formation du trichloroacétimidate **126** nécessite tout d'abord la déprotection sélective de la position anomérique du β-D-galactose peracétylé par action de l'éthanolamine (Schéma 77). L'intermédiaire mono-déprotégé **125** est obtenu avec un rendement de 83 % après purification sur cartouche de gel de silice. Sa structure a été établie par l'analyse du spectre RMN ^{1}H où nous avons pu en particulier démontrer que la désacétylation avait été accomplie sur le carbone anomérique par un déblindage du proton anomérique de 5,4 ppm à 6 ppm et la disparition d'un singulet correspondant aux CH_3 d'un groupement acétate de méthyle. L'intermédiaire mono-protégé **125** est ensuite engagé dans la réaction avec le trichloroacétonitrile en présence de DBU pour conduire au trichloroacétimidate **126** avec un rendement de 47 % après purification. La formation du trichloroacétimidate a été confirmée par l'apparition d'un singulet à 8,73 ppm correspondant au proton NH sur le spectre RMN ^{1}H. Le doublet assigné au proton anomérique est de nouveau déplacé vers les champs faibles.

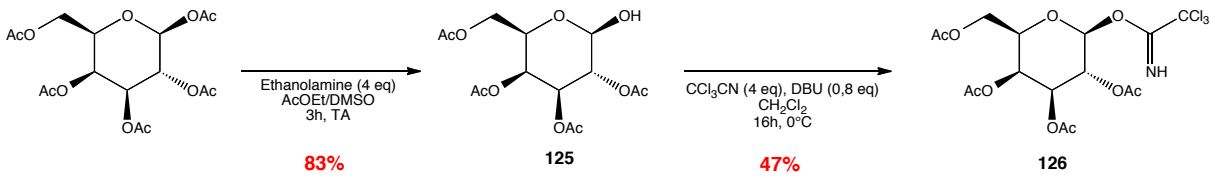


Schéma 77 : *Formation du trichloroacétimidate **126***

[254] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem. Int. Engl.*, **1980**, *19*, 731

[255] (a) J. R. Pougny, P. Sinaÿ, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 4073 ; (b) J. R. Pougny, J. C. Jacquinet, M. Nassar, D. Duchet, M. Milat, P. Sinaÿ, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 6762

[256] (a) R. R Schmidt, Neue methoden zur glycoside- und oligosaccharide synthese –gibt est alternativen zur Noenigs-Knorr methode ?, *Angew. Chem*, **1986**, *98*, 213 ; (b) R. R Schmidt, New methods of glycoside and oligosaccharide syntheses – are there alternatives to Koenigs-Knorr methode, *Angew. Chem. Int. Engl.*, **1986**, *25*, 21

La préparation des dérivés azotures du galactose (**122** à **124**) est catalysée par le triflate de triméthylsilyle (Schéma 78). L'emploi de ce réactif implique que le milieu soit anhydre et qu'il soit rapidement neutralisé en fin de réaction. Dans le cas contraire, la liaison glycosidique formée peut être coupée.

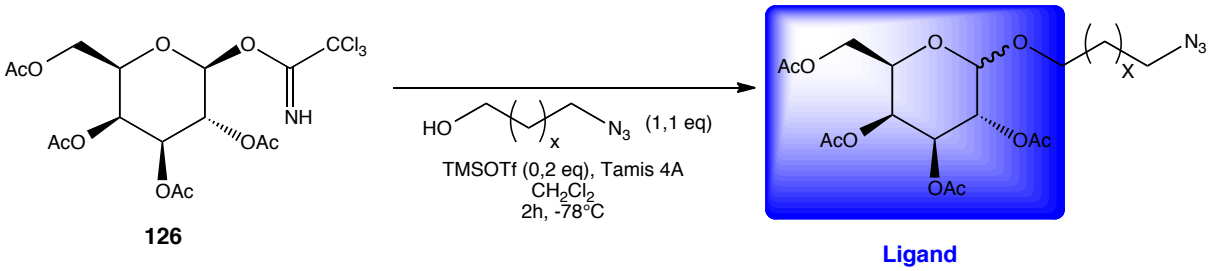


Schéma 78 : *Réaction des bras espaceurs azidoalcools sur le trichloroacétimidate **126***

Par cette méthode de passage par un trichloroacétimidate, nous n'avons pas pu isoler le glycoside **123**, mais uniquement les composés **122** et **124** issus respectivement de la glycosidation du D-galactose avec les bras azidoalcool **119** et **121.** Les composés **122** et **124** ont été obtenus après purification avec un rendement de 29 % pour n = 4 et 10 % pour n = -$(CH_2CH_2O)_2$- (Tableau 28), soit en 3 étapes à partir du β-D-galactose peracétylé avec un rendement de 11 % et 5 %. La formation des produits a été confirmée par LC-MS par l'apparition d'un pic à 5,73 min de m/z = 446,70 $[M+H]^+$ pour le composé **122** et l'apparition d'un pic à 4,9 min de m/z = 528,35 $[M+Na]^+$ pour le composé **124**.

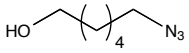
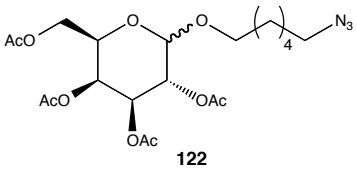
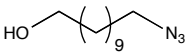
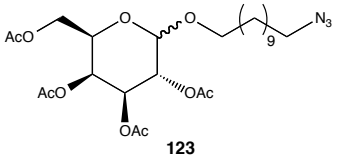
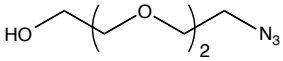
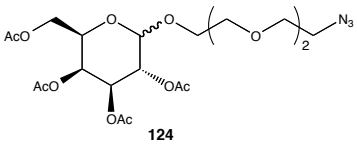
Bras espaceur azidoalcool utilisé	*Rendement*	*Dérivé azoturé du galactose*
 **119**	**29 %**	 **122**
 **120**	/	 **123**
 **121**	**12 %**	 **124**

Tableau 28 : *Résultats de la glycosidation du Schéma 78*

Une fois encore les rendements sont faibles ou les produits de glycosidation n'ont pas été obtenu, nous avons voulu vérifier que ces mauvais résultats n'étaient pas dû à l'utilisation des bras espaceurs azidoalcool. C'est pourquoi nous avons fait réagir le trichloroacétimidate **126** avec des bras espaceurs halogéno-alcool (Schéma 79). Les composés issus de la glycosidation ont été obtenus avec des rendements moyens de 29 % pour n = 4, et de 38 % pour n = 9 et n = -$(CH_2CH_2O)_2$- (Tableau 29). Les substituants anomériques se manifestent sur les spectres RMN ^{1}H par la présence de nouveaux signaux (triplet) entre 3,3 et 3,9 ppm (O-CH_2-).

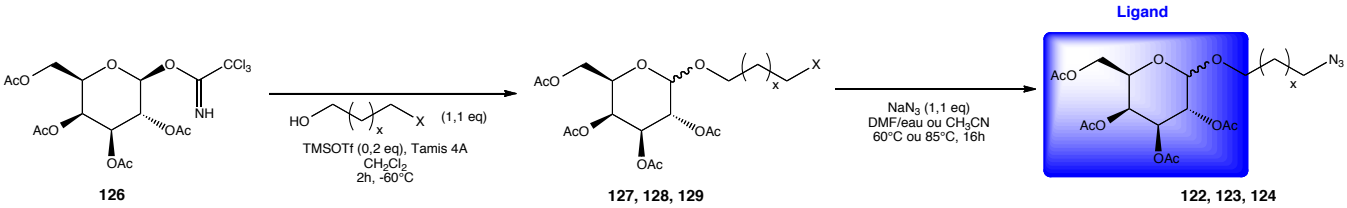


Schéma 79 : *Glycosidation par réaction entre le trichloroacétimidate **126** et les bras espaceurs halogéno-alcool*

Les dérivés halogénés du galactose **127** à **129** ont ensuite été substitués par de l'azoture de sodium avec de bons rendements compris entre 86 et 100 %, soit en 4 étapes à partir du β-D-galactose peracétylé avec des rendements compris entre 10 et 15 %. La structure des dérivés azoturés a été confirmée par l'apparition d'un triplet entre 3,2 et 3,4 ppm intégrant pour les protons méthyliques en alpha de l'azoture.

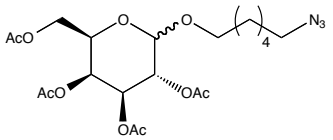
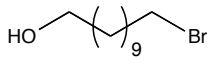
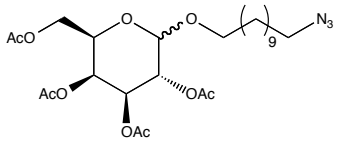
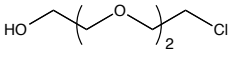
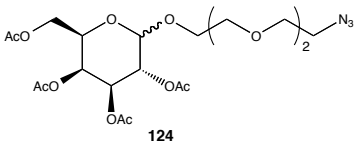
Bras espaceur halogéno-alcool	*Rendement de la glycosidation*	*Rendement de l'azidation*	*Rendement total sur 4 étapes*	*Dérivé azoturé du galactose*
	29 % (**127**)	86 %	**10 %**	 **122**
	38 % (**128**)	Qtf	**15 %**	 **123**
	38 % (**129**)	Qtf	**15 %**	 **124**

Tableau 29 : *Résultats de la glycosidation du Schéma 79*

Pour conclure, la voie de synthèse du Schéma 79 nous a permis d'obtenir trois O-glycosides du galactose couplé à un bras espaceur dont la fonction terminale est un azoture. Les faibles rendements peuvent peut-être s'expliquer par les difficultés rencontrées pour rendre le milieu complètement anhydre. Les traces d'humidité résiduelles ont certainement du empoisonner le catalyseur. Il serait intéressant de reprendre ces réactions afin d'en améliorer le rendement, mais pour notre étude préliminaire d'agent de contraste bifonctionnel, la quantité de produits obtenus est suffisante pour réaliser des essais de couplage par chimie click sur le squelette **IX**. Une dernière étape sera nécessaire afin d'obtenir des ligands de récepteurs d'asialoglycoprotéine. Il s'agit de la déprotection de toutes les fonctions hydroxyles du sucre.

V. Synthèse du châssis VIII

La préparation de ces nouvelles sondes d'imagerie moléculaire repose sur un squelette obtenu à partir d'une réaction à 3 composants qui nous offre plusieurs points d'ancrage pour permettre le couplage de groupements de détection (IRM/scintigraphie/optique) et de ligands.

Le châssis commun à ces agents de contraste est une propargylamine obtenue « one pot » à partir d'une réaction à 3 composants entre un aldéhyde, une amine secondaire et le TMS-acétylène (Schéma 80), dont nous avons développé le principe et notre savoir-faire au chapitre 2. Les chélatants de dérivés métalliques obtenus précédemment seront greffés au châssis commun par couplage peptidique et les dérivés azoturés de ligand seront couplés par cycloaddition d'Huisgen. Afin d'obtenir le châssis **VIII,** la propargylamine sera déprotégée au niveau de l'alcyne de sa fonction triméthylsilyle afin d'obtenir un alcyne vrai pour effectuer la chimie click. Quant aux fonctions ester présentes au niveau des groupements R_1, elle seront saponifiées pour libérer les acides carboxyliques intervenant lors du couplage peptidique.

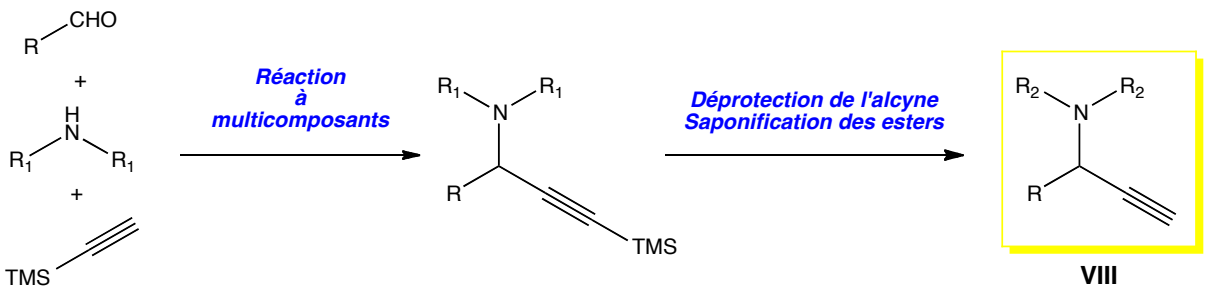


Schéma 80 : *Schéma réactionnel de la formation du châssis **VIII***

A. Formation de l'aldéhyde bifonctionnel

Trois produits rentrent en jeu dans la réaction à 3 composants conduisant à la propargylamine : un aldéhyde, une amine secondaire et un alcyne vrai. Dans notre cas, nous avons opté pour le TMS-acétylène comme alcyne vrai, car la déprotection de ce dernier une fois sur le châssis pourra se faire facilement.

Pour pouvoir coupler ensemble les deux types d'agents d'imagerie bimodal **X** et bifonctionnel **XI** sur une même structure et obtenir de véritables agents d'imagerie moléculaire multimodaux et ciblants (Schéma 60), nous avons décidé d'utiliser un aminoaldéhyde. Notre objectif est de greffer les deux types d'agent sur un bras espaceur ayant des fonctions réactives vis-à-vis de l'amine, comme des chlorures d'acyle pour former des fonctions amides ou encore des fonctions hydroxyles pour réaliser une réaction de type Fukuyama-Mitsunobu (Schéma 81). Pour réaliser un modèle simple de châssis **VIII** et prouver la faisabilité de notre concept, nous avons décidé de synthétiser un aldéhyde aliphatique portant une amine terminale protégée.

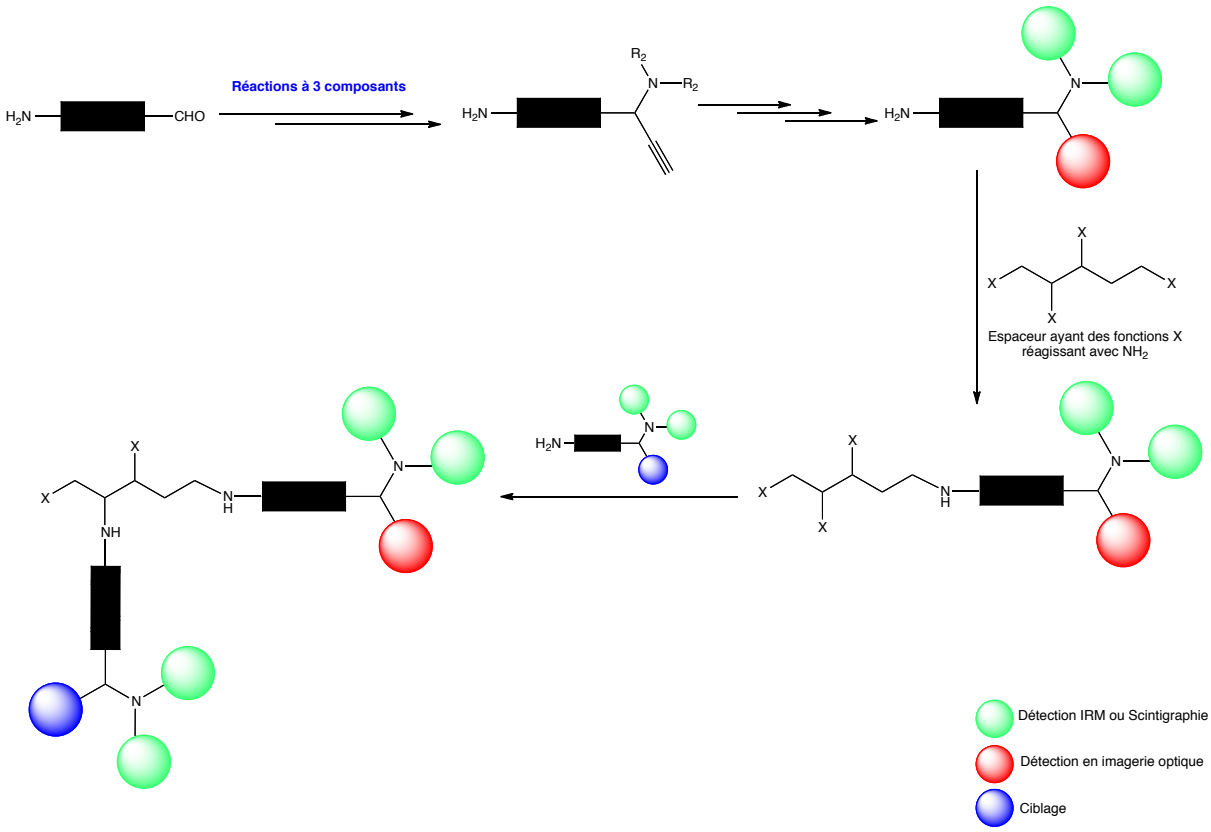


Schéma 81 : *Explication du choix d'un aldéhyde bifonctionnel*

À partir du 6-aminohexan-1-ol, nous avons protégé l'amine primaire par différents groupements protecteurs qui résistent à l'oxydation lors de l'étape suivante (Schéma 82).

Nous avons opté pour différents types de protection répondant à ces critères : une protection sous forme de carbamate avec le groupement tert-butyloxycarbonyle (Boc) **130**, une protection sous forme d'amide simple avec le groupement trifluoroacétate (TFA) **131**, une protection sous forme de sulfonamide soit avec le groupement para-toluène sulfonyle (Ts) **132**, soit avec le groupement ortho-nitrobenzènesulfonyle (*o*-Ns) **133** et soit avec le groupement para-nitrobenzènesulfonyle (*p*-Ns) **134**.

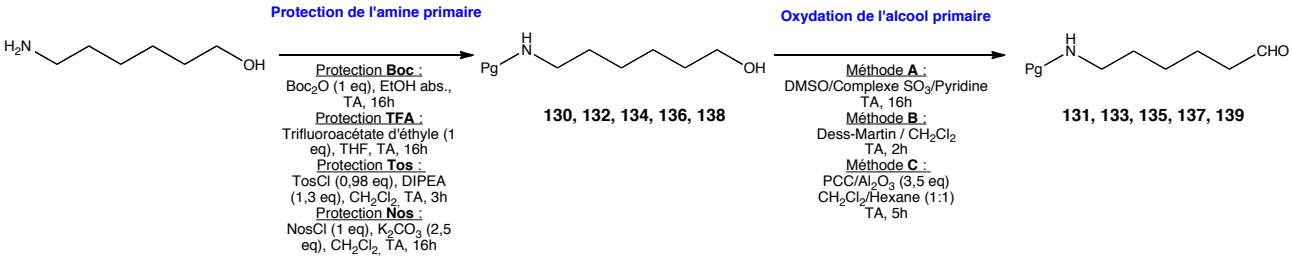


Schéma 82 : *Synthèse du dérivé amino protégé du 6-aminohexan-1-al*

Les 5 aminoalcools semiprotégés **130**, **132**, **134**, **136** et **138** ont été obtenus avec de très bons rendements sans purification (Tableau 30) en employant des protocoles classiques (Schéma 82) adaptés à chaque type de protection utilisée.

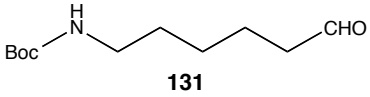
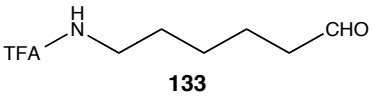
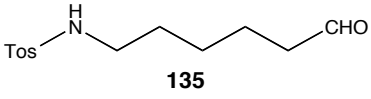
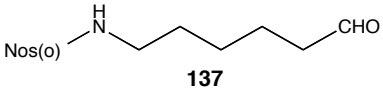
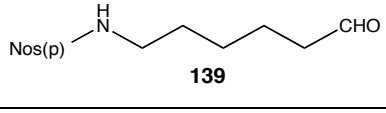
Groupement protecteur de l'amine	*Rendement de la protection*	*Rendement de l'oxydation*	*Rendement total*	*Aldéhyde formé*
Boc	Qtf (**130**)	*Méthode A :* 73 %	**73 %**	 **131**
		Méthode B : 60 %	**60 %**	
		Méthode C : 65 %	**65 %**	
TFA	Qtf (**132**)	*Méthode C :* 66 %	**66 %**	 **133**
Tosyle	Qtf (**134**)	*Méthode A :* 77 %	**77 %**	 **135**
Nosyle (nitro en ortho)	99 % (**136**)	*Méthode A :* 56 %	**55 %**	 **137**
Nosyle (nitro en para)	97 % (**138**)	*Méthode A :* 78 %	**76 %**	 **139**

Tableau 30 : *Résultats de la protection de l'amine et l'oxydation du 6-aminohexan-1-ol*

Diverses voies oxydantes ont été testées sur le premier modèle **130** dont l'amine est protégée par un groupement Boc. Tout d'abord, nous avons commencé par tester la méthode d'oxydation utilisant le périodinane de Dess-Martin,[257] la *méthode B*. C'est un réactif doux et sélectif des alcools primaires et secondaires. L'oxydation est rapide, ayant lieu à température ambiante. Au bout de deux heures, la CCM révèle la formation du produit et la fin de la réaction. L'aldéhyde **131** est obtenu avec un rendement d'environ 60 %. L'inconvénient de cette méthode est que le produit de la réaction et le réactif de Dess-Martin ont le même R_f et la purification sur cartouche de gel de silice ne nous a pas permis de l'éliminer complètement.

La deuxième solution envisagée est l'oxydation de l'alcool à l'aide de pyridinium chlorochromate (PCC)[258] adsorbé sur alumine[259] (*méthode C*). L'avantage de l'alumine tient à la grande facilité de récupération du produit d'oxydation. Après filtration sur fritté et purification par chromatographie flash, le composé **131** est obtenu avec un rendement de 65 %.

Enfin, l'alcool **130** a été traité par le complexe SO_3/pyridine dans le DMSO[260,261,262] (*méthode A*). Le DMSO est un réactif d'oxydation utile lorsque sa réactivité électrophile est accentuée. Il s'agit donc d'augmenter la charge positive sur l'atome de soufre en tirant les électrons vers l'atome d'oxygène engagé dans une combinaison avec un réactif activant. D. Swern[263] a notamment mis au point l'activation du DMSO par le chlorure d'oxalyle, mais il est également possible d'activer le DMSO par un complexe SO_3/pyridine. La première étape de l'oxydation consiste en une attaque électrophile de l'atome d'oxygène du sulfoxyde (Schéma 83, étape 1). L'intermédiaire sulfoxonium ainsi formé subit alors une attaque nucléophile de l'alcool primaire pour conduire au sel de sulfonium correspondant (Schéma 83, étape 2). La présence d'une base organique (la triéthylamine et la diisopropyléthylamine dans notre cas) permet l'arrachement du proton de ce sel et donne l'ylure de sulfonium

[257] D. B. Dess, J. C. Martin, A useful 12-I-5 triacetoxyperiodinane (the Dess-Martin periodinane) for the selective oxidation of primary or secondary alcohols and a variety of related 12-I-5 species, *J. Am. Chem. Soc.,* **1991***, 113*, 7277-7287

[258] E. J. Corey, J. W. Suggs, *Tetrahedron Lett.,* **1975**, *16*, 2647

[259] S. Bhar, S. K. Chaudhuri, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 3493

[260] K. Omura, D. Swern, Oxidation of alcohols by "activated" dimethyl sulfoxide. a preparative, steric and mechanistic study, *Tetrahedron,* **1978***, 34*, 1651-1660

[261] A. J. Mancuso, D. Swern,Activated Dimethyl Sulfoxide: Useful Reagents for Synthesis, *Synthesis,* **1981***, 3*, 165-185

[262] J. R. Parikh, W.E Doering., Sulfur trioxide in the oxidaiton of alcohols by dimethyl sulfoxide, *J. Am. Chem. Soc.,* **1967***, 89,* 5505-5507

[263] S. Haung, A. Mancuso, D. Swern, Oxidation of long-chain and related alcohols to carbonyls by dimethyl sulfoxide "activated" by oxalyl chloride *J. Org. Chem*., **1978**, *43*, 2480-2482

(Schéma 83, étape 3) qui par une réaction d'élimination intramoléculaire conduit à l'aldéhyde attendu (Schéma 83, étape 4).

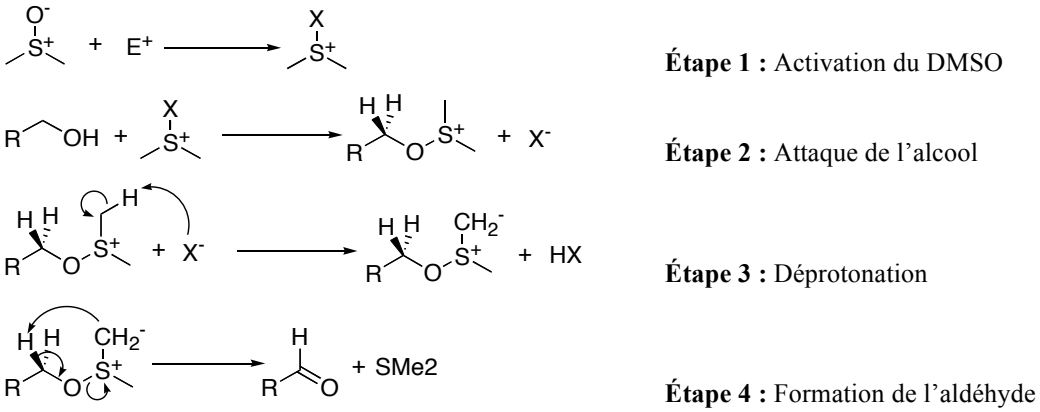


Schéma 83 : *Mécanisme d'oxydation d'un alcool primaire en présence de DMSO activé*

L'aldéhyde **131** a été obtenu par la *méthode A* après purification avec un rendement de 73 %. Donc nous avons privilégié cette méthode d'oxydation (complexe SO_3/pyridine dans le DMSO) pour la formation des autres aldéhydes **133**, **135**, **137**, **139** qui nous a permis de les obtenir avec de bons rendements compris entre 56 et 78 %. En RMN ^{1}H, nous avons alors observé l'apparition d'un triplet vers 9,7 ppm correspondant au proton aldéhydique. Les différents aldéhydes ont été obtenus en 2 étapes à partir du 6-aminohexan-1-ol avec des rendements globaux compris entre 55 et 77 %.

B. Amine secondaire

1. Choix du type d'amine secondaire

Pour pouvoir greffer les dérivés amino des chélatants au châssis **VIII** commun par couplage peptidique, il est nécessaire d'avoir des acides carboxyliques au niveau des groupements R_2 (Schéma 84). Comme la réaction A^3 nous permet d'introduire « *one pot* » plusieurs points d'ancrage (R, R_2, alcyne), nous avons choisi d'utiliser une amine secondaire possédant une ou deux fonctions acides carboxyliques.

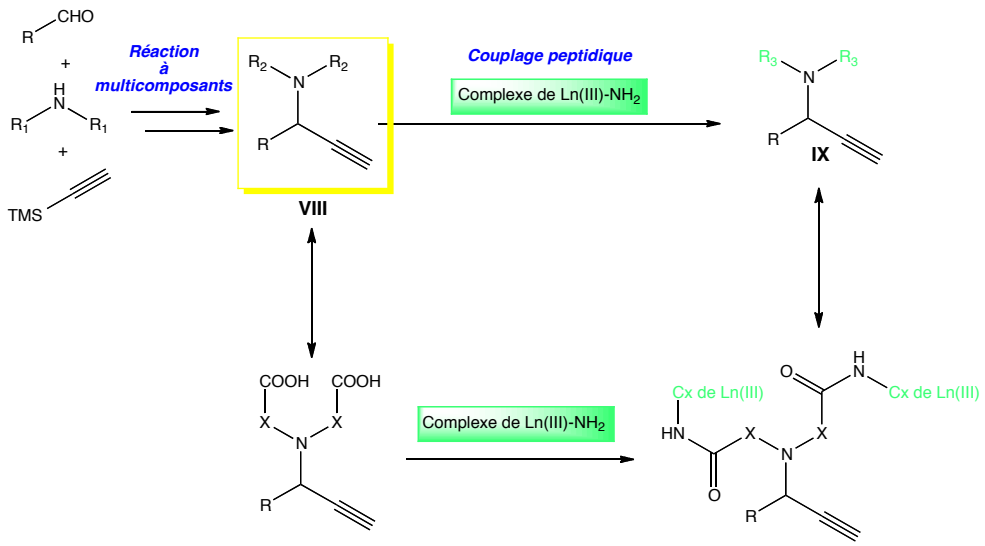


Schéma 84 : *Utilisation d'une amine secondaire possédant une fonction acide carboxylique sur son squelette*

Nous avons tout d'abord réalisé la réaction à 3 composants avec l'aldéhyde **131**, le TMS-acétylène et l'acide iminodiacétique **140** sous activation MW catalysée par 0,6 équivalent de CuI (Schéma 85). Malheureusement, la propargylamine **141** attendue n'a pas été obtenue. Ceci est certainement dû à la présence des acides libres qui sont rentrés en concurrence avec le mécanisme de formation de la propargylamine. C'est pourquoi nous avons décidé de travailler avec des amines secondaires possédant des acides carboxyliques protégés sous forme d'ester.

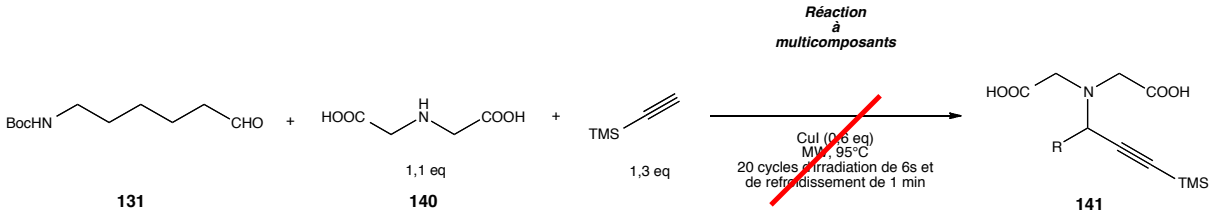


Schéma 85 : *Réaction à 3 composants à partir de l'acide iminodiacétique **140***

2. Amines secondaires commerciales

Nous avons tout d'abord choisi de réaliser des châssis **VIII** à partir de l'ester méthylique de L-proline **142** commercial afin d'obtenir une version asymétrique de la propargylamine formée. Deux autres produits commerciaux dérivés de l'acide iminodiacétique ont été utilisés : le premier où les acides sont protégés sous forme d'ester éthylique, l'iminodiacétate de diéthyle **143** et le deuxième où les acides sont protégés sous forme d'ester tert-butylique, l'iminodiacétate de tert-butyle **144**. L'avantage avec ces deux derniers composés est que l'on pourra coupler deux agents chélatants sur la structure et ainsi augmenter l'efficacité de détection des agents de contraste formés.

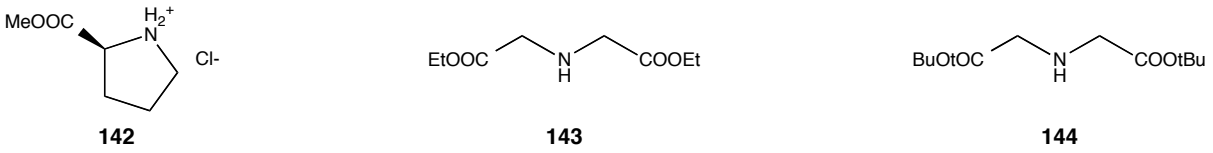


Figure 114 : *Amines secondaires commerciales utilisées*

3. Synthèse de l'iminodiacétate de di-2-(triméthylsilyl)éthyle

D'autre part, nous avons préparé un dérivé de l'acide iminodiacétique, où les acides sont protégés sous forme d'ester par un groupement triméthylsilyléthyle TMSE. L'amine de l'acide iminodiacétique **140** a tout d'abord été protégée par un groupement Boc dans un milieu dioxane/ NaOH 1M avec un rendement de 88 %.[264] Ce résultat a été confirmé par RMN ^{1}H avec l'apparition d'un singulet à 1,36 ppm caractéristique du groupement tert-butyle du Boc. L'acide N-Boc-iminodiacétique **145** a ensuite été estérifié avec le 2-(triméthylsilyl)éthanol en présence de DCC avec un rendement quantitatif.[265] La structure a été confirmée sur le spectre RMN ^{1}H par l'apparition de deux triplets à 0,98 ppm et 4,22 ppm correspondant au groupement éthyle du groupement TMSE. Le diester protégé **146** a ensuite été converti en amine libre **147** par un milieu HCl 5-6N dans l'isopropanol avec un rendement de 38 %. La disparition du singulet à 1,36 ppm caractéristique du groupement Boc sur le spectre RMN ^{1}H a permis de confirmer la formation du composé **147**.

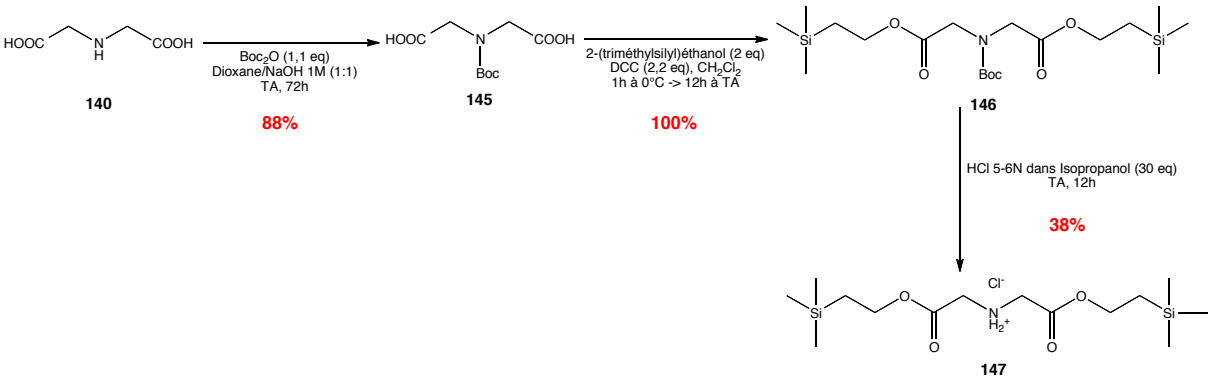


Schéma 86 : *Synthèse de l'iminodiacétate de di-2-(triméthylsilyl)éthyle **147***

[264] (a) J. Cookson, M. S. Vickers, R. L. paul, A. R. Cowley, P. D. Beer, Amide functionalised dithiocarbamate ruthenium (II) bis-bipyridyl receptors : a new class of redox-responsive anion sensor, *Inorganica Chimica Acta*, **2008**, *361*, 1689-1698 : (b) S. Girault, E. Davioud-Charvet, L. Maes, J-F. Dubremetz, M-A. Debreu, V. Landry, C. Sergheraert, Potent and specific inhibitors of trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi : bis(2-aminodiphenylsulfides) for fluorescent labeling studies, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 837-846

[265] L. Wang, J. E. T. Corrie, J. F. Wootton, Photolabile precursors of cyclick nucleotides with high aqueous solubility and stability, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3474-3478

C. Réaction A³

La propargylamine **VIII'** a été obtenue par une réaction à 3 composants entre les aldéhydes (**131**, **133**, **135**, **137** et **139**), les amines secondaires (**142**, **143**, **144** et **147**) et le TMS-acétylène (Schéma 87). Cette réaction A^3 est catalysée par du cuivre (I) et la quantité optimale trouvée pour ces modèles est comprise entre 0,5 et 0,6 équivalents. D'autre part, cette étape a été optimisée sous activation MW en réalisant des cycles d'irradiation et de refroidissement contrôlés par des températures comprises entre 45 et 95°C comme l'ont développé les équipes de Fan[172] ou de Ju[166]. Les résultats des différentes combinaisons sont regroupés dans le Tableau 31.

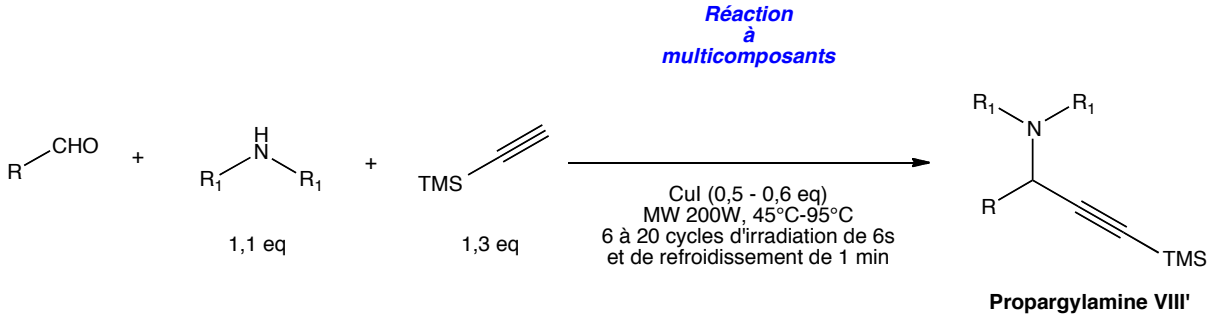


Schéma 87 : *Réaction à 3 composants conduisant à la propargylamine précurseur du châssis **VIII***

Un seul essai a été réalisé avec l'ester méthylique de la L-proline **142** qui conduit à la propargylamine **148** avec un rendement après purification assez faible de 20 %. De plus, nous n'avons pas observé d'influence stéréoisomérique de la L-proline sur le nouveau carbone asymétrique formé. Donc nous n'avons pas poursuivi notre synthèse de châssis **VIII'** avec cette amine **142**, mais nous avons privilégié les dérivés de l'acide iminodiacétique qui nous permettent de greffer deux chélatants de dérivés métalliques.

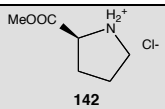
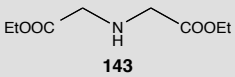
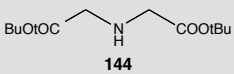
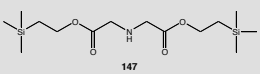
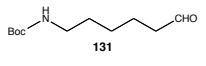
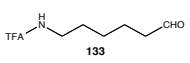
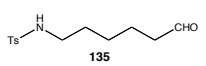
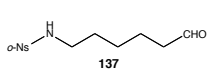
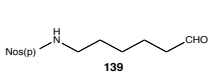
Aldéhyde \ Amine	 **142**	 **143**	 **144**	 **147**
 **131**	20 % (**148**)	70 % (**149**)	73 % (**154**)	-
 **133**	-	52 % (**150**)	62 % (**155**)	-
 **135**	-	90 % (**151**)	34 % (**156**)	15 % (**157**)
 **137**	-	65 % (**152**)	-	44 % (**158**)
 **139**	-	51 % (**153**)	-	27 % (**159**)

Tableau 31 : *Synthèse de différentes propargylamines de structure **VIII'***

Les diesters éthyliques et tert-butyliques de l'acide iminodiacétique conduisent à des propargylamines avec des rendements similaires et tout à fait corrects allant de 34 % pour le composé **156** à 90 % pour le composé **151**. Le groupement protecteur de l'amine du composé aldéhydique ne semble pas avoir influencé positivement ou négativement la réaction A^3 (comparaison des propargylamines formées à partir de l'amine **143** conduisant aux composés **149** à **153**). Les meilleurs rendements ont été obtenus lorsque l'amine du composé aldéhydique est protégée par un groupement Boc **131**. Par contre, les propargylamines issues du couplage avec l'iminodiacétate de di-2-(triméthylsilyl)éthyle **147** sont obtenus avec des rendements moyens de l'ordre de 15 à 44 % (composés **157** à **159**) et ceci malgré une optimisation des conditions opératoires. Ces rendements modérés peuvent peut-être s'expliquer par un encombrement stérique plus important dans le cas de l'amine **147** que pour les amines **143** et **144**. Les structures des différentes propargylamines ont été confirmées sur le spectre RMN ^{1}H par la disparition du proton aldéhydique à 9,7 ppm et l'apparition d'un triplet ou multiplet à 3,5 ppm correspondant au proton en α de l'alcyne. De même sur le spectre RMN ^{13}C, le déplacement à 202 ppm du carbone aldéhydique a disparu pour laisser place au carbone asymétrique de la propargylamine vers 54-55 ppm.

D. Saponication/Déprotection de l'alcyne

Les châssis **VIII** des agents d'imagerie moléculaire sont obtenus après une déprotection de l'alcyne et une saponification des esters réalisées en une seule étape. En effet, le groupement triméthylsilyle est un groupement labile en présence d'acide trifluoroacétique ou en milieu basique. Une déprotection par action des ions fluorures (à partir de TBAF) a été préalablement réalisée pour enlever les groupements TMS et TMSE qui a bien conduit au produit déprotégé, mais qui n'a pas pu être obtenu sans trace d'ions tétrabutylammonium. Deux modes opératoires ont alors été envisagés en fonction des groupements à saponifier : une saponification par une solution de NaOH 4M en milieu méthanoïque à température ambiante ou sous activation MW pour saponifier les esters éthyliques ou tert-butyliques ou une déprotection en milieu acide fort par action de l'acide trifluoroacétique pour déprotéger les esters tert-butyliques ou les esters triméthylsilyléthyles (*méthode C*) (Schéma 88).

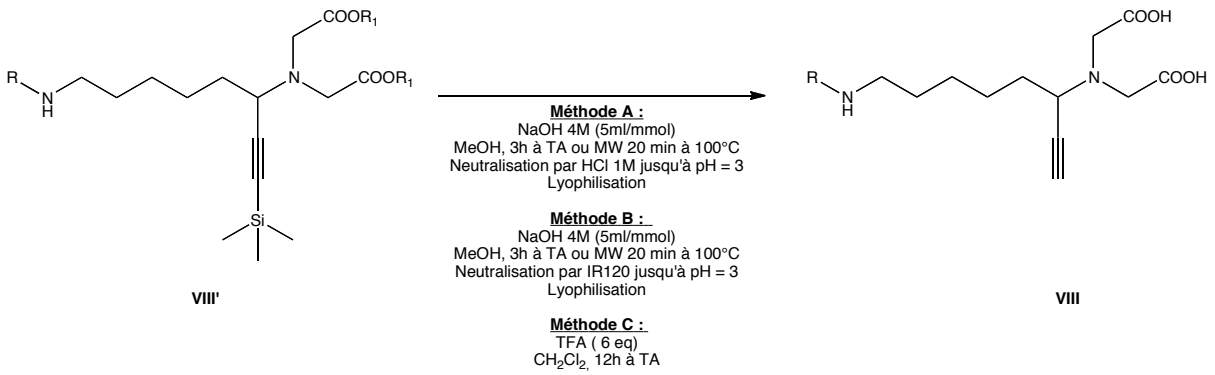


Schéma 88 : *Saponification et déprotection de l'alcyne de la propargylamine **VIII'***

En ce qui concerne la méthode de saponification en milieu basique, deux traitements différents ont été opérés pour récupérer le diacide **VIII** formé. La première méthode *(méthode A*) consiste à neutraliser le milieu par une solution de HCl 1M puis à lyophiliser le milieu réactionnel, tandis que la deuxième méthode (*méthode B*) utilise une résine Amberlite acide IR120 pour neutraliser le milieu.

Nous allons voir plus en détail les différentes méthodes appliquées et les résultats obtenus en fonction des propargylamines formées au paragraphe précédent et plus particulièrement en fonction du groupement protecteur porté par l'amine aliphatique.

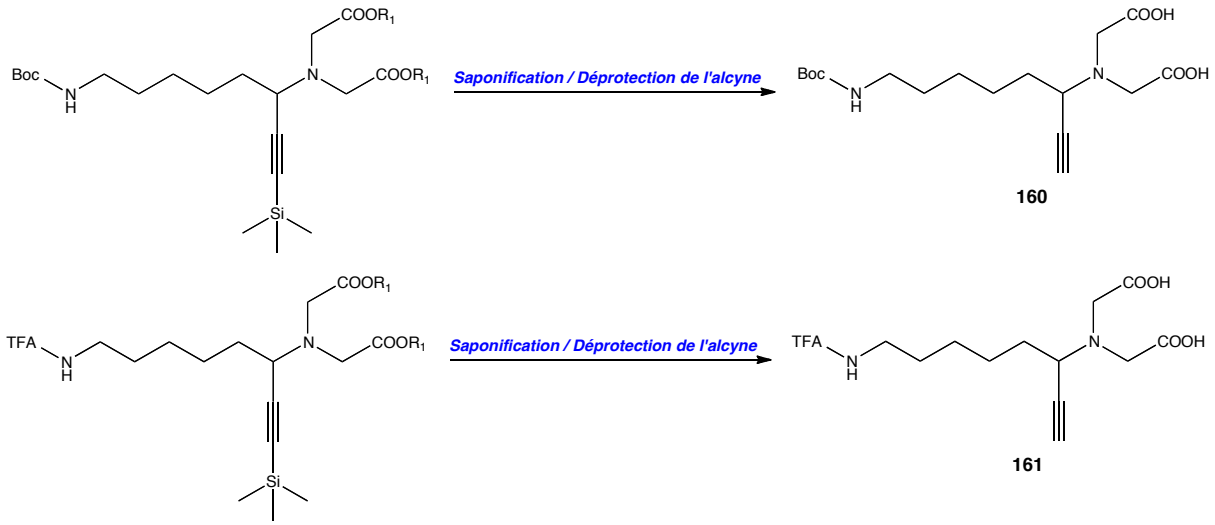


Schéma 89 : *Synthèse des châssis **VIII** où l'amine primaire est protégée par un groupement Boc ou un groupement TFA*

Squelette VIII' mis en jeu	*Méthode A*	*Méthode B*	*Méthode C*
149 (Boc, R_1 = Et)	Formation du produit **160** avec R = **69 %,** mais perte partielle de la protection Boc	Formation du produit **160**, mais perte partielle de la protection Boc	-
154 (Boc, R_1 = tBu)	Uniquement déprotection de la fonction alcyne	-	Formation du produit **160** mais perte de la protection Boc
150 (TFA, R_1 = Et)	Formation du produit **161**, mais perte de la protection TFA	-	-
155 (TFA, R_1 = tBu)	-	-	Pas d'obtention du produit **161**

Tableau 32 : *Résultats de la synthèse du châssis **VIII** du Schéma 89*

La déprotection des châssis **VIII'** où l'amine est protégée par un groupement Boc ou TFA n'a pas permis d'aboutir exactement au châssis **VIII** attendu **160** ou **161** (Tableau 32). La saponification des esters éthyliques en milieu basique conduit bien à la formation du diacide. Par contre, elle ne permet pas la déprotection des esters tert-butyliques, tandis que la déprotection en présence de TFA permet d'obtenir le diacide issu de la déprotection des acides carboxyliques estérifiés par des groupements tert-butyles. Malheureusement, il a été constaté une perte partielle ou totale de la protection (Boc ou TFA) de l'amine dans la plupart des méthodes appliquées. En effet, ces deux groupements protecteurs ne sont pas très stables en milieu basique fort ou en milieu acide fort. C'est pourquoi nous avons privilégié les groupements protecteurs de type tosyle ou nosyle plus stables dans les conditions décrites pour la déprotection des châssis **VIII'** (Schéma 90).

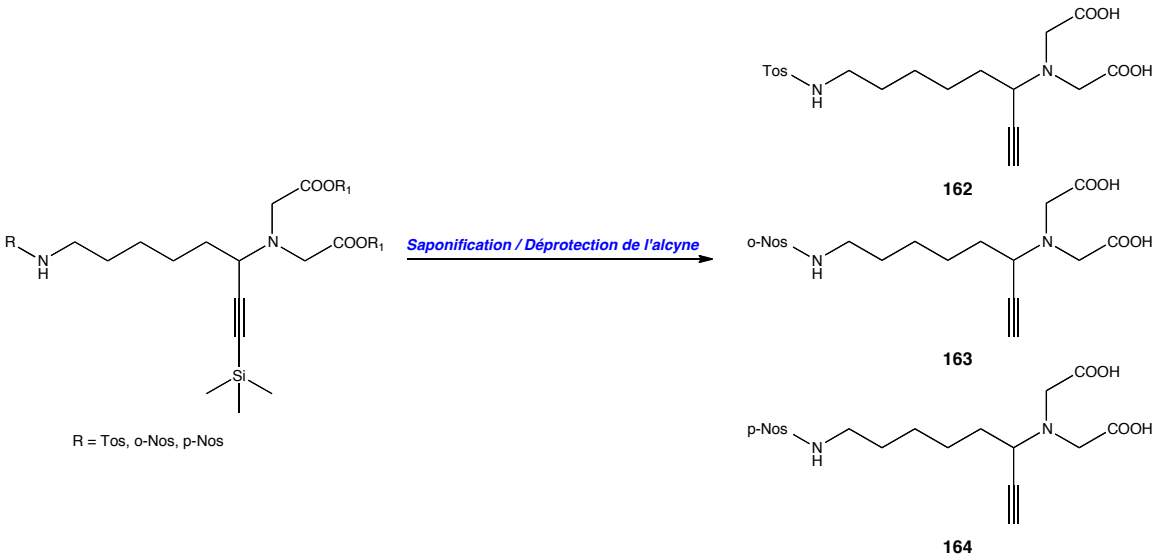


Schéma 90 : *Synthèse des châssis **VIII** où l'amine primaire est protégée par un groupement Tosyle ou Nosyle*

Les résultats obtenus pour la déprotection des divers châssis où l'amine primaire est protégée par un groupement sulfonamide sont regroupés dans le Tableau 33. La déprotection des esters tert-butyliques du composé **156** en présence de TFA nous permet d'obtenir le châssis attendu **162**, mais la réaction n'est pas totale malgré une optimisation des conditions (ajout d'équivalent de TFA, temps réactionnel plus long, chauffage). Afin de pallier à ces problèmes de rendement, nous avons synthétisé les esters triméthylsilyléthyles (composés **157**, **158** et **159**) qui sont connus pour être un groupement plus labile que les tert-butyles en présence d'acide trifluoroacétique. Malheureusement, le mode opératoire de la *méthode C* appliqué aux composés **157**, **158** et **159** nous a permis de déprotéger les acides carboxyliques correspondants, mais n'a pas déprotégé l'alcyne de son groupement triméthylsilyle. Nous avons donc obtenu les châssis **VIII** recherchés sans perte des groupements protecteurs lors de la saponification des esters éthyliques (composés **151**, **152** et **153**) en milieu basique. Les meilleurs rendements des propargylamines déprotégées **162**, **163** et **164** ont été obtenus après une mise au point du traitement de la réaction de saponification qui s'est orientée vers l'utilisation d'une résine acide pour neutraliser le milieu plutôt qu'une solution d'acide chlorhydrique 1M. L'analyse des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C nous a permis de confirmer la saponification des esters avec la disparition du triplet à 1,30 ppm et du quadruplet à 4,2 ppm correspondant au groupement éthyle et la déprotection de l'alcyne par un blindage des carbones alcyniques (déplacement de 103 à 75 ppm pour le carbone quaternaire et de 90 à 68 ppm pour le carbone tertiaire).

Squelette VIII' mis en jeu	*Méthode A*	*Méthode B*	*Méthode C*
151 (Ts, R_1 = Et)	Formation du produit **162**, mais reste beaucoup de sels	Formation du produit **162** R = **97 %**	-
156 (Ts, R_1 = tBu)	-	-	Formation du produit **162**, mais réaction non totale
157 (Ts, R_1 = TMSE)	-	-	Uniquement déprotection des acides carboxyliques R = **100 %**
152 (*o*-Ns, R_1 = Et)	-	Formation du produit **163** R = **84 %**	-
158 (*o*-Ns, R_1 = TMSE)	-	-	Uniquement déprotection des acides carboxyliques R > **100 %**, produit non propre

153 (p-Ns, R_1 = Et)	-	Formation du produit **164** R = **72 %**	-
159 (p-Ns, R_1 = TMSE)	-	-	Uniquement déprotection des acides carboxyliques R > **100 %,** produit non propre

Tableau 33 : *Résultats de la synthèse des châssis **VIII** du* Schéma 90

Pour récapituler, nous avons obtenu 3 châssis **VIII** en 4 étapes avec des rendements totaux compris entre 28 et 67 % (Tableau 34) à partir du 6-aminohexan-1-ol, dont l'amine a été protégée par un groupement tosyle ou nosyle et l'alcool oxydé en aldéhyde. Cet aldéhyde (**135**, **137** et **139**) a ensuite été engagé dans la réaction à trois composants avec l'iminodiacétate de diéthyle et le TMS-acétylène pour conduire aux propargylamines protégées **151**, **152** et **153**. La saponification des esters éthyliques et la déprotection de l'alcyne ont abouti au châssis commun, sur lequel nous allons pouvoir greffer les différents éléments nécessaires à la synthèse des agents de contraste pour l'imagerie moléculaire (Schéma 91).

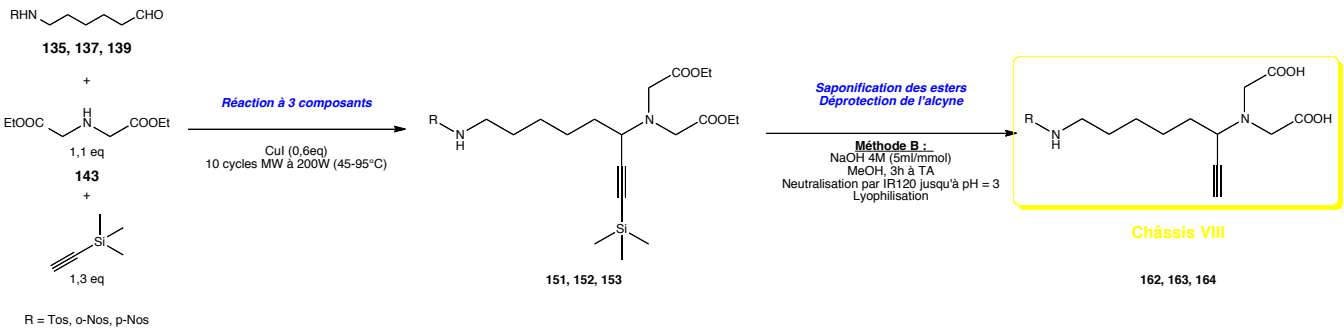


Schéma 91 : *Récapitulatif de la synthèse du châssis **VIII***

Aldéhyde	Tos, **135**	Nos(o), **137**	Nos(p), **139**
Rendement de la A^3	90 % (**151**)	65 % (**152**)	51 % (**153**)
Rendement de la déprotection	97 % (**162**)	84 % (**163**)	72 % (**164**)
Rendement sur 4 étapes	**67 %**	**30 %**	**28 %**

Tableau 34 : *Bilan de la synthèse du châssis **VIII** du Schéma 91*

VI. Couplage peptidique entre les châssis VIII et les chélatants de sel métallique

Nous venons de voir la synthèse des squelettes communs (le châssis **VIII**) aux agents de contraste sur lesquels les acides carboxyliques peuvent être engagés dans un couplage peptidique avec les dérivés amino des chélatants de sel métallique **95** et **97**. Les acides **162**, **163** et **164** ont donc été couplés aux différents chélatants **95** et **97** en présence d'EDC et d'HOBt pendant 16 h pour obtenir les composés **165** à **170** (Schéma 92).

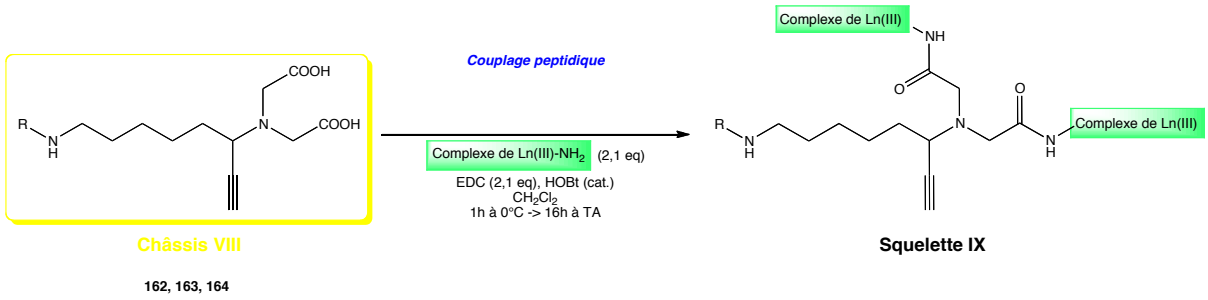


Schéma 92 : *Couplage peptidique entre le châssis **VIII** et les chélatants de sel métallique*

Les produits de couplage **165, 167** et **169**, où le chélatant est un dérivé DTPA **95**, ont été obtenus avec des rendements modérés compris entre 13 et 21 % et avec des rendements globaux sur 5 étapes de 10 % pour R = Tosyle, 6 % pour R = *o*-Nosyle et 4 % pour R = *p*-Nosyle (Tableau 35). Tandis que les produits de couplage **166**, **168** et **170**, où le chélatant est un dérivé DO3A **97**, ont été obtenus avec des rendements quantitatifs et avec des rendements globaux sur 5 étapes de 46 % pour R = Tosyle, 30 % pour R = *o*-Nosyle et 28 % pour R = *p*-Nosyle (Tableau 35). Cette différence de réactivité peut s'expliquer par l'encombrement stérique des bras du pentaester tert-butylique DTPA lors du couplage, mais aussi par le fait que le dérivé amino DTPA synthétisé était peut-être moins pur que le dérivé amino DO3A commercial. L'analyse LC-MS des composés **IX** nous a permis de confirmer la formation des produits. Par exemple pour le composé **168**, un pic est apparu à 2,1 min de m/z = 546,5 $\frac{[M+3H]^{3+}}{3}$; 819,05 $\frac{[M+2H]^{2+}}{2}$; 841 $\frac{[M+2Na]^{2+}}{2}$ et 1897,7 $[M+H]^{+}$. Les composés **IX** ont été caractérisés par l'apparition d'un pic à 171 ppm sur le spectre RMN ^{13}C correspondant au carbonyle de l'amide et sur le spectre RMN ^{1}H par les apparitions d'un multiplet entre 8,4 et 8,7 ppm correspondant au proton aminé de l'amide et d'un singulet à 1,48 ppm intégrant pour 90H pour les composés DTPA et à 1,35 ppm intégrant pour 54H

pour les composés DO3A correspondant aux protons méthyliques des groupements tert-butyles.

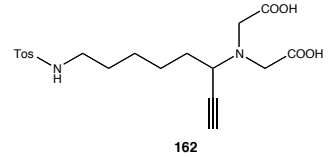
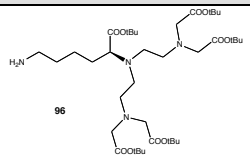
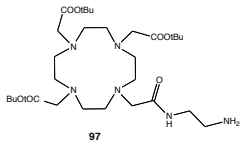
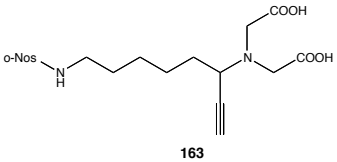
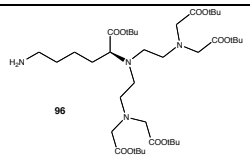
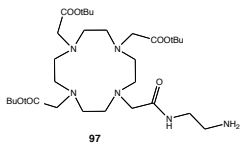
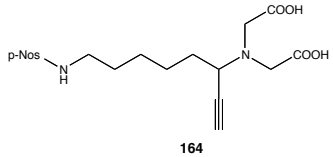
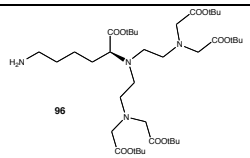
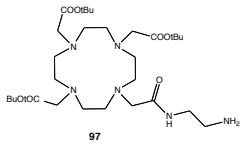
Châssis VIII	*Chélatant de sel metallique*	*Rendement du couplage peptidique*	*Rendement sur 5 étapes*
 162	 96	21 % (165)	**10 %**
	 97	Qtf (166)	**46 %**
 163	 96	21 % (167)	**6 %**
	 97	Qtf (168)	**30 %**
 164	 96	13 % (169)	**4 %**
	 97	Qtf (170)	**28 %**

Tableau 35 : *Résultats du couplage peptidique du Schéma 92*

VII. Chimie click sur la structure IX

Nos agents de contraste se construisent bloc par bloc. Nous venons de greffer les éléments permettant la détection en IRM ou scintigraphie (composé **IX**). Nous allons, dans ce paragraphe, décrire le couplage des autres éléments intervenant dans la synthèse de l'agent d'imagerie moléculaire (ceux-ci étant une deuxième sonde d'imagerie tel qu'un chromophore émettant dans le proche infrarouge **111** et un ligand (**116**, **117**, **118** et **124**) pour le ciblage). Ce greffage est réalisé par une réaction de chimie click, la cycloaddition d'Huisgen, entre l'alcyne vrai du squelette **IX** et les azotures portés par le chromophore et les ligands (Schéma 93) catalysé par du cuivre (I) pour former un 1,4-triazole.

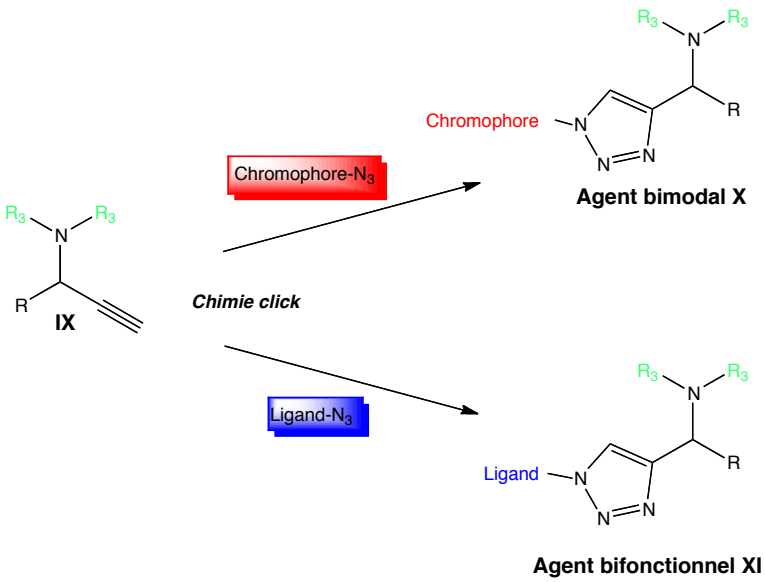


Schéma 93 : *Chimie click sur les composés* ***IX***

A. Mise au point de la cycloaddition d'Huisgen sur un squelette modèle

Nous avons tout d'abord cherché à optimiser la réaction de chimie click sur nos squelettes **IX** en appliquant différents protocoles opératoires où le cuivre (I) est soit généré *in situ* (par réduction de Cu(II) par de l'acide ascorbique), soit incorporé au milieu sur résine supportée A.21-CuI. Cette optimisation a été réalisée sur un seul modèle de triazole à partir de l'alcyne **166** et de l'azoture **39** (Schéma 94).

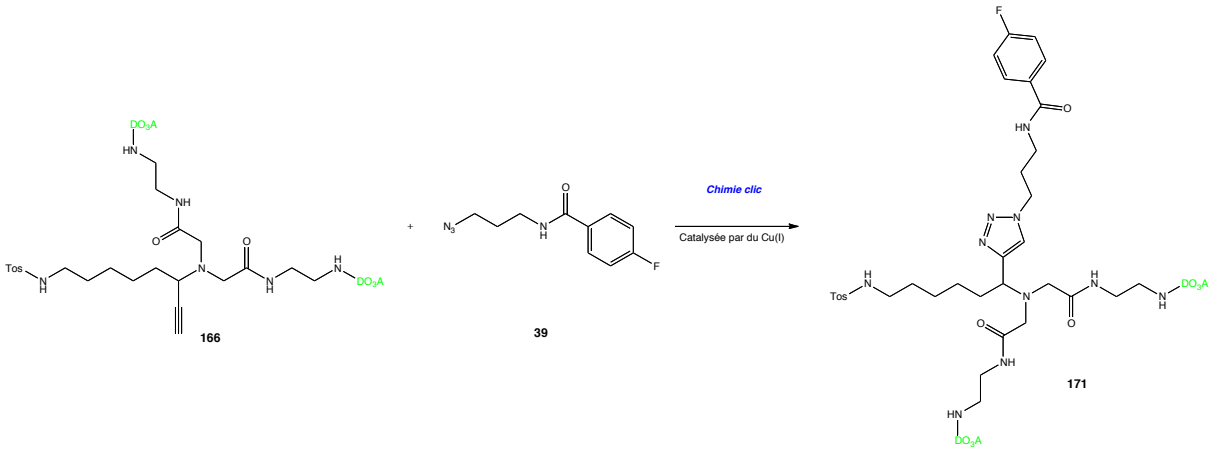


Schéma 94 : *Chimie click sur le squelette modèle* ***166***

La génération du cuivre (I) *in situ* ne nous a pas permis d'obtenir le triazole **171** issu du schéma réactionnel 94. Par contre, à l'aide du catalyseur que nous avons développé au sein du laboratoire A21-CuI, le triazole **171** a été obtenu avec un rendement de 27 % après 72 h de réaction (Tableau 36). L'analyse LC-MS nous a permis de confirmer la formation du composé

171 avec l'apparition d'un pic à 2,05 min de m/z = 609,35 $\frac{[M+3H]^{3+}}{3}$ et 936,17 $\frac{[M+2Na]^{2+}}{2}$.

Protocole mis en jeu	*Résultats*
$CuSO_4$ (1,2 eq)/Cu[266] THF/Eau TA, 18h-48h	Pas d'obtention du triazole **171** Produit de départ majoritaire
$CuSO_4$ (0,05 eq)/Na-Ascorbate (0,5 eq)[267] DMF/Eau 35 min à 100°C sous MW	Pas d'obtention du triazole **171** Produit de départ majoritaire
A21-CuI (0,2 eq) CH_2Cl_2 TA, 72h	Formation du triazole **171** avec un rendement de 27 %

Tableau 36 : *Optimisation de la réaction de chimie click sur le squelette **IX***

C'est cette dernière méthode de chimie click catalysée par du cuivre supporté que nous allons appliquer sur l'ensemble des squelettes **IX** afin d'obtenir les agents bimodaux **X** et les agents bifonctionnels **XI**.

B. Synthèse d'une bibliothèque d'agents de contraste issus de la chimie click

Nous avons tout d'abord synthétisé une petite librairie d'agents de contraste issus de la chimie click entre l'alcyne de deux squelettes **IX** comportant deux dérivés du DTPA et la banque d'azotures générés après acylation au chapitre 2 en appliquant les conditions optimisées ci-dessus (Schéma 95). Ainsi, une fois les acides carboxyliques des chélatants déprotégés, il sera possible de complexer des ions Gd^{3+} pour obtenir des agents de contraste pour l'IRM. La diversification du squelette **IX** nous permettra alors d'étudier l'influence des différents groupements « cliqués » sur la relaxivité r_1 et r_2.

[266] (a) S. Knör, A. Modlinger, T. Poethko, M. Schottelius, H-J. Wester, H. Kessler, Synthesis of novel 1,4,7,10-tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) derivatives for chemoselective attachment to unprotected polyfunctionalized compounds, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 6082-6090 ; (b) C. Wängler, M. Schäfer, R. Schirrmacher, P. Bartenstein, B. Wängler, DOTA derivatives for site-specific biomolecule-modification via clickk chemistry : synthesis and comparison of reaction charactristics, *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**

[267] (a) I. Dijkgraaf, A. Y. Rijnders, A. Soede, A. C. Dechesne, G. Wilma van Esse, A. J. Brouwer, F. H. M. Corstens, O. C. Boerman, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, Synthesis of DOTA-conjugated multivalent cyclick-RGD peptide dendrimers via 1,3-dipolar cycloaddition and their biological evaluation : implications for tumor targeting and tumor imagind purposes, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 935-944 ; (b) C-B. Yim, O. C. Boerman, M. de Visser, M. de Jong, A. C. Dechesne, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, Versatile conjugation of octreoide to dendrimers by cycloaddition (« click») chemistry to yield high-affinity multivalent cyclick peptide drendrimers, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*, 1323-1331

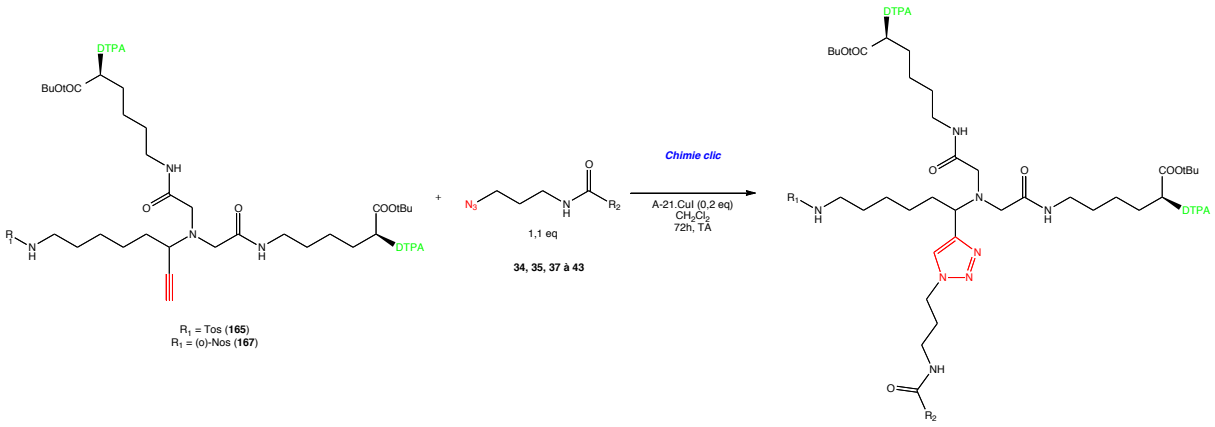


Schéma 95 : *Obtention d'une banque d'agents de contraste par chimie click*

1. A partir du squelette IX où R = Tosyle (165)

Une première banque de 8 triazoles a été obtenue à partir du squelette **166** qui présente deux dérivés DTPA et dont l'amine terminale est protégée par un groupement Tosyle. Sur les 9 azotures engagés dans cette réaction, seulement un seul n'a pas abouti à la formation du triazole attendu. Il s'agit du composé **175,** où le bras azoture est greffé par acylation sur une longue chaîne alkyle en 9 carbones. Ceci peut s'expliquer par l'encombrement stérique de la chaîne aliphatique ou son repliement lors de la réaction de chimie click. Les divers triazoles **172** à **180**, excepté le composé **175** ont été obtenus avec de bons rendements, voire quantitatifs (Tableau 37). La pureté et la structure des composés ont été déterminées uniquement par analyse LC-MS, car au vue de la complexité des structures obtenues et la faible quantité de produits obtenus, l'étude des spectres RMN n'a pas permis de mettre en évidence la formation du triazole.

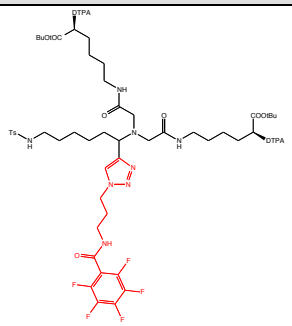
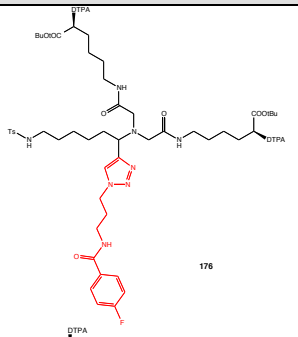
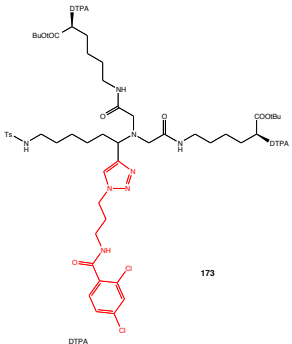
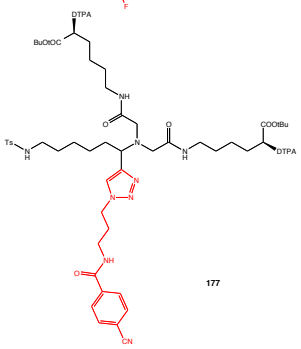
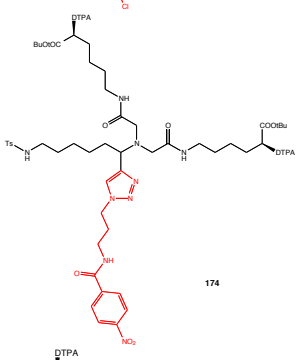
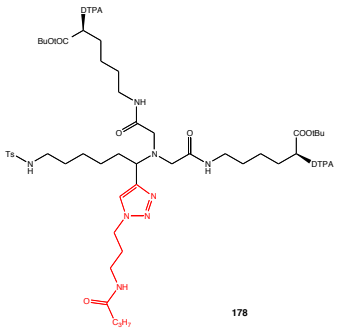
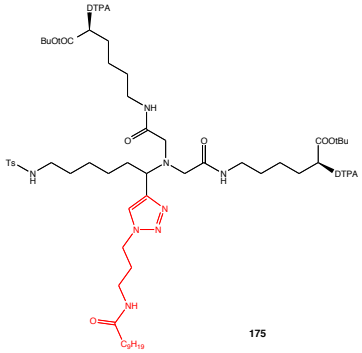
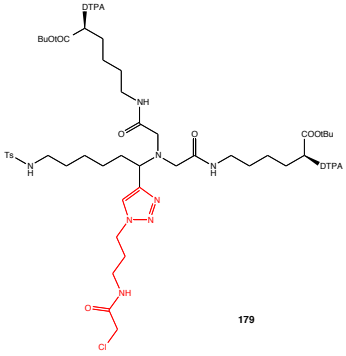
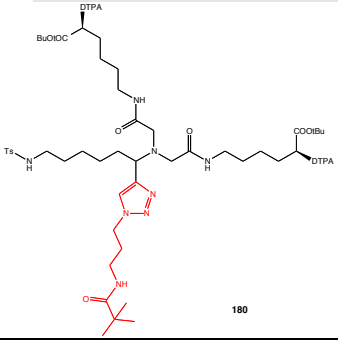
Agent de contraste	*Résultats LC-MS*	*Agent de contraste*	*Résultats LC-MS*
	ELSD 100% R_t = 3,97 min m/z = 721,05 $[M+3H]^{3+}/3$ 763,10 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$ 1081,25 $[M+2H]^{2+}/2$		ELSD 95% R_t = 4,53 min m/z = 696,85 $[M+3H]^{3+}/3$ 739,40 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$ 1044,90 $[M+2H]^{2+}/2$ 1107,95 $[M+2Cu]^{2+}/2$
	ELSD 80% R_t = 4,61 min m/z = 714,65 $[M+3H]^{3+}/3$ 1071,10 $[M+2H]^{2+}/2$		ELSD 100% R_t = 4,7 min m/z = 699,35 $[M+3H]^{3+}/3$ 1048,15 $[M+2H]^{2+}/2$
	ELSD 100% R_t = 3,96+4,39 min m/z = 705,90 $[M+3H]^{3+}/3$ 796,25 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$ 1058,45 $[M+2H]^{2+}/2$ 1121,05 $[M+2Cu]^{2+}/2$		ELSD 98% R_t = 4,2 min m/z = 679,90 $[M+3H]^{3+}/3$ 1082,25 $[M+2H]^{2+}/2$
	/		ELSD 100% R_t = 3,9 min m/z = 681,60 $[M+3H]^{3+}/3$ 723,90 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$ 1021,65 $[M+2H]^{2+}/2$ 1084,70 $[M+2Cu]^{2+}/2$
		ELSD 95 % R_t = 3,9 min m/z = 684,30 $[M+3H]^{3+}/3$ 1026,05 $[M+2H]^{2+}/2$	

Tableau 37 : *Synthèse d'une librairie de 8 triazoles obtenus à partir de l'alcyne* ***165***

2. A partir du squelette IX où R = (*o*)-Nosyle (167)

Une seconde banque de 7 triazoles a été obtenue à partir du squelette **167** qui présente deux dérivés DTPA et dont l'amine terminale est protégée par un groupement *o*-Nosyle. Sur les 9 azotures engagés dans cette réaction, seulement deux n'ont pas abouti à la formation du triazole attendu. Il s'agit du composé **184** où le bras azoture est greffé par acylation à une chaîne aliphatique en 9 carbones et du composé **189** où le bras azoture est greffé par acylation à un groupement chlorométhyle. Ces résultats peuvent s'expliquer par les mêmes raisons évoquées au paragraphe précédent, mais aussi par un problème de solubilité des azotures **38** et **42** dans le milieu réactionnel. Les triazoles **181** à **190**, à l'exception des composés **184** et **189** ont été obtenus avec de bons rendements, voire quantitatifs (Tableau 38). La pureté et la structure des composés ont été déterminées uniquement par analyse LC-MS comme pour la série précédente de triazoles.

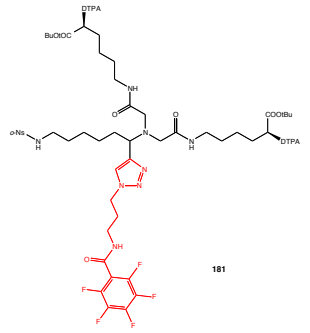
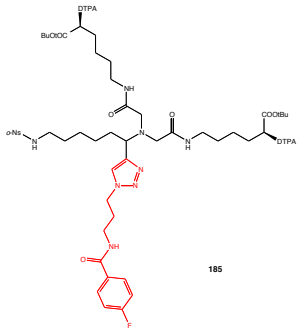
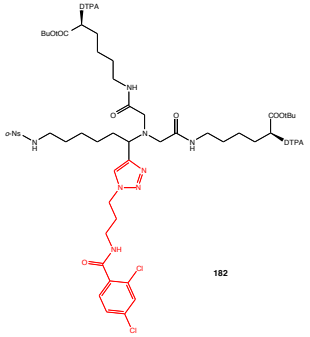
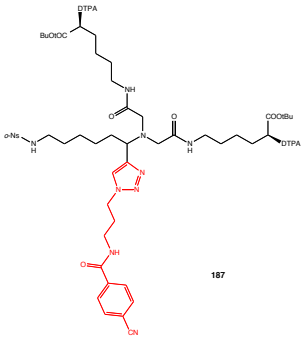
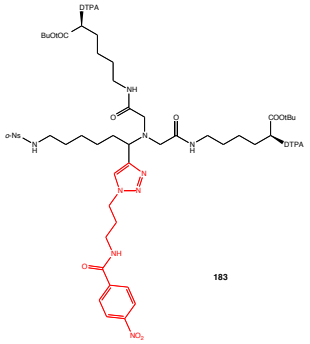
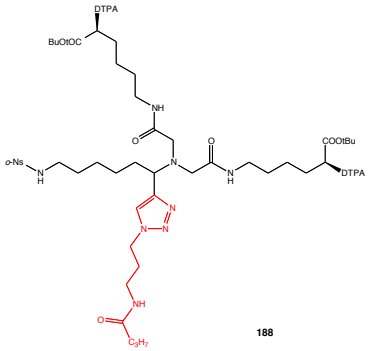
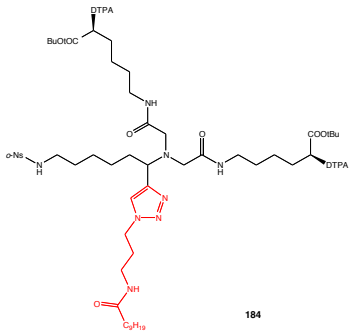
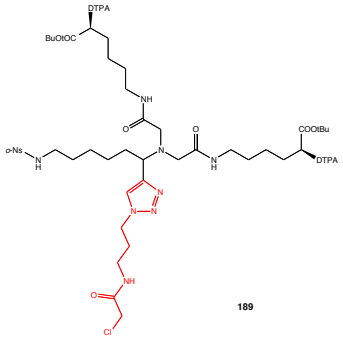
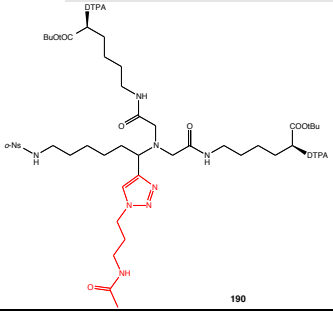
Agent de contraste	*Résultats LC-MS*	*Agent de contraste*	*Résultats LC-MS*
 181	ELSD 97% R_t = 3,8 min m/z = 731,4 $[M+3H]^{3+}/3$ 773,50$[M+2Cu+H]^{3+}/3$ 1096,15 $[M+2H]^{2+}/2$ 1159,35 $[M+2Cu]^{2+}/2$	 185	ELSD 100% R_t = 4,01 min m/z = 707,1 $[M+3H]^{3+}/3$ 749,20$[M+2Cu+H]^{3+}/3$ 1060,25 $[M+2H]^{2+}/2$ 1122,90$[M+2Cu]^{2+}/2$
 182	ELSD 100% R_t = 3,93+4,53 min m/z = 724,35 $[M+3H]^{3+}/3$ 765,75$[M+2Cu+H]^{3+}/3$ 1086,10 $[M+2H]^{2+}/2$ 1149,0 $[M+2Cu]^{2+}/2$	 187	ELSD 46% R_t = 3,5-4,5 min m/z = 709,75 $[M+3H]^{3+}/3$ 1064,20 $[M+2H]^{2+}/2$
 183	ELSD 60% R_t = 3,67+3,96+4,45 min m/z = 716,55 $[M+3H]^{3+}/3$ 758,4 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$ 1073,65 $[M+2H]^{2+}/2$ 1136,65 $[M+2Cu]^{2+}/2$	 188	ELSD 97% R_t = 3,94 min m/z = 637,6 $[M+3H]^{3+}/3$ 1034,8 $[M+2H]^{2+}/2$ 1096,75$[M+2Cu]^{2+}/2$
 184	/	 189	/
 190	ELSD 84% R_t = 4,1 min m/z = 680,70 $[M+3H]^{3+}/3$ 1020,40 $[M+2H]^{2+}/2$		

Tableau 38 : *Synthèse d'une librairie de 7 triazoles obtenus à partir de l'alcyne* ***167***

C. Formation de l'agent bimodal de structure X

Un agent bimodal de structure **X** a été synthétisé par cycloaddition d'Huisgen entre l'alcyne du composé **166** comportant deux dérivés DO3A et le dérivé azoture du chromophore Cy5.5 **111** (Schéma 96). Le triazole **191** est obtenu sous forme d'un solide bleu avec un rendement quantitatif après 72 h de réaction à l'abri de la lumière. L'analyse LC-MS nous a permis de confirmer la formation du composé **191** par l'apparition d'un pic à 3,4 min de m/z = 578,55 $\frac{[M+4H]^{4+}}{4}$; 594,00 $\frac{[M+Cu+3H]^{4+}}{4}$; 609,35 $\frac{[M+2Cu+2H]^{4+}}{4}$; 625,4 $\frac{[M+3Cu+H]^{4+}}{4}$ et 771,20 $\frac{[M+3H]^{3+}}{3}$. D'après les résultats, nous pouvons constater que des ions cuivriques sont piégés dans les sites chélatants DO3A, connus pour complexer non seulement l'ion Gd^{3+} mais aussi Cu^{2+} , Zn^{2+} ou encore Ca^{2+}. Nous verrons dans le paragraphe suivant comment nous avons pu éliminer ces ions cuivriques afin qu'ils n'interférent pas lors de la complexation avec Gd^{3+} et des mesures de relaxivité. Cet agent bimodal **191** permettra une détection à la fois en IRM grâce aux complexes DO3A et en imagerie optique grâce au chromophore Cy5.5.

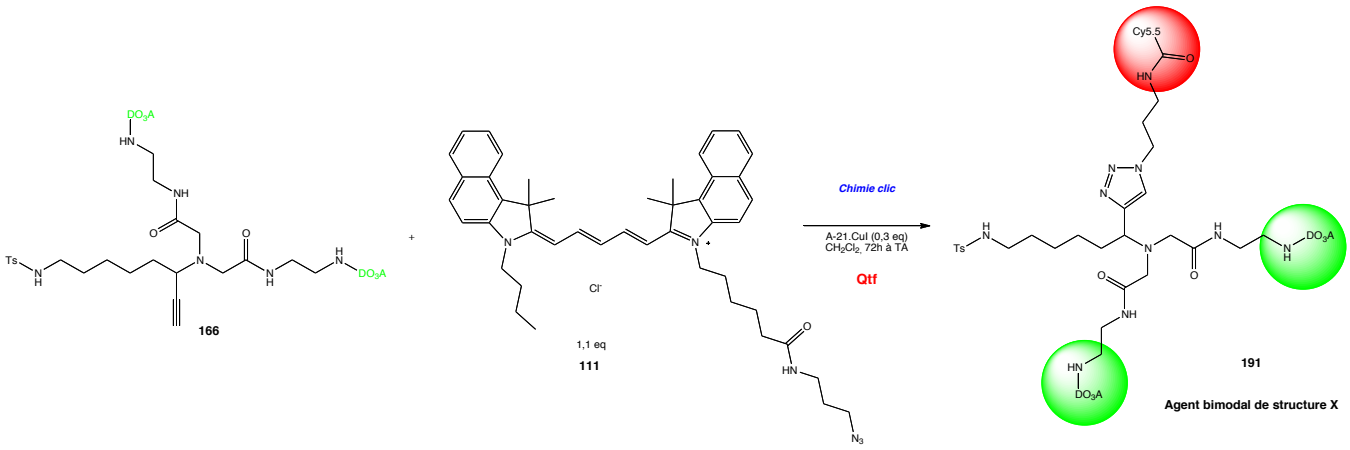


Schéma 96 : *Synthèse d'un agent bimodal **191** pour l'IRM et l'imagerie optique*

D. Formation des agents bifonctionnels de structure XI

Une petite banque d'agents bifonctionnels de structure **XI** a été synthétisée par chimie click à partir de l'alcyne vrai des squelettes **IX** (**165** à **170**) et des bras azotures greffés sur l'acide 8-flavone acétique (**116** à **118**) ainsi que sur le galactose (**124**) (Schéma 97).

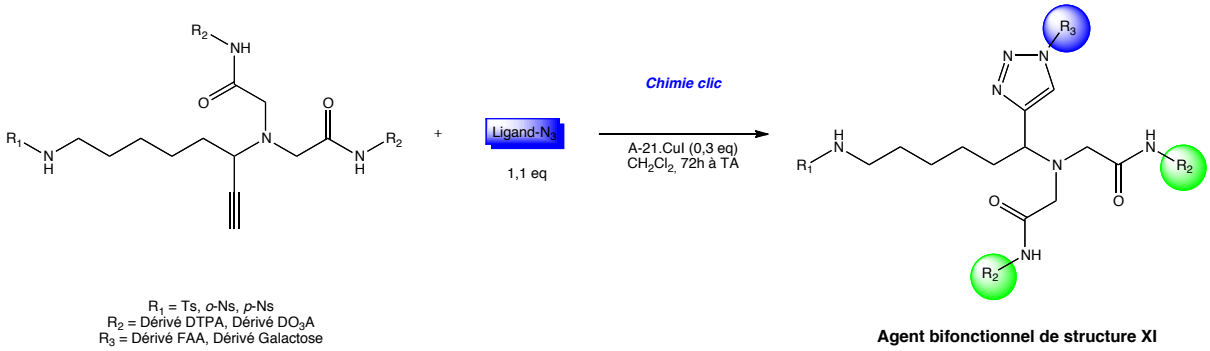


Schéma 97 : *Synthèse d'agents bifonctionnels pour le ciblage et la détection en IRM ou scintigraphie*

Les résultats des différents couplages sont regroupés dans le Tableau 39. Les premiers essais réalisés sur le squelette **165** comportant deux complexes DTPA et dont l'amine terminale est protégée par un groupement tosyle n'ont pas été très concluants. Nous avons obtenu le triazole **192** issu du couplage avec la FAA **117** avec un rendement de 44 % alors que nous n'avons pas pu former le triazole **193** issu du couplage avec le galactose **124**. Ces mauvais résultats s'expliquent par la possibilité que l'alcyne de départ **165** n'était pas complètement pur et que des impuretés aient empoisonné le catalyseur. Il est aussi possible que les deux complexes DTPA encombrent l'accès de l'alcyne ne permettant pas l'insertion du cuivre ou la réaction avec l'azoture pour former le métallocycle à six membres (Schéma 45). C'est pourquoi nous n'avons pas pour l'instant réalisé l'ensemble des combinaisons possibles avec les squelettes **IX** portant des complexes DTPA, nous avons préféré nous focaliser sur l'obtention des agents bifonctionnels comportant des complexes DO3A. En effet, les rendements obtenus pour ces triazoles sont bien meilleurs que pour les agents de type DTPA. Ils sont compris entre 50 et 100 % et les meilleurs résultats ont été obtenus avec le squelette **166** ayant un tosyle comme groupement protecteur de l'amine terminale et les dérives de la FAA. D'autre part, on peut noter que la longueur du bras espaceur entre l'azoture et le ligand n'a pas d'influence sur la formation du triazole. Par contre, les essais de chimie click réalisés avec le dérivé du galactose **124** n'ont pas abouti aux triazoles attendus **197** et **201**. Il est difficile pour l'instant de rationnaliser ces résultats, il faudrait les compléter avec d'autres essais de couplage incluant les autres dérivés du galactose pour savoir si c'est le

galactose qui est en cause dans cette manipulation ou uniquement le composé **124**. Malheureusement, nous n'avions pas assez de quantités des autres dérivés du galactose pour mener à bien cette étude.

Groupement protecteur de l'amine R_1	*Chélate de dérivé métallique R_2*	*Squelette IX*	*Ligand R_3 mis en jeu*	*Rendement* (Calculé par LC-MS)	*Agent de contraste XI formé*
Tosyle	Dérivé DTPA	**165**	FAA-$(CH_2)_4$-N_3 (**116**)	Non réalisé	
			FAA-$(CH_2)_6$-N_3 (**117**)	44 %	**192**
			FAA-$(PEG)_2$-N_3 (**118**)	Non réalisé	
			Galactose-$(PEG)_2$-N_3 (**124**)	/	**193**
	Dérivé DO_3A	**166**	FAA-$(CH_2)_4$-N_3 (**116**)	Qtf	**194**
			FAA-$(CH_2)_6$-N_3 (**117**)	Qtf	**195**
			FAA-$(PEG)_2$-N_3 (**118**)	Qtf	**196**
			Galactose-$(PEG)_2$-N_3 (**124**)	/	**197**
o-Nosyle	Dérivé DTPA	**167**	FAA-$(CH_2)_4$-N_3 (**116**)	Non réalisé	
			FAA-$(CH_2)_6$-N_3 (**117**)	Non réalisé	
			FAA-$(PEG)_2$-N_3 (**118**)	Non réalisé	
			Galactose-$(PEG)_2$-N_3 (**124**)	Non réalisé	
	Dérivé DO_3A	**168**	FAA-$(CH_2)_4$-N_3 (**116**)	88 %	**198**
			FAA-$(CH_2)_6$-N_3 (**117**)	51 %	**199**
			FAA-$(PEG)_2$-N_3 (**118**)	Qtf	**200**
			Galactose-$(PEG)_2$-N_3 (**124**)	/	**201**
p-Nosyle	Dérivé DTPA	**169**	FAA-$(CH_2)_4$-N_3 (**116**)	Non réalisé	
			FAA-$(CH_2)_6$-N_3 (**117**)	Non réalisé	
			FAA-$(PEG)_2$-N_3 (**118**)	Non réalisé	
			Galactose-$(PEG)_2$-N_3 (**124**)	Non réalisé	
	Dérivé DO_3A	**170**	FAA-$(CH_2)_4$-N_3 (**116**)	56%	**202**
			FAA-$(CH_2)_6$-N_3 (**117**)	Non réalisé	
			FAA-$(PEG)_2$-N_3 (**118**)	50%	**203**
			Galactose-$(PEG)_2$-N_3 (**124**)	Non réalisé	

Tableau 39 : *Synthèse d'une librairie de précurseurs d'agent bifonctionnel de structure **XI***

La purification sur gel de silice ne nous a pas permis d'isoler les composés formés. C'est pourquoi nous avons décidé de les engager directement dans l'étape suivante qui est la déprotection des chélatants et de les purifier une seule fois par chromotographie préparative afin de perdre le moins de produit possible. La formation des composés n'a pu être confirmée que par les analyses LC-MS, car l'étude structurale par RMN n'a pu être menée sur les mélanges dont les châssis moléculaires étaient complexes. Les composés ont été mis en

évidence par l'apparition d'un pic correspondant aux composés dichargés, trichargés ou encore tétrachargés. L'analyse du composé **192** (comportant 2 DTPA, M = 2268,91 g.mol^{-1}) fait apparaître un pic à 4,9 min de m/z = 757,55 $\frac{[M+3H]^{3+}}{3}$ et de 1136 $\frac{[M+2H]^{2+}}{2}$. L'analyse du composé **195** (comportant 2 DO3A, M = 2008,55 g.mol^{-1}) fait apparaître un pic à 2,037 min de m/z = 670,5 $\frac{[M+3H]^{3+}}{3}$ et 691,7 $\frac{[M+Cu+2H]^{3+}}{3}$. On peut remarquer, comme lors de la formation de l'agent bimodal **191,** que des ions cuivriques sont piégés dans les chélatants et plutôt dans les dérivés DO3A que dans les dérivés DTPA.

Afin de pouvoir complexer des ions Gd^{3+} ou le radioisotope ^{99m}Tc, il est important de pouvoir éliminer ce cuivre chélaté qui diminuerait l'efficacité des agents de contraste formés, car moins de dérivés métalliques seraient présents dans la structure finale. Un premier essai a été réalisé en utilisant une résine thiourée de type QuadraPure pour piéger les ions cuivriques, mais ce dernier n'a pas été concluant. Il est aussi possible d'éliminer Cu^{2+} par complexation avec de l'EDTA, mais cette méthode ne nous est pas apparue la plus appropriée car les constantes d'affinité des complexes Cu-DO3A et Cu-EDTA sont du même ordre de grandeur. D'autre part, nous avons aussi réussi à séparer par chromatographie préparative en phase inverse les composés sans cuivre et les composés avec cuivre, mais le rendement de composés purs sans cuivre était très faible. Nous avons alors trouvé dans la littérature une méthode de précipitation des ions cuivriques et cuivreux utilisée lors de réaction de click cycloaddition sur des complexes polyaminocarboxylates de type DTPA ou DOTA[266,268]. Les ions cuivriques et cuivreux sont éliminés du milieu réactionnel et des chélatants (du DO3A et du triazole) par précipitation avec du sulfure de sodium puis filtration. Les composés de structure **X** et **XI**, où nous avons détecté des traces de cuivre, sont dilués dans un mélange eau/THF à laquelle on additionne une solution de Na_2S à 0,2M. La précipitation a lieu en 5 minutes et le précipité CuS rouge est éliminé du milieu par simple filtration pour conduire au précurseur d'agent de contraste de structure **X** et **XI** (Schéma 98).

[268] A. T. Lebedev, J. P. Holland, J. S. Lewis, Clickable bifunctional radiometal chelates for peptide labeling, *Chem. Commun.,* **2010**, *46*, 1706-1708

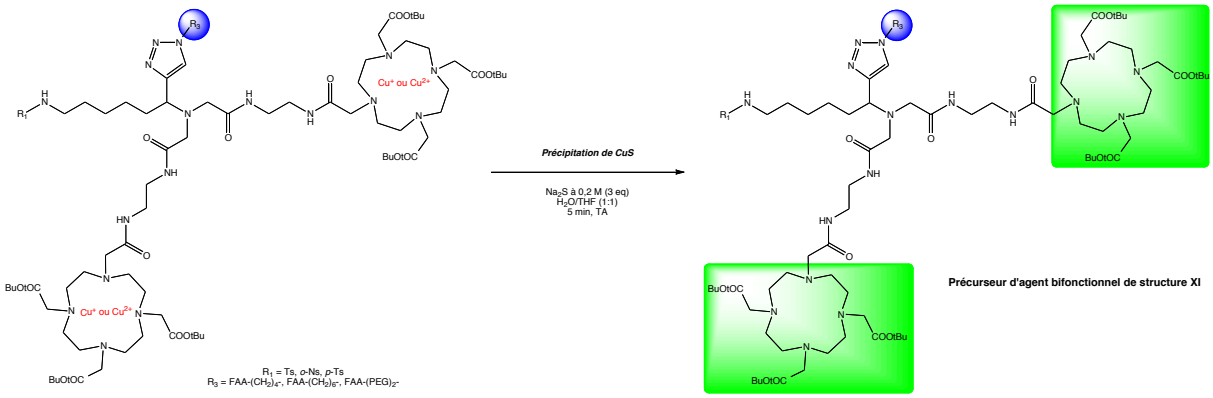


Schéma 98 : *Élimination du cuivre complexé dans les groupements DO3A*

Les premiers essais réalisés en utilisant 10 équivalents de Na_2S, comme décrits dans la littérature, ont permis d'éliminer complètement le cuivre, mais il a été constaté par analyse LC-MS une dégradation des produits par une perte d'un ou deux groupements d'acétate de tert-butyle portés par le chélate DO3A. Les conditions opératoires ont été optimisées afin de diminuer le risque de dégradation et nous avons trouvé que l'utilisation de 3 équivalents de Na_2S permettait de décomplexer le cuivre des chélates sans dégrader à la molécule. Cette décomplexation a été suivie et confirmée par LC-MS. En ce qui concerne les composés dégradés, une réaction d'alkylation des amines libres avec du bromoacétate de tert-butyle a permis de récupérer quantitativement les complexes DO3A.

Afin de pallier ces problèmes de complexation du cuivre, il serait possible d'envisager de réaliser la déprotection des acides carboxyliques et la complexation avec Gd(III) avant de réaliser la click cycloaddition. Malheureusement, il sera toujours possible que du cuivre s'insère dans les complexes DO3A par échange d'ions, puisque l'ion cuivrique est utilisé pour calculer la stabilité des complexes Gd-DO3A. Récemment, l'équipe de Schilbi[269] a montré qu'une addition lente de Cu(I) (0,05 mol % $Cu(OAc)_2$/ascorbate de sodium) au milieu réactionnel contenant l'azoture et le propargylamide-DOTA$(tBu)_3$ à une température élevée (85°C) permettait d'obtenir le triazole avec de bons rendements sans complexer les ions cuivriques. Ils ont spéculé que l'addition lente du cuivre permettait la cycloaddition avant que le métal soit complexé par les ligands DOTA. Il serait peut-être intéressant de réaliser notre cycloaddition dans ces conditions pour voir si nous pourrions obtenir des agents bifonctionnels libres de cuivre.

[269] T. L. Mindt, C. müller, F. Stuker, J-F. Salazar, A. Hohn, T. Mueggler, M. Rudin, R. Schibli, A « clickk chemistry » approach to the efficient synthesis of multiple imaging probes derived from a single precursor, *Bioconjugate Chem.,* **2009**, *20*, 1940-1949

VIII. Déprotection des acides carboxyliques des chélatants

La dernière étape avant la complexation avec les dérivés métalliques consiste en la déprotection des acides carboxyliques par action de l'acide trifluoroacétique sur les groupements tert-butyles (Schéma 99).

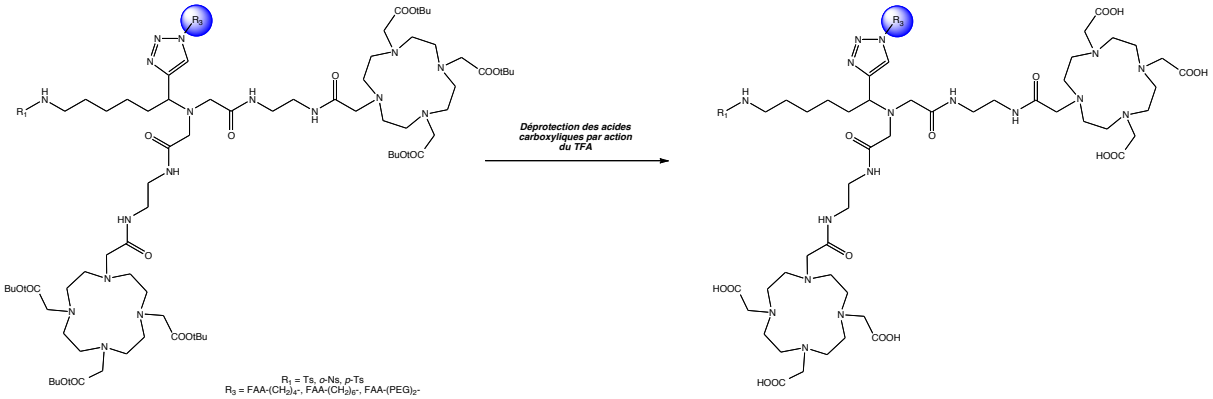


Schéma 99 : *Déprotection des acides carboxyliques des groupements chélatants*

Plusieurs protocoles issus de la littérature sur la déprotection des complexes DOTA et DO3A ont été testés et les résultats sont regroupés dans le Tableau 40. Les essais réalisés dans du dichlorométhane en présence de TFA à différentes concentrations (*méthodes 1 à 4*) n'ont pas permis de déprotéger les chélates de DO3A, il a surtout été noté une dégradation des produits de départ certainement due à la lenteur de la réaction. C'est pourquoi nous sommes orientés vers une déprotection en milieu concentré en TFA en présence d'eau. Lors de l'essai en présence de TFA/H_2O (95:5) (*méthode 5*), la formation des chélates déprotégés a bien été obtenue, mais beaucoup de produits secondaires ont été observé. L'ajout de triisopropylsilane (*méthode 6*) au milieu réactionnel nous a permis d'obtenir les acides carboxyliques déprotégés sans formation de produits secondaires.

Méthode	*Protocole mis en jeu*	*Résultats*
1	TFA/ CH_2Cl_2 (1:1) – 20 mL/mmol[270] TA, 72h	Réaction lente Dégradation du produit Pas d'obtention du produit déprotégé
2	TFA/ CH_2Cl_2 (1:2) – 100 mL/mmol[271] TA, 72h	Réaction lente Dégradation du produit Pas d'obtention du produit déprotégé
3	TFA/ CH_2Cl_2 (1:3) – 13 mL/mmol[272]	Réaction lente Dégradation du produit de départ Traces du produit déprotégé
4	1) TFA/ CH_2Cl_2 (1:15) - 7 mL/mmol - TA, 1h30 2) Milieu concentré 3) TFA/TIS (97:3) – 2 mL/mmol[273]	Réaction lente Dégradation du produit Pas d'obtention du produit déprotégé
5	TFA/H_2O (95:5) – 200 mL/mmol[267(a)] TA, 24h	Obtention du produit déprotégé Présence de beaucoup de produits secondaires
6	TFA/H_2O/TIS (95:2,5:2,5) – 200 mL/mmol[266,274] TA, 5h-16h	Réaction propre Formation du produit déprotégé

Tableau 40 : *Mise au point de la déprotection des complexes DO3A*

Ce dernier protocole 6 a été employé pour les divers agents de contraste de structure **XI** synthétisés précédemment et les composés déprotégés ont été purifiés par HPLC semi-préparative en phase inverse. Les résultats et les analyses LC-MS de ces composés sont regroupés dans le tableau suivant.

[270] L. Tei, G. Gugliotta, S. Avedano, G. B. Giovenzana, M. Botta, Application of the Ugi four-compoent reaction to the synthetic of ditopic bifunctional chelating agents, *Org. Biomol. Chem*., **2007**, *7*, 4406-4414
[271] W. Liu, A. Hajibeigi, M. Lin, C. L. Rostollan, Z. Kovacs, O. K. Öz, X. Sun, An osteoclast-targeting agent for imaging and therapy ob bone metastasis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2008**, *18*, 4789-4793
[272] J. P. André, C. F. G. C. Geraldes, J. A. Martins, A. E. Merbach, M. I. M. Prata, A. C. Santos, J. J. P. de Lima, E. Tóth, Lanthanide(III) complexes of DOTA-glyconjugates : a potential new class of lectins-mediated medical imaging agents, *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 5804-5816
[273] A. Barge, L. Tei, D. Upadhyaya, F. Fedeli, L. Beltrami, R. Stefania, S. Aime, G. Cravotto, Bifunctional ligands based on the DOTA-monoamide cage*, Org. Biomol. Chem*., **2008**, *6*, 1176-1184
[274] M. E. Martin, S. G. Parameswarappa, M. S. O'Dorisio, F. C. Pigge, M. K. Schultz, A DOTA-peptide conjugate by copper-free clickk chemistry, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2010**, *20*, 4805-4807

Groupement protecteur de l'amine R_1	*Chélate de dérivé métallique R_2*	*Ligand R_3 mis en jeu*	*Agent de contraste XI*	*Rendement*	*Pureté* (LC-MS % ELSD)	*Agent de contraste XI déprotégé*
Tosyle	Dérivé DO_3A	FAA-$(CH_2)_4$-N_3	**194**	17 %	89 %	**204**
		FAA-$(CH_2)_6$-N_3	**195**	30 %	100 %	**205**
		FAA-$(PEG)_2$-N_3	**196**	73 %	98 %	**206**
o-Nosyle	Dérivé DO_3A	FAA-$(CH_2)_4$-N_3	**198**	56 %	97 %	**207**
		FAA-$(CH_2)_6$-N_3	**199**	Non réalisé		
		FAA-$(PEG)_2$-N_3	**200**	36 %	60 %	**208**
p- Nosyle	Dérivé DO_3A	FAA-$(CH_2)_4$-N_3	**202**	39 %	75 %	**209**
		FAA-$(PEG)_2$-N_3	**203**	Non réalisé		

Tableau 41 : *Résultats de la deprotection des agents de contraste **XI***

Les composés déprotégés sont obtenus avec des rendements modérés compris entre 17 (composé **204**) et 73 % (composé **206**) et avec des puretés correctes comprises entre 60 (composé **208**) et 100 % (composé **205**). Les rendements les moins bons peuvent s'expliquer par le fait que la déprotection a été réalisée sur des milieux réactionnels bruts. Il y a peut-être eu une surestimation des produits formés à l'issue de la cycloaddition click et la purification par HPLC entraîne toujours une perte de produits plus important que la purification sur cartouche. Les puretés moyennes résultent d'une difficulté à isoler correctement les produits lors de la purification par HPLC. La colonne utilisée de type Econosphère C18 n'était peut-être pas la plus appropriée pour séparer ces molécules de poids moléculaire aux alentours 1700 $g.mol^{-1}$.

IX. Complexation avec Gd(III)

Nous n'avons pour l'instant qu'obtenu des agents bifonctionnels comportant des complexes DO3A qui permettent de chélater le gadolinium, utile pour améliorer le contraste des images en IRM. Les agents comportant des complexes DTPA n'ont pas été obtenus en assez grande quantité pour pouvoir réaliser des essais de complexation avec des radioisotopes.

Les complexes de gadolinium sont facilement obtenus par réaction de ligands totalement protonés avec une quantité équimolaire de sels de gadolinium à pH contrôlé. L'oxyde de gadolinium peut être utilisé pour ce type de réaction, mais la réaction est très lente. L'hydroxyde de gadolinium, obtenu par précipitation d'une solution de chlorure métallique par de la soude, permet d'éviter l'utilisation de sels pour ajuster le pH lors de la réaction. Le carbonate ou l'acétate de gadolinium peuvent également être utilisés. Nous avons

privilégié le chlorure de gadolonium hexahydrate commercial pour réaliser ces complexations. La plupart des complexations sont réalisées dans de l'eau déionisée en ajustant ou non le pH à 5-6,5 et faisant réagir soit une quantité équimolaire ou un léger excès de $GdCl_3$ pendant plusieurs heures (12h[275] à 16h[276]) à température ambiante ou quelques heures (15 min[267,269] à 3h[277]) au reflux. Les premiers essais réalisés à température ambiante et à pH 6 ne nous ont pas permis de complexer les ions Gd^{3+} dans les chélates DO3A, c'est pourquoi nous nous sommes orientés vers une activation par voie thermique. Au vue du succès de la voie thermique, nous avons essayé de transposer cette complexation sous irradiation micro-ondes (Schéma 100).

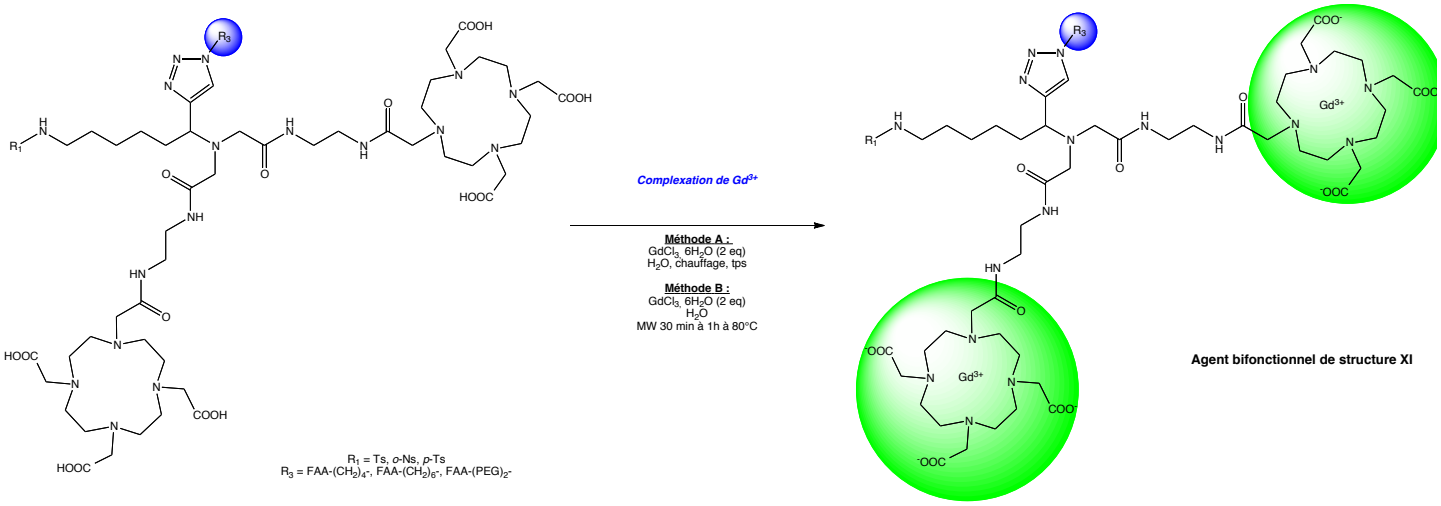


Schéma 100 : *Complexation de Gd^{3+}, synthèse d'agents bifonctionnels pour l'IRM et le ciblage*

Dans le tableau suivant, sont regroupés les différents modes opératoires réalisés pour complexer le Gd(III) et les résultats obtenus. D'après les rendements calculés par LC-MS, la complexation avec Gd^{3+} a fonctionné de façon modérée (5 et 58 %). Les complexes **Gd-XI** obtenus ont pour la plupart un temps de rétention plus important que leurs précurseurs **XI** libres. Les faibles rendements ont été la plupart du temps obtenus quand l'agent de contraste **XI** déprotégé n'était pas très pur. En effet, nous avons constaté une fois la complexation réalisée que les produits secondaires non éliminés lors de la purification HPLC sortaient au

[275] C. Richard, B-T. Doan, J-C. Beloeil, M. Bessodes, E. Tóth, D. Scherman, Noncovalent functionalization of carbon nanotubes with amphiphilic Gd chelates : toward powerful T and T MRI contrast agents, *Nano. Lett.*, **2008**, *8*, 232- 236

[276] F. Leclercq, M. Cohen-Ohana, N. Mignet, A. Sbarbati, J. Herscovici, D. Scherman, G. Byk, Design, synthesis and evaluation of gadolinum cationic lipids as tools for biodistribution tudies of gene delivery complexes, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 112-119

[277] N. Kamaly, T. Kalber, A. Ahmad, M. H. Oliver, P.-W. So, A. H. Herlihy, J. D. Bell, M. R. Jorgensen, A. D. Miller, Bimodal paramagnetic and fluorescent liposomes for cellular and tumor magnetic resonance imaging, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 118-129

même temps de rétention que nos produits, ce qui a engendré une surestimation de la masse d'agent à complexer.

Agent de contraste XI déprotégé	*Complexation à TA*	*Complexation au reflux* (85°C)	*Complexation au MW* (nb eq de $GdCl_3$)	*Rendement*	*Pureté* (LC-MS % ELSD)	*Complexe Gd- XI*
204 (Ts+C_4-FAA)			1h (2 eq)	9 %	9 %	**210**
205 (Ts+C_6-FAA)		48h	30 min (2 eq)	58 %	27 %	**211**
206 (Ts+PEG-FAA)	10 jours, pas complète	48h, pas complète	20 min (3 eq) 30 min (2 eq)	27 %	17 %	**212**
207 (*o*-Ns+C_4-FAA)	10 jours, pas complète		20 min (3 eq) 30 min (2 eq)	34 %	41 %	**213**
208 (*o*-Ns+PEG-FAA)		16h	20 min (3 eq) 30 min (2 eq)	12 %	6 %	**214**
209 (*p*-Ns+C4-FAA)		16h	20 min (3 eq) 30 min (2 eq)	5 %	2,2 %	**215**

Tableau 42 : *Résultats de la complexatin des agents bifonctionnels* ***XI***

Plusieurs essais ont été réalisés sur différents lots du composé **207** qui présentaient quelques traces de cuivre pour voir s'il était possible de déplacer les ions cuivriques des complexes DO3A par les ions gadolinium. Malheureusement, les complexes Cu-DO3A sont trop stables pour être détruits. Nous avons donc obtenu des agents de contraste **213** complexés sous forme de mélange 70/30 un agent avec Gd-DO3A/Gd-DO3A et un agent avec Gd-DO3A/Cu-DO3A. Ce mélange de complexes est tout de même intéressant pour voir l'influence du cuivre sur la relaxivité.

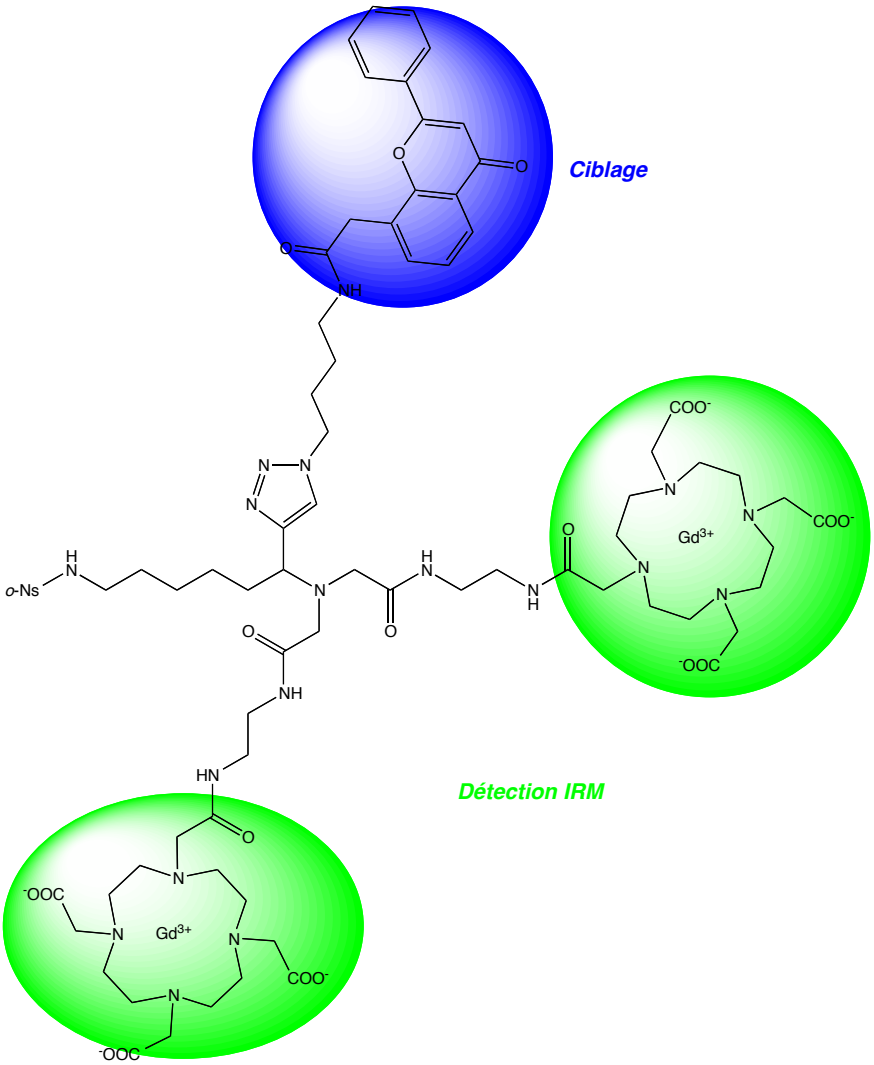


Figure 115 : *Composé **213** : Agent bifonctionnel de type **XI***

Nous avons ensuite dosé le gadolinium libre présent dans les échantillons issus de la complexation de l'agent de contraste **213** par une méthode de complexométrie. L'indicateur coloré le plus utilisé pour les lanthanides(III) est l'orange de xylénol (Figure 116) qui en présence du métal libre change de couleur.[277,278] La valeur du pH provoque aussi un changement de couleur. En milieu acide ou neutre, la solution est jaune. Quand le milieu devient basique, la couleur devient violette. Ce changement de couleur est dû à une déprotonation du groupement hydroxyle phénolique qui conduit à une délocalisation électronique et donc au déplacement de la longueur d'absorption. L'orange de xylénol possède plusieurs groupes N et O donneurs permettant la coordination du métal, qui provoque le départ du proton de l'oxygène phénolique.

[278] A. Barge, G. Cravotto, E. Gianolio, F. Fedeli, How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note*, Contrast Med. Mol. Imaging*, **2006**, *1*, 184-188

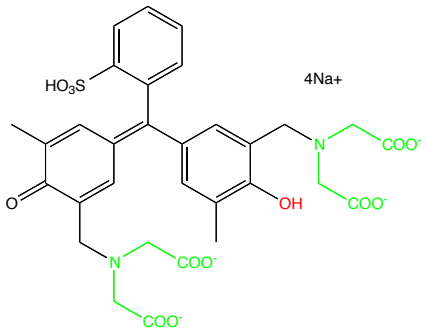


Figure 116 : *Structure chimique de l'orange de xylénol*

En raison de la faible stabilité thermodynamique du complexe Gd-orange de xylénol (log K = 5,8) et dans le cas de solutions contenant des Gd-complexes très stables (Gd-DTPA, Gd-DOTA, Gd-DO3A), seul les ions libres Gd(III) sont les substrats pour l'indicateur coloré et qu'il n'est pas possible d'extraire les ions métalliques des complexes. La concentration en ions gadolinium libres a été déterminée en mesurant l'absorbance à 573 nm d'un mélange d'une solution d'orange de xylénol (tampon acétate pH 5,2) et un solution contenant les complexes **Gd-XI**. En appliquant la loi de Beer-Lambert, on est capable de déterminer la concentration en gadolinium libre :

A = l. ε . [Gd(III) libre] où l est la longueur de la cuve (1 cm)

ε le coefficient d'extinction molaire = 20700 L. $mol^{-1}.cm^{-1}$

[Gd(III) libre] la concentration en ions gadolinium libre

d'où,

$$[Gd(III)libre] = \frac{A573}{\varepsilon}$$

3 lots différents de complexe **213** ont été analysés, les résultats sont regroupés dans le Tableau 43. Malheureusement, il y a dans ces différents lots environ 50 % de Gd^{3+} libre par rapport à la quantité totale de gadolinium. C'est pourquoi nous avons essayé de les purifier par HPLC semi-préparative pour éliminer l'excès de gadolinium et les autres impuretés. Mais cette opération de purification n'a pas été concluante, car nous n'avons pas pu récupérer les composés complexés. Nous avons donc décidé d'évaluer la relaxivité de ces 3 lots d'agent de contraste bifonctionnel **213** sans purification préalable dans un premier temps.

Lot	*Complexe* 213	*% de Gd $^{3+}$ libre*
1	Lot contenant uniquement Gd-DO3A/Gd-DO3A	48 % ± 5 %
2	66/33 [Gd-DO3A/Gd-DO3A]/[Gd-DO3A/Cu-DO3A]	40 % ± 5 %
3	50/50 [Gd-DO3A/Gd-DO3A]/[Gd-DO3A/Cu-DO3A]	50 % ± 5 %

Tableau 43 : *Résultats du dosage complexométrique*

Des expériences sont en cours pour éliminer le gadolinium libre en le complexant avec de l'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique) puis en réalisant une chromatographie d'exclusion stérique et une dialyse.[279,276] Ces expériences seront réalisées, si elles sont concluantes, sur l'ensemble des agents de contraste bifonctionnel **XI** synthétisés pour évaluer par la suite l'influence du groupement protecteur de l'amine et le type et la longueur du bras espaceur du ligand sur la relaxivité.

X. Perspectives de synthèse : Agents multimodaux pour l'imagerie moléculaire

L'originalité de ce projet est de pouvoir coupler les deux types d'agents d'imagerie bimodal **X** et bifonctionnel **XI** sur une même structure afin d'obtenir de véritables agents d'imagerie moléculaire multimodaux et ciblants (Schéma 60). Nous avons décidé de développer des couplages entre l'amine protégée par un groupement tosyle ou nosyle et des groupements hydroxyles en appliquant une réaction de Fukuyama-Mitsunobu[280] (Schéma 101). Ainsi, nous ne sommes pas obligés de déprotéger l'amine et donc d'insérer une étape supplémentaire dans le schéma réactionnel.

[279] M. Tan, X. Wu, E-K. Jeong, Q. Chen, Z-R. Lu, *Biomacromolecules*, **2010**, *11*, 754-761

[280] (a) T. Fukuyama, C-K Jow, M. Cheng, 2- and 4-nitrobenzenesulfonamides : exceptionally versatile means for preparation of secondary amines and protection of amines, *Tetrahedron lett*., **1995**, *36*, 6373-6374 ; (b) S. G. Leach, C. J. Cordier, D. Morton, G. J. McKiernan, S. warriner, A. Nelson, A fluorous-tagged linker from which small moleucules are released by ring-closing metathesis, *J. Org. Chem*., **2008**, *73*, 2753-2759

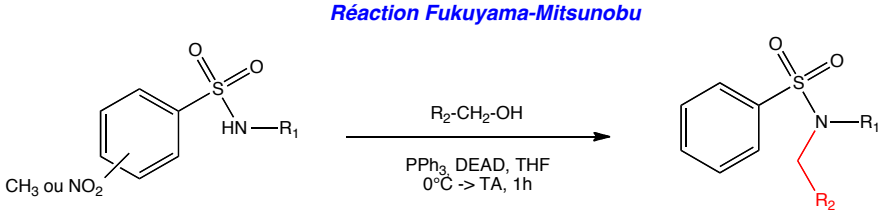


Schéma 101 : *Réaction Fukuyama-Mitsunobu*

Les bras espaceurs choisis entre deux agents de contraste sont des diols monoprotégés sous forme d'éther avec un groupement tert-butyldiméthylsilyle ou encore des polyols protégés (n-1). Ces bras espaceurs diol monoprotégé réagiront avec l'amine nosylée ou tosylée d'un agent bifonctionnel **XI** par couplage de Fukuyama-Mitsunobu. Le second alcool sera par la suite déprotégé en présence de TBAF pour réagir à nouveau par couplage de Fukuyama-Mitsunobu avec l'amine nosylée ou tosylée d'un agent bimodal **X** pour conduire à un agent bimodal et ciblant (Schéma 102).

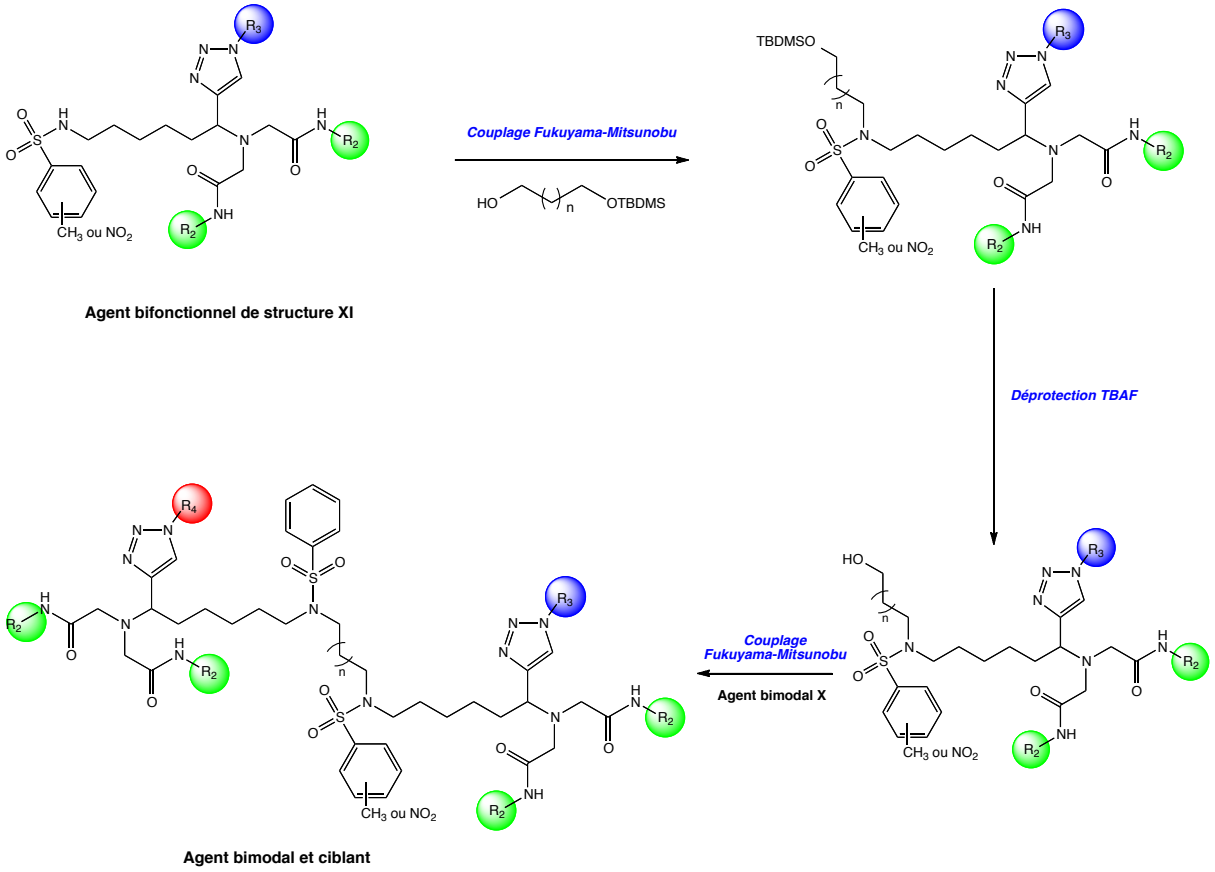


Schéma 102 : *Synthèse d'un agent bimodal et ciblant par couplage Fukuyama-Mitsunobu*

XI. Évaluation des agents de contraste

L'efficacité des agents de contraste IRM est définie par leurs relaxivités r_1 et r_2, elles-mêmes définies par l'amélioration du taux de relaxation par rapport à une concentration de 1 mM d'agents qui sont des GdL (complexe Gadolinium-Ligand) dans le cas de complexes de Gd^{3+}. Des études préliminaires de mesure de relaxivité ont été réalisées sur 3 lots d'agent de contraste bifonctionnel **213** (Figure 115, Tableau 43). La relaxivité du composé **213** a pu ainsi être mesurée en IRM à différentes concentrations en GdL et à différents champs (0,47 T, 4,7 T et 7 T). Pour déterminer la relaxivité des différents lots du composé **213**, il est nécessaire de préparer une gamme de concentration en GdL (1 ; 0,5 ; 0,1 ; 0,05 ; 0,01 mM) dans de l'eau déionisée. Afin de réaliser cette gamme, nous avons bien sûr tenu compte du fait qu'il y a 2 moles de GdL par mole de composé **213** pour le premier lot pur, sans cuivre complexé, 1,65 moles de GdL par mole pour le lot N°2, 1,5 moles de GdL par mole pour le lot N°3. La concentration en GdL a ensuite été vérifiée par spectrométrie de masse quadripolaire à source plasma (ICP-MS). Les temps de relaxation T_1 et T_2 des 3 gammes d'échantillons ont ensuite été mesurés sur différents spectromètres. Les taux de relaxation longitudinale et transversale ont été mesurés respectivement avec une séquence IRM de saturation en T_1 (saturation recovery) et une séquence en T_2 de type Carr-Purcell-Meilboom-Gill (CPMG) aux fréquences de Larmor des protons à 20 MHz (Bruker Minispec), 200 MHz (Bruker Biospec) et 300 MHz (Bruker 300WB US) et à respectivement 37°C, 20°C et 25°C.[281]

Les relaxivités longitudinales r_1 et transversales r_2 *in vitro* sont définies comme suit (chapitre **I**) :

$$\text{Pour } r_1 \text{ (mM}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}, \; R_1 = 1/T_1 = r_1[Gd^{3+}] + R_1^0$$

$$\text{Pour } r_2 \text{ (mM}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}, \; R_2 = 1/T_2 = r_2[Gd^{3+}] + R_2^0$$

Où $[Gd^{3+}]$ est la concentration totale en Gd^{3+} en mmol/l et R_1^0 : valeur du taux de relaxation de l'eau.

Après avoir mesuré les temps de relaxation en T_1 et T_2 à un champs donné, on rapporte les valeurs R_1 ($R_1=1/T_1= y$) et R_2 ($R_2=1/T_2= y$) en fonction de la concentration en GdL ($[Gd^{3+}] = x$) pour en déduire la relaxivité totale des différents lots par régression linéaire (exemple à 7T : Figure 117, Figure 118).

[281] Hacke, Brown, Thompson, Venkatesan, Magnetic Resonance Imaging, Physical Principles and Sequence Design, Wiley, **1999**

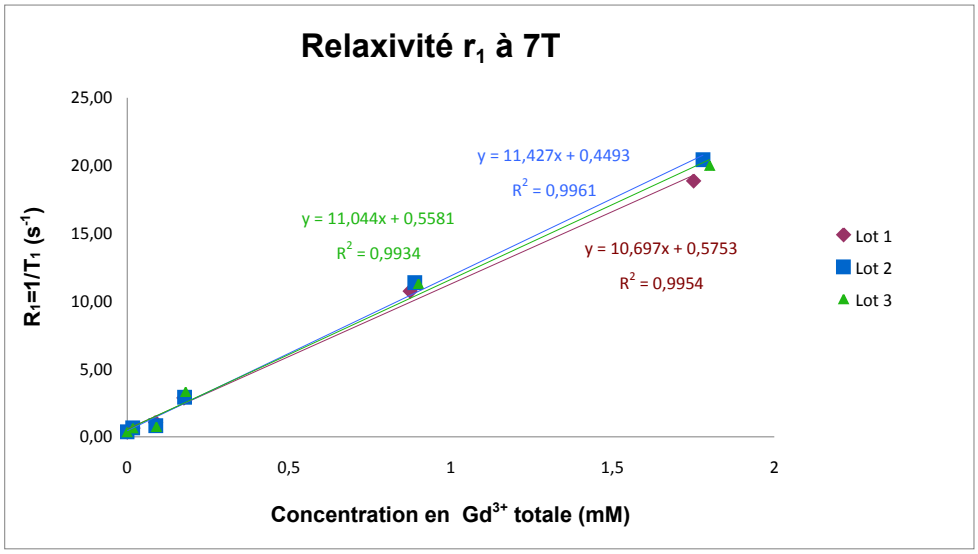


Figure 117 : *Graphique de la relaxivité totale r_1 des différents lots du composé **213** à 7 T*

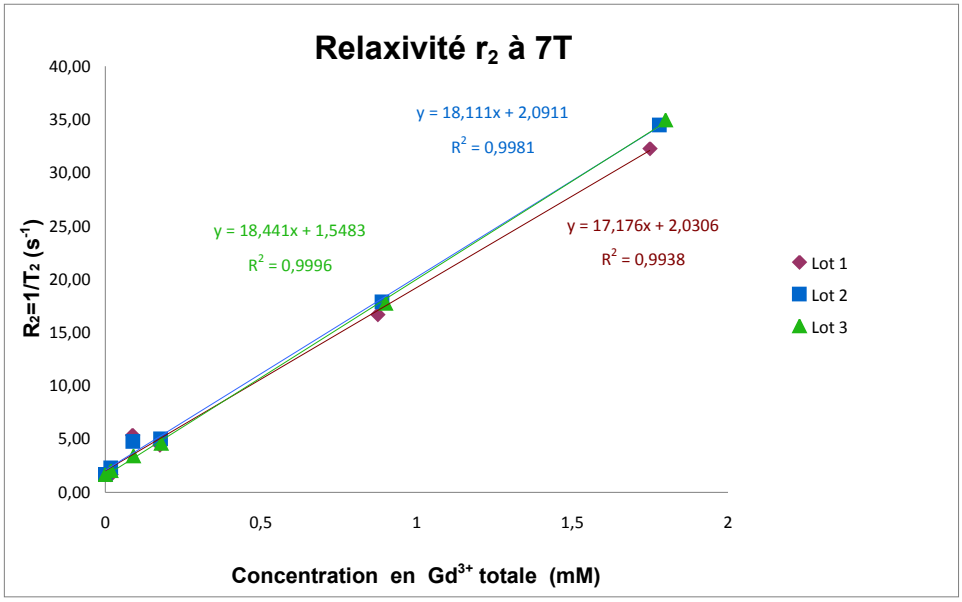


Figure 118 : *Graphique de la relaxivité totale r_2 des différents lots du composé **213** à 7 T*

D'après les équations précédentes et les résultats expérimentaux obtenus par les graphiques ci-dessus, nous avons pu déterminer les relaxivités totales r_1 et r_2 des différents lots du composé **213** à 7 T (Tableau 44).

N° du lot du composé 213	$r_{1\ Totale}$ ($mM^{-1}.s^{-1}$)	$r_{2\ Totale}$ ($mM^{-1}.s^{-1}$)
1	10,7 ± 1,1	17,2 ± 1,1
2	11,4 ± 1,1	18,1 ± 1,1
3	11,0 ± 1,1	18,4 ± 1,1

Tableau 44 : *Relaxivités totales à 7 T (300 MHz) des différents lots du composé **213***

Dans un mélange aqueux contenant plusieurs espèces chélatant l'ion Gd^{3+}, le taux de relaxation des protons de l'eau observé est la somme des contributions découlant de chaque espèce seule plus la contribution de relaxation de l'eau qui s'exprime par l'équation suivante[38] :

$$R_{obs} = \sum_i r_i C_i + R^0$$

Où r_i la relaxivité d'une espèce donnée, C_i la concentration en GdL de l'espèce donnée et R^0 le taux de relaxation de l'eau.

Or $R_{obs} - R^0 = r_{obs} \times C_{totale}$, d'où $r_{obs} = \sum_i \frac{r_i C_i}{C_{totale}}$.

Dans notre cas, nous devons tenir compte du fait qu'il y a un certain pourcentage d'ions Gd^{3+} libres et que les ions Gd^{3+} chélatés sont complexés dans des environnements différents et dans des proportions différentes en fonction des lots analysés. On dénombre trois types d'ions Gd^{3+} : les ions Gd^{3+} libres (concentration notée $[Gd^{3+}]_{libre}$), les ions Gd^{3+} complexés dans les 2 chélates DO3A de la molécule **213** (concentration notée $[Gd^{3+}]_{Gd/Gd}$), les ions Gd^{3+} complexés dans un seul chélate DO3A de la molécule **213** et dont le deuxième DO3A complexe les ions Cu^{2+} (concentration notée $[Gd^{3+}]_{Gd/Cu}$). D'après le dosage colorimétrique effectué précédemment pour déterminer la concentration d'ions Gd^{3+} libres contenus dans les différents lots, on peut déterminer la concentration en Gd^{3+} contenus dans les différentes espèces (Tableau 45).

N° du lot	*Complexe* **213**	$[Gd^{3+}]_{libre}$	$[Gd^{3+}]_{Gd/Gd}$	$[Gd^{3+}]_{Gd/Cu}$
1	100 % Gd/Gd	48 %	52 %	0 %
2	66 % Gd/Gd + 33 % Gd/Cu	40 %	40 %	20 %
3	50 % Gd/Gd + 50 % Gd/Cu	50 %	25 %	25 %

Tableau 45 : *Pourcentages de Gd^{3+} contenus dans les différentes espèces*

Afin de déterminer les relaxivités de chaque espèce, nous avons tout d'abord déterminé les relaxivités r_1 et r_2 des ions Gd^{3+} et Cu^{2+} seuls à 7 T (Tableau 46). Au vue des relaxivités faibles des ions Cu^{2+}, nous avons négligé leurs contributions sur la relaxivité totale qu'elle soit longitudinale ou transversale dans les calculs suivants.

Ions	r_1 ($mM^{-1}.s^{-1}$)	r_2 ($mM^{-1}.s^{-1}$)
Gd^{3+}	11,0 ± 0,1	14,7 ± 0,1
Cu^{2+}	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1

Tableau 46 : *Relaxivités r_1 et r_2 déterminées à 7 T*

En utilisant l'équation d'additivité des relaxivités des espèces établies précédemment, on est capable de déterminer les relaxivités r_1 et r_2 de chaque espèce comme suit :

$$r_{obs} \times \left[Gd^{3+}\right]_{totale} = r_{Gd/Gd} \times \left[Gd^{3+}\right]_{Gd/Gd} + r_{Gd/Cu} \times [Gd^{3+}]_{Gd/Cu} + r_{Gd^{3+}libre} \times \left[Gd^{3+}\right]_{libre}$$

Le lot N°1 du composé **213** va nous permettre de déterminer les relaxivités $r_{1\ Gd/Gd}$ et $r_{2\ Gd/Gd}$:

$$r_{Gd/Gd} = \frac{r_{obs} \times \left[Gd^{3+}\right]_{Totale} - r_{Gd^{3+}libre} \times \left[Gd^{3+}\right]_{libre}}{\left[Gd^{3+}\right]_{Gd/Gd}}.$$

Ensuite, nous pouvons déterminer les relaxivités $r_{1\ Gd/Cu}$ et $r_{2\ Gd/Cu}$ avec les résultats expérimentaux obtenus avec les échantillons 2 et 3 :

$$r_{Gd/Cu} = \frac{r_{obs} \times [Gd^{3+}]_{Totale} - r_{Gd^{3+}libre} \times \left[Gd^{3+}\right]_{libre} - r_{Gd/Gd} \times \left[Gd^{3+}\right]_{Gd/Gd}}{[Gd^{3+}]_{Gd/Cu}}.$$

Dans le Tableau 47, sont reportées les valeurs des relaxivités r_1 et r_2 à 7 T calculées par rapport à une concentration millimolaire de GdL dans les différents complexes en fonction du lot du composé **213**.

N° du lot	$r_{1\ Gd/Gd}$ ($mM^{-1}.s^{-1}$)	$r_{1\ Gd/Cu}$ ($mM^{-1}.s^{-1}$)	$r_{2\ Gd/Gd}$ ($mM^{-1}.s^{-1}$)	$r_{2\ Gd/Cu}$ ($mM^{-1}.s^{-1}$)
1	10,4 ± 1,1		19,5 ± 1,1	
2		14,2 ± 1,1		22,1 ± 1,1
3		7,9 ± 1,1		17,3 ± 1,1

Tableau 47 : *Relaxivités des espèces Gd/Gd et Gd/Cu calculées par rapport à une concentration mmol/L de GdL à 7 T*

Les valeurs des relaxivités des 3 lots sont à peu près du même ordre de grandeur. Ce résultat nous indique que la présence d'autres ions chélatés dans la structure du composé **213** n'est pas d'influence négative ou positive sur la relaxivité définie par rapport à une concentration millimolaire de GdL. A part pour le lot 2, les valeurs sont un peu plus fortes.

Ceci est peut-être dû à l'hypothèse que nous avons précédemment faite lors du calcul de la relaxivité des différentes espèces. Comme les lots ne sont pas purs, il pourrait y avoir une autre espèce complexant les ions gadolinium que nous n'aurions pas isolée dans notre calcul et qui contribuerait à la relaxation du complexe Gd/Cu. Comme nous l'attendions, ces chélatants de gadolinium ont un effet plus significatif sur les temps de relaxation T_1 que sur le temps de relaxation T_2 et produisent donc un contraste positif. D'autre part, les valeurs r_1 et r_2 sont similaires à celles de Gd^{3+} libre ce qui nous indique que la structure moléculaire conçue pour nos agents d'imagerie moléculaire permet bien de chélater des ions gadolinium et d'obtenir des agents de contraste efficaces en termes de relaxivité r_1. En ce qui concerne les relaxivités r_2, les valeurs ne sont pas prédominantes en termes de réduction de T_2. En effet, on parle d'agent de contraste T_2 quand le rapport r_2/r_1 est supérieur à 10 ce qui n'est généralement pas le cas avec des complexes polyaminocarboxylate de gadolinium.

Dans le Tableau 48, sont reportées les valeurs des relaxivités r_1 et r_2 à 7 T calculées par rapport à une concentration mmol/L non plus rapportée en concentration de Gd mais en concentration du composé (qui contient soit 2 moles de Gd, soit 1,65 moles de Gd suivant les lots) de composé dans les différents complexes en fonction du lot du composé **213**.

N° du lot	r_1 *Composé 213* Gd/Gd ($mM^{-1}.s^{-1}$)	r_1 *Composé 213* Gd/Cu ($mM^{-1}.s^{-1}$)	r_2 *Composé 213* Gd/Gd ($mM^{-1}.s^{-1}$)	r_2 *Composé 213* Gd/Cu ($mM^{-1}.s^{-1}$)
1	20,8 ± 1,1		39,0 ± 1,1	
2		14,2 ± 1,1		22,1 ± 1,1
3		7,9 ± 1,1		17,3 ± 1,1

Tableau 48 : *Relaxivités de l'espèce **213** Gd/Gd et l'espèce **213** Gd/Cu calculées par rapport à une concentration mmol/L de composé **213** à 7 T*

Il est intéressant de calculer les relaxivités par rapport à une concentration millimolaire de composé et non de GdL, car on constate dans ce cas que l'espèce complexant deux ions gadolinium a une efficacité 2 fois plus grande que celle de l'espèce complexant un ion gadolinium et un ion cuivrique. Donc *in vivo*, on pourra injecter deux fois moins de produits pour avoir le même contraste qu'avec l'espèce ne possédant qu'un ion gadolinium.

Nous avons ensuite procédé de la même manière pour déterminer les relaxivités longitudinales et transversales des complexes Gd/Gd et Gd/Cu à 0,47 T et à 4,7 T (Tableau 49, Tableau 50).

Champ	$r_{1\ GdL}$ ($mM^{-1}.s^{-1}$)			$r_{2\ GdL}$ ($mM^{-1}.s^{-1}$)		
	Complexe 213 Gd/Gd	*DOTAREM*	*Gd^{3+}*	*Composé 213 Gd/Gd*	*DOTAREM*	*Gd^{3+}*
0,47 T	18,1 ± 0,7	3,9 ± 0,1	10,2 ± 0,1	17,5 ± 0,7	4,2 ± 0,1	14,0 ± 0,1
4,7 T	15,6 ± 0,8	4,4 ± 0,5	9,4 ± 0,5	22,4 ± 0,8	5,4 ± 0,5	14,3 ± 0,5
7 T	10,4 ± 1,1	3,8 ± 0,1	11,0 ± 0,1	19,5 ± 1,1	4,5 ± 0,1	14,5 ± 0,1

Tableau 49 : *Relaxivités (r_1 et r_2) par GdL du complexe Gd/Gd, du DOTAREM et de Gd^{3+} à différents champs*

Champ	$r_{1\ GdL}$ ($mM^{-1}.s^{-1}$)			$r_{2\ GdL}$ ($mM^{-1}.s^{-1}$)		
	Complexe 213 Gd/Cu	*DOTAREM*	*Gd^{3+}*	*Composé 213 Gd/Cu*	*DOTAREM*	*Gd^{3+}*
0,47 T	Lot 2 : 18,9 ± 0,7 Lot 3 : 15,1 ± 0,7	3,9 ± 0,1	10,2 ± 0,1	Lot 2 : 23 ± 0,7 Lot 3 : 23,8 ± 0,7	4,2 ± 0,1	14,0 ± 0,1
4,7 T	Lot 2 : 16,0 ± 0,8 Lot 3 : 13,7 ± 0,8	4,4 ±0,5	9,4 ± 0,5	Lot 2 : 21,1 ± 0,8 Lot 3 : 17,4 ± 0,8	5,4 ± 0,5	14,3 ± 0,5
7 T	Lot 2 : 14,2 ± 1,1 Lot 3 : 7,9 ± 1,1	3,8 ± 0,1	11,0 ± 0,1	Lot 2 : 22,1 ± 1,1 Lot 3 : 17,3 ± 1,1	4,5 ± 0,1	14,5 ± 0,1

Tableau 50 : *Relaxivités (r_1 et r_2) par GdL du complexe Gd/Cu, du DOTAREM et de Gd^{3+} à différents champs*

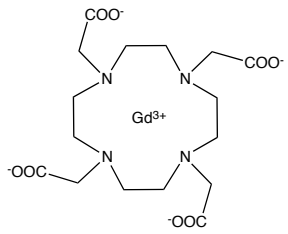


Figure 119 : *Structure du DOTAREM*

En comparant les relaxivités longitudinales des complexes avec un chélatant de référence utilisé couramment en médecine, le DOTAREM [Gd(**DOTA**)(H_2O)]$^-$, on peut noter que les complexes Gd/Gd et Gd/Cu ont des relaxivités entre 2 et 4 fois plus grandes que celles du DOTAREM en fonction de la fréquence employée. Dans notre cas, par rapport au DOTAREM, on devrait injecter environ 4 fois moins de produit. Ce résultat nous indique que le châssis moléculaire de nos agents de contraste a permis d'obtenir des agents de contraste plus efficaces que les agents de contraste commerciaux en termes de relaxation des protons de l'eau.

Ne possédant pas les complexes Gd/Gd et Gd/Cu isolément, nous avons voulu comparer l'efficacité de nos lots du composé **213** par rapport au DOTAREM. Sur les graphes 120 et 121, sont reportées les relaxivités totales des lots sans la contribution des ions Gd^{3+} libres en fonction de différentes fréquences de champ B_0.

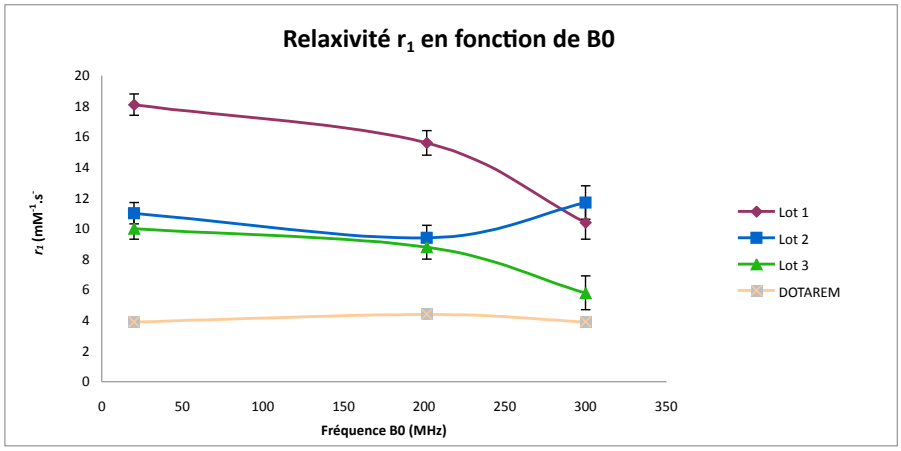


Figure 120 : *Relaxivité r_1 en fonction de B_0*

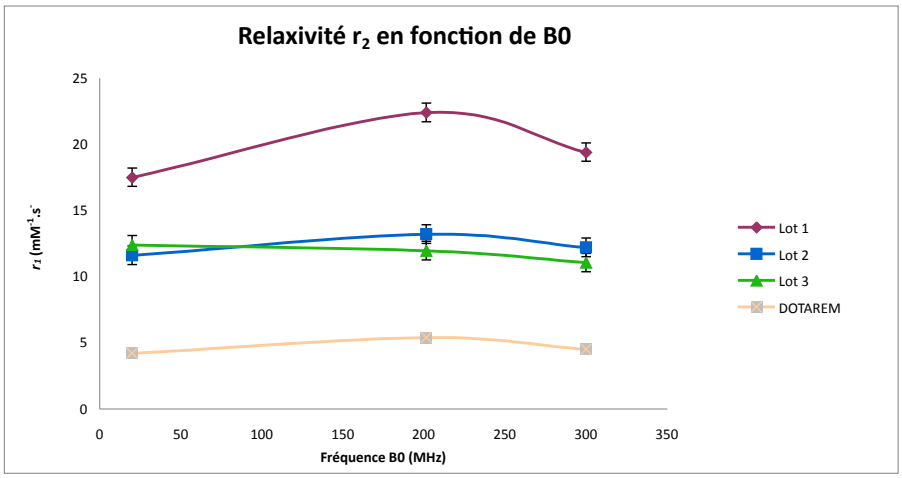


Figure 121 : *Relaxivité r_2 en fonction de B_0*

D'après le graphe 120, les valeurs r_1 décroissent avec l'augmentation de la fréquence du champ, comme cela a été prédit par la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan sur la relaxation. L'allure des courbes du lot N°1 et du lot N°3 sont similaires. Le lot N°1 composé par un complexe Gd-DO3A/Gd-DO3A a des relaxivités r_1 deux fois plus grandes que le lot N°3 composé à 50 % par un complexe Gd-DO3A/Gd-DO3A et à 50 % par un complexe Gd-DO3A/Cu-DO3A. Cette observation nous permet de conclure sur l'utilité d'avoir greffé deux complexes de sel métallique sur le squelette **VIII** pour former des agents de contraste plus performants. La courbe du lot N°2 suit aussi l'allure des courbes précédentes à l'exception de la valeur r_1 à la fréquence de Larmor du proton à 300 MHz, dont le problème a été évoqué

précédemment. En effet pour cette valeur, il existe des incertitudes sur la composition du lot N°2 du composé **213** ou lors de la détermination du temps de relaxation T_1 faussant ainsi la relaxivité r_1 du lot N°2 à 300 MHz.

Les mêmes conclusions peuvent être obtenues d'après le graphe 121 sur la relaxivité transversale des 3 lots du composé **213**. L'allure des courbes ne met pas en évidence une fréquence où les relaxivités seraient plus grandes. En effet pour un même lot, les valeurs r_2 sont du même ordre de grandeur. Afin d'identifier des relaxivités r_1 plus élèvées, en général des mesures sont réalisées entre 20 et 200 MHz. Malheureusement, nous ne disposions pas de spectromètre IRM pour réaliser ces expériences.

En comparant les relaxivités des différents lots du composé **213** par rapport aux relaxivités obtenues par le DOTAREM, on peut en conclure que le lot N°1 composé par un complexe Gd-DO3A/Gd-DO3A a des relaxivités trois à quatre fois plus grandes que celles du DOTAREM tandis que les lots 2 et 3 composés par un mélange de complexes Gd-DO3A/Gd-DO3A et Gd-DO3A/Cu-DO3A ont des relaxivités deux fois plus grandes que celles du DOTAREM. Ainsi nos agents de contraste formés par le composé **213** devraient permettre d'obtenir soit des images plus contrastées que celles obtenues avec le DOTAREM, soit d'utiliser des concentrations plus faibles pour obtenir des images comparables à celles avec le DOTAREM. Cette dernière conclusion est intéressante pour l'utilisation de ces produits en tant qu'agent d'imagerie moléculaire. Ainsi, on pourra injecter de faibles quantités d'agents de contraste ciblant un organe ou un tissu sans perdre en contraste d'image.

Nous n'avons pas pour l'instant étudié la stabilité de nos complexes Gd-DO3A, car nous avons utilisé le chélate DO3A déjà connu pour former un complexe très stable avec l'ion Gd^{3+} ($K_{[Gd(\mathbf{HP\text{-}DO3A})(H2O)]-} = 10^{23,8}$). Cette étude de stabilité thermodynamique pourra être menée par des expériences de transmétallation.[38] Les profils de dispersion de relaxation magnétique nucléaire ou plus couramment, d'après l'anglais, profils NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) que nous avons obtenus par relaxométrie sont un outil de base pour la caractérisation de nos agents de contraste. Toutefois, devant la complexité et l'intrication du nombre de paramètres gouvernant la relaxivité, il est souvent difficile de les obtenir de façon pertinente sur les seuls profils NMRD. En particulier, il est très difficile de séparer les contributions relatives de sphère interne et de sphère externe. Il est donc nécessaire de déterminer un maximum de paramètres de façon indépendante et d'ajuster les paramètres manquants par l'utilisation des profils NMRD. Par la suite, nous pouvons envisager de réaliser plusieurs techniques pour déterminer indépendamment des paramètres importants

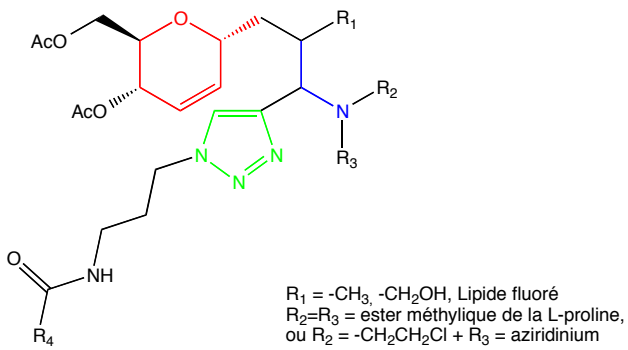
influençant la relaxivité : par exemple, la RMN de l'oxygène $_{17}O$ permet de caractériser l'hydratation des complexes, de déterminer la vitesse d'échange, le temps de corrélation rotationnelle τ_R, la RPE permet de déterminer la distance Gd-H. Par la suite, une évaluation biologique *in vivo*, des tests de cytoxicité devront être réalisés.

Pour conclure, l'évaluation primaire *in vitro* de la relaxivité de ces nouveaux agents de contraste ciblant est plutôt prometteuse. L'efficacité de ces châssis originaux peut faire d'eux de bons agents d'imagerie moléculaire. L'étude de l'ensemble des agents de contraste bifonctionnels **XI** synthétisés nous permettra d'établir un profil d'agent d'imagerie moléculaire présentant les meilleures relaxivités en jouant sur certains groupements de la structure (groupement protecteur de l'amine et le type et la longueur du bras espaceur du ligand).

Conclusion générale

Ce travail de thèse avait pour objectif de mettre en place une méthodologie de synthèse de **nouvelles sondes ciblées** pour **l'imagerie moléculaire** et de concevoir une banque de ces **nouveaux agents de contraste possédant un caractère bifonctionnel et/ou bimodale**. Ce travail s'est articulé autour de 3 grands axes: la synthèse d'une chimiothèque de petites molécules à partir de synthon C-glycosidique, le criblage de cette dernière par la technique des puces à petites molécules, la conception et l'évaluation de nouveaux agents d'imagerie moléculaire.

Le premier objectif de ce travail de thèse a été la conception d'une **chimiothèque** de **nouvelles propargylamines polycycliques osidiques**. Le but principal étant la découverte de composés à fort potentiel biologique pour le ciblage de récepteurs moyennant des voies de synthèses rapides telles que les réactions à composants multiples, la synthèse sous activation micro-ondes et la synthèse sur support fluoré. Nous avons tout d'abord synthétisé l'aldo-C-glycoside fluoré du glucal qui a été engagé dans un processus de couplage à 3 composants (A^3) avec un acide aminé, la L-proline et le TMS-acétylène. Par la suite, une cycloaddition entre l'alcyne et différents azotures diversifiés a permis l'introduction d'hétérocycles triazoles par chimie click. Ainsi une chimiothèque de 21 molécules polycycliques hautement fonctionnalisées a été synthétisée, dont 3 molécules fluorées (Figure 122).



Rdt = 13 à 96 %

Figure 122 : *Structure commune à la chimiothèque synthétisée*

En ce qui concerne la synthèse des petites molécules fluorées, il nous reste à diversifier la librairie en faisant réagir d'autres azotures sur l'alcyne du composé C-glycoside fluoré **31** et à améliorer les conditions opératoires de la cycloaddition d'Huisgen pour augmenter le rendement (utilisation de Cu(I) en solution, activation sous MW…). D'autre part, dans une approche de synthèse orientée vers la diversité, il sera possible de réaliser un

couplage peptidique après libération de l'acide carboxylique de la L-proline et ainsi obtenir diverses extensions moléculaires sur l'acide (Schéma 103).

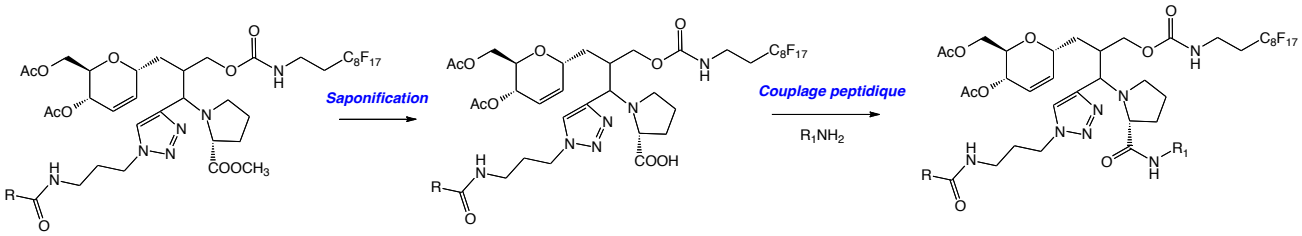


Schéma 103 : *Diversification du squelette **VII***

Finalement, les activités biologiques de ces chimiothèques restent à déterminer. Les tests de criblage sont possibles grâce aux fonctions hydroxyles du sucre et l'étiquette fluorée greffée sur le synthon C-glycosidique qui permettra l'immobilisation de ces composés sur lames. Les résultats de criblage nous donneront des informations importantes dans la direction future de nos travaux de recherche.

L'évaluation biologique *in vitro* de ces molécules a été réalisée par une méthode de **criblage** rapide, efficace et à faible coût basée sur la **technique des chimiothèques sur puces**. L'immobilisation des molécules sur les lames est réalisée soit par des liaisons covalentes ou des interactions fluor-fluor. Ne possédant qu'une chimiothèque restreinte de petites molécules fluorées, nous nous sommes orientés vers une méthode permettant de fonctionnaliser les lames par un groupe isocyanate. Dans ces conditions, il est possible d'immobiliser des molécules contenant des groupements amine, alcool, thiol et phénol sur le même support. Une fois les puces préparées, elles sont incubées avec la protéine d'intérêt marquée par un fluorophore. Après une mise au point de l'étape d'incubation avec une protéine modèle, nous nous sommes investis dans la recherche des ligands de trois familles différentes de protéine. Le criblage de la protéine rétrovirale Vpr, protéine accessoire du VIH-1 nous a permis de valider notre concept. Nous avons identifié des ligands déjà connus, mais aussi plus originaux de Vpr. L'interaction avec une de ces petites molécules a été confirmée par la suite par un criblage secondaire par RMN. Son activité inhibitrice contre la réplication virale en milieu cellulaire est en cours d'évaluation. Il est désormais possible d'étendre cette méthode de criblage à d'autres protéines marquées par fluorescence afin d'identifier de nouveaux modulateurs d'activité protéique.

Enfin, la dernière partie de ce travail a consisté en la synthèse d'agents d'imagerie moléculaire. Le squelette de ces agents repose sur une propargylamine obtenue à partir d'une

réaction à 3 composants qui nous offre plusieurs points d'ancrage pour permettre le couplage de groupements de détection et de ligands connus ou originaux. La stratégie de synthèse employée combine une réaction à composants multiples, des couplages peptidiques et une cycloaddition d'Huisgen. Ces travaux nous ont permis de concevoir et d'évaluer une famille d'agents de contraste possédant un caractère bifonctionnel alliant une fonction de ciblage des cellules tumorales de l'endothélium et deux groupes chélatant des sels métalliques pour la détection (IRM ou scintigraphie). Nous avons aussi développé une sonde bimodale pour l'IRM et l'imagerie optique avec des applications dans le proche infrarouge.

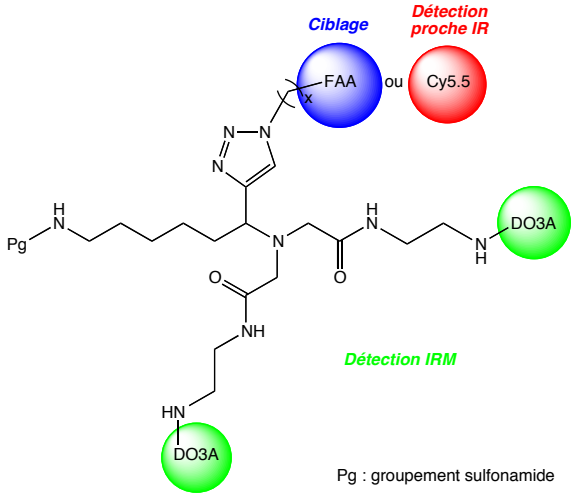


Figure 123 : *Squelette des agents d'imagerie moléculaire*

L'évaluation primaire *in vitro* de la relaxivité d'un de ces nouveaux agents de contraste ciblant est plutôt prometteuse. Les relaxivités de ce châssis original sont deux à trois plus grandes que celles d'un agent commercial. Ce résultat nous permet de valider notre stratégie de synthèse d'agents d'imagerie moléculaire. Par la suite, le greffage de ces agents de contraste bifonctionnels optimisés et des agents bimodaux sur des polyols nous permettra d'augmenter l'efficacité de ciblage de nos sondes, d'obtenir un meilleur contraste en IRM et une intensité plus grande en imagerie optique. L'obtention d'agents de contraste plus purs et sans Gd^{3+} libres est en cours de réalisation pour nous permettre dans un futur proche d'étudier la toxicité sur cellules de ces composés et leur biodistribution *in vivo* sur souris saine, puis de ciblage sur cellules tumorales et *in vivo* sur souris portant une tumeur.

Pour conclure, ces squelettes novateurs d'agents de contraste me semblent d'un grand intérêt pour la synthèse d'agents d'imagerie moléculaire. De ce point de vue, le développement et l'étude de systèmes multimodaux et ciblant mérite d'être poursuivi.

Partie expérimentale

I. GENERALITES 261

II. MATERIEL 261
A. Réactifs de départ et solvants 261
B. Appareillages 261

III. METHODES DE PURIFICATION ET D'ANALYSE 262
A. Chromatographie sur Couche Mince (CCM) 262
B. Chromatographies sur silice 263
C. Résonance Magnétique Nucléaire 263
D. Point de fusion 264
E. Analyses LC-MS 264
F. Spectrométrie de masse 264
G. ICP-MS 264

IV. PRECAUTIONS PRISES 264

V. MODES OPERATOIRES ET ANALYSES 264

- Chimiothèque de composés fluorés hautement diversifiés 265
- Agents de contraste multimodaux et bifonctionnels 310
- Criblage sur puces de petites molécules 388
- Evaluation IRM des agents d'imagerie moléculaire 396

I. Généralités

La nomenclature de l'Union Internationale de Chimie et Physique Appliquée (UIPCA) est utilisée pour la dénomination des différents composés synthétisés. Pour plus de lisibilité et pour permettre la comparaison des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C des différents composés, la numérotation des atomes de carbone ne suit pas nécessairement la nomenclature UIPAC.

II. Matériel

A. Réactifs de départ et solvants

Réactifs utilisés pour la synthèse

Les réactifs sont disponibles commercialement auprès d'Acros, Aldrich ou Alfa Aesar. Sauf indication contraire, ils sont utilisés sans autre purification. Toutes les réactions sensibles à l'air ou à l'humidité ont été effectuées avec des solvants anhydres et sous atmosphère d'argon. Les solvants ont été dégazés, si nécessaire, par plusieurs purges vide/argon avant leur utilisation. Les solvants sont fournis par SDS. Le THF est continuellement distillé sur sodium et benzophénone sous atmosphère d'azote. Le dichlorométhane a été distillé sur P_2O_5. L'acétate d'éthyle est distillé pour les purifications.

Réactifs et matériels utilisés pour le criblage

Les réactifs sont disponibles commercialement auprès d'Aldrich sauf pour :
- Acide Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoique : NeoMPS
- Kit de marquage par Cy5 (Q15108) : Cy5 monofunctional reactive dye to label 1.0 mg antibody or other protein : GE Healthcare
- ThyA et ThyX : fournies par l'équipe de Hannu Myllykallio[282]
- Endogline : Recombinant human endogline (Ref : 1097-EN/CF) de R&D Systems
DyLight 649 NHS Ester, 1mg (46415) : ThermoScientific
- Endogline marquée Cy5 : fournie par l'équipe de Virginie Escriou, marquée par Céline Largeau[283]
- Vpr marquée par Alexa DyLight 649 : fournie par l'équipe de Serge Bouaziz[284]

Les lames utilisées pour la mise au point de la fonctionnalisation sont des lames ESCO 75x25mm prénettoyées et bords rodés et les lames utilisées pour les différents criblages sont des lames GAPSII de Corning (Aldrich). Les cuves utilisées pour l'incubation des lames avec la protéine sont des cuves QuadriPerm (VWR).

B. Appareillages

[282] Institut de génétique et de microbiologie (IGM) UMR 8621 - Bâtiments 400 et 409 Université Paris-Sud 11 91405 ORSAY Cedex

[283] UPCGI UMR8151/U1022– Faculté de pharmacie Paris Descartes, 4 avenue de l'observatoire 75270 PARIS Cedex 06

[284] Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques UMR 8015 CNRS – Faculté de pharmacie Paris Descartes, 4 avenue de l'observatoire 75270PARIS Cedex 06

Micro-onde

L'appareil micro-onde est un Discover couplé à un Explorer 48-positions CEM. Il possède 4 racks de 12 (pour des tubes de 10 mL) ou 6 (pour des tubes de 35 mL) positions. Il peut atteindre une pression de 20 bars et une puissance de 300W. Il est doté d'une agitation magnétique et d'un refroidisseur relié à l'air comprimé.

Microdéposeur

Le microdéposeur est un *Q*Array^{mini} GenePix. Il permet de créer à la surface des lames des spots de 50 à 500 mm de diamètre à partir de solution de concentration de l'ordre du millimolaire.

Scanner

Le scanner est un GenePix Personnal 4100A. Il possède des lasers émettant à 532 nm et 635 nm.

Spectrophotomètre UV-Visible : Cary 100 Scan - Waters

Centrigeuse : Array It – Microarray High Speed Centrifuge

Agitateur orbitalaire : Polymax 1040 – Heidolph

Spectromètres IRM

- 4,7 T Bruker Biospec situé dans la plate-forme IRM de l'hôpital européen Georges Pompidou
- 7 T Bruker 300WB (wightbore) US propre à notre unité

Relaxomètre : 0,47 T Bruker Minispec situé sur la plate-forme IRM de l'hôpital européen Georges Pompidou

III. Méthodes de purification et d'analyse

A. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La cinétique des réactions est suivie par chromatographie sur couche mince. Elles sont réalisées sur des plaques de gel de silice (Merck 60 F_{254}) sur support aluminium. Les produits ont été élués avec un mélange heptane/acétate d'éthyle ou dichlorométhane/méthanol en proportions variables.
Les produits de migration ont été révélés à l'aide d'une lampe UV (254 nm) et/ou d'un des révélateurs suivants :

- Ninhydrine (200 mg dans 100 mL d'EtOH), avec chauffage
- Acide phosphomolybdique (5 g dans une solution 100 mL d'EtOH/H_2SO_4 95/5), avec chauffage
- Anisaldéhyde pour la révélation spécifique des sucres (dans une solution de 100 mL d'EtOH/H_2SO_4/acide acétique 90/5/5)

B. Chromatographies sur silice

Les chromatographies sur colonne de silice ont été réalisées sous pression d'air comprimé (chromatographie éclair) sur gel de silice 60 Merck (granulométrie 35-70µm).[285]

Les purifications appelées « chromatographies sur cartouche » sont des purifications sur des courtes colonnes de gel de silice 60 Merck (rapport produit/gel 1/5) à l'aide d'un dispositif aspirant le solvant. La colonne est équilibrée à l'heptane puis l'échantillon est déposé en solution dans un minimum de dichlorométhane. La colonne est éluée par dix fractions d'un mélange heptane/acétate d'éthyle, sauf mention particulière, d'un volume est égal au volume de silice. Pour chaque fraction, la quantité d'acétate d'éthyle est augmentée de 10 %, afin de passer de 100 % d'heptane à 100 % d'acétate d'éthyle.

Les chromatographies en phase inverse sont effectuées sur de courtes colonnes en phase inverse Supelco (Supelclean C8 phase inverse) à l'aide d'un dispositif aspirant le solvant. La colonne est équilibrée à l'eau puis éluée par des fractions d'un mélange en gradient H_2O/CH_3CN/MeOH. Ces colonnes sont ensuite régénérées par le passage de MeOH (volume égal à 10 volumes de silice).

Les chromatographies en phase fluorée sont effectuées sur de courtes colonnes FluoroPlash SPE 5g (Fluorous ®) à l'aide d'un dispositif aspirant le solvant. La colonne est équilibrée par de l'eau puis éluée par un mélange MeOH/H_2O (2/8) pour faire passer les produits organiques puis avec du MeOH sec pour récupérer les produits fluorés.

Purification HPLC

Elles sont réalisées sur un appareil WATERS LC 4000 équipé d'un détecteur à barrettes de diodes Waters 996, avec comme colonne analytique Econosphère C18 5U (l = 250 mm, d.i. = 4,6 mm). Les éluants sont des systèmes constitués de H_2O/TFA 0,1 %, CH_3CN/TFA 0,1 % et de MeOH.

C. Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres RMN sont enregistrés sur un spectromètre Advance DRX Bruker, à 300,13 MHz pour le ^{1}H et 75, 47 MHz pour le ^{13}C, découplé du proton. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm), par rapport au tétraméthylsilane (TMS). La multiplicité des signaux est exprimée comme suit : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), qt (quintuplet), m (multiplet ou massif), dd (doublet de doublet), dt (doublet de triplet). Les constantes de couplage *J* sont exprimées en Hertz (Hz).

N.B. : Comme nous observons, pour la plupart des composés décrits, différents isomères, en RMN, ils sont notés 1a, 1b par exemple.

[285] Still W. C., kahn M., Mitra A. **(1978)** Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *J. Org. Chem., 43, 14*, 2923-2925

D. Point de fusion

Ils sont mesurés à l'aide d'un microscope DRP Cogit équipé d'une plateforme thermostatée (thermostat Reichert) ou d'un banc Köfler. Ils sont exprimés en degrés centigrades.

E. Analyses LC-MS

Les analyses sont effectuées sur un appareil SHIMADZU LCSM-2010 A, équipé d'un détecteur UV à barrettes de diodes SPD-M10 A (lampe D_2&W, balayage de 190 à 600nm), d'un détecteur de masse LCSM-2010 A (ESI) et d'un détecteur à diffusion de lumière ELSD-LT. L'unique colonne utilisée est une colonne analytique Sunfire de Waters (C8, phase inverse, l = 53 mm, d.i. = 7 mm). Les solvants utilisés sont de qualité HPLC et dégazés aux ultrasons pendant 20 min. Les éluants sont H_2O/HCOOH 0,1 % et CH_3CN/HCOOH 0,1 %. Le signal est enregistré puis analysé sur un ordinateur équipé du logiciel LC-MS Solution®. Les résultats sont exprimés en fonction du rapport m/z.

F. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse à haute résolution (HRMS) ont été réalisés sur un LTQ-orbitrap (Thermo Fischer Scientific) à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI).

G. ICP-MS

Le dosage de chaque élément contenu dans les agents de contraste a réalisé par spectrométrie par torche à plasma sur un spectrométre ICP-MS de type X Series II (Thermo Scientific) au laboratoire de Géologie des Systèmes Volcaniques de l'institut de physique du globe à l'UPMC. La spectrométrie de masse quadripolaire à source plasma est une technique instrumentale d'analyse multi-élémentaire simple, rapide et sensible pour la plupart des éléments de la classification périodique. Elle repose sur la séparation, l'identification et la quantitafication des éléments constitutifs d'un échantillon en fonction de leur rapport m/z et permet les mesures de concentrations des éléments présents à l'état de traces dans des échantillons.

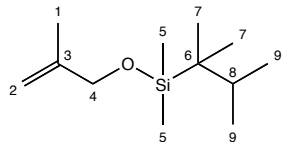
IV. Précautions prises

La manipulation et la synthèse des azotures a été réalisée sur de petites quantités afin de prévenir de tous risques d'explosion et plus particulièrement pour les azotures de faibles poids moléculaires. Lors de la synthèse des composés azotures, l'azoture de sodium est utilisé. Cependant, il faut savoir que ce composé est hautement dangereux car très explosif (ne pas évaporer à sec) mais aussi toxique (toxicité identique à celle du cyanure) !!!

V. Modes opératoires et analyses

Chimiothèque de composés fluorés hautement diversifiés

(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthyl[(2-méthylprop-2-èn-1-yl)oxy]silane **(2)**



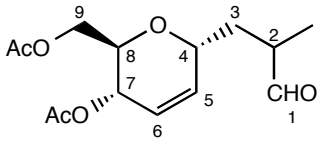
$C_9H_{20}OSi$ - $M = 214{,}43\ g.mol^{-1}$

On ajoute successivement dans un réacteur de micro-onde le chlorure de thexyldiméthylsilyle (6,2 g, 35 mmol), l'imidazole (4,8 g, 70 mmol) le tout sous atmosphère inerte. On dissout l'imidazole avec un peu de DMF (3 mL). On additionne ensuite le 2-méthyl-2-propèn-1-ol **1** (2,9 mL, 35 mmol). Le milieu réactionnel est irradié pendant 5 min à 60°C puis pendant 45 min à 120°C. A la fin de l'irradiation, la solution est diluée avec du DMF, puis extraite avec de l'hexane. La phase hexane est lavée (H_2O) puis séchée ($MgSO_4$) et évaporée. Le liquide brut est purifié par cartouche de silice pour conduire à l'alcool protégé **2** sous forme d'un liquide incolore avec un rendement de 80 % (6 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.1 (s, 6H, H_5), 0.88 (s, 6H, H_7), 0.90 (s, 3H, H_9), 0.92 (s, 3H, H_9), 1.64 (m, 1H, H_8), 1.70 (s, 3H, H_3), 4.02 (s, 2H, H_4), 4.80 (s, 1H, H_2), 4.99 (s, 1H, H_1)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.41 (C_5), 18.56 (C_6), 18.9 (C_1), 20.38 (C_9), 34.28 (C_8), 66.72 (C_4), 109.17 (C_2), 149.9 (C_3)

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-(2-méthyl-3-oxopropyl)-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(4)**



$C_{14}H_{20}O_6$ - M = 284,3 g.mol^{-1}

Protocole sous activation MW catalysé par $ZnBr_2$

On introduit du tri-O-acétyl-D-glucal **3** (0,817 g, 3 mmol), l'éther allylique silylé **2** (0,772 g, 3,6 mmol), du 1,2-dichloroéthane (6 mL) et du bromure de zinc anhydre (0,40 g, 1,8 mmol) dans un réacteur. Le réacteur est placé au micro-onde pour être chauffé pendant 7 minutes à 100°C et sous agitation forte. Le résidu est dissous dans de l'éther, lavé (solution saturée de Na_2HPO_4). La phase aqueuse est ensuite extraite avec de l'éther (x3). La phase organique est lavée successivement avec une solution saturée de Na_2CO_3 et avec une solution saturée de NaCl, séchée ($MgSO_4$) puis concentrée. Le produit obtenu est ensuite purifié sur gel de silice par un gradient d'éluant : heptane/acétate d'éthyle. Le C-glycoside **4** est obtenu sous forme d'une huile de couleur jaune pâle avec un rendement de 80 %.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.1 (d, 1,8H, *J* = 7.1 Hz, CH_3-C_2, (S)), 1.12 (d, 1,2H, *J* = 7.3 Hz, CH_3-C_2, (R)), 1.36 (ddd, 0,6H, *J* = 3.13, 7.32 et 14.56 Hz, H_3(S)), 1.75 (ddd, 0,4H, *J* = 3.7, 7.75 et 14.6 Hz, H_3(R)), 1.85 (ddd, 0,4H, *J* = 3.7, 7.75, 14.6 Hz, H_3(S)), 1.85 (ddd, 0,4H, *J* = 3.7, 7.75, et 14.6 Hz, H_3(R)), 2.02 et 2.03 (2s, 6H, MeCOO), 2.12 (ddd, 1H, *J* = 6.2, 10.75 et 14.56 Hz, H_3(S)), 2.6 (m, 1H, H_2), 3.85 (ddd, 1H, *J* = 3.4, 6.45 et 6.45 Hz, H_8), 4.05 (dd, 1H, *J* = 3.4 et 12 Hz, H_9), 4.15 (dd, 1H, *J* = 6.45 et 12 Hz, H_9), 4.3 (m, 1H, H_4), 5.1 (m, 1H, H_7), 5.75 (dd, 1H, *J* = 2.2 et 10.3 Hz, H_6), 5.82 (dd, 1H, *J* = 1.2 et 10.3 Hz , $H_{5)}$, 9.7 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H_1)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 13.64 (CH_3-C_2), 20.75 et 21.07 (*Me*COO), 33.79 (C-$_3$), 42.95 et 43.78 (C-$_2$), 62.59 (C_9), 64.83 (C_7), 69.16 (C_8), 69.49 et 69.69 (C_4), 123.76 et 123.78 (C_6), 132.78 et 132.99 (C_5), 170.35 et 170.73 (Me*CO*), 204.06 (C_1)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 7,91 min, m/z = 307 $[M+Na]^+$

Protocole sous activation MW catalysé par les complexes de lanthanides

Dans un réacteur micro-onde, sont introduits successivement l'éther allylique silylé **2** (0,051g, 0,24 mmol), le tri-O-acétyl-D-glucal **3** (0,054g, 0,2 mmol), le catalyseur puis le dichloroéthane (0,5 mL). Le tube est agitée sous azote pendant quelques minutes puis irradié sous activation micro-onde pendant 7 minutes à 100°C. Après évaporation du dichloroéthane, l'huile marron obtenue est diluée dans l'éther puis lavée successivement par la soude (1 M), un mélange 50/50 de solutions saturées en Na_2HPO_4 et en $NaHSO_4$. Ensuite les phases aqueuses rassemblées sont extraites par deux fois à l'éther. Enfin les phases organiques obtenues sont rassemblées, lavées par des solutions saturés de Na_2CO_3 puis de NaCl, séchées ($MgSO_4$), filtrées et évaporées. L'huile jaune foncée obtenue est purifiée sur cartouche de silice. Le produit **4** est obtenu sous forme d'une huile jaune claire.

Protocole à TA catalysé par le triflate de scandium

Dans un ballon sous argon à température ambiante, sont introduits successivement l'éther allylique silylé **2** (1,2 éq.), le tri-O-acétyl-D-glucal **3** (0,1–5 mmol), le triflate de scandium (0,05 – 1 éq.) puis le dichloroéthane (1 mL). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation jusqu'à disparition complète du tri-O-acétyl-D-glucal. Après évaporation du dichloroéthane, l'huile marron obtenue est diluée dans l'éther et on ajoute de l'amberlyst A-21 jusqu'à l'obtention d'un pH basique. Après filtration, le filtrat éthéré est lavé successivement par des solutions saturées de Na_2CO_3 puis de NaCl. La phase organique est séchée ($MgSO_4$), filtrée et évaporée. L'huile jaune obtenue est purifiée sur cartouche de silice. Le produit **4** est obtenu sous la forme d'une huile jaune claire.

Protocole à 0°C catalysé par le triflate de scandium

Dans un ballon sous argon placé dans un bain de glace, sont introduits successivement l'éther allylique silylé **2** (1,2 éq.), le tri-O-acétyl-D-glucal **3** (0,1 mol), le triflate de scandium (0,4 – 1 éq.) puis le dichloroéthane (1 mL). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation jusqu'à disparition complète du tri-O-acétyl-D-glucal. Après évaporation du dichloroéthane, l'huile marron obtenue est diluée dans l'éther et on ajoute de l'amberlyst A-21 jusqu'à l'obtention d'un pH basique. Après filtration, le filtrat éthéré est lavé successivement par des solutions saturées de Na_2CO_3 puis de NaCl. La phase organique est séchée ($MgSO_4$), filtrée et évaporée. L'huile jaune obtenue est purifiée sur cartouche de silice. Le produit **4** est obtenu sous la forme d'une huile jaune claire.

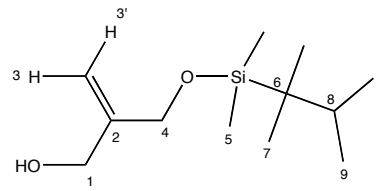
Protocole à -40°C catalysé par le triflate de scandium

Dans un ballon sous argon placé dans un bain à -40°C (acétonitrile/ azote liquide), sont introduits successivement l'éther allylique silylé **2** (0,129 g, 0,6 mmol), le tri-O-acétyl-D-glucal **3** (0,136g, 0,5 mmol), le triflate de scandium (0,05 – 0,1 éq.) puis le dichloroéthane (1 mL). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation jusqu'à disparition complète du tri-O-acétyl-D-glucal. Après évaporation du dichloroéthane, l'huile marron obtenue est diluée dans l'éther et on ajoute de l'amberlyst A-21 jusqu'à l'obtention d'un pH basique. Après filtration, le filtrat éthéré est lavé successivement par des solutions saturées de Na_2CO_3 puis de NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée. L'huile jaune obtenue est purifiée sur cartouche de silice. Le produit **4** est obtenu sous la forme d'une huile jaune claire.

Protocole à -78°C catalysé par le triflate de scandium

Dans un ballon sous argon placé dans un bain à -78°C (acétone/ azote liquide), sont introduits successivement l'éther allylique silylé **2** (0,129 g, 0,6 mmol), le tri-O-acétyl-D-glucal **3** (0,136g, 0,5mmol), le triflate de scandium (0,05 – 0,1 éq.) puis le dichloroéthane (1 mL). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation jusqu'à disparition complète du triacétyl-D-glucal. Après évaporation du dichloroéthane, l'huile marron obtenue est diluée dans l'éther et on ajoute de l'amberlyst A-21 jusqu'à l'obtention d'un pH basique. Après filtration, le filtrat éthéré est lavé successivement par des solutions saturées de Na_2CO_3 puis de NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée. L'huile jaune obtenue est purifiée sur cartouche de silice. Le produit **4** est obtenu sous la forme d'une huile jaune claire.

2-({[(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilyl]oxy}méthyl)prop-2-èn-1-ol **(7)**



$C_{12}H_{26}O_2Si$ - $M = 230,17\ g.mol^{-1}$

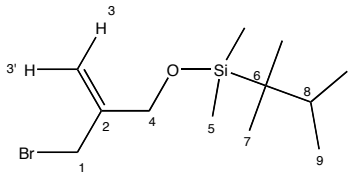
A une solution d'hydrure de sodium (0,3 g, 12,5 mmol) dans du THF fraichement distillé (25 mL), est ajouté le 2-méthylène-propane-1,3-diol **6** (1,10 g, 12,5 mmol) à TA. Le milieu réactionnel est agité pendant 45 min jusqu'à ce qu'il se forme une grande quantité de précipité blanc. Le chlorure de thexyldiméthylsilyle (2,23 g, 12,5 mmol) est ensuite ajouté et une agitation vigoureuse est maintenue pendant 45 min. Le mélange est versé dans de l'éther (17 mL/mmol) puis lavé par une solution à 10 % de K_2CO_3 (5 mL/mmol) et une solution saturée de NaCl (5 mL/mmol). La phase organique est séchée ($MgSO_4$) et concentrée. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice (AcOEt/Heptane : 1/7) pour donner le produit monoprotégé **7** sous forme d'huile jaune avec un rendement de 88 % (2,54 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) -0.12 (s, 6H, H_5), 0.85 (s, 6H, H_7), 0.87 (s, 3H, H_9), 0.90 (s, 3H, $H_{9'}$), 1.64 (m, 1H, H_8), 2.07 (sb, 1H, OH), 4.15 (s, 2H, H_1), 4.21 (s, 2H, H_4), 5.06 (s, 1H, H_3), 5.09 (s, 1H, $H_{3'}$)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.09 (C_5), 18.90 (C_7), 20.68 (C_9), 25.58 (C_6), 34.52 (C_8), 65.05 (C_1), 62.27 (C_4), 111.38 (C_3), 147.89 (C_2)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 10 min ; *m/z* = 231 $[M+H]^+$

{[2-(bromométhyl)prop-2-èn-1-yl]oxy}(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilylane **(8)**



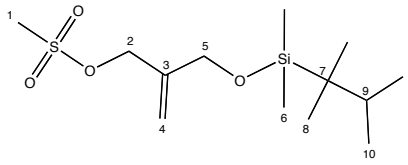
$C_{12}H_{25}BrOSi$ - $M = 293,31\ g.mol^{-1}$

A une solution du diol monoprotégé **7** (0,07 g, 0,304 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (3 mL), est ajoutée sous agitation et à 0°C du tétrabromure de carbone (0,141 g, 0,426 mmol) et de la triphénylphosphine (0,096 g, 0,365 mmol). Le milieu est agité pendant 2 h à TA. Une fois la reaction terminée, de l'acétate d'éthyle (3,9 mL) et une solution saturée de $NaHCO_3$ (1,2 mL) sont ensuite ajoutés à 0°C. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl, puis séchée et évaporée. Le résidu est purifié sur cartouche de silice pour donner le composé bromé **8** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 74 % (66 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.13 (s, 6H, H_5), 0.87 (s, 6H, H_7), 0.88 (s, 3H, H_9), 0.90 (s, 3H, $H_{9'}$), 1.64 (m, 1H, H_8), 2.12 (sb, 1H, OH), 4.01 (s, 2H, H_4), 4.24 (s, 2H, H_1), 5.228 (s, 1H, H_3), 5.235 (s, 1H, $H_{3'}$)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.07 (C_5), 18.97 (C_7), 20.70 (C_9), 25.61 (C_6), 33.37 (C_1), 34.55 (C_8), 63.69 (C_4), 115.20 (C_3), 145.26 (C_2)

Mésylate de 2-({[(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilyl]oxy}méthyl)prop-2-èn-1-yle **(8')**

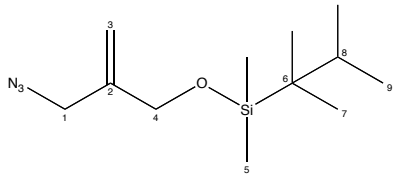


$C_{13}H_{28}O_4SSi$ - $M = 308,51\ g.mol^{-1}$

A une solution du diol monoprotégé **7** (0,069 g, 0,3 mmol) et de DMAP (0,004 g, 0,03 mmol) dans 1 mL de dichlorométhane anhydre sous argon et à 0°C, est ajouté de la triéthylamine (0,033 g, 0,33 mmol). Après 5 min, le chlorure de mésyle (0,033 g, 0,285 mmol) est ajouté. Après de 2h15 d'agitation à TA, la solution est lavée avec une solution saturée de NH_4Cl (3mL/mmol). La phase aqueuse est extraite avec de l'éther. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl, puis séchée ($MgSO_4$) et évaporée. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour donner le produit mésylé **8'** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 18 % (17 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.11 (s, 6H, H_6), 0.86 (s, 6H, H_8), 0.87 (s, 3H, H_{10}), 0.89 (s, 3H, $H_{10'}$), 1.63 (m, 1H, H_9), 3.02 (s, 3H, H_1), 4.18 (s, 2H, H_2), 4.73 (s, 2H, H_5), 5.26 (s, 1H, H_4), 5.34 (s, 1H, $H_{4'}$)

{[2-(azidométhyl)prop-2-èn-1-yl]oxy}(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilane **(9)**



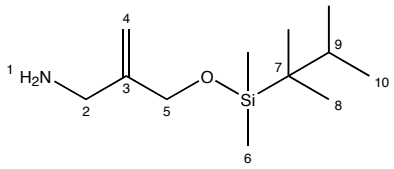
$C_{12}H_{25}N_3OSi$ - $M = 255,43\ g.mol^{-1}$

À une solution du dérivé bromé **8** (0,2 g, 0,682 mmol) dans du DMF (3,4 mL), on ajoute l'azoture de sodium (0,27 g, 4,091 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à 100°C pendant 12 h. On dilue le milieu réactionnel avec de l'eau. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther, séchée sur $MgSO_4$ et concentrée. Le produit **9** est obtenu sans purification sous forme d'une huile jaune orangée avec un rendement de 86 % (150 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.10 (s, 6H, H_5), 0.85 (s, 6H, H_7), 0.87 (s, 3H, H_9), 0.89 (s, 3H, $H_{9'}$), 1.62 (m, 1H, H_8), 3.78 (s, 2H, H_1), 4.13 (s, 2H, H_4), 5.08 (s, 1H, H_3), 5.23 (s, 1H, $H_{3'}$)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.16 (C_5), 18.90 (C_7), 20.54 (C_9), 25.59 (C_6), 34.55 (C_8), 44.33 (C_1), 64.31 (C_4), 113.83 (C_3), 143.24 (C_2)

{[2-(aminométhyl)prop-2-èn-1-yl]oxy}(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilane **(10)**



$C_{12}H_{27}NOSi$ - M = 229,43 g.mol^{-1}

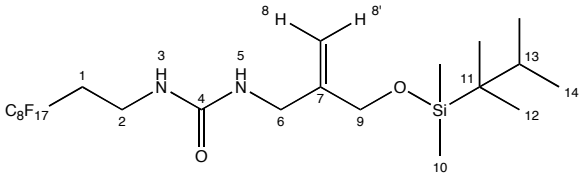
À une solution du dérivé azoture **9** (0,2 g, 0,783 mmol) dans 3,9 mL de THF, est ajouté de la triphénylphosphine (1,03 g, 3,915 mmol), puis chauffée pendant 4 h à 30-40°C. On additionne ensuite 1,2 mL d'eau et on poursuit l'agitation à 40 °C pendant 2 heures. La solution est concentrée sous vide puis l'huile résultante est purifiée sur cartouche de silice pour donner le produit amino **10** sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 68 % (122 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.12 (s, 6H, H_6), 0.86 (s, 6H, H_{10}), 0.87 (s, 3H, H_8), 0.89 (s, 3H, $H_{8'}$), 1.63 (m, 1H, H_9), 1.78 (s br, 2H, H_1), 3.32 (s, 2H, H_2), 4.15 (s, 2H, H_5), 4.99 (s, 1H, H_4), 5.07 (s, 1H , $H_{4'}$)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.47 (C_6), 18.50 (C_8), 20.30 (C_{10}), 25.17 (C_7), 34.12 (C_9), 44.26 (C_2), 64.79 (C_5), 108.47 (C_4), 133.20 (C_3)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3 min ; *m/z* = 230 $[M+H]^+$

1-[2-({[(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilyl]oxy}méthyl)prop-2-èn-1-yl]-3-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecyl)urée **(11)**



$C_{23}H_{31}F_{17}N_2O_2Si$ - M = 718,19 g.mol^{-1}

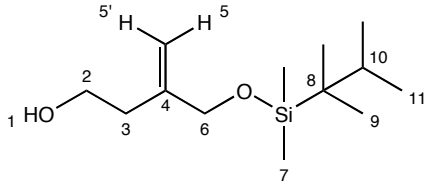
A une solution agitée d'isocyanate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10-Heptadecafluorodecyle (0,235 g, 0,48 mmol) dans 4,8 mL de THF sec, est ajoutée une solution du dérivé amino **10** (0,09 g, 0,394 mmol) et de triéthylamine (0,058 g, 0,576 mmol) dans 2,4 mL de THF sec. Le milieu réactionnel est agité à TA pendant une nuit. Le THF est évaporé sous vide, puis le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour donner l'espaceur fluoré **A-C1** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 54 % (187 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.08 (s, 6H, H_{10}), 0.84 (s, 6H, H_{14}), 0.86 (s, 3H, H_{12}), 0.87 (s, 3H, $H_{12'}$), 1.59 (m, 1H, H_{13}), 2.82 (m, 2H, H_1), 3.48 (m, 2H, H_2), 3.74 (d, 2H, H_6), 4.09 (s, 2H, H_9), 4.96 (s, 1H, H_8), 5.07 (s, 1H , $H_{8'}$), 5.42 (sb, 1H, NH), 5.57 (sb, 1H, NH)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.14 (C_{10}), 18.84 (C_{12}), 20.62 (C_{14}), 25.17 (C_{11}), 30.10 (C_1), 33.12 (C_2), 34.50 (C_{13}), 43.40 (C_6), 64.92 (C_9), 111.56 (C_8), 129.04 (C-F), 132.48 (C-F), 145.03 (C_7), 158.37 (C_4)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 12,43 min ; *m/z* = 719 $[M+H]^+$; 741 $[M+Na]^+$

3-({[(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilyl]oxy}méthyl)but-3-èn-1-ol **(12)**



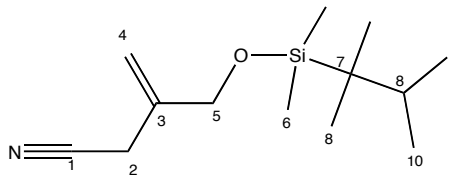
$C_{13}H_{28}O_2Si$ - $M = 244,19\ g.mol^{-1}$

A une solution à 1M de paraformaldéhyde (0,5 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (0,5 mL), est ajoutée une solution à 1M de l'éther allylique silylé **2** (0,107 g, 0,5 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (0,5 mL). On additionne au milieu réactionnel une solution 1M de trifluorométhanesulfonate de scandium (0,246 g, 0,5 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (0,5 mL) à 0°C. La réaction est ramenée à température ambiante graduellement puis agitée 10 h. On quenche la réaction par une solution saturée de $NaHCO_3$. La phase aqueuse est extraite 3 fois avec de l'AcOEt et les phases organiques recombinées sont lavées par une solution saturée de NaCl puis séchées sur $MgSO_4$. Après évaporation, le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour donner l'alcool **12** avec un rendement de 3 % (4 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.12 (s, 6H, H_7), 0.87 (s, 6H, H_9), 0.88 (s, 3H, H_{11}), 0.90 (s, 3H, $H_{11'}$), 1.64 (m, 1H, H_{10}), 2.19 (t, 1H, J = 5,9 Hz, H_1), 2.33 (t, 2H, J = 5.95 Hz, H_3), 3.72 (td, 2H, J = 5.9 Hz, H_2), 4.08 (s, 2H, H_6), 4.93 (s, 1H, H_5), 5.12 (s, 1H, $H_{5'}$)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 10,5 min ; m/z = 245 $[M+H]^+$

3-({[(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilyl]oxy}méthyl)but-3-ènenitrile **(13)**



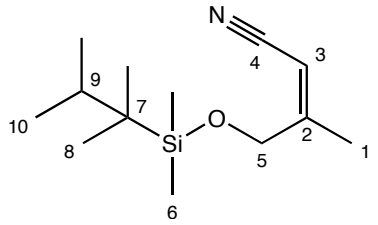
$C_{13}H_{25}NOSi$ - $M = 239,42\ g.mol^{-1}$

A une solution du dérivé bromé **8** (0,252 g, 0,859 mmol) dans de l'acétonitrile anhydre (8,6 mL), est ajouté le cyanure de triméthylsilyle (0,085 g, 0,859 mmol) à 0°C. Puis, une solution de TBAF à 1M dans le THF (0,859 mL, 0,859 mmol) est ajoutée dans le milieu réactionnel doucement à 0°C. Le milieu réactionnel est agité pendant 4 h, puis dilué avec de l'acétate d'éthyle (23 mL). La phase organique est lavée successivement par une solution saturée de $NaHCO_3$ (7 mL) et de NaCl puis séchée sur $MgSO_4$. Après évaporation, le résidu est purifié sur cartouche de silice pour donner le composé nitrile **13** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 75 % (130 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.10 (s, 6H, H_6), 0.84 (s, 6H, H_8), 0.86 (s, 3H, H_{10}), 0.88 (s, 3H, $H_{10'}$), 1.60 (m, 1H, H_9), 3.12 (s, 2H, H_2), 4.11 (s, 2H, H_5), 5.22 (s, 2H, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.50 (C_6), 18.52 (C_8), 20.32 et 20.44 (C_{10}), 21.33 (C_2), 34.24 (C_9), 63.81 (C_5), 108.68 (C_4), 113.87 (C_1), 145.26 (C_3)

4{[(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilyl]oxy}-3-méthylbut-2-ènenitrile **(13')**

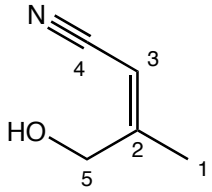


$C_{13}H_{25}NOSi$ - $M = 239,41\ g.mol^{-1}$

À une solution de dérivé bromé **8** (0,138 g, 0,47 mmol) dans de l'acétonitrile anhydre (4,7 mL), est ajouté du cyanure de triméthylsilyle (0,047 g, 0,47 mmol). Puis, une solution de TBAF à 1M dans le THF (0,123 g, 0,47 mmol) est ajouté au milieu réactionnel doucement à TA. Le milieu réactionnel est agité pendant 20 min. Après évaporation, le résidu est dilué avec de l'acétate d'éthyle (13 mL) et une solution saturée de $NaHCO_3$ (4 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl puis séchée sur $MgSO_4$. Après évaporation, le résidu est purifié sur cartouche de silice pour donner le produit **13'** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 4 % (5 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.09 (s, 6H, H_6), 0.85 (s, 6H, H_8), 0.87 (s, 3H, H_{10}), 0.89 (s, 3H, $H_{10'}$), 1.63 (m, 1H, H_9), 1.96 (s, 3H, H_1), 5.06 (s, 2H, H_5), 5.53 (s, 1H, H_3)

4-hydroxy-3-méthylbut-2-ènenitrile **(13'')**



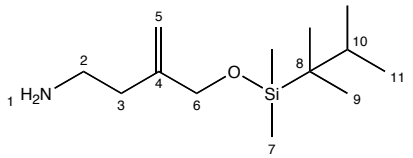
C_5H_7NO - $M = 97,11\ g.mol^{-1}$

À une solution du dérivé bromé **8** (0,138 g, 0,47 mmol) dans de l'acétonitrile anhydre (4,7 mL), est ajouté du cyanure de triméthylsilyle (0,047 g, 0,47 mmol). Puis, une solution de TBAF à 1M dans le THF (0,123 g, 0,47 mmol) est ajoutée au milieu réactionnel doucement à TA. Le milieu réactionnel est agité pendant 20 min. Après évaporation, le résidu est dilué avec de l'acétate d'éthyle (12,7 mL) et une solution saturée de $NaHCO_3$ (3,764 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl puis séchée sur $MgSO_4$. Après évaporation, le résidu est purifié sur cartouche de silice pour donner le produit **13''** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 59 % (27 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.99 (s, 3H, H_1), 2.43 (s, 1H, OH), 4.18 (s, 2H, H_5), 5.55 (s, 1H, H_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 17,97 (C_1), 65,62 (C_5), 93,90(C_3), 117,56 (C_4), 163,85 (C_2)

(4-amino-2-méthylidènebutoxy)(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilane **(14)**



$C_{13}H_{29}NOSi$ - $M = 243,46\ g.mol^{-1}$

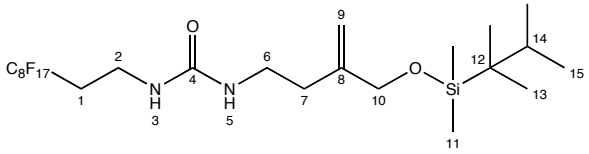
A une solution de $LiAlH_4$ (0,026 g, 0,672 mmol) dans du THF fraîchement distillé (1 mL), on ajoute du chlorure d'aluminum (0,09 g, 0,672 mmol) lentement à 0°C et le milieu est agité pendant 15 min. Le dérivé nitrile **13** (0,134 g, 0,56 mmol) dilué dans du THF (1,4 mL) est ajouté au milieu réactionnel puis la réaction est agitée pendant 3 h à 0°C. Une fois la réaction achevée, le solvant est évaporé et le résidu est dilué avec de l'acétate d'éthyle. Une solution aqueuse à 10 % de NaOH (4 mL/mmol) est ajoutée pour quencher la réaction. La phase organique est lavée successivement avec une solution saturée de $NaHCO_3$, de NaCl et séchée ($MgSO_4$). La phase organique est filtrée et évaporée pour donner le composé amino **14** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 71 % (97 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.10 (s, 6H, H_7), 0.84 (s, 6H, H_9), 0.86 (s, 3H, H_{11}), 0.88 (s, 3H, $H_{11'}$), 1.61 (m, 1H, H_{10}), 2.48 (t, 2H, J = 7,05 Hz, H_3), 3.12 (m, 2H, H_2), 4.05 (s, 2H, H_6), 4.93 (s, 1H, H_4), 5.15 (s, 1H, $H_{4'}$)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -2.71 (C_7), 18.92 (C_{11}), 20.72 (C_9), 25.65 (C_8), 31.93 (C_2), 34.49 (C_{10}), 38.97 (C_3), 66.00 (C_6), 112.75 (C_5), 144.44 (C_4)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,5-7,5 min ; *m/z* = 244 $[M+H]^+$

3-[3-({[(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilyl]oxy}méthyl)but-2-èn-1-yl]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadécafluorodécyl)urée **(15)**



$C_{24}H_{33}F_{17}N_2O_2Si$ - $M = 732,59\ g.\ mol^{-1}$

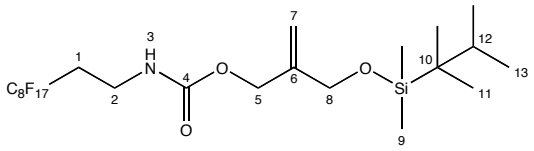
A une solution sous argon d'isocayante de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10-heptadécafluorodécyle (0,21 g, 0,43 mmol) dans du THF fraichement distillé (4,3 mL), est ajoutée une solution du composé amino **14** (0,086 g, 0,353 mmol) et de triéthylamine (0,052 g, 0,516 mmol) dans 2,15 mL de THF fraichement distillé. Le milieu réactionnel est agité pendant 16 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour donner l'espaceur fluoré **A-C2** sous forme de solide jaune avec un rendement de 78 % (203 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.07 (s, 6H, H_{11}), 0.82 (s, 6H, H_{13}), 0.83 (s, 3H, H_{15}), 0.85 (s, 3H, $H_{15'}$), 1.58 (m, 1H, H_{14}), 2.16 (t, 2H, J = 6,7 Hz, H_7), 2.28 (m, 2H, H_1), 3.24 (t, 2H, J = 6,7 Hz, H_6), 3.45 (t, 2H, J = 6,4 Hz, H_2), 4.01 (s, 2H, H_{10}), 4.82 (s, 1H, H_9), 5.06 (s, 1H, $H_{9'}$)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.18 (C_{11}), 18.78 (C_{15}), 20.59 (C_{13}), 25.65 (C_{12}), 30.04 (C_2), 32.78 (C_7), 33.51 (C_1), 34.44 (C_{14}), 38.66 (C_6), 66.06 (C_{10}), 111.32 (C_9), 144.44 (C_8)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 13 min ; *m/z* = 733 $[M+H]^+$, 755 $[M+Na]^+$

N-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadécafluorodécyl)carbamate de 2-({[(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilyl]oxy}méthyl)prop-2-èn-1-yle **(16)**



$C_{23}H_{30}F_{17}NO_3Si$ - $M = 719{,}55\ g.mol^{-1}$

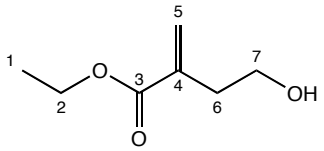
À une solution sous argon d'isocyanate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10-heptadécafluorodécyle (0,293 g, 0,6 mmol) dans du THF fraîchement distillé (6 mL), est ajoutée une solution du diol monoprotégé **7** (0,113 g, 0,492 mmol) et de triéthylamine (0,073 g, 0,72 mmol) dans 3 mL de THF fraîchement distillé. Le milieu réactionnel est agité pendant 16 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour donner l'espaceur fluoré **B-C1** sous forme de solide blanc avec un rendement de 38 % (135 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.154 (s, 6H, H_9), 0.85 (s, 6H, H_{11}), 0.87 (s, 3H, H_{13}), 0.88 (s, 3H, $H_{13'}$), 1.61 (m, 1H, H_{12}), 2.35 (m, 2H, H_1), 3.52 (t, 2H, J = 6,7 Hz, H_2), 4.12 (s, 2H, H_8), 4.60 (s, 2H, H_5), 5.09 (s, 1H, $H_{7'}$), 5.21 (s, 1H, H_7)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.17 (C_9), 18.87 (C_{11}), 20.64 (C_{13}), 25.58 (C_{10}), 31.41 (C_2), 31.63 (C_7), 33.88 (C_1), 34.52 (C_{12}), 38.66 (C_6), 63.94 (C_8), 65.86 (C_5), 112.9 (C_7), 144.44 (C_4)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 13,65 min ; m/z = 720 $[M+H]^+$

2-(2-hydroxyéthyl)propenoate d'éthyle **(18)**



$C_7H_{12}O_3$ - $M = 144{,}08\ g.mol^{-1}$

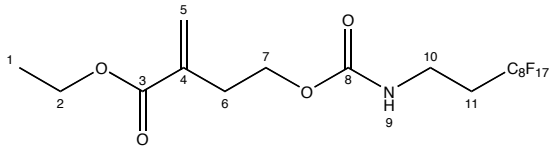
À une solution sous argon de 2-(bromométhyl)acrylate d'éthyle (0,1 g, 0,521 mmol) dans un mélange d'eau (0,5 mL) et d'éthanol (0,5 mL), est ajouté du formaldéhyde à 37 % dans l'eau (0,028 g, 0,938 mmol) et de l'indium (0,066 g, 0,573 mmol). Le milieu réactionnel est agité à TA pendant 22 h, puis dilué par une solution de HCl à 1M (5 mL/mmol). Le milieu est à nouveau agité pendant 15 min, puis le produit est extrait avec de l'AcOEt. La phase organique est lavée successivement par une solution saturée de $NaHCO_3$ et de NaCl, puis séchée ($MgSO_4$) et évaporée. Le résidu brut est purifié sur cartouche de silice pour donner l'alcool **18** sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 92 % (64 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.32 (t, J = 7,13 Hz, 3H, H_1), 2.59 (t, J = 6,17 Hz, 2H, H_6), 3.72 (t, J = 6,10 Hz, 2H, H_7), 4.23 (q, J = 7,13 Hz, 2H, H_2), 5.67 (s, 1H, H_5), 6.25 (s, 1H, $H_{5'}$)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 14.19 (C_1), 35.57 (C_6), 60.10 (C_7), 61.62 (C_2), 127.18 (C_5), 137.62 (C_4), 167.48 (C_3)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 2,5 min ; m/z = 145 $[M+H]^+$

4-{[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10-heptadécafluorodécyl)carbamoyl]oxy}-2-méthylidènebutanoate d'éthyle **(19)**



$C_{18}H_{16}F_{17}NO_4$ - $M = 633{,}30\ g.mol^{-1}$

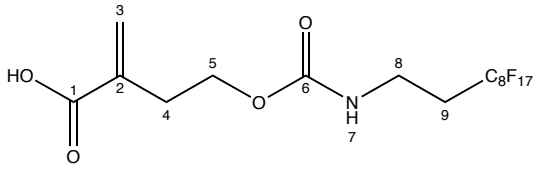
À une solution d'isocyanate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10-heptadécafluorodécyle (0,406 g, 0,83 mmol) dans du THF fraîchement distillé (8,3 mL) sous argon, est ajoutée une solution de 2-(2-hydroxyéthyl)propènoate d'éthyle **18** (0,098 g, 0,681 mmol) et de triéthylamine (0,10 g, 0,1 mmol) dans 4,15 mL de THF. Le milieu réactionnel est agité à TA pendant 3 jours. Le solvant est évaporé et le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour donner le composé fluoré **19** sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 28 % (124 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.30 (t, *J* = 7,15 Hz, 3H, H_1), 2.35 (m, 2H, H_{11}), 2.63 (t, *J* = 6,53 Hz, 2H, H_6), 3.51 (q, J = 6,43 Hz, 2H, H_{10}), 4.18-4.25 (m, 4H, H_2, H_7), 5.61 (s, 1H, $H_{5'}$), 6.24 (s, 1H, H_5)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 14.19 (C_1), 31.17 (C_{11}), 32.17 (C_6), 33.84 (C_{10}), 61.26 (C_2), 63.76 (C_7), 127.39 (C_5), 137.62 (C_4), 167.48 (C_3)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 11,22 min ; *m/z* = 634 $[M+H]^+$; 656 $[M+Na]^+$

Acide 4-{[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10-heptadecafluorodecyl)carbamoyl]oxy}-2-méthylidènebutanoique **(21)**



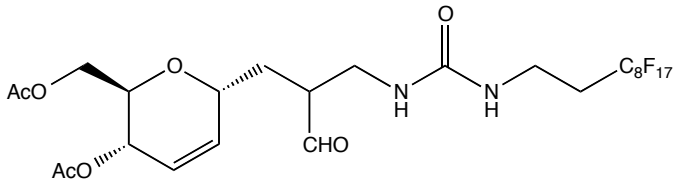
$C_{16}H_{12}F_{17}NO_4$ - $M = 605{,}24\ g.mol^{-1}$

Le composé **19** (0,046 g, 0,073 mmol) est dissous dans du THF anhydre (1 mL) à 0°C. Une solution de NaOH à 2N (0,200 mL) est ajoutée lentement. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 3 heures et la réaction est suivie par CCM. Une fois la réaction terminée, le milieu est acidifiée avec de l'Amberlite IR-120 jusqu'à pH=3, puis la résine est filtrée et lavée avec du MeOH anhydre. Le filtrat obtenu est évaporé et repris plusieurs fois si nécessaire avec du MeOH pour éliminer toute trace d'eau. Le produit **21** n'est obtenu que sous forme de traces et sous forme d'un solide jaune.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 2.35 (m, 2H, H_9), 2.63 (m, 2H, H_4), 3.51 (m, 2H, H_8), 4.24 (m, 2H, H_5), 5.73 (s, 1H, $H_{3'}$), 6.35 (s, 1H, H_3)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 10,5 min ; *m/z* = 606 $[M+H]^+$; 628 $[M+Na]^+$

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-[2-({[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecyl)carbamoyl]amino}méthyl)-3-oxopropyl]-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(23)**

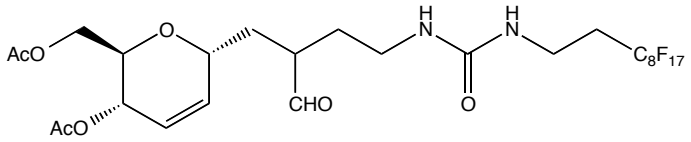


$C_{25}H_{25}F_{17}N_2O_7$ - M = 788,14 g.mol^{-1}

Dans un réacteur micro-onde, sont introduits successivement le tri-O-acétyl-D-glucal **3** (0,023 g, 0,085 mmol), l'espaceur allylique **11** (0,061 g, 0,085 mmol) dans une solution de 0,1 mL de 1,2-dichloroéthane et de 0,1 mL de HFE-7100, puis est introduit le bromure de zinc (0,006 g, 0,029 mmol). Le tube est mis sous agitation puis scellé et chauffé sous activation micro-onde pendant 7 minutes à 100° C (300W max). Le produit est observé par LC-MS avec un rendement de 5 %, le produit brut n'a pas été purifié

LC-MS : ELSD 5 %, R_t = 10,5 min ; *m/z* = 789 $[M+H]^+$; 812 $[M+Na]^+$

Acétate de [3-(acétyloxy)-6-[2-(2-{[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecyl)carbamoyl]amino}éthyl)-3-oxopropyl]-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(24)**

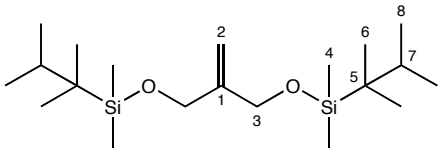


$C_{26}H_{27}F_{17}N_2O_7$ – M = 802,15 g.mol-1

Dans un réacteur micro-onde, sont introduits successivement le tri-O-acétyl-D-glucal **3** (0,023 g, 0,085 mmol), l'espaceur allylique **15** (0,062 g, 0,085 mmol) dans 0,2 mL de 1,2-dichloroéthane et 0,1 mL de HFE, puis est introduit le bromure de zinc (0,011 g, 0,051 mmol). Le tube est mis sous agitation puis scellé et chauffé sous activation micro-onde pendant 7 minutes à 100° C (300W max). Le produit attendu a été observé en LC-MS. Le mileu réactionnel est dilué avec de l'AcOEt, puis lavé successivement avec une solution saturée de $NaHPO_4$, une solution saturée de $NaHCO_3$ et une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et concentrée pour donner une huile orange (68 mg) contenant 5 % de produit attendu.

LC-MS : ELSD 5 %, R_t = 10,5 min ; *m/z* = 803 $[M+H]^+$; 826 $[M+Na]^+$

2,3,3,4,4,10,10,11,11,12-decaméthyl-7-méthylidène-5,9-dioxa-4,10-disilatridecane **(26')**



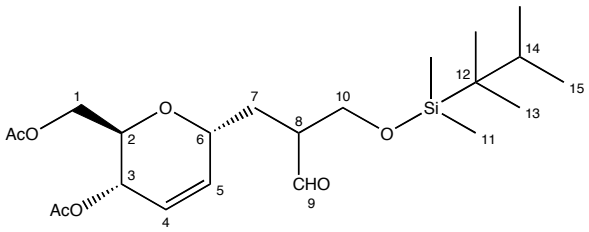
$C_{20}H_{44}O_2Si_2$ - $M = 372,73\ g.mol^{-1}$

On ajoute successivement le 2-méthylène-propane-1,3-diol (0,881 g, 10 mmol), le chlorure de thexyldiméthylsilyle (3,933 g, 22 mmol) dans 10 mL de DMF dans un réacteur MW muni d'un barreau magnétique. Puis on ajoute de l'imidazole (2,859 g, 42 mmol) le tout sous atmosphère inerte. Après dissolution complète des réactifs, le milieu est irradié pendant 5 min à 60°C puis pendant 45 min à 120°C. La solution est diluée avec de la DMF, puis extraite avec de l'hexane. La phase hexane est lavée avec de l'eau, séchée et évaporée. Le produit di-protégé **26'** est obtenu sous la forme d'un liquide incolore avec un rendement quantitatif (4,13 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.10 (s, 12H, H_4), 0.86 (s, 12H, H_8), 0.88 (s, 6H, H_6), 0.90 (s, 6H, $H_{6'}$), 1.59 (m, 2H, H_7), 4.14 (s, 4H, H_3), 5.07 (s, 2H, H_2)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.06 (C_4), 18.93 (C_8), 20.70 (C_6), 25.58 (C_5), 34.55 (C_7), 64.17 (C_3), 109.23 (C_1), 148.42 (C_2)

Acétate de [(2R,3S,6R)-6-[2-({2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilyl]oxy}méthyl)-3-oxopropyl]-3-(acétyloxy)-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(27')**



$C_{22}H_{38}O_7Si$ - $M = 442,6\ g.mol^{-1}$

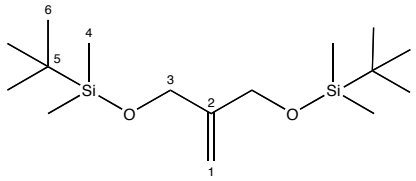
Dans un réacteur micro-onde, on introduit successivement le tri-O-acétyl-D-glucal **3** (0,054 g, 0,2 mmol), le diol protégé **26'** (0,089 g, 0,24 mmol) dans 1 mL de 1,2-dichloroéthane puis le bromure de zinc (0,027 g, 0,12 mmol). Le tube est mis sous agitation sous atmosphère d'argon puis la réaction est activée sous MW pendant 7 minutes à 100° C. A la fin de la réaction, on élimine le solvant (dichloroéthane) à l'évaporateur rotatif. Puis on additionne au milieu réactionnel de l'éther et un mélange de solution saturée de $NaHSO_4$ et de Na_2HPO_4. La phase organique est séparée et la phase aqueuse est extraite à l'éther. Les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution saturée de Na_2CO_3, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées. Le produit est purifié sur cartouche de silice (éluant : heptane / AcOEt). On obtient le C-glycoside **27'** sous forme d'une huile orange avec un rendement de 62 % (55 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.06 (s, 6H, H_{11}), 0.79 (s, 6H, H_{13}), 0.82 (s, 3H, H_{15}), 0.84 (s, 3H, $H_{15'}$), 1.56 (m, 1H, H_{14}), 1.63-1.70 (m, 1H, H_7(S), H_7(R)), 1.75 (m, 0,4H, H_7(R)), 2.06 (1s, 6H, MeCOO), 2.13 (ddd, 0,6H, *J* = 6.4, 10.72 et 14.9 Hz, H_7(S)), 2.69 (m, 1H, H_8), 3.85 (m, 2H, H_{10}), 3.92 (m, 1H, H_2), 4.07 (dd, 1H, *J* = 3.11 et 11.88 Hz, H_1), 4.19 (dd, 1H, *J* = 5.88 et 11.89 Hz, H_1), 4.29 (m, 1H, H_6), 5.09 (m, 1H, H_3), 5.77 (m, 1H, H_4), 5.86 (m, 1H, H_5), 9.75 (d, 1H, *J* = 8.74 Hz, H_9)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.31 (C_{11}), 18.88 (C_{15}), 20.62 (C_{13}), 21.20 et 21.49 (*Me*COO), 28.85 (C_7), 29.75 (C_{12}), 34.58 (C_{14}), 51.02 et 51.63 (C_8), 61.55 et 62.42 (C_{10}), 63.00 et 63.10 (C_1), 65.22 et 65.27 (C_3), 69.70 et 69.81 (C_6), 70.05 et 70.45 (C_2), 123.98 et 124.45 (C_4), 133.10 (C_5), 171.05 (Me*CO*), 204.42 (C_9)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 10,5 min ; *m/z* = 465 $[M+Na]^+$

2,2,3,3,9,9,10,10-octaméthyl-6-méthylidène-4,8-dioxa-3,9-disilaundecane **(26)**



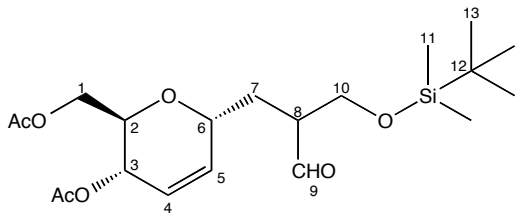
$C_{16}H_{36}O_2Si_2$ – M = 316,23 g.mol^{-1}

On ajoute successivement le 2-méthylène-propane-1,3-diol (0,264 g, 3 mmol), le chlorure de t-butyldiméthylsilyle (0,99 g, 6,6 mmol) dans 1 mL de DMF, puis ensuite l'imidazole (0,858 g, 12,6 mmol) le tout sous atmosphère inerte. Après dissolution complète des réactifs, le milieu est irradié sous MW pendant 5 min à 60°C puis pendant 45 min à 120°C. La solution est diluée avec de la DMF, puis extraite avec de l'hexane. La phase hexane est lavée avec de l'eau, séchée sur $MgSO_4$ et évaporée. Le produit diprotégé **26** est obtenu sous forme d'un liquide incolore avec un rendement de 96 % (0,91 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.04 (s, 6H, H_4), 0.83 (s, 18H, H_6), 4.09 (s, 4H, H_3), 5.01 (s, 2H, H_1)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -5.14 (C_4), 25.87 (C_6), 63.87 (C_3), 109.02 (C_1), 147.90 (C_2)

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-(2-{[(tert-butyldiméthylsilyl)oxy]méthyl}-3-oxopropyl)-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(27)**



$C_{20}H_{34}O_7Si$ – M = 414,21 g.mol^{-1}

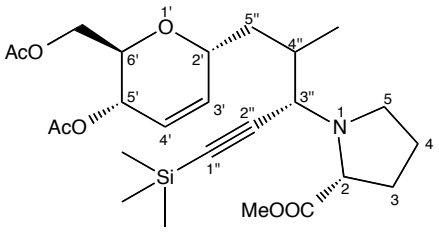
Dans un réacteur micro-onde, sont introduits le tri-O-acétyl-D-glucal **3** (0,1 g, 0,367 mmol), le diol protégé **26** (0,140 g, 0,441 mmol) dans 0,6 mL de 1,2-dichloroéthane. Le bromure de zinc (0,05 g, 0,220 mmol) est ensuite introduit dans le milieu réactionnel. Le réacteur est ensuite irradié sous MW pendant 7 minutes à 100° C. A la fin de la réaction, on élimine le solvant (dichloroéthane) à l'évaporateur rotatif. Puis on additionne au milieu réactionnel de l'éther et un mélange de solution saturée de $NaHSO_4$ et de Na_2HPO_4. La phase organique est séparée et la phase aqueuse est extraite à l'éther. Les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution saturée de Na_2CO_3, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées. Le produit est purifié sur cartouche de silice (éluant : heptane / AcOEt). On obtient alors le C-glycoside **27** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 79 % (0,12 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.02 (s, 6H, H_{11}), 0.84 (s, 9H, H_{13}), 1.65 (ddd, 0,6H, *J* = 3.31, 6.7 et 14.72 Hz, H_7(S)), 1.75 (m, 0,4H, H_7(R)), 2.01 (m, 0,4H, H_7(R)), 2.05 (s, 6H, MeCOO), 2.12 (ddd, 0,6H, *J* = 6.0, 10.7 et 14.7 Hz, H_7(S)), 2.68 (m, 1H, H_8), 3.81-3.96 (m, 3H, H_2, H_{10}), 4.11 (m, 2H, H_1), 4.28 (m, 1H, H_6), 5.09 (m, 1H, H_3), 5.77 (m, 1H, H_4), 5.86 (m, 1H, H_5), 9.75 (d, 1H, J = 8.74 Hz, H_9)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -5.58 (C_{11}), 18.14 (C_{12}), 20.74 et 21.01 (*Me*COO), 25.80 (C_{13}), 28.56 et 29.30 (C_7), 50.66 et 51.34 (C_8), 61.49 et 62.19 (C_{10}), 62.58 et 63.66 (C_1), 64.85 (C_3), 69.31 et 69.37 (C_6), 69.69 et 70.07 (C_2), 123.60 et 124.04 (C_4), 132.67 et 133.21 (C_5), 170.36 et 170.71 (Me*CO*), 203.62 et 203.86 (C_9)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 10,4 min ; *m/z* = 437,5 $[M+Na]^+$

(2S)-1-[(3S)-5-[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]-4-méthyl-1-(triméthylsilyl)pent-1-yn-3-yl]pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(28)**



$C_{25}H_{39}NO_7Si$ - M = 493,24 g.mol^{-1}

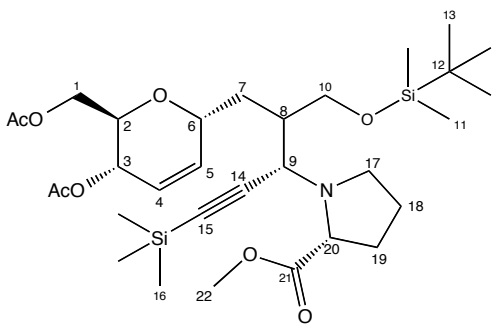
Un mélange de C-glycoside **4** (0,4 g ; 1,41 mmol), de chlorhydrate d'ester méthylique de L-proline (0,303 g ; 1,83 mmol), de TMS acétylène (0,276 g ; 2,81 mmol) et de CuI (0,536 g ; 2,81 mmol) est agité à température ambiante pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est extrait avec de l'éther puis la phase organique est concentrée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur cartouche de gel de silice pour donner la propargylamine **28** sous forme d'une huile jaune foncé, avec un rendement de 57 %.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.15 (s, 9H, (C**H$_3$**)$_3$Si), 1.03(d, 1.4H, *J* = 6.68 Hz, C**H$_3$**-C$_{4''}$), 1.08(d, 1.6H, *J* = 7.51 Hz, C**H$_3$**-C$_{4''}$), 1.12 (m, H$_{5''}$), 1.46 (m, H$_{5''}$), 1.69-1.94 (m, 4H, H$_3$, H$_4$), 1.88 (m, 1H, H$_{4''}$), 1.99 (m, H$_{5''}$), 2.02, 2.04 (2s, 6H, C**H$_3$**COO), 2.24 (m, H$_{5''}$), 2.67 (m, 1H, H$_5$), 2.82 (m, 1H, H$_5$), 3.29 (d, 1H, *J* = 9.98 Hz, H$_{3''}$), 3.48 (m, 1H, H$_2$), 3.65 (s, 3H, C**H$_3$**OCO-C$_2$), 3.87 (m, 1H, H$_{6'}$), 4.05-4.22 (m, 2H, AcOC**H$_2$**-C$_{6'}$), 4.36 (m, 1H, H$_{2'}$), 5.15 (m, 1H, H$_{5'}$), 5.69 (m,1H, H$_{4'}$), 5.89 (m, 1H, H$_{3'}$)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.1 ((**C**H$_3$)$_3$Si), 15.7, 18.6 (**C**H$_3$-C$_{4''}$), 20.6, 20.9 (**C**H$_3$COO), 23.5, 23.6 (C$_4$), 28.8, 28.9 (C$_3$), 33.3, 34.0 (C$_{4''}$), 36.6 (C$_{5''}$), 46.2, 46.7 (C$_5$), 51.4 (**C**H$_3$OCO-C$_2$), 63.2, 63.4 (AcO**C**H$_2$-C$_{6'}$), 64.1, 64.4 (C$_{3''}$), 65.3 (C$_{5'}$), 67.2 (C$_2$), 68.7, 69.2 (C$_{6'}$), 71.2, 72.9 (C$_{2'}$), 90.9, 91.2 (C$_{1''}$, C$_{2''}$), 123.7, 123.9 (C$_{4'}$), 133.6, 133.8 (C$_{3'}$), 170.5, 171.0 (CH$_3$**C**OO), 174.40 (CH$_3$O**C**OC-2)

LC-MS : ELSD pur. 100 %; R$_t$ = 8,45 min ; *m/z* = 494 [M+H]$^+$

1-(4-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-5-[(tert-butyldiméthylsilyl)oxy]-1-(triméthylsilyl)pent-1-yn-3-yl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(29)**



$C_{31}H_{53}NO_8Si_2$ – M = 623,33 g.mol^{-1}

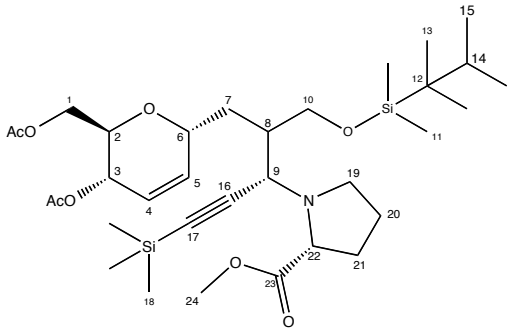
Dans un ballon sous atmosphère inerte, on introduit successivement l'aldo-C-glycoside **27** (0,08 g, 0,193 mmol), l'ester méthylique de la L-proline (0,026 g, 0,203 mmol), et le triméthylsilylacetylène (0,023 g, 0,232 mmol) puis de l'iodure de cuivre (0,011 g, 0,058 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 jours puis purifié directement sur cartouche de silice avec pour éluant un gradient Heptane 100 % vers AcOEt 100 %. La propargylamine **29** est obtenue sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 67 % (81 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.03 (s, 9H, H_{16}), 0.14 (s, 6H, H_{11}), 0.80 (s, 9H, H_{13}), 1.51-2.44 (m, 7H, H_7, H_8, H_{18}, H_{19}), 1.96 (s, 6H, -OCOC*H*$_3$), 2.65 (m, 2H, H_{17}), 3.45 (m, 1H, H_{20}), 3.57 (m, 1H, H_9), 3.65 (s, 3H, H_{22}), 3.76 (m, 2H, H_{10}), 3.96 (m, 1H, H_2), 4.20 (m, 2H, H_1), 4.34 (m, 1H, H_6), 5.02 (m, 1H, H_3), 5.53-5.86 (m, 2H, H_4, H_5)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.31 (C_{11}), 0.00 (C_{16}), 13.92 (C_{12}), 20.08 (C_{13}), 20.56 et 20.89 (*Me*COO), 22.50 (C_{18}), 24.97 (C_{19}), 28.83 (C_7), 31.70 (C_7), 38.59 (C_8), 46,58 (C_{17}), 56,36 et 58,35 (C_9), 62.17 (C_{20}), 63.07 et 63.57 (C_{10}), 64.12 et 64.22 (C_1), 65.24 et 65.53 (C_3), 68.39 et 69.75 (C_6), 70.09 et 70.57 (C_2), 103.08 et 104.02 (C_{14}), 90.08 et 90.28 (C_{15}), 122.52, 123.27, 123.92 et 124.31 (C_4), 131.77, 133.67 et 134.25 (C_5), 170.02 (Me*CO*), 174.38 et 174.33 (C_{21})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 10 min ; *m/z* = 624 $[M+H]^+$; *m/z* = 646 $[M+Na]^+$

1-(4-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-5-{[(2,3-diméthylbutan-2-yl)diméthylsilyl]oxy}-1-(triméthylsilyl)pent-1-yn-3-yl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(29')**



$C_{33}H_{57}NO_8Si_2$ – M = 651,36 g.mol^{-1}

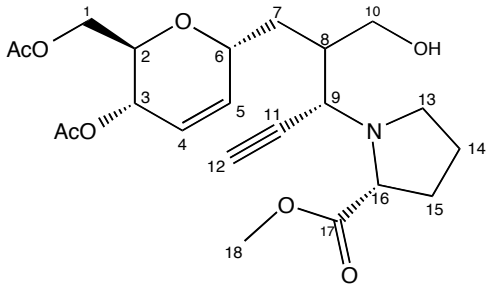
Dans un ballon sous atmosphère inerte, on introduit successivement l'aldo-C-glycoside **27'** (0,04 g, 0,09 mmol), l'ester méthylique de la L-proline (0,012 g, 0,095 mmol), et le triméthylsilylacetylène (0,011 g, 0,108 mmol) puis de l'iodure de cuivre (0,005 g, 0,027 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 jours puis purifié directement sur cartouche de silice avec pour éluant un gradient 100 % Heptane vers 100 % AcOEt. La propargylamine **29'** est obtenue sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 47 % (28 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.03 (s, 9H, H_{16}), 0.14 (s, 6H, H_{11}), 0.80 (s, 6H, H_{13}), 0.82 (s, 6H, H_{15}), 1.50-2.44 (m, 7H, H_7, H_8, H_{14}, H_{20}, H_{21}), 2.03 (s, 6H, -OCOCH_3), 2.74 (m, 2H, H_{18}), 3.45 (m, 1H, H_{22}), 3.65 (s, 3H, H_{24}), 3.76 (m, 2H, H_{10}), 3.96 (m, 1H, H_2), 4.20 (m, 2H, H_1), 4.34 (m, 1H, H_6), 5.67-5.96 (m, 2H, H_4, H_5)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -3.31 (C_{11}), 0.00 (C_{18}), 18.42 (C_{15}), 20.08 (C_{13}), 20.56 et 20.89 (*Me*COO), 22.50 (C_{20}), 24.97 et 24.95 (C_{21}), 28.83 (C_{12}), 31.70 (C_7), 34.04 (C_{14}), 103.08 et 104.02 (C_{16}), 90.08 et 90.28 (C_{17}), 122.52, 123.27, 123.92 et 124.31 (C_4), 131.77, 133.67 et 134.25 (C_5), 170.02 (Me*CO*), 174.38 et 174.33 (C_{23})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 12,5 min ; *m/z* = 653 $[M+H]^+$

1-(4-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)methyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-5-hydroxypent-1-yn-3-yl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(30)**



$C_{22}H_{31}NO_8$ – M = 437,20 g.mol^{-1}

Déprotection sur le composé 29'

Le composé **29'** (0,028 g, 0,043 mmol) est dilué avec 0,5 mL de THF auquel on ajoute une solution de TBAF 1M dans du THF (0,10 mmol). Le milieu réactionnel est agité toute une nuit à temperature ambiante, puis 24h au reflux. Le mélange est concentré et dilué avec du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée, séchée sur $MgSO_4$, filtrée et concentrée. Le produit **29'** n'est pas complètement déprotégé, le groupement thexyldimethylsilyle ne part pas même après plusieurs essais.

LC-MS : R_t = 3,5 min ; *m/z* = 439 $[M+H]^+$ et R_t = 7 min ; *m/z* = 581 $[M+H+thexyl]^+$

Déprotection sur le composé 29

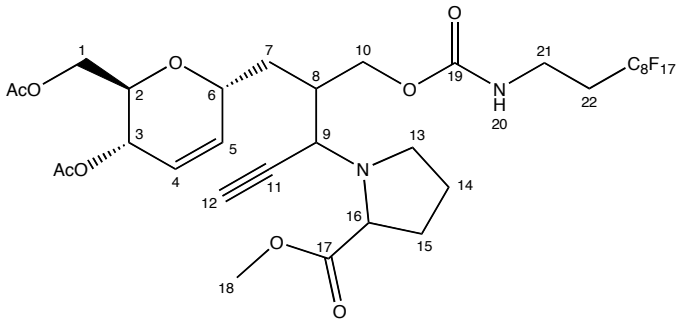
Le composé **29** (0,081 g, 0,13 mmol) est dilué dans 1 mL de THF puis on additionne une solution 1M de TBAF dans du THF (0,325 mmol). Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante, puis concentré sous vide. Le brut est repris par de l'AcOEt et la phase organique est lavée 2 fois avec une solution saturée de NaCl, séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice avec pour éluant un gradient Hept 100% vers AcOEt 100%. La propargylamine déprotégée **30** est obtenue sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 67 % (38 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) : 1.61-2.33 (m, 8H, H_7, H_8, H_{14}, H_{15}, H_{12}), 2.06 (s, 6H, -OCO*CH$_3$*), 2.82 (m, 2H, H_{13}), 3.53 (m, 2H, H_{16}), 3.70 (s, 3H, H_{18}), 3.70-3.95 (m, 4H, H_2, H_{10}, H_9), 4.15 (m, 2H, H_1), 4.34 (m, 1H, H_6), 5.17 (m, 1H, H_3), 5.71-5.91 (m, 2H, H_4, H_5)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) : 20.77 et 21.07 (*Me*COO), 23.70 (C_{14}), 29.03 (C_{15}), 31.15 (C_7), 42.50 (C_8), 47.78 (C_{13}), 51.89 (C_{18}), 55.46 (C_{16}), 63.13 (C_{12}), 63.75 et 64.04 (C_9), 65.08 (C_6), 69.32 et 69.92 (C_3), 72.35 (C_1), 74.91 (C_2), 79.89 (C_{11}), 123.40 (C_4), 133.52 (C_5), 170.04 et 170.85 (Me*CO*), 174.70 (C_{17})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 2,7 min ; *m/z* = 438 $[M+H]^+$

1-(4-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-5-{[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecyl)carbamoyl]oxy}pent-1-yn-3-yl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(31)**



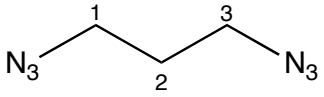
$C_{33}H_{35}F_{17}N_2O_9$ – M = 926,21 g.mol^{-1}

À une solution d' isocyanate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10-Heptadecafluorodecyle (0,012 g, 0,025 mmol) dans 1 mL de THF anhydre, est ajoutée une solution du composé hydroxyle **30** (0,011 g, 0,025 mmol) dans 0,5 mL de THF anhydre. Le milieu réactionnel est agité pendant 3 jours puis concentré et purifié directement sur cartouche de silice. La structure **VI** fluorée est obtenue sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 78 % (18 mg).

^{1}H RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.67-2.17 (m, 7H, H_7, H_8, H_{14}, H_{15}), 2.06 (s, 6H, -OCOC*H*$_3$), 2.39 (m, 2H, H_{21}), 2.85 (m, 2H, H13), 3.41-3.66 (m, 4H, H_9, H_{16}, H_{22}), 3.70 (s, 3H, H_{18}), 3.90 (m, 2H, H_{10}), 4.12-4.50 (m, 4H, H_2, H_6, H_1), 5.10 (m, 1H, H_3), 5,75 (m, 1H, H_5), 5,97 (m, 1H, H_4)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 11,1 min ; *m/z* = 927 $[M+H]^+$; 949 $[M+Na]^+$

1,3-diazidopropane **(32)**



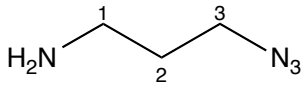
$C_3H_6N_6$ - M = 126,06 g.mol^{-1}

L'azoture de sodium (8,69 g, 133,73 mmol) est ajouté à une solution de 1,3-dibromopropane (9 g, 44,57 mmol) dans le DMF (45 mL). Le milieu est agité sous N_2 à 80°C pendant 20 heures. Le mélange réactionnel est alors dilué dans l'eau et extrait à l'éther (x3). La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée ($MgSO_4$) puis concentrée. Le produit **32** est obtenu avec un rendement de 93 % (5,22 g) sous forme d'une huile incolore. Il est engagé dans l'étape suivante sans purification sur colonne.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.76 (qn, 1H, *J* = 6.6 Hz, H_2), 3.35 (t, 4H, *J* = 6.4Hz, H_1, H_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 28.3 (C_2), 48.4 (C_1, C_3)

3-azidopropan-1-amine **(33)**



$C_3H_8N_4$ - M = 100,07 g.mol^{-1}

A une solution de 1,3-diazidopropane **32** (10.44 g ; 82.80 mmol) dans un mélange éther/acétate d'éthyle (1:1) (100 mL) et de HCl à 5 % (80 mL), est ajoutée la triphénylphosphine (20.63 g ; 78.66 mmol) par petites portions sur 1 heure à 0°C. Le milieu réactionnel est agité pendant 24 heures à température ambiante. La phase organique est éliminée et la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane. La phase aqueuse résultante est basifiée avec NaOH 1N et extraite de nouveau avec du dichlorométhane. La phase organique est séchée ($MgSO_4$) puis concentrée. Le produit est obtenu avec un rendement de 33 % (2,73 g) sous forme d'une huile incolore. Il est utilisé sans purification sur colonne.

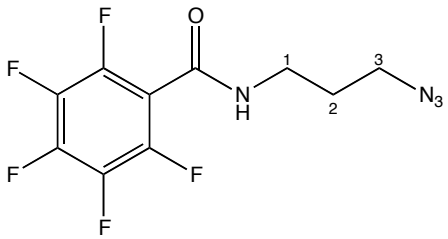
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.14 (s, 2H, N**H$_2$**-C_1), 1.66 (qn, 2H, *J* = 6.6Hz, H_2), 2.78 (t, 2H, J = 6.5Hz, H_1), 3.31 (t, 2H, J = 6.4Hz, H_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 34.2 (C_2), 39.45 (C_1), 48.6 (C_3)

Acylation (34 à 43)

Un mélange de 3-azidopropan-1-amine **33**, de chlorure d'acide (1 éq..) et d'Amberlite A-21 sèche (1,2 éq..) dans le dichlorométhane (7 mL) est agité pendant 3 heures à TA et sous atmosphère d'azote. Le milieu réactionnel est filtré puis concentré. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice avec un gradient d'éluant : heptane / acétate d'éthyle.

N-(3-azidopropyl)-2,3,4,5,6-pentafluorobenzamide **(34)**



$C_{10}H_7F_5N_4O$ - M = 249,05 g.mol^{-1}

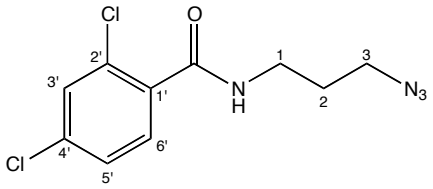
La réaction entre le 3-azidopropan-1-amine **33** (0,3 g ; 3 mmol), le chlorure de pentafluorobenzoyle (0,44 mL ; 3 mmol) en présence de l'A-21 sèche (0,749 g ; 3,6 mmol) fournit, après purification sur colonne, le composé **34** avec un rendement de 55 % (0,411 g) sous forme d'un solide blanc.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.80-1.86 (m, 2H, H_2), 3.38 (t, 2H, *J* = 4.5Hz, H_1), 3.48 (t, 2H, *J* = 4.5Hz, H_3), 6.34 (s, 1H, N**H**).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 29.3 (C_2), 39.2 (C_3), 49.8 (C_1), 159.6 (NH**C**O), 136.4, 137.5, 141.4, 147.9 (C_{ar}).

LC-MS : ELSD pur. 100 %; R_t = 3,55 min ; *m/z* = 250 $[M+H]^+$

N-(3-azidopropyl)-2,4-dichlorobenzamide **(35)**



$C_{10}H_{10}Cl_2N_4O$ - M = 272,02 g.mol^{-1}

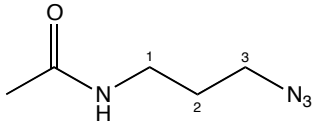
Un mélange de 3-azidopropan-1-amine **33** (0,3 g ; 3 mmol), de chlorure de 2,4-dichlorobenzoyle (0,43 mL ; 3 mmol) en présence de l'A-21 sèche (0,749 g ; 3,6 mmol) est agité durant 3 heures pour donner le composé **35** avec un rendement de 59 % (0,48 g) sous forme d'un solide jaune.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.71-1.77 (m, 2H, H_2), 3.27 (t, 2H, *J* = 4.7Hz, H_1), 3.46 (t, 2H, *J* = 4.6Hz, H_3), 6.23 (s, 1H, N**H**), 7.40-7.49 (m, 2H, $H_{5'}$, $H_{6'}$), 7.99 (s, 1H, $H_{3'}$)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 29.6 (C_2), 40.2 (C_3), 53.4 (C_1), 167.6 (NH**C**O), 126.9, 127.4, 131.9 ($C_{3'}$, $C_{5'}$, $C_{6'}$), 134.9, 136.1 ($C_{2'}$, $C_{4'}$)

LC-MS : ELSD pur. 100 %; R_t = 3,51 min ; *m/z* = 273 $[M+H]^+$

N-(3-azidopropyl)acétamide **(36)**



$C_5H_{10}N_4O$ - M = 142,08 g.mol^{-1}

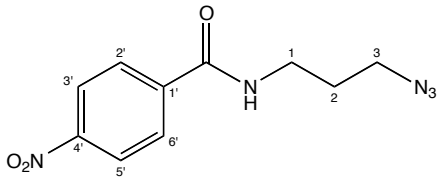
La réaction entre le 3-azidopropan-1-amine **33** (0,3 g ; 3 mmol), le chlorure d'acétyle (0,214 mL ; 3 mmol) en présence de l'A-21 sèche (0,749 g ; 3,6 mmol) fournit, après 3 heures d'agitation, le composé **36** avec un rendement de 77 % (0,328 g) sous forme d'une huile jaune.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.62 (s, 3H, C**H$_3$**CO), 2.17-2.20 (m, 2H, H_2), 3.38 (m, 2H, H_1), 3.47 (m, 2H, H_3), 6.50 (s, 1H, N**H**).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 29.7 (C_2), 38.6 (**C**H_3CO), 40.1 (C_1), 51.4 (C_3), 175.3 (NH**C**O).

LC-MS : ELSD pur. 100 %; R_t = 3,46 min ; *m/z* = 143 $[M+H]^+$

N-(3-azidopropyl)-4-nitrobenzamide **(37)**



$C_{10}H_{11}N_5O_3$ - M = 249,08 g.mol^{-1}

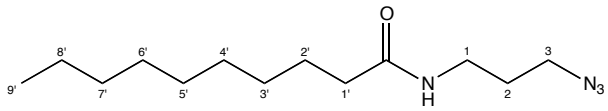
Un mélange de 3-azidopropan-1amine **33** (0,3 g ; 3 mmol), de chlorure de 4-nitrobenzoyle (0,556 g ; 3 mmol) en présence de l'A-21 sèche (0,749 g ; 3,6 mmol) est agité durant 3 heures pour donner le composé **37** avec un rendement de 60 % (0,45 g) sous forme d'un solide jaune.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.95-2.02 (m, 2H, H_2), 3.25-3.67 (m, 4H, H_1, H_3), 6.58 (s, 1H, N**H**), 7.97-7.98 (d, 2H, *J* = 7.6Hz, $H_{2'}$, $H_{6'}$), 8.33-8.35 (d, 2H, *J* = 7.6Hz, $H_{3'}$, $H_{5'}$)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 29.9 (C_2), 39.1 (C_1), 50.0 (C_3), 124.9 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 128.1 ($C_{3'}$, $C_{5'}$), 140.0 ($C_{1'}$), 150.6 ($C_{4'}$), 166.0 (HN**C**O)

LC-MS : ELSD pur. 100 %; R_t = 3,50 min ; *m/z* = 250 $[M+H]^+$

N-(3-azidopropyl)decanamide **(38)**



$C_{13}H_{26}N_4O$ - M = 254,21 g.mol^{-1}

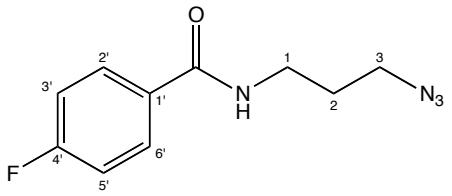
Une solution d'amine **33** (0,3 g ; 3 mmol), de chlorure de décanoyle (0,61 mL ; 3 mmol) et d'A-21 sèche (0,749 g ; 3,6 mmol) dans du dichlorométhane est agitée durant 3 heures pour donner l'amide **38** avec un rendement de 83 % (0,633 g) sous forme d'une huile jaune.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.89 (m, 3H, $H_{9'}$), 1.27-132 (m, 12H, $H_{8'}$, $H_{7'}$, $H_{6'}$, $H_{5'}$, $H_{4'}$, $H_{3'}$), 1.63-1.74 (m, 2H, $H_{2'}$), 1.78 (t, 2H, *J* = 6.5Hz, $H_{1'}$), 2.16-2.20 (m, 2H, H_2), 3.33-3.40 (m, 4H, H_1, H_3), 5.75 (s, 1H, N**H**)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 14.6 ($C_{9'}$), 23.1 ($C_{8'}$), 26.6 ($C_{2'}$), 30.2 (C_2), 31.5, 32.0, 32.7 ($C_{3'}$, $C_{4'}$, $C_{5'}$, $C_{6'}$), 33.8 ($C_{7'}$), 37.8 (C_1), 49.9 (C_3), 173.4 (HN**C**O)

LC-MS : ELSD pur. 100 %; R_t = 3,45 min ; *m/z* = 255 $[M+H]^+$

N-(3-azidopropyl)-4-fluorobenzamide **(39)**



$C_{10}H_{11}FN_4O$ - $M = 222{,}09\ g.mol^{-1}$

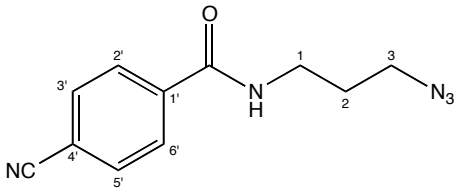
La réaction entre le 3-azidopropan-1-amine **33** (0,3 g ; 3 mmol), le chlorure de 4-fluorobenzoyle (0,35 mL ; 3 mmol) en présence de l'A-21 sèche (0,749 g ; 3,6 mmol) fournit, après 3 heures d'agitation, le composé **39** avec un rendement de 67 % (0,446 g) sous forme d'un solide blanc.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.83 (qn, 2H, *J* = 6.4Hz, H_2), 3.36 (t, 2H, *J* = 6.4Hz, H_1), 3.45 (t, 4H, *J* = 6.4Hz, H_3), 6.255 (s, 1H, N**H**), 7.01-7.05 (m, 2H, $H_{2'}$, $H_{6'}$), 7.70-7.73 (m, 2H, $H_{3'}$, $H_{5'}$)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 29.8 (C_2), 39.9 (C_1), 50.0 (C_3), 115.9, 116,2 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 129.3 ($C_{5'}$, $C_{3'}$), 131.1 ($C_{1'}$), 165.4 ($C_{4'}$), 167.5 (HN**C**O)

LC-MS : ELSD pur. 100 %; R_t = 3,48 min ; *m/z* = 223 $[M+H]^+$

N-(3-azidopropyl)-4-cyanobenzamide **(40)**



$C_{11}H_{11}N_5O$ - $M = 229{,}09\ g.mol^{-1}$

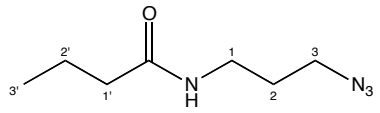
Un mélange de 3-azidopropan-1amine **33** (0,3 g ; 3 mmol), de chlorure de 4-cyanobenzoyle (0,496 g ; 3 mmol) en présence de l'A-21 sèche (0,749 g ; 3,6 mmol) est agité durant 3 heures pour donner le composé **40** avec un rendement de 45 % (0,31 g) sous forme d'un solide jaune.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.82 (qn, 2H, *J* = 6.2Hz, H_2), 3.40-3.53 (m, 4H, H_1, H_3), 6.40 (s, 1H, N**H**), 7.67 (d, 2H, *J* = 7.2Hz, $H_{2'}$, $H_{6'}$), 7.79 (d, 2H, *J* = 6.8Hz, $H_{3'}$, $H_{5'}$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 29.0 (C_2), 38.9 (C_1), 50.8 (C_3), 115.9 ($C_{4'}$), 118.7 (**C**N), 127.0 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 133.6 ($C_{3'}$, $C_{5'}$), 139.6 ($C_{1'}$), 165.895 (HN**C**O).

LC-MS : ELSD pur. 100 %; R_t = 3,51 min ; *m/z* = 230 $[M+H]^+$

N-(3-azidopropyl)butanamide **(41)**



$C_7H_{14}N_4O$ - M = 170,11 g.mol^{-1}

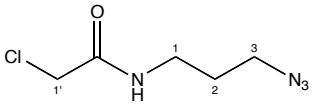
La réaction entre le 3-azidopropan-1amine **33** (0,3 g ; 3 mmol), le chlorure de butanoyle (0,316 mL ; 3 mmol) en présence de l'A-21 sèche (0,749 g ; 3,6 mmol) fournit, après 3 heures d'agitation, le composé **41** avec un rendement de 81 % (0,413 g) sous forme d'un solide blanc.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.91-0.95 (m, 3H, $H_{3'}$), 1.60-1.81 (m, 4H, $H_{2'}$, $H_{1'}$), 2.13-2.16 (m, 2H, H_2), 3.30-3.37 (m, 4H, H_1, H_3), 6.12 (s, 1H, N**H**)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 15.0 ($C_{3'}$), 20.0 ($C_{2'}$), 29.8 (C_2), 37.1 ($C_{1'}$), 39.8 (C_1), 51.0 (C_3), 174.9 (HN**C**O)

LC-MS : ELSD pur. 100 %; R_t = 3,45 min ; *m/z* = 230 $[M+H]^+$

N-(3-azidopropyl)-2-chloroacétamide **(42)**



$C_5H_9ClN_4O$ - M = 176,04 g.mol^{-1}

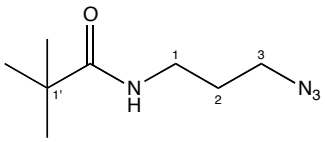
Une solution de 3-azidopropan-1amine **33** (0,3 g ; 3 mmol), de chlorure de chloroacétyle (0,24 mL ; 3 mmol) et d'A-21 sèche (0,749 g ; 3,6 mmol) dans le DCM est agitée durant 3 heures pour donner le composé **42** avec un rendement de 66 % (0,348 g) sous forme d'un solide blanc.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.75 (qn, 2H, *J* = 6.8Hz, H_2), 3.33-3.38 (m, 4H, H_1, H_3), 4.05 (s, 2H, $H_{1'}$), 6.78 (s, 1H, N**H**)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 27.9 (C_2), 36.5 (C_1), 42.1 (C_3), 48.5 ($C_{1'}$), 165.0 (HN**C**O)

LC-MS : ELSD pur. 100 %; R_t = 3,48 min ; *m/z* = 177 $[M+H]^+$

N-(3-azidopropyl)-2,2-diméthylpropanamide **(43)**



$C_8H_{16}N_4O$ - M = 184,13 g.mol^{-1}

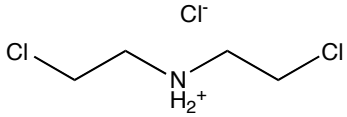
Un mélange de 3-azidopropan-1amine **33** (0,3 g ; 3 mmol), de chlorure de triméthylacétyle (0,37 mL ; 3 mmol) en présence de l'A-21 sèche (0,749 g ; 3,6 mmol) est agité durant 3 heures pour donner le composé **43** avec un rendement de 71 % (0,39 g) sous forme d'un solide jaune.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.13 (s, 9H, $(CH_3)_3C_{1'}$), 1.70-1.76 (m, 2H, H_2), 3.24-3.31 (m, 4H, H_1, H_3), 6.2 (s, 1H,N**H**)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 28.1 ($(CH_3)_3C_{1'}$), 29.8 (C_2), 38.4 (C_1), 39.1 ($C_{1'}$), 50.0 (C_3), 179.9 (HN**C**O)

LC-MS : ELSD pur. 100 %; R_t = 3,50 min ; *m/z* = 185 $[M+H]^+$

2,2'-dichlorodiéthylamine hydrochloride **(45)**



$C_4H_{10}Cl_3N$ - M = 176,99 g.mol^{-1}

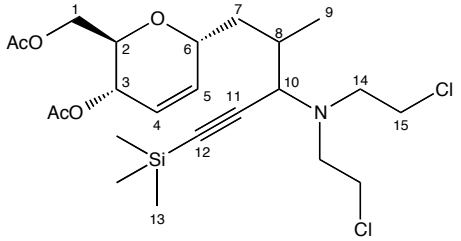
A une solution de chlorure de thionyle (89 g, 750 mmol) dans 75 mL de dichlorométhane anhydre est ajoutée sous agitation vigoureuse une solution de diéthanolamine (31 g, 300 mmol) dans 75 mL de dichlorométhane anhydre. Une fois l'addition complète, le milieu réactionnel semi-solide est chauffé à reflux pendant 3h30 (le temps nécessaire à la dissolution complète du solide). La solution est refroidie dans la glace et les cristaux sont récoltés par filtration et lavés avec du dichlorométhane froid pour éliminer les impuretés. Le produit **45** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 60 % (31,9 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 3,73 (t, 4H, *J* = 6,35 Hz, -C*H*$_2$NH), 3,95 (t, 4H, -C*H*$_2$Cl), 9,50 (s, 2H, NH_2^+)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 47,93

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 2 min ; *m/z* = 142 $[M-HCl+H]^+$

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-{3-[bis(2-chloroéthyl)amino]-2-méthyl-5-(triméthylsilyl)pent-4-yn-1-yl}-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(46)**



$C_{23}H_{37}Cl_2NO_5Si$ – M = 505,18 g.mol^{-1}

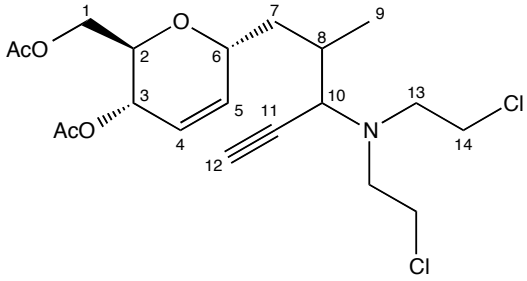
Dans un ballon sous atmosphère inerte, on introduit successivement l'aldo-C-glycoside **4** (0,057 g, 0,2 mmol), le 2,2'-dichlorodiéthylamine **45** (0,046 g, 0,26 mmol), et le triméthylsilylacetylène (0,031 g, 0,32 mmol) puis de l'iodure de cuivre (0,023 g, 0,12 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 h à TA puis purifié directement sur cartouche de silice avec pour éluant un gradient de 100 % Heptane vers 100 % AcOEt. La propargylamine **46** est obtenue sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 34 % (34 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.00 (s, 9H, H_{13}), 0.73 (m, 1.2H, H_9), 0.93 (m, 1.8H, H_9), 1.27 (m, 0,6H, H_7), 1.74-1.93 (m, 1,4H, H_7), 2.19 (m, 1H, H_8), 1.92, 1.95 (2s, 6H, C**H$_3$**COO), 2.72 (m, 4H, H_{14}), 2.82 (d, 0,3H, *J* = 10.5 Hz, H_{10}), 2.89 (d, 0,7H, *J* = 10.3 Hz, H_{10}), 3.85 (t, 4H, *J* = 6.92 Hz, H_{15}), 3.74 (m, 1H, H_2), 3.95 (m, 2H, H_1), 4.18 (m, 1H, H_6), 4.95 (m, 1H, H_3), 5.60 (m,1H, H_5), 5.71 (m, 1H, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.0 (C_{13}), 16.2 (C_9), 20.8 et 20.9 (OCH_3), 29.6 (C_7), 42.2 (C_{14}, C_{15}), 44.5 et 44.7 (C_8), 62.0 et 62.2 (C_{10}),), 60.6, 60.9 et 61.0 (C_1), 64.3 et 65.0 (C_6), 68.5 et 68.8 et 68.9 (C_3), 71.2 et 72.9 (C_2), 123.3 et 124.9 (C_4), 133.8 et 134.0 (C_5), 170.22 et 170.78 (CH_3**C**OO)

LC-MS : ELSD pur. 100 %; R_t = 11,30 min ; *m/z* = 506 $[M(^{35}Cl)+H]^+$ et 508 $[M(^{37}Cl)+H]^+$

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-{3-[bis(2-chloroéthyl)amino]-2-méthylpent-4-yn-1-yl}-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(47)**



$C_{20}H_{29}Cl_2NO_5$ – M = 433,14 g.mol^{-1}

La propargylamine protégée **46** (0,163 g, 0,322 mmol) est dissoute dans 1 mL de THF puis on ajoute une solution de TBAF 1M dans le THF (0,354 mmol). Le milieu réactionnel est agité à TA pendant 16 h. Après évaporation du solvant, le produit brut est purifié directement sur cartouche de silice avec pour éluant un gradient Heptane 100 % vers AcOEt 100 %. La propargylamine déprotégée **47** est obtenue sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 47 % (66 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.04 (m, 3H, H_9), 1.27 (m, 0,6H, H_7), 1.74-1.93 (m, 1,4H, H_7), 2.02, 2.03 (2s, 6H, C**H$_3$**COO), 2.23 (m, 1H, H_8), 2.82 (m, 4H, H_{13}), 2.97 (m, 0,5H, H_{10}), 3.01 (m, 0,5H, H_{10}), 3.49 (t, 4H, *J* = 6.92 Hz, H_{14}), 3.87 (td, 1H, *J* = 3.51 et 6.54 Hz, H_2), 4.02 (dd, 0,5H, *J* = 3.4 et 11.9 Hz, H_1), 4.16 (dd, 1,5H, *J* = 4.8 et 11.8 Hz, H_1), 4.22 (m, 1H, H_6), 4.95 (m, 1H, H_3), 5.03-5.12 (m,2H, H_5, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 17.3 et 17.7 (C_9), 20.8 et 21.0 (OCH_3), 31.8, 32.4 et 32.9 (C_7), 35.8, 35.9, 36.2 et 36.8 (C_8), 42.2 (C_{13}, C_{14}), 53.9, 54.1, 54.2 et 54.7 (C_{10}), 60.6, 60.9 et 61.0

(C_1), 62.9 et 63.2 (C_6), 65.0 et 65.2 (C_3), 68.8, 69.0 et 69.4 (C_2), 73.7 et 73.9 (C_{12}), 81.0 (C_{11}), 123.1 et 123.8 (C_4), 133.4 et 134.1 (C_5), 170.4, 170.5 et 170.8 (CH_3**C**OO)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 10 min ; *m/z* = 435 $[M(^{35}Cl)+H]^+$

Préparation du catalyseur A21.CuI

Amberlyst A-21 sèche :

L'A-21 commerciale hydratée (100 g) est suspendue dans 500 mL de MeOH pendant une demi-heure. La résine est filtrée puis lavée trois fois avec du méthanol. La résine récupérée est suspendue dans 500 mL du dichlorométhane durant une demi-heure. Puis elle est filtrée et lavée trois fois de suite avec du dichlorométhane. Les traces de solvant sont éliminées sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. La résine séchée est conservée au vide dans un dessiccateur en présence de P_2O_5. Le fournisseur indique que la résine contient 4,8 équivalents d'amine par gramme de résine sèche.

Catalyseur supporté (A-21.CuI) :

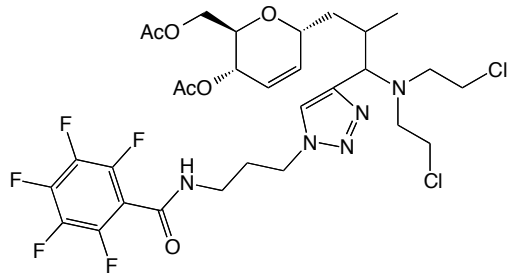
On ajoute l'amberlyst A-21 sèche (2 g, 9,6 mmol d'amine) à une solution d'iodure de cuivre (0,76 g, 4,0 mmol) dans l'acétonitrile (50 mL). La suspension est mise sous agitation orbitalaire pendant 17 heures. La résine est ensuite filtrée, lavée avec de l'acétonitrile (2 x 50 mL), du dichlorométhane (2 x 50 mL) puis elle est séchée *in vacuo* à 40°C. La masse de la résine a augmenté de 536,7 mg (2,82 mmol) ce qui donne une résine possédant 1,11 mmol de CuI par gramme d'A-21.

Synthèse des triazoles sur le squelette modèle 47 par chimie click

On ajoute l'alcyne **47** (0,008 g, 0,019 mmol) et l'azoture (**34, 37** à **43**) (1,1 éq.) à une suspension du catalyseur supporté (A-21.CuI, 0,1 éq., 2 mg, 0,002 mmol) dans du dichlorométhane (0,3 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures. La solution est alors filtrée et la résine est lavée 2 fois avec du dichlorométhane. Les filtrats sont rassemblés et concentrés pour donner les produits attendus.

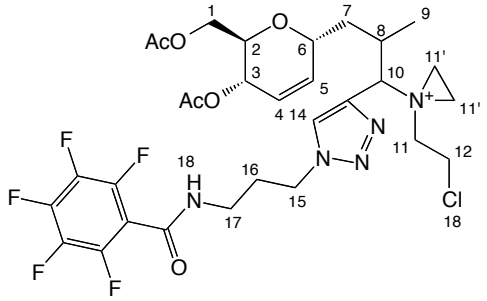
NB : Les composés aziridinium sont récupérés sous forme neutre, mais ils sont représentés ici sous forme cationique sans le contre-ion Cl^- afin de pouvoir calculer la masse exacte nécessaire à la compréhension des analyses LC-MS.

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-{3-[bis(2-chloroéthyl)amino]-2-méthyl-3-(1-{3-[(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl}-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(48)**



$C_{30}H_{36}Cl_2F_5N_5O_6$ – M = 728,53 g.mol^{-1}

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-(1-{3-[(pentafluorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl)-1-(2-chloroéthyl)aziridin-1-ium **(48')**



$C_{30}H_{36}ClF_5N_5O_6^+$ - M = 693,08 g.mol^{-1}

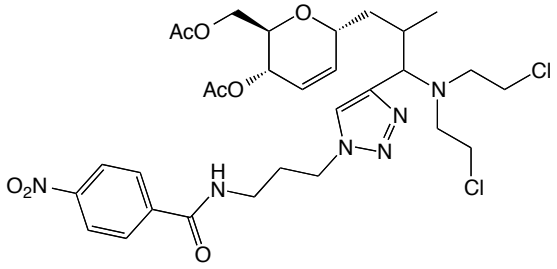
Le N-(3-azidopropyl)-2,3,4,5,6-pentafluorobenzamide **34** (0,006 g, 0,021 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **47** pour conduire au triazole **48** avec un rendement de 15 % (1,8 mg) et au triazole **48'** avec un rendement de 81 % (9,7 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) du 48': δ (ppm) 1.16 (m, 3H, H_9), 1.2-2.1 (m, H_7, H_{16}, 2 x OCH_3), 2.15 (m, 1H, H_8), 2.52 (m, $H_{11'}$), 2.82 (m, H_{11}), 3.38-3.53 (m, H_{12}, H_{17}), 3.8-4.4 (m, 5H, H_2, H_1, H_6, H_{10}), 4.44 (m, 2H, H_{15}), 5.10 (m, 1H, H_3), 5.5-5.9 (m, 2H, H_5, H_4), 6.6 (sb, 1H, H_{18}), 7.44 (s, 1H, H_{14})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) du 48': δ (ppm) 23.5 (OCH_3), 29.8 (C_{16}), 31.2 (C_7), 33.3 (C_8), 40.3 (C_{13}, C_{14}), 44.0 (C_{15}), 49.1 (C_{17}), 51.4 (C_{10})

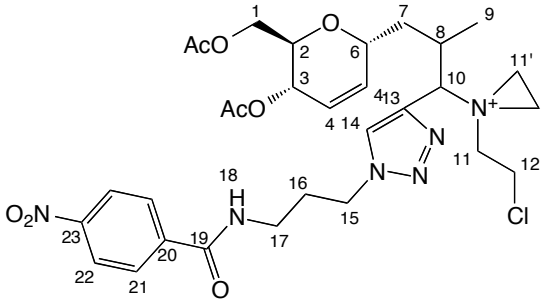
LC-MS du 48 : ELSD 15 %, R_t = 5,65 min ; *m/z* = 729,60 $[M+H]^+$
LC-MS du 48' : ELSD 81 %, R_t = 3,22 min ; *m/z* = 692,10 $[M(^{35}Cl)+H]^+$; 694,15 $[M(^{37}Cl)+H]^+$

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-{3-[bis(2-chloroéthyl)amino]-2-méthyl-3-(1-{3-[(4-nitrophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl}-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(49)**



$C_{30}H_{40}Cl_2N_6O_8$ – M = 683,58 g.mol^{-1}

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-(1-{3-[(4-nitrophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl)-1-(2-chloroethyl)aziridin-1-ium **(49')**



$C_{30}H_{40}ClN_6O_8^+$ - M = 648,13 g.mol^{-1}

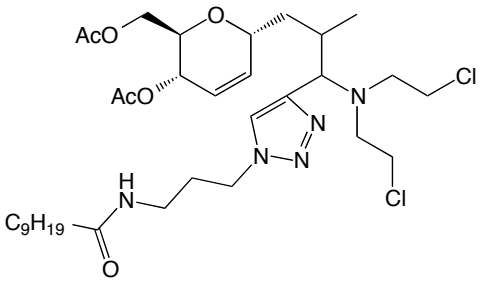
Le N-(3-azidopropyl)-4-nitrobenzamide **37** (0,005 g, 0,021 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **47** pour conduire au triazole **49** avec un rendement de 5 % (0,6 mg) et au triazole **49'** avec un rendement de 83 % (10 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) du 49': δ (ppm) 1.16 (m, 3H, H_9), 1.3-2.5 (m, H_7, H_{16}, 2 x OCH_3, H_8), 2.62 (m, $H_{11'}$), 2.82 (m, H_{11}), 3.4-3.56 (m, H_{12}, H_{17}), 3.9-4.4 (m, 5H, H_2, H_1, H_6, H_{10}), 4.5 (t, 2H, H_{15}), 5.21 (m, 1H, H_3), 5.5-5.85 (m, 2H, H_5, H_4), 6.59 (sb, 1H, H_{18}), 7.52 (s, 1H, H_{14}), 7.93 (m, 2H, H_{21}), 8.2 (m, 2H, H_{22})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) du 49': δ (ppm) 17.1 (C_9), 20.8 et 21.0 (OCH_3), 28.5 (C_{16}), 29.5 et 29.8 (C_7), 36.7 et 37.2 (C_8), 38.3 (C_{17}), 42.4 (C_{11}, C_{12}), 49.7 (C_{15}), 53.2 et 53.4 ($C_{11'}$), 62.8 (C_{10}), 63.5 (C_1), 65.0 (C_6), 68.4 (C_3), 69.7 (C_2), 122.8 (C_5), 123.8 (C_{21}), 128.0 (C_{22}), 134.3 (C_4), 161.8 (C_{23}), 139.4 (C_{20}), 145.5 (C_{13}), 149.6 (C_{23}), 165.5 (C_{19}), 170.8 et 170.9 (CH_3**C**OO)

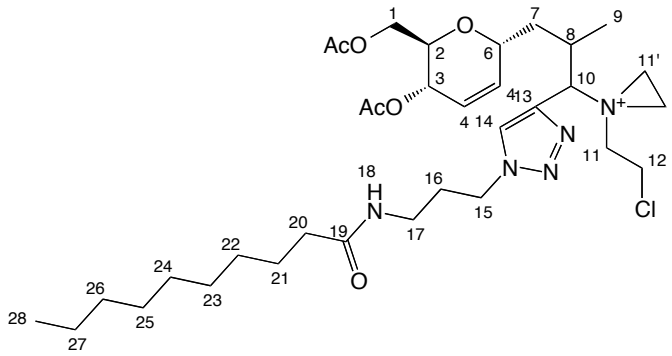
LC-MS du 49 : ELSD 5 %, R_t = 5,47 min ; *m/z* = 683,75 $[M+H]^+$; 705,60 $[M+Na]^+$
LC-MS du 49' : ELSD 83 %, R_t = 2,43 min ; *m/z* = 647,65 $[M(^{35}Cl)+H]^+$; 649,65 $[M(^{37}Cl)+H]^+$

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-{3-[bis(2-chloroéthyl)amino]-3-[1-(3-decanamidopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-2-méthylpropyl}-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(50)**



$C_{33}H_{55}Cl_2N_5O_6$ – M = 688,73 g.mol^{-1}

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)methyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-[1-(3-decanamidopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]propyl)-1-(2-chloroéthyl)aziridin-1-ium **(50')**



$C_{33}H_{55}ClN_5O_6^+$ - M = 653,27 g.mol^{-1}

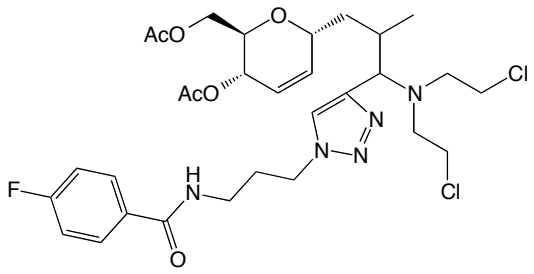
Le N-(3-azidopropyl)decanamide **38** (0,005 g, 0,021 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **47** pour conduire au triazole **50** avec un rendement de 14 % (1,8 mg) et au triazole **50'** avec un rendement de 86 % (10 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) du 50': δ (ppm) 0.71 (t, 3H, H_{28}), 1.05-1.35 (m, H_9, H_{22} à H_{27}), 1.4-2.4 (m, H_7 , H_{16}, 2 x OCH_3, H_8, H_{20}, H_{21}), 2.55 (m, $H_{11'}$), 2.85 (m, H_{11}), 3.2 (m, 2H, H_{17}), 3.5 (m, H_{12}), 3.8-4.4 (m, 5H, H_2, H_1, H_6, H_{10}), 4.4 (m, 2H, H_{15}), 5.1 (m, 1H, H_3), 5.5-5.95 (m, 2H, H_5, H_4), 7.45 (s, 1H, H_{14})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) du 50': δ (ppm) 12.8 (C_{28}), 17.8 (C_9), 20.8 et 20.9 (OCH_3), 21.4 (C_{27}), 28.1 (C_{21}), 29.7 (C_{16}), 30.6 (C_7), 34-36 (C_8, C_{17}, C_{22}, C_{23}, C_{24}, C_{25}, C_{26}), 41.3 (C_{11}, C_{12}), 48.8 (C_{15}), 52.0 ($C_{11'}$), 61.7 (C_{10}), 62.8 (C_1), 63.8 (C_6), 65.4 (C_3), 67.5 (C_2), 121.0 (C_4), 133.2 (C_5), 169.7 (CH_3**C**OO)

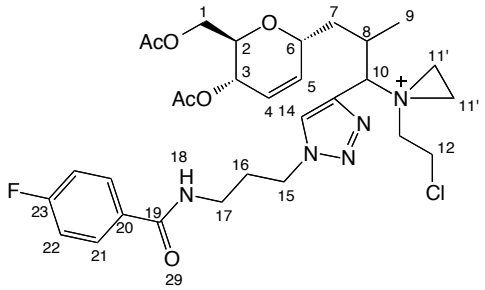
LC-MS du 50 : ELSD 14 %, R_t = 6,10 min ; *m/z* = 688,85 $[M+H]^+$; 710,90 $[M+Na]^+$
LC-MS du 50' : ELSD 86 %, R_t = 3,75 min ; *m/z* = 652,75 $[M(^{35}Cl)+H]^+$; 654,85 $[M(^{37}Cl)+H]^+$

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-{3-[bis(2-chloroéthyl)amino]-3-(1-{3-[(4-fluorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-2-méthylpropyl}-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(51)**



$C_{30}H_{40}Cl_2FN_5O_6$ – M = 656,57 g.mol^{-1}

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-(1-{3-[(4-fluorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl)-1-(2-chloroéthyl)aziridin-1-ium **(51')**



$C_{30}H_{40}ClFN_5O_6^+$ - M = 621,12 g.mol^{-1}

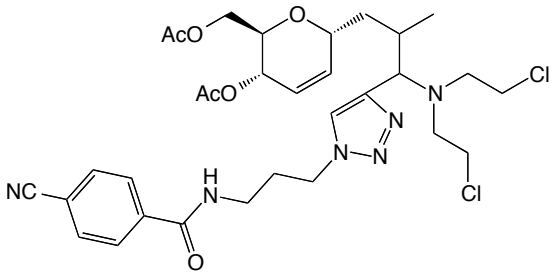
Le N-(3-azidopropyl)-4-fluorobenzamide **39** (0,005 g, 0,021 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **47** pour conduire au triazole **51** avec un rendement de 12 % (1,5 mg) et au triazole **51'** avec un rendement de 84 % (10 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) du 51': δ (ppm) 1.16 (m, 3H, H_9), 1.2-2.2 (m, H_7, H_{16}, 2 x OCH_3, H_8), 2.55 (m, 4H, $H_{11'}$), 2.82 (m, 4H, H_{11}), 3.36-3.53 (m, H_{12}, H_{17}), 4.0-4.28 (m, 5H, H_2, H_1, H_6, H_{10}), 4.43 (t, 2H, H_{15}), 5.10 (m, 1H, H_3), 5.5-5.9 (m, 2H, H_5, H_4), 6.6 (sb, 1H, H_{18}), 7.05 (m, 2H, H_{21}), 7.49 (S, 1H, H_{14}), 7.7 (m, 2H, H_{22})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) du 51': δ (ppm) 15.9 (C_9), 19.8 et 19.9 (OCH_3), 27.5 (C_{16}), 29.7 et 29.8 (C_7), 35.4, 35.5 et 35.8 (C_8), 36.7 (C_{17}), 41.3 (C_{11}, C_{12}), 48.5 (C_{15}), 52.0 et 52.4 ($C_{11'}$), 59.3 (C_{10}), 61.7 (C_1), 63.9 (C_6), 67.6 (C_3), 68.3 (C_2), 114.6 (C_{22}), 121.7 (C_4), 128.1 (C_{21}), 129.3 (C_{20}), 129.4 (C_{14}), 133.0 (C_5), 133.2 (C_{13}), 161.8 (C_{23}), 169.3 (C_{19}), 169.7 (CH_3**C**OO)

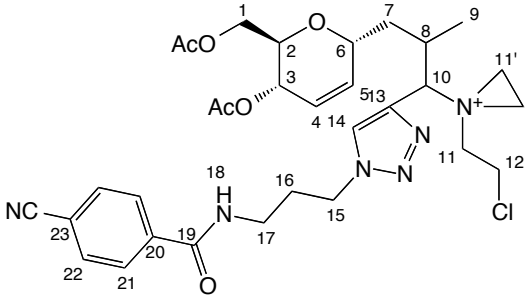
LC-MS du 51 : ELSD 12 %, R_t = 5,32 min ; *m/z* = 656,70 $[M+H]^+$; 678,70 $[M+Na]^+$
LC-MS du 51' : ELSD 84 %, R_t = 2,32 min ; *m/z* = 620,60 $[M(^{35}Cl)+H]^+$; 622,65 $[M(^{37}Cl)+H]^+$

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-{3-[bis(2-chloroéthyl)amino]-3-(1-{3-[(4-cyanophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4- yl]-2-méthylpropyl}-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(52)**



$C_{31}H_{40}Cl_2N_6O_6$ – M = 663,59 g.mol^{-1}

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-(1-{3-[(4-cyanophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl)-1-(2-chloroéthyl)aziridin-1-ium **(52')**



$C_{31}H_{40}ClN_6O_6^+$ - M = 628,14 g.mol^{-1}

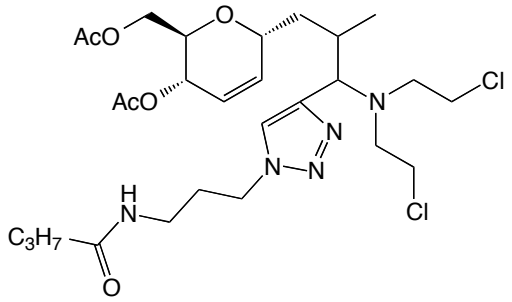
Le N-(3-azidopropyl)-4-cyanobenzamide **40** (0,005 g, 0,021 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **47** pour conduire au triazole **52** avec un rendement de 3 % (0,4 mg) et au triazole **52'** avec un rendement de 76 % (9 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) du 52': δ (ppm) 1.18 (m, 3H, H_9), 1.3-2.3 (m, H_7, H_{16}, 2 x OCH_3, H_8), 2.62 (m, $H_{11'}$), 2.82 (m, H_{11}), 3.35-3.56 (m, H_{12}, H_{17}), 3.8-4.4 (m, 5H, H_2, H_1, H_6, H_{10}), 4.45 (t, 2H, H_{15}), 5.11 (m, 1H, H_3), 5.5-5.95 (m, 2H, H_5, H_4), 6.49 (sb, 1H, H_{18}), 7.45 (s, 1H, H_{14}), 7.7 (m, 2H, H_{21}), 7.9 (m, 2H, H_{22})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) du 52': δ (ppm) 17.8 (C_9), 21.8 et 21.9 (OCH_3), 29.2 (C_{16}), 30.7 et 31.8 (C_7), 37.3 et 37.4 (C_8), 38.9 (C_{17}), 43.2 (C_{11}, C_{12}), 50.4 (C_{15}), 53.9 ($C_{11'}$), 63.7 (C_{10}), 65.8 (C_1), 66.9 (C_6), 69.4 (C_3), 70.4 (C_2), 115.6 (C_{20}), 128.3 (C_{22}), 128.4 (C_4), 133.2 (C_{21}), 135.0 (C_{14}), 135.2 (C_5), 138.2 (C_{13}), 138.9 (C_{23}), 166.3 (C_{19}), 170.6 (CH_3**C**OO)

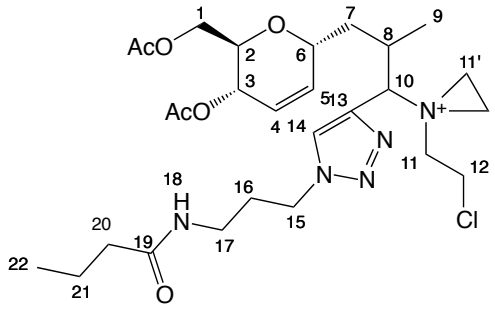
LC-MS du 52 : ELSD 3 %, R_t = 5,00 min ; *m/z* = 663,60 $[M+H]^+$; 685,70 $[M+Na]^+$
LC-MS du 52' : ELSD 76 %, R_t = 2,28 min ; *m/z* = 627,65 $[M(^{35}Cl)+H]^+$; 629,65 $[M(^{37}Cl)+H]^+$

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-{3-[bis(2-chloroéthyl)amino]-3-[1-(3-butanamidopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-2-méthylpropyl}-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(53)**



$C_{27}H_{43}Cl_2N_5O_6$ – M = 604,57 g.mol^{-1}

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-[1-(3-butanamidopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]propyl)-1-(2-chloroéthyl)aziridin-1-ium **(53')**



$C_{27}H_{43}ClN_5O_6^+$ - M = 569,11 g.mol^{-1}

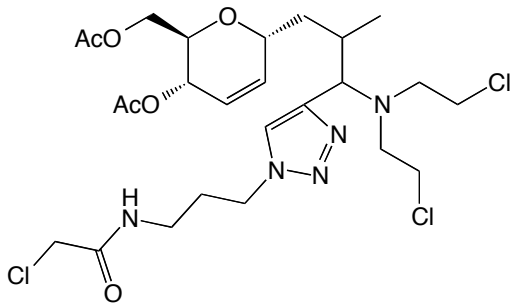
Le N-(3-azidopropyl)butanamide 41 (0,004 g, 0,021 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **47** pour conduire au triazole **53** avec un rendement de 4 % (0,4 mg) et au triazole **53'** avec un rendement de 96 % (10 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) du 53': δ (ppm) 0.9 (t, 3H, H_{22}), 1.3-2.4 (m, H_7, H_{16}, 2 x OCH_3, H_8, H_9, H_{20}, H_{21}), 2.6 (m, $H_{11'}$), 2.9 (m, H_{11}), 3.2 (m, 2H, H_{17}), 3.5 (m, H_{12}), 3.8-4.4 (m, 5H, H_2, H_1, H_6, H_{10}), 4.4 (m, 2H, H_{15}), 5.1 (m, 1H, H_3), 5.5-5.95 (m, 2H, H_5, H_4), 7.46 (s, 1H, H_{14})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) du 53': δ (ppm) 13.8 (C_{22}), 17.8 (C_9), 19.1 (C_{21}), 21.1 et 21.2 (OCH_3), 28.9 (C_{16}), 37.1 (C_{20}), 38.6 (C_8), 38.7 (C_{17}), 42.6 (C_{11}, C_{12}), 45 (C_{15}), 49.4 ($C_{11'}$), 62.4 (C_{10}), 62.7 (C_1), 65.7 (C_6), 68.8 (C_3), 69.3 (C_2)

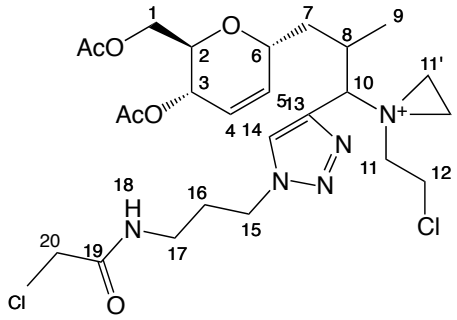
LC-MS du 53 : ELSD 4 %, R_t = 4,98 min ; *m/z* = 606,55 $[M+H]^+$; 628,65 $[M+Na]^+$
LC-MS du 53' : ELSD 96 %, R_t = 2,13 min ; *m/z* = 568,55 $[M(^{35}Cl)+H]^+$; 570,60 $[M(^{37}Cl)+H]^+$

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-{3-[bis(2-chloroéthyl)amino]-3-{1-[3-(2-chloroacétamido)propyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}-2-méthylpropyl}-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(54)**



$C_{25}H_{38}Cl_3N_5O_6$ – M = 610,96 g.mol^{-1}

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acetyloxy)-6-[(acetyloxy)methyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]methyl}-1-{1-[3-(2-chloroacetamido)propyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}propyl)-1-(2-chloroethyl)aziridin-1-ium **(54')**



$C_{25}H_{38}Cl_2N_5O_6^+$ - M = 575,50 g.mol^{-1}

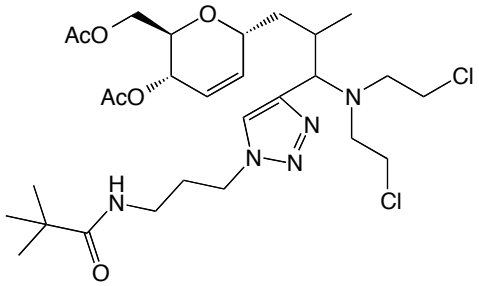
Le N-(3-azidopropyl)-2-chloroacetamide **42** (0,004 g, 0,021 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **47** pour conduire au triazole **54** avec un rendement de 8 % (0,9 mg) et au triazole **54'** avec un rendement de 73 % (8 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) du 54': δ (ppm) 1.3 (m, 3H, H_9), 1.3-2.4 (m, H_7, H_{16}, 2 x OCH_3, H_8), 2.57 (m, $H_{11'}$), 2.85 (m, H_{11}), 3.2 (m, 2H, H_{17}), 3.5 (m, H_{12}), 3.8-4.4 (m, 5H, H_2, H_1, H_6, H_{10}), 4.01 (s, 2H, H_{20}), 4.35 (m, 2H, H_{15}), 5.1 (m, 1H, H_3), 5.6-5.95 (m, 2H, H_5, H_4), 7.44 (s, 1H, H_{14})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) du 54': δ (ppm) 20.8 et 20.9 (OCH_3), 27.4 (C_{16}), 29.7 et 30.8 (C_7), 35.3 (C_8), 36.5 (C_{17}), 41.5 (C_{20}), 45 (C_{11}, C_{12}), 58.2 (C_{15}), 52.6 ($C_{11'}$), 61.7 (C_{10}), 63.8 (C_1), 64.9 (C_6), 68.4 (C_3), 69.4 (C_2), 165.3 (C_{19}), 169.6 (CH_3**C**OO)

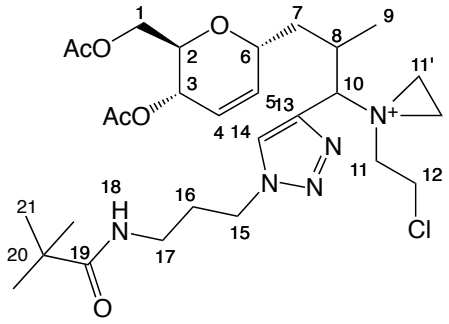
LC-MS du 54 : ELSD 8 %, R_t = 6 min ; *m/z* = 612,45 $[M+H]^+$; 634,60 $[M+Na]^+$
LC-MS du 54' : ELSD 73 %, R_t = 2,17 min ; *m/z* = 574,55 $[M(^{35}Cl)+H]^+$; 576,60 $[M(^{37}Cl)+H]^+$

Acétate de [(2R,3S,6R)-3-(acétyloxy)-6-{3-[bis(2-chloroéthyl)amino]-3-{1-[3-(2,2-diméthylpropanamido)propyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}-2- méthylpropyl}-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyle **(55)**



$C_{28}H_{45}Cl_2N_5O_6$ – M = 618,59 g.mol^{-1}

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-{1-[3-(2,2-diméthylpropanamido)propyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}propyl)-1-(2-chloroéthyl)aziridin-1-ium **(55')**



$C_{28}H_{45}ClN_5O_6^+$ - M = 583,14 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-2,2-dimethylpropanamide **43** (0,004 g, 0,021 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **47** pour conduire au triazole **55** avec un rendement de 14 % (1,6 mg) et au triazole **55'** avec un rendement de 86 % (9 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) du 55': δ (ppm) 1.10 (m, 3H, H_9), 1,18 (s, 9H, H_{21}) 1.3-2.4 (m, H_7, H_{16}, 2xOCH_3, H_8), 2.55 (m, $H_{11'}$), 2.85 (m, H_{11}), 3.2 (m, 2H, H_{17}), 3.5 (m, H_{12}), 3.9-4.4 (m, 5H, H_2, H_1, H_6, H_{10}), 4.4 (m, 2H, H_{15}), 5.1 (m, 1H, H_3), 5.6-5.95 (m, 2H, H_5, H_4), 6,1 (sb, 1H, H_{18}), 7.45 (s, 1H, H_{14})

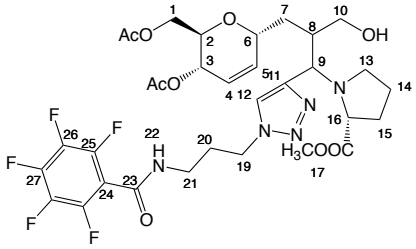
RMN ^{13}C ($CDCl_3$) du 55': δ (ppm) 18 (C_9), 20.8 et 20.9 (OCH_3), 25.8 (C_{16}), 29.7 et 29.8 (C_7), 34.7 (C_8), 36.6 (C_{17}), 44.7 (C_{12}), 48.2 (C_{15}), 51.6 ($C_{11'}$), 61.0 (C_{10}), 63.1 (C_1), 65.9 (C_6), 67.4 (C_3), 69.4 (C_2)

LC-MS du 55 : ELSD 14 %, R_t = 5,1 min ; *m/z* = 618,60 $[M+H]^+$; 640,65 $[M+Na]^+$
LC-MS du 55' : ELSD 86 %, R_t = 2,21 min ; *m/z* = 582,60 $[M(^{35}Cl)+H]^+$

Synthèse des triazoles sur le squelette 30 par chimie click (56 à 64)

On ajoute l'alcyne **30** et l'azoture (**34** à **43**) (1,1 éq.) à une suspension du catalyseur supporté (amberlist A-21.CuI, 0,1 éq., 8 mmol %, 3 mg) dans du dichlorométhane (0,3 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 48 heures. La solution est alors filtrée et la résine est lavée avec du dichlorométhane. Les filtrats sont rassemblés et concentrés pour donner les produits attendus.

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-3-hydroxy-1-(1-{3-[(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(56)**



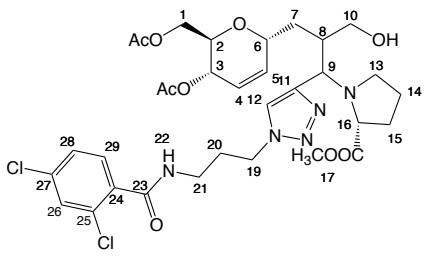
$C_{32}H_{38}F_5N_5O_9$ - M = 731,66 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-2,3,4,5,6-pentafluorobenzamide **34** (0,008 g, 0,028 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **30** (0,011 g, 0,025 mmol) pour conduire au triazole **56** avec un rendement de 66 % sous forme d'une huile verte.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) : 1.2-2.3 (m, H_7, H_8, H_{15}, H_{12},H_{20}), 2.06 (s, 6H, -OCOCH_3), 3.4-3.9 (m, H_2, H_{18} H_{21}), 4.2 (m, 2H, H_1), 4.4 (m, 1H, H_6), 4.5 (m, 2H, H_{19}), 5.2 (m, 1H, H_3), 5.6-5.9 (m, 2H, H_4, H_5), 6.6 (H_{22}), 7.6 (H_{12}), 7.8 (d, 2H, H_{25}), 7.95 (d, 2H, H_{26})

LC-MS : R_t = 2,8 min, ELSD 64 %, m/z = 732,15 $[M+H]^+$; 754,90 $[M+Na]^+$
R_t = 3,73 min, ELSD 36 %, m/z = 858,70 $[2M+4Cu]^{2+}/2$

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-(1-{3-[(2,5-dichlorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-3-hydroxypropyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(57)**



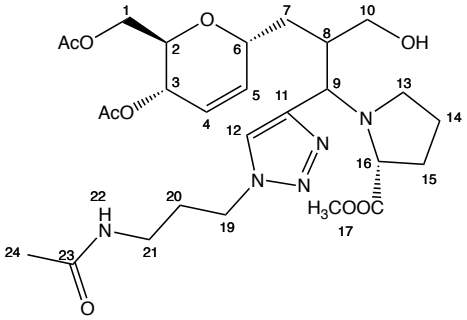
$C_{32}H_{41}Cl_2N_5O_9$ – M = 710,60 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-2,4-dichlorobenzamide **35** (0,009 g, 0,031 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **30** (0,013 g, 0,029 mmol) pour conduire au triazole **57** avec un rendement de 28 % sous forme d'une huile verte.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) : 1.5-2.35 (m, H_7, H_8, H_{14}, H_{15}, H_{16}), 1.7 (m, 2H, H_{20}), 2.07 (s, 6H, -OCO*CH*$_3$), 3.5-4.4 (m, H_2, H_1, H_6, H_{18}, H_{19}, H_{21}), 5.1 (m, 1H, H_3), 5.7-6.05 (m, 2H, H_4, H_5), 6.4 (sb, H_{22}), 7.4 (d, 1H, H_{28}), 7.45 (s, 1H, H_{25}), 7.7 (d, 1H, H_{27})

LC-MS : R_t = 3,594 min, ELSD 54 %, m/z = 710,85 $[M+H]^+$; 732,80 $[M+Na]^+$
R_t = 4,014 min, ELSD 46 %, m/z = 836,80 $[2M+4Cu]^{2+}/2$

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)methyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-[1-(3-acétamidopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-3-hydroxypropyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(58)**



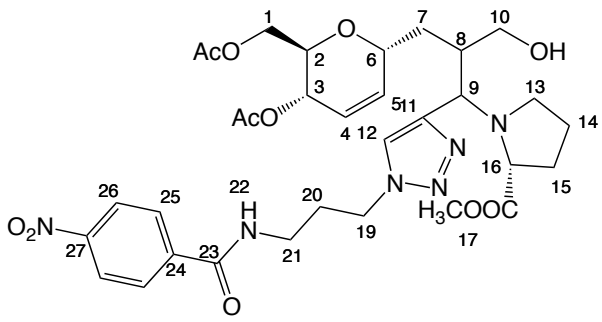
$C_{27}H_{41}N_5O_9$ – M = 579,64 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)acetamide **36** (0,004 g, 0,031 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **30** (0,013 g, 0,029 mmol) pour conduire au triazole **58** avec un rendement de 57 % sous forme d'une huile verte.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) : 1.4-2.3 (m, H_7, H_8, H_{14}, H_{15}, H_{16}), 1.9 (s, 3H, H_{24}) 2.1 (s, 6H, -OCO*CH*$_3$), 3.3-4.5 (m, H_2, H_1, H_6, H_{18}, H_{19}, H_{21}), 5.2 (m, 1H, H_3), 5.7-6.0 (m, 2H, H_4, H_5)

LC-MS : R_t = 2,083 min, ELSD 100 %, m/z = 580,75 $[M+H]^+$; 602,85 $[M+Na]^+$, 706,90 $[2M+4Cu]^{2+}/2$

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)methyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-3-hydroxy-1-(1-{3-[(4-nitrophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(59)**



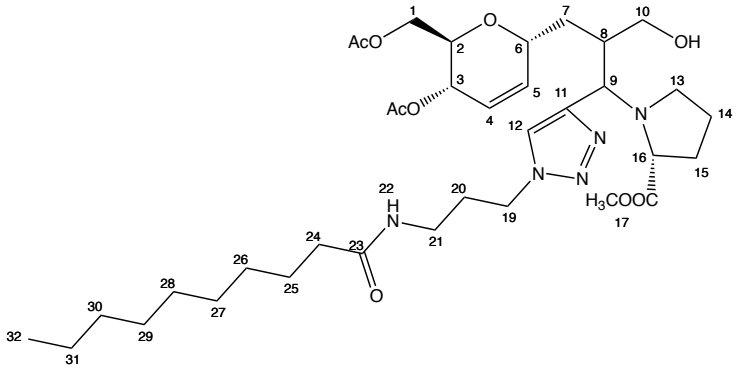
$C_{32}H_{42}N_6O_{11}$ – M = 686,71 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-4-nitrobenzamide **37** (0,007 g, 0,028 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **30** (0,013 g, 0,029 mmol) pour conduire au triazole **59** avec un rendement de 32 % sous forme d'une huile verte.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) : 1.3-2.3 (m, H_7, H_8, H_{14}, H_{15}, H_{16},H_{20}), 2.1 (s, 6H, -OCO*CH_3*), 3 (m, H_{13}), 3.5-4.5 (m, H_2, H_{18}, H_{19}, H_{21},H_1,H_6), 5.2 (m, 1H, H_3), 5.5-5.9 (m, 2H, H_4, H_5), 6.6 (H_{22}), 7.5 (H_{12}), 7.9 (d, 2H, H_{26}), 8.3 (d, 2H, H_{25})

LC-MS : R_t = 2,160 min, ELSD 64 %, m/z = 688,20 $[M+H]^+$; 709,95 $[M+Na]^+$
R_t = 3,317 min, ELSD 36 %, m/z = 813,75 $[2M+4Cu]^{2+}/2$

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-[1-(3-decanamidopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-3-hydroxypropyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(60)**



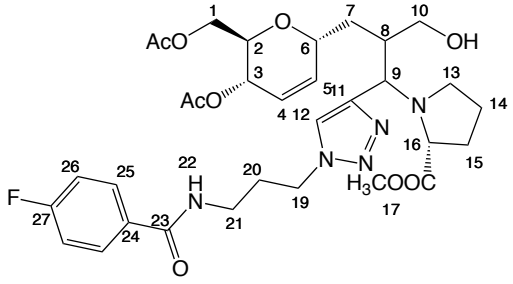
$C_{35}H_{57}N_5O_9$ – M = 691,86 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)decanamide **38** (0,008 g, 0,031 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **30** (0,013 g, 0,029 mmol) pour conduire au triazole **60** avec un rendement de 24 % sous forme d'une huile verte foncée.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) : 0.9 (t, 2H, H_{32}), 1.2-1.3 (m, 12H, H_{26}->H_{31}), 1.5-2.35 (m, H_7, H_8, H_{14}, H_{15}, H_{16}), 1.6 (m, 2H, H_{25}) 1.8 (m, 2H, H_{24}), 2.07 (s, 6H, -OCO*CH_3*), 2.1 (m, 2H, H_{20}), 3.2-4.4 (m, H_2, H_1, H_6, H_{18}, H_{19}, H_{21}), 5.2 (m, 1H, H_3), 5.5-6.0 (m, 2H, H_4, H_5)

LC-MS : R_t = 3,713 min, ELSD 67 %, m/z = 693,00 $[M+H]^+$; 715,25 $[M+Na]^+$
R_t = 4 min, ELSD 33 %, m/z = 819,00 $[2M+4Cu]^{2+}/2$

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]methyl}-1-(1-{3-[(4-fluorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-3-hydroxypropyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(61)**



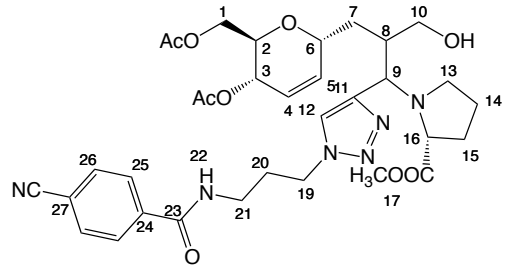
$C_{32}H_{42}FN_5O_9$ – M = 659,70 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-4-fluorobenzamide **39** (0,006 g, 0,028 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **30** (0,011 g, 0,025 mmol) pour conduire au triazole **61** avec un rendement de 48 % sous forme d'une huile verte.

RMN ^{1}H (CDCl$_3$) : δ (ppm) : 1.1-2.2 (m, H_7, H_8, H_{14}, H_{15}, H_{16},H_{20}), 2.06 (s, 6H, -OCO*CH$_3$*), 3 (m, H_{13}), 3.4-4.4 (m, H_2, H_{18} H_{21},H_1,H_6), 4.4 (m, 2H, H_{19}), 5.1 (m, 1H, H_3), 5.6-5.9 (m, 2H, H_4, H_5), 6.4 (H_{22}), 7.1 (H_{26}), 7.5 (H_{12}), 7.7 (H_{25})

LC-MS : R_t = 2,01 min, ELSD 79 %, m/z = 660,90 $[M+H]^+$; 683,00 $[M+Na]^+$
R_t = 2,9 min, ELSD 21 %, m/z = 786,90 $[2M+4Cu]^{2+}/2$

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-(1-{3-[(4-cyanophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-3-hydroxypropyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(62)**



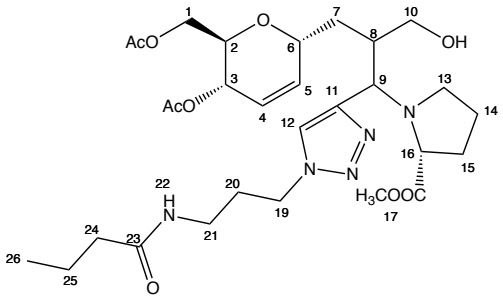
$C_{33}H_{42}N_6O_9$ – M = 666,72 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-4-cyanobenzamide **40** (0,006 g, 0,028 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **30** (0,011 g, 0,025 mmol) pour conduire au triazole **62** avec un rendement de 50 % sous forme d'une huile verte.

RMN ^{1}H (CDCl$_3$) : δ (ppm) : 1.2-2.3 (m, H_7, H_8, H_{14}, H_{15}, H_{12},H_{20}), 2.06 (s, 6H, -OCO*CH$_3$*), 3 (m, H_{14}), 3.4-3.9 (m, H_2, H_{14}, H_{18} H_{21}), 4.2 (m, 2H, H_1), 4.4 (m, 1H, H_6), 4.5 (m, 2H, H_{19}), 5.2 (m, 1H, H_3), 5.6-5.9 (m, 2H, H_4, H_5), 6.4 (H_{23}), 7.6 (H_{12})

LC-MS : R_t = 2,079 min, ELSD 83 %, m/z = 667,85 $[M+H]^+$; 689,90 $[M+Na]^+$
R_t = 2,813 min, ELSD 17 %, m/z = 793,90 $[2M+4Cu]^{2+}/2$

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-[1-(3-butanamidopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-3-hydroxypropyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(63)**



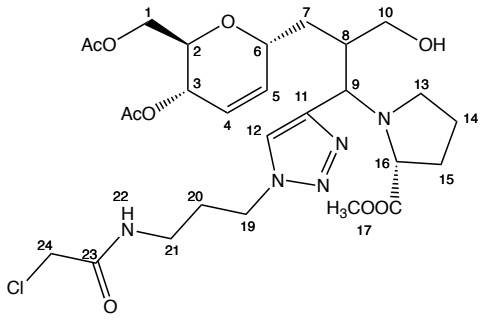
$C_{29}H_{45}N_5O_9$ – M = 607,70 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)butanamide **42** (0,005 g, 0,031 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **30** (0,013 g, 0,029 mmol) pour conduire au triazole **63** avec un rendement de 56 % sous forme d'une huile verte.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) : 0.9 (t, 2H, H_{26}), 1.5-2.35 (m, H_7, H_8, H_{14}, H_{15}, H_{16}), 1.6 (m, 2H, H_{25}) 1.7 (m, 2H, H_{20}), 2.07 (s, 6H, -OCO*CH$_3$*), 2.1 (m, 2H, H_{24}), 3.2-4.4 (m, H_2, H_1, H_6, H_{18}, H_{19}, H_{21}), 5.1 (m, 1H, H_3), 5.5-5.9 (m, 2H, H_4, H_5)

LC-MS : R_t = 2,091 min, ELSD 100 %, m/z = 608,65 $[M+H]^+$; 631,10 $[M+Na]^+$; 734,85 $[2M+4Cu]^{2+}/2$

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-{1-[3-(2-chloroacétamido)propyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}-3-hydroxypropyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(64)**



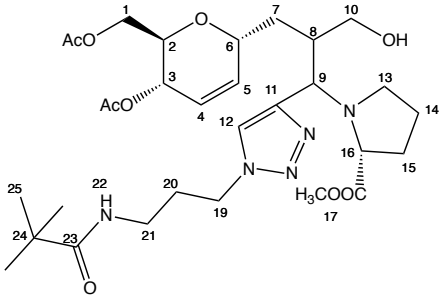
$C_{27}H_{40}ClN_5O_9$ - M = 614,09 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-2-chloroacétamide **43** (0,006 g, 0,031 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **30** (0,013 g, 0,029 mmol) pour conduire au triazole **64** avec un rendement de 46 % sous forme d'une huile verte.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) : 1.4-2.3 (m, H_7, H_8, H_{14}, H_{15}, H_{16}), 1.8 (m, 2H, H_{20}), 2.1 (s, 6H, -OCO*CH$_3$*), 3.5 (m, H_{19}, H_{21}), 4.05 (s, 2H, H_{24}), 3.6-4.4 (m, H_2, H_1, H_6, H_{18}), 5.1 (m, 1H, H_3), 5.7-5.95 (m, 2H, H_4, H_5), 6.7 (sb, H_{22})

LC-MS : R_t = 2,083 min, ELSD 100 %, m/z = 614,80 $[M+H]^+$; 636,75 $[M+Na]^+$; 741,05 $[2M+4Cu]^{2+}/2$

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-{1-[3-(2,2-diméthylpropanamido)propyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}-3-hydroxypropyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle (**65**)



$C_{30}H_{47}N_5O_9$ – M = 621,72 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-2,2-dimethylpropanamide **44** (0,006 g, 0,031 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **30** (0,013 g, 0,029 mmol) pour conduire au triazole **65** avec un rendement de 49 % sous forme d'une huile verte.

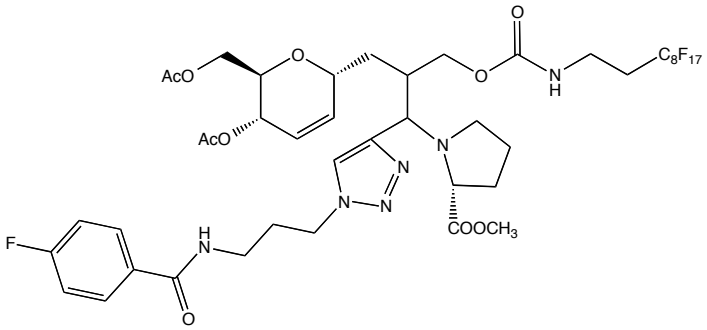
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) : 1.4-2.2 (m, H_7, H_8, H_{14}, H_{15}, H_{16}), 1.6 (m, 2H, H_{20}), 2.1 (s, 6H, -OCO*CH_3*), 3.4 (m, H_{19}, H_{21}), 3.6-4.5 (m, H_2, H_1, H_6, H_{18}), 4.4 (m, 2H, H_{19}), 5.1 (m, 1H, H_3), 5.65-5.95 (m, 2H, H_4, H_5), 7.5 (H_{12})

LC-MS : R_t = 2,076 min, ELSD 80 %, m/z = 622,90 $[M+H]^+$; 644,90 $[M+Na]^+$
R_t = 2,606 min, ELSD 20 %, m/z = 748,90 $[2M+4Cu]^{2+}/2$

Synthèse des triazoles sur le squelette 30 par chimie click (67 À 69)

On ajoute l'alcyne **31** (0,006 g, 0,006 mmol) et l'azoture (**38, 39** et **42**) (1,1 éq.) à une suspension du catalyseur supporté (amberlist A-21.CuI, 0,3 éq., 3 mg) dans un mélange 1/1 de dichlorométhane/HFE-7001 (0,3 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 72 heures. La solution est alors filtrée et la résine est lavée avec du dichlorométhane. Les filtrats sont rassemblés et concentrés pour donner les produits attendus.

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-(1-{3-[(4-fluorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-3-{3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecyl)carbamoyl]oxy}propyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(66)**

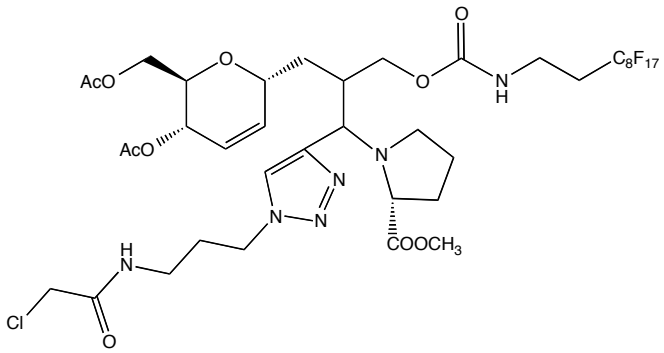


$C_{43}H_{46}F_{18}N_6O_{10}$ – M = 1148,83 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-4-fluorobenzamide **38** (0,002 g, 0,007 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **31** pour conduire au triazole **66** avec un rendement de 16 % sous forme d'une huile marron.

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 5,807 min, m/z = 1149,90 $[M+H]^+$; 1172,15 $[M+Na]^+$

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-{1-[3-(2-chloroacétamido)propyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}-3-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecyl)carbamoyl]oxy}propyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(67)**

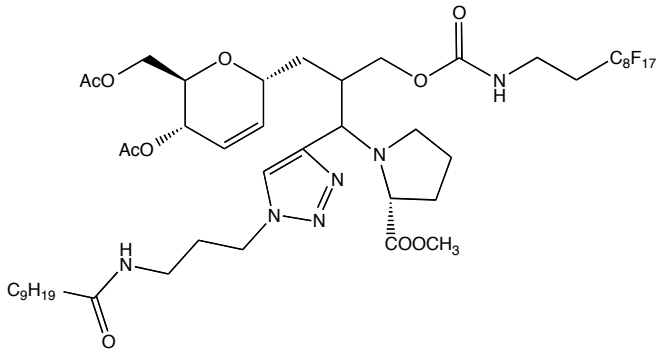


$C_{38}H_{44}ClF_{17}N_6O_{10}$ – M = 1103,22 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-2-chloroacétamide **39** (0,001 g, 0,007 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **31** pour conduire au triazole **67** avec un rendement de 17 % sous forme d'une huile marron.

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 5,565 min, m/z = 1103,20 $[M+H]^+$; 1125,95 $[M+Na]^+$

1-(2-{[(2R,5S,6R)-5-(acétyloxy)-6-[(acétyloxy)méthyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]méthyl}-1-[1-(3-decanamidopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-3-{[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecyl)carbamoyl]oxy}propyl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle **(68)**



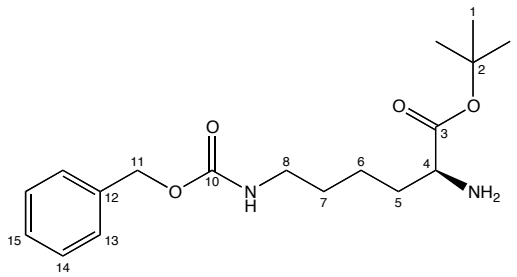
$C_{46}H_{61}F_{17}N_6O_{10}$ – M = 1180,98 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)decanamide **42** (0,002 g, 0,007 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **31** pour conduire au triazole **68** avec un rendement de 13 % sous forme d'une huile verte.

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 5,565 min, m/z = 1103,20 $[M+H]^+$; 1125,95 $[M+Na]^+$

Agents de contraste multimodaux et bifonctionnels

1,1-diméthyléthyle ester de N6-[(phénylméthoxy)carbonyl]-L-Lysine (**92**)



$C_{18}H_{28}N_2O_4$ - M = 336,43 g,mol^{-1}

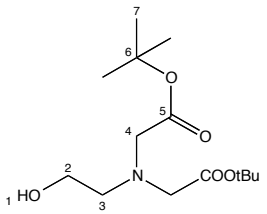
L'acide perchlorique (1,784 mL) est ajouté goutte-à-goutte à une suspension de H-Lys(Z)-OH (5 g, 17,837 mmol) dans 62 mL (89 mmol) d'acétate de tert-butyle. Après 20 h d'agitation à TA, 53 mL d'une solution saturée de Na_2CO_3 est ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel faisant précipiter les réactifs qui n'ont pas réagi. Le mélange est filtré puis est ajoutée une solution de NaOH 10 N jusqu'à ce que la phase aqueuse soit à pH 10. La phase organique est ensuite séparée, lavée avec de l'eau puis séchée sur $MgSO_4$. Le solvant est évaporé et on récupère le produit **92** sous forme d'huile jaune avec un rendement de 78 % (4,67 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.37 (s, 9H, H_1), 1.44 (m, 6H, H_5, H_6, H_7), 3.11 (m, 2H, H_8), 3.20 (m, 1H, H_4), 5.00 (sbr, 1H, H_9), 5.01 (s, 2H, H_{11}), 7.27 (m, 5H, H_{13}, H_{14}, H_{15})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 22.78 (C_6), 28.03 (C_1), 29.68 (C_7), 34.50 (C_5), 40.82 (C_8), 54.81 (C_4), 66.49 (C_{11}), 80.89 (C_2), 128.02 (C_{13}, C_{15}), 128.45 (C_{14}), 136.66 (C_{12}), 156.40 (C_{10}), 175.34 (C_3)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 2-4 min, m/z = 337,30 $[M+H]^+$; 359,70 $[M+Na]^+$

N,N-bis[(tert-butoxycarbonyl)méthyl]-2-hydroxyéthylamine (**93**)



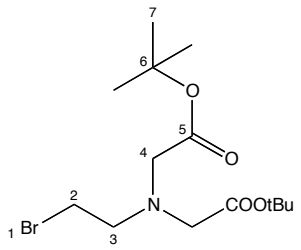
$C_{14}H_{27}NO_5$ - M = 289,37 g.mol^{-1}

Au bromoacétate de tert-butyle (29,404 g, 150,75 mmol) dissous dans 100 mL de DMF, on ajoute 18 g de $NaHCO_3$. Le mélange est refroidi à 0°C et de l'éthanolamine (4,092 g, 67 mmol) est ajoutée sur une période de 5 min. Le mélange est agité à 0°C pendant 30 min, puis pendant 22 h à TA. On dilue ensuite le milieu réactionnel avec 300 mL d'éther diéthylique et une solution saturée de $NaHCO_3$. La phase organique est séparée puis à nouveau lavée successivement avec une solution saturée de $NaHCO_3$ et de la saumure, séchées sur $MgSO_4$. Le filtrat est évaporé pour donner le produit brut **93** sous forme d'huile incolore (23,7 g, 122 %).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm)) 1.39 (s, 18H, H_7), 2.81 (t, 2H, H_3, *J* = 5.04 Hz), 3.37 (s, 4H, H_4), 3.46 (m, 2H, H_2)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 27.73 (C_7), 56.56 (C_4), 56.99 (C_3), 59.29 (C_2), 81.33 (C_6), 171.35 (C_5)

2-[(2-bromoéthyl)[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino]acétate de tert-butyle (**94**)



$C_{14}H_{26}BrNO_4$ - M = 352,27 g.mol^{-1}

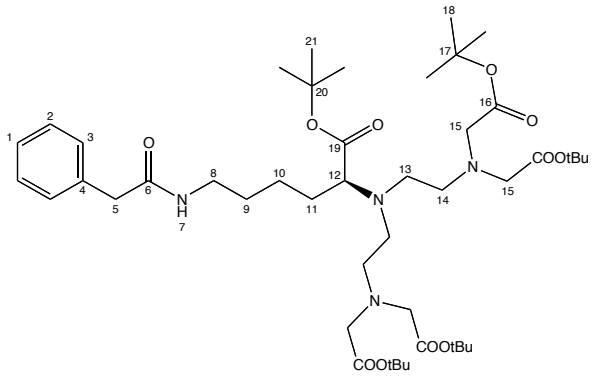
La N,N-bis[(tert-butoxycarbonyl)méthyl]-2-hydroxyéthylamine (23,971 g, 82,84 mmol) est dissoute dans 260 mL de DCM. On ajoute ensuite au milieu réactionnel de la triphénylphosphine (23,901 g, 91,124 mmol). Le mélangé est refroidi à 0°C puis on y additionne par fraction en 5 min le N-bromosuccinimide (16,218 g, 91,124 mmol). La réaction est maintenue à 0°C pendant 1h30 puis 12 h à TA. Le milieu est concentré puis trituré avec de l'éther diéthylique. Le milieu est filtré pour éliminer le résidu solide. La phase étherée est concentrée, puis purifiée sur cartouche de gel de silice pour conduire au produit bromé **94** sous forme de liquide jaune avec un rendement de 61 % (17,7 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm)): 1.41 (s, 18H, H_7), 3.08 (t, 2H, H_3, *J* = 7.55 Hz), 3.38 (t, 2H, H_2, J = 7.53 Hz), 3.42 (s, 4H, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 28.09 (C_7), 30.20 (C_2), 56.43 (C_2), 56.60 (C_3), 81.16 (C_6), 170.44 (C_5)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 6,087 min, m/z = 354,05 $[M+H]^+$; 376,15 $[M+Na]^+$

1,1-diméthyléthyle ester de N6-[(phenylméthoxy)carbonyl]-N2,N2-bis[2-[bis[2-(1,1-diméthyléthoxy)-2-oxoéthyl]amino]éthyl]-L-lysine (**95**)



$C_{46}H_{78}N_4O_{12}$ - M = 879,13 g,mol^{-1}

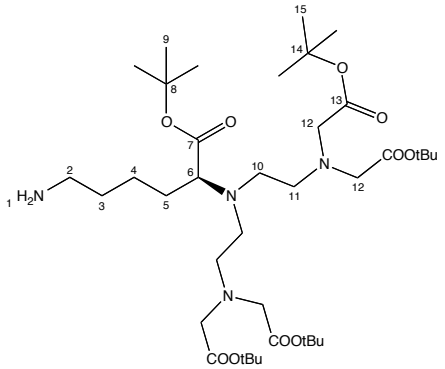
77 mL de tampon phosphate 2N à pH=8 sont ajoutés à une solution de 1,1-diméthyléthyle ester de N6-[(phenylméthoxy)carbonyl]-L-Lysine (4,7 g, 13,97 mmol) et de 2-[(2-bromoéthyl)[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino]acétate de tert-butyle (12,303 g, 34,926 mmol) dans 77 mL de CH_3CN. Le mélange est agité pendant 2 h vigoureusement. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est remplacée par 77 mL de tampon phosphate 2N à pH=8. Après 48 h, le mélange est séparé, et la phase organique est concentrée. Le résidu est dissous dans 58 mL de DCM, lavé 2 fois à l'eau, séché sur $MgSO_4$ et évaporé. Le produit brut est purifié sur cartouche de gel de silice pour donner le produit **95** sous forme d'huile jaune très visqueuse avec un rendement de 77 % (9,4 g),

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.26-1.71 (m, 6H, H_9, H_{10}, H_{11}), 1.44 (s, 45H, H_{18}, H_{21}), 2.64-2.81 (m, 8H, H_{13}, H_{14}), 3.1-3.26 (m, 3H, H_8, H_{12}), 3.42 (s, 8H, H_{15}), 5.08 (s, 2H, H_5), 5.1 (sbr, 1H, H_7), 7.3-7.4 (m, 5H, H_1, H_2, H_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 22.70 (C_{10}), 28.16 (C_{18}), 28.29 (C_{21}), 29.10 (C_{11}), 29.49 (C_9), 40.80 (C_8), 50.21 (C_{13}), 23.57 (C_{14}), 55.93 (C_{15}), 63.50 (C_{12}), 67.60 (C_5), 80.65 (C_{20}), 80.79 (C_{17}), 127.96 (C_1), 128.09 (C_3), 128.43 (C_2), 137.20 (C_4), 156.40 (C_6), 170.66 (C_{16}), 172.80 (C_{19})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 5 min, m/z = 880,30 $[M+H]^+$

(2S)-6-amino-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]hexanoate de tert-butyle (**96**)



$C_{38}H_{72}N_4O_{10}$ - M = 745,00 g,mol^{-1}

On ajoute du palladium sur charbon Pd/C (0,977 g, 36,45 mmol) à une solution de 1,1-diméthyléthyle ester de N6-[(phenylméthoxy)carbonyl]-N2,N2-bis[2-[bis[2-(1,1-diméthyléthoxy)-2-oxoéthyl]amino]éthyl]-L-lysine (8,011 g, 9,112 mmol) dans 45 mL de MeOH. Le mélange est agité 12 h à TA sous atmosphère H_2. Le mélange est filtré sur Millipore HA 45 μm et concentré sous vide. Le résidu est dissous dans une solution d'HCl 0,5N pendant 10 min. Une solution de NaOH 1N est ensuite ajoutée pour neutraliser le milieu puis la phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et concentrée. Le produit brut est purifié sur cartouche de gel de silice pour obtenir le dérivé Lysine-DTPA **96** sous forme d'une huile jaune très visqueuse avec un rendement de 90 % (6,1 g),

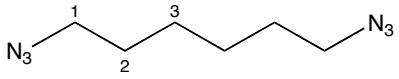
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.13-1.55 (m, 6H, H_3, H_4, H_5), 1.39 (s, 45H, H_{15}, H_9), 1.60 (m, 2H, H_2), 2.54-2.74 (m, 8H, H_{10}, H_{11}), 3.10 (m, 1H, H_6), 3.30 (s, 8H, H_{12})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 23.85 (C_4), 27.99 (C_{15}), 28.12 (C_9), 30.09 (C_5), 33.41 (C_3), 42.10 (C_2), 50.26 (C_{10}), 53.61 (C_{11}), 55.85 (C_{12}), 64.72 (C_6), 80.36 (C_8), 80.51 (C_{14}), 170.42 (C_{13}), 173.03 (C_7)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,692 min, m/z = 746 $[M+H]^+$

HRMS : Masse exacte = 767.51407 [M+Na] ; Masse trouvée = 767.51562 [M+Na]

1,6-diazidohexane (**98**)



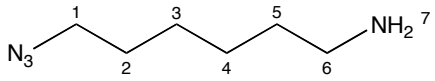
$C_6H_{12}N_6$ - M = 168,20 g.mol^{-1}

A une solution de 1,6-dibromohexane (6,5 mL, 40 mmol) dans 60 mL de DMF, est ajouté de l'azoture de sodium (7,8 g, 120 mmol, 3 éq). Le mélange est agité sous N_2 à 80°C pendant 20 h. Une fois la réaction terminée, de l'eau est ajoutée (400 mL). Puis le milieu est extrait 3 fois à l'éther (3x 100 mL). La phase organique est lavée 3 fois à l'eau (3x100 mL), séchée sur $MgSO_4$ et concentrée. Le composé diazidé **98** est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 92 % (6,59 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.38 (m, 4H, H_3), 1.59 (m, 4H, H_2), 3.25 (t, 4H, H_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 26.24 (C_3), 28.68 (C_2), 51.26 (C_1)

6-azidohexan-1-amine (**99**)



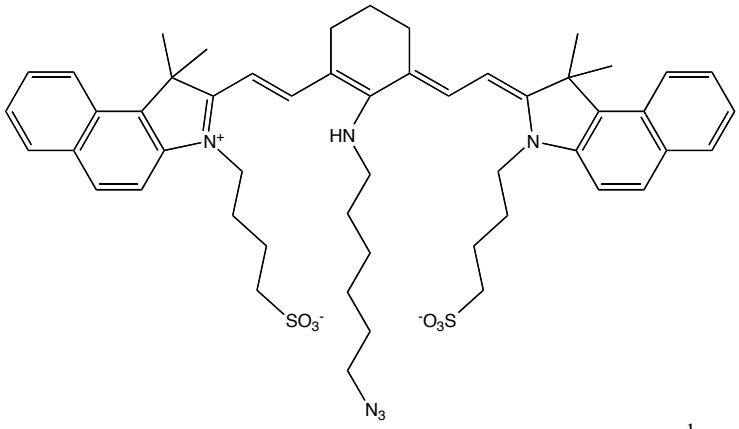
$C_6H_{14}N_4$ – M = 142,20 g.mol^{-1}

À une solution de 1,6-diazidohexane (6,59g, 39,18 mmol) dans un mélange éther (25 mL)/AcOEt (25 mL) et d'acide chlorhydrique à 5 % (40 mL), est ajouté de la triphénylphosphine (9,76 g, 34,98mmol, 0,95 éq.) par petite portion sur 1h à 0°C. Le mélange est agité pendant 24 h à TA. La phase organique est retirée et la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (2x50 mL). La phase aqueuse résultante est basifiée avec de la soude 2M jusqu'à un pH de 10, puis extraite de nouveau avec du dichlorométhane (3x100 mL). La phase organique est alors séchée sur $MgSO_4$ puis concentrée. Le composé amino-azoture **99** est obtenu avec un rendement de 70 % (3,91 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.29 (m, 4H, H_3, H_4), 1.37 (m, 2H, H_5), 1.52 (m, 2H, H_2, J = 7.22 Hz), 2.60 (t, 2H, H_6, J = 6.88 Hz), 3.18 (t, 2H, H_1, J = 6.91 Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 26.26 (C_3), 26.41 (C_4), 28.64 (C_5), 33.16 (C_1), 41.73 (C_6), 51.21 (C_1)

2-[(E)-2-[(3E)-2-[(6-azidohexyl)amino]-3-{2-[(2Z)-1,1-diméthyl-3-(4-sulfonatobutyl)-1H,2H,3H-benzo[e]indol-2-ylidène]éthylidène}cyclohex-1-èn-1-yl]éthènyl]-1,1-diméthyl-3-(4-sulfonatobutyl)-1H-benzo[e]indol-3-ium (**101**)



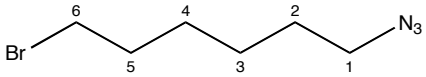
$C_{53}H_{64}N_3NaO_8S_2$ – M = 934,21 g.mol^{-1}

De la triéthylamine (0,061 g, 0,605 mmol) et la 6-azidohexan-1-amine (0,019 g, 0,133 mmol) sont ajoutées à une solution de IR-820 (0,1 g ; 0,121 mmol) dans du DMF (4,23 mL) sous N_2. La solution verte est agitée plusieurs heures à une température de 85°C. La solution verte tourne à une solution bleue. Le solide bleu est ensuite évaporé puis purifié sur cartouche de gel de silice (AcOEt/MeOH 70/30). On obtient le produit **101** sous forme d'un solide bleu avec un rendement de 18 % (0,12 g).

LC-MS: ELSD 45 %, R_t = 4,3 min, m/z= 966 $[M+MeCN]^+$

IR: Pour le $\mathbf{N_3}$: 2086,6 cm^{-1} et les $\mathbf{SO_3^-}$:1044,26 cm^{-1}

1-azido-6-bromohexane (**102**)



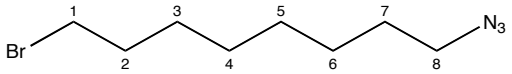
$C_6H_{12}BrN_3$ - M = 205,02 g.mol^{-1}

Une solution de 1,6-dibromohexane (5 g, 20,494 mmol) et d'azoture de sodium (1,332 g, 20,494 mmol) dans 38 mL de DMF est chauffée à 80°C pendant 16 h. A la fin de la réaction, on concentre le tout et on extrait la phase organique par un mélange d'eau et d'acétate d'éthyle. La solution organique est séchée ($MgSO_4$) puis évaporée. L'huile résultante est purifiée sur cartouche de gel de silice pour conduire au produit **102** sous forme d'un liquide jaune avec un rendement de 83 % (3,5g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.43-1.49 (m, 4H, H_3, H_4), 1.63 (m, 2H, H_5), 1.89 (m, 2H, H_2), 3.29 (m, 2H, H_6), 3.45 (m, 2H, H_1)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 25.92 (C_3), 27.31 (C_4), 28.72 (C_2), 31.91 (C_6), 33.61 (C_5), 51.31 (C_1)

1-azido-8-bromooctane (**103**)



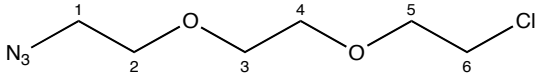
$C_8H_{16}BrN_3$ - M = 234,14 g.mol^{-1}

Une solution de 1,8-dibromooctane (5 g, 18,381 mmol) et d'azoture de sodium (1,195 g, 18,381 mmol) dans 35 mL de DMF est chauffée à 80°C pendant 16 h. Une fois la réaction finie, on concentre le tout et on extrait la phase organique par un mélange d'eau et d'acétate d'éthyle. La solution organique est séchée ($MgSO_4$) puis évaporée. L'huile résultante est purifiée sur cartouche de gel de silice pour conduire au produit **103** sous forme d'un liquide jaune avec un rendement de 83 % (3,5 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.30-1.52 (m, 8H, H_3, H_4, H_5, H_6), 1.58 (m, 2H, H_7), 1.86 (m, 2H, H_2), 3.26 (t, 2H, J = 6.89 Hz, H_8), 3.41 (t, 2H, J = 7.59 Hz, H_1)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 26.60 (C_6), 28.04 (C_3), 28.60 (C_4), 28.79 (C_5), 28.99 (C_7), 32.74 (C_1), 33.95 (C_2), 51.42 (C_8)

1-azido-2-[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthane (**104**)



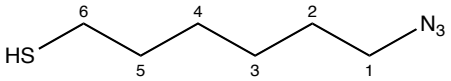
$C_6H_{12}ClN_3O_2$ - M = 193,63 g.mol^{-1}

Le 1-chloro-2-[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthane (5,612 g, 30 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution d'azoture de sodium (1,95 g, 30 mmol) dans 20 mL de DMSO. Le milieu réactionnel est chauffé à 90°C pendant 16 h. Le mélange est ensuite versé dans 30 mL d'eau glacée et extrait avec de l'éther diéthylique. La phase éthérée est lavée abondamment avec de l'eau puis séchée sur $MgSO_4$ et évaporée. Le produit **104** est obtenu sous la forme d'un liquide jaune avec un rendement quantitatif (6,04 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 3.39 (t, 2H, J = 4.98 Hz, H_2), 3.62-3.77 (m, 8H, H_2+H_4+H_1+H_6), 3.79 (t, 2H, J = 5.57 Hz, H_5)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 42.8 (C_6), 50.7 (C_1), 70.1 (C_2), 70.7 (C_3+C_4), 71.4 (C_5)

6-azidohexane-1-thiol (**105**)



$C_6H_{13}N_3S$ - M = 159,25 g.mol^{-1}

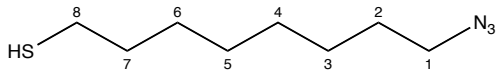
Le 1-azido-6-bromohexane (0,5 g, 2,439 mmol) est ajouté à une solution de thiourée (0,195 g, 2,561 mmol) dans 5 mL d'éthanol. Le milieu est chauffé à 80°C pendant 16 h. Au milieu, est ensuite ajouté 6 mL de NaOH 3N. Après 4 h d'agitation à 100°C, le milieu

réactionnel est neutralisé par une solution d'HCl à 10 % et est agité pendant 20 min à TA. Tous les produits volatils sont évaporés. Le produit brut est extrait avec du DCM (4 fois), puis séché sur $MgSO_4$, Le produit **105** est obtenu sous forme d'un liquide jaune avec un rendement de 48 % (0,18 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.27-1.36 (m, 5H, H_3+H_4+SH), 1.53-1.64 (m, 4H, H_2+H_5), 2.62 (t, 2H, J = 7.28 Hz, H_6), 3.22 (t, 2H, J = 6.73 Hz, H_1)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 26.3 (C_3), 27.98 (C_4), 28.7 (C_2), 29.0 (C_5), 38.9 (C_6) : 51.3 (C_1)

8-azidooctane-1-thiol (**106**)



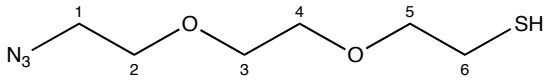
$C_8H_{17}N_3S$ - M = 187,31 g.mol^{-1}

Le 1-azido-8-bromooctane (0,5 g, 2,136 mmol) est ajouté à une solution de thioiurée (0,171 g, 2,242 mmol) dans 5 mL d'éthanol. Le milieu est chauffé à 80°C pendant 16 h. Au milieu, est ensuite ajouté 5,3 mL de NaOH 3N. Après 4 h d'agitation à 100°C, le milieu réactionnel est neutralisé par une solution d'HCl à 10 % et est agité pendant 20 min à TA. Tous les produits volatils sont évaporés. Le produit brut est extrait avec du DCM (4 fois), puis séché sur $MgSO_4$. Le produit **106** est obtenu sous forme d'un liquide jaune avec un rendement de 65 % (0,26 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.29 (m , 9H, H_3, H_4, H_5, H_6, H_9), 1.51-1.65 (m, 4H, H_2, H_7), 2.63 (t, 2H, J = 7.44 Hz, H_8), 3.21 (t, 2H, J = 6.89 Hz, H_1)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 24.6 (C_3), 26.2 (C_6); 28.4 (C_5), 28.8 (C_4), 29.2 (C_2), 39.1 (C_8), 51.4 (C_1)

1-azido-2-[2-(2-sulfanyléthoxy)éthoxy]éthane (**107**)



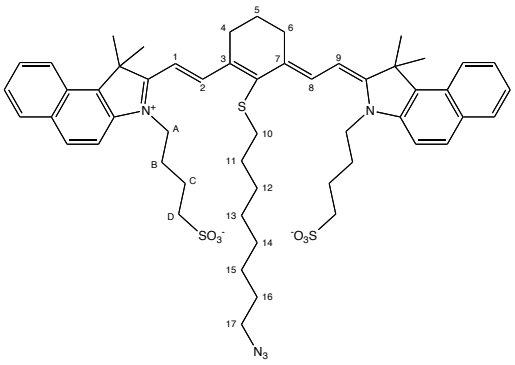
$C_6H_{13}N_3O_2$ - M = 191,251 g.mol^{-1}

Le 1-azido-2-[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthane (0,5 g, 2,582 mmol) est ajouté à une solution de thiourée (0,206 g, 2,711 mmol) dans 6 mL d'éthanol. Le milieu est chauffé à 80°C pendant 16 h. Au milieu, est ensuite ajouté 6,1 mL de NaOH 3N. Après 4 h d'agitation à 100°C, le milieu réactionnel est neutralisé par une solution d'HCl à 10 % et est agité pendant 20 min à TA. Tous les produits volatils sont évaporés. Le produit brut est extrait avec du DCM (4 fois) puis séché sur $MgSO_4$. Le produit **107** est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 78 % (0,38g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 2.62 (t, 2H, J = 7.65 Hz, H_2), 3.27 (t, 2H, J = 5.31 Hz, H_5), 3.47-3.57 (m, 8H, H_1, H_3, H_4, H_6)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 31.72 (C_6), 50.60 (C_1), 69.91-69.97 (C_2), 70.18-70.25 (C_3), 70.61 (C_4), 70.01 (C_5)

2-[(E)-2-[(3E)-2-[(8-azidooctyl)sulfanyl]-3-{2-[(2E)-1,1-diméthyl-3-(4-sulfonatobutyl)-1H,2H,3H-naphtho[2,1-b]pyrrol-2-ylidene]éthylidene}cyclohex-1-en-1-yl]éthenyl]-3,3-diméthyl-1-(4-sulfonatobutyl)-3H-naphtho[1,2-b]pyrrol-1-ium (**109**)

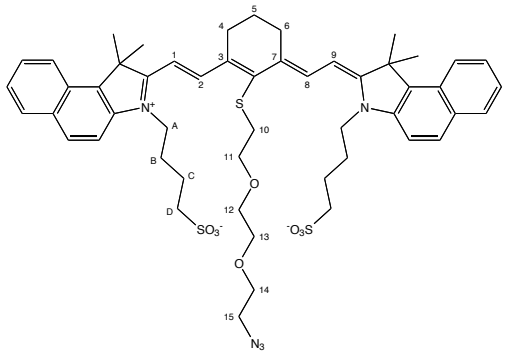


$C_{54}H_{66}N_5O_6S_3$ - M = 977,33 g.mol^{-1}

On ajoute à une solution d'IR-820 (0,05 g, 0,06 mmol) dans 1 mL de DMF le 8-azidooctane-1-thiol (0,014 g, 0,073 mmol) et de la triéthylamine (0,007 g, 0,073 mmol). La solution verte est agitée à l'abri de la lumière pendant 48 h. Le milieu réactionnel est évaporé puis purifié sur cartouche de gel de silice pour au conduire au produit **109** avec un rendement de 14 %.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.29 (m, H_{12}, H_{13}, H_{14}, H_{15}), 1.5-1.7 (m, H_{11}, H_{16}), 1.75-1.9 (m, 8H, H_b, H_c), 2.78 (m, 4H, H_a), 3.21 (t, 2H, H_{17}), 3.5-3.7 (m, H_{12}, H_{13}, H_{15}), 3.7 (m, 2H, H_{10}), 4.35 (m, 4H, H_d), 6.25 (d, 2H, H_1, H_9), 7.3-8.4 (14H, m, H_{arom}, H_2, H_8)

2-[(E)-2-[(3E)-2-({2-[2-(2-azidoéthoxy)éthoxy]éthyl}sulfanyl)-3-{2-[(2E)-1,1-diméthyl-3-(4-sulfonatobutyl)-1H,2H,3H-naphtho[2,1-b]pyrrol-2-ylidene]éthylidene}cyclohex-1-en-1-yl]éthenyl]-3,3-diméthyl-1-(4-sulfonatobutyl)-3H-naphtho[1,2-b]pyrrol-1-ium (**110**)

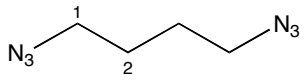


$C_{52}H_{62}N_5O_8S_3$ - M = 981,27 g.mol^{-1}

On ajoute à une solution d'IR-820 (0,05 g, 0,06 mmol) dans 1 mL de DMF le 1-azido-2-[2-(2-sulfanyléthoxy)éthoxy]éthane (0,014 g, 0,073 mmol) et de la triéthylamine (0,007 g, 0,073 mmol). La solution verte est agitée à l'abri de la lumière pendant 48 h. Le milieu réactionnel est évaporé puis purifié sur cartouche de gel de silice pour conduire au produit **110** sous forme d'un solide vert avec un rendement de 29 %.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.75-1.9 (m, 8H, H_b, H_c), 2.78 (m, 4H, H_a), 3.05 (m, 2H, H_{14}), 3.35 (m, 2H, H_{11}), 3.5-3.7 (m, H_{12}, H_{13}, H_{15}), 3.8 (m, 2H, H_{10}), 4.35 (m, 4H, H_d), 6.25 (d, 2H, H_1, H_9), 7.3-8.4 (14H, m, H_{arom}, H_2, H_8)

1,4-diazidobutane (**112**)



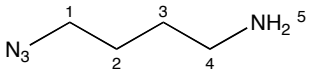
$C_4H_8N_6$ – M = 140,15 g.mol^{-1}

On ajoute de l'azoture de sodium (7,8 g, 120 mmol) à une solution de 1,4-dibromobutane (4,78 mL, 40 mmol) dans 60 mL de DMF. Le mélange est agité sous N_2 à 80°C pendant 20 h. À la fin de la réaction, 400 mL d'eau sont ajoutés et la phase aqueuse est extraite avec 3 fois à l'éther (3x 100 mL). La phase organique est lavée 3 fois à l'eau (3x100 mL), séchée sur $MgSO_4$ et évaporée. Le produit diazidé **112** est obtenu sous forme d'une huile avec un rendement de 88 % (4,93 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.65 (m, 4H, H_2), 3.30 (m, 4H, H_1)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 26.13 (C_1), 50.89 (C_2)

4-azidobutan-1-amine (**113**)



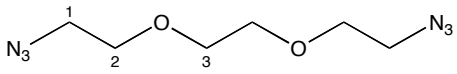
$C_4H_{10}N_4$ – M = 114,15 g.mol^{-1}

On ajoute de la triphénylphosphine (9,17 g, 34,98 mmol, 0,95 éq.) par petite portion sur 1 h à 0°C à une solution de 1,4-diazidobutane (5,16 g, 36,82 mmol) dans un mélange 1/1 éther/AcOEt (46 mL) et d'acide chlorhydrique 5 % (36,8 mL), est ajouté. Le mélange est agité pendant 24 h à TA. La phase organique est retirée et la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (2 x 50 mL). La phase aqueuse résultante est basifiée avec de la soude 2M jusqu'à un pH de 10, puis extraite de nouveau avec du dichlorométhane (3 x 100 mL). La phase organique est alors séchée sur $MgSO_4$ puis concentrée. Le composé amino-azoture **113** est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 95 % (3,97 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.39 (m, 2H, H_2), 1.51 (m, 2H, H_3) 2.61 (tt, 2H, H_4, J = 6.82 Hz), 3.19 (t, 2H, H_1, J = 6.86 Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 26.15 (C_2), 30.39 (C_3), 41.37 (C_4), 51.18 (C_1)

1-azido-2-[2-(2-azidoéthoxy)éthoxy]éthane (**114**)



$C_6H_{12}N_6O_2$ - M = 174,2 g.mol^{-1}

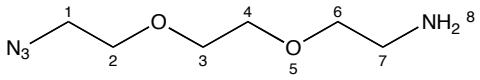
Le 1-chloro-2-[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthane (5,612 g, 30 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution d'azoture de sodium (4,29 g, 66 mmol) dans 20 mL de DMSO. Le milieu réactionnel est chauffé à 90°C pendant 16 h. Le mélange est ensuite versé dans 30 mL

d'eau glacée et extrait avec de l'éther diéthylique. La phase éthérée est lavée abondamment avec de l'eau puis séchée sur $MgSO_4$ et évaporée. Le produit **114** est obtenu sous la forme d'un liquide jaune avec un rendement quantitatif (6,5 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 2.36 (t, 4H, J = 5.30 Hz, H_2), 3.64-3.67 (m, 8H, H_1+H_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 30.6 (C_1), 70.1 (C_2), 70.7 (C_3)

1-(2-aminoéthoxy)-2-(2-azidoéthoxy)éthane (**115**)



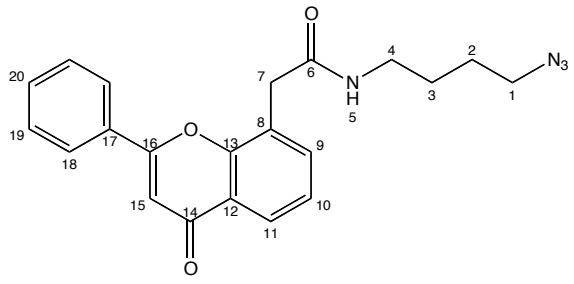
$C_6H_{14}N_4O_2$ - M = 174,20 g.mol^{-1}

On ajoute de la triphenylphosphine (7,711 g, 29,4 mmol) par petite portions sur 1 h à 0°C à une solution de 1-azido-2-[2-(2-azidoéthoxy)éthoxy]éthane (5,226 g, 30 mmol) dans un mélange 1/1 d'éther diéthylique et d'AcOEt (40 mL) et de 30 mL d'une solution d'HCl 1N. Le mélange est agité pendant 24 h à température ambiante. La phase organique est éliminée et la phase aqueuse est extraite 2 fois avec du DCM pour éliminer l'oxyde de triphenylphosphine. La phase organique est jetée. La phase aqueuse est neutralisée avec une solution de NaOH 10M puis elle est extraite au DCM (3x). La phase organique est séchée ($MgSO_4$) et concentrée pour donner un liquide jaune avec un rendement de 83 % (4,3 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.94 (m, 2H, H_7), 2.82 (td, 2H, J = 5.25 et 1.65 Hz, H_6), 3.35 (t, 2H, J = 5.19 Hz, H_2), 3.48 (td, 2H, J = 5.20 et 1.72 Hz, H_5), 3.58-3.63 (m, 6H, H1, H_3, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 41.61 (C_6), 50.61 (C_1), 70.00 (C_2), 70.24 (C_4), 70.59 (C_3), 73.23 (C_5)

N-(4-azidobutyl)-2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamide (**116**)



$C_{21}H_{20}N_4O_3$ - M = 376,41 g.mol^{-1}

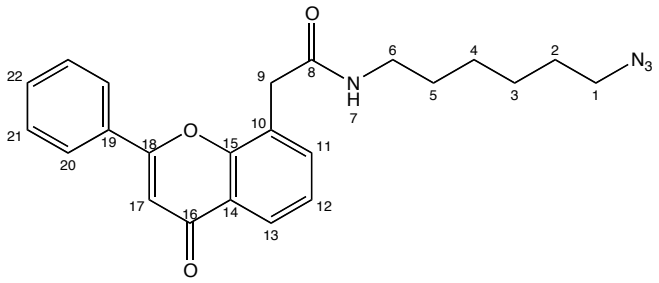
De l'EDC (0,034 g, 0,178 mmol) et une quantité catalytique de HOBt sont ajoutés à une solution d'acide flavone-8-acétique (0,05 g, 0,178 mmol) dans 0,5 mL de DCM. À cette solution homogène maintenue à 0°C sous azote, le 4-azidobutan-1-amine (0,026 g, 0,232 mmol) dilué dans 0,2 mL de DCM est lentement additionné. La réaction est agitée à 0°C durant 1 h puis est remise lentement à TA jusqu'à la fin du couplage (48 h). Le milieu est alors dilué dans du DCM et la phase organique est lavée à l'eau puis séchée sur $MgSO_4$ avant d'être évaporée. Le résidu brut est ensuite purifié sur cartouche de gel de silice pour conduire au produit de couplage **116** sous forme de solide jaune avec un rendement de 74 % (0,05 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.37-1.48 (m, 4H, H_2, H_3), 3.07 (t, 2H, *J* = 6.62 Hz, H_1), 3.20 (m, 2H, H_4), 3.84 (s, 2H, H_7), 6.15 (t, 1H, *J* = 6.11 Hz, H_5), 6.65 (s, 1H, H_{15}), 7.24 (m, 1H, H_{20}), 7.39-7.49 (m, 3H, H_{19}, H_{10}), 7.54 (d, 1H, *J* = 7.28 Hz, H_9), 7.79 (d, 2H, *J* = 9.46 Hz, H_{18}), 7.97 (d, 1H, *J* = 9.46 Hz, H_{11})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 26.12 (C_3), 26.80 (C_2), 38.05 (C_7), 39.17 (C_4), 50.89 (C_1), 107.32 (C_{15}), 124.06 (C_8), 124.91 (C_{10}), 125.18 (C_{17}), 126.192 (C_{19}), 129.195 (C_{20}), 135.28 (C_9), 154.25 (C_{13}), 163.07 (C_{17}), 169.65 (C_8), 178.26 (C_{14})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,5 min, m/z = 377,35 $[M+H]^+$, 399,40 $[M+Na]^+$

N-(6-azidohexyl)-2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamide (**117**)



$C_{23}H_{24}N_4O_3$ - M = 404,46 $g.mol^{-1}$

De l'EDC (0,034 g, 0,178 mmol) et une quantité catalytique de HOBt sont ajoutés à une solution d'acide flavone-8-acétique (0,05 g, 0,178 mmol) dans 0,5 mL de DCM. A cette solution homogène maintenue à 0°C sous argon, le 6-azidohexan-1-amine (0,028 g, 0,196 mmol) dilué dans 0,2 mL de DCM est lentement additionné. La réaction est agitée à 0°C durant 1 h puis est remise lentement à TA jusqu'à la fin du couplage (12 h). Le milieu est alors dilué dans du DCM et la phase organique est lavée à l'eau puis séchée sur $MgSO_4$ avant d'être évaporée. Le résidu brut est ensuite purifié sur cartouche de gel de silice pour conduire au produit de couplage **117** sous forme de solide jaune avec un rendement de 83 % (0,06 g).

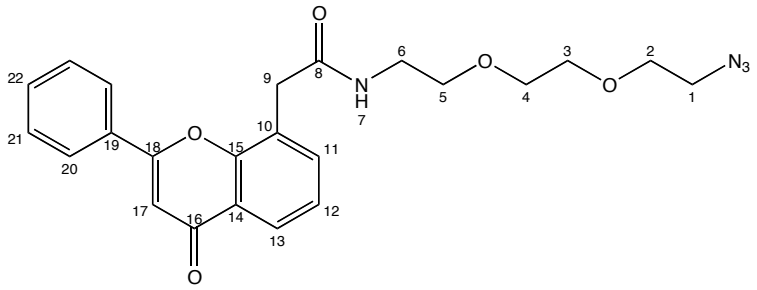
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.20-1.28 (m, 2H, H_3, H_4), 1.40-1.46 (m, 4H, H_2, H_5), 3.18 (t, 2H, *J* = 6.67 Hz, H_1), 3.26 (m, 2H, H_6), 3.95 (s, 2H, H_9), 5.96 (t, 1H, *J* = 6.15 Hz, H_7), 6.85 (s, 1H, H_{17}), 7.35 (m, 1H, H_{22}), 7.45-7.55 (m, 3H, H_{11}, H_{21}), 7.66 (m, 2H,H_{12}), 7.95 (d, 1H, *J* = 9.46 Hz, H_{20}), 8.17 (d, 1H, *J* = 9.46 Hz, H_{13})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 26.30 (C_3, C_4), 28.63 (C_5), 29.41 (C_2), 38.18 (C_9), 39.70 (C_6), 51.25 (C_1), 107.37 (C_{17}), 124.15 (C_{10}), 124.97 (C_{23}), 125.17 (C_{12}), 126.23 (C_{20}), 129.24 (C_{21}), 131.44 (C_{13}), 131.90 (C_{19}), 135.33 (C_{11}), 154.30 (C_{14}), 163.11 (C_{15}), 169.58 (C_8), 178.31 (C_{16})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,804 min , m/z = 405,4 $[M+H]^+$; 427,50 $[M+Na]^+$

HRMS : Masse exacte = 427.17406 [M+Na] ; Masse trouvée = 427.17410 [M+Na]

N-{2-[2-(2-azidoethoxy)éthoxy]éthyl}-2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamide (**118**)



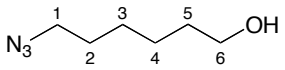
$C_{23}H_{24}N_4O_5$ - M = 436,46 g.mol^{-1}

De l'EDC (0,014 g, 0,071 mmol) et une quantité catalytique de HOBt sont ajoutés à une solution d'acide flavone-8-acétique (0,02 g, 0,071 mmol) dans 0,5 mL de DCM. À cette solution homogène maintenue à 0°C sous argon, le 1-(2-aminoéthoxy)-2-(2-azidoéthoxy)éthane (0,016 g, 0,093 mmol) dilué dans 0,2 mL de DCM est lentement additionné. La réaction est agitée à 0°C durant 1 h puis est remise lentement à TA jusqu'à la fin du couplage (48 h). Le milieu est alors dilué dans du DCM et la phase organique est lavée à l'eau puis séchée sur $MgSO_4$ avant d'être évaporée. Le produit est ensuite purifié sur cartouche de gel de silice pour conduire au produit de couplage **118** sous forme de solide jaune avec un rendement de 72 % (0,022 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 3.34 (t, 2H, *J* = 6.60 Hz, H_2), 3.49-3.53 (m, 8H, H_1, H_3, H_4, H_6), 3.63 (t, 2H, H_5), 3.96 (s, 2H, H_9), 6.20 (sbr, 1H, H_7), 6.86 (s, 1H, H_{16}), 7.42 (dd, 1H, H_{12}), 7.55-7.59 (m, 3H, H_{20}, H_{21}), 7.68 (d, 1H, *J* = 7.20 Hz, H_{11}), 7.96 (m, 2H, H_{19}), 8.20 (d, 1H, *J* = 9.46 Hz, H_{13})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 38.03 (C_9), 40 (C_6), 50 (C_1), 69.77 (C_2), 70.18 (C_3, C_4), 70.41 (C_5), 108.00 (C_{16}), 124.91 (C_{12}), 125.20 (C_{22}), 126.29 (C_{20}), 129.25 (C_{19}), 131.79 (C_{13}), 135.38 (C_{11}), 170.00 (C_{18})

6-azido-hexan-1-ol (**119**)



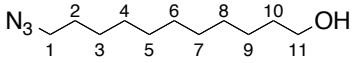
$C_6H_{13}N_3O$ - M = 149,19 g.mol^{-1}

On additionne doucement une solution d'azoture de sodium (6,32 g, 97,217 mmol) dans 30 mL d'eau à une solution de 6-bromohexan-1-ol (5 g, 27,776 mmol) dans 30 mL d' acétone à 0°C. Le mélange est ensuite chauffé à 60°C durant 12 h. Le milieu réactionnel est évaporé pour éliminer l'acétone. La solution auqueuse résultante est extraite 3 fois avec du DCM. La phase organique est lavée par une solution de bicarbonate de sodium à 10 % et de l'eau, séchée par du $MgSO_4$ et filtrée. Le produit **119** est obtenu sous forme de liquide jaune avec un rendement de 85 % (3,5 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.34-1.42 (m, 4H, H_3, H_4), 1.49-1.63 (m, 4H, H_2, H_5), 2.70 (sb, 1H, H_7), 3.24 (t, 2H, *J* = 6.85 Hz, H_1), 3.57 (m, 2H, H_6)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 25.32 (C_3), 26.49 (C_4), 28.77 (C_2), 32.46 (C_5), 51.34 (C_1), 62.41 (C_6)

11-azidoundecanol (**120**)



$C_{11}H_{23}N_3O$ - M = 213,32 g.mol-1

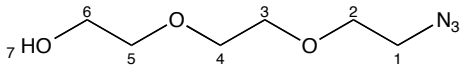
On additionne de l'azoture de sodium (5,916 g, 91 mmol) à un mélange de 11-bromoundecanol (6,502 g, 26 mmol) dans 88 mL de CH_3CN. Le mélange est chauffé à 60°C durant 12 h puis concentré. Le résidu est repris dans du DCM et lavé 2 fois avec de la saumure. La phase organique est séchée ($MgSO_4$) puis évaporée. Le produit azoturé **120** est obtenu sous forme de liquide jaune avec un rendement de quantitatif (5,4 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.2-1.38 (m, 14H, H_3, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9), 1.51-1.62 (m, 4H, H_2, H_{10}), 2.11 (sbr, 1H, H_{12}), 3.25 (t, 2H, J = 6.49 Hz, H_1), 3.61 (t, 2H, J = 5.08 Hz, H_{11})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 25.75, 26.70, 28.82, 29.14, 29.46, 29.56, 30.49; 32.74; 51.47 (C_1), 62.86 (C_{11})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 5,959 min, m/z = 186 $[M-N_2]^+$

2-(2-(2-Azidoéthoxy)éthoxy)éthanol (**121**)



$C_6H_{13}O_3N_3$ - M = 175,19 g.mol^{-1}

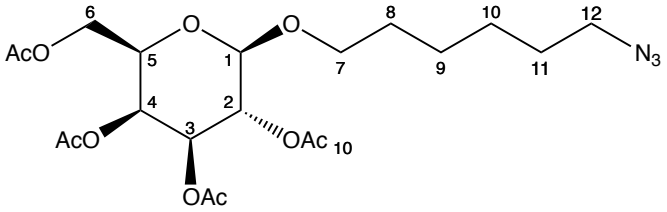
On chauffe à 100 °C une solution de 2-(2-(2-chloroéthoxy)éthoxy)éthanol (0,51 g, 3,025 mmol) et d'azoture de sodium (0,442 g, 6,805 mmol) dans 20 mL de DMF. Après 12 h, le milieu est concentré et extrait à l'aide d'un mélange d'eau et d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée ($MgSO_4$) puis évaporée. Le produit azoturé **121** est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 81 % (0,43 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 2.82 (m, 1H, H_7), 3.36 (t, 2H, J = 5.13 Hz, H_1), 3.55-3.69 (m, 10H, H_2, H_3, H_4, H_5, H_6)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 50.61 (C_1), 61.61 (C_6), 69.96 (C_2), 70.33 (C_3), 70.59 (C_4), 72.53 (C_5)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 2 min, m/z = 148,10 $[M-N_2]^+$; 198,15 $[M+Na]^+$

Acétate de [(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-tris(acétyloxy)-6-[(6-azidohexyl)oxy]oxan-2-yl]méthyle (**122**)



$C_{18}H_{27}N_3O_{10}$ – M = 445,42 g.mol^{-1}

Réaction par passage un trichloroacétimidate

Dans un ballon séché sous un courant d'azote muni d'un barreau magnétique, le mélange du galactose **126** (0,258 g, 0,524 mmol), du 6-azido-hexan-1-ol (0,086 g, 0,576 mmol), et de 0,05 g de tamis moléculaire dans 5 mL de DCM est agité à TA pendant 30 min. Le mélange est ensuite refroidi à -60°C et une solution de triflate de triméthylsilyle (0,023 g, 0,105 mmol) est ajoutée. L'agitation est maintenue à -60°C pendant 1 heure. Ensuite le mélange réactionnel est laissé à TA pendant 2 h. Puis, le milieu réactionnel est neutralisé avec du $NaHCO_3$ et une solution saturée de $NaHCO_3$. Le produit brut obtenu est purifié sur cartouche de gel de silice avec pour éluant un gradient de 100 % d'heptane vers 100 % d'acétate d'éthyle pour former le composé **122** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 29 % (72 mg).

Azidation

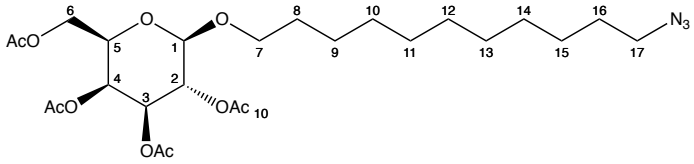
A un mélange de galactosé bromé **127** (0,035 g, 0,06 mmol) dans 1 mL de CH3CN placé sous azote, est additionné de l'azoture de sodium (0,027 g, 0,421 mmol). Le milieu est chauffé à 60 °C pendant 16 h puis concentré. Le résidu est repris dans du CH_2Cl_2 et lavé 2 fois avec une solution aqueuse de NaCl saturée. La phase organique est séchée ($MgSO_4$) puis évaporée. L'huile résultante est purifiée cartouche de gel de silice avec pour éluant un gradient de 100 % d'heptane vers 100 % d'acétate d'éthyle pour former le composé **122** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 86 % (36 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.35-1.50 (m, 4H, H_9, H_{10}), 1.52-1.70 (m, 4H, H_8, H_{11}), 2.03 (s, 3H, -CH_3), 2.06 (s, 3H, -CH_3), 2.08 (s, 3H, -CH_3) 2.17 (s, 3H, -CH_3), 3.28 (t, 2H, J = 6.89 Hz, H_{12}), 3.50 (m, 1H, H_{7a}), 3.89-3.95 (m, 2H, H_5, H_{7b}), 4.18 (m, 2H, H_6), 4.47 (d, 1H, H_1), 5.03 (dd, 1H, H_3), 5.22 (dd, 1H, H_2), 5.40 (dd, 1H, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 20.676 (CH_3 de OAc), 25.32 (C_{10}), 26.51 (C_9), 28.78 (C_{11}), 32.49 (C_8), 51.32 (C_{12}), 61.3 (C_5), 67.1 (C_3), 68.9 (C_6), 69.9 (C_4), 70.6 (C_2), 70.9 (C_7), 101.3 (C_1), 170.4 (CO de OAc)

LC-MS : ELSD 81 %, R_t = 5,729 min, m/z = 446,7 $[M+H]^+$

Acétate de [(2R,3S,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(acétyloxy)-6-[(11-azidoundecyl)oxy]oxan-2-yl]méthyle (**123**)



$C_{25}H_{41}N_3O_{10}$ – M = 543,61 g.mol^{-1}

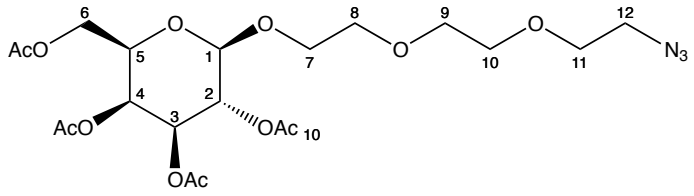
Azidation

A un mélange de galactosé bromé **128** (0,035 g, 0,06 mmol) dans 1 mL de CH3CN placé sous azote, est additionné de l'azoture de sodium (0,027 g, 0,421 mmol). Le milieu est chauffé à 60 °C pendant 16 h puis concentré. Le résidu est repris dans du CH_2Cl_2 et lavé 2 fois avec une solution aqueuse de NaCl saturée. La phase organique est séchée ($MgSO_4$) puis évaporée. L'huile résultante est purifiée cartouche de gel de silice avec pour éluant un gradient de 100 % d'heptane vers 100 % d'acétate d'éthyle pour former le composé **123** sous forme d'une huile jaune avec un rendement quantitatif (53 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.22-1.50 (m, 14H, H_9, H_{10}, H_{11}, H_{12}, H_{13}, H_{14}, H_{15}), 1.55-1.64 (m, 4H, H_8, H_{16}), 2.01 (s, 3H, -CH_3), 2.07 (s, 6H, -CH_3), 2.09 (s, 3H, -CH_3), 3.28 (t, 2H, H_{17}), 3.48 (m, 1H, H_{7a}), 3.89-3.95 (m, 2H, H_{7b}, H_5), 4.19 (m, 1H, H_6), 4.48 (d, 1H, H_1), 5.04 (dd, 1H, H_3), 5.22 (dd, 1H, H_2), 5.41 (dd, 1H, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 20.7+25.7+26.7+28.8+29.4+32.8 (CH_3 de OAc, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}, C_{15}, C_{16}), 51.5 (C_{17}), 61.5 (C_5), 63.1 (C_3), 67.2 (C_6), 69.9 (C_4), 70.5 (C_2), 70.9 (C_7), 101.0 (C_1), 170.4 (CO de OAc)

Acétate de [(2R,3S,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(acétyloxy)-6-{2-[2-(2-azidoéthoxy)éthoxy]éthoxy}oxan-2-yl]méthyle (**124**)



$C_{20}H_{31}N_3O_{12}$ – M = 505,47 g.mol^{-1}

Glycosidation avec $SnCl_4$

À une solution de D-galactose peracétylé (0,781 g, 2 mmol) dans 24 mL de DCM, est ajouté du chlorure d'étain(IV) (1,042 g, 4 mmol) goutte à goutte à 0°C. Après 30 min d'agitation à 0°C, on introduit le 2-(2-(2-Azidoéthoxy)éthoxy)éthanol (0,491 g, 2,8 mmol) puis la réaction est agitée à TA pendant 12 h. Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel est dilué par de l'éther éthylique puis il est versé dans un erlenmeyer contenant une solution saturée de Na_2HPO_4. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique. Les phases organiques sont successivement lavées avec une solution saturée de $NaHCO_3$ et de la saumure puis séchée avec $MgSO_4$. Après concentration, l'huile obtenue est purifiée sur cartouche de gel de silice sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 6,5 % (58 mg).

Réaction par passage un trichloroacétimidate

Dans un ballon séché sous un courant d'azote muni d'un barreau magnétique, le mélange du galactose **126** (0,258 g, 0,524 mmol), du 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthanol (0,576 mmol) et de 0,05 g de tamis moléculaire dans 5 mL de DCM est agité à TA pendant 30 min. Le mélange est ensuite refroidi à -60°C et une solution de triflate de triméthylsilyle (0,023 g, 0,105 mmol) est ajoutée. L'agitation est maintenue à -60°C pendant 1 heure. Ensuite le mélange réactionnel est laissé à TA pendant 2 h. Puis, le milieu réactionnel est neutralisé avec du $NaHCO_3$ et une solution saturée de $NaHCO_3$. Le produit brut obtenu est purifié sur cartouche de gel de silice avec pour éluant un gradient de 100 % d'heptane vers 100 % d'acétate d'éthyle pour conduire au composé **123** sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 12 % (31 mg).

Azidation

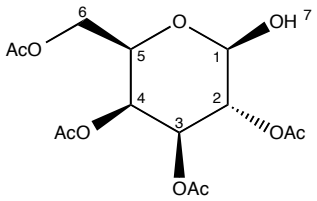
A un mélange de galactosé bromé **129** (0,059 g, 0,118 mmol) dans 2 mL de CH3CN placé sous azote, est additionné de l'az ture de sodium (0,054 g, 0,828 mmol). Le milieu est chauffé à 60 °C pendant 16 h puis concentré. Le résidu est repris dans du CH_2Cl_2 et lavé 2 fois avec une solution aqueuse de NaCl saturée. La solution organique est séchée ($MgSO_4$) puis évaporée. L'huile résultante est purifiée cartouche de gel de silice avec pour éluant un gradient de 100 % d'heptane vers 100 % d'acétate d'éthyle pour former le composé **124** sous forme d'une huile jaune avec un rendement quantitatif (73 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.97 (s, 3H, -CH_3), 2.03 (s, 3H, -CH_3), 2.03 (s,3H, -CH_3), 2.13 (s, 3H, -CH_3), 3.39 (m, 2H, H_{12}), 3.6-3.72 (m, 10H, H_{11}+H_{10}+H_9+H_7+H_8), 4.08 (m, 2H, H_6), 4.40 (m, 1H, H_1), 5.00-5.19 (m, 2H, H_2, H_5), 5.36-5.48 (m, 2H, H_3, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 21.22+21.07 (CH_3 de OAc), 51.04 (C_{12}), 61.9 (C_5), 67.35 (C_3), 68.4 (C_6), 69.00 (C_4), 70.12 (C_{11}), 70.45 (C_{10}), 70.73 (C_9), 71.04 (C_2), 72.56 (C_8), 91.00 (C_1), 170.56 (CO de OAc)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,9 min, m/z = 528,35 $[M+Na]^+$

2, 3, 4, 5-tetra-O-acétyl-D-galactose (**125**)



$C_{14}H_{20}O_{10}$ – M = 348,30 g.mol-1

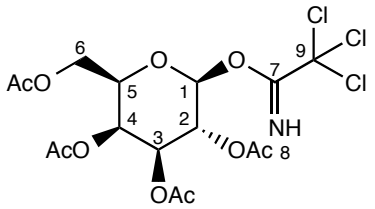
Dans un ballon sous agitation, on introduit du β-D-galactose peracétylé (1,00 g, 2,562 mmol) dans de l'AcOEt (19 mL) et dans du DMSO (0,1 mL). Puis on ajoute goutte-à-goutte et sous forte agitation de l'éthanolamine (0,626g, 10,247 mmol). La réaction est suivie par CCM et dès que la désacétylation commence sur un autre carbone, le mélange réactionnel est évaporé puis purifié par chromatographie flash pour donner le composé **125** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 83 % (0,74 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.82 (s, 3H, -CH_3), 1.88 (s, 3H, -CH_3), 1.93 (s, 3H, -CH_3), 1.99 (s, 3H, -CH_3), 2.71 (sbr, 1H, H_7), 3.89-4.02 (m, 3H, H_5, H_6), 4.32 (m, 0,84H, $H_{1\beta}$), 4.68 (m, 0,16H, $H_{1\alpha}$), 4.93 (m, 1H, H_3), 5.10-5.33 (m, 2H, H_2, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 20.20 (CH_3), 20.28 (CH_3), 20.37 (CH_3), 20.43 (CH_3), 60.30 (C_6), 65.63 (C_5), 67.23 (C_3), 68.14 ($C_{2\alpha}$), 68.37 ($C_{2\beta}$), 70.44 (C_4), 90.15 ($C_{1\beta}$), 92.24 ($C_{1\alpha}$), 170.07 (CO), 170.39 (CO), 170.55 (CO), 170.63 (CO)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,683 min, m/z = 371,20 $[M+Na]^+$

((2R,3S,4S,5R,6R))-3,4,5-Tris(acétyloxy)-6-((2,2,2-trichloroéthanimidoyl)oxy)oxan-2-yl)) (**126**)



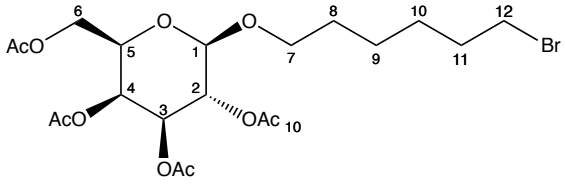
$C_{16}H_{20}O_{10}Cl_3$ – M = 492,69 g.mol-1

Dans un ballon, on introduit le galactose **125** (0,818 g, 2,347mmol) dans 10 mL de CH_2Cl_2. Le mélange réactionnel est refroidi à 0°C, puis on ajoute le DBU (0,286 g, 1,878 mmol) et du trichloroacétonitrile (1,356 g, 9,39 mmol). L'agitation est ensuite maintenue en ne dépassant pas les 5°C pendant 2 h. Le mélange réactionnel est ensuite concentré et directement purifié sur une cartouche de gel de silice (éluant : heptane/AcOEt (5/5)). Le composé trichloroacétimodate **126** est obtenu sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 47 % (0,54 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.98 (s, 3H, -CH_3), 1.985 (s, 3H, -CH_3), 1.99 (s, 3H, -CH_3), 2.13 (s, 3H, -CH_3), 4.05 (td, 1H, $J_{6,6}$ = 11,29 Hz, $J_{6,5}$ = 6,72 Hz , H_{6b}), 4.11 (td, 1H, $J_{6,6}$ =11,31 Hz, $J_{6,5}$ = 6,56 Hz, H_{6a}), 4.37 (td, 1H, $J_{5,4}$ = 0,84 Hz, $J_{5,6}$ = 6,60 Hz, H_5), 5.31 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 10,84 Hz, $J_{2,1}$ = 3,33 Hz, H_2), 5.36 (dd, 1H, $J_{3,4}$ = 3,02 Hz, $J_{3,2}$ = 10,85 Hz, H_3), 5.52 (dd, 1H, $J_{4,5}$ = 1,24 Hz, $J_{4,3}$ = 2,97 Hz, H_4), 6.56 (d, 1H, J = 3,33 Hz, H_1), 8.66 (s, 1H, H_8)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 20.61 (CH_3), 61.24 (C_6), 66.89 (C_5), 67.36 (C_3), 67.49 (C_4), 68.98 (C_2), 90.66 (C_9), 93.51 (C_1), 160.90 (C_8), 169.97 (CO), 170.10 (CO), 170.29 (CO)

Acétate de [(2R,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acétyloxy)-6-[(6-bromohexyl)oxy]oxan-2-yl]méthyle (**127**)



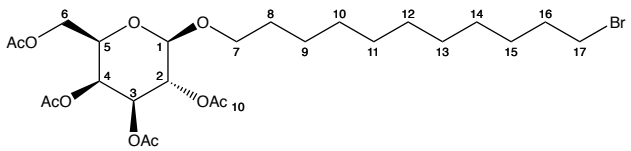
$C_{20}H_{31}BrO_{10}$ – M = 511,36 g.mol^{-1}

Dans un ballon séché sous un courant d'azote muni d'un barreau magnétique, le mélange du trichloroactéimidate **126** (0,1 g, 0,203 mmol), du 6-bromohexan-1-ol (0,073 g, 0,406 mmol) et de 0,05 g de tamis moléculaire dans 2 mL de CH_2Cl_2 est agité à TA pendant 30 min. Le mélange est ensuite refroidi à -60°C et une solution de triflate de triméthylsilyle (0,005 g, 0,02 mmol) est ajoutée. L'agitation est maintenue à -60°C pendant 1 heure. Puis le mélange réactionnel est agité à TA pendant 2 heures avant d'être neutraliser avec du $NaHCO_3$ et une solution saturée de $NaHCO_3$. Le produit brut obtenu est purifié sur cartouche de gel de silice avec pour éluant un gradient de 100 % d'heptane vers 100 % d'acétate d'éthyle pour conduire au composé **127** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 29 % (25 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.36-1.50 (m, 4H, H_9, H_{10}), 1.55 (m, 2H, H_8), 1.88 (m, 2H, H_{11}), 1.99 (s, 3H, -CH_3), 2.06 (s, 6H, -CH_3), 2.16 (s, 3H, -CH_3), 3.41 (t, 2H, J = 6.77 Hz, H_{12}), 3.90 (m, 2H, H_7), 4.10-4.22 (m, 3H, H_5, H_6), 4.46 (d, 1H, J = 8.59 Hz, H_1), 5.02 (dd, 1H, J = 3.38 et 11.14 Hz, H_3), 5.19 (dd, 1H, J = 7.98 et 10.44 Hz, H_2), 5.39 (d, 1H, J = 3.34 Hz, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 20.69 (-CH_3), 24.94 (C_{10}), 29.21 (C_8), 32.46 (C_{12}), 33.87 (C_4), 61.33 (C_6), 67.12 (C_5), 69 (C_{13}), 70 (C_4), 70.59 (C_2), 70.98 (C_7)

Acétate de [(2R,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acétyloxy)-6-[(11-bromoundecyl)oxy]oxan-2-yl]méthyle (**128**)



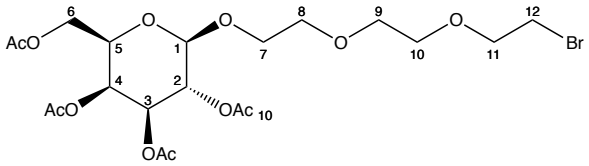
$C_{25}H_{41}BrO_{10}$ – M = 581,49 g.mol^{-1}

Dans un ballon séché sous un courant d'azote muni d'un barreau magnétique, le mélange du trichloroactéimidate **126** (0,1 g, 0,203 mmol), du 11-bromoundecanol (0,102 g, 0,406 mmol) et de 0,05 g de tamis moléculaire dans 2 mL de CH_2Cl_2 est agité à TA pendant 30 min. Le mélange est ensuite refroidi à -60°C et une solution de triflate de triméthylsilyle (0,005 g, 0,02 mmol) est ajoutée. L'agitation est maintenue à -60°C pendant 1 heure. Puis le mélange réactionnel est agité à TA pendant 2 heures avant d'être neutraliser avec du $NaHCO_3$ et une solution saturée de $NaHCO_3$. Le produit brut obtenu est purifié sur cartouche de gel de silice avec pour éluant un gradient de 100 % d'heptane vers 100 % d'acétate d'éthyle pour conduire au composé **128** sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 38 % (44 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.2-1.40 (m, 12H, H_{10}, H_{11}, H_{12}, H_{13}, H_{14}, H_9), 1.42 (m, 2H, H_{15}), 1.58 (m, 2H, H_8), 1.85 (m, 2H, H_{16}), 2.01 (s, 3H, -CH_3), 2.08 (s, 6H, -CH_3), 2.17 (s, 3H, -CH_3), 3.43 (t, 2H, J = 6.85 Hz, H_{17}), 3.51 (m, 1H, H_7), 3.8-3.91 (m, 2H, H_7, H_5), 4.10-4.25 (m, 1H, H_6), 4.48 (d, 1H, J = 7.89 Hz, H_1), 5.04 (dd, 1H, J = 3.39 et 10.48 Hz, H_3), 5.2 (dd, 1H, J = 7.81 et 10.38 Hz, H_2), 5.41 (d, 1H, J = 3.19 Hz, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 20.72+20.79+20.87 (-CH_3), 25.80 (C_{14}), 28.16 (C_{15}), 28.74 (C_{16}), 29.41+29.51+29.56+29.63 (C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}), 32.82 (C_{18}), 34.04 (C_{17}), 61.32 (C_6), 67.13 (C_5), 68.99 (C_2), 70.33 (C_7), 70.59 (C_4), 71 (C_2), 101.36 (C_1), 169.44+170.28+170.36+170.48 (CO)

Acétate de [(2R,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acétyloxy)-6-{2-[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthoxy}oxan-2-yl]méthyle (**129**)



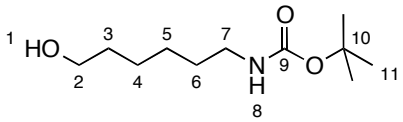
$C_{20}H_{31}BrO_{12}$ – M = 543,36 g.mol-1

Dans un ballon séché sous un courant d'azote muni d'un barreau magnétique, le mélange du trichloroactéimidate **126** (0,155 g, 0,315 mmol), du 2-(2-(2-chloroéthoxy)éthoxy)éthanol (0,106 g, 0,629 mmol) et de 0,05 g de tamis moléculaire dans 3 mL de CH_2Cl_2 est agité à TA pendant 30 min. Le mélange est ensuite refroidi à -60°C et une solution de triflate de triméthylsilyle (0,005 g, 0,02 mmol) est ajoutée. L'agitation est maintenue à -60°C pendant 1 heure. Puis le mélange réactionnel est agité à TA pendant 2 heures avant d'être neutraliser avec du $NaHCO_3$ et une solution saturée de $NaHCO_3$. Le produit brut obtenu est purifié sur cartouche de gel de silice avec pour éluant un gradient de 100 % d'heptane vers 100 % d'acétate d'éthyle pour conduire au composé **129** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 38 % (59 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.99 (s, 3H, -CH_3), 2.04 (s, 3H, -CH_3), 2.06 (s, 3H, -CH_3), 2.16 (s, 3H, -CH_3), 3.60-3.78 (m, 11H, H_{7a}, H_8, H_9, H_{10}, H_{11}, H_{12}), 3.90-3.98 (m, 2H, H_5, H_{7b}), 4.15 (m, 2H, H_6), 4.57 (d, 1H, *J* = 7.89 Hz, H_1), 5.01 (dd, 1H, *J* = 3.39 et 10.48 Hz, H_3), 5.2 (dd, 1H, *J* = 7.81 et 10.38 Hz, H_2), 5.38 (d, 1H, *J* = 3.19 Hz, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 20.72+20.66+20.77 (-CH_3), 42,78 (C_{12}), 61.31 (C_6), 67.09 (C_5), 68.83 (C_{11}), 69.05 (C_2), 70.31 (C_7), 70.38 (C_{10}), 70.65 (C_4), 70.91 (C_9), 71 (C_3), 71.32 (C_8), 101.32 (C_1), 169.53+170.18+170.30 (CO)

N-(6-hydroxyhexyl)carbamate de tert-butyle (**130**)



$C_{11}H_{23}NO_3$ - M = 217,31 g.mol^{-1}

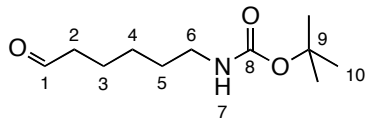
Le 6-amino-1-hexanol (15,2 g, 130 mmol) est dissous dans 520 mL d'éthanol. Le dicarbonate de di-tert-butyle (28,3 g, 130 mmol) dissous dans 260 mL d'éthanol est additionné au milieu réactionnel. Le milieu est agité pendant 16 h à TA puis concentré sous vide. Le produit **130** est obtenu sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 100 % (28,3 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.30-1.54 (m, 17H, H_3, H_4, H_5, H_6, H_{11}), 1.83 (sb,1H, H_1), 3.08 (m, 2H, H_2), 3.63 (td, *J* = 1,70 Hz et *J* = 6,44 Hz, 2H, H_7), 4.57 (sb, 1H, H_8)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 25.3 (C_6), 26.4 (C_5), 28.4 (C_{11}), 30.0 (C_4), 32.6 (C_3), 40.3 (C_7), 62.6 (C_2), 79.1 (C_{10}), 156.1 (C_9)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,6 min, m/z = 240 $[M+Na]^+$

N-(6-oxohexyl)carbamate de tert-butyle (**131**)



$C_{11}H_{21}NO_3$ - M = 215,29 g.mol^{-1}

Dess-Martin

Le N-(6-hydroxyhexyl)carbamate de tert-butyle (0,2 g, 0,92 mmol) est dissous dans 4 mL de dichlorométhane. Le périodinane de Dess-Martin (15 wt % dans DCM) (4 mL, 1,38 mmol) est ajouté à température ambiante. Le milieu réactionnel est agité jusqu'à disparition du produit de départ (CCM). Le milieu réactionnel est dilué avec de l'éther diéthylique, puis filtré sur célite. Le filtrat est évaporé et purifié sur cartouche de gel de silice (éluant Heptane/ACOEt). L'aldéhyde **131** est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 60 % (118 mg).

PCC/Al_2O_3

À une solution de N-(6-hydroxyhexyl)carbamate de tert-butyle (1 g, 4,6 mmol) dans un mélange de 18 mL de DCM et de 9 mL d'hexane est ajouté du PCC sur Al_2O_3 (15 g, 18,4 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante sous atmosphère d'argon pendant 4 h. À la fin de la réaction, le milieu est dilué dans de l'éther diéthylique pendant 1h puis filtré sur célite. Le filtrat est concentré et purifié sur cartouche de gel de silice pour donner l'aldéhyde **131** avec un rendement de 65 % (0,65 g) sous forme d'une huile jaune.

DMSO activé – Complexe SO_3/pyridine

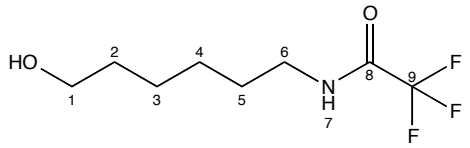
À une solution de N-(6-hydroxyhexyl)carbamate de tert-butyle (10 g, 46 mmol) dans 70 mL de DMSO, est ajouté 29 mL de DIPEA à TA. Dans un second ballon, au complexe pyridinium de trioxyde de soufre (18,3 g, 115 mmol) dans 38 mL de DMSO est ajouté à TA 9,3 mL de pyridine. Cette solution est agitée pendant 10 min à 0°C. Ce mélange est versé dans le milieu réactionnel contenant l'alcool à -5°C et est agité pendant une nuit à TA. Le mélange est versé sur de la glace/eau, puis est extrait 3 fois avec de l'AcOEt. La phase organique est lavée successivement 2 fois avec une solution d'HCl 1M et de la saumure, séchée sur $MgSO_4$ et concentrée. Le produit brut est purifié sur cartouche de gel de silice pour donner l'aldéhyde **131** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 73 % (7,2 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.24-1.48 (m, 4H, H_4, H_5), 1.42 (s, 9H, H_9), 1.63 (m, 2H, H_3), 2.42 (td, J = 1,70 Hz et J = 7,27 Hz, 2H, H_2), 3.05-3.13 (m, 2H, H_6), 4.57 (sb, 1H, H_7), 9.74 (t, 1H, J = 1,7 Hz, H_1)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 21.6 (C_3), 26.3 (C_4), 28.4 (C_{10}), 29.9 (C_5), 40.3 (C_3), 43.7 (C_2), 79.1 (C_9), 155.9 (C_7), 202.4 (C_1)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 7,7 min, m/z = 238 $[M+Na]^+$

2,2,2-trifluoro-N-(6-hydroxyhexyl)acétamide (**132**)



$C_8H_{14}F_3NO_2$ - M = 213,20 g.mol^{-1}

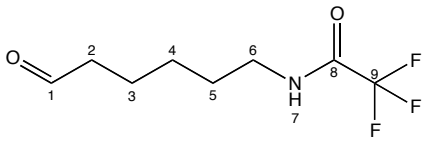
À une solution de 6-amino-1-hexanol (3,43 g, 29,269 mmol) dans 70 mL de THF à 0°C sous argon, est ajouté le trifluoroacétate d'éthyle (3,5 mL, 29,269 mmol) goutte à goutte. Après 48 h d'agitation à TA, la solution est concentrée. L'huile obtenue est reprise deux fois au DCM et concentrée. Le produit **132** est obtenu sous forme d'un solide jaune avec un rendement quantitatif (6,3 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.3-1.5 (m, 4H, H_4+H_3), 1.5-1.7 (m, 4H, H_2+H_5), 2.1 (sb, 1H, OH), 3.4 (q, 2H, *J* = 6.71 Hz, H_6), 3.6 (t, 2H, *J* = 6.38 Hz, H_1), 7 (sb, 1H, H_7)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 25.2 (C_3), 26.3 (C_4), 28.8 (C_5), 32.3 (C_2), 39.8 (C_6), 62.6 (C_1), 114-117.8 (C_9), 157.2 (C_8)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,5 min, m/z = 214 $[M+H]^+$; 236 $[M+Na]^+$

2,2,2-trifluoro-N-(6-oxohexyl)acétamide (**133**)



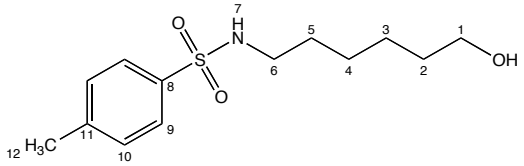
$C_8H_{12}F_3NO_2$ - M = 211,18 g.mol^{-1}

À une solution de 2,2,2-trifluoro-N-(6-hydroxyhexyl)acétamide (1,776 g, 8,33 mmol) dans un mélange de 33 mL de DCM et de 17 mL d'hexane, est ajouté du PCC/Al_2O_3 (25 g, 29,156 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante sous atmosphère d'argon pendant 12 h. À la fin de la réaction, le milieu est dilué dans de l'éther et agité pendant 1 h, puis filtré sur célite. Le filtrat est concentré et purifié sur cartouche de silice. L'aldéhyde **133** est obtenu sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 66 % (1,17 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.35 (m, 4H, H_4), 1.6-1.71 (m, 4H, H_3+H_5), 2.5 (m, 2H, H_2), 3.35 (q, 2H, *J* = 6.87 Hz, H_6), 7.3 (sb, 1H, H_7), 9.7 (t, 1H, *J* = 1.51 Hz, H_1)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 21.3 (C_3), 23.9 (C_4), 28.4 (C_5), 39.6 (C_2), 43.7 (C_6), 113.9-117.8 (C_9), 157.5 (C_8), 202.7 (C_1)

6-hydroxy-S-(4-méthylphenyl)hexane-1-sulfonamido (**134**)



$C_{13}H_{21}NO_3S$ - M = 271,38 g.mol^{-1}

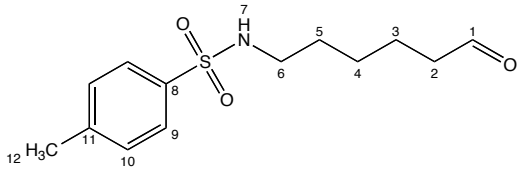
Le 6-amino-1-hexanol (5 g, 42,666 mmol) est dissous dans 200 mL de DCM. La DIPEA (9,7 mL, 55,465 mmol) est alors ajoutée au milieu réactionnel refroidi à 0°C. Le chlorure de tosyle (7,971 g, 41,812 mmol) est ensuite ajouté goutte à goutte. Le milieu est maintenu sous agitation pendant 15 minutes à 0°C puis laissé remonter à TA pendant 4 h. Le milieu est ensuite lavé successivement avec de l'eau (0°C), une solution d'HCl 1M, une solution de $NaHCO_3$ saturée et de la saumure. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ avant d'être concentrée au rotavapor. Le produit **134** est obtenu sous forme d'un solide blanchâtre avec un rendement de 99 % (11,53 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.30-1.33 (m, 4H, H_4+H_3), 1.42-1.53 (m, 4H, H_2+H_5), 2.2 (m, 1H, OH), 2.42 (s, 3H, H_{12}), 2.9 (m, 2H, H_6), 3.57 (m, 2H, H_1), 5.31 (m, 1H, H_7), 7.3 (d, 2H, *J* = 8.52 Hz, H_9), 7.73 (d, 2H, *J* = 8.17 Hz, H_{10})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 21.5 (C_{12}), 25.15 (C_3), 26.2 (C_4), 29.4 (C_5), 32.3 (C_2), 43.0 (C_6), 62.3 (C_1), 128.7 (C_9), 129.7 (C_{10}), 137.0 (C_8), 143.2 (C_{11})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4 min , m/z = 272 $[M+H]^+$; 294 $[M+Na]^+$

S-(4-méthylphenyl)-6-oxohexane-1-sulfonamido (**135**)



$C_{13}H_{19}NO_3S$ - M = 269,36 g.mol^{-1}

PCC/Al_2O_3

À une solution de 6-hydroxy-S-(4-methylphenyl)hexane-1-sulfonamido (0,236 g, ,087 mmol) dans un mélange de 4 mL de DCM et de 2 mL d'hexane, est ajouté du PCC/Al_2O_3 (2,5 g, 3,044 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante sous atmosphère d'argon pendant 12 h. À la fin de la réaction, le milieu est dilué par l'éther, laissé agiter 1 h puis filtré sur célite. Le filtrat est concentré et purifié sur cartouche de gel de silice pour donner l'aldéhyde **135** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 40 % (0,095 g).

DMSO activé – Complexe SO_3/pyridine

À une solution de 6-hydroxy-S-(4-methylphenyl)hexane-1-sulfonamido (4 g, 14,74 mmol) dans 20 mL de DMSO anhydride, est ajouté 10 mL de DIPEA à TA. Dans un second ballon, au complexe pyridinium de trioxyde de soufre (5,865 g, 36,849 mmol) dans 12 mL de

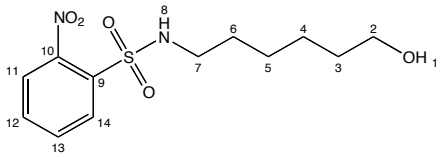
DMSO est ajouté à TA 3 mL de pyridine. Cette solution est agitée pendant 10 min à 0°C. Ce mélange est versé dans le milieu réactionnel contenant l'alcool à -5°C et est agité pendant une nuit à TA. Le mélange est versé sur de la glace/eau, puis est extrait 3 fois avec de l'AcOEt. La phase organique est lavée 2 fois avec une solution d'HCl 1M et de la saumure, séchée avec $MgSO_4$ et concentrée. Le produit brut est purifié sur cartouche de gel de silice pour donner l'aldéhyde **135** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 77 % (3,1 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.28-1.37 (m, 2H, H_4), 1.45-1.62 (m, 4H, H_3+H_5), 2.38-2.44 (m, 2H, H_2), 2.44 (s, 3H, H_{12}), 2.93 (m, 2H, H_6), 4.96 (m, 1H, H_7), 7.31 (d, 2H, J = 8.17 Hz, H_9), 7.76 (d, 2H, J = 8.52 Hz, H_{10}), 9.73 (t, 1H, J = 2.11 Hz, H_1)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 21.4 (C_{12}), 21.5 (C_3), 25.9 (C_4), 29.2 (C_5), 42.9 (C_2), 43.6 (C_6), 127.1 (C_9), 129.7 (C_{10}), 137.0 (C_8), 143.4 (C_{11}), 202.7 (C_1)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,696 min, m/z = 270,10 $[M+H]^+$; 292,05 $[M+Na]^+$

6-hydroxy-S-(2-nitrophenyl)hexane-1-sulfonamido (**136**)



$C_{12}H_{18}N_2O_5S$ - M = 302,35 g.mol^{-1}

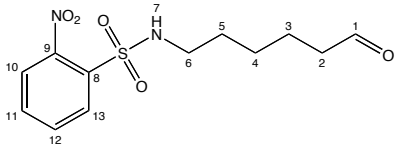
Le 6-amino-1-hexanol (5 g, 42,666 mmol) est ajouté à une solution agitée de chlorure de 2-nitrobenzénesulfonyle (9,455 g, 42,666 mmol) et de K_2CO_3 (9,398 g, 93,865 mmol) dans 72 mL de DCM. La solution résultante est agitée pendant 72 h, quenchée avec de l'eau (0,2 mL/mmol), puis une solution d'HCl à 10 % (2 mL/mmol) est ajoutée. Les phases sont séparées et la phase organique est lavée une solution saturée de Na_2CO_3, puis de l'eau, séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous vide. Le produit **136** est obtenu sous forme d'un solide jaune avec un rendement quantitatif (12,85 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.35-1.39 (m, 5H, H_1+H_4+H_5), 1.51-1.60 (m, 4H, H_3+H_6), 3.13 (t, 2H, J = 6.87 Hz, H_7), 3.65 (t, 2H, H_2), 5.34 (m, 1H, H_8), 7.76 (m, 2H, H_{arom}), 7.9 (m, 1H, H_{arom}), 8.2 (m, 1H, H_{arom})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 25.2 (C_4), 26.2 (C_5), 29.5 (C_3), 32.4 (C_6), 43.7 (C_7), 62;7 (C_2), 125.4 (C_9), 131.1+132.8+133.5 (C_{10}+C_{11}+C_{12}+C_{13}+C_{14})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,203 min, m/z = 303,20 $[M+H]^+$; 325,25 $[M+Na]^+$

S-(2-nitrophenyl)-6-oxohexane-1-sulfonamido (**137**)



$C_{12}H_{16}N_2O_5S$ - M = 300,33 g.mol^{-1}

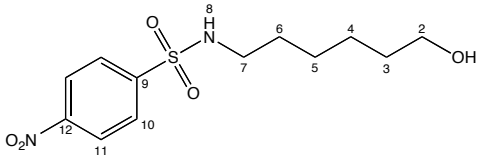
À une solution de 6-hydroxy-S-(2-nitrophenyl)hexane-1-sulfonamido (12,85 g, 42,501 mmol) dans 63 mL de DMSO anhydride est ajouté 26 mL de DIPEA à 25°C. Dans un autre ballon, le complexe pyridinium de trioxyde de soufre (16,911 g, 106,252 mmol) est ajouté à une solution de 8 mL de pyridine dans 36 mL de DMSO, cette dernière est agitée pendant 10 min. Ce mélange est versé dans le milieu réactionnel contenant l'alcool à -5°C et est agité pendant 1 h à 0°C, puis 48 h à TA. Le mélange est versé sur de la glace/eau, puis est extrait 3 fois avec de l'AcOEt. La phase organique est lavée 2 fois avec une solution d'HCl 1M et de la saumure, séchée avec $MgSO_4$ et concentrée. Le produit brut est purifié sur cartouche de gel de silice pour donner l'aldéhyde **137** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 56 % (7,1 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.32 (m, 2H, H_4), 1.48-1.59 (m, 4H, H_3+H_5), 2.38 (td, 2H, H_2), 3.09 (m, 2H, H_6), 5.42 (m, 1H, H_7), 7.76 (m, 2H, H_{11}+H_{12}), 7.83 (m, 1H, H_{13}), 8.09 (m, 1H, H_{10}), 9.7 (t, 1H, J = 1.51 Hz, H_1)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 21.0 (C_3), 25.8 (C_4), 29.2 (C_5), 43.5 (C_2), 43.7 (C_6), 125.3 (C_{10}), 130.9 (C_{13}), 132.9 (C_{11}), 133.5 (C_8), 133.7 (C_{12}), 147.98 (C_9), 202.6 (C_1)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,696 min, m/z = 301,05 $[M+H]^+$; 323,15 $[M+Na]^+$

6-hydroxy-S-(4-nitrophenyl)hexane-1-sulfonamido (**138**)

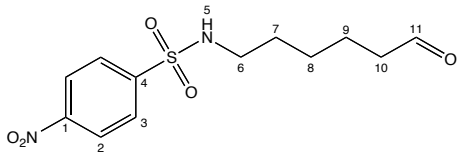


$C_{12}H_{18}N_2O_5S$ - M = 302,35 g.mol^{-1}

Le 6-amino-1-hexanol (2,815 g, 24,021 mmol) est ajouté à une solution agitée de chlorure de 4-nitrobenzenesulfonyle (5,323 g, 24,021 mmol) et de K_2CO_3 (5,291 g, 52,846 mmol) dans 40 mL de DCM. La solution résultante est agitée pendant 24 h, quenchée avec de l'eau (0,2 mL/mmol) ; puis une solution d'HCl à 10 % (2 mL/mmol) est ajoutée. Les phases sont séparées et la phase organique est lavée successivement avec une solution saturée de Na_2CO_3, puis de l'eau, séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous vide. Le produit **138** est obtenu sous forme de solide orange avec un rendement de 97 % (7 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.33-1.39 (m, 4H, H_4, H_5), 1.50-1.57 (m, 4H, H_3, H_6), 1.70 (m, 1H, H_1), 3.03 (m, 2H, H_7), 3.65 (m, 2H, H_2), 5.12 (t, 1H, J = 6.02 Hz, H_8), 8.08 (d, 2H, J = 9.07 Hz, H_{10}), 8.39 (d, 2H, J = 8.83 Hz, H_{11})

S-(4-nitrophenyl)-6-oxohexane-1-sulfonamido (**139**)



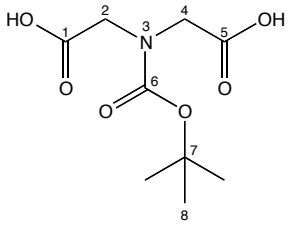
$C_{12}H_{16}N_2O_5S$ - M = 300,33 g.mol^{-1}

À une solution de 6-hydroxy-S-(4-nitrophenyl)hexane-1-sulfonamido (7,04 g, 23,285 mmol) dans 35 mL de DMSO anhydride est ajouté 15 mL de DIPEA à 25°C. Dans un autre ballon, le complexe pyridinium de trioxyde de soufre (9,265 g, 58,211 mmol) est ajoutée à une solution de 4,7 mL de pyridine dans 20 mL de DMSO. Cette dernière est agitée pendant 10 min. Ce mélange est versé dans le milieu réactionnel contenant l'alcool à -5°C et est agité pendant 1 h à 0°C, puis 48 h à TA. Le mélange est versé sur de la glace/eau, puis est extrait 3 fois avec de l'AcOEt. La phase organique est lavée 2 fois avec une solution de HCl 1M et de la saumure, séchée avec $MgSO_4$ et concentrée. Le produit brut est purifié sur cartouche de gel de silice pour donner l'aldéhyde **139** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 46 % (3,2 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.26-1.38 (m, 2H, H_8), 1.52-1.63 (m, 4H, H_7 + H_9), 2.46 (td, 2H, *J* = 7.06 et 1.40 Hz, H_{10}), 3.03 (td, 2H, *J* = 6.88 et 2.19 Hz, H_6), 5.18 (t, 1H, *J* = 5.92 Hz, H_5), 8.08 (d, 2H, *J* = 9.07 Hz, H_2), 8.38 (d, 2H, *J* = 8.83 Hz, H_3), 9.76 (t, 1H, J = 1.48 Hz, H_{11})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 21.24 (C_9), 25.87 (C_8), 29.40 (C_7), 43.05 (C_{10}), 43.58 (C_6), 124.46 (C_3), 128.32 (C_2), 145.95 (C_4), 150.06 (C_1), 202.52 (C_{11})

Acide 2-{[(tert-butoxy)carbonyl](carboxyméthyl)amino}acétique (**145**)



$C_9H_{15}NO_6$ - M = 233,22 g.mol^{-1}

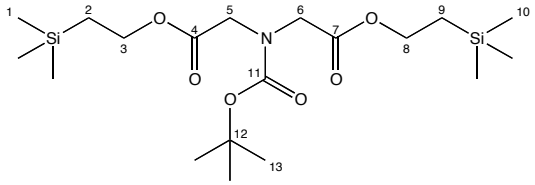
À un mélange hétérogène d'acide iminodiacétique (10 g, 75,131 mmol) dans 150 mL de dioxane est ajouté 150 mL d'une solution de NaOH 1M. Quand le milieu réactionnel est homogène, le dicarbonate de di-tert-butyle (18,037 g, 82,645 mmol) est ajouté. Il se forme alors une suspension neigeuse qui s'éclaircit entre 2-3 h. Le milieu réactionnel est agité à TA pendant 72 h, puis lavé 2 fois avec de l'éther. La phase aqueuse est acidifiée avec une solution de HCl à 10 % (1 mL/mmol) et extraite avec de l'AcOEt. La phase organique est lavée avec de la saumure et séchée sur $MgSO_4$ puis évaporée pour conduire à un solide blanc avec un rendement de 78 % (13,7 g).

RMN ^{1}H (DMSO-D6) : δ (ppm) 1.36 (s, 9H, H_8), 3.83 (s, 2H, H_4), 3.92 (s, 2H, H_2)

RMN ^{13}C (DMSO-D6) : δ (ppm) 28.3 (C_8), 49.6 (C_4), 50.1 (C_2), 80.1 (C_7), 155.3 (C_6), 171.7 (C_1)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 2,5 min, m/z = 256 $[M+Na]^+$

2-{[(tert-butoxy)carbonyl]({2-oxo-2-[2-(triméthylsilyl)éthoxy]éthyl})amino}acétate de 2-(triméthylsilyl)éthyle (**146**)



$C_{19}H_{39}NO_6Si_2$ - M = 433,69 g.mol^{-1}

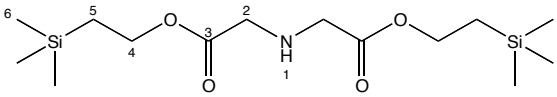
Le diacide **145** (5,7 g, 24,441 mmol) est ajouté à une solution de 2-(triméthylsilyl)éthanol (5,809 g, 49,126 mmol) dans 415 mL de DCM à 0°C. 10 minutes plus tard, du DCC (11,094 g, 53,769 mmol) dilué dans 97 mL de DCM est ajouté goutte à goutte. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à 0°C pendant une heure. Après passage à température ambiante, l'agitation est maintenue pendant 12 h. Le milieu est filtré et le filtrat est concentré au rotavapor. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice pour conduire au diacide protégé **146** sous forme d'un liquide jaune avec un rendement quantitatif (11 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.1 (s, 18H, H_1+H_{10}), 0.98 (t, 4H, *J* = 8.50 Hz, H_2+H_9), 1.42 (s, 9H, H_{13}), 3.97 (s, 2H, H_6), 4.07 (s, 2H, H_5), 4.22 (t, 4H, *J* = 8.40 Hz, H_3+H_8)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -1.41 (C_1+C_{10}), 17.4 (C_2+C_9), 28.1 (C_{14}), 49.1 (C_7), 49.7 (C_5), 63.3 (C_3+C_8), 80.9 (C_{13}), 155.1 (C_{12}), 169.8 (C_4+C_7)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 5,7 min , m/z = 356 $[M\text{-}Boc+Na]^+$

2-({2-oxo-2-[2-(triméthylsilyl)éthoxy]éthyl}amino)acétate de 2-(triméthylsilyl)éthyle (**147**)



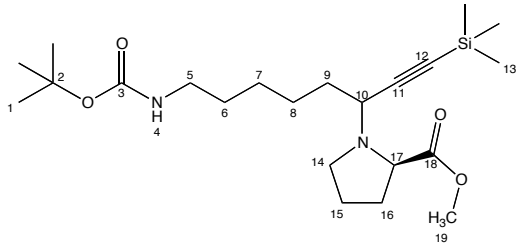
$C_{14}H_{31}NO_4Si_2$ - M = 333,57 g.mol^{-1}

À 120 mL d'une solution de HCl dans l'isopropanol à 5-6 N est ajouté le composé **146** (8,76 g, 20,199 mmol). Le milieu réactionnel est agité à TA pendant 12 h. Le solvant est évaporé et le résidu est dissous dans de l'eau. La solution est ajustée à pH 8 avec de l'ammoniaque à 5 % saturé avec NaCl, puis extraite 3 fois avec du DCM. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée et évaporée. Le produit brut est purifié sur cartouche de silice pour conduire au composé **147** sous forme d'un liquide jaune avec un rendement 38 % (0,26 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.08 (s, 18H, H_6), 1.01 (t, 4H, *J* = 8.50 Hz, H_5), 3.44 (s, 2H, H_2), 4.22 (t, 4H, *J* = 8.40 Hz, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -1.52 (C_6), 17.37 (C_5), 50.31 (C_2), 63.12 (C_4), 171.92 (C_3)

(2R)-1-(8-{[(tert-butoxy)carbonyl]amino}-1-(triméthylsilyl)oct-1-yn-3-yl)pyrrolidine-2-carboxylate de méthyle (**148**)



$C_{22}H_{40}N_2O_4Si$ - $M = 424{,}65\ g.mol^{-1}$

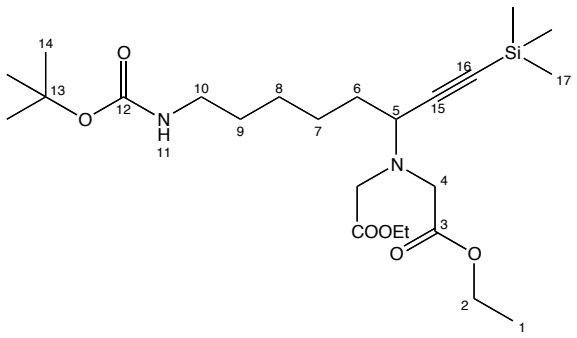
L'ester méthylique de la L-proline (0,042 g, 0,255 mmol), l'aldéhyde **131** (0,05 g, 0,232 mmol) et le triméthylsilylacetylène (0,03 g, 0,302 mmol) et l'iodure de cuivre (0,013 g, 0,07 mmol) sont placés dans un ballon. La réaction est laissée sous agitation une nuit à TA. Le brut est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice avec pour éluant un gradient Heptane 100 % vers AcOEt 100 %. Le produit **148** est obtenu sous forme d'une huile orangée avec un rendement de 20 %.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.15 (s, 9H, H_{13}), 1.24-1.69 (m, 8H, $H_6 + H_7 + H_8 + H_9$), 1.43 (s, 9H, H_1), 1.78-2.13 (m, 4H, $H_{15} + H_{16}$), 2.64 (q, 1H, J = 8,7 Hz, H_{17}), 2.93 (m, 1H, H_{10}), 3.10 (m, 2H, H_5), 3.50 (t, 1H, J = 8,1 Hz, H_{14}), 3.62 (t, 1H, J = 7,8 Hz, $H_{14'}$), 3.70 (s, 3H, H_{19}), 4.54 (sb, 1H, N-H)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.0 (C_{13}), 23.1 (C_{15}), 25.8 (C_{16}), 28.2 (C_1), 28.8 (C_6), 29.7 (C_9), 34.3 (C_5), 46.4 (C_{14}), 51.6 (C_{10}), 53.5 (C_{19}), 63.1 (C_{17}), 78.8 (C_2), 155.7 (C_3), 170.9 (C_{18})

LC-MS : ELSD (100 %), R_t = 8,3 min, m/z = 425 $[M+H]^+$

2-[(8-{[(tert-butoxy)carbonyl]amino}-1-(triméthylsilyl)oct-1-yn-3-yl)(2-éthoxy-2-oxoéthyl)amino]acétate d'éthyle (**149**)



$C_{24}H_{44}N_2O_6Si$ - $M = 484{,}70\ g.mol^{-1}$

L'iminodiacétate de diéthyle (0,46 g, 2,45 mmol), l'aldéhyde **131** (0,48 g, 2,23 mmol) et le triméthylsilylacétylène (0,28 g, 2,9 mmol) sont mis successivement dans un réacteur micro-onde. Puis on ajoute de l'iodure de cuivre (0,25 g, 1,34 mmol). Le tube est ensuite scellé (sans solvant). Le mélange est agité préalablement puis mis sous irradiation durant un total de 90 s (15*6s entrecoupé d'une minute) sous une température maximale de 95°C±5°C.

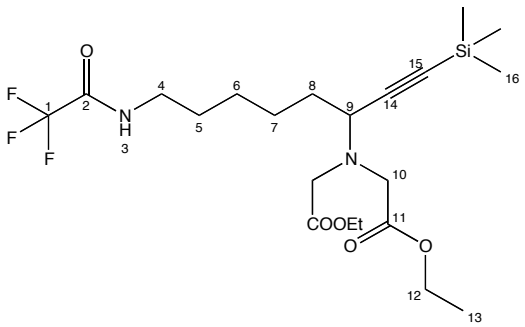
Le milieu réactionnel est ensuite dilué dans du DCM puis filtré sur célite. Le filtrat est concentré et purifié sur cartouche de gel de silice (éluant : heptane / AcOEt). Le produit **149** de la réaction A^3 est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 70 % (3,8 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.13 (s, 9H, H_{17}), 1.24 (t, 6H, *J* = 7,1 Hz, H_1), 1.30-1.50 (m, 8H, H_6 + H_7 + H_8 + H_9), 1.41 (s, 9H, H_{14}), 3.08 (m, 2H, H_{10}), 3.21 (q, 2H, *J* = 17,1 Hz, H_4), 3.47 (d, 2H, *J* = 17,1Hz, $H_{4'}$), 3.58 (t, 1H, *J* = 8,1 Hz, H_5), 4.14 (q, 4H, *J* = 7,1 Hz, H_2), 4.60 (sb, 1H, H_{11})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.3 (C_{17}), 14.3 (C_1), 25.9 (C_9), 26.5 (C_8), 28.5 (C_{14}), 30.0 (C_7), 34.0 (C_6), 40.5 (C_{10}), 53.6 (C_4), 55.9 (C_5), 60.8 (C_2), 79.1 (C_{13}), 90.3 (C_{16}), 103.6 (C_{15}), 156.1 (C_{12}), 171.2 (C_3)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 6,7 min, m/z = 485 $[M+H]^+$; 507 $[M+Na]^+$

2-[(2-éthoxy-2-oxoéthyl)[8-(2,2,2-trifluoroacétamido)-1-(triméthylsilyl)oct-1-yn-3-yl]amino]acétate d'éthyle (**150**)



$C_{21}H_{35}F_3N_2O_5Si$ - M = 480,59 g.mol^{-1}

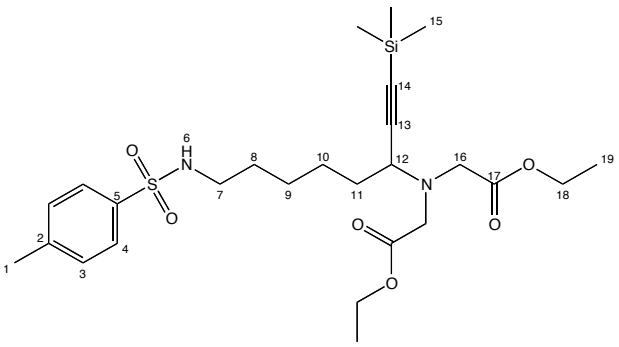
L'iminodiacétate de diéthyle (0,986 g, 5,209 mmol), l'aldéhyde **133** (1 g, 4,735 mmol) et le triméthylsilylacétylène (0,605 g, 6,156 mmol) sont mis successivement dans un réacteur micro-onde. Puis on ajoute de l'iodure de cuivre (0,541 g, 2,841 mmol). Le tube est ensuite scellé (sans solvant). Le mélange est agité préalablement puis mis sous irradiation durant un total de 120 s (20*6s entrecoupé d'une minute) sous une température maximale de 95°C±5°C. Le milieu réactionnel est ensuite dilué dans du DCM puis filtré sur célite. Le filtrat est concentré et purifié sur cartouche de gel de silice (éluant : heptane / AcOEt). Le produit **150** de la réaction A^3 est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 52 % (1,19 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.15 (s, 9H, H_{16}), 1.25 (t, 6H, *J* = 7.02 Hz, H_{13}), 1.28-1.60 (m, 10H, H_4+H_5+H_6+H_7+H_8), 3.35 (m, 4H, H_{10}), 3.45 (m, 1H, H_9), 4.19 (q, 4H, *J* = 7.17 Hz, H_{12}), 7.3 (sb, 1H, H_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.1 (C_{16}), 14.1 (C_{13}), 25.0 (C_7), 25.5 (C_6), 28.5 (C_5), 31.5 (C_8), 39.4 (C_9), 53.1 (C_{12}), 54.9 (C_9), 60.4 (C_{11}), 90.1(C_{14}), 103.2 (C_{15}), 114.06-117.87 (CF), 157.5 (C_2), 171.2 (C_{11})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 6,4 min , m/z = 481 $[M+H]^+$; 503 $[M+Na]^+$

2-[(2-éthoxy-2-oxoéthyl)({8-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-(triméthylsilyl)oct-1-yn-3-yl})amino]acétate d'éthyle (**151**)



$C_{26}H_{42}N_2O_6SSi$ - M = 538,77 g.mol^{-1}

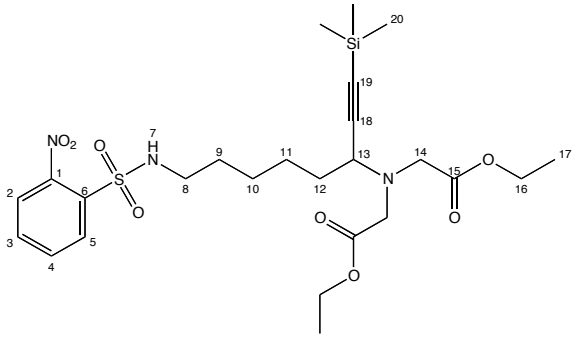
L'iminodiacétate de diéthyle (0,208 g, 1,1 mmol), l'aldéhyde **135** (0,269 g, 1 mmol) et le triméthylsilylacétylène (0,128 g, 1,3 mmol) sont mis successivement dans un réacteur micro-onde. Puis on ajoute de l'iodure de cuivre (0,114 g, 0,6 mmol). Le tube est ensuite scellé (sans solvant). Le mélange est agité préalablement puis mis sous irradiation durant un total de 60 s (10*6s entrecoupé d'une minute) sous une température maximale de 95°C±5°C. Le milieu réactionnel est directement purifié sur cartouche de gel de silice. Le produit **151** de la réaction A^3 est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 90 % (0,49 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.16 (s, 9H, H_{15}), 1.24-1.33 (m, 12H, H_8+H_9+H_{10}+H_{19}), 1.45 (m, 2H, H_{11}), 2.42 (s, 3H, H_1), 2.92 (m, 2H, H_6), 3.3 (d, 2H, J = 17.17 Hz, H_{16}), 3.45 (d, 2H, J = 17.17 Hz, H_{16}), 3.50 (m, 1H, H_{12}), 4.16 (q, 4H, J = 7.23 Hz, H_{18}), 4.96 (t, 1H, J = 6.05 Hz, H_6), 7.29 (d, 2H, J = 7.58 Hz, H_3), 7.75 (d, 2H, J = 8.25 Hz, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.1 (C_{15}), 14.2 (C_{19}), 21.5 (C_{12}), 25.3 (C_{10}), 25.7 (C_9), 29.3 (C_8), 33.6 (C_{11}), 42.8 (C_7), 53.3 (C_{18}), 60.8 (C_{16}), 90.2 (C_{14}), 103.3 (C_{13}), 127.1 (C_4), 129.6 (C_3), 137.0 (C_5), 143.1 (C_2), 171.1 (C_{17})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 6,59 min , m/z = 539,5 $[M+H]^+$; 561,5 $[M+Na]^+$

2-[(2-éthoxy-2-oxoéthyl)({8-[(2-nitrobenzéne)sulfonamido]-1-(triméthylsilyl)oct-1-yn-3-yl})amino]acétate d'éthyle (**152**)



$C_{25}H_{39}N_3O_8SSi$ - M = 569,74 g.mol^{-1}

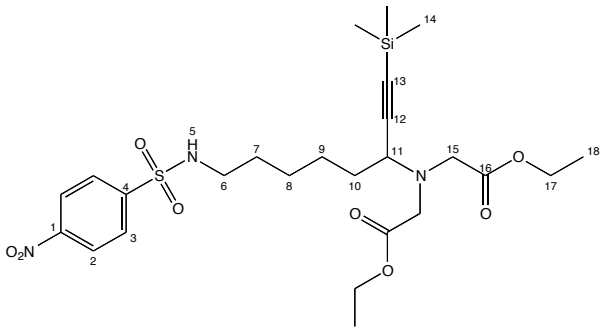
L'iminodiacétate de diéthyle (0,693 g, 3,663 mmol), l'aldéhyde **137** (1 g, 3,33 mmol) et le triméthylsilylacétylène (0,425 g, 4,329 mmol) sont ajoutés successivement dans un réacteur micro-ondes. Puis on ajoute de l'iodure de cuivre (0,38 g, 2 mmol). Le tube est ensuite scellé (sans solvant). Le mélange est agité préalablement puis mis sous irradiation durant un total de 60 s (10*6s entrecoupé d'une minute) sous une température maximale de 95°C±5°C. Le milieu réactionnel est directement purifié sur cartouche de gel de silice. Le produit **152** de la réaction A^3 est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 65 % (1,23 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.13 (s, 9H, H_{20}), 1.19-1.52 (m, 14H, H_9+H_{10}+H_{11}+H_{12}+H_{17}), 3.06 (q, 2H, *J* = 6.37 Hz, H_8), 3.30 (d, 2H, *J* = 17.14 Hz, H_{14}), 3.45 (d, 2H, *J* = 17.14 Hz, H_{14}), 3.52 (t , 1H, *J* = 6.51 Hz, H_{13}), 4.14 (q, 4H, *J* = 7.17 Hz, H_{16}), 5.42 (m, 1H, H_7), 7.70-7.72 (m, 2H, H_3+H_4), 7.82 (m, 1H, H_5), 8.09 (m, 1H, H_2)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.06 (C_{20}), 14.15 (C_{17}). 25.4 (C_{11}), 25.8 (C_{10}), 29.4 (C_9), 33.6 (C_{12}), 43.5 (C_8), 53.3 (C_{14}), 55.4 (C_{13}), 60.6 (C_{16}), 90.2 (C_{18}), 103.3 (C_{19}), 125.2 (C_2), 130.9 (C_5), 132.7 (C_3), 133.5 (C_8), 133.5 (C_4), 133.8 (C_6), 147.1 (C_1), 171.0 (C_{15})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 6.62 min, m/z = 570 $[M+H]^+$; 592 $[M+Na]^+$

2-[(2-ethoxy-2-oxoethyl)({8-[(4-nitrobenzene)sulfonamido]-1-(trimethylsilyl)oct-1-yn-3-yl})amino]acetate d'éthyle (**153**)



$C_{25}H_{39}N_3O_8SiS$ - M = 569,74 g.mol^{-1}

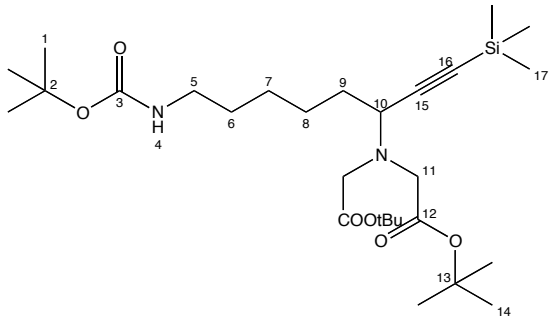
L'iminodiacétate de diéthyle (1,04g, 5,494 mmol), l'aldéhyde **139** (1 g, 3,33 mmol) et le trimethylsilylacetyléne (0,425g, 4,329 mmol) sont mis dans un réacteur micro-ondes avec de l'iodure de cuivre (I) (0,38g, 1,998 mmol). Le tube est ensuite sellé (sans solvant), le mélange est agité préalablement puis mis sous irradiation pendant 10 cycles (15*6s entrecoupé d'une minute de refroidissement par air comprimé) sous une température de 95°C + 5°C. Le produit de réaction est ensuite directement purifié par chromatographie sur gel de silice pour conduire au composé **139** sous forme d'une huile épaisse de couleur orange, obtenue avec un rendement de 51,4 % (0,975g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0 (s, 9H, H_{14}), 1.12 (t, 6H, H_{18}), 1.16-1.40 (m, 8H, H_7 + H_8 + H_9 + H_{10}), 2.86 (q, 2H, *J* = 6.37 Hz, H_6) 3.30 (d, 2H, *J* = 17.15 Hz, H_{15}), 3.45 (d, 2H, *J* = 17.15 Hz, H_{15}), 3.44 (t, 1H, *J* = 6.51 Hz, H_{11}), 4.03 (q, 4H, *J* = 7.17 Hz, H_{17}), 5.48 (t, 1H, H_5), 7.89-7.94 (m, 2H, H_3), 8,19-8.22 (m, 2H, H_2)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0 (C_{14}), 13.97 (C_{18}) , 24.46 (C_9), 24.94 (C_8),29.01 (C_7), 33.24 (C_{10}), 42.48 (C_6), 53.06 (C_{15}), 54.58 (C_{11}), 60.78 (C_{17}), 90.04 (C_{12}), 103.05 (C_{13}), 124.24 (C_2), 128.20 (C_3), 146.34 (C_1), 149.77 (C_4), 171.19 (C_{16})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 6,167 min, m/z = 592 $[M+Na]^+$

2-{[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl](8-{[(tert-butoxy)carbonyl]amino}-1-(triméthylsilyl)oct-1-yn-3-yl)amino}acétate de tert-butyle (**154**)



$C_{28}H_{52}N_2O_6Si$ - M = 540,81 g.mol^{-1}

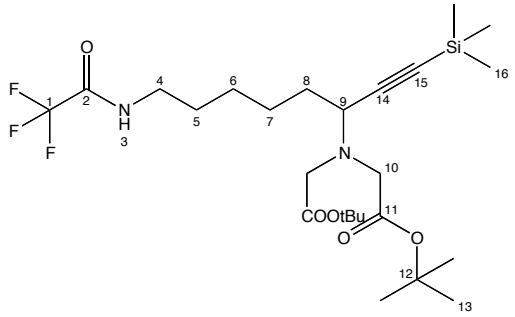
L'iminodiacétate de tert-butyle (2,131 g, 8,686 mmol), l'aldéhyde **131** (1,7 g, 7,896 mmol) et le triméthylsilylacétylène (1,008 g, 10,265 mmol) sont ajoutés successivement dans un réacteur micro-onde. Puis on ajoute de l'iodure de cuivre (0,902 g, 4,738 mmol). Le tube est ensuite scellé (sans solvant). Le milieu réactionnel est agité préalablement puis mis sous irradiation durant un total de 90 s (15*6s entrecoupé d'une minute) sous une température maximale de 95°C±5°C. Le milieu réactionnel est ensuite dilué dans du DCM puis filtré sur célite. Le filtrat est concentré et purifié sur cartouche de gel de silice (éluant : heptane/AcOEt). Le produit **154** de la réaction A^3 est obtenu sous forme d'une huile orange avec un rendement de 73 % (3,11g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0,10 (s, 9H, H_{17}), 1.15-1.70 (m, 8H, H_6 + H_7 + H_8 + H_9), 1.27 (s, 9H, H_1), 1.30 (s, 18H, H_{14}), 3.87 (m, 2H, H_5), 3.07 (q, 2H, *J* = 17,1 Hz, H_{11}), 3.25 (d, 2H, *J* = 17,1Hz, $H_{11'}$), 3.48 (t, 1H, *J* = 8,1 Hz, H_{10}), 4.71 (sb, 1H, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0 (C_{17}), 25.7 (C_7), 26.2 (C_6), 27.9 (C_{14}), 28.2 (C_1), 29.7 (C_8), 33.8 (C_9), 40.2 (C5), 53.9 (C_{11}), 55.4 (C_{10}), 79.1 (C_2), 80.6 (C_{13}), 89.1 (C_{16}), 103.8 (C_{15}), 155.8 (C_3), 170.2 (C_{12})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 7,5 min , m/z = 542 $[M+H]^+$; 564 $[M+Na]^+$

2-{[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl][8-(2,2,2-trifluoroacétamido)-1-(triméthylsilyl)oct-1-yn-3-yl]amino}acétate de tert-butyle (**155**)



$C_{25}H_{43}F_3N_2O_5Si$ - M = 536,70 g.mol^{-1}

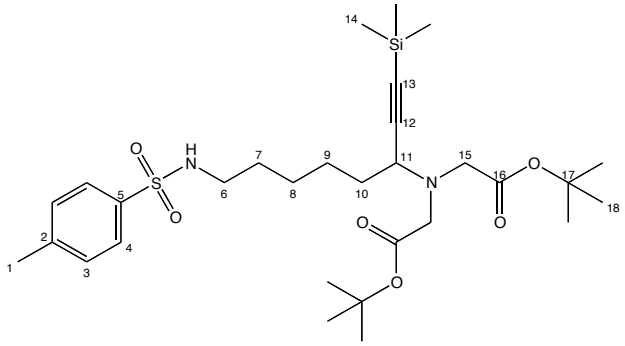
L'iminodiacétate de di-tert-butyle (1,278 g, 5,209 mmol), l'aldéhyde **133** (1 g, 4,735 mmol) et le triméthylsilylacétylène (0,605 g, 6,156 mmol) sont mis successivement dans un réacteur micro-onde. Puis on ajoute de l'iodure de cuivre (0,541 g, 2,841 mmol). Le tube est ensuite scellé (sans solvant). Le mélange est agité préalablement puis mis sous irradiation durant un total de 120 s (20*6s entrecoupé d'une minute) sous une température maximale de 95°C±5°C. Le milieu réactionnel est ensuite dilué dans du DCM puis filtré sur célite. Le filtrat est concentré et purifié sur cartouche de gel de silice (éluant : heptane/AcOEt). Le produit **155** de la réaction A^3 est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 62 % (1,58 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.1 (s, 9H, H_{17}), 1.2-1.60 (m, 8H, H_5+H_6+H_7+H_8), 1.3 (s, 18H, H_{14}), 3.05-3.21 (m, 5H, H_{10}+H_4), 3.95 (m, 1H, H_9), 6.95 (sb, 1H, H_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0 (C_{17}), 13.9 (C_{13}), 25.1 (C_7), 25.7 (C_6), 27.9 (C_{14}), 28.4 (C_5), 31.7 (C_8), 39.4 (C_4), 53.8 (C_{10}), 54.0 (C_9), 80.8 (C_{13}), 89.9 (C_{16}), 103.2 (C_{15}), 114.06-117.87 (CF), 157.5 (C_2), 107.2 (C_{12})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 7 min , m/z = 537 $[M+H]^+$; 559 $[M+Na]^+$

2-{[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]({8-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-(triméthylsilyl)oct-1-yn-3-yl})amino}acétate de tert-butyle (**156**)



$C_{30}H_{50}N_2O_6SSi$ - M = 594,88 g.mol^{-1}

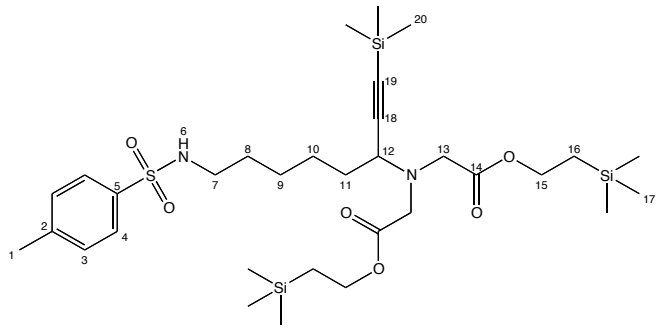
L'iminodiacétate de di-tert-butyle (0,095 g, 0,388 mmol), l'aldéhyde **135** (0,095 g, 0,353 mmol) et le triméthylsilylacétylène (0,045 g, 0,458 mmol) sont mis successivement dans un réacteur micro-onde. Puis on ajoute de l'iodure de cuivre (0,04 g, 0,212 mmol). Le tube est ensuite scellé (sans solvant). Le mélange est agité préalablement puis mis sous irradiation durant un total de 60 s (10*6s entrecoupé d'une minute) sous une température maximale de 95°C±5°C. Le milieu réactionnel est directement purifié sur cartouche de gel de silice. Le produit **156** de la réaction A^3 est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 34 % (0,07 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.16 (s, 9H, H_{15}), 1.25-1.68 (m, 24H, H_7+H_8+H_9+H_{18}), 1,7 (m, 2H, H_{10}), 2.45 (s, 3H, H_1), 2.92 (m, 2H, H_6), 3.3 (d, 2H, J = 17.17 Hz, H_{15}), 3.45 (d, 2H, J = 17.17 Hz, H_{15}), 3.51 (m, 1H, H_{11}), 4.96 (t, 1H, J = 6.92 Hz, NH), 7.29 (d, 2H, J = 7.49 Hz, H_3), 7.75 (d, 2H, J = 7.55 Hz, H_4)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.1 (C_{14}), 21.5 (C_1), 25.3 (C_9), 25.7 (C_8), 27.9 (C_{18}), 29.3 (C_7), 33.6 (C_{10}), 42 (C_6), 53.7 (C_{15}), 54 (C_{11}), 75 (C_{13}), 80 (C_{12}), 81 (C_{17}), 126.9 (C_4), 129.5 (C_3), 137.0 (C_5), 143.1 (C_2), 171.1 (C_{16})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 7,23 min, m/z = 596 $[M+H]^+$; 618 $[M+Na]^+$

2-({8-[(4-méthylbenzene)sulfonamido]-1-(triméthylsilyl)oct-1-yn-3-yl}({2-oxo-2-[2-(triméthylsilyl)éthoxy]éthyl})amino)acétate de 2-(triméthylsilyl)éthyle (**157**)



$C_{32}H_{58}N_2O_6SSi_3$ - M = 683,13 g.mol^{-1}

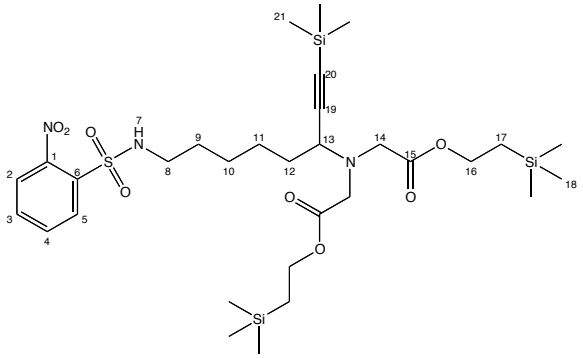
L'amine secondaire **147** (0,998 g, 2,992 mmol), l'aldéhyde **135** (0,733 g, 2,72 mmol) et le triméthylsilylacétylène (0,347 g, 3,536 mmol) sont mis successivement dans un réacteur micro-onde. Puis on ajoute de l'iodure de cuivre (0,31 g, 1,632 mmol). Le tube est ensuite scellé (sans solvant). Le mélange est agité préalablement puis mis sous irradiation durant un total de 60 s (10*6s entrecoupé d'une minute) sous une température maximale de 95°C±5°C. Le milieu réactionnel est directement purifié par cartouche de gel de silice. Le produit **157** de la réaction A^3 est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 15 % (0,28 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) -0.07 (s, 18H, H_{17}), 0.06 (s, 9H, H_{20}), 0.92 (4H, m, H_{16}), 1.1-1.7 (m, 8H, H_8+H_9+H_{10}+H_{11}), 2.32 (s, 3H, H_1), 2.86 (m, 2H, H_7), 3.3 (d, 2H, *J* = 17.17 Hz, H_{13}), 3.45 (d, 2H, *J* = 17.17 Hz, H_{13}), 3.48 (m, 1H, H_{12}), 4.1 (m, 4H, H_{15}), 5.4 (m, 1H, H_6), 7.2 (d, 2H, J = 7.49 Hz, H_4), 7.6 (d, 2H, J = 7.55 Hz, H_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -1.6 (C_{17}), 0.05 (C_{20}), 17.6 (C_{16}), 21.4 (C_1), 25.2 (C_{10}), 25.7 (C_9), 28.9 (C_8), 33.5 (C_{11}), 42.8 (C_7), 53.2 (C_{13}), 55.2 (C_{12}), 62.9 (C_{15}), 89.9 (C_{18}), 127.0 (C_4), 129.5 (C_3), 137.6 (C_5), 142.7 (C_2), 171.0 (C_{14})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 7-15 min , m/z = 684 $[M+H]^+$; 706 $[M+Na]^+$

2-({8-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]-1-(triméthylsilyl)oct-1-yn-3-yl}({2-oxo-2-[2-(triméthylsilyl)éthoxy]éthyl})amino)acétate de 2-(triméthylsilyl)éthyle (**158**)



$C_{31}H_{55}N_3O_8SSi_3$ - M = 714,10 g.mol^{-1}

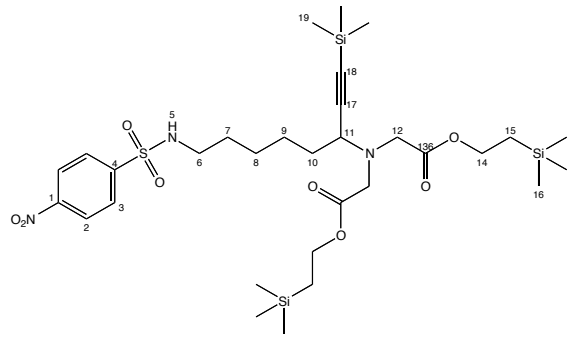
L'amine secondaire **147** (0,998 g, 2,992 mmol), l'aldéhyde **137** (0,817 g, 2,72 mmol) et le triméthylsilylacétylène (0,347 g, 3,536 mmol) sont additionnés successivement dans un réacteur micro onde. Puis on ajoute de l'iodure de cuivre (0,31 g, 1,6 mmol). Le tube est ensuite scellé (sans solvant). Le mélange est agité préalablement puis mis sous irradiation durant un total de 60 s (10*6s entrecoupé d'une minute) sous une température maximale de 85°C±5°C. Le milieu réactionnel est directement purifié sur cartouche de gel de silice. Le produit **158** de la réaction A^3 est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 44 % (0,26 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0 (s, 18H, H_{18}), 0.02 (s, 9H, H_{21}), 0.92 (m, 4H, H_{17}), 1.15-1.8 (m, 8H, H_9, H_{10}, H_{11}, H_{12}), 3.07 (m, 2H, H_8), 3.28 (d, 2H, J = 17.17 Hz, H_{14}), 3.42 (d, 2H, J = 17.17 Hz, $H_{14'}$), 3.55 (m, 1H, H_{13}), 4.16 (m, 4H, H_{16}), 5.55 (m, 1H, H_7), 7.7 (m , 2H, H_{arom}), 7.79 (m, 1H, H_{arom}), 8.1 (m, 1H, H_{arom})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -1.53 (C_{18}), 0.1 (C_{21}), 17.34 (C_{17}), 25.4 (C_{11}), 25.9 (C_{10}), 29.5 (C_{12}), 33.6 (C_9), 43.5 (C_8), 53.3 (C_{13}), 62.8 (C_{14}), 63.1 (C_{16}), 90.1 (C_{20}), 103.4 (C_{19}), 125.21-130.9-132.6-133.4 (C_2+C_3+C_4+C_5), 134 (C_1), 148 (C_6), 171.1 (C_{15})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 7,5-15 min, m/z = 715 $[M+H]^+$; 737 $[M+Na]^+$

2-({8-[(4-nitrobenzene)sulfonamido]-1-(triméthylsilyl)oct-1-yn-3-yl}({2-oxo-2-[2-(triméthylsilyl)éthoxy]éthyl})amino)acétate de 2-(triméthylsilyl)éthyle (**159**)



$C_{31}H_{55}N_3O_8SSi_3$ - M = 714,10 g.mol^{-1}

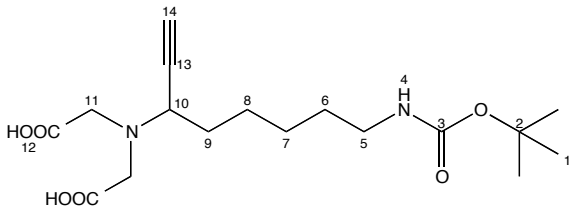
L'amine secondaire **147** (0,998 g, 2,992 mmol), l'aldéhyde **139** (0,817 g, 2,72 mmol) et le triméthylsilylacétylène (0,347 g, 3,536 mmol) sont additionnés successivement dans un réacteur micro-onde. Puis on ajoute de l'iodure de cuivre (0,31 g, 1,63 mmol). Le tube est ensuite scellé (sans solvant). Le mélange est agité préalablement puis mis sous irradiation durant un total de 60 s (10*6s entrecoupé d'une minute) sous une température maximale de 95°C±5°C. Le milieu réactionnel est directement purifié sur cartouche de gel de silice. Le produit **159** de la réaction A^3 est obtenu sous forme d'une huile marron avec un rendement de 27 % (0,53 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.00 (s, 18H, H_{16}), 0.1 (s, 9H, H_{19}), 0.96 (m, 4H, H_{15}), 1.21-1.45 (m, 8H, H_7, H_8, H_9, H_{10}), 2.96 (m, 2H, H_6), 3.26 (d, 2H, J = 17.15 Hz, H_{12}), 3.41 (d, 2H, J = 17.15 Hz, $H_{12'}$), 3.57 (m, 1H, H_{11}), 4.2 (m, 4H, H_{14}), 5.9 (m, 1H, H_6), 8.04 (d, 2H, J = 8.45 Hz, H_3), 8.31 (d, 2H, J = 8.43 Hz, H_2)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) -1.2 (C_{16}), 0.08 (C_{19}), 17.26 (C_{15}), 24.75 (C_9), 25.26 (C_8), 29.17 (C_{10}), 33.37 (C_7), 42.66 (C_6), 53.18 (C_{11}), 62.97 (C_{12}), 63.15 (C_{14}), 90.08 (C_{18}), 103.28 (C_{17}) : 124.24 (C_3), 128.29 (C_2), 146.59 (C_4), 149.82 (C_1), 171.25 (C_{13})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 7,5-15 min , m/z = 715,73 $[M+H]^+$; 737 $[M+Na]^+$

Acide [(8-{[(tert-butoxy)carbonyl]amino}oct-1-yn-3-yl)(carboxy)amino]formique (**160**)



$C_{17}H_{28}N_2O_6$ – M = 356,41 g.mol^{-1}

Méthode A

Le composé éthylique **149** (0,1 g, 0,206 mmol) est mis en présence d'une solution de NaOH 6N (0,033 g, 0,825 mmol) dans 2 mL de THF La solution est irradiée pendant 20 min sous MW à 100°C (ou est agitée à température ambiante pendant une nuit). À la fin de la

réaction, le mélange réactionnel est acidifié à pH 3 avec la résine H^+ IR120 puis lyophilisé. Le composé diacide **160** est obtenu sous forme d'un solide jaune (129 mg), cependant une perte partielle de la protection Boc a été observée.

Méthode B

Le composé éthylique **149** (0,3 g, 0,727 mmol) est mis en présence d'une solution de NaOH 6N (0,087 g, 2,182 mmol) dans 4 mL de THF. La solution est irradiée pendant 20 min sous MW à 100°C (ou est agitée à température ambiante pendant une nuit). À la fin de la réaction, le mélange réactionnel est acidifié à pH 3 avec de l'HCl 1M puis lyophilisé. Le composé diacide **160** est obtenu sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 69 %, mais perte partielle de la protection Boc.

Méthode A

Le composé tert-butylique **154** (0,162 g, 0,3 mmol) est mis en présence d'une solution de NaOH 10N (0,12 mL ; 0,599 mmol) dans 2 mL de THF. La solution est irradiée pendant 20 min sous MW à 100°C (ou est agitée à température ambiante pendant une nuit). À la fin de la réaction, on n'observe pas la formation du produit attendu, mais uniquement le produit sans le TMS.

Méthode C

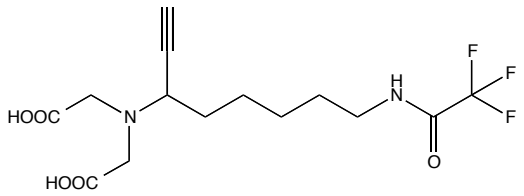
Le composé tert-butylique **155** (0,118 mmol) est dilué dans 5 mL de DCM et mis à 0°C. L'acide trifluoroacétique (0,353 mmol) est ensuite ajouté au milieu réactionnel. La réaction est agitée pendant 24 h à TA. L'analyse du milieu réactionnel ne nous a permis d'isoler le produit **161**.

RMN ^{1}H (Acétone – d_6) : δ (ppm) 1.25-1.70 (m, 17H, H_6 + H_7 + H_8 + H_9+H_1), 2.06 (s, 1H, H_{14}), 2.90-3.07 (m, 4H, H_{11} + H_5), 3.25 (d, 2H, J = 17.1Hz, $H_{11'}$), 3.48 (m, 1H, H_{10})

RMN ^{13}C (Acétone – d_6) : δ (ppm) 25.7 (C_7), 26.2 (C_8), 27.9 (C_1), 29.9 (C_6), 32.9 (C_9), 40.2 (C_5), 54.0 (C_{10}), 57.1 (C_{11}), 69.0 (C_{14}), 78.1 (C_2), 82.1 (C_{13}) , 156.7 (C_3), 178.5 (C_{12})

LC-MS : ELSD 91 %, R_t = 3,6 min , m/z = 257 $[M-Boc+H]^+$
ELSD 2 %, R_t = 4,9 min , m/z = 357 $[M+H]^+$; 379 $[M+Na]^+$

Acide 2-[(carboxyméthyl)[8-(2,2,2-trifluoroacétamido)oct-1-yn-3-yl]amino]acétique (**161**)



$C_{14}H_{19}F_3N_2O_5$ - M = 352,31 g.mol^{-1}

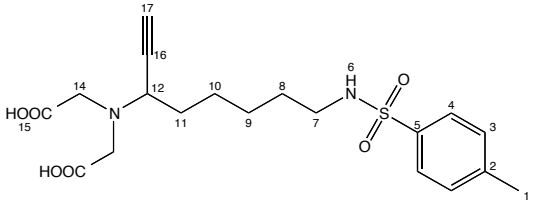
Méthode A

À une solution du composé éthylique **150** (0,15 g, 0,312 mmol) dans 2 mL de THF est ajouté 0,2 mL de NaOH 10M. Le milieu réactionnel est irradié pendant 20 min à 100°C. L'analyse LC-MS du milieu réactionnel conduit à la perte de la protection TFA de l'amine.

Méthode C

Le composé tert-butylique **155** (0,2 g, 0,373 mmol) est dilué dans 15 mL de DCM. Puis est ajouté à 0°C l'acide trifluoroacétique (0,17 mL, 2,236 mmol). La réaction est agitée pendant 12 h à TA. Le milieu réactionnel est concentré et le résidu est purifié en phase inverse. La purification n'a pas permis d'isoler le produit recherché.

Acide 2-[(carboxyméthyl)({8-[(4-méthylbenzene)sulfonamido]oct-1-yn-3-yl})amino]acétique (**162**)



$C_{19}H_{26}N_2O_6S$ - M = 410,48 g.mol^{-1}

Méthode A

À une solution du composé éthylique **151** (0,944 g, 1,752 mmol) dans 44 mL de MeOH, est ajouté 9 mL d'une solution de NaOH 4M. La solution est agitée à température ambiante pendant 3 h et la réaction est suivie par CCM. Le précipité est dissous avec de l'eau (10 mL/mmol) puis neutralisé avec de l'HCl 1M jusqu'à pH 3. Le milieu est filtré et le filtrat est évaporé et lyophilisé pour conduire au produit diacide **162** sous forme d'un solide.

Méthode B

À une solution du composé éthylique **151** (0,944 g, 1,752 mmol) dans 44 mL de MeOH, est ajouté 9 mL d'une solution de NaOH 4M. La solution est agitée à température ambiante pendant 3 h et la réaction est suivie par CCM. Le précipité est dissous avec de l'eau (10 mL/mmol) puis neutralisé avec de l'IR120 (H^+) jusqu'à pH 3. Le milieu est filtré et le filtrat est évaporé et lyophilisé pour conduire au produit diacide **162** sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 97 % (0,7g).

Méthode C

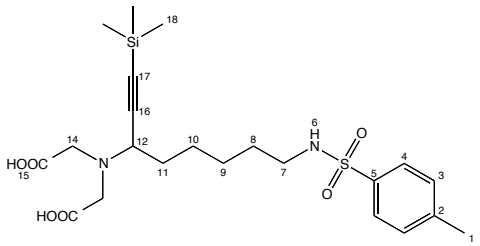
Le composé tert-butylique **156** (0,07 g, 0,118 mmol) est dilué dans 5 mL de DCM et mis à 0°C. L'acide trifluoroacétique (0,03 mL, 0,353 mmol) est ensuite ajouté au milieu réactionnel. La réaction est agitée pendant 2 jours à TA. Après ajout à nouveau de TFA, la réaction a abouti au produit attendu **162** mais elle n'est pas totale.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.19-1.40 (m, 8H, H_7+H_8+H_9+H_{10}), 2.1 (s, 3H, H_1), 2.6 (m, 2H, H_7), 3.3 (d, 2H, *J* = 17.17 Hz, H_{14}), 3.4 (d, 2H, *J* = 17.17 Hz, H_{14}), 3.5 (m, 1H, H_{12}), 7.4 (d, 2H, J = 7.49 Hz, H_4), 7.6 (d, 2H, J = 7.55 Hz, H_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 21.0 (C_1), 25.6 (C_{10}), 26.2 (C_9), 29.1 (C_8), 31.7 (C_{11}), 42.8 (C_7), 55.12 (C_{12}), 57.8 (C_{13}), 67.9 (C_{17}), 75.1 (C_{16}), 127.0 (C_4), 129.7 (C_3), 136.9 (C_5), 143.2 (C_2), 171.3 (C_{14})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 5 min , m/z = 411,5 $[M+H]^+$; 423,5 $[M+Na]^+$

Acide 2-[(carboxyméthyl)({8-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-(triméthylsilyl)oct-1-yn-3-yl})amino]acétique (**162'**)



$C_{22}H_{34}N_2O_6SSi$ - M = 482,67 g.mol^{-1}

Méthode C

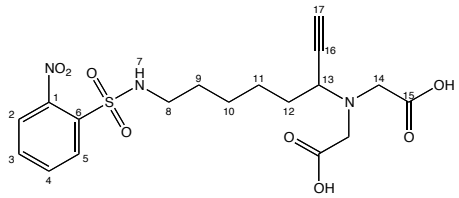
Le composé TMSE **157** (0,232 g, 0,34 mmol) est dissous dans 2,9 mL d'acide trifluoroacétique. Le milieu est agité pendant 4 h à TA. Le TFA est évaporé pour conduire au produit **162** avec l'alcyne encore protégée avec le groupement TMS sous forme d'huile marron (non purifiée) avec un rendement quantitatif.

RMN ^{1}H (DMSO-D6) : δ (ppm) 0.1 (s, 9H, H_{18}), 1.03-1.35 (m, 8H, H_8+H_9+H_{10}+H_{11}), 2.24 (s, 3H, H_1), 2.56 (m, 2H, H_7),), 3.05 (d, 2H, *J* = 17.17 Hz, H_{14}), 3.15 (d, 2H, *J* = 17.17 Hz, H_{14}), 3.46 (m, 1H, H_{12}), 7.24 (d, 2H, J = 7.49 Hz, H_4), 7.52 (d, 2H, J = 7.55 Hz, H_3)

RMN ^{13}C (DMSO-D6) : δ (ppm) 0 (C_{18}), 20.9 (C_1), 25.1 (C_{10}), 28.8 (C_9), 32.6 (C_{11} ou C_{12}), 42.4 (C_7), 126.5 (C_4), 129.6 (C_3), 137.7 (C_5), 142.5 (C_2), 172.2 (C_{14})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 6,1 min , m/z = 483,45 $[M+H]^+$; 505,50 $[M+Na]^+$; 526,25 $[M+CH_3CN]^+$

Acide 2-[(carboxyméthyl)({8-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]oct-1-yn-3-yl})amino]acétique (**163**)



$C_{18}H_{23}N_3O_8S$ - M = 441,46 g.mol^{-1}

Méthode B

Le composé éthylique **152** (1,045 g, 1,834 mmol) est mis en présence de 10 mL d'une solution de NaOH 4N dans 46 mL de MeOH. La solution est agitée à température ambiante pendant 3 heures et la réaction est suivie par CCM. Le précipité est dissous dans de l'eau (10 mL/mmol), puis neutralisé avec de l'IR120 (H^+). Le milieu est filtré et le filtrat est évaporé et lyophilisé pour donner le diacide **163** sous forme d'un solide marron avec un rendement de 84 % (0,68 g).

Méthode C

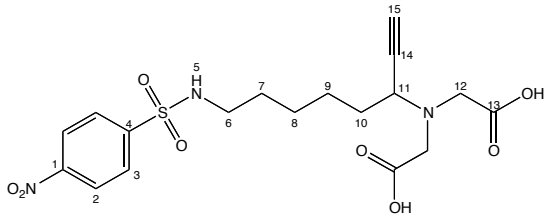
Le composé diprotégé par un groupement TMSE **158** (0,07 g, 0,098 mmol) est dissous dans 1 mL d'acide trifluoroacétique. Le milieu est agité pendant 4 h à TA. Le TFA est évaporé. Le produit brut correspondant au diacide **163** avec un groupement TMS sur l'alcyne a été obtenu sous forme d'un solde marron avec un rendement > à 100 % (0,25 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.2-1.65 (m, 4H, H_9, H_{10}, H_{11}, H_{12}), 2.9 (m, 2H, H_8), 3.25 (d, 2H, *J* = 17.17 Hz, H_{14}), 4.13 (d, 2H, *J* = 17.17 Hz, $H_{14'}$), 3.96 (m, 1H, H_{13}), 7.86-8.08 (m, 4H, H_{arom})

RMN ^{13}C (DMSO-D6) : δ (ppm) 26.2 (C_{11}), 26.5 (C_{10}), 34.1 (C_{12}), 43.8 (C_8), 55.2 (C_{14}), 56.7 (C_{13}), 74.8 (C_{17}), 81.8 (C_{16}), 124.8+129.9+133.1+134.4 (C_2, C_3, C_4, C_5), 173.2 (C_{15})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 5,043 min, m/z = 422,55 $[M+H]^+$; 464,65 $[M+Na]^+$; 480,60 $[M+K]^+$

Acide 2-[(carboxyméthyl)({8-[(4-nitrobenzene)sulfonamido]oct-1-yn-3-yl})amino]acétique (**164**)



$C_{18}H_{23}N_3O_8S$ - M = 441,46 g.mol^{-1}

Méthode B

Le composé éthylique **153** (0,9 g, 1,58 mmol) est mis en présence de 7,9 mL d'une solution de NaOH 4N dans 40 mL de MeOH. La solution est agitée à température ambiante pendant 3 h. À la fin de la réaction, le mélange réactionnel est acidifié par de l'IR120 puis filtré. Le filtrat est évaporé et lyophilisé pour conduire au diacide **164** sous forme d'un solide marron avec un rendement de 72 %.

Méthode C

Le composé TMSE **159** (0,277 g, 0,388 mmol) est dissous dans 3,6 mL d'acide trifluoroacétique. Le milieu est agité pendant 12 h à TA. Le TFA est évaporé pour conduire à un produit brut de 0,79 g avec un rendement quantitatif correspondant au produit diacide **164** avec un groupement TMS sur l'alcyne.

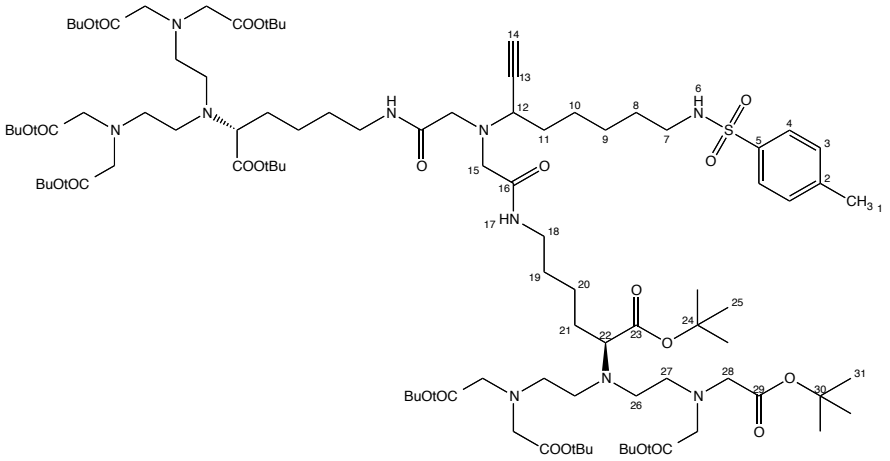
RMN ^{1}H (DMSO-D6) : δ (ppm) 1.26-1.6 (m, 8H, H_7, H_8, H_9, H_{10}), 2.79 (m, 2H, H_6), 3.25 (d, 2H, J = 17.15 Hz, H_{12}), 3.28 (d, 2H, *J* = 17.15 Hz, $H_{12'}$), 3.74 (m, 1H, H_{11}), 8.06 (d, 2H, *J* = 8.45 Hz, H_3), 8.43 (d, 2H, *J* = 8.43 Hz, H_2)

RMN ^{13}C (DMSO-D6) : δ (ppm) 124.65 (C_3), 128.09 (C_2), 146.3 (C_4), 149.5 (C_1)

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,6 min, m/z = 442 $[M+H]^+$; 464 $[M+Na]^+$

NB : Pour les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C des produits suivants, l'interprétation n'a pas pu être réalisée sur l'ensemble des produits, car les signaux des ligands polyaminocarboxylates (en particulier les signaux intégrant pour les groupements tert-butyles) masquent la plupart des signaux du reste de la structure. Donc c'est pourquoi dans ce qui suit, vous ne trouverez qu'une description succinte des structures par RMN.

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5S)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)({8-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]oct-1-yn-3-yl})amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**165**)



$C_{95}H_{166}N_{10}O_{24}S$ - M = 1864 g.mol^{-1}

À une solution de diacide **162** (0,4 g, 0,974 mmol) dans 2 mL de DCM anhydride, de l'EDC (0,392 g, 2,046 mmol) et une quantité catalytique d'HOBt sont ajoutés sous argon. Cette solution est agitée pendant 20 min à 0°C avant l'addition lente du chélatant **96** (1,597 g, 2,144 mmol) dilué dans 1 mL de DCM. La réaction est agitée à 0°C et sous argon durant 1h puis est remise lentement à TA jusqu'à la fin du couplage (72 h). Le milieu est alors dilué avec du DCM et la phase organique est lavée à l'eau puis séchée sur $MgSO_4$ avant d'être évaporée. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur cartouche de gel de silice pour conduire au châssis **165** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 21 % (383 mg).

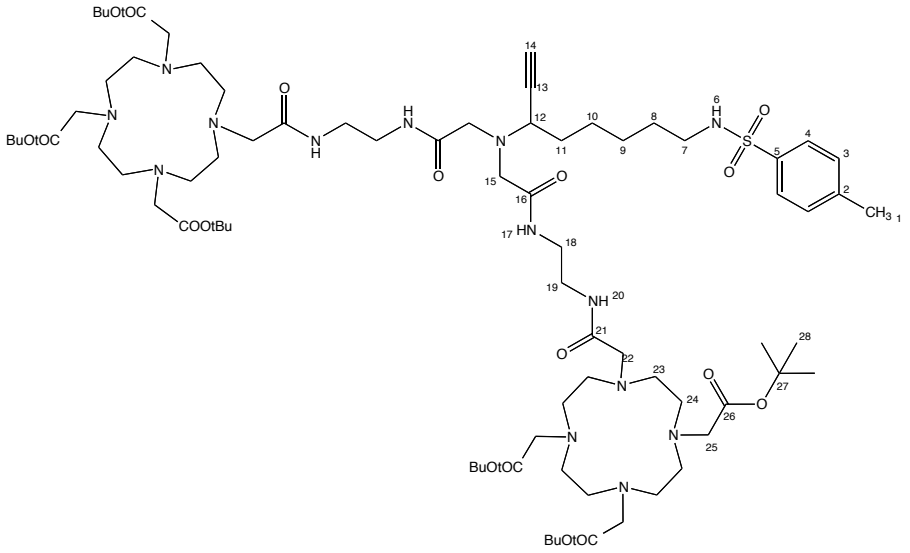
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.2-1.9 (m, 20H, H_8, H_9, H_{10}, H_{11}, H_{19}, H_{20}, H_{21}), 1.48 (s, 110H, H_{25}, H_{31}), 2.45 (s, 3H, H_1), 2.65 (m, 2H, H_7), 2.7-3.0 (m, 16H, H_{26}, H_{27}), 3.25-3.32 (m, 7H, H_{12}, H_{15}, H_{22}), 3.46 (s, 16H, H_{28}), 7.34 (d, 1H, J = 7.49 Hz, H_4), 7.77 (d, 1H, J = 7.45 Hz H_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 22 (C_1), 28.21 (C_{25}), 28.32 (C_{31}), 50 (C_{26}), 53.73 (C_{27}), 56.05 (C_{26}), 63 (C_{22}), 80.91 (C_{30}+C_{24}),127.09 (C_4), 129.61 (C_3), 170.77 (C_{23}+C_{29})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,1 min , m/z = 1865,6 $[M+H]^+$; 933,6 $[M+2H]^{2+}/2$; 944,4 $[M+H+Na]^{2+}/2$; 955,6 $[M+2Na]^{2+}/2$

HRMS : Masse exacte 933.098782 $[M+2H]^{2+}/2$: Masse trouvée 933.09851 $[M+2H]^{2+}/2$

2-{4,10-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-7-[({2-[2-({8-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]oct-1-yn-3-yl}({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétate de tert-butyle (**166**)



$C_{79}H_{138}N_{14}O_{18}S$ - $M = 1604{,}09\ g.mol^{-1}$

À une solution de diacide **162** (0,025 g, 0,061 mmol) dans 1 mL de DCM, de l'EDC (0,026 g, 0,134 mmol) et une quantité catalytique d'HOBt sont ajoutés. À cette solution homogène agitée à 0°C sous argon pendant 20 min, on additionne lentement le chélatant **97** (0,082 g, 0,134 mmol) dilué dans 1 mL de DCM. La réaction est agitée à 0°C durant une heure puis est remise lentement à TA jusqu'à la fin du couplage (12 h). Le milieu est alors dilué dans du DCM et la phase organique est lavée à l'eau puis séchée sur $MgSO_4$ avant d'être évaporée. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur cartouche de gel de silice pour conduire au châssis **166** sous forme d'un solide jaune avec un rendement quantitatif.

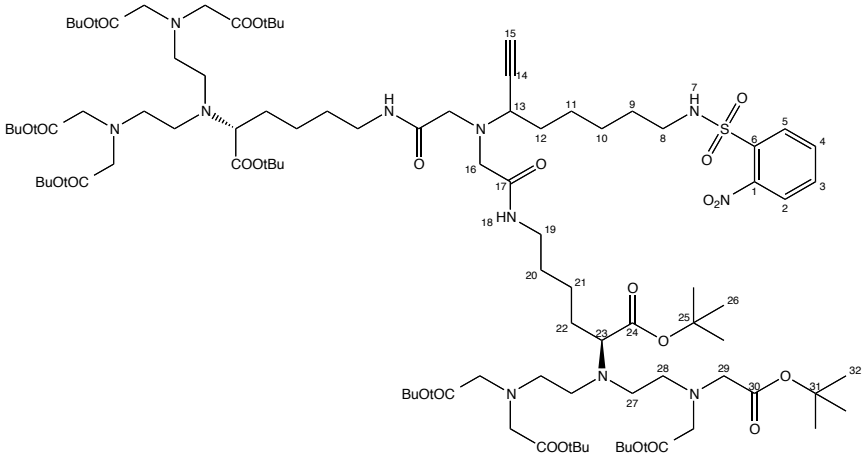
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.2-1.6 (m, 62H, H_8+H_9+H_{10}+H_{28}), 2.03 (d, 16H, H_{24}), 2.07 (d, 16H, H_{23}), 2.4 (s, 3H, H_1), 2.85 (m, 2H, H_7), 3.13-3.64 (m, 29H, H_{18}+H_{19}+H_{15}+H_{22}+H_{25}), 7.30 (d, 2H, J = 8.31 Hz, H_4), 7.8 (d, 2H, J = 8.20 Hz, H_3), 8.4 (d, 2H, H_{20}), 8.7 (d, 2H, H_{17})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 21.5 (C_1), 25.6 (C_{10}), 25.8 (C_9), 28.0 (C_{28}), 29.7 (C_8), 30.9 (C_{11}), 32.95 (C_{12}), 38.5 (C_{18}), 40.1 (C_{19}), 42.9 (C_7), 55.7 (C_{15}), 56.3 (C_{22}), 56.9 (C_{25}), 73.6 (C_{14}), 80.7 (C_{13}), 81.8 (C_{27}), 127.2 (C_4), 129.5 (C_3), 137.5 (C_5), 142.7 (C_2), 171.1 (C_{16}), 171.7 (C_{21}), 172.5 (C_{26})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 2,47 min , m/z = 536,00 $[M+3H]^{3+}/3$; 803,60 $[M+2H]^{2+}/2$

HRMS : Masse exacte 824.49093 $[M+2Na]^{2+}/2$; Masse trouvée 824.49095 $[M+2Na]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5S)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)({8-[(2-nitrobenzéne)sulfonamido]oct-1-yn-3-yl})amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**167**)



$C_{94}H_{163}N_{11}O_{26}S$ - M = 1895,42 g.mol^{-1}

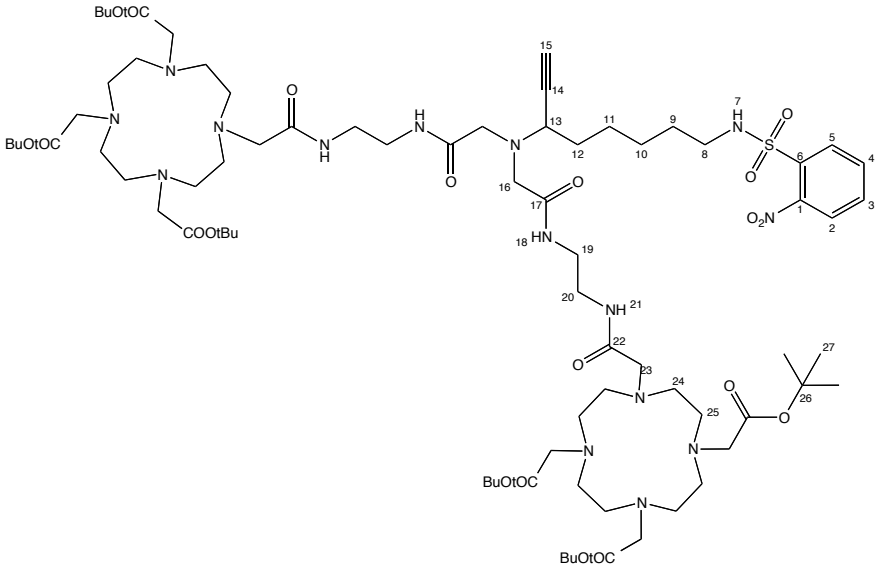
Une solution de tetrafluoroborate de O-benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetraméthyluronium TBTU (0,14 g, 0,438 mmol) dans 3 mL de DMF est ajoutée à 0°C à une solution du châssis **163** (0,233 g, 0,313 mmol), du chélatant **96** (0,022 g, 0,05 mmol) et de triéthylamine (0,506 g, 5 mmol) dans 12 mL de DMF. Le mélange est agité à 0°C pendant 96 h et à TA pendant encore 24 h. Le solvant est évaporé et le résidu est lavé avec une solution de HCl à 0,5M (2 fois, 187 mL/mmol), une solution saturée de $NaHCO_3$ (2 fois, 187 mL/mmol) et de l'eau (2 fois, 187 mL/mmol). Le brut réactionnel est purifié sur cartouche de gel de silice pour conduire au produit de couplage **167** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 21 % (20 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1-1.7 (m, 20H, H_9, H_{10}, H_{11}, H_{12}, H_{20}, H_{21}, H_{22}), 1.48 (s, 90H, H_{26}, H_{32}), 2.65-2.9 (m, 18H, H_8, H_{27}, H_{28}), 3.05-3.4 (m, 11H, H_{13}, H_{16}, H_{19}, H_{23}), 3.45 (s, 16H, H_{29}), 5,55 (m, 1H, H_7), 7.76-7.79 (m, 2H, H_3, H_4), 7.8 (m, 1H, H_5), 8.1 (m, 1H, H_2)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 25.66 (C_{21}), 28.30 (C_{26}. C_{32}), 29.34 (C_{11}), 29.70 (C_{22}), 43.52 (C_{19}. C_8), 50.07 (C_{27}), 53.65 (C_{28}), 55.27 (C_{16}), 56.05 (C_{29}), 56.53 (C_{12}), 64.24 (C_{23}), 80.95 (C_{25}. C_{31}), 125.23 (C_2), 131.03 (C_5), 132.68 (C_3), 133.46 (C_4), 170.78 (C_{30}), 172.90 (C_{24})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,9 min, m/z = 633 $[M+3H]^{3+}/3$; 949,20 $[M+2H]^{2+}/2$; 960 $[M+Na+H]^{2+}/2$; 970,9 $[M+2Na]^{2+}/2$; 1897,7 $[M+H]^+$

2-{4,7-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-10-[({2-[2-({8-[(2-nitrobenzene)sulfonamido]oct-1-yn-3-yl}({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétate de tert-butyle (**168**)



$C_{78}H_{135}N_{15}O_{20}S$ - M = 1635,06 g.mol^{-1}

À une solution du diacide **163** (0,025 g, 0,057 mmol) dans 0,2 mL de DCM, de l'EDC (0,024 g, 0,125 mmol) et une quantité catalytique de HOBt sont ajoutés. À cette solution homogène maintenue à 0°C sous azote, le chélatant **97** (0,077 g, 0,125 mmol) dilué dans 0,2 mL de DCM est additionné lentement. La réaction est agitée à 0°C sous azote durant une heure puis est remise lentement à TA jusqu'à la fin du couplage (12 h). Le milieu est alors dilué dans du DCM et la phase organique est lavée à l'eau puis séchée sur $MgSO_4$ avant d'être évaporée. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur cartouche de gel de silice pour conduire au produit de couplage **168** sous forme d'un solide jaune avec un rendement quantitatif.

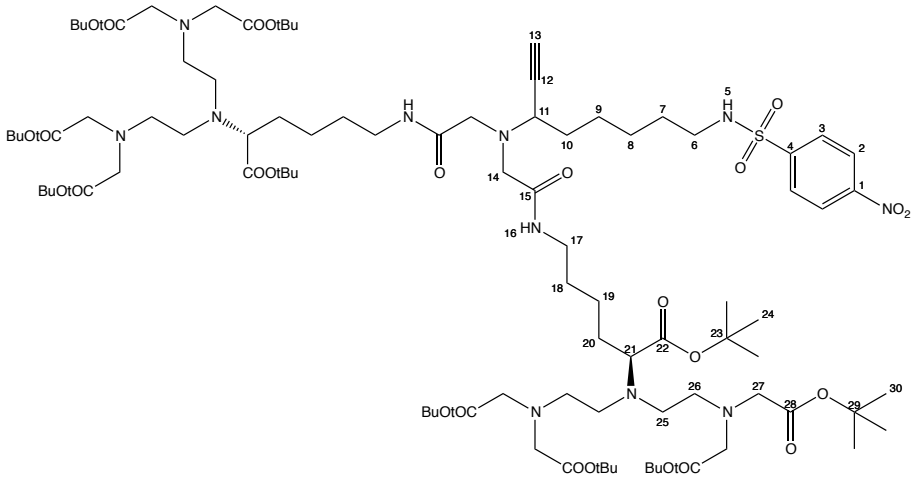
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 3 (m, 2H, H_8), 3.3-3.44 (m, 4H, H_{16}), 3.54 (m, 1H, H_{13}), 7.6-7.85 (m, 4H, H_2, H_3, H_4, H_5), 8.4 (m, 2H, H_{17}), 8.65 (m, 2H, H_{21})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 55.78 (C_{13}), 28.03 (C_{27}), 81.81 (C_{26}), 169.76 (C_{22}), 171.69 (C_{25}), 172.50 (C_{17})

LC-MS : ELSD 84 %, R_t = 2,1 min, m/z = 546,5 $[M+3H]^{3+}/3$; 819,05 $[M+2H]^{2+}/2$; 841 $[M+2Na]^{2+}/2$; 527,85 $[M-2tBu+H]^{3+}/3$; 589 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 1897,7 $[M+H]^+$

HRMS : Masse exacte 839.97565 $[M+2Na]^{2+}/2$; Masse trouvée 839.97400 $[M+2Na]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5S)-5-[bis(2-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)({8-[(4-nitrobenzene)sulfonamido]oct-1-yn-3-yl})amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**169**)



$C_{94}H_{163}N_{11}O_{26}S$ - M = 1895,42 g.mol^{-1}

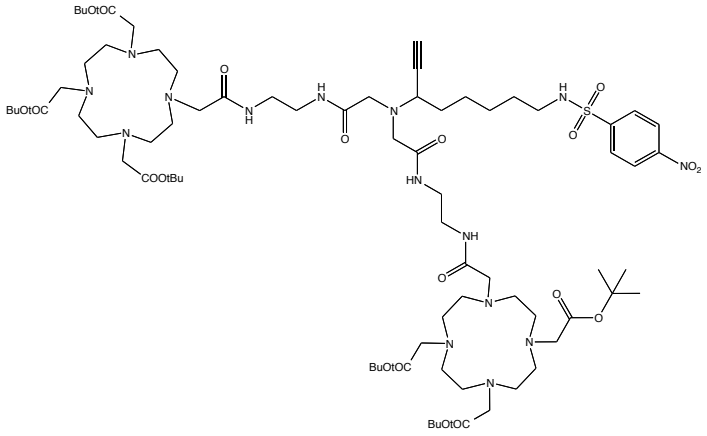
À une solution de diacide **164** (0,019 g, 0,043 mmol) dans 1 mL de DCM, de l'EDC (0,017 g, 0,09 mmol) et une quantité catalytique de HOBt sont ajoutés. À cette solution homogène maintenue à 0°C sous azote, le chélatant **96** (0,071 g, 0,095 mmol) dilué dans 0,5 mL de DCM est additionné lentement. La réaction est agitée à 0°C sous azote durant une heure puis est remise lentement à TA jusqu'à la fin du couplage (72 h). Le milieu est alors dilué dans du DCM et la phase organique est lavée à l'eau puis séchée sur $MgSO_4$ avant d'être évaporée. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur cartouche de silice en phase inverse pour conduire au produit de couplage **169** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 13 % (30 mg).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1-1.9 (m, H_7, H_8, H_9, H_{10}, H_{18}, H_{19}, H_{20}), 1.41 (s, 90H, H_{24}, H_{30}), 2.5-3.2 (m, H_{25}, H_{26}), 3.40 (s, 16H, H_{27}), 8.06 (d, 2H, H_3), 8.4 (d, 2H, H_2)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : δ (ppm) 27.3 (C_{24}, C_{30}), 55.01 (C_{27}), 79.9 (C_{23}, C_{29}), 122.5 (C_2), 127.6 (C_3), 169.72 (C_{28}), 171.90 (C_{22})

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,25 min , m/z = 949,15 $[M+2H]^{2+}/2$

2-{4,7-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-10-[({2-[2-({8-[(4-nitrobenzène)sulfonamido]oct-1-yn-3-yl}({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)ethyl]carbamoyl}méthyl)amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétate de tert-butyle (**170**)



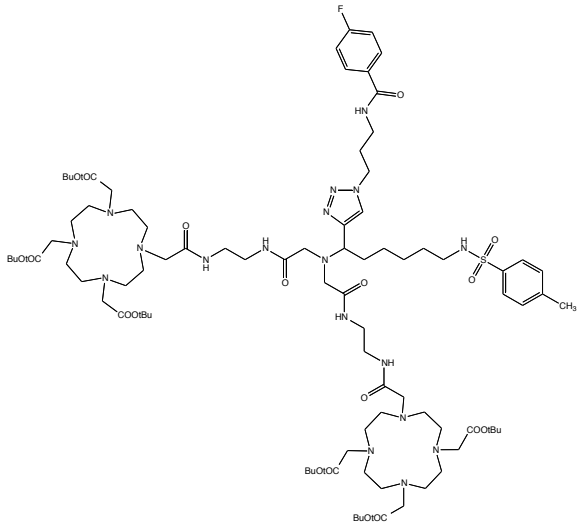
$C_{78}H_{135}N_{15}O_{20}S$ - M = 1635,06 g.mol^{-1}

A une solution de diacide **164** (0,035 g, 0,08 mmol) dans 1 mL de DCM, de l'EDC (0,034 g, 0,176 mmol) et une quantité catalytique de HOBt sont ajoutés. A cette solution homogène maintenue à 0°C sous azote, le chélatant **97** (0,108 g, 0,176 mmol) dilué dans 0,5 mL de DCM est additionné lentement. La réaction est agitée à 0°C sous azote durant une heure puis est remise lentement à TA jusqu'à la fin du couplage (12 h). Le milieu est alors dilué dans du DCM et la phase organique est lavée à l'eau puis séchée sur $MgSO_4$ avant d'être évaporée. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur cartouche de gel de silice pour conduire au produit de couplage **170** sous forme d'un solide jaune avec un rendement quantitatif (218 mg).

LC-MS : ELSD 77 %, R_t = 2,1 min, m/z = 547,7 $[M+3H]^{3+}/3$; 818,70 $[M+2H]^{2+}/2$; 527,55 $[M-2tBu+H]^{3+}/3$

NB : Pour les composés suivants, vous ne trouverez pas l'analyse des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C, car n'y figurent que les signaux des ligands polyaminocarboxylates.

2,2-diméthylpropanoate de {4,10-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-7-({[2-(2-{[1-(1-{3-[(4-fluorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]hexyl]({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)amino}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}méthyle (**171**)



$C_{89}H_{149}FN_{18}O_{19}S$ - M = 1826,31 g.mol^{-1}

Cu/CuSO$_4$

Le composé **166** (0,02 g, 0,012 mmol) et l'azoture **39** (0,003 g, 0,013 mmol) sont dissous d'un mélange (1:1) d'eau (1 mL) et de THF (1 mL). Une solution à 0,1 M de sulfate de cuivre (II) pentahydrate (0,312 mL) est ajoutée et environ 10 mg de cuivre (0,001 g, 0,012 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 3h30 à TA. Les solides sont filtrés et les solvants sont évaporés, mais le triazole **171** n'a pas été formé.

CuSO$_4$/Na-Ascorbate

Le composé **166** (0,02 g, 0,012 mmol) et l'azoture **39** (0,003 g, 0,014 mmol) sont dissous dans 1 mL de DMF dans un tube MW. Une solution à 0,05 M de sodium ascorbate (0,128 mL) est ajoutée suivie de l'addition d'une solution à 6 mM de sulfate de cuivre (II) pentahydrate (0,107 mL). Le tube est irradié à 100°C pendant 35 min suivi d'une agitation pendant 16 h à TA. Les solvants sont évaporés et le résidu est repris dans un mélange tBuOH/H_2O (1:1) puis lyophilisé. Malheureusement, le triazole **171** n'a pas été formé.

A-21.CuI

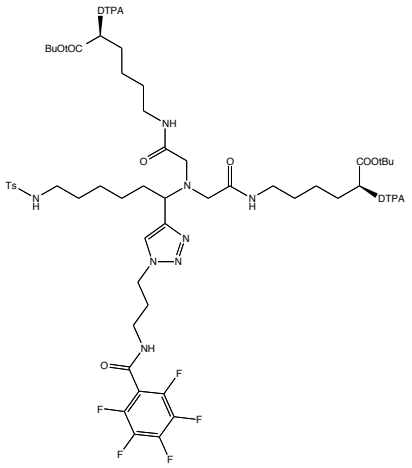
L'Amberlyst A-21.CuI (0,003 g, 0,004 mmol) est suspendue dans 1 mL de DCM. Sont ensuite ajoutés le composé **166** (0,02 g, 0,012 mmol) et l'azoture **39** (0,003 g, 0,014 mmol). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 72 h avant d'être filtré sur fritté. La résine est alors lavée 2 fois avec du DCM et le filtrat est concentré au rotavapor. Le triazole **171** a été obtenu sous forme d'une hule jaune avec un rendement de 27 % (5 mg).

LC-MS : ELSD 62 %, R_t = 2,05 min, m/z = 609,35 $[M+3H]^{3+}/3$; 856,60 $[M+2H]^{2+}/2$

Protocole général de chimie click du composé **172** au **180**

À une solution de l'alcyne **163** (0,004 g, 0,002 mmol) dans 0,5 mL de DCM, sont additionnés 1,1 éq. d'azoture et 0,13 éq. de catalyseur supporté (amberlyst A-21**.**CuI, 1,23 mmol/g). La suspension est agitée sur agitateur orbitalaire (600 rpm) pendant 72 h à température ambiante. La solution est alors filtrée et la résine est lavée avec du DCM (x2). Le filtrat est rassemblé et évaporé *in vacuo*.

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)({6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-(1-{3-[(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl})amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**172**)



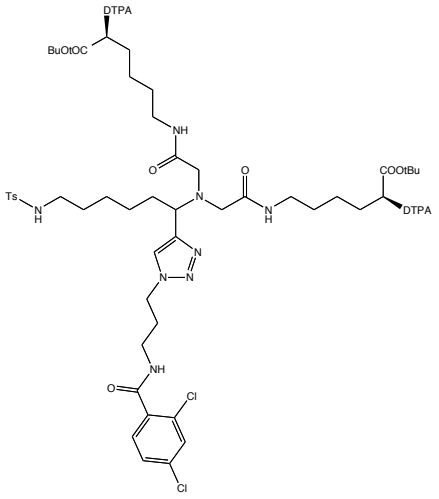
$C_{105}H_{173}F_5N_{14}O_{25}S$ - M = 2158,63 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-2,3,4,5,6-pentafluorobenzamide **34** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **163** pour conduire au triazole **172** avec un rendement quantitatif sous forme d'une huile verte (7,6 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,973 min, m/z = 721,05 $[M+3H]^{3+}/3$; 763,10 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 1081,25 $[M+2H]^{2+}/2$

HRMS : Masse exacte 1080.12581 $[M+2H]^{2+}/2$; Masse trouvée 1080.12324 $[M+2H]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)[1-(1-{3-[(2,4-dichlorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]hexyl]amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**173**)

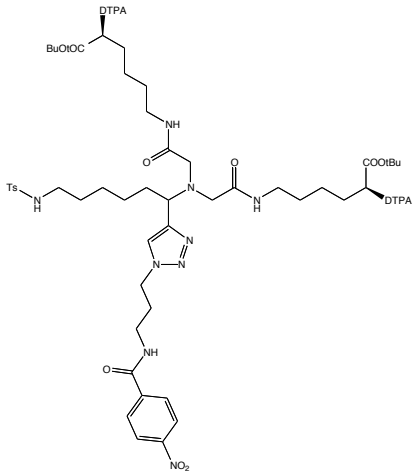


$C_{105}H_{176}Cl_2N_{14}O_{25}S$ - M = 2137,57 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-2,4-dichlorobenzamide **35** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **163** pour conduire au triazole **173** avec un rendement de 80 % sous forme d'une huile verte (13 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,980+4,615 min , m/z = 714,65 $[M+3H]^{3+}/3$; 1071,10 $[M+2H]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)[1-(1-{3-[(4-nitrophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]hexyl]amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**174**)



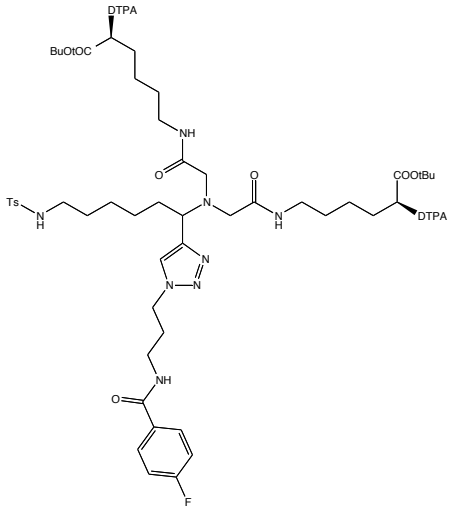
$C_{105}H_{177}N_{15}O_{27}S$ - M = 2113,68 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-4-nitrobenzamide **37** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **163** pour conduire au triazole **174** avec un rendement quantitatif sous forme d'une huile (5,8 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,964+4,389 min , m/z = 705,90 $[M+3H]^{3+}/3$; 796,25 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 1058,45 $[M+2H]^{2+}/2$; 1121,05 $[M+2Cu]^{2+}/2$

HRMS : Masse exacte 1057.64178 $[M+2H]^{2+}/2$; Masse trouvée 1057.63988 $[M+2H]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)[1-(1-{3-[(4-fluorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]hexyl]amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**176**)

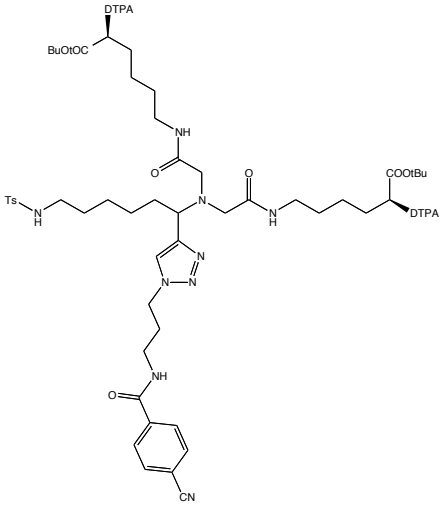


$C_{105}H_{177}FN_{14}O_{25}S$ - M = 2086,67 $g.mol^{-1}$

Le N-(3-azidopropyl)-4-fluorobenzamide **39** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **163** pour conduire au triazole **176** avec un rendement de 95 % sous forme d'une huile (10 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,526 min , m/z = 696,85 $[M+3H]^{3+}/3$; 739,40 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 1044,90 $[M+2H]^{2+}/2$; 1107,95 $[M+2Cu]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)[1-(1-{3-[(4-cyanophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]hexyl]amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**177**)

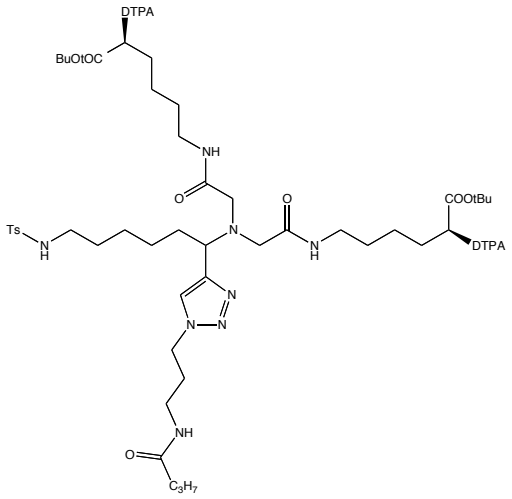


$C_{106}H_{177}N_{15}O_{25}S$ - M = 2093,69 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-4-cyanobenzamide **40** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **163** pour conduire au triazole **177** avec un rendement quantitatif sous forme d'une huile (12 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,7 min , m/z = 699,35 $[M+3H]^{3+}/3$; 1048,15 $[M+2H]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)({1-[1-(3-butanamidopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]hexyl})amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**178**)

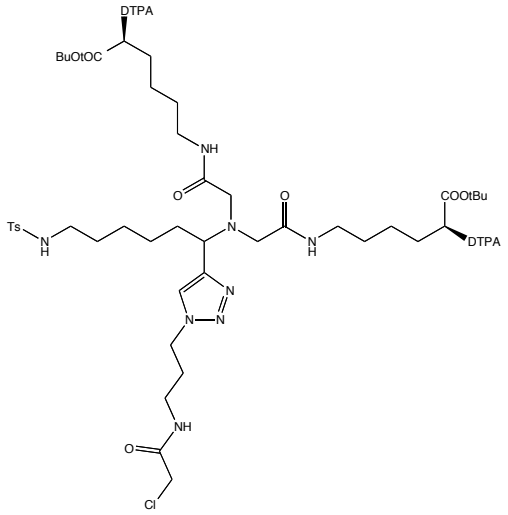


$C_{102}H_{180}N_{14}O_{25}S$ - M = 2034,66 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)butanamide **41** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **163** pour conduire au triazole **178** avec un rendement quantitatif sous forme d'une huile verte (12 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,2 min , m/z = 679,90 $[M+3H]^{3+}/3$; 1082,25 $[M+2H]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)(1-{1-[3-(2-chloroacétamido)propyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}-6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]hexyl)amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**179**)

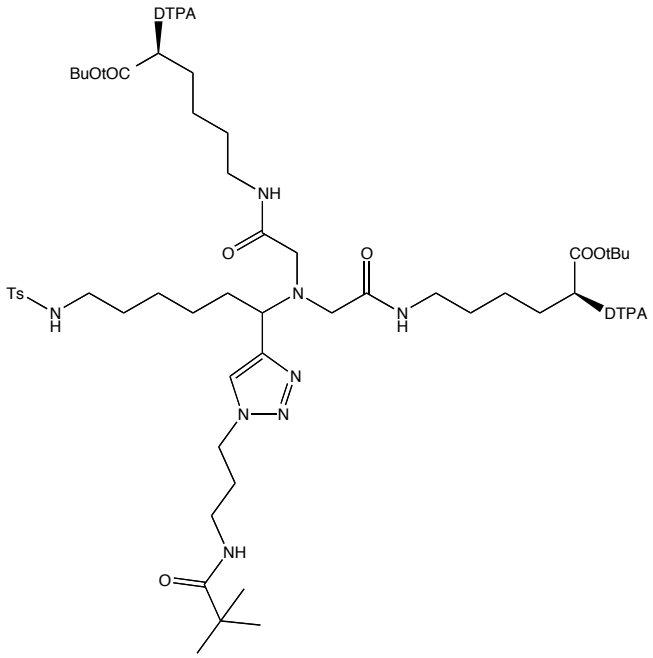


$C_{100}H_{175}ClN_{14}O_{25}S$ - M = 2041,06 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-2-chloroacétamide **42** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **163** pour conduire au triazole **179** avec un rendement quantitatif sous forme d'une huile verte (12 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,9 min , m/z = 681,60 $[M+3H]^{3+}/3$; 723,90 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 1021,65 $[M+2H]^{2+}/2$; 1084,70 $[M+2Cu]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)(1-{1-[3-(2,2-diméthylpropanamido)propyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}-6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]hexyl)amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**180**)



$C_{103}H_{182}N_{14}O_{25}S$ - M = 2048,69 g.mol^{-1}

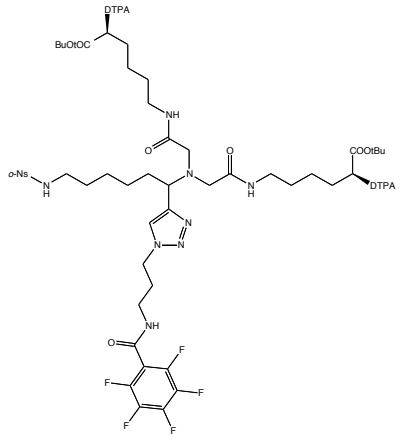
Le N-(3-azidopropyl)-2,2-diméthylpropanamide **43** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **163** pour conduire au triazole **180** avec un rendement de 95 % sous forme d'une huile verte (12 mg).

LC-MS : ELSD 95 % ; R_t = 3,9 min ; m/z = 684,30 $[M+3H]^{3+}/3$; 1026,05 $[M+2H]^{2+}/2$

Protocole général de chimie click du composé **181** au **190**

À une solution du composé **167** (0,003 g, 0,002 mmol) dans 0,5 mL de DCM, sont additionnés 1,1 éq. d'azoture et 0,13 éq. de catalyseur supporté (amberlyst A-21**.**CuI, 1,23 mmol/g). La suspension est agitée sur agitateur orbitalaire (600 rpm) pendant 72 h à température ambiante. La solution est alors filtrée et la résine est lavée avec du DCM (x2). Le filtrat est rassemblé et évaporé *in vacuo*.

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)({6-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]-1-(1-{3-[(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl})amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**181**)



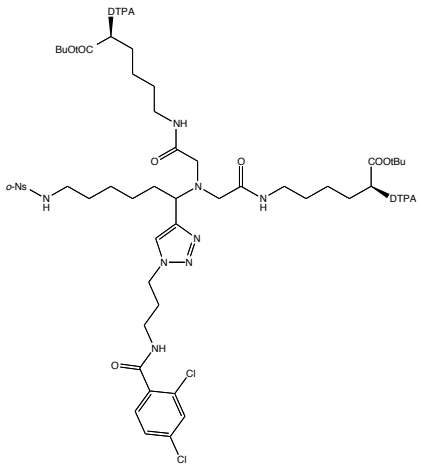
$C_{104}H_{170}F_5N_{15}O_{27}S$ - M = 2189,60 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-2,3,4,5,6-pentafluorobenzamide **34** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **167** pour conduire au triazole **181** avec un rendement de 97 % sous forme d'une huile verte (8 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,8 min , m/z = 731,4 $[M+3H]^{3+}/3$; 773,50 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 1096,15 $[M+2H]^{2+}/2$; 1159,35 $[M+2Cu]^{2+}/2$

HRMS : Masse exacte 1095.61040 $[M+2H]^{2+}/2$; Masse trouvée 1095.60755 $[M+2H]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)[1-(1-{3-[(2,4-dichlorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-6-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]hexyl]amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**182**)



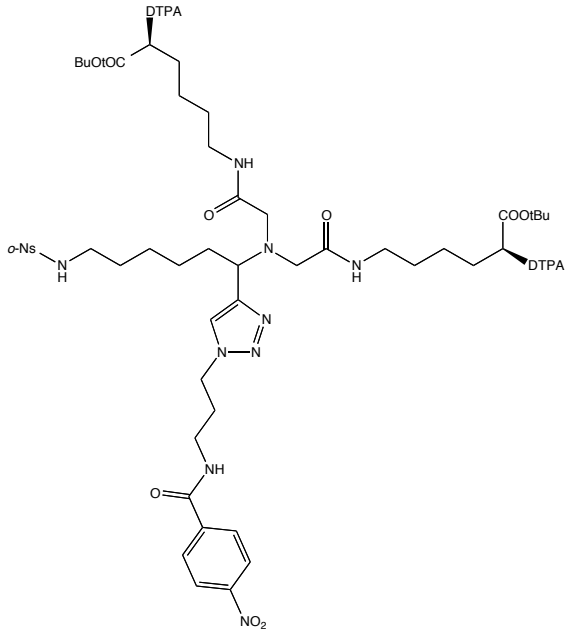
$C_{104}H_{173}Cl_2N_{15}O_{27}S$ - M = 2168,54 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-2,4-dichlorobenzamide **35** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **167** pour conduire au triazole **182** avec un rendement quantitatif sous forme d'une huile verte (7,2 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,933+4,532 min , m/z = 724,35 $[M+3H]^{3+}/3$; 765,75 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 1086,10 $[M+2H]^{2+}/2$; 1149,0 $[M+2Cu]^{2+}/2$

HRMS : Masse exacte 1085.09397 $[M+2H]^{2+}/2$; Masse trouvée 1085.09259 $[M+2H]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)[1-(1-{3-[(4-nitrophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-6-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]hexyl]amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**183**)

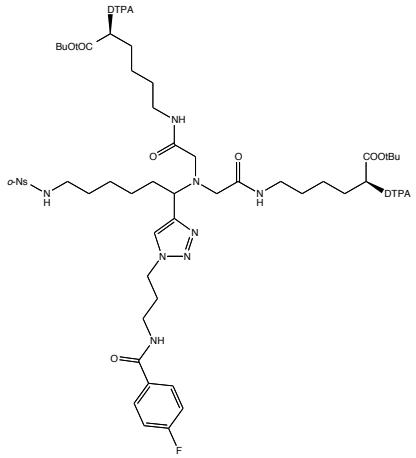


$C_{104}H_{174}N_{16}O_{29}S$ - M = 2144,65 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-4-nitrobenzamide **37** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **167** pour conduire au triazole **183** avec un rendement de 60 % sous forme d'une huile verte (7,5 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 3,96+4,45 min , m/z = 716,15 $[M+3H]^{3+}/3$; 758,05 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 1073,65 $[M+2H]^{2+}/2$; 1136,65 $[M+2Cu]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)[1-(1-{3-[(4-fluorophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-6-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]hexyl]amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**185**)



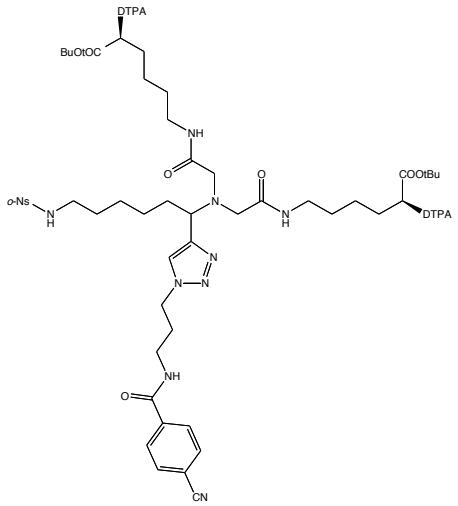
$C_{104}H_{174}FN_{15}O_{27}S$ - M = 2117,64 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-4-fluorobenzamide **39** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **167** pour conduire au triazole **185** avec un rendement quantitatif sous forme d'une huile verte (7 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,006 min , m/z = 707,1 $[M+3H]^{3+}/3$; 749,20 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 1060,25 $[M+2H]^{2+}/2$; 1122,90 $[M+2Cu]^{2+}/2$

HRMS : Masse exacte 1059.62924 $[M+2H]^{2+}/2$; Masse trouvée 1059.62777 $[M+2H]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)[1-(1-{3-[(4-cyanophenyl)formamido]propyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-6-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]hexyl]amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**186**)

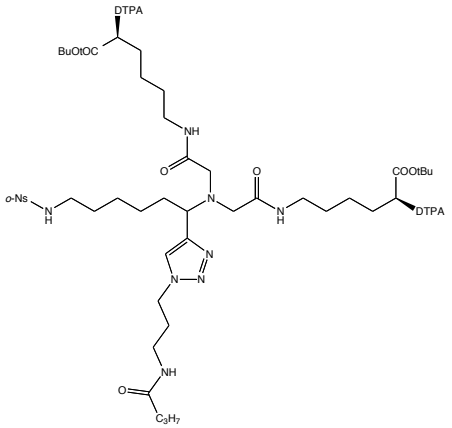


$C_{105}H_{174}N_{16}O_{27}S$ - M = 2124,66 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)-4-cyanobenzamide **40** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **167** pour conduire au triazole **186** avec un rendement de 46 % sous forme d'une huile verte (5 mg).

LC-MS : ELSD 46 %, R_t = 3,5-4,5 min , m/z = 709,75 $[M+3H]^{3+}/3$; 1064,20 $[M+2H]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)({1-[1-(3-butanamidopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-6-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]hexyl})amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**187**)

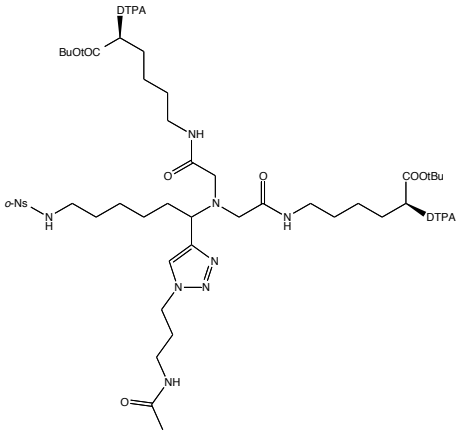


$C_{101}H_{177}N_{15}O_{27}S$ - M = 2065,64 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)butanamide **41** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **167** pour conduire au triazole **187** avec un rendement de 97 % sous forme d'une huile verte (14 mg).

LC-MS : ELSD 97 %, R_t = 3,937 min , m/z = 637,6 $[M+3H]^{3+}/3$; 1034,8 $[M+2H]^{2+}/2$; 1096,75 $[M+2Cu]^{2+}/2$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)({1-[1-(3-acétamidopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-6-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]hexyl})amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**189**)



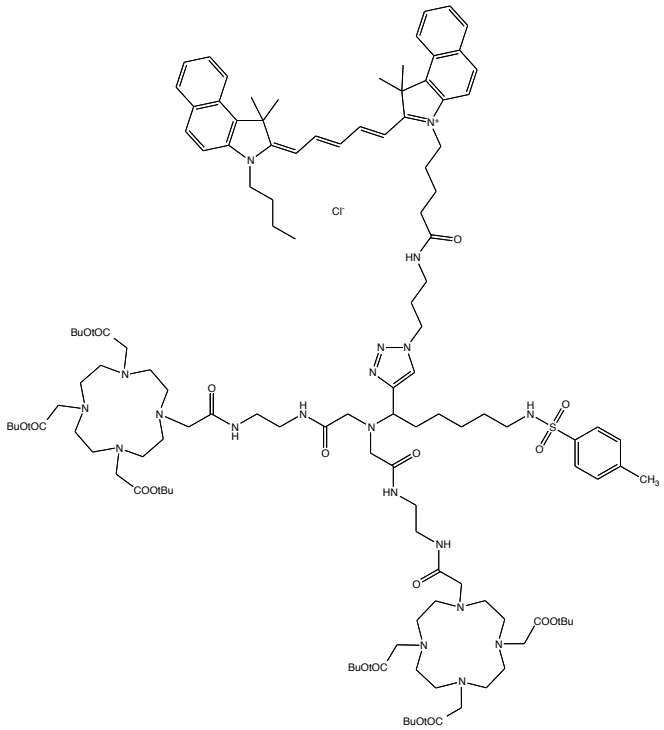
$C_{99}H_{173}N_{15}O_{27}S$ - M = 2137,58 g.mol^{-1}

Le N-(3-azidopropyl)acetamide **36** (0,001 g, 0,002 mmol) est additionné à une solution d'alcyne **167** pour conduire au triazole **189** avec un rendement de 84 % sous forme d'une huile jaune (8 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 4,1 min , m/z = 680,70 $[M+3H]^{3+}/3$; 1020,40 $[M+2H]^{2+}/2$

HRMS : Masse exacte 1019.62612 $[M+2H]^{2+}/2$; Masse trouvée 1019.62394 $[M+2H]^{2+}/2$

Chlorure de 3-(5-{[3-(4-{1-[bis({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)amino]-6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]hexyl}-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl]carbamoyl}pentyl)-2-[(1E,3E)-5-[(2E)-3-butyl-1,1-diméthyl-1H,2H,3H-benzo[e]indol-2-ylidène]penta-1,3-dièn-1-yl]-1,1-diméthyl-1H-benzo[e]indol-3-ium (**191**)

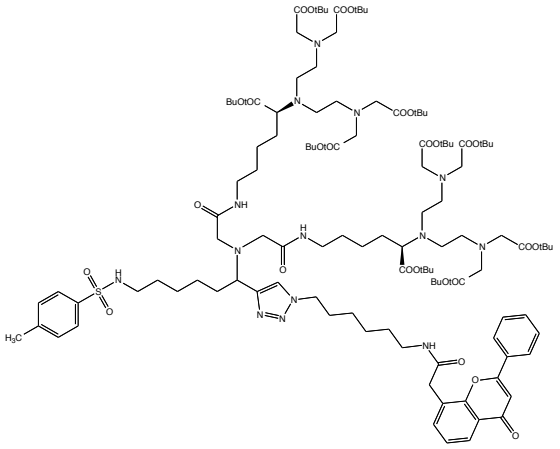


$C_{124}H_{191}ClN_{20}O_{19}S$ - M = 2333,48 $g.mol^{-1}$

L'Amberlyst A-21.CuI (0,001 g) est suspendue dans 0,5 mL de DCM. Sont ensuite ajoutés l'alcyne **166** (0,001 g, 0,001 mmol) et l'azoture Cy5.5 **111** (0,001 g, 0,001 mmol). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 72 h à TA avant d'être filtré sur fritté. La résine est alors lavée 2 fois avec dichlorométhane et le filtrat est concentré au rotavapor. Le triazole **191** est obtenu sous forme d'un solide bleu avec un rendement de 48 % (4 mg).

LC-MS : ELSD 48 %, R_t = 3,56 min , m/z = 578,55 $[M+4H]^{4+}/4$; 594,00 $[M+Cu+3H]^{4+}/4$; 609,35 $[M+2Cu+2H]^{4+}/4$; 777 $[M+3H]^{3+}/3$

(2S)-2-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-{2-[({[(5R)-5-[bis(2-{bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]amino}éthyl)amino]-6-(tert-butoxy)-6-oxohexyl]carbamoyl}méthyl)({6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-(1-{6-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]hexyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl})amino]acétamido}hexanoate de tert-butyle (**192**)

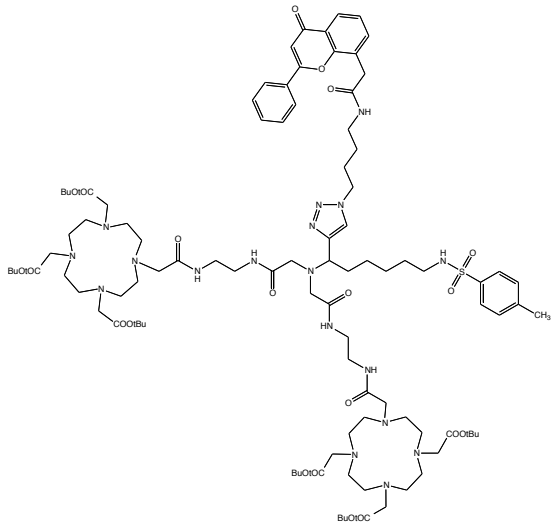


$C_{118}H_{190}N_{14}O_{27}S$ - M = 2268,91 g.mol^{-1}

L'azoture **117** (0,006 g, 0,016 mmol) et l'Amberlyst A-21.CuI (0,005 g, 0,004 mmol) sont additionnés à une solution d'alcyne **165** (0,027 g, 0,014 mmol) dans 0,65 mL de DCM pour conduire après filtration et extraction à 32 mg de triazole **192** sous forme d'huile verte avec un rendement de 44 %.

LC-MS : ELSD 77 %, R_t = 4,9 min , m/z = 757,55 $[M+3H]^{3+}/3$; 1136 $[M+2H]^{2+}/2$

2-{4,7-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-10-[({2-[2-({6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-(1-{4-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-7-yl)acétamido]butyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétate de tert-butyle (**194**)

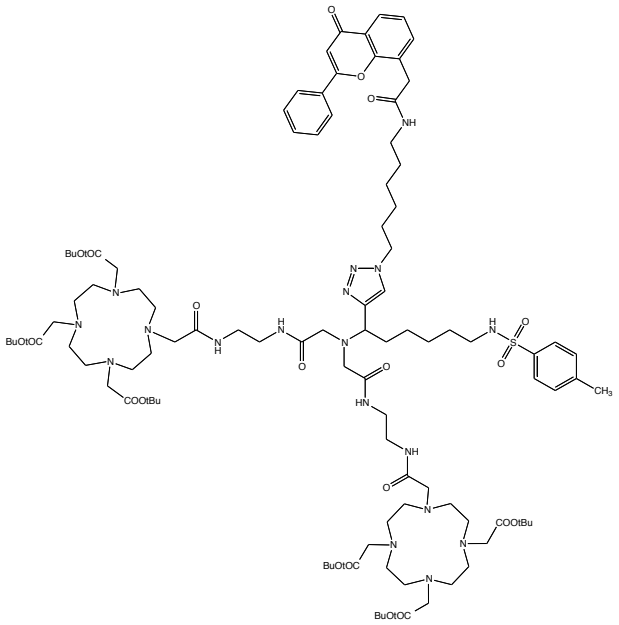


$C_{100}H_{158}N_{18}O_{21}S$ - M = 1980,50 g.mol^{-1}

L'Amberlyst A-21.CuI (0,015 g, 0,019 mmol) est suspendue dans 1 mL de DCM. Sont ensuite ajoutés l'alcyne **166** (0,1 g, 0,062 mmol) et l'azoture **116** (0,026 g, 0,069 mmol). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 72 h avant d'être filtré sur fritté. La résine est alors lavée 2 fois avec dichlorométhane et le filtrat est concentré au rotavapor. Le triazole **194** est obtenu sous forme d'un solide vert avec un rendement quantitatif (141 mg).

LC-MS : ELSD 88 %, R_t = 2,088 min , m/z = 643,40 $[M+3H]^{3+}/3$; 681,55 $[M+Cu+2H]^{3+}/3$; 702,05 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 723, 45 $[M+3Cu]^{3+}/3$

2-{4,7-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-10-[({2-[2-({6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-(1-{6-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-7-yl)acétamido]hexyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétate de tert-butyle (**195**)

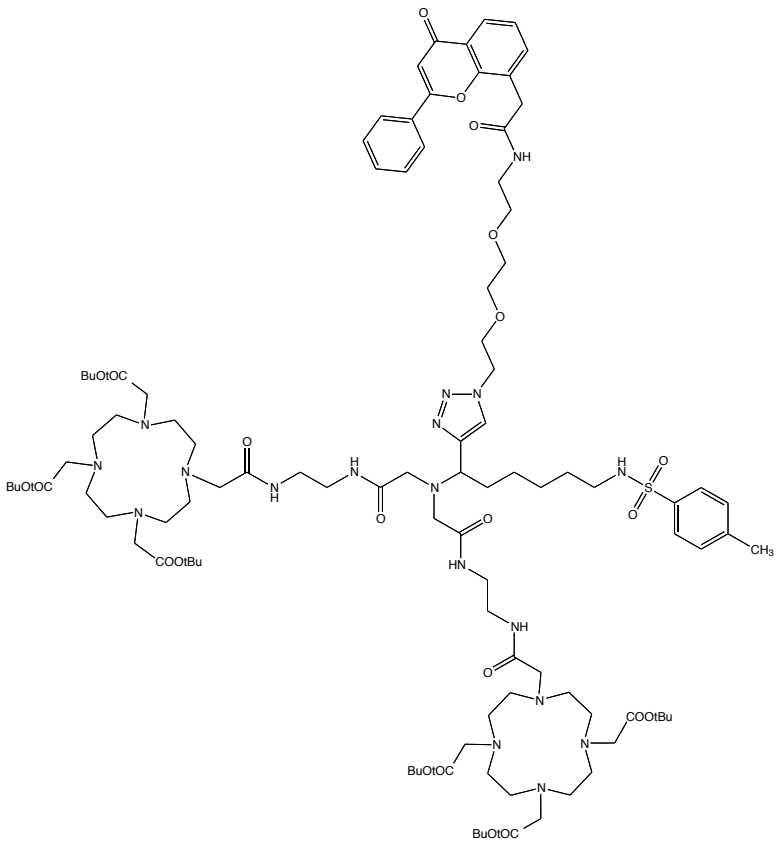


$C_{102}H_{162}N_{18}O_{21}S$ - M = 2008,55 g.mol^{-1}

L'Amberlyst A-21.CuI (0,018 g, 0,022 mmol) est suspendue dans 1 mL de DCM. Sont ensuite ajoutés l'alcyne **166** (0,118 g, 0,074 mmol) et l'azoture **117** (0,033 g, 0,081 mmol). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 72 h avant d'être filtré sur fritté. La résine est alors lavée 2 fois avec dichlorométhane et le filtrat est concentré au rotavapor. Le triazole **195** est obtenu sous forme d'un solide vert avec un rendement quantitatif (174 mg).

LC-MS : ELSD 87 %, R_t = 2,03 min , m/z = 652,85 $[M-tBu+3H]^{3+}/3$; 673,20 $[M+3H]^{3+}/3$; 690,90 $[M+Cu+2H]^{3+}/3$; 711,35 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$

2-{4,7-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-10-[({2-[2-({6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-{1-[2-(2-{2-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]éthoxy}éthoxy)éthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}hexyl}({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétate de tert-butyle (**196**)

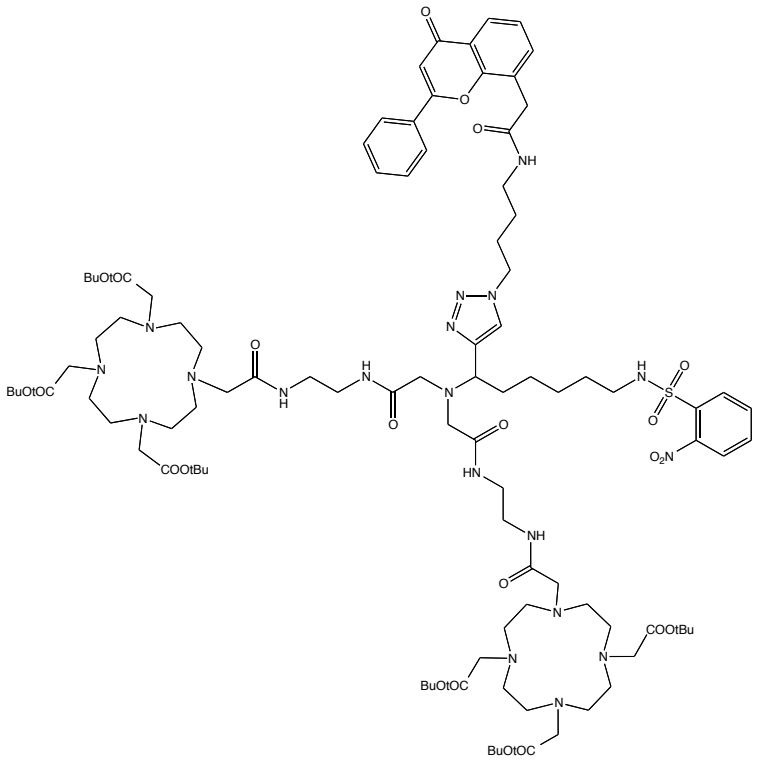


$C_{102}H_{162}N_{18}O_{23}S$ - M = 2040,55 g.mol^{-1}

L'Amberlyst A-21.CuI (0,015 g, 0,019 mmol) est suspendue dans 1 mL de DCM. Sont ensuite ajoutés l'alcyne **166** (0,1 g, 0,062 mmol) et l'azoture **118** (0,03 g, 0,069 mmol). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 72 h avant d'être filtré sur fritté. La résine est alors lavée 2 fois avec dichlorométhane et le filtrat est concentré au rotavapor. Le triazole **196** est obtenu sous forme d'un solide vert avec un rendement quantitatif (130 mg).

LC-MS : ELSD 95 %, R_t = 2,058 min , m/z = 683,65 $[M+3H]^{3+}/3$; 663,55 $[M-tBu+H]^{3+}/3$; 701,55 $[M+Cu+2H]^{3+}/3$; 722,05 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$

2-{4,7-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-10-[({2-[2-({6-[(2-nitrobenzene)sulfonamido]-1-(1-{4-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]butyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétate de tert-butyle (**198**)

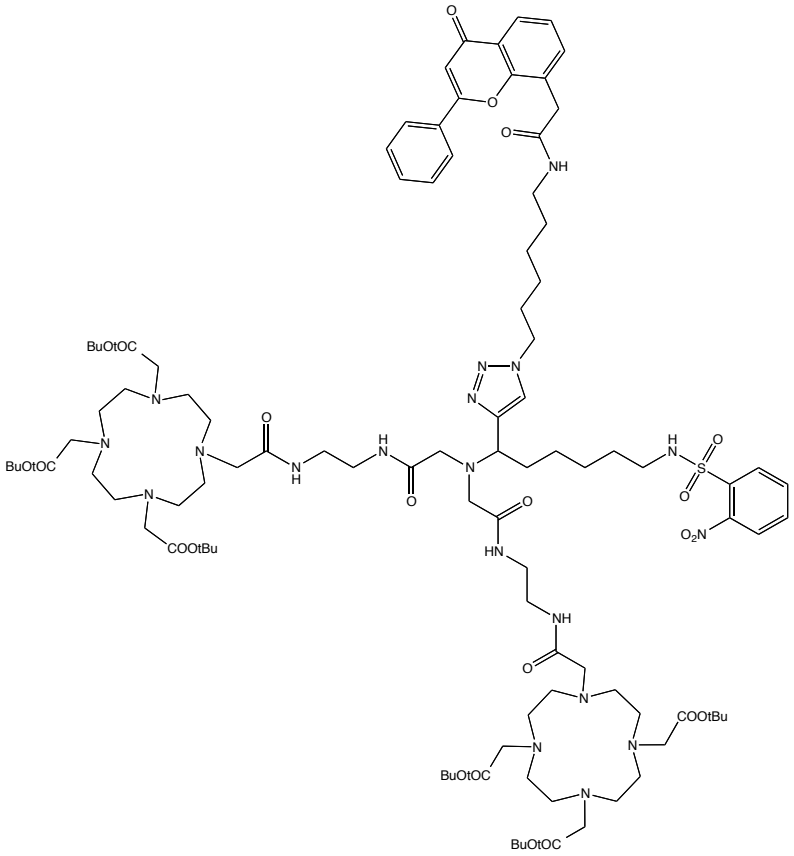


$C_{99}H_{155}N_{19}O_{23}S$ - M = 2011,47 g.mol^{-1}

L'azoture **116** (0,038 g, 0,101 mmol) et l'Amberlyst A-21.CuI (0,023 g, 0,028 mmol) sont additionnés à une solution d'alcyne **168** (0,15 g, 0,092 mmol) dans 0,5 mL de DCM. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 72 h. Le milieu réactionnel conduit après filtration et extraction à 217 mg de triazole **198** sous forme d'un solide vert avec un rendement de 88 %.

LC-MS : ELSD 82 %, R_t = 2,109 min, m/z = 671,55 $[M+3H]^{3+}/3$; 653,95 $[M-tBu+H]^{3+}/3$; 692 $[M+Cu+2H]^{3+}/3$; 712,80 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 733,80 $[M+3Cu]^{3+}/3$

2-{4,7-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-10-[({2-[2-({6-[(2-nitrobenzene)sulfonamido]-1-(1-{6-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]hexyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétate de tert-butyle (**199**)

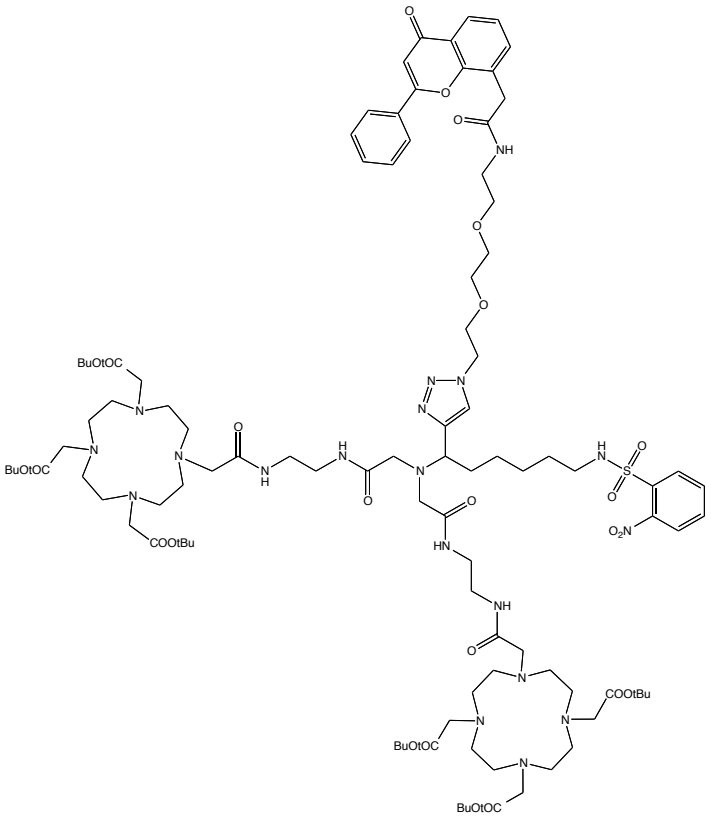


$C_{101}H_{159}N_{19}O_{23}S$ - M = 2039,52 g.mol^{-1}

L'azoture **117** (0,011 g, 0,026 mmol) et l' Amberlyst 21 + CuI (0,008 g, 0,010 mmol) sont additionnés à une solution d'alcyne **168** (0,039 g, 0,024 mmol) dans 0,5 mL de DCM. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 72 h. Le milieu réactionnel conduit après filtration et extraction à 37 mg de triazole **199** sous forme d'un solide vert avec un rendement de 51 %.

LC-MS : ELSD 72 %, R_t = 1,949 min, m/z = 680,80 $[M+3H]^{3+}/3$

2-{4,7-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-10-[({2-[2-({6-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]-1-{1-[2-(2-{2-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]éthoxy}éthoxy)éthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}hexyl}({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétate de tert)butyle (**200**)

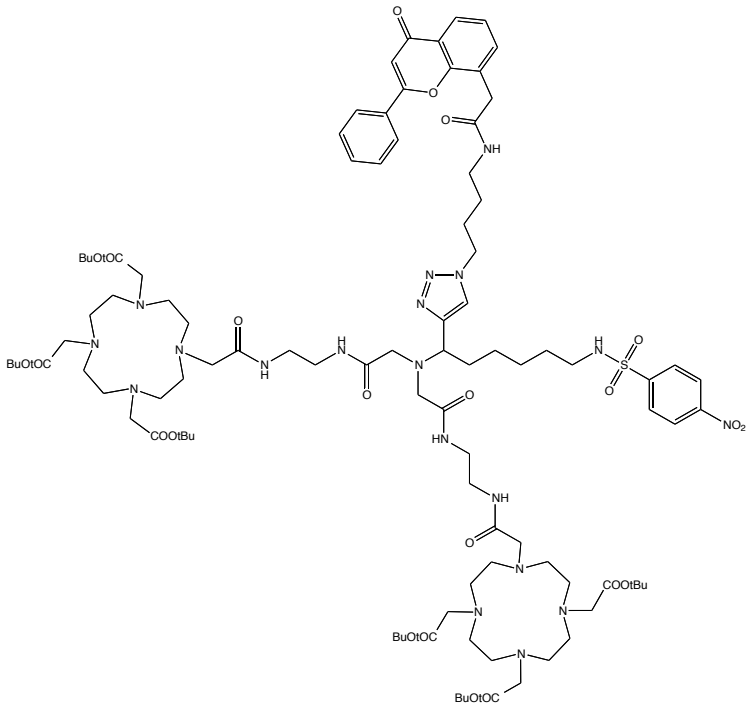


$C_{101}H_{159}N_{19}O_{25}S$ - M = 2071,52 g.mol^{-1}

L'azoture **118** (0,044 g, 0,101 mmol) et l' Amberlyst 21 + CuI (0,023 g, 0,028 mmol) sont additionnés à une solution d'alcyne **168** (0,150 g, 0,092 mmol) dans 1 mL de DCM. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 72 h. Le milieu réactionnel conduit après filtration et extraction à 240 mg de triazole **200** sous forme d'un solide vert avec un rendement quantitatif.

LC-MS : ELSD 80 %, R_t = 2,024 min, m/z = 691,40 $[M+3H]^{3+}/3$; 712 ?00 $[M+Cu+2H]^{3+}/3$; 732.70 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$

2-{4,7-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-10-[({2-[2-({6-[(4-nitrobenzène)sulfonamido]-1-(1-{4-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]butyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétate de tert-butyle (**202**)

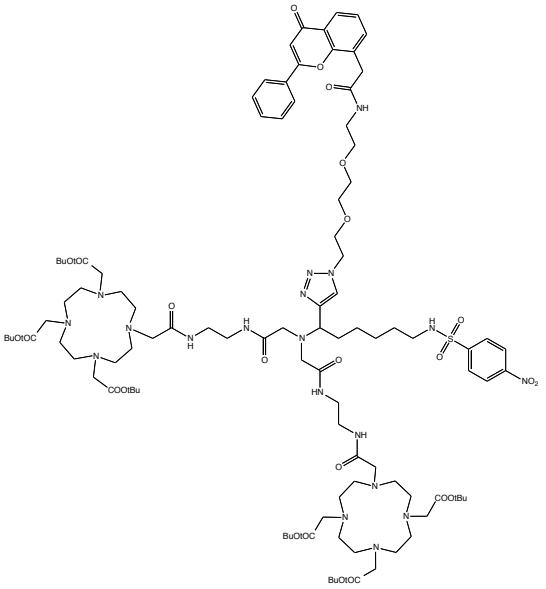


$C_{99}H_{155}N_{19}O_{23}S$ - M = 2011,47 g.mol^{-1}

L'azoture **116** (0,023 g, 0,061 mmol) et l'Amberlyst 21 + CuI (0,014 g, 0,017 mmol) sont additionnés à une solution d'alcyne **169** (0,09 g, 0,055 mmol) dans 0,5 mL de DCM. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 72 h. Le milieu réactionnel conduit après filtration et extraction à 107 mg de triazole **202** sous forme d'un solide vert avec un rendement de 56 %.

LC-MS : ELSD 62 %, R_t = 1,78 min, m/z = 671,30 $[M+3H]^{3+}/3$; 691,70 $[M+Cu+2H]^{3+}/3$; 712,65 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 733,60 $[M+3Cu]^{3+}/3$

2-{4,7-bis[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-10-[({2-[2-({6-[(4-nitrobenzène)sulfonamido]-1-{1-[2-(2-{2-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]éthoxy}éthoxy)éthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}hexyl}({[2-(2-{4,7,10-tris[2-(tert-butoxy)-2-oxoéthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétamido)éthyl]carbamoyl}méthyl)amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl}acétate de tert-butyle (**203**)



$C_{101}H_{159}N_{19}O_{25}S$ - M = 2071,52 g.mol^{-1}

L'azoture **118** (0,026 g, 0,061 mmol) et l' Amberlyst A-21.CuI (0,014 g, 0,017 mmol) sont additionnés à une solution d'alcyne **169** (0,09 g, 0,055 mmol) dans 0,5 mL de DCM. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 72 h. Le milieu réactionnel conduit après filtration et extraction à 111 mg de triazole **203** sous forme d'un solide vert avec un rendement de 50 %.

LC-MS : ELSD 56 %, R_t = 2,015 min, m/z = 711 $[M+Cu+2H]^{3+}/3$; 733,3 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 755,5 $[M+3Cu]^{3+}/3$

Protocole général avec Na_2S

Le triazole est dissous dans une mélange (1/1) de THF et d'eau (10 mL/mmol). Puis est ajouté 3 équivalents de sulfure de sodium. Il se forme alors un précipité noir/marron qui est éliminé par filtration (lavage avec une mélange 1/1 Eau/THF). Le filtrat est évaporé et lyophilisé.

6 protocoles de déprotection des acides carboxyliques

TFA/CH_2Cl_2 (1:1)

L'agent bifonctionnel de structure **XI** protégé est dilué dans 10 mL/mmol de DCM, puis on ajoute lentement 10 mL/mmol d'acide trifluoroacétique. La réaction est agitée pendant 72 heures à TA et concentrée sous vide.

TFA/CH_2Cl_2 (1:2)

L'agent bifonctionnel de structure **XI** protégé est dilué dans 66 mL/mmol de DCM, puis on ajoute lentement 33 mL/mmol d'acide trifluoroacétique. La réaction est agitée pendant 72 heures à TA et concentrée sous vide.

TFA/CH_2Cl_2 (1:3)

L'agent bifonctionnel de structure **XI** protégé est dilué dans 10 mL/mmol de DCM, puis on ajoute lentement 3 mL/mmol d'acide trifluoroacétique. La réaction est agitée pendant 72 heures à TA et concentrée sous vide.

TFA/CH_2Cl_2 (1:15)

L'agent bifonctionnel de structure **XI** protégé est dilué dans 6,5 mL/mmol de DCM, puis on ajoute lentement 0,5 mL/mmol d'acide trifluoroacétique. La réaction est agitée pendant 1h30 à TA et concentrée sous vide. Une solution de triisopropylsilane (3 %) dans 2,5 mL/mmol de TFA est ajoutée au milieu réactionnel. La solution est agitée pendant 48 h.Le milieu est concentré et le résidu est précipité dans de l'éther.

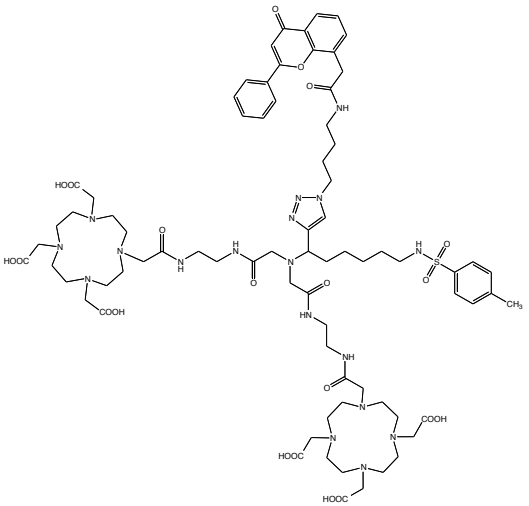
TFA/H_2O (95:5)

L'agent bifonctionnel de structure **XI** protégé est dilué dans 10 mL/mmol d'eau, puis on ajoute lentement 190 mL/mmol d'acide trifluoroacétique. La réaction est agitée pendant 24 heures à TA et concentrée sous vide.

TFA/H_2O/TIS (95/2,5/2,5)

L'agent bifonctionnel de structure **XI** protégé est dilué dans 5 mL/mmol d'eau et 5 mL/mmol de TIS, puis on ajoute lentement 190 mL/mmol d'acide trifluoroacétique. La réaction est agitée entre 5 et 16 h à TA puis elle est concentrée sous vide.

Acide 2-[4,7-bis(carboxymethyl)-10-[({2-[2-({6-[(4-meéthylbenzène)sulfonamido]-1-(1-{4-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-7-yl)acétamido]butyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[(2-{2-[4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétamido}éthyl)carbamoyl]méthyl})amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétique (**204**)

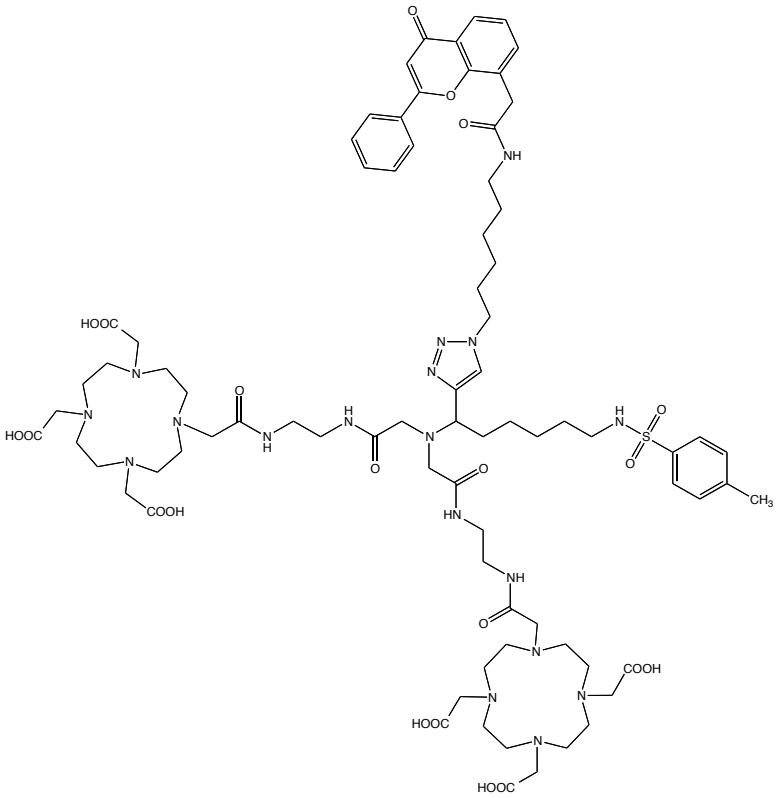


$C_{76}H_{110}N_{18}O_{21}S$ - M = 1643,86 g.mol^{-1}

L'agent bifonctionnel protégé **194** (0,01 g, 0,005 mmol) est dilué dans 0,025 mL d'eau et 0,025 mL de TIS, puis est ajouté lentement 4,75 mL d'acide trifluoroacétique. La réaction est agitée 16 h à TA puis elle est concentrée sous vide. L'agent déprotégé **204** est obtenu sous forme d'un solide vert avec un rendement de 17 % (1 mg).

LC-MS : ELSD 89 %, R_t = 1,431 + 2,063 min, m/z = 548,80 $[M+3H]^{3+}/3$; 569,40 $[M+Cu+2H]^{3+}/3$; 822,60 $[M+2H]^{2+}/2$; 852,95 $[M+Cu+H]^{2+}/2$

Acide 2-[4,7-bis(carboxyméthyl)-10-[({2-[2-({6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-(1-{6-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-7-yl)acétamido]hexyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[(2-{2-[4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétamido}éthyl)carbamoyl]méthyl})amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétique (**205**)

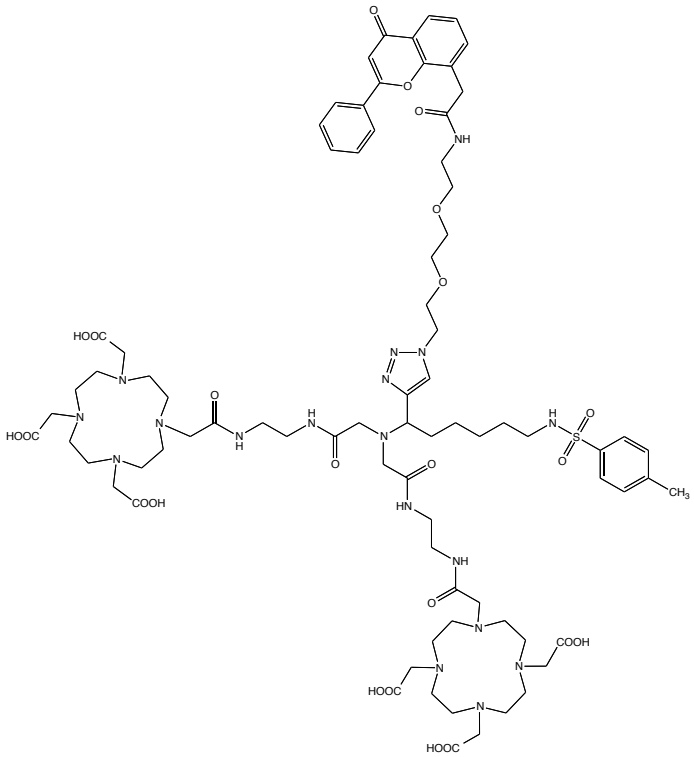


$C_{78}H_{114}N_{18}O_{21}S$ - M = 1671,91 g.mol^{-1}

L'agent bifonctionnel protégé **195** (0,004 g, 0,002 mmol) est dilué dans 0,005 mL d'eau et 0,005 mL de TIS, puis est ajouté lentement 0,95 mL d'acide trifluoroacétique. La réaction est agitée 16 h à TA puis elle est concentrée sous vide. L'agent déprotégé **205** est obtenu sous forme d'une huile bleutée avec un rendement de 30 % (1 mg).

LC-MS : ELSD 100 %, R_t = 1,216 + 2,102 min, m/z = 519,40 $[M-2tBU+3H]^{3+}/3$; 540,05 $[M-tBu+3H]^{3+}/3$; 779,69 $[M-2tBu+2H]^{2+}/2$

Acide 2-[4,7-bis(carboxyméthyl)-10-[({2-[2-({6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-{1-[2-(2-{2-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]éthoxy}éthoxy)éthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}hexyl}({[(2-{2-[4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétamido}éthyl)carbamoyl]méthyl})amino)acétamido]ethyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétique (**206**)

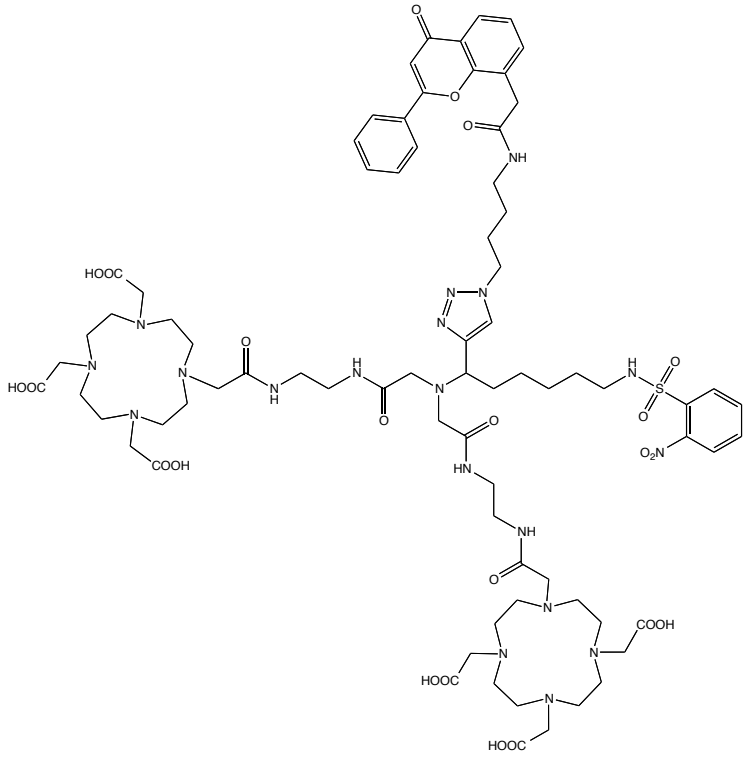


$C_{78}H_{114}N_{18}O_{23}S$ - M = 1703,91 g.mol^{-1}

L'agent bifonctionnel protégé **196** (0,008 g, 0,004 mmol) est dilué dans 0,01 mL d'eau et 0,01 mL de TIS, puis est ajouté lentement 1,9 mL d'acide trifluoroacétique. La réaction est agitée 16 h à TA puis elle est concentrée sous vide. L'agent déprotégé **206** est obtenu sous forme d'une huile verte après purification par HPLC avec un rendement de 73 % (5 mg).

LC-MS : ELSD 98 %, R_t = 1,406 + 2,014 min, m/z = 568,90 $[M+3H]^{3+}/3$; 852,85 $[M+2H]^{2+}/2$; traces 589,45 $[M+Cu+2H]^{3+}/3$; 883,50 $[M+Cu+H]^{2+}/2$

Acide 2-[4,7-bis(carboxyméthyl)-10-[({2-[2-({6-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]-1-(1-{4-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]butyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[(2-{2-[4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétamido}éthyl)carbamoyl]méthyl})amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétique (**207**)

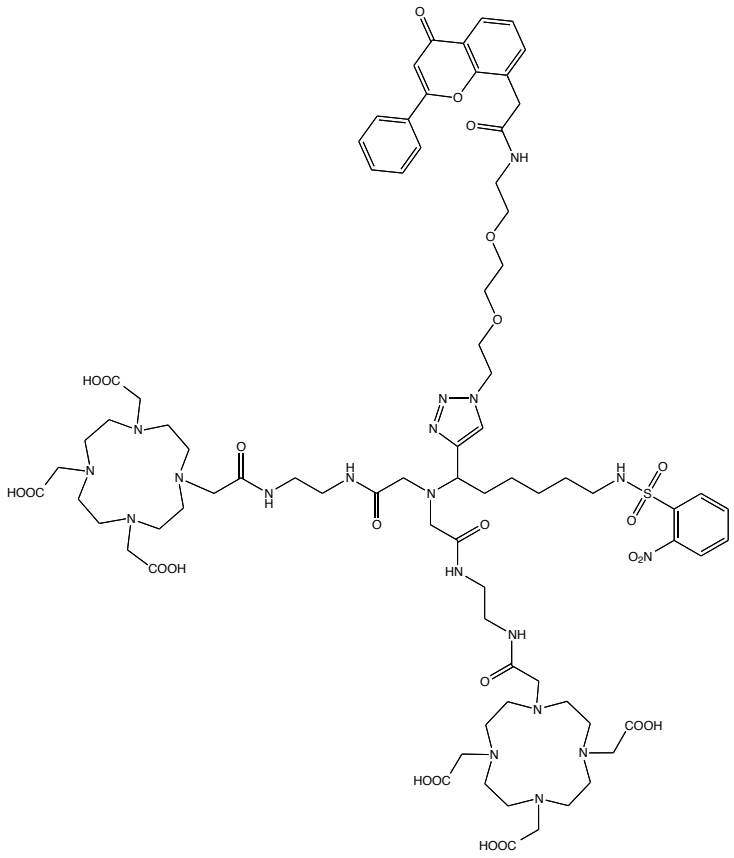


$C_{75}H_{107}N_{19}O_{23}S$ - M = 1674,83 g.mol^{-1}

L'agent bifonctionnel protégé **198** (0,037 g, 0,018 mmol) est dilué dans 0,1 mL d'eau et 0,1 mL de TIS, puis est ajouté lentement 5 mL d'acide trifluoroacétique. La réaction est agitée 16 h à TA puis elle est concentrée sous vide. L'agent déprotégé **207** est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 56 % (8 mg).

LC-MS : ELSD 98 %, R_t = 1,511 + 2,274 min, m/z = 559,25 $[M+3H]^{3+}/3$; 838,30 $[M+2H]^{2+}/2$; traces 579,45 $[M+Cu+2H]^{3+}/3$

Acide 2-[4,7-bis(carboxyméthyl)-10-[({2-[2-({6-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]-1-{1-[2-(2-{2-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]éthoxy}éthoxy)éthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}hexyl}({[(2-{2-[4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétamido}éthyl)carbamoyl]méthyl})amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétique (**208**)

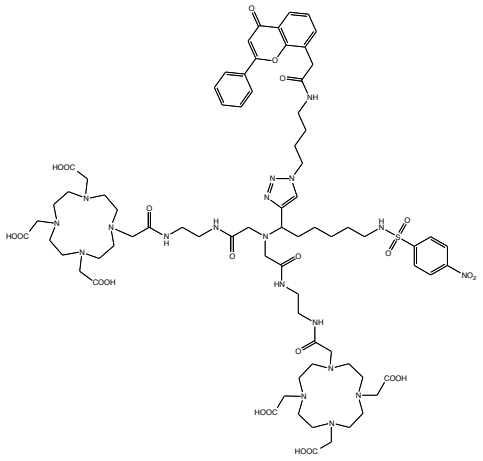


$C_{77}H_{111}N_{19}O_{25}S$ - M = 1734,88 g.mol^{-1}

L'agent bifonctionnel protégé **200** (0,01 g, 0,005 mmol) est dilué dans 0,02 mL d'eau et 0,020, mL de TIS, puis est ajouté lentement 3,8 mL d'acide trifluoroacétique. La réaction est agitée 16 h à TA puis elle est concentrée sous vide. L'agent déprotégé **208** est obtenu sous forme d'une huile verte avec un rendement de 36 % (4 mg).

LC-MS : ELSD 60 %, R_t = 2,075 min, m/z = 579,30 $[M+3H]^{3+}/3$; 868,95 $[M+2H]^{2+}/2$; traces 621,20 $[M+Cu+2H]^{3+}/3$

Acide 2-[4,7-bis(carboxyméthyl)-10-[({2-[2-({6-[(4-nitrobenzène)sulfonamido]-1-(1-{4-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]butyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[(2-{2-[4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétamido}éthyl)carbamoyl]méthyl})amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétique (**209**)



$C_{75}H_{107}N_{19}O_{23}S$ - M = 1674,83 g.mol^{-1}

L'agent bifonctionnel protégé **202** (0,01 g, 0,005 mmol) est dilué dans 0,02 mL d'eau et 0,020, mL de TIS, puis est ajouté lentement 3,8 mL d'acide trifluoroacétique. La réaction est agitée 16 h à TA puis elle est concentrée sous vide. L'agent déprotégé **209** est obtenu sous forme d'une huile verte après purification par HPLC avec un rendement de 39 % (2 mg).

LC-MS : ELSD 75 %, R_t = 1,945 min, m/z = 559,30 $[M+3H]^{3+}/3$; 838,50 $[M+2H]^{2+}/2$; traces 600,80 $[M+2Cu+H]^{3+}/3$; 901,50 $[M+2Cu]^{2+}/2$

Complexation avec $GdCl_3$

TA

A une solution d'agent bifonctionnel de structure **XI** dans 85 mL/mmol d'eau déminéralisée, est ajoutée 2 équivalents de chlorure de gadolinium hexahydrate. Le milieu est agité à TA pendant 10 jours. Le produit est ensuite évaporé et lyophilisé.

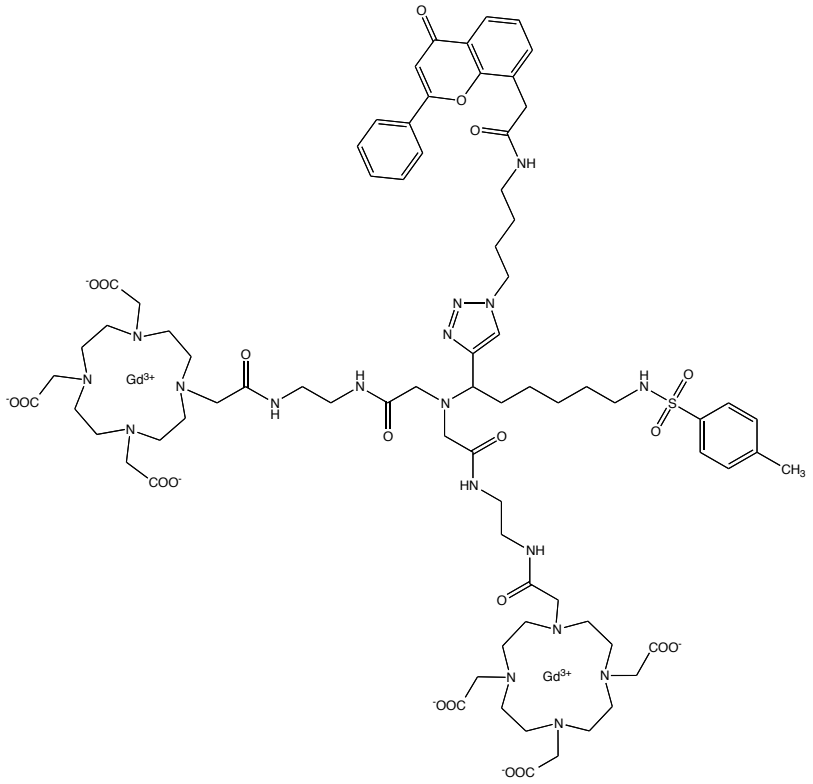
Chauffage

A une solution d'agent bifonctionnel de structure **XI** dans 85 mL/mmol d'eau déminéralisée, est ajoutée 2 équivalents de chlorure de gadolinium hexahydrate. Le milieu est chauffé à 85-90°C pendant 10 min à 3h. Le produit est ensuite évaporé et lyophilisé.

Irradiation MW

A une solution d'agent bifonctionnel de structure **XI** dans 85 mL/mmol d'eau déminéralisée, est ajoutée 2 équivalents de chlorure de gadolinium hexahydrate. Le milieu est irradié pendant 10 min à 1 h à 85°C. L'irradiation est reproduite autant de fois que nécessaire jusqu'à l'obtention du produit attendu (suivi LC-MS). Le produit est ensuite évaporé et lyophilisé.

2-[4,7-bis(carboxylatométhyl)-10-[({2-[2-({6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-(1-{4-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-7-yl)acétamido]butyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[(2-{2-[4,7,10-tris(carboxylatométhyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétamido}éthyl)carbamoyl]méthyl})amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétate de digadolinium (**210**)

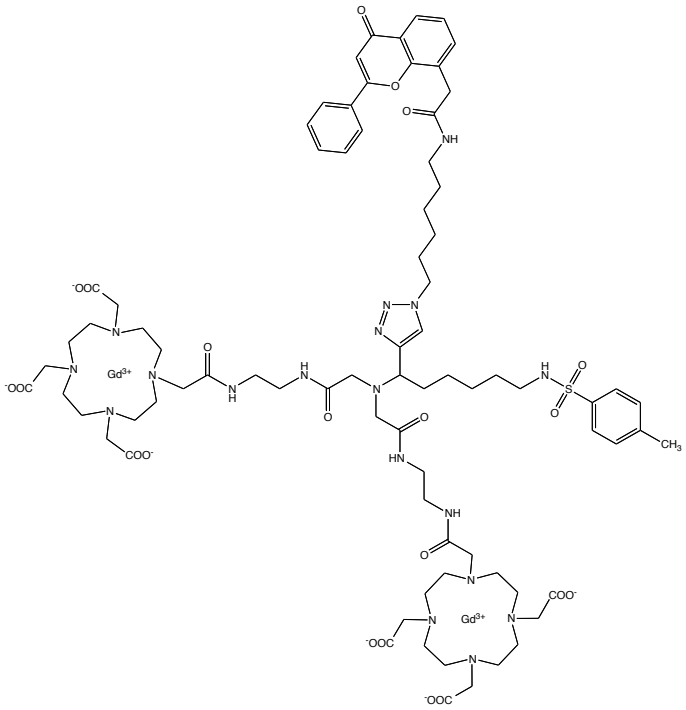


$C_{76}H_{104}Gd_2N_{18}O_{21}S$ - M = 1952,31 g.mol^{-1}

A une solution d'agent bifonctionnel **204** (0,012 g, 0,007 mmol) dans 0,75 mL d'eau déminéralisée, est ajoutée le $GdCl_3.6H_2O$ (0,008 g, 0,022 mmol). Le milieu est irradié pendant 1h à 85°C. Le produit est ensuite évaporé et lyophilisé. Le complexe Gd-XI **210** est obtenu sous forme d'un solide jaunâtre avec un rendement de 9 % (14,6 mg).

LC-MS : ELSD 9 %, R_t = 2,638 min, m/z = 651,35 $[M+3H]^{3+}/3$; 977 $[M+2H]^{2+}/2$

2-[4,7-bis(carboxylatométhyl)-10-[({2-[2-({6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-(1-{6-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-7-yl)acétamido]hexyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[(2-{2-[4,7,10-tris(carboxylatométhyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétamido}éthyl)carbamoyl]méthyl})amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétate de digadolinium (**211**)

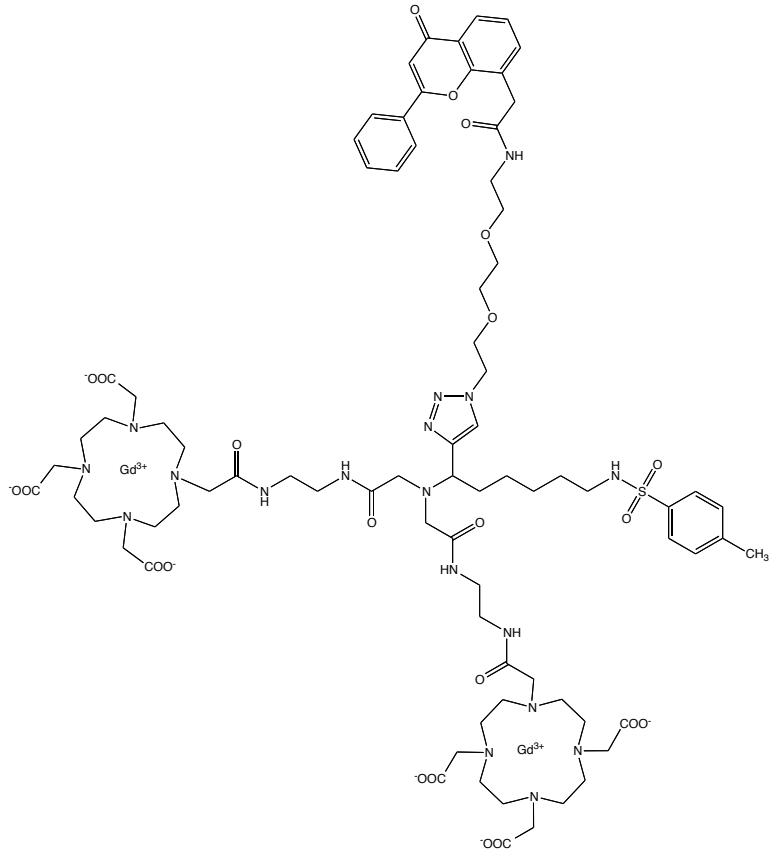


$C_{78}H_{108}Gd_2N_{18}O_{21}S$ - M = 1980,37 g.mol^{-1}

A une solution d'agent bifonctionnel **205** (0,014 g, 0,008 mmol) dans 0,84 mL d'eau déminéralisée, est ajoutée le $GdCl_3.6H_2O$ (0,009 g, 0,025 mmol). Le milieu est irradié pendant 30 min à 85°C. Le produit est ensuite évaporé et lyophilisé. Le complexe Gd-XI **211** est obtenu sous forme d'un solide jaune vert avec un rendement de 58 % (15 mg).

LC-MS : ELSD 27 %, R_t = 1,978 min, m/z = 641,50 $[M+3H]^{3+}/3$

2-[4,7-bis(carboxylatométhyl)-10-[({2-[2-({6-[(4-méthylbenzène)sulfonamido]-1-{1-[2-(2-{2-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]éthoxy}éthoxy)éthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}hexyl}({[(2-{2-[4,7,10-tris(carboxylatométhyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétamido}éthyl)carbamoyl]méthyl})amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétate de digadolinium (**212**)

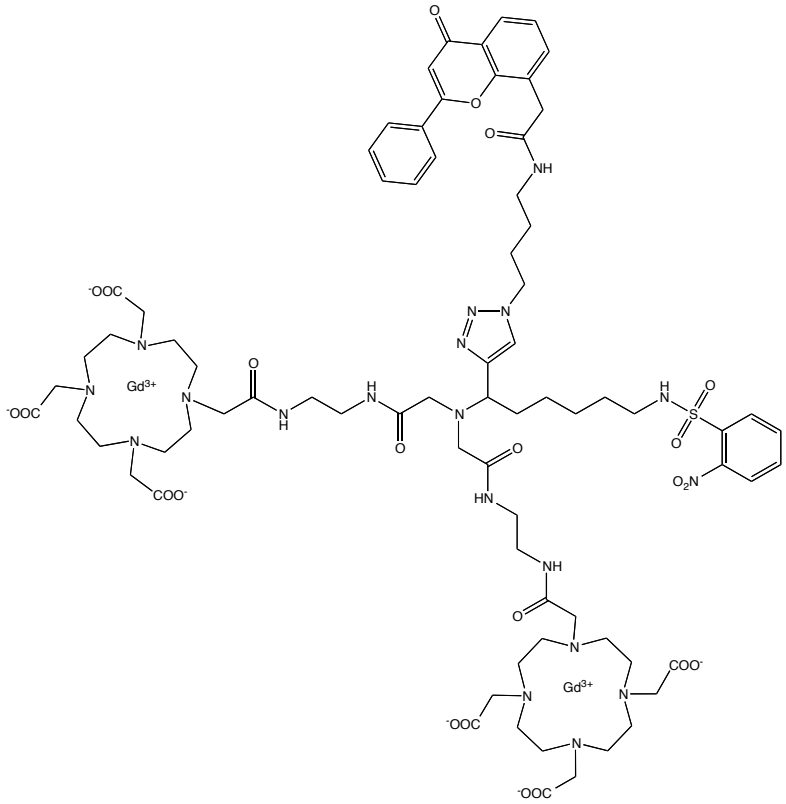


$C_{78}H_{108}Gd_2N_{18}O_{23}S$ - M = 2012,36 g.mol^{-1}

A une solution d'agent bifonctionnel **206** (0,001 g, 0,001 mmol) dans 0,1 mL d'eau déminéralisée, est ajoutée le $GdCl_3.6H_2O$ (0,001 g, 0,002 mmol). Le milieu est irradié pendant 30 min à 85°C. Le produit est ensuite évaporé et lyophilisé. Le complexe Gd-XI **212** est obtenu sous forme d'un solide jaune vert avec un rendement de 27 % (1,85 mg).

LC-MS : ELSD 17 %, R_t = 1,980 min, m/z = 652,45 $[M+3H]^{3+}/3$

2-[4,7-bis(carboxylatométhyl)-10-[({2-[2-({6-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]-1-(1-{4-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]butyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[(2-{2-[4,7,10-tris(carboxylatométhyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétamido}éthyl)carbamoyl]méthyl})amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétate de digadolinium (**213**)

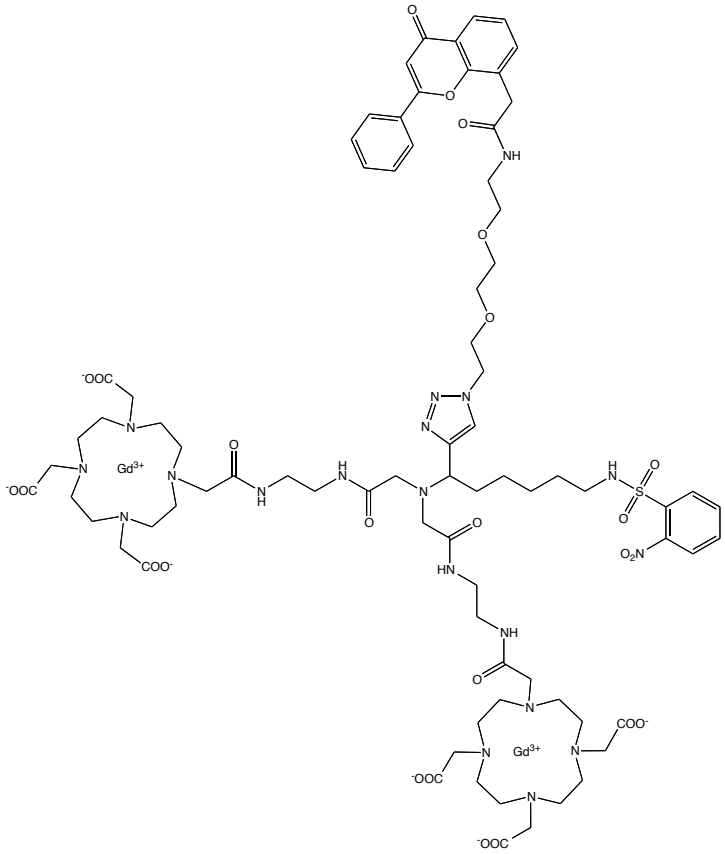


$C_{75}H_{101}Gd_2N_{19}O_{23}S$ - M = 1983,28 g.mol^{-1}

A une solution d'agent bifonctionnel **207** (0,008 g, 0,005 mmol) dans 0,5 mL d'eau déminéralisée, est ajoutée le $GdCl_3.6H_2O$ (0,004 g, 0,01 mmol). Le milieu est irradié pendant 30 min à 85°C. Le produit est ensuite évaporé et lyophilisé. Le complexe Gd-XI **213** est obtenu sous forme d'un solide blanc/jaune avec un rendement de 34 % (6,59 mg).

LC-MS : ELSD 41 %, R_t = 2,737 min, m/z = 681,85 $[M+3H]^{3+}/3$; 991,95 $[M+2H]^{2+}/2$

2-[4,7-bis(carboxylatométhyl)-10-[({2-[2-({6-[(2-nitrobenzène)sulfonamido]-1-{1-[2-(2-{2-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]éthoxy}éthoxy)éthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}hexyl}({[(2-{2-[4,7,10-tris(carboxylatométhyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétamido}éthyl)carbamoyl]méthyl})amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétate de digadolinium (**214**)

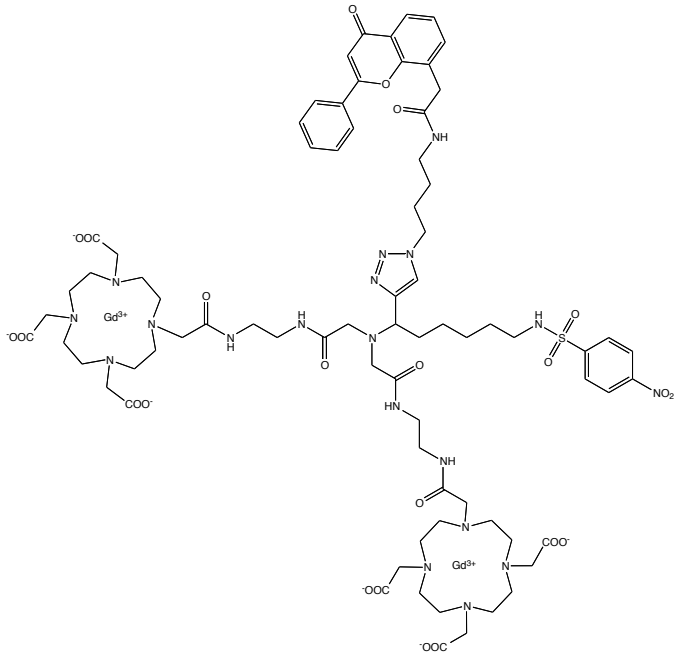


$C_{77}H_{105}Gd_2N_{19}O_{25}S$ - M = 2043,33 g.mol^{-1}

A une solution d'agent bifonctionnel **208** (0,001 g, 0,001 mmol) dans 0,1 mL d'eau déminéralisée, est ajoutée le $GdCl_3.6H_2O$ (0,001 g, 0,002 mmol). Le milieu est irradié pendant 30 min à 85°C. Le produit est ensuite évaporé et lyophilisé. Le complexe Gd-XI **214** est obtenu sous forme d'une huile verte avec un rendement de 12 % (2 mg).

LC-MS : ELSD 6 %, R_t = 2,048 min, m/z = 631,10 $[M+3H]^{3+}/3$

2-[4,7-bis(carboxylatométhyl)-10-[({2-[2-({6-[(4-nitrobenzène)sulfonamido]-1-(1-{4-[2-(4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-8-yl)acétamido]butyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl}({[(2-{2-[4,7,10-tris(carboxylatométhyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétamido}éthyl)carbamoyl]méthyl})amino)acétamido]éthyl}carbamoyl)méthyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]acétate de digadolinium (**215**)



$C_{75}H_{101}Gd_2N_{19}O_{23}S$ - M = 1983,28 g.mol^{-1}

A une solution d'agent bifonctionnel **209** (0,014 g, 0,008 mmol) dans 1 mL d'eau déminéralisée, est ajoutée le $GdCl_3.6H_2O$ (0,006 g, 0,016 mmol). Le milieu est irradié pendant 30 min à 85°C. Le produit est ensuite évaporé et lyophilisé. Le complexe Gd-XI **215** est obtenu sous forme d'un solide vert avec un rendement de 5 % (18 mg).

LC-MS : ELSD 2,2 %, R_t = 2,781 min, m/z = 661,90 $[M+3H]^{3+}/3$

Méthode de dosage de Gd^{3+} libre

9,5 mg d'orange de Xylénol orange est diluée dans 25 mL de tampon acétate (0,1 M, pH 5,2) afin d'obtenir une concentration finale à 0,5 mM. 10 µL de la solution contenant les complexes XI-Gd sont additionnées à 990 µL de la solution d'orange de Xylénol. L'absorbance à 573 nm de ce mélange est ensuite mesurée par un spectrophotomètre UV-Visible. En appliquant la loi de Beer-Lambert, on est capable de déterminer la concentration en gadolinium libre :

A = l. ε . [Gd(III) libre] où l est la longueur de la cuve (1 cm)
ε le coefficient d'extinction molaire = 20700 L. mol^{-1}.cm^{-1}
[Gd(III) libre] la concentration en ions gadolinium libre

d'où,

$$[Gd(III)libre] = \frac{A573}{\varepsilon} = \frac{A573}{20700}$$

Criblage sur puces à petites molécules

Obtention des lames fluorées

Les lames sont préalablement activées par immersion dans une solution de NaOH à 10g/100ml dans de l'éthanol à 60% puis agitées pendant 1 heure. Les lames sont ensuite lavées 2 fois à l'eau Milli-Q (immersion et 30 s aux ultrasons) puis 2 fois à l'éthanol (immersion et 30 s aux ultrasons). Les lames préalablement activées sont plongées dans une solution de Rf8-ethyl-$SiCl_3$ à 3 % (un trichlorosilane comportant une queue perfluorée de huit carbones) dans 50 mL d'éthanol. La solution est maintenue sous agitation et sous azote pendant une nuit. Après transfert sur un portoir en inox, les lames sont lavées à l'éthanol (immersion et 30 s aux ultrasons x3), à l'eau Milli-Q (immersion et 30 s aux ultrasons x3) puis séchées sous flux d'air comprimé et conservées au dessiccateur.

Préparation des lames « **amino** »

Le protocole de silanisation s'est déroulé en deux étapes: une étape d'activation et une étape de fonctionnalisation.

Activation des lames ordinaires de microscope (libération des sites silanols)

Les lames sont placées sur un portoir en verre et immergées entièrement dans l'éthanol absolu puis soumises aux ultrasons pendant 10 minutes. Après deux lavages rapides à l'eau Milli-Q, les lames sont plongées dans une solution ammoniac à 28%/péroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 30 % dans l'eau)/eau Milli-Q (1/1/5 – 30 ml/30 ml/150 ml) et la solution est mise sous faible agitation à température ambiante pendant 1 h. Les lames sont à nouveau rincées 2 fois à l'eau Milli-Q puis immergées dans une solution d'HCl (37 %)/eau Milli-Q (1/6 – 30 ml/180 ml) sous faible agitation à température ambiante pendant 30 minutes. Après deux lavages rapides à l'eau Milli-Q et à l'éthanol, elles sont séchées, une à une, sous flux d'air comprimé. Les lames sont directement engagées dans l'étape de fonctionnalisation.

Obtention des lames « amino »

L'APTES est mis en solution dans l'éthanol anhydre (3% d'APTES dans l'éthanol (*V/V* – 8 ml/210 ml) sous azote durant 20 min. Les lames préalablement activées sont placées sur un portoir en verre, puis plongées entièrement dans la solution d'APTES. Le milieu est agité durant 5h à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées, par immersion, trois fois dans l'éthanol, trois fois dans un mélange éthanol/eau-Milli-Q (1/1) puis trois fois à l'eau Milli-Q durant 30 secondes et sous ultrasons pour chaque lavage. Les lames sont ensuite séchées rapidement, une à une, sous un flux d'air comprimé et placées dans une étuve à 120-140°C durant une nuit. Les lames ainsi fonctionnalisées sont conservées dans un dessiccateur, sous atmosphère inerte.

Dosage des fonctions amines libres au bleu de bromophénol

Les lames sont immergées dans une solution de bleu de bromophénol à 10 mg/100 mL de DMF (solution jaune) durant 30 min, puis lavées par un trempage rapide dans de l'éthanol et séchées sous flux d'air comprimé. La lame (une lame à la fois) est ensuite immergée dans 4 mL d'une solution de pipéridine à 20 % (v/v) dans du DMF durant 10 min. Enfin, les complexes « bleu de bromophénol-piperidinium » solubles dans le DMF sont lus dans la solution au spectrophotomètre UV-visible à la longeur d'onde de 605 cm^{-1}.

Formation des lames « **isocyanate** »

Le protocole de fonctionnalisation se déroule en trois étapes: une étape de greffage de l'espaceur, une étape de déprotection de l'espaceur et une étape de fonctionnalisation en dérivé isocyanate.

Greffage de l'espaceur PEG

Dans une petite cuve, on prépare une solution à 10 mM (0,0385 g) d'acide Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoique, 10 mM (0,052 g) de PyBOP et à 20 mM (0,035 mL) de DIPEA dans 10 ml de DMF anhydre. Après homogénéisation de la solution, deux lames « amino » sont placées au fond de la cuve (face écrite au dessus). Les lames sont agitées sur un agitateur orbitalaire pendant une nuit. Les lames sont ensuite placées sur un portoir en inox (portoir de 10 lames) et rincées par immersion dans de la DMF puis égouttées à nouveau.

Déprotection de l'espaceur PEG

Dans une petite cuve, on prépare une solution à 10% (*V/V*) de pipéridine dans de la DMF anhydre (17 ml/153 ml). 10 lames sont placées sur un portoir en inox puis le portoir est immergé dans la solution précédente. La solution est agitée à TA pendant une nuit. Les lames sont ensuite égouttées et rincées par immersion dans de la DMF avec une agitation pendant 1 min puis égouttées à nouveau.

Formation de la fonction NCO

Dans une petite cuve, on prépare une solution à 10% (*V/V*) de 1,6-diisocyanatohexane dans de la DMF anhydre (17 ml/153 ml). Après homogénéisation de la solution, le portoir de 10 lames y est immergé et la solution est agitée pendant 1 heure à TA. Les lames sont ensuite égouttées et rincées par immersion dans de la DMF avec une agitation pendant 3 min (2x) et par immersion dans du THF avec une agitation pendant 2 min (1x). Les lames sont ensuite séchées par centrifugation et stockées dans un dessiccateur.

Méthode de dépôt – préparation des librairies miniaturisées

Préparation des échantillons

Les 609 petites molécules utilisées sont diluées dans du DMSO anhydre pour aboutir à une concentration finale de 10 mg/mL (en moyenne 0,01 M). Les solutions de petites molécules sont déposées dans une plaque à 384 puits à raison de 10 μL par puit. Les plaques de petites molécules sont conservées jusqu'à 12 cycles de congélation/décongélation.

Préparation du micro-déposeur

Les aiguilles sont nettoyées par immersion dans de l'éthanol, puis passées pendant 5 min au bain à ultrasons. Les réservoirs de la station de lavage du spotter sont remplis avec de l'ethanol et de l'eau MilliQ), puis sont placées 4 aiguilles sur le bras ainsi que les lames.

Dépôt des petites molécules

Les petites molécules sont déposées suivant un patron bien défini. Chaque molécule a 4 réplicats sur la lame et est déposée 3 fois pour former un spot. Les lames sont ensuite laissées à sécher sur le spotter pendant 3 h.

Activation de la liaison covalente et quenching des fonctions NCO libres

Les lames sont ensuite placées sur un portoir déposé à l'intérieur d'un dessiccateur en contact avec de la pyridine pendant une nuit. Le portoir contenant les lames est ensuite placé dans une petite cuve contenant une solution à 5 % (*V/V*) d'éthylène glycol et 0,1 % (*V/V*) de pyrdine dans de la DMF anhydre (8 ml/0,16 ml/152 ml). La solution est agitée à TA pendant 1 h. Les lames sont ensuite égouttées et rincées par immersion dans de la DMF avec une agitation pendant 1 h et par immersion dans du THF avec une agitation pendant 3 min (2x). Les lames sont ensuite séchées par centrifugation et stockées à l'abri de la lumière pendant 6 mois à -20°C ou quelques jours à 4°C.

Les 609 petites molécules sont réparties sur 4 lames.

Marquage de **ThyA** et **ThyX** par Cy5

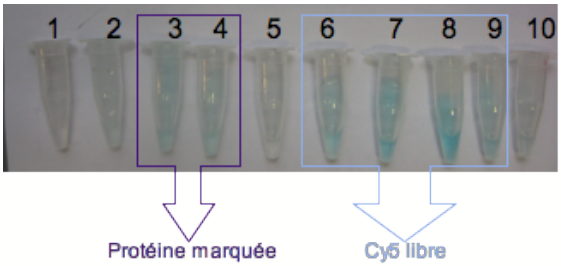
1 mg de protéine est diluée avec 1 ml de tampon bicarbonate à 0,1M à pH = 9,3. Cette solution est introduite dans le tube eppendorf contenant la Cy5 (issu du kit). Le tube est agité vigoureusement. Puis il est placé à l'abri de la lumière pendant 1 h avec une agitation toutes les 10 min. Le mélange Protéine marquée/Cy5 libre est ensuite purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur gel Sephadex G-25. Au préalable, 3 g de gel Sephadex G-25 sont mouillés avec 40 ml de tampon PBS et laissés gonfler pendant 3 h. Le gel est dégazé avant d'être introduit dans une colonne. La colonne est ensuite équilibrée (éluant : tampon PBS). La solution de protéine marquée est alors déposée en haut de colonne puis éluée avec du tampon PBS. Les fractions bleues récoltées (après le volume mort) contiennent la protéine marquée et sont stockées à -80°C.

Dosage des fractions de Thy marquée par Cy5 par la méthode de Bradford

Une gamme étalon de solution de caséine dans du tampon PBS est préparée en balayant des concentrations de 0,05 à 2000 µg/ml. A 500 µl de chaque standard, est ajouté 125 µl du réactif Coomassie (Bio-Rad) puis le mélange est agité pendant 30 min. En parallèle, 50 µl de chaque fraction de protéine marquée sont dilués dans 450 µl de tampon PBS auxquels sont ajoutés 125 µl de réactif Coomassie, puis le mélange est agité pendant 30 min. Enfin, les complexes formés par la gamme étalon sont lus au spectrophotomètre UV-visible à la longueur d'onde de 595 cm^{-1} afin de tracer une courbe d'étalonnage. Puis les échantillons sont lus à la même longueur d'onde et leur concentration est déterminée par rapport à la courbe d'étalonnage.

Marquage de l'**endogline** par Cy5 (réalisé par Céline Largeau de l'équipe de Virginie Escriou)

La Cy5 est suspendue dans 1 ml de tampon de bicarbonate à 0,1 M à pH 9,3. On prélève 75 µl de la solution Cy5 précédente. On y ajoute ensuite 50 µl de EGh diluée à 1,5 µg/µl dans un tampon PBS à pH 7,2 contenant 0,1 % de NaN_3. Le mélange est incubé pendant 30 min à TA en vortexant toutes les 10 minutes. A la fin du temps d'incubtaion, on ajoute 875 µl de tampon PBS à pH 7,2 contenant 0,1 % de NaN_3 pour avoir un volume final de 1 ml. L'échantillon est ensuite déposé sur une colonne de biotinylation pour séparer la protéine marquée et la Cy5 libre. La colonne est éluée avec du tampon PBS à pH 7,2 contenant 0,1 % de NaN_3 et des fractions de 500 µl sont récupérées dans des eppendorfs.

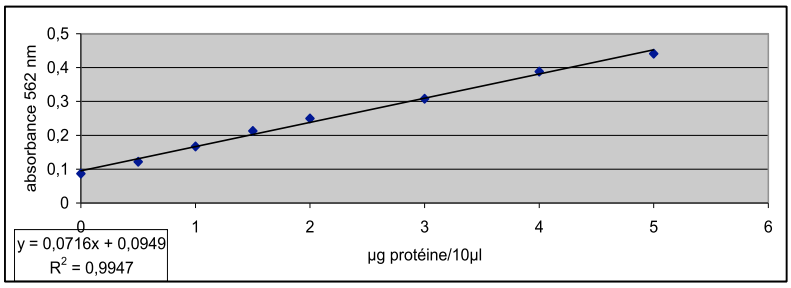


Dosage des fractions d'endogline marquée par Cy5 par la méthode BCA

Une gamme étalon de solution de BSA dans du tampon PBS à pH 7,2 contenant 0,1 % de NaN_3 est préparée en balayant des concentrations de 0 à 100 µg/ml. A 10 µl de chaque standard et de chaque fraction récupérée, est ajouté 200 µl de réactif BCA puis le mélange est agité pendant 30 min à 37°C. Enfin, les complexes formés par la gamme étalon sont lus au spectrophotomètre UV-visible à la longueur d'onde de 562 cm^{-1} afin de tracer une courbe d'étalonnage. Puis les échantillons sont lus à la même longueur d'onde et leur concentration est déterminée par rapport à la courbe d'étalonnage.

gamme BSA dans tampon de séparation

µg protéine/10µl	0	0,5	1	1,5	2	3	4	5
Abs. 562nm	0,087	0,122	0,167	0,213	0,25	0,308	0,388	0,441



fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	0,09	0,104	0,151	0,132	0,099	0,095	0,095	0,09	0,099	0,089
µg protéine/10µl	-0,07	0,13	0,78	0,52	0,06	0,00	0,00	-0,07	0,06	-0,08
µg protéine/500µl fraction		6	39	26	3					

Marquage de **Vpr** par DyLight 649 NHS ester (réalisé Rodrigue Marquant de l'équipe de Serge Bouaziz)

Vpr (1-96) a été obtenu à l'aide d'un synthétiseur en phase solide en utilisant une stratégie de synthèse FMOC, puis purifié par HPLC semi-préparative en phase inverse. La protéine a ensuite été analysée par spectromètre de masse et son degré de pureté a été mesuré à 98 %.

1 mg de Vpr est diluée dans 500 µl de tampon PBS 0,05 M à pH = 8,5. Puis est ajoutée 144 µl d'une solution de DyLight 649 NHS Ester à 10 mg/ml dans de la DMF. Le mélange est agité et incubé pendant 1 h à TA à l'abri de la lumière. La protéine marquée est purifiée par HPLC semi-préparative pour éliminer le fluorophore libre. Vpr marqué est obtenu après lyophilisation sous forme de solide bleu et conservé à -20°C.

Incubation avec ThyA-Cy5 et ThyX-Cy5

Les 4 lames issues du dépôt sont placées chacune dans un puit d'une cuve QuadriPerm. Elles sont recouvertes chacune par 4 mL d'une solution de lait écrémé à 3 g/100 ml (tampon PBS) et agitées (agitation orbitalaire) pendant une heure à l'abri de la lumière et à TA. Elles sont ensuite placées sur un portoir en inox et lavées 3 fois par immersion dans du tampon PBS avec une agitation pendant 3 min puis séchées. Les 4 lames sont à nouveau placées dans les puits de la cuve QuadriPerm puis recouvertes chacune par 4 mL de TS marquée par Cy5. La ThyA-Cy5 et la ThyX-Cy5 sont diluées avec du tampon HEPES pour obtenir des concentrations finales respectivement de 3 μg/ml et 4 μg/ml. Les lames sont incubées pendant 1 h à l'abri de la lumière sur agitateur orbitalaire à TA. Elles sont ensuite placées sur un portoir en inox et lavées 3 fois par immersion dans du tampon HEPES avec une agitation pendant 3 min Les lames sont ensuite séchées par centrifugation et directement analysées au scanner à fluorescence.

Incubation avec l'endogline-Cy5

L'endogline-Cy5 est diluée avec du tampon PBS contenant 0,1 % de NaN_3 pour obtenir une concentration finale de 2 μg/ml. Les 4 lames issues du dépôt sont placées chacune dans un puit d'une cuve QuadriPerm. Elles sont recouvertes chacune par 4 mL de solution d'endogline-Cy5 et agitées (agitation orbitalaire) pendant une heure à l'abri de la lumière et à TA. Elles sont ensuite placées sur un portoir en inox et lavées 3 fois par immersion dans du tampon PBS avec une agitation pendant 3 min. Les lames sont ensuite séchées par centrifugation et directement analysées au scanner à fluorescence.

Incubation avec Vpr-DyLight 649

La protéine Vpr-DyLight 649 est diluée par un mélange 70/30 H_2O MilliQ/CH_3CN pour obtenir une concentration finale de 1 μg/ml. Les 4 lames issues du dépôt sont placées chacune dans un puit d'une cuve QuadriPerm. Elles sont recouvertes chacune par 4 mL de solution de Vpr-DyLight 649 et agitées (agitation orbitalaire) pendant une heure à l'abri de la lumière et à TA. Elles sont ensuite placées sur un portoir en inox et lavées 1 fois par immersion dans un mélange 70/30 H_2O MilliQ/CH_3CN et 2 fois dans de l'eau MilliQ avec une agitation pendant 3 min. Les lames sont ensuite séchées par centrifugation et directement analysées au scanner à fluorescence.

Criblage secondaire par RMN

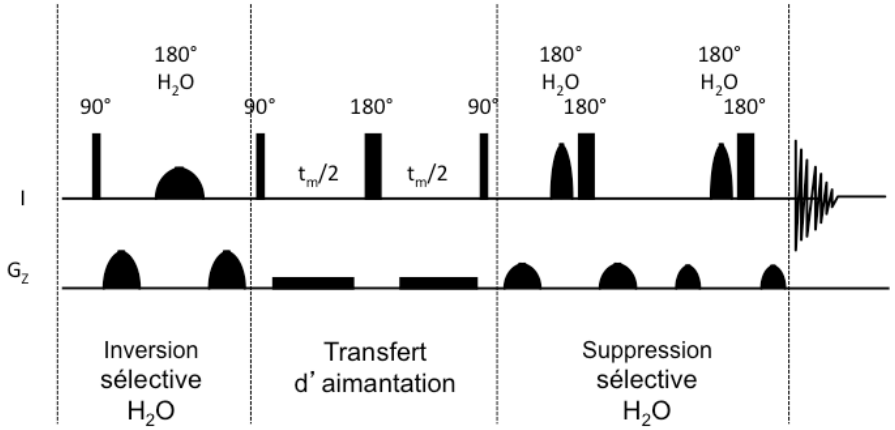
Méthodes utilisées :

Les spectres ont été enregistrés à 600 MHz en proton sur un spectromètre Bruker équipé d'une cryosonde permettant de travailler à très faible concentration. Le composé **90** est dilué à une concentration de 10 mM et la protéine Vpr à 0.1 mM, cent fois moins concentrée. L'échantillon a été préparé à pH 4.5 et les expériences enregistrées à 20°C. 5% de DMSO ont été utilisés pour la solubilisation du composé **90**. Le signal du DMSO à 2.5 ppm est du même signe que celui du composé **90** montrant ainsi que le DMSO interagit avec Vpr en aidant à sa solubilisation et à sa structuration en hélice.

L'expérience 1D en proton (ZGESPG - water suppression using excitation sculpting with gradients)[286] a été réalisée sur une largeur spectrale de 6009 Hz. L'acquisition a été faite sur 1600 points et 128 passages ont été effectués. La transformée de fourier a été effectuée après un niveau de zérofilling et une application d'une fonction d'apodisation exponentielle (LB=0.3).

L'expérience WaterLogsy utilise la séquence ePHOGSY-NOE comportant une excitation sélective de l'eau avec une impulsion préformée de 180°.

Séquence d'impulsion de l'expérience WaterLogsy :



Etude de docking moléculaire

Méthode utilisée :

La structure RMN de VPR a été utilisée comme récepteur. La baïcaleine et le composé **90** ont été construits avec NewClogP (utilisation Clean3D qui construit des conformères ayant la plus basse énergie). Le docking a été effectué avec le logiciel Autodock4. Dans un premier temps, le récepteur est placé dans une grille 3D et un atome « sonde » du ligand est placé en chaque point de la grille. L'énergie d'interaction de cet atome avec la protéine est calculée et attribuée à chaque point de la grille. À chaque configuration prise par le ligand, l'énergie peut donc être évaluée. Le docking proprement dit est fait en utilisant l'algorithme génétique de Lamarck.

[286] T.-L. Hwang & A.J. Shaka, *J. Magn. Reson., Series A,* **1995**, *112*, 275-279

Résultats :

Composé docké	*Nb structures*	*Energie* (kJ/mol)	*Liaisons H* (Å)	*Stacking* (Å)	*Proximité* (Å)
Baïcaléine	101/200	-26,2	Pro10(O)/LIG(O19) 2.94 Arg12(N)/LIG(O19) 3.11		Gln3(2HE2)/LIG(C6) 2.84 Pro10(O)/LIG(O18) 2.64 Gln11/1HE2)/LIG(O16) 2.56 Arg12(HN)/LIG(O19) 2.18 Pro14(CB)/LIG(C3) 3.29 Trp18(CE3)/LIG(C6) 3.30
Composé **90** Pose majoritaire	38/200	-23,6	Gln65(O)/ LIG(O10) 2,69	Phe69(HN)/LIG(O10) 3.20	Leu26(CD2)/LIG(O17) 3.00 Glu29(OE1)/LIG(C14) 3.05 Arg62(HH1)/LIG(C4) 3.24 Gln65(HE2)/LIG(O17) 2.01 Leu68(CD1)/LIG(O18) 3.07
Composé **90** Pose minoritaire	20/200	-19,6	Gln3(NE2)/LIG(N20) 2,82		Gln3(HE2)/LIG(N20) 1.95 Gln11(CA)/LIG(C3) 3.40 Arg12(HN)/LIG(C2) 2.73 Pro14(CA)/LIG(O9) 3.28 Asp17(OD1)/LIG(C11) 3.40 Trp18(CE3)/LIG(O16) 3.11

Évaluation IRM des agents d'imagerie moléculaire

Méthodes utilisées sur les spectromètres :

Réglages des séquences de saturation en T_1 :

TE = 13 ms
TR = 15 000, 8000, 3000, 1200, 800, 594, 300, 144 ms
Nombre réponse = 1
Temps acquisition = 15 min 29 sec

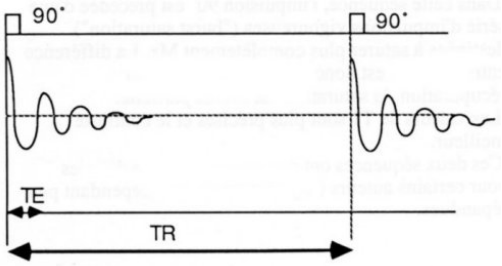


Figure 124 : *Séquence de saturation en T_1*

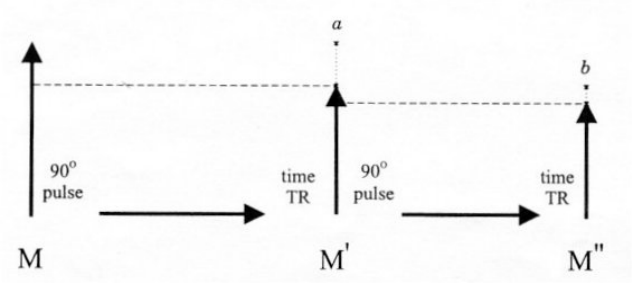


Figure 125 : *Effet de deux impulsions 90° sur l'aimantation longitudinale M_z*

Réglages des séquences de saturation en T_2, séquence de type CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill)

TE (T_2 long)= 40 ms ; TE (T_2 court)= 11 ms
TR = 15 000 ms
Nombre réponse = 1
Temps acquisition = 12 min

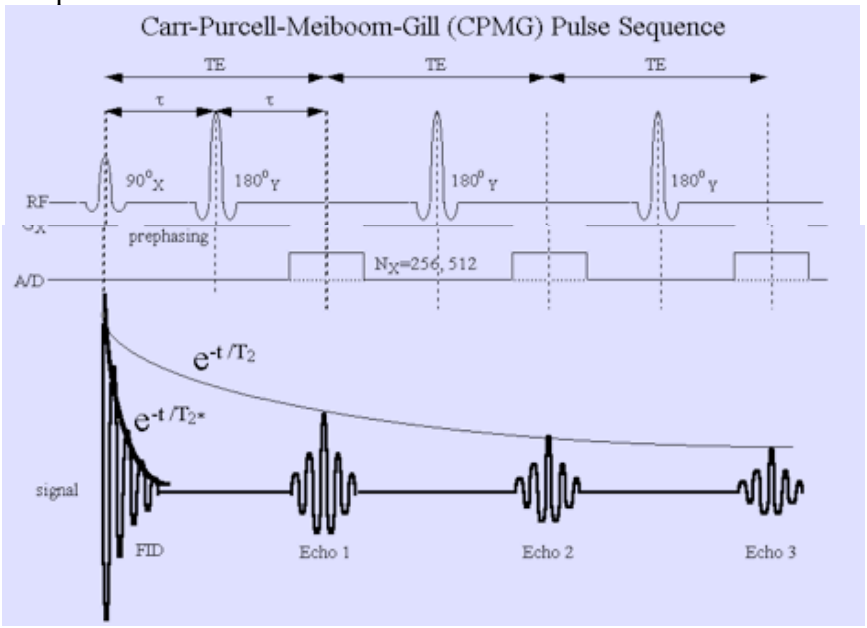


Figure 126 : *Séquence de saturation en T_2*

Résultats

Relaxivités de Gd^{3+} et Cu^{2+} à différents champs B_0 :

Champ	*Gd^{3+}*		*Cu^{2+}*		*Erreur sur les mesures*
	r_1 ($mM^{-1}.s^{-1}$)	*r_2* ($mM^{-1}.s^{-1}$)	*r_1* ($mM^{-1}.s^{-1}$)	*r_2* ($mM^{-1}.s^{-1}$)	
0,47 T	10,2	14,0	0,6	0,5	*0,1*
4,7 T	9,4	14,3	0,6	0,4	*0,5*
7 T	11,0	14,7	0,5	0,6	*0,1*

Relaxivité r_1 ($mM^{-1}.s^{-1}$) des différents lots du composé **213** sans la contribution de celle de Gd^{3+} libre à différents champs :

N° du lot du composé 213	*0,47 T*	*4,7 T*	*7 T*
1	18,1	15,6	10,4
2	11,0	9,4	11,7
3	10,0	8,8	5,8
Erreur sur les mesures	*0,7*	*0,8*	*1,1*

Relaxivité r_2 ($mM^{-1}.s^{-1}$) des différents lots du composé **213** sans la contribution de celle de Gd^{3+} libre à différents champs :

N° du lot du composé 213	*0,47 T*	*4,7 T*	*7 T*
1	17,5	22,4	19,4
2	11,6	13,2	12,2
3	12,4	11,9	11,1
Erreur sur les mesures	*0,7*	*0,8*	*1,1*

Relaxivité du DOTAREM à différents champs :

Relaxivité ($mM^{-1}.s^{-1}$)	*0,47 T*	*4,7 T*	*7 T*
r_1	3,9	4,4	3,9
r_2	4,2	5,4	4,5
Erreur sur les mesures	*0,1*	*0,5*	*0,1*

Bibliographie

1. (a) D. Gurwitz, G. Livshits, Personalized medecine Europe : health, genes and society, *European Journal of Human Genetics*, **2006**, *14*, 376-380 ; (b) K. K. Jain, From molecular diagnostics to personalized medecine*, Expert review of molecular diagnostics*, **2002**, *2*, 299-301 ; (c) J. H. Thrall, Personalised medecines : hopes and realities, *Radiology*, **2004**, *231*, 613-616

2. H. R. Wolfe, M. Mendizabal, E. Lleong, A. Cuthbertson, V. desai, S. Pullan, D. K. Fujii, M. Morrison, R. Pither, S. A. Waldman, In Vivo Imaging of Human Colon Cancer Xenografts in Immunodeficient Mice Using a Guanylyl Cyclase C–Specific Ligand, *J. Nuclear Med*., **2002**, *18*, 321-325

3. G. A. Lemieux, K. J. Yarema, C. L. Jacobs, C. R. Bertozzi, Exploiting Differences in Sialoside Expression for Selective Targeting of MRI Contrast Reagents *J. Am. Chem. Soc*., **1999**, *121*, 4278-4279

4. A. P. Kozikowski, M. Kotoula, D. W. Ma, N. Boujrad, W. Tuckmantel, V. Papadopoulos, Synthesis and Biology of a 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl Derivative of 2-Phenylindole-3-acetamide: A Fluorescent Probe for the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor, *J. Med. Chem*., **1997**, *40*, 2435-2439

5. (a) W. J. Mulder J, Strijkers GJ, Habets JW, Bleeker EJ, van der Schaft DW, Storm G, Koning GA, Griffioen AW, Nicolay K. MR molecular imaging and fluorescence microscopy for identification of activated tumor endothelium using a bimodal lipidic nanoparticle, *FASEB J.,* **2005**, *19*, 2008-2010 ; (b) W. J. M. Mulder, K. Castermans, J. R van Beijnum, M. G. A oude Egbrink, P. T. K. Chin, Z. A. Fayad, C. W. G ; M ; Löwik, E. L. Kaijzel, I. Que, G. Storm, G. J. Strijkers, A. W. Griffioen, K. Nicolay, Molecular imaging of tumor angiogenesis using αvβ3-integrin targeted multimodal quantum dots, *Angiogenesis*, **2009**, *12*, 17-24

6. H. E. Blackwell, Y. Zhao, Chemical Genetic Approaches to Plant Biology, *Plant Physiology*, **2003**, *133*, 448-455

7. S. L. Schreiber, Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery, *Science,* **2000,** *287*, 1964-9

8. M. D. Burke, S. L. Schreiber, A planning strategy for diversity-oriented synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2004***, 43,* 46-58

9. F. E. Koehn, G. T. Carter, The evolving role of natural porducts in drug discovery, *Nature Reviews,* **2005***, 4,* 206-220

10. (a) M. Syamala M, *Org Prep* Proceed *Int,* **2009**, *41*,1 (b) J. D. Sunderhaus, S. F. Martin, Applications of Multicomponent Reactions to the Synthesis of Diverse Heterocyclic Scaffolds *,Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 1300 (c) J. Biggs-Houck, A. Younai, J. T. Shaw, Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *14*, 371 (d) J. Wei, J. T. Shaw, Diastereoselective Synthesis of γ-Lactams by a One-Pot, Four-Component Reaction*, Org. Lett.,* **2007**, *9*, 4077

11. S. L. Schreiber, Molecular diversity by design, *Nature*, **2009**, *458*, 153-154 ; D. Morton, S. Leach, C. Cordier, S. Warriner and A. Nelson, Synthesis of natural-product-like molecules with over eighty distinct scaffolds, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2009**, *48*, 104-109

12. R. L. Nicholson, M. L. Ladlow, D. R. Spring, Fluorous tagged small molecule microarrays, *Chem. Commun*, **2007**, DOI 10.1039/b712906h

13. P. R. Reilly, Personalized medicine and pharmacogenetics : new tools for disease management, *Disease Management*, **2002**, *5*, 69-75

14. AF. Chatziioannou, *et al*., Molecular imaging of small animals with dedicated PET tomographs*. Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2002**, *29,* 98-114

15. M. Zanca, Les techniques d'imagerie moléculaire et métabolique en imagerie par résonance magnétique nucléaire, *Médecine Nucléaire***, 2007**, *31*, 173-182

16. GM. Lanza, R. Lamerichs, S. Caruthers, SA. Wickline, Molecular Imagingin MR with targeted paramagnetic nanoparticles, *Medicamundi*, **2003**, *47*, 34-9

17. J. C. Miller, J. H. Thrall, Clinical Molecular Imaging, *J. Am. Coll. Radiol*, **2004**, *1*, 4-23

18. (a) V. Ntziachristos, CH. Tung, C. Bremer, R. Weissleder, Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo, *Nature Med.,* **2002**, *8*, 757-760 ; (b) U. Mahmood, CH. Tung, A. Bogdanov, R. Weissleder, Near infrared optical imaging of protease activity for cancer detection, *Radiology*, **1999**, *213,* 866-870

19. Liu Shuang, Chakraborty Sudipta, 99mTc-centered one-pot synthesis for preparation of 99mTc radiotracers , *Dalton Transactions*, **2011**, *40*, 6077-6086

20. C. M. F. Gomes, A. J. Abrunhosa, E. K. J. Pauwels, Molecular imaging with SPECT and PET in exploratory investigational new drug studies, *Drugs of the Future*, **2011**, *36*, 69-77

21. C. Richard, P. Chaumet-Riffaud, A. Belland, A. Parat, C. Contino-Pepin, M. Bessodes, D. Scherman, B. Pucci, N. Mignet, Amphiphilic perfluoroalkyl carbohydrates as new tools for liver imaging, *International Journal of Pharmaceutics*, **2009**, *379*, 310-308

22. Z. Yang, D. P. Kontoyiannis, X. Wen, C. Xiong, R. Zhang, N. D. Albert, C. Li, Gamma scintigraphy imaging of murine invasive pulmonary aspergillosis with a ^{111}In-labeled cyclic peptide, *Nuclear Medicine and Biology*, **2009**, *36,* 259-266

23. M. E. Phelps, Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **2000**, *97*, 9226-9233

24. A. Moller, A. Loft, A. Berthelsen, P. Damgaard, J. Graff, C. Christensen, K. Perell, B. Petersen, G. Daugaard, 18F-FDG PET/CT as a diagnostic tool in patients with extracervical carcinoma of unknown primary site: a literature review, *The oncologist*, **2011**, *16*, 445-451

25. Luo Shenglin, Zhang Erlong, Su Yongping, Cheng Tianmin, Shi Chunmeng, A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging, *Biomaterials*, **2011**, *32*, 7127-7138

26. S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, Near-infrared fluorescence : application to *in vivo* molecular imaging, *Curr. Op. Chem. Biol*., **2009**, *14*, 1-9

27. C-H. Tung, Y. Lin, W. K. Moon, R. Weissleder, *In vivo* imaging of proteolytic enzyme activity using a novel molecular reporter, *ChemBioChem*, **2002**, *8*, 784-786

28. Z-H. Jin, V. Josserand, S. Foillard, D. Boturyn, P. Dumy, M-C. Favrot, J-L. Coll, In vivo optical imaging of intergrin $\alpha_v\beta_3$in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors, *Mol. Cancer*, **2007**, *6*, 41-49

29. C-H. Tung, U. Mahmood, S. Bredow, R. Weissleder, A receptor-targeted near-infrared fluorescence probe for *in vivo* tumor imaging, *Cancer Res.,* **2000**, *60*, 4953-4958

30. D. Stark, W. Bradley, *Magnetic Resonance Imaging*, 2nd ed, Vol. 1, Chapter 5, Mosby Year Book, St. Louis, **1992**

31. Site CultureSciences – Chimie de l'ENS- http://culturesciences.chimie.ens.fr. Article rédigé par Hagop Demirdjian (professeur agrégé responsable du site ENS-DGESCO *CultureSciences-Chimie*), relu par J.-B. Baudin (Sous-Directeur du Département de Chimie de l'ENS)

33. Thèse de Aurélie Desbree soutenue le 27/09/2005 s'intitulant « Nouvelle approche multimodale et quantitative pour les études in vivo chez le petit animal : couplage de la β-MicroProbe aux techniques magnétiques et développement de fantômes de rat et de souris voxelisés » de l'université Paris VII

34. D. Yang, Q. Ye, D. Williams, T. Hitchens, and H. C, Normal and Transplanted Rat Kidneys: Diffusion MR Imaging at 7 T, *Radiology*, **2004,** *231*, 702-709

35. Q. Shen, H. Ren, H. Cheng, M. Fisher, and T. Duong., Functional, perfusion and diffusion MRI of acute focal ischemic brain injury*, J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2005,** *25*, 1265–1279

37. I. Solomon, N. Bloembergen, Nuclear magnetic interactions in the HF molecule, *J. Chem. Phys*., **1956**, *25*, 261

38. A. E. Merbach and E. Tóth, The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging, Wiley, **2001**

39. I. Solomon, Relaxation processes in a system of two spins, *Phys. Rev.,* **1955**, *99*, 559

40. P. Hermann, J. Kotek, V. Kubıcek, I. Lukes, Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes, *Dalton Trans.,* **2008**, 3027–3047

41. F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, The nuclear induction experiment, *Phys. Rev.,* **1948**, *70*, 474-485

42. P. C. Lauterbur, M. H. Mendoca-Dias, A. M. Rudin in Frontiers of Biological Energetics, Dutton P. L., Leigh L. S., *Scarpa A. (Eds), Academic Press*, New York, **1978**, 752

43. H. U. Kauczor, X. J. Chen, E. J. R. Van Beek, W. G. Schreiber, Pulmonary ventilation imaged by magnetic resonance: at the doorstep of clinical application, *Eur. Respir. J.*, **2001**, 17, 1008-1023

44. P. Caravan, Protein-targeted gadolinum-based magnetic resonance imaging (IRM) contrast agents : design and mechanism of action, *Accounts of chemical research*, **2009**, *42*, 851-862

45. RM Botnar, AS Perez, S Witte, AJ Wiethoff, J Laredo, J Hamilton, W Quist, EC Parsons, A Vaidya, A Kolodziej et al., In vivo molecular imaging of acute and subacute thrombosis using a fibrin-binding magnetic resonance imaging contrast agent, *Circulation*, **2004**, *109*, 2023-2029

46. JF. Poduslo, TM. Wengenack, GL Curran, et al., Molecular targeting of Alzheimer's amyloid plaques for contrast-enhanced magnetic resonance imaging, *Neurobiol Dis*, **2002**, *11*, 315-329

47. DA Sipkins, DA Cheresh, MR Kazemi, Detection of tumor angiogenesis in vivo by avb3-targeted magnetic resonance imaging, *Nature Medecine*, **1998**, *4*, 623-626

48. A. Liciani, JC. Olivier, O. Clement, N. Siauve, PY. Brillet, B. Bessoud, F. Gazeau, IF Uchegbu, E. Kahn, G. Fija, *et al.,* Glucose-receptor MR imaging of tumors : study in mice with PEGylated paramagnetic niosomes, *Radiology*, **2004**, *231*, 135-142

49. L. Frullano, TJ. Meade, Multimodal MRI contrast agents, *J. Biol. Inorg. Chem.,* **2007**, *12*, 939-949

50. He Xiaoxiao, Gao Jinhao, Gambhir Sanjiv Sam, Cheng Zhen, Near-infrared fluorescent nanoprobes for cancer molecular imaging: status and challenges, *Trends in Molecular Medicine*, **2010**, *16,* 574-583

51. MM. Hueber, AB. Staubli, K. Kustedjo, MHB. Gray, J. Shih, SE. Fraser, RE. Jacobs, TJ. Meade Fluorescently Detectable Magnetic Resonance Imaging Agents*, Bioconjug. Chem*., **1998**, *9*, 242-249

52. A. Ragusa, A. Zacheo, A. Aloisi, T. Pellegrino, Quantum dots designed for biomedical applications, *Inorganic Nanoparticles*, **2011**, *24,* 257-311

53. Klaas Nicolay *et al*., Molecular imaging of tumor agiogenesis using $\alpha.\beta_3$-integrin targeted multimodal quantum dots, *Angiogenesis*, **2008**

54. W. Wang, K. Shi, K. Sunkunk, Y. Sasidhar, A. G. Cameron, E. K. Adams, M. E. Mawad, E. M. Sevick-Muraca, A new optical and nuclear dual-labeled imaging agent targeting interleukin 11 receptor alpha-chain, *Bioconjugate Chem.,* **2007**, *18*, 397-402

55. (a) A. Quon, S. S. Gambhir, FDG-PET and beyond: molecular breast cancer imaging , *J. Clin. Oncol*., **2005**, *23*, 1664-1673 ; (b) H. A. Wieder et al., Time course of tumor metabolic activity during chemoradiotherapy of esophageal squamous cell carcinoma and response to treatment , *J. Clin. Oncol*., **2004**, *22*, 900-908

56. M. G. Harisinghani *et al.,* Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer, *N. Engl. J. Med*., **2003**, *348*, 2491-2499

57. R. Weissleder, K. Kelly, E. Y. Sun, T. Shtatland, L. Josephson, Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules*, Nat. Biotechnol*., **2005**, *23*, 1418

58. D. G. Anderson, S. Levenberg, R. Langer, Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells, *Nat. Biotechnol.,* **2004**, *22*, 863

59. L. D. Stein, Humane genome : End of the beginning, *Nature,* **2004***, 431*, 915-916

60. M. Tyers, M. Mann, From genomics to proteomics, *Nature,* **2003,** *422*, 193-197

61. M. R. Wilkins, C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K. L. Williams, D. F. Hochstrasser, From proteins to proteomes : large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis, *Biotechnology,* **1996,** *14*, 61-65

62. S. Mocellin, C. R. Rossi, P. Traldi, D. Nitti, M. Lise, Molecular oncology in the post-genomic era : the chalenge of proteomics, *TRENDS Mol.Med.,* **2004,** *10*, 24-32

63. (a) L. S. Schreiber, Chemical Genetics Resulting from a passion for synthetic organic chemistry, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1127. (b) T.J. Mitchison, Toward a pharmacological genetics, *Chem. Biol.* **1994**, 1, 3. (c) C. M. Crews, U. Splittberger, Chemical Genetics : Exploring and controlling cellular processes with chemical probes, *Trends Biochem. Sci.* **1999***, 24*, 317

64. D. P. Walsh, Y. T. Chang, Chemical Genetics, *Chem.Rev.* **2006**, *106*, 2476

65. (a) J. L. Peters, F. Cnudde , T. Gearts, Forward Genetics and map-based cloning approaches, *Trends Plant Sci.* **2003**, *8*, 484. (b) J. Malicki, Harnessing the power of forward genetic analysis of neuronal diversity and patterning in the zebrafish retina *, Trend Neuro. Sci.* **2000**, *23*, 531. C) Lokey R. S., Forward chemical genetics : Progress and obstacles on the path of a new pharmacopoeia, *Current Opin. Chem. Biol.,* **2003***, 7,* 91-96

66. (a) J. S. Takahashi, L. H. Pinto, M. H. Vitaterna, Forward and reverse genetic approaches to behaviour in the mouse, *Science,* **1994**, 264, 1724 ; (b) T. Mayer, Chemical genetics : tailoring tools for cell biology, *TRENDS in Cell. Biol.,* **2003***, 13(5)*, 270-277 ; (c) J-R. Yeh, C. M. Crews, Chemical genetics : adding to the developmental biology toolbox, *Developmental Cell,* **2003***, 5,* 11-19

67. T. K. Kim, Chemical genomics and medicinal systems biology : Chemical control of genomic networks in human systems biology for innovative medicine, *J. Biochem. Mol. Biol.*, **2004**, *37*, 53-58

68. M. A. Shogren-Knaak, P. J. Alaimo, K. M. Shokat, Recent advances in chemical approaches to the study of biological systems, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.,* **2001***, 17*, 405-433

69. P. J. Alaimo, M. A. Shogren-Knaak, K. M. Shokat, Chemical genetic approaches for the elucidation of signalling pathways, *Curr. Op. Chem. Biol.,* **2001***, 5,* 360-367

70. G. MacBeath, Chemical genomics : what will it take and who gets to play ?, *Genome Biology*, **2001***, 2(6)*, 1-6

71. H. M. Geysen, R. N. Meloen, S. J. Barleling, Use of peptides to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amoni acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **1984***, 81*, 3998-4002

72. R. F. Service, Combinatorial chemistry hits the drug market, *Science,* **1996***, 272*, 1266-1268

73. H. M. Geysen, F. Schoenen, D. Wagner, R. Wagner, Combinatorial compound libraries for drug discovery : an ongoing challenge, *Nature Rev. Drug. Disc.,* **2003,** *2*, 222-230
74. F. Darvas, G. Dorman, L. Urge, I. Szabo, Z. Ronai, M. Sasvari-Szekely, Combinatorial chemistry. Facing the challenge of chemical genomics, *Pure Appl. Chem.,* **2001***, 73,* 1487-1498
75. M. D. Burke, S. L. Schreiber; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 46
77. L. Weber, High-diversity combinatorial libraries, *Curr. Op. Chem. Biol.,* **2000***, 4*, 295-302
78. I. Ugi, The α-addition of immonium ions and anions to isonitriles accompanied by secondary reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **1986***, 1,* 8
79. J. Zhu, H. Bienaymé, *Multicomponent Reactions*, eds., Wiley-VCH: Weinheim, **2005**
80. J. Biggs-Houck, A. Younai and J. T. Shaw, Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis, *Curr Opin Chem Biol,* **2010,** 14, 371-382
81. S. Dandapani, L. Marcaurelle, Current strategies for diversity-oriented synthesis , *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *14*, 362.
82. P. Y. Ng, Y. Tang, W. M. Knosp, H. S. Stadler, J. T. Shaw, Synthesis of diverse lactam carboxamides leading to the discovery of a new transcription-factor inhibitor , *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 5352-5355
83. O. Kwon, S. B. Park, S. L. Schreiber, Skeletal diversity via a branched pathway : efficient synthesis of 29400 discrete, polycyclic compounds and their arraying into stock solutions, *J. Am. Chem. Soc.,* **2002***, 124,* 13402-13404
84. R. A. Stavenger, S. L. Schreiber, Assymetric catalysis in diversity-oriented organic synthesis : enantioselective or 4320 encoded and spatially segregated dihydropyrancarboxamides, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2001***, 40 (18)*, 3417-3421
85. M. M.-C. Lo, C. S. Neumann, S. Nagayama, E. O. Perlstein, S. L. Schreiber, A library of spirooxindoles based on a stereoselective three-component coupling reaction, *J. Am. Chem. Soc.,* **2004***, 126*, 16077-16086
86. B. R. Stockwell, S. J. Haggarty, S. L. Schreiber, High-throughput screening of small molecules in miniaturized mammalian cell-based assays involving post-translational modifications, *Chem. Biol*., **1999**, *6*, 71-83
87. B. R. Stockwell, J. S. Hardwick, J. K. Tong, S. L. Schreiber, Chemical genetic and genomic approaches reveal a role for copper in specific gene activation, *J. Am. Chem. Soc.,* **1999***, 121*, 10662-10663
88. R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne, J. Kuby,Enzyme-linked immunosorbent assay, *Immunology*, **2003**, **5th Ed.**, *Freeman*, New-York
89. S. J. Haggarty, K. M. Koeller, J. C. Wong, C. M. Grozinger, S. L. Schreiber, Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deactylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* **2003***, 100(8)*, 4389-4394
90. P. A. Marks, V. M. Richon, T. Miller, W. K. Kelly, Histone deacetylase inhibitors, *Adv. Cancer Res.,* **2004***, 91*, 137-168
91. P. A. Marks, V. M. Richon, R. Breslow, R. A. Rifkind, Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs, *Curr. Op. Oncol.,* **2001***, 13 (6)*, 477-483
92. K. M. Koeller, S. J. Haggarty, B. D. Perkins, I. Leykin, J. C. Wong, M-C. J. Kao, S. L. Schreiber, Chemical genetic modifier screens : small molecule trichostatin suppressors as probes of intracellular histone and tubulin acetylation, *Chem. Biol.,* **2003***, 10*, 397-410
93. S. J. Haggarty, K. M. Koeller, J. C. Wong, R. A. Butcher, S. L. Schreiber, Multidimensional Chemical Genetic Analysis of diversity-oriented synthesis-derived deacetylase inhibitors using cell-based assays, *Chem. Biol.,* **2003***, 10*, 383-396
94. C. L. Antos, T. A. McKinsey, M. Dreitz, L. M. Hollingworth, C. L. Zhang, K. Schreiber, H. Rindt, R. J. Gorczynski, E. N. Olson, Dose-dependent blockade to cardiomyocyte hypertrophy by histone deacetylase inhibitors, *J. Biol. Chem***., 2003***, 278*, 28930-28937
95. S-S. Tian, P. Lamb, A. G. King, S. G. Miller, L. Kessler, J. I. Luengo, L. Averill, R. K. Johnson, J. G. Gleason, L. M. Pelus, S. B. Dillon, J. Rosen, A small, nonpeptidyl mimic of granulocyte-colony stimulating factor, *Science*, **1998,** *281*, 257-259
96. J. I. Armstrong, S. Yuan, J. M. Dale, V. N. Tanner, A. Theologis, Identificaiton of inhibitors of auxin transcriptional activation by means of chemical genetics in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Sci. Acad.,* **2004,** *101*, 14978-14983
97. P. G. Komarov, E. A. Komarova, R. V. Kondratov, K. Christov-Tselkov, J. S. Coon, M. V. Chernov, A. V. Gudkov, A chemical inhibitor of p53 that protects mice from side effects of cancer therapy, *Science,* **1999,** *285*, 1733-1737
98. C. Nardella, C. Steinkühler, Radiolabeled heparan sulfate immobilized on microplate as substrate for the detection of heparanase activity, *Anal. Biochem.,* **2004,** *332*, 368-375

99. M. A. Kelly, T. J. McLellan, P. J. Rosner, Strategic use of affinity-based mass spectrometry in early stages of target based drug discovery, *J. Pharm. Biomed. Anal.,* **2002,** *40 (3),* 528-538
100.D. Falb, S. Jindal, Chemical genomics : bridging the gap between the proteome and therapeutics, *Curr. Opin. Drug Disc. Devel.,* **2002,** *5(4)*, 532-539
101.A. D. Annis, C.-C. Chuang, M. P. Scott, H. M. Nash, A general technique to rank protein-ligand binding affinities and determine allosteric versus direct binding site competition in compound mixtures, *J. Am. Chem. Soc.,* **2004,** *126,* 15495-15503
102.G. Deng, G. Sanyal, Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery, *J. Pharm. Biomed. Anal.,* **2006,** *40 (3)*, 528-538
103.J. Rademann, G. Jung, Integrating combinatorial synthesis and bioassays, *Science,* **2000,** *287*, 1947-1948
104.M. Meldal, Pega : a flow stable polyethylene glycol dimethylacrylamide copolymer for solid phase synthesis, *Tetrahedron Lett.,* **1992,** *33*, 3077-3080
105.S. Leon, R. Quarell, G. Lowe, Evaluation of resins for on-bead screening : a study of paparin and chymotrypsin specificity using pega-bound combinatorial peptide libraries, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **1998,** *8(21)*, 2997-3002
106.K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity, *Nature,* **1991,** *354*, 82-84
107.J. Morken, T. Kapoor, S. Feng, F. Shirai, S. L. Schreiber, Exploring the leucine-proline binding pocket of the Src SH3 domain using structure-based, split-pool synthesis and affinity based selection, *J. Am. Chem. Soc.,* **1998,** *120(1)*, 30-36
108.P. G. Alluri, M. Reddy, K. Bachhawat-Sikder, H. J. Olivos, T. Kodadek, Isolation of protein ligands from peptoic large libraries, *J. Am. Chem. Soc.,* **2003,** *125*, 13995-14004
109.J. A. Ostrem, F. Al-Obeidi, P. Safar, A. Safarova, S. K. Stringer, M. Patek, M. T. Cross, J. Spoonamore, J. C. Locascio, P. Kasireddy, D. S. Thorpe, N. Sepetov, M. Lebl, P. Wildgoose, P. Strop, Discovery of a novel, potent, and specific family of factor Xa inhibitors via combinatorial chemistry, *Biochemistry,* **1998,** *37*, 1053-1059
110.S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis, *Science,* **1991,** *251*, 767-773
111.C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J.C. Stephans, S. P. Fodor, S. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. J. Schultz, An unnatural bioploymer, *Science,* **1993,** *261*, 1303-1305
112.A.C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin C. P., Holmes, S. P . Fodor, Light-generated oligonucleotide arrays for rapide DNA sequence analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **1994**, *91(11)*, 5022-5026
113.S. Singh-Gasson, R. D. Green, Y. Yue, C. Nelson, F. Blattner, M. R. Sussman, F. Cerrina, Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array, *Nat. Biotechnol.,* **1999,** *17(10)*, 974-978
114.S. Li, D. Bowerman, N. Marthandan, S. Klyza, K. Luebke, H. R. Garner, T. Kodadek, Photolithographic synthesis of peptoids, *J. Am. Chem. Soc.,* **2004,** *126*, 4088-4089
115.Méthode décrite dans (a) G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interaction, *J. Am. Chem. Soc.,* **1999,** *121*, 7967-7968 ; (b) P. J. Hergenrother, K. M. Depew, S. L. Schreiber, Small-molecule microarrays : covalent attachment and screening of alcohol-containing small molecules on glass slides, *J. Am. Chem. Soc.,* **2000,** *122,* 7849-7850
116.H. Kanoh, S. Kumashiro, S. Simizu, Y. Kandoh, S. Hatakeyama, H. Tashiro, H. Osada, Immobilization of natural products on glass slides by using a photoaffinity reaction and the detection of protein-small-molecule interactions, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2003,** *42*, 5584-5587
117.M. Uttamchandani, D. P. Walsh, S. Q. Yao, Y.-T. Chang, Small-molecule microarrays : recent advances and applications, *Curr. Op. Chem. Biol.,* **2005,** *8*, 4-13
118.M. Uttamchandani, J. Wang, S. Q. Yao, Protein and small molecule microarrays : powerful tools for high-throughput proteomics, *Mol. Biosyst.,* **2006,** *2*, 58-68
119.K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, Fluorous-based carbohydrate microarrays, *J. Am. Chem. Soc.,* **2005,** *127*, 13162-13163
120.J. A. Gladysz, D. P. Curran, Fluorous chemistry : from bi-phasic catalysis to a parallel chemical universe and beyond, *Tetrahedron,* **2002,** *58*, 3823-3825
121.W. Zhang, Fluorous technologies for solution-based high-throughput organic synthesis, *Tetrahedron,* **2003,** *59*, 4475-4489
122.W. Zhang, Fluorous tagging strategies for solution-phase synthesis of small-molecules, peptides and oligosaccharides, *Curr. Op. Drug Disc. Dev.,* **2004,** *7*, 784-797

123.A. J. Vegas, J. H. Fuller, A. N. Koehler, Small-molecule microarrays as tools in ligand discovery, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 1385-1394
124.K. M. Specht, K. M. Shokat, The emerging power of chemical genetics, *Curr. Op. Cell Biol.,* **2002***, 14(2)*, 155-159.
125.C. Jaramillo, S. Knapp, Synthesis of C-Aryl Glycosides, *Synthesis,* **1994**, *1*, 20
127.S. Q. Cai, R. Wang, W. Yang, M. Shang, C. Ma, Y. Shoyama, Antiviral Flavonoid-Type *C*-Glycosides from the Flowers of *Trollius chinensis***,** *Chemistry & Biodiversity,* **2006**, *3*, 343-38
128.B. Dinda, A. Bhattacharya, U. De Chandra, S. Arima, H. Takayanagi, Y. Harigaya, Antimicrobial C-glucoside from aerial parts of Diospyros nigra, *Chem. Pharm. Bull.,* **2006**, *5*, 679-681
129. (a) C. A. Sanhueza, C. Mayat, M. Garcia-Chicano, R. Diaz-Penate, R. L. Dorta, J. T. Vazquez, Antiproliferation and apoptosis induced by C-glycosides in human leukemia cancer cells**,** *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2006**, *16*, 4223-4227 (b) M. R. Chaulagain , M. H. D. Postema, F. Valeriote, H. Pietraszkewicz, Synthesis and anti-tumor activity of β-*C*-glycoside analogs of the immunostimulant KRN7000, *Tetrahedron Lett.,* **2004**, *41*, 7791
130. (a) R. R.Schmidt, H. Dietrich, Amino-substituted ß-Benzyl-*C*-glycosides; Novel ß-Glycosidase Inhibitors**,** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30,* 1328-1329 (b) W. Zou**,** C-glycosides and aza-C-glycosides as potential glycosidase and glycosyltransferase inhibitors**,** *Current Topics in Medicinal Chemistry,* **2005**,*14*, 1363-1391 (c) F. Stolz, A. Blume, S. Hinderlich, W. Reutter, R. R. Schmidt, *C*-Glycosidic UDP-GlcNAc Analogues as Inhibitors of UDP-GlcNAc 2-Epimerase**,** *Eur. J. Org. Chem.,* **2004**, *15*, 3304-3312
132.J. Herscovici, S. Delatre, K. Antonakis, Lewis acid induced homoallylic C-alkylation. A new approach to C-glycosides**,** *J. Org. Chem.,* **1987**, *52*, 5691-5695
133.H. Wetter, K. Oertle, *Tetrahedron Lett*., **1985**, *26*, 5515
134. (a) C. O. Kappe, Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6250-6284 (b) J. P. Tierney, P. Lidström, *Microwave Assisted Organic Synthesis*, Eds., Blackwell Publising, **2005**
135. Thèse d'Amira Mbarek soutenue en Mai 2011 s'intitulant « Conception et synthèse d'une chimiothèque diversifiée à partir de synthons C-glycosidiques »
136.K. Ishihara, M. Kubota, H. Kurihara, H. Yamamoto, Scandium Trifluoromethanesulfonate as an Extremely Active Lewis Acid Catalyst in Acylation of Alcohols with Acid Anhydrides and Mixed Anhydrides**,** *J. Org. Chem.,* **1996**, *61*, 4560-4567
137.S. Kobayashi, I. Hachiya, Lanthanide Triflates as Water-Tolerant Lewis Acids. Activation of Commercial Formaldehyde Solution and Use in the Aldol Reaction of Silyl Enol Ethers with Aldehydes in Aqueous Media**,** *J. Org. Chem.,* **1994**, *59*, 3590-3596
138.J.W.J. Kennedy, D. G. Hall, Lewis Acid Catalyzed Allylboration: Discovery, Optimization, and Application to the Formation of Stereogenic Quaternary Carbon Centers**,** *J.Org. Chem.* **2004**, *69*, 4412-4428
139. (a) P. G. McDougal, J. G. Rico, Y-I. Oh, B. D. Condon, A convenient procedure for the monosilylation of symmetric 1,n-diols, *J. Org. Chem*., **1986**, *51*, 3388-3390, (b) H-Y. Lee, H. Seop Yae, B. Guy Kim, H-M. Choo, A practical total synthesis of gelastatins, *Tetrahedron lett.,* **2003**, 44, 5803-5806
140.J. Ju, DH. Kim, L. Bi, Q. Meng, X. Bai, Z. Li, X. Li, MS. Marma, S. Shi, J. Wu, JR. Edwards, A. Romu, NJ. Turro, Four-color DNA sequencing using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators, *PNAS*, **2006**, *103*, 19635-19640
141.S. G. Alvarez, M. T. Alvarez, A practical procedure for the synthesis of alkyl azides at ambiant temperature in dimethyl sulfoxide in high purity and yield, *Synthesis,* **1997,** *4*, 413-414
142.N. Hooper, L. J. Beeching, J. M. Dyke, A. Morris, J. S. Ogden, A. A. Dias, M. L. Costa, M. T. Barros, M. H. Cabral, A. M. C. Moutinho, A study of the thermal decomposition of 2-azidoethanol and 2-azidoethyl acetate by ultraviolet photoelectron spectroscopy and matrix isolation infrared spectroscopy, *J. Phys. Chem.,* **2002,** *106*, 9968-9975
143.A. J. Scheel, H. Komber, B. I. Voit, Novel hyperbranched poly[1,2,3]-triazoles derived from AB2 monomers by 1,3 dipolar cycloaddition, *Macromol. Rapid Comm.,* **2004,** *25*, 1175-1180
144.K. Alder, F. Pascher, A. Schmitz, Substituting additions. I. Addition of maleic anhydride and azodicarboxylic esters to singly unsaturated hydrocarbons. Substitution processes in the allyl position *Ber. Dtsch. Chem.* **1943**, *76*, 27
145.M. Yamanaka, A. Nishida, M. Nakagawa, Ytterbium (III) triflate/TMSCl : Efficient catalyst for Imino Ene reaction, *Org. Lett.,* **2000**, *2*, 159-161
146. (a) K. Mikami, H. Ohmura, M. Yamanaka, (2,5)-ene cyclization by mesoporous solid acids : isotope labeling study and ab initio calculation for continuum from concerted to stepwise ene mechanism, *J. Org. Chem*., **2003**, *68*, 1081-1088 ; (b) K. Mikami, M. Shimjzu, T. Nakai, Highly regio and

stereocontrolled glyoxyalte-ene reaction with (homo)allylic ethers : remarkable alkoxy effect in regio- and stereocontrol, *J. Org. Chem*., **1991**, *56*, 2952-2953

147. S. Hanessian, H. Park, R-Y Yang, Zinc-mediated allylation of N-protected –amino aldehydes in aqueous solution. Stereoselective synthesis of Phe-Phe hydroxyethylene dipeptide isosteres, *Synlett*, **1997**, 351-352

148. H. Nagano, R Kuwahara, F. Yokoyama, Radical mediated stereoselective synthesis of meso-7,11-dimethylheptadecane, a female sex pheromone component of the spring hemlock looper and the pitch pine looper, *Tetrahedron*, **2007**, *634*, 8810-8814

149. A. Dömling, Recent advances in isocyanide-based multicomponent chemistry, *Curr. Opin. Chem. Biol.,* **2002,** *6*, 306-313

150. I. Ugi, C. Steinbrückner, Isonitrile 2 : reaktionen von isonitrilen mit carbonylverbindungen, aminen und stickstoffwasserstoffsäure, *Chem. Ber.,* **1961,** *39*, 3168-3210

151. L. Banfi, G. Guanti, R. Riva, Passerini multicomponent reaction of protected a-aminoaldehydes as tool for combinatorial synthesis of enzyme inhibitors, *Chem. Commun.,* **2000,** 985-986

152. A. Dömling, I. Ugi, Multicomponent reactions with isocyanides, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2000,** *39*, 3168-3210

153. (a) G. S. Kauffman, G. D. Harris, R. L. Dorow, B. R. P. Stone, R. L. Parsons, J. A. Pesti, N. A. Magnus, P. N. Confalone, W. A. Nugent, An Efficient Chiral Moderator Prepared from Inexpensive (+)-3-Carene: Synthesis of the HIV-1 Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor DPC 963**,** *Org. Lett.,* **2000**, *2*, 3119-3121 (b) M. A. Huffman, N. Yasuda, A. E. De Camp, E. J. Grabowski, Lithium Alkoxides of Cinchona Alkaloids as Chiral Controllers for Enantioselective Acetylide Addition to Cyclick N-Acyl Ketimines**,** *J. Org. Chem*., **1995**, *60*, 1590-1594 (c) B. Nilsson, H. M. Vargas, B. Ringdahl, U. Hacksell, Phenyl-substituted analogues of oxotremorine as muscarinic antagonists.,*J. Med. Chem.,* **1992**, *35*, 285-294 (d) K. Hattoi, M. Miyata, H. Yamato, Highly selective and operationally simple synthesis of enantiomerically pure .beta.-amino esters via double stereodifferentiation**,** *J. Am. Chem. Soc.,* **1993**, *115*, 1151-1152 (e) G. Dyker, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 1698

154. Agoniste des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine à utilisation uniquement expérimentale. Elle provoque par action centrale des effets semblables aux symptômes de la maladie de Parkinson (tremblements, ataxie et spasticité).

155. M. Konishi , H. Ohkuwa , T. Tsuno , T. Oki**,** Crystal and molecular structure of dynemicin A: a novel 1,5-diyn-3-ene antitumor antibiotic**,** *J. Am. Chem. Soc*., **1990**, *112*, 3715-3716

156. Y. Herzig , L. Lerman , W. Goldenberg , D. Lerner , H. E. Gottlieb , A. Nudelman, Hydroxy-1-aminoindans and derivatives: preparation, stability, and reactivity**,** *J. Org. Chem.,* **2006**, *71*, 4130-4140

157. T. J. Tucker, T. A. Lyle, C.M. Wiscount, S. F. Britcher, S. D. Young, W. M. Sanders, W. C. Lumma, M. F. Goldman, G. A. O'Brien, R. G. Ball, C. F. Homnick, W. A. Schleif, E. A. Emini, J. R. Huff, P. S. Anderson, Synthesis of a Series of 4-(Arylethynyl)-6-chloro-4-cyclopropyl-3,4-dihydroquinazolin-2(1H)-ones as Novel Non-nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors**,** *J. Med. Chem*., **1994**, *3* , 2437-2444

158. (a) I. E. Kopka, Z. A. Fataftah, M. W. Rathke, Preparation of a series of highly hinderered secondary amines, including bis(triethyl-carbinyl)amine, *J. Org. Chem.,* **1980**, *45*, 4616. (b) Y. Imada, M. Yuassa, I. Nakamura, S. I. Murahashi, Copper(I)-Catalyzed Amination of Propargyl Esters. Selective Synthesis of Propargylamines, 1-Alken-3-ylamines, and (Z)-Allylamines**,** *J. Org. Chem.,* **1994**, *59*, 2282-2284 (c) S. Czernecki, J. M. Valery, **A** Stereocontrolled Synthesis of a Lincosamine Precursor**,** *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, *9*, 767-770

159. (a) C. J. Li, C. Wei, Highly efficient Grignard-type imine additions *via* C–H activation in water and under solvent-free condition, *Chem. Commun.* **2002**, 268. (b) J. J. McNally, M. A. Youngman, S. L. Dax, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 967. (c) J. Zhang, C. Wei, C. J. Li, Cu(I)Br mediated coupling of alkynes with *N*-acylimine and *N*-acyliminium ions in water, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 5731-5733

160. C. Fischer, E. M. Carreira, Direct Addition of TMS-acetylene to Aldimines Catalyzed by a Simple, Commercially Available Complex. *Org. Lett.,* **2001**, *3*, 4319

161. C. Wei, C.-J. Li, A Highly Efficient Three-Component Coupling of Aldehyde, Alkyne, and Amines via C-H Activation Catalyzed by Gold in Wate, *J. Am. Chem. Soc*., **2003**, *125*, 9584-9585

162. C. Wei, Z. Li, C.-J. Li, *Org. Lett.*, The first silver-catalyzed three-component coupling of aldehyde, alkyne, and amine, **2003**, *5*, 4473

163. N. Gommermann, C. Koradin, K. Polborn, P. Knochel, Enantionselective, Copper (I)-catalysed three component reaction for the preparation of propargylamines, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2003**, *42*, 5763

164. (a) G. W. Kabalka, L. Wang, R. M. A Microwave-Enhanced Solventless Mannich Condensation on CuI-Doped Alumina, **2001**, 676. (b) S. L. Dax, S. C. Cook, Cyclick urea HIV protease inhibitors containing alkynyl- and alkenyl-tethered heterocycles in the P2 region**,** *Bioorg. Med. Chem.Lett.,* **1996**, *6*, 797

165. (a) J. J. McNally, M. A. Youngman, S. L. Dax, Mannich reactions of resin-bound substrates: 2. A versatile three-component solid-phase organic synthesis methodology**,** *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 967. (b) A. B. Dyatkin, R. A. Rivero, The solid phase synthesis of complex propargylamines using the combination of sonogashira and mannich reactions, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3647-3650

166. Y. Ju, C. J. Li, R. S. Varma, Microwave-Assisted Cu(I)Catalyzed Solvent-free Three Component Coupling of Aldehyde, Alkyne and Amine**,** *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 891

167. F. Bohlmann, H. Schoenowsky, E. Inhoffen, G. Grau, Polyacetylenverbindungen, LII. Über den Mechanismus der oxydativen Dimerisierung von Acetylenverbindungen, *Chem. Ber.,* **1964**, *97*, 794

168. C.O. Kappe,Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry, *Chem. Soc. Rev.,* **2008,** *37,* 1127-1139

169. D. Dallinger, C.O. Kappe,Microwave-assisted synthesis in water as solvent, *Chem. Rev.,* **2007,** *107,* 2563-2591

170. A. R. Katritzky, S. K. Singh, Microwave-assisted heterocyclick synthesis**,** *ARKIVOC* **2003**, *13*, 68-86

171. K. Tanaka, F. Toda, *Chem*. *Rev*. **2000**, *100*, 1025

172. Shi L., Tu Y.-Q., Wang M., Zhang F.-M, Fan C.-A., Microwaves-promoted three-component coupling of aldehyde, alkyne, and amine via C-H activation catalyzed by copper in water, *Org. Lett.,* **2004,** *6,* 1001-1003

173. (a) P. I. Dalko, L. Moisan, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2001**, *40*, 3726. (b) P. I. Dalko, L. Moisan, *Angew. Chem. Int. Ed*., **2004**, *40*, 5138. (b) A. Cordova, S. Watanabe, F. Tanaka, W. Notz, C. F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 1866. (c) W. Notz, F. Tanaka, C. F. Barbas, *Acc. Chem. Res*., **2004,** *37*, 580

174. P. W. Hickmott, Enamines: recent advances in synthetic, spectroscopic, mechanistic, and stereochemical aspects-I *, Tetrahedron*, **1982**, 38, 1975-2050

175. H. C. Kolb, K. B. Sharpless, The growing impact of click chemistry in drug discovery, *Drug Discov. Today*, **2003**, *8*, 1128

176. H. Nandiva, X. Jiang, J. Lahann, Click Chemistry: Versatility and control in the hands of materials scientists, *Advanced Materials*, **2007**, *19*, 2197

177. P. Wu, A. K. Feldmann, C. J. Hawkew, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. Frecher, K. B. Sharpless,V. V. Fokin, Efficiency and fidelity in a click-chemistry route to triazole dendrimers by the copper(I)-catalyzed ligation of azides and alkynes*, Angew Chem Int Ed.,***2004***, 43,* 3928-3932.

178. (a) A. Padwa, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, *Wiley, New York*. **1984**. (b) D. P. Curran, Stereochemical and Synthetic Studies of the Intramolecular Diels- Alder Reaction, *Ed. Advances in Cycloaddition*, **1990**, 2. (c) A. Padwa, I. M. Fleming, B. Trost, Intermolecular 1,3-Dipolar Cycloadditions, *Comprehensive Organic Synthesis*, **1991**, *4*, 1069

179. R. Huisgen, Kinetics and reaction mechanisms: selected examples from the experience of forty year**,** *Pure Appl. Chem.,* **1989,** *61*, 613

180. R. Huisgen, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry,* Wiley, New York, **1984**,1, 1

181. V. Rostovtsev, G. Green, V. Fokin, B. Sharpless, A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes**,** *Angew. Chem., lnt. Ed.,* **2002,** *41*, 2596.

182. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,30-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides, *J. Org. Chem.,* **2002,** *67*, 3057.

183. P. Wu, V. V. Fokin, Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications, *Aldrichim. Acta*., **2007**, *40*, 7

184. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. Rostovtsev, L. Noodleman, B. Sharpless, V. Fokin, Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates, J. *Am. Chem. Soc.,* **2005**, *127*, 210

185. C. Girard, E. Onen, M. Aufort, S. Beauviere, E. Samson, J. Herscovici, Reusable polymer supported catalyst for the [3+2] Huisgen cycloaddition in automation protocols, *Org. Lett.,* **2006**, *8*, 1689.

186. I. Jlalia, C. Beauvineau, S. Beauvière, E. Önen, M. Aufort, A. Beauvineau, E. Khaba, J. Herscovici, F. Meganem and C. Girard, Automated Synthesis of a 96 Product-Sized Library of Triazole Derivatives Using a Solid Phase Supported Copper Catalyst, *Molecules* **2010**, *15*, 3087-3120

187. M. Aufort, J. Herscovici, P. Bouhours, N. Moreau, C. Girard, Synthesis and antibiotic activity of a small molecules library of 1,2,3-triazole derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2008**, *18*, 1195.

188. (a) S. G. Alvarez, M. T. Alvarez, A pratical procedure for the synthesis of alkyl azides at ambient temperature in diemthyl sulfoxide in high purity and yield, *Synthesis,* **1997**, 413. (b) N. Hooper, L. J. Beeching, J. M. Dyke, A. Morris, J. S. Ogden, A. A. Dias, M. L. Costa, M. T. Barros, M. H. Cabral, A. M. C. Moutinho, A study of the thermal decomposition of 2-azidoethanol and 2-azidoethyl acetate bu ultraviolet photoelectron spectroscopy and matrix isolation infrared spectroscopy, *J. Phys. Chem. A*., **2002,** *106*, 9968. (c) A. J. Scheel, H. Komber, B. I. Voit, Novel hyperbranched poly[1,2,3]-triazoles derived from AB2 monomers by 1,3-dipolar cycloaddition, *Macromol. Rapid Comm.,* **2004**, *25*, 1175. (d) P. Appukkuttan, W. Dehaen, V. V. Fokin, E. V. Eycken, *Org. Lett*., **2004**, *6*, 4223.

189. C. Girard, I. Tranchant, P. Nioré, and J. Herscovici, *Synlett*, **2000**, 11, 1577-1580

190. N. L. Pohl, Fluorous tags catching on microarrays, *Angew. Chem. Int. Ed*., **2008**, *47*, 3868-3870

191. A. N. Koehler, A. F. Shamji, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.,* **2003**, *125*, 8420-8421

192. G. MacBeath, A. N. Koehler and S. L. Schreiber, J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 7967-7968

193. M. Uttamchandani, D. P. Walsh, S. M. Kheronsky, X. Huang, S. Q. Yao, Y. T. Chang*, J. Comb. Chem.*, **2004**, *6*, 862-868

194. A. J. Vegas, J. H. Fuller, A. N. Koehler, Small-molecule microarrays as tools in ligand discovery, *Chem. Soc. Rev*., **2008**, *37*, 1385-1394

195. J. E. Bradner, O. M. McPherson, R. Matzitschek, D. Barnes-Seeman, J. P. Shen, J. Dhaliwal, K. E. Stevenson, J. L. Duffner, S. B. Park, D. S. Neuberg, P. Nghiem, S. L. Schreiber and A. N. Koehler, A robust small-molecule microarray platform for screening cell lysates, *Chemistry & Biology*, **2006**, *13*, 4933-504

196. J. E. Bradner, O. M. McPherson and A. N. Koehler, A method for the covalent capture and screening of diverse small molecules in a microaaray format, *Nature Protocols*, **2006**, 1, 2344-2352

197. L. Välimaa, K .Pettersson, J. Rosenberg, M. Karp, T. Lövgren, Quantification of streptavidin absorption in microtitration wells, *Anal. Biochem.,* **2004,** *331*, 376-384

198. S. Burazerovic, J. Gradinaru, J. Pierron, T. R. Ward, Hiererchical self-assembly of one-dimensional streptavidin bundles as a collagen mimetic for the biomineralization of calcite, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2007,** *46*, 5510-5514

199. S.-C. Wu, S.-L. Wong, Engineering soluble monomeric streptavidin with reversible biotin binding capacity, *J. Biol. Chem.,* **2005,** *280*, 23225-23231

200. H. Schetters, Avidin and streptavidin in clinical diagnostics, *Biomol. Eng.,* **1999,** *16*, 73-76

201. A. Scorilas, A. Bjartell, H. Lilja, C. Moller, E. P. Diamandis, Streptavidin-polyvinylamine conjugates labeled with europium chelate : applications in immunoassay, immunohistochemistry, and microarrays, *Clin. Chem.,* **2000,** *46*, 1450-1455

202. Q. P. Qin, T. Lövgren, K. Pettersson, Development of highly fluorescent detection reagents for the construction of ultrasensitive immunoassays, *Anal. Chem.,* **2001,** *73*, 1521-1529

203. K. Ohno, B. Levin, D. Meruelo, Cell-specific, multidrug delivery system using streptavidin-protein a fusion protein, *Biochem. Mol. Med.,* **1996,** *58*, 227-233

204. D. S. Wilbur, P. M. Pathare, D. K. Hamlin, P. S. Stayton, R. To, L. A. Klumb, K. R. Buhler, R. L. Vessella, Development of new biotin/streptavidin reagents for pretargeting, *Biomol. Eng.,* **1999,** *16*, 113-118

205. M. P. Costi, S. Ferrari, A. Venturelli, S. Calo, D. Tondi, D. Barlocco, Thymidylate synthase stucture, function and implication in drug discovery, **2005,** *Curr. Med. Chem., 12*, 2241-2258

206. W. R. Monfort, A. Weichsel, Thymidylate synthase : Structure, inhibition and strained conformations during catalysis, *Pharm. Ther.,* **1997,** *76,* 29-43

207. H. Myllykallio, G. Lipowski, D. Leduc, J. Filee, P. Forterre, U. Liebl, An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis, *Science,* **2002,** *297*, 105-107

208. S. Graziani, Y. Xia, J. R. Gurnon, J. L. Van Etten, D. Leduc, S. Skouloubris, H. Myllykallio, U. Liebl, Functional analysis of FAD-dependent thymidylate synthase ThyX from *Paramecium bursaria* chorella Virus-1, *J. Biol. Chem.,* **2004,** *279*, 54340-54347

209. S. Graziani, J. Bernauer, S. Skouloubris, M. Graille, C.-Z. Zhou, C. Marchand, P. Deconttignies, H. van Tielbeurgh, H. Myllykallio, U. Liebl, *J. Biol. Chem,* **2006,** *281*, 24048-24057

210. M. Giladi, G. Bitan-Banin, M. Mevarech, R. Ortengerg, Genetic evidence for a novel thymidylate synthase in the halophilic archaeon *Halobacterium salinorum* and *Campilobacter jejuni*, *FEMS Micro. Lett.,* **2002,** *216*, 105-109

211. P. Kuhn, S. A. Lesley, I. I. Mathews, J. M. Canaves L. S., Brinen, Dai X, A. M. Deacon, M.A. Esliger, R Eshaghi, R. Floyd, Crystal structure of Thy1, a thymidylate synthase complementing protein from *Thermotoga maritima* at 2.25A resolution, *Proteins Struct. Funct. Genet.,* **2002,** *49*, 142-145

212. A. G. Murzin, DNA building block reinvented, *Science,* **2002,** *297*, 61-62

213.P. Sampathkumar, S. Turley, C. H. Sibley, W. G. J. Holl, NADP $^{+}$ expels both the co-factor and a substrate analog from the *Mycobacterium tuberculosis* ThyX active site: Opportunities for anti-bacterial drug design, *J. Mol.. Biol.,* **2006,** *360*, 1-6

214. Protéines ThyA et ThyX fournies par l'équipe de Hannu Myllykallio - Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS UMR 8621, Université Paris Sud, Orsay, France

215. (a) M. M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*, **1976**, *72*, 248-254 (b) W.J. Kilkowski, G.G. Gross, Color reaction of hydrolyzable tannins with Bradford reagent, Coomassie brilliant blue. *Phytochemistry*, **1999**, *51*, 363-366

216.J.P. Dales, et al., CD105 expression is a marker of high metastatic risk and poor outcome in breast carcinomas. Correlations between immunohistochemical analysis and long-term follow-up in a series of 929 patient,. *Am. J. Clin. Pathol.,* **2003**, *119*, 374-380

217.E.J. Quackenbush and M. Letarte, Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. *J. Immunol.,* **1985**, *134*, 1276-1285

219.W. Graulich, et al., Cell type specificity of the human endoglin promoter. *Gene*, **1999**, *227*, 55-62

220.S. Cheifetz, et al., Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells*, J. Biol. Chem*., **1992**, *267*, 19027-19030

221.L. Jonker and H.M. Arthur, Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mech Dev*, **2002**, *110*,193-196

222. (a) P. Lastres, et al., Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1, *J. Cell. Biol.,* **1996**, *133*, 1109-1121 ; (b) C. Li, et al., CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells, *FASEB J.,* **2000**, *14*, 55-64

223.B. Guo, et al., CD105 (endoglin), apoptosis, and stroke. *Stroke*, **2004**, *35*, 94-95

224.N. Takahashi, et al., Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suprressive effect of chemo therap on the serum endoglin, *Clin. Cancer Res*., **2001**, *7*, 524-532

225.S. Bredow, et al., Imaging of tumour neovasculature by targeting the TGF-beta binding receptor endoglin. *Eur. J. Cancer*, **2000**, *36*, 675-681

226.E. Fonsatti, et al*.,* Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model*, Clin. Cancer Res*., **2000**, *6*, 2037-2043

228. Site internet "Vie", site ressource en Sciences de la Vie - ENS / DGESCO / UPMC 1999-2011

229.N. Morellet, S. Bouaziz, P. Petitjean, B. P. Roques, NMR Structure of the HIV-1 Regulatory Protein VPR*, J. Mol. Biol.*, **2003**, *327*, 215-227

230.M. Burkrinsky, A. Adzhubei, Viral Portein R of HIV-1, *Rev. Med. Virol*., **1999**, *9*, 39-49

231.N. Morellet, B. P. Roques, S. Bouaziz, Structure-function relationship of Vpr : biological implications, *Current HIV Research*, **2009**, *7*, 184-210

232.E. Le Rouzic, S. Benichou, The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle, *Retrovirology,* **2005**, 2-11

234.G. Salgado, A. Vogel, R. Marquant, S. E. Feller, S. Bouaziz, I. D. Alves, *J. Med. Chem*, **2009***, 52*, 7157-7162

235.M. Shimura, Y. Zhou, Y. Asada, T. Yoshikawa, K. Hatake, F. Takaku, Y. Ishizaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **1999**, *261*, 308-316

236. Rapport de stage de LARGEN Robert 2ème année BTS Biotechnologies 2008/2009

237. (a) P. J. Hajduk, T. Gerfin, J. M. Boehlen, M. Haberli, D. Marek, S. W. Fesik, High-trhoughput nulcear magnetic resonance-based screeening, *J. Med. Chem*., **1999**, *42*, 2315-2317 ; (b) H. Widmer, W. Jahnke, Protein NMR in biomedical research, *Cell Mol. Life Sci*., **2004**, *61*, 580-599 ; (c) C. Smet, J-F. Duckert, J-M. Wieruszeski, I. Landrieu, L. Buee, G. Lippens, B. Deprez, Control of protein-protein interactions : structure-based discovery of low molecular weight inhibitors of the interactions between Pin1 WW domain an phosphopeptides, *J. Med. Chem*., **2005**, *8*, 4815-4823

238. (a) Dalvit *et al*., *J. Biomol. NMR*, **2001**, *21*, 349-359 ; (b) C. Dalvit, *J. Magn. Reson.*, **1996**, *112*, 282-288 ; (c) C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tatï, M. Veronesi, A. Vulpetti and M. Sundstroem, *J. Biomol. NMR*, **2000**, *18*, 65-68

240. (a) O. A. Gansaiw, M. W. Brechbiel, S. Mirzadeh, D. Coclher, M. Roselli, Chelates and antibodies : current methods and new directions, Cancer imaging and radiolabeled antibodies, Ed. D. M. Goldebenberg, 153-171, Kkuwers Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands ; (b) C. H. Cummins, E. W. Rutters, W. A. Fordyce, A convenient synthesis bifunctional chelating agents based on diethylenetriamine pentaacetic acid and their coordination chemistry with yttrium(III), *Bioconjugate Chem*., **1991**, *2*, 180-186

241. P. L. Anelli, F. Fedeli, O. Gazotti, L. Lattuada, G. Lux, F. Rebasti, L-glutamic acid and L –lysine as useful building block for the preparation of bifunctional DTPA-like ligands, *Bioconjugate Chem*., **1999**, *10*, 137-140

242. M. A. Williams, H. Rapoport, Synthesis of enantiomerically pure diethylenetriamine pentaacetic acid analogues. L-phenylalanine as the educt for substitution at the central acetic acid, *J. Org. Chem*., **1993**, *58*, 1151-1158

243. A. Masotti, P. Vicennati, F. Boschi, L. Calderan, A. Sbarbati, G. Ortaggi, A novel near-infrared indocyanine dye-polyethylenimine conjugate allows DNA delivery imaging in vivo. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 983-987

244. Y-Y. Lin, S-C. Tsai, S. J. Yu, Highly efficient and recyclable Au nanoparticle-supported palladium(II) interphase catalysts and microwave-assisted alkyne cyclotrimerization reactions in ionics liquids, *J. Org. Chem*., **2008**, *73*, 4920-4928

245. (a) JB Harborne, Nature, distribution, and function of plant flavonoids. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine - Biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*, Cody V, Middleton EJr, Harborne JB (eds), **1986**, 15-24. Alan R. Liss, Inc.: New York ; (b) Ghedira K, Flavonoids: structure, biological activities, prophylactic function and therapeutic uses, *Phytothérapie,* **2005***, 4*, 162-169

246. BH . Havsteen, The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther,* **2002***, 96*, 67-202

247. JPJ. Marais, B. Deavours, RA. Dixon, D. Ferreira, The stereochemistry of flavonoids. *In The Science of Flavonoids*, Grotewold E (ed), **2006**, 1-46. Springer Science, Inc.: New York

248. Dans cette thèse, nous avons délibérément utilisé le féminin pour évoquer l'abréviation "FAA", en référence à la "flavone acétique", appellation qui lui a été attribuée par l'ensemble des chercheurs francophones qui ont travaillé sur cette molécule.

249. B. Carboni, A. Benalil, M. Vaultier (**1993**) Aliphatic amino azides as key building blocks for efficient polyamine syntheses, *J. Org. Chem., 58,* 3736-3741

250. J. W. Lee, S. I. Jun, K. Kim (**2001**) An efficient and pratical method for the synthesis of mono-N-protected a,w-diaminoalkanes, *Tetrahedron Lett., 42,* 2709-2711

251. K. Drickamer, M. E. Taylor, Biology of animal lectins, *Ann. Rev. Cell. Biol*., **1993**, *9*, 237-264

252. (a) S. G. Alvarez, M. T. Alvarez, *Synthesis*, **1997**, 413-414 ; (b) A. J. Scheel, H. Komber, B. I. Voit, *Macromol. Rapid Commun*., **2004**, *25*, 1175-1180 ; (c) N. Hooper, L. Beeching, J. M. Dyke, A. Morris, J. S. Ogden, A. A. Dias, M. L. Costa, M. T. Barros, M. H. Cabrell, A. M. C. Moutinho, *J. Phys. Chem. A*., **2002**, *106*, 9968-9969

253. (a) P. M. Collins, H. Eder, Preparation of 3-methoxycarbonylpropyl α-D- and 7-methoxycarbonylhexyl β-D-galactopyranosides : spacer-arm glycosides for branched oligosaccharide synthesis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1984**, 1525, (b) R. U. Lemieux, W. P. Shyluk, *Can. J. Chem*., **1953**, *31*, 528

254. R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem. Int. Engl.,* **1980**, *19*, 731

255. (a) J. R. Pougny, P. Sinaÿ, *Tetrahedron Lett*., **1976**, 4073 ; (b) J. R. Pougny, J. C. Jacquinet, M. Nassar, D. Duchet, M. Milat, P. Sinaÿ, *J. Am. Chem. Soc*., **1977**, *99*, 6762

256. (a) R. R Schmidt, Neue methoden zur glycoside- und oligosaccharide synthese –gibt est alternativen zur Noenigs-Knorr methode ?, *Angew. Chem*, **1986**, *98*, 213 ; (b) R. R Schmidt, New methods of glycoside and oligosaccharide syntheses – are there alternatives to Koenigs-Knorr methode, *Angew. Chem. Int. Engl*., **1986**, *25*, 21

257. D. B. Dess, J. C. Martin, A useful 12-I-5 triacetoxyperiodinane (the Dess-Martin periodinane) for the selective oxidation of primary or secondary alcohols and a variety of related 12-I-5 species, *J. Am. Chem. Soc.,* **1991***, 113*, 7277-7287

258. E. J. Corey, J. W. Suggs, *Tetrahedron Lett.,* **1975**, *16*, 2647

259. S. Bhar, S. K. Chaudhuri, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 3493

260. K. Omura, D. Swern, Oxidation of alcohols by "activated" dimethyl sulfoxide. a preparative, steric and mechanistic study, *Tetrahedron,* **1978***, 34*, 1651-1660

261. A. J. Mancuso, D. Swern,Activated Dimethyl Sulfoxide: Useful Reagents for Synthesis, *Synthesis,* **1981***, 3*, 165-185

262. J. R. Parikh, W.E Doering., Sulfur trioxide in the oxidaiton of alcohols by dimethyl sulfoxide, *J. Am. Chem. Soc.,* **1967***, 89,* 5505-5507

263. S. Haung, A. Mancuso, D. Swern, Oxidation of long-chain and related alcohols to carbonyls by dimethyl sulfoxide "activated" by oxalyl chloride *J. Org. Chem*., **1978**, *43*, 2480-2482

264. (a) J. Cookson, M. S. Vickers, R. L. paul, A. R. Cowley, P. D. Beer, Amide functionalised dithiocarbamate ruthenium (II) bis-bipyridyl receptors : a new class of redox-responsive anion sensor, *Inorganica Chimica Acta*, **2008**, *361*, 1689-1698 : (b) S. Girault, E. Davioud-Charvet, L. Maes, J-F. Dubremetz, M-A. Debreu, V. Landry, C. Sergheraert, Potent and specific inhibitors of trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi : bis(2-aminodiphenylsulfides) for fluorescent labeling studies, *Bioorg. Med. Chem*., **2001**, *9*, 837-846

265. L. Wang, J. E. T. Corrie, J. F. Wootton, Photolabile precursors of cyclick nucleotides with high aqueous solubility and stability, *J. Org. Chem*., **2002**, *67*, 3474-3478

266. (a) S. Knör, A. Modlinger, T. Poethko, M. Schottelius, H-J. Wester, H. Kessler, Synthesis of novel 1,4,7,10-tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) derivatives for chemoselective attachment to unprotected polyfunctionalized compounds, *Chem. Eur. J*., **2007**, *13*, 6082-6090 ; (b) C. Wängler, M. Schäfer, R. Schirrmacher, P. Bartenstein, B. Wängler, DOTA derivatives for site-specific biomolecule-modification via click chemistry : synthesis and comparison of reaction charactristics, *Bioorg. Med. Chem*., **2010**

267. (a) I. Dijkgraaf, A. Y. Rijnders, A. Soede, A. C. Dechesne, G. Wilma van Esse, A. J. Brouwer, F. H. M. Corstens, O. C. Boerman, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, Synthesis of DOTA-conjugated multivalent cyclick-RGD peptide dendrimers via 1,3-dipolar cycloaddition and their biological evaluation : implications for tumor targeting and tumor imagind purposes, *Org. Biomol. Chem*., **2007**, *5*, 935-944 ; (b) C-B. Yim, O. C. Boerman, M. de Visser, M. de Jong, A. C. Dechesne, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, Versatile conjugation of octreoide to dendrimers by cycloaddition (« click») chemistry to yield high-affinity multivalent cyclick peptide drendrimers, *Bioconjugate Chem*., **2009**, *20*, 1323-1331

268. A. T. Lebedev, J. P. Holland, J. S. Lewis, Clickable bifunctional radiometal chelates for peptide labeling, *Chem. Commun.,* **2010**, *46*, 1706-1708

269. T. L. Mindt, C. müller, F. Stuker, J-F. Salazar, A. Hohn, T. Mueggler, M. Rudin, R. Schibli, A « clickk chemistry » approach to the efficient synthesis of multiple imaging probes derived from a single precursor, *Bioconjugate Chem.,* **2009**, *20*, 1940-1949

270. L. Tei, G. Gugliotta, S. Avedano, G. B. Giovenzana, M. Botta, Application of the Ugi four-compoent reaction to the synthetic of ditopic bifunctional chelating agents, *Org. Biomol. Chem*., **2007**, *7*, 4406-4414

271. W. Liu, A. Hajibeigi, M. Lin, C. L. Rostollan, Z. Kovacs, O. K. Öz, X. Sun, An osteoclast-targeting agent for imaging and therapy ob bone metastasis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2008**, *18*, 4789-4793

272. J. P. André, C. F. G. C. Geraldes, J. A. Martins, A. E. Merbach, M. I. M. Prata, A. C. Santos, J. J. P. de Lima, E. Tóth, Lanthanide(III) complexes of DOTA-glyconjugates : a potential new class of lectins-mediated medical imaging agents, *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 5804-5816

273. A. Barge, L. Tei, D. Upadhyaya, F. Fedeli, L. Beltrami, R. Stefania, S. Aime, G. Cravotto, Bifunctional ligands based on the DOTA-monoamide cage*, Org. Biomol. Chem*., **2008**, *6*, 1176-1184

274. M. E. Martin, S. G. Parameswarappa, M. S. O'Dorisio, F. C. Pigge, M. K. Schultz, A DOTA-peptide conjugate by copper-free clickk chemistry, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2010**, *20*, 4805-4807

275. C. Richard, B-T. Doan, J-C. Beloeil, M. Bessodes, E. Tóth, D. Scherman, Noncovalent functionalization of carbon nanotubes with amphiphilic Gd chelates : toward powerful T and T MRI contrast agents, *Nano. Lett*., **2008**, *8*, 232- 236

276. F. Leclercq, M. Cohen-Ohana, N. Mignet, A. Sbarbati, J. Herscovici, D. Scherman, G. Byk, Design, synthesis and evaluation of gadolinum cationic lipids as tools for biodistribution tudies of gene delivery complexes, *Bioconjugate Chem*., **2003**, *14*, 112-119

277. N. Kamaly, T. Kalber, A. Ahmad, M. H. Oliver, P.-W. So, A. H. Herlihy, J. D. Bell, M. R. Jorgensen, A. D. Miller, Bimodal paramagnetic and fluorescent liposomes for cellular and tumor magnetic resonance imaging, *Bioconjugate Chem*., **2008**, *19*, 118-129

278. A. Barge, G. Cravotto, E. Gianolio, F. Fedeli, How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note*, Contrast Med. Mol. Imaging***, 2006**, *1*, 184-188

279. M. Tan, X. Wu, E-K. Jeong, Q. Chen, Z-R. Lu, *Biomacromolecules*, **2010**, *11*, 754-761

280. (a) T. Fukuyama, C-K Jow, M. Cheng, 2- and 4-nitrobenzenesulfonamides : exceptionally versatile means for preparation of secondary amines and protection of amines, *Tetrahedron lett*., **1995**, *36*, 6373-6374 ; (b) S. G. Leach, C. J. Cordier, D. Morton, G. J. McKiernan, S. warriner, A. Nelson, A fluorous-tagged linker from which small molecules are released by ring-closing metathesis, *J. Org. Chem*., **2008**, *73*, 2753-2759

281. Hacke, Brown, Thompson, Venkatesan, Magnetic Resonance Imaging, Physical Principles and Sequence Design, Wiley, **1999**

285. Still W. C., kahn M., Mitra A. **(1978)** Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *J. Org. Chem., 43, 14*, 2923-2925

286. T.-L. Hwang & A.J. Shaka*, J. Magn. Reson., Series A,* **1995***, 112*, 275-279