



Conception et synthèse d'hétérocycles azotés et de dérivés stéroïdiens, modulateurs potentiels de transporteurs ABC (glycoprotéine-P)

Wael Zeinyeh

► To cite this version:

Wael Zeinyeh. Conception et synthèse d'hétérocycles azotés et de dérivés stéroïdiens, modulateurs potentiels de transporteurs ABC (glycoprotéine-P). Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10325 . tel-00874305

HAL Id: tel-00874305

<https://theses.hal.science/tel-00874305>

Submitted on 17 Oct 2013

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.

N° d'ordre 325 - 2010

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ÉCOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ

DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 17 décembre 2010

par

M. Waël ZEINYEH

TITRE :

**Conception et synthèse d'hétérocycles azotés et de dérivés
stéroïdiens, modulateurs potentiels de transporteurs ABC
(glycoprotéine-P)**

Directeur de thèse : Pr. Nadia WALCHSHOFER

JURY : Pr. Ahcène BOUMENDJEL (Université Joseph Fourier, rapporteur)
Pr. Roger ESCALE (Université Montpellier I)
Dr Sylvie RADIX (MCU-HDR, UCB Lyon 1, ISPB)
Pr. Pascal RATHELOT (PU-PH, Université Aix-Marseille II, rapporteur)
Pr. Nadia WALCHSHOFER (UCB Lyon 1, ISPB)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

Remerciements

Mes plus sincères remerciements vont à toutes les personnes grâce auxquelles cette thèse a pu voir le jour.

A Monsieur le Professeur Michel Pugeat, pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche.

A Madame le Professeur Nadia Walchshofer, pour m'avoir encouragé dès le début à emprunter la voie de la recherche, et pour avoir tout fait pour que je puisse poursuivre ma thèse dans les meilleures conditions.

A Madame le Docteur Sylvie Radix. Son soutien m'était inestimable, tant au niveau scientifique qu'humain. C'est grâce à sa présence et à sa disponibilité que ce travail a pu avancer, même si les mots me manquent pour lui exprimer toute ma gratitude.

A Monsieur le Docteur Bruno Claustrat, chef du service d'Hormonologie au Groupement Hospitalier Est – Hospices Civils de Lyon. Sans la confiance qu'il m'a accordée, ce travail de thèse n'aurait jamais pu être effectué. Je lui exprime mes plus profonds respects.

A Monsieur le Docteur Henri Déchaud, pour toutes ses qualités scientifiques et humaines, et pour tout ce qu'il m'a appris durant ces trois dernières années. Je lui présente mes plus sincères remerciements en espérant avoir été digne de sa confiance.

A Messieurs les Professeurs Ahcène Boumendjel et Pascal Rathelot, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce manuscrit, et pour toutes leurs remarques constructives.

A Monsieur le Professeur Roger Escale, pour m'avoir fait l'honneur de figurer dans mon jury de thèse.

A toute l'équipe du laboratoire de chimie organique de la faculté de pharmacie de Lyon, ma grande famille durant ces trois dernières années: M. le Pr. Pascal Nebois pour son encouragement et son accueil, M. le Dr Zouhair Bouaziz pour sa grande expérience, ses conseils toujours pertinents et son agréable sourire, M^{me} le Dr Christelle Marminon pour sa bonne humeur et sa disposition permanente à offrir de l'aide, M. le Dr Luc Rocheblave pour les petites idées qui m'ont très souvent mis sur la bonne voie aux moments durs où les molécules décident de ne pas réagir, et M. Jacques Gentili pour ses précieuses connaissances en chimie et en informatique.

A M^{me} le Dr Catherine Grenot, M. le Pr. Charles Dumontet, M. le Dr Philippe Lawton, M^{me} le Dr Ghina Alameh et M^{me} Eva Matera, pour avoir effectué les tests biologiques des produits synthétisés dans le cadre de cette thèse.

A l'équipe du laboratoire de chimie thérapeutique pour leur disponibilité et leur aide : M. le Pr. Roland Barret, M. le Pr. Marc Leborgne, M^{me} le Dr Marie-Emmanuelle Millon, M. le Dr Laurent Ettouati, et M. le Dr Thierry Lomberget.

A Monsieur le Docteur Julien Pilmé, pour les discussions enrichissantes que nous avons eues au sujet de la modélisation moléculaire.

A Monsieur Marc Rolland de Ravel, pour toutes les techniques qu'il m'a apprises et que je n'aurais peut-être apprises nulle part ailleurs ! Ainsi que pour sa patience et sa très agréable compagnie au laboratoire. Merci.

A mes amis, leur présence m'était essentielle même s'ils ne le savent probablement pas : Alan, Mouhammad, Nada, Ilona, Claire, Géraldine, Nicoletta, Touatia, Mouhannad, Elma, et tous ceux que j'ai oubliés.

A ma très chère famille en Syrie : mon père, ma mère, Amer et Zeina...

Table des matières

Abréviations	6
Introduction.....	7
 CHAPITRE 1 : La multichimiorésistance et la famille des transporteurs ABC.....	10
1. La glycoprotéine-P (Pgp)	11
1.1. Historique	11
1.2. Structure.....	12
1.3. Les sites de liaison de la Pgp	14
1.3.1. Les sites de liaison de l'ATP (Nucleotide-Binding Domains, NBD)	14
1.3.2. Les autres sites de liaison	15
1.3.3. Le cas du (des) site(s) aux stéroïdes	16
1.4. Mécanisme d'action de la Pgp	21
1.5. Rôle de la Pgp dans les tissus sains	24
1.6. La Pgp et la multichimiorésistance en clinique	25
1.6.1. Les méthodes de détection	25
1.6.2. Les implications cliniques de la multichimiorésistance	26
1.7. Les inhibiteurs de la Pgp.....	27
1.7.1. Les structures.....	27
1.7.2. Mécanismes d'action	31
1.7.3. Perspectives.....	32
2. Le transporteur CpABC3	33
 CHAPITRE 2 : Conception et synthèse de dérivés d'imidazo[4,5-<i>b</i>]pyridin-7-ones.....	36
1. Les inhibiteurs d'ATPases	37
2. Bibliographie concernant la synthèse des imidazo[4,5-<i>b</i>]pyridines.....	39
2.1. Synthèse du noyau imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine.....	39
2.1.1. Synthèses à partir du noyau imidazole	39

2.1.2.	Synthèses à partir de pyridines.....	41
2.2.	Synthèses d'imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin-7-ones à partir d'imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridines.....	44
2.2.1.	À partir d'un groupement NO ₂ en position 7.....	44
2.2.2.	À partir d'un chlore en position 7.....	44
3.	Travaux personnels : Synthèse et évaluation des dérivés d'imidazo[4,5-<i>b</i>]pyridin-7-one	46
3.1.	Synthèse des dérivés 7-chloroimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine (III).....	47
3.1.1.	Synthèse des dérivés N-oxydes (9) et (10).....	47
3.1.2.	Etude de la régiosélectivité de la <i>N</i> -benzylation des composés (9) et (10)	48
3.1.3.	Chloration des dérivés N4-oxyde benzylés N1-(11) et N3-(11)	53
3.2.	Synthèse des imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin-7-ones (V)	55
3.2.1.	Synthèse de l'imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin-7-one (15)	55
3.2.2.	Alkylation en N4 de l'imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin-7-one (15)	57
3.3.	Evaluation biologique.....	62
CHAPITRE 3 : Conception, synthèse et évaluation biologique de dérivés bivalents progestérone-adénine comme inhibiteurs potentiels de la P-glycoprotéine		66
1.	Le concept du ligand bivalent.....	67
2.	Exemples de ligands bivalents.....	68
3.	Les ligands bivalents de la Pgp dans la littérature	72
4.	Conception, synthèse et évaluation biologique de dérivés bivalents progestérone-adénine comme inhibiteurs potentiels de la P-glycoprotéine.....	76
4.1.	Synthèse des ligands bivalents adénine-progestérone	78
4.1.1.	Fonctionnalisation de la progestérone	78
4.1.2.	Synthèse des dérivés adénine-bras-NH ₂	85
4.1.3.	Couplage des dérivés adénine-bras-NH ₂ avec les acides (29) et (30)	95
4.2.	Evaluation biologique des ligands bivalents progestérone-adénine.....	99
4.2.1.	Principe du test.....	99
4.2.2.	Résultats et discussion.....	101

CHAPITRE 4 :Synthèse de bras de type oligocyclohexylidène	105
1. Rappels bibliographiques	106
1.1. Méthode de Barton et Kellogg	106
1.2. Synthèse par réaction de Grignard	107
1.3. Synthèse <i>via</i> des composés dinitrés vicinaux'	108
1.4. Synthèse par réaction de McMurry.....	109
1.5. Synthèse via des acides β -hydroxycarboxyliques.....	110
1.6. Structure.....	112
2. Travaux personnels : Résultats et discussion	114
2.1. Essais par réaction de Wittig	114
2.2. Essais par réaction de Grignard	118
2.3. Essais par réaction de déshydratation-décarboxylation	121
2.4. Fonctionnalisation des oligocyclohexylidènes	124
Conclusion et perspectives	129
Partie expérimentale	133
Partie expérimentale Chimie	134
Partie expérimentale Biologie	217
Références.....	220

Abréviations

%m. : pourcentage massique
Boc : *tert*-butyloxycarbonyl
Boc₂O : dicarbonate de di-*tert*-butyle
Cbz : benzyloxycarbonyl
CCM : chromatographie en couche mince
CI : ionisation chimique
DCC : dicyclohexylcarbodiimide
DCM : dichlorométhane
DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone
DEAD : azadicarboxylate de diéthyle
DHP : 3,4-dihydro-2H-pyrane
DIAD : azadicarboxylate de diisopropyle
DMAP : 4-(diméthylamino)pyridine
DMF : diméthylformamide
DMF-DMA : *N,N*-diméthylformamide diméthylacétal
DMF-DNPA : *N,N*-diméthylformamide dineopentylacétal
DNR : daunorubicine
EI : ionisation électronique
ESI : ionisation par électrospray
Fmoc : fluorenylméthyloxycarbonyl
HOSu : N-hydroxysuccinimide
HRMS : spectrométrie de masse haute résolution
Hz : hertz
IR : infra-rouge
LDA : diisopropylamidure de lithium
MM : masse molaire
MO : micro-onde
MsCl : chlorure de méthanesulfonyl
PBS : tampon phosphate salin
PDC : dichromate de pyridinium
Pf : point de fusion
Pgp : glycoprotéine-P
ppm : partie par million
Pyr : pyridine
quant. : quantitatif
Rac. : racémique
Rdt : rendement
RMN : résonance magnétique nucléaire
RPMI : milieu de culture cellulaire développé au Roswell Park Memorial Institute
SM : spectrométrie de masse
TA : température ambiante
TBAF : fluorure de tétrabutylammonium
TBS : *tert*-butyldiméthylsilyl
THF : tétrahydrofurane
*p*TsCl : chlorure de *para*-toluènesulfonyl
UI : Unité Internationale
UV : ultra-violet

Introduction

La multichimiorésistance (multidrug resistance, MDR), est définie comme la résistance simultanée, exprimée par la cellule, à l'encontre d'agents cytotoxiques très variés du point de vue de leurs structures et de leurs mécanismes d'action.

Elle est l'un des mécanismes par lesquels les cancers développent une résistance aux traitements antitumoraux, et constitue, par conséquent, l'une des raisons de l'échec de ces traitements.

Plusieurs mécanismes peuvent intervenir pour conférer à la cellule une résistance à un principe actif donné ou à une classe médicamenteuse donnée. Parmi ces mécanismes, on peut citer la modification des voies métaboliques, l'altération des protéines cibles, la surexpression ou l'inactivation de certains gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose, etc...

La multichimiorésistance, qui confère à la cellule une protection contre un large spectre de substances actives n'ayant en commun ni leur structure ni leur cible, est souvent due à l'expulsion des cytotoxiques en dehors de la cellule par des pompes d'efflux, protéines appartenant à la famille des ABC (ATP-binding cassettes).

A l'heure actuelle, plusieurs protéines de la famille des ABC sont connues pour être impliquées dans le phénotype MDR : BCRP ou ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein), MRP-1 ou ABCC1 (Multidrug Resistance Protein) et la glycoprotéine-P ou ABCB1 (P-glycoprotein, Pgp)^{1,2}. Cette dernière a été la première à être découverte. Elle est la plus largement étudiée, mais elle reste une cible de choix pour lutter contre le phénotype MDR. A l'heure actuelle, les traitements visant à inhiber la Pgp n'ont pas montré d'efficacité clinique significative. En effet, les inhibiteurs actifs *in vitro* se sont souvent révélés très toxiques ou peu spécifiques, *in vivo*. La recherche d'inhibiteurs de la Pgp reste donc un défi d'actualité dans le domaine de la cancérologie. Notre équipe a donc orienté l'un de ses axes de recherche vers la synthèse d'inhibiteurs potentiels de la Pgp.

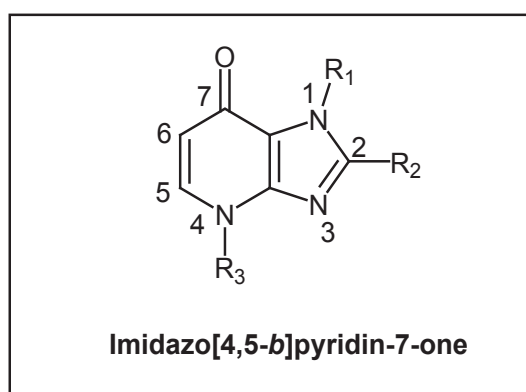
De plus, la famille ABC n'est pas exclusivement d'origine humaine, on trouve ces transporteurs dans des organismes couvrant toute l'échelle de l'évolution, allant des procaryotes (les bactéries) et des eucaryotes unicellulaires (dont certains parasites de

l'homme) jusqu'aux mammifères. En particulier, une deuxième protéine de la famille ABC a été explorée dans notre laboratoire, il s'agit de CpABC3, transporteur membranaire chez le parasite *Cryptosporidium parvum*, et possédant un rôle potentiel dans la résistance de ce parasite aux traitements. En outre, cette protéine possède également l'intérêt de présenter une importante homologie de structure avec la Pgp, en particulier au niveau des domaines liant l'ATP (Nucleotide Binding Domains ou NBDs), ce qui lui permet de constituer un modèle valable pour l'évaluation des inhibiteurs potentiels de l'activité ATPasique de la Pgp.

Dans le cadre de cette thèse, nous exposons le travail de recherche mené dans notre laboratoire dans l'objectif de développer des inhibiteurs potentiels des transporteurs ABC, en particulier la Pgp.

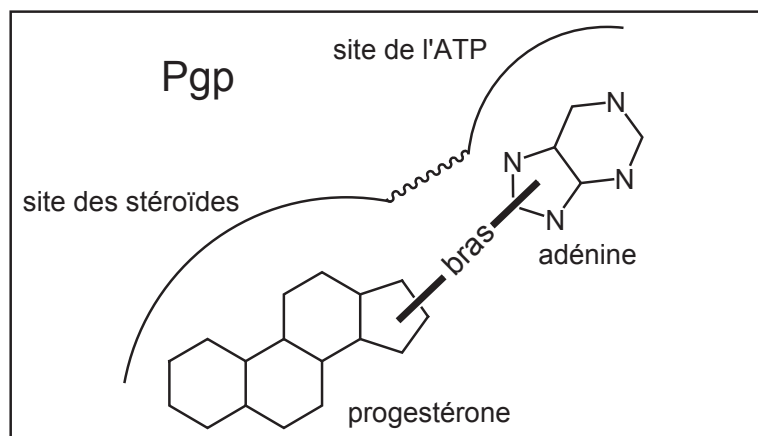
Le premier chapitre de ce document est un rappel bibliographique sur les connaissances actuelles concernant la multichimiorésistance par surexpression de transporteurs ABC. Nous traitons plus particulièrement de la Pgp : sa structure, son mécanisme d'action, ses sites de liaison, son rôle clinique ainsi que ses inhibiteurs chimiques.

Le deuxième chapitre est consacré à la synthèse d'hétérocycles de type imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-one. En effet, ce noyau peut être considéré comme une déazapurine, et de ce fait, pourrait avoir un effet inhibiteur de l'activité ATPasique des transporteurs ABC. Nous présentons la synthèse du noyau imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-one, ainsi que différentes modulations effectuées en positions 1, 2 et 4. Les tests d'inhibition de l'activité ATPasique de CpABC3 par ces composés sont également présentés à la fin du chapitre.

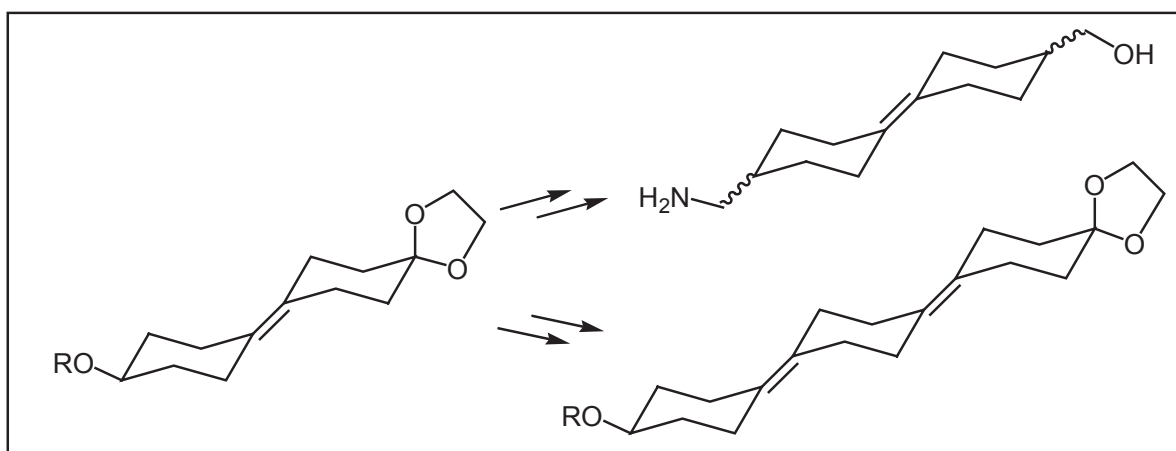


Le troisième chapitre est consacré à la synthèse de dérivés bivalents, de structure progestérone-espaceur-adénine, destinés à se lier simultanément sur le site aux stéroïdes et

sur le site à ATP de la Pgp. En plus de leur activité inhibitrice potentielle de la Pgp, ces bivalents pourraient constituer des outils pharmacologiques pour l'étude structurale de cette protéine, en fournissant des informations précieuses sur l'éventuelle proximité du site aux stéroïdes de celui à ATP. Nous exposons ainsi la synthèse de dix-sept dérivés bivalents, avec des bras de liaison de longueur et de géométrie variable, et un point de fixation sur la progestérone en C7 ou C20. L'évaluation de l'activité inhibitrice de la Pgp par ces composés est présentée à la fin du chapitre.



Enfin, dans le quatrième chapitre, nous présentons la synthèse de composés de type oligocyclohexylidène. En effet, ces composés possèdent une structure rigide, à longueur bien déterminée, et peuvent servir comme bras de liaison dans des composés bivalents à activité biologique. La synthèse de chaînes à deux et à trois unités cyclohexylidènes est exposée dans ce chapitre, ainsi que la fonctionnalisation du dérivé bicyclohexylidène avec des groupements permettant, à terme, d'effectuer le couplage de ces chaînes avec un stéroïde et un hétérocycle azoté.



CHAPITRE 1

La multichimiorésistance et la famille des transporteurs ABC

1. La glycoprotéine-P (Pgp)

1.1. Historique

La Pgp a été découverte en 1976 par des chercheurs canadiens (Juliano *et al.*)³. Ces chercheurs ont étudié des lignées cellulaires tumorales issues de l'ovaire du hamster chinois, présentant une résistance à un large spectre d'anticancéreux.

Des études antérieures avaient relié cette résistance à la diminution de l'accumulation des anticancéreux à l'intérieur de la cellule⁴.

En analysant le profil électrophorétique des protéines membranaires issues de ces lignées résistantes, Juliano *et al.* ont montré qu'une glycoprotéine membranaire de 170kDa était largement surexprimée dans les cellules résistantes par rapport aux lignées parentales sensibles. Ils ont baptisé cette glycoprotéine : la P-glycoprotéine, « P » pour « Permeability », supposant qu'elle avait un rôle dans la modulation de la perméabilité membranaire aux anticancéreux.

En 1983, Kartner *et al.*⁵ ont montré que la Pgp était également surexprimée dans des lignées tumorales multichimiorésistantes humaines. Depuis cette date, la Pgp est devenue une cible d'étude privilégiée dans le domaine de la cancérologie.

Ainsi, en partant d'une partie du génome qui subit une amplification significative dans les cellules cancéreuses multichimiorésistantes^{6,7,8}, le gène codant pour la Pgp a été identifié en 1986⁹. Il a été appelé « mdr1 » (pour Multiple Drug Resistance), et sa localisation chromosomique a été déterminée en 1987¹⁰, sur le chromosome 7. Les auteurs ont également montré que le gène mdr est en grande partie conservé entre les différentes espèces étudiées (l'homme, le hamster et la souris)⁸.

Le fait que la surexpression de la Pgp soit le résultat de l'amplification d'un gène faisant partie du patrimoine génétique des cellules saines, suggère que la Pgp joue un rôle dans ces cellules. Ceci a été confirmé, soit en localisant directement la Pgp dans des échantillons tissulaires grâce à un anticorps monoclonal (par exemple, l'étude menée en 1987 par Thiebaut *et al.* ¹¹), soit en étudiant l'expression du gène mdr1 dans les différents tissus (par exemple, Fojo *et al.* en 1987¹²). Les résultats, concordant, indiquaient que la Pgp était exprimée dans certains tissus humains sains : le foie, les reins, le pancréas, le tube digestif, les glandes corticosurrénales et la barrière hémato-encéphalique. Dans ces tissus, la Pgp est

essentiellement localisée sur la surface apicale des cellules épithéliales, soutenant l'hypothèse selon laquelle la Pgp joue un rôle dans la régulation de l'absorption et de l'élimination des xénobiotiques.

Pendant les deux dernières décennies, la Pgp a été très largement étudiée. Les recherches se sont portées sur sa structure, son mode de fonctionnement, et ses inhibiteurs potentiels.

1.2. Structure

La nature glycoprotéïque et la localisation membranaire de la Pgp ont été suggérées depuis la première publication la décrivant en 1976³.

La Pgp humaine est une protéine de 1280 acides aminés. Elle est constituée de deux parties équivalentes par leur taille et presque identiques par leur séquence d'acides aminés.

Chacune des deux parties comprend six domaines transmembranaires hydrophobes (TMs), trois boucles extracellulaires, deux boucles intracellulaires, et un domaine cytoplasmique hydrophile, capable de lier les nucléotides (NBD, Nucleotide-Binding Domain) (**figure 1**). Chacun de ces domaines NBD contient deux séquences d'acides aminés, connus sous le nom de motifs Walker, A et B¹³. Ces séquences caractérisent la plupart des protéines capables d'hydrolyser l'ATP. Les parties N-terminale et C-terminale de la protéine sont intracellulaires.

Cette figure ne peut pas être diffusée en accès libre.
Merci de consulter la publication d'origine (référence ci-dessous).

Figure 1 . Structure schématique de la Pgp, les domaines transmembranaires sont numérotés de 1 à 12, les motifs Walker A et B sont notés A et B. (d'après C.-H. Choi¹⁴)

Ce modèle a été proposé d'après la structure primaire de la protéine, établie à partir du séquençage de son gène¹⁵. L'étude de cette structure et la comparaison avec les structures primaires d'autres protéines de transport membranaires déjà connues (en particulier des protéines bactériennes), a permis de prédire l'existence de ces douze domaines transmembranaires hydrophobes, et de la séquence NBD déjà identifiée dans plusieurs ATPases.

Très récemment, la structure tridimensionnelle de la Pgp de souris, ayant 87% d'homologie de structure avec la Pgp humaine, a été établie par diffraction des rayons X¹⁶ (**figure 2**). Elle a une longueur de 136 Å et une largeur de 70 Å. La cavité interne de la Pgp a un volume de 6000 Å³ environ, et elle est entourée essentiellement d'acides aminés à chaîne latérale hydrophobe, appartenant aux hélices α des domaines transmembranaires (TM 1 à 12).

Cette étude a également révélé l'existence de deux portes d'entrée à la cavité hydrophobe, d'une largeur de 9 Å environ, donnant sur le feuillet interne de la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique. Ceci vient confirmer d'anciennes hypothèses selon lesquelles les molécules expulsées par la Pgp passent d'abord par la bicouche lipidique, et sont expulsées à partir du feuillet interne de la membrane^{17,18}.

Cette figure ne peut pas être diffusée en accès libre.
Merci de consulter la publication d'origine (référence ci-dessous).

Figure 2. Deux vues opposées de la Pgp de souris. TM1, TM2, etc... : domaines transmembranaires. NBD1 et NBD2: domaines de liaison de l'ATP. N et C : parties N-terminale et C-terminale. (d'après S.G.Aller *et al.*¹⁶)

1.3. Les sites de liaison de la Pgp

1.3.1. Les sites de liaison de l'ATP (Nucleotide-Binding Domains, NBD)

L'activité ATPasique de la Pgp est démontrée depuis 1988¹⁹. Des mutations d'un seul acide aminé sur l'un ou l'autre des deux domaines NBD ou sur les deux domaines en même temps ont montré que pour le fonctionnement de la protéine, ces deux domaines devaient être intacts²⁰. Les domaines NBD des transporteurs ABC chez les différentes espèces vivantes présentent d'importantes homologues. Ils sont constitués de motifs conservés, Walker A et Walker B (qu'on trouve dans la plupart des ATPases¹³ que ces protéines soient des transporteurs membranaires ou non), de boucles D, H, Q et A, et d'une séquence « signature » particulière aux transporteurs ABC, qu'on appelle également le motif C²¹.

Aller *et al.*¹⁶ ont mis en évidence une distance entre les deux domaines NBD de 30 Å environ ; de plus, des études récentes^{22,23} ont proposé un modèle selon lequel la liaison d'une molécule d'ATP sur chacun des deux NBDs induit la formation d'un dimère entre ces deux domaines. La présence d'un cation Mg^{2+} est nécessaire pour cette liaison. Les interactions entre les deux molécules d'ATP et les deux NBD sont schématisées dans la **figure 3**. C'est sous cette forme dimérisée que la Pgp expulserait, vers le milieu extracellulaire, la molécule médicamenteuse initialement retenue dans sa cavité centrale.

Cette figure ne peut pas être diffusée en accès libre.
Merci de consulter la publication d'origine (référence ci-dessous).

Figure 3. Interactions supposées entre les deux molécules d'ATP et les deux domaines NBD dimérisés (d'après Ambudkar *et al.*²¹)

L'hydrolyse de l'ATP serait à l'origine du retour de la Pgp à sa conformation initiale, avec deux domaines NBDs éloignés. En effet, l'hydrolyse de l'ATP en ADP est supposée engendrer des répulsions électrostatiques conduisant à l'éloignement des deux NBDs.

Par conséquent, les deux motifs NBDs seraient le moteur qui induit les changements de conformation nécessaires pour le travail de pompe d'efflux de la Pgp. Ces changements seraient ultérieurement transmis aux parties transmembranaires.

1.3.2. Les autres sites de liaison

A l'heure actuelle, il paraît évident que la Pgp contient plusieurs sites de liaisons, étant donné le nombre important de molécules susceptibles d'être transportées ou de moduler son activité.

Plusieurs études ont déterminé des sites de liaison de médicaments transportés par la Pgp. La méthode la plus utilisée est le photomarquage d'affinité de la protéine par des dérivés photoactivables de la molécule étudiée. Le terme « photoactivable » indique que ces dérivés deviennent chimiquement réactifs par activation par le rayonnement électromagnétique. La forme réactive du dérivé forme alors une liaison covalente avec un acide aminé adjacent au site de la liaison du dérivé sur la protéine.

Cette méthode permet d'une part, de prouver l'existence d'une liaison spécifique entre le dérivé chimique et la protéine (par compétition avec d'autres ligands). D'autre part, le photomarquage d'affinité permet de localiser le site de liaison de la molécule sur la protéine, ceci en effectuant une digestion enzymatique de la protéine pour donner des polypeptides, qui seront analysés (essentiellement par spectrométrie de masse MALDI-TOF) afin de déterminer les fractions qui ont été marquées par le dérivé photoactivable.

Ainsi, l'existence de sites de liaison de la ciclosporine²⁴, de la daunomycine²⁵, du vérapamil²⁶, de la prazosine²⁷ et des alcaloïdes de la Pervenche²⁸ a été mise en évidence.

En se basant sur les résultats de photomarquage d'affinité, ainsi que sur l'étude des conséquences de plusieurs mutations ponctuelles sur l'activité de la Pgp, Shilling *et al.*²⁹ ont proposé un modèle selon lequel les sites de liaison des médicaments sur la Pgp sont concentrés dans la zone des parties TM 5 et 6, et TM 11 et 12.

Ces régions sont riches en acides aminés à chaîne latérale aromatique qui favorisent les interactions de « stacking » avec des cycles aromatiques, et en acides aminés donneurs de liaison hydrogène également caractéristiques des régions riches en sites de liaison.

1.3.3. Le cas du (des) site(s) aux stéroïdes

Les premières études concernant les interactions stéroïdes-Pgp datent de 1988. En partant du fait que les cellules de l'endomètre de l'utérus de la souris gravide surexpriment le gène *mdr1*, Yang *et al.*³⁰ ont supposé que la Pgp pourrait jouer un rôle dans la régulation du transport des hormones sexuelles, sécrétées en abondance pendant la gestation. Les auteurs ont effectué une étude de photomarquage d'affinité pour montrer que certains stéroïdes hydrophobes, en particulier la progestérone, inhibaient le photomarquage de la Pgp par des dérivés photoactivables de certains médicaments (azidopine et vinblastine). Ceci suggérait une liaison de la progestérone sur la Pgp. La progestérone s'est montrée également capable d'inhiber la Pgp et ainsi d'augmenter la sensibilité cellulaire vis-à-vis d'agents anticancéreux. Cette étude a été également la première à évaluer l'interaction des substances endogènes avec la Pgp, confirmant l'hypothèse d'un rôle de la Pgp dans les tissus sains. Ces résultats ont ensuite été confirmés sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines³¹.

En 1992, Ueda *et al.*³² ont étudié le transport de différents stéroïdes par la Pgp. Le principe de l'étude reposait sur l'évaluation du mouvement des stéroïdes étudiés à travers une monocouche de cellules, surexprimant la Pgp sur leur surface apicale et non pas sur leur surface basale. Les substances transportées par la Pgp se retrouvaient alors plus concentrées dans le milieu qui était en contact avec la surface apicale de la monocouche cellulaire. Les auteurs ont pu conclure que, parmi les stéroïdes étudiés, le cortisol, l'aldostérone et la dexaméthasone (**figure 4**) étaient transportés par la Pgp. Étonnamment, la progestérone, quant à elle, ne l'était pas, bien qu'il s'agisse du stéroïde qui avait montré la plus grande activité inhibitrice du transport de la Pgp.

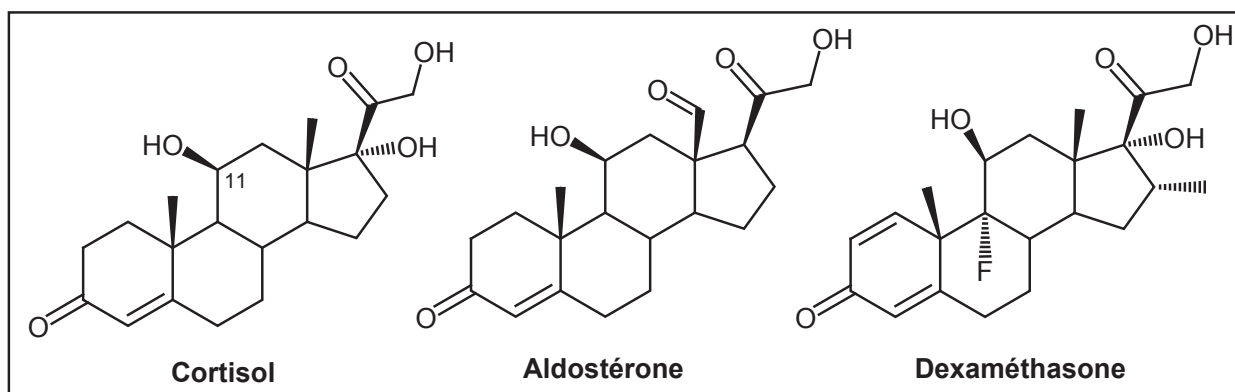


Figure 4. Stéroïdes transportés par la Pgp

Suite à ces résultats, il a été proposé que le transport des stéroïdes dépendait de leur hydrophilie : ainsi, les stéroïdes qui possèdent un caractère hydrophile (en particulier le groupement hydroxyle en position 11) sont transportés (par ex. le cortisol et l'aldostérone), tandis que la progestérone, très hydrophobe, ne l'est pas.

Par la suite, d'autres dérivés de la progestérone, tel que l'acétate de mégestérol³³ et le RU486³⁴ (**figure 5**) se sont avérés des inhibiteurs plus puissants de l'activité de la Pgp que la progestérone.

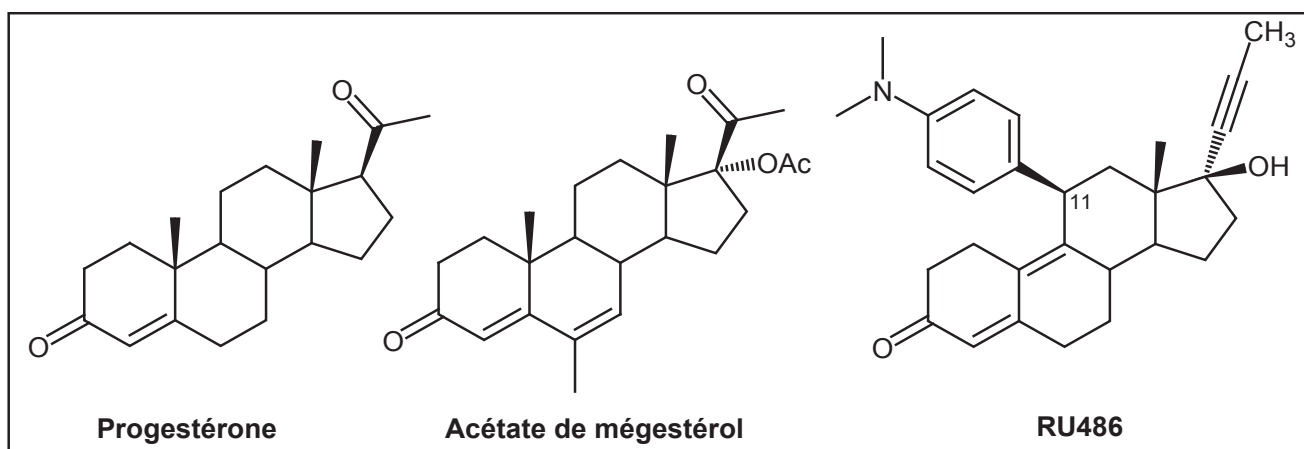


Figure 5. Stéroïdes inhibiteurs de la Pgp

Les premiers éléments concernant le site de liaison de la progestérone sur la Pgp datent de 1997. Dayan *et al.*³⁵ ont exploré un fragment recombinant de la Pgp de souris, appelé le fragment NBD1-étendu, contenant les acides aminés 371-705, qui correspond au domaine cytosolique NBD1. L'évaluation de la liaison de différents ligands a été réalisée par la mesure du « quenching » de la fluorescence intrinsèque du fragment NBD1-étendu, dû à la présence d'un résidu tryptophane en position 696.

Dayan *et al.*³⁵ ont montré que :

- la progestérone, et certains de ses analogues (le RU486 et la $\Delta 6$ -progestérone) qui sont connus pour avoir une activité inhibitrice de la Pgp sans être transportés, se lient sur ce fragment NBD1 cytosolique.

- les stéroïdes transportés par la Pgp, mais qui sont très faiblement inhibiteurs de son activité (tels que le cortisol et la dexaméthasone) ne se lient pas, ou se lient très faiblement, à ce fragment NBD1.

- le site de liaison de la progestérone et du RU486 se trouve à proximité du site de liaison de l'ATP. Ceci a été suggéré d'après une étude de compétition qui a montré que le MANT-ATP (**figure 6**) (analogue de l'ATP contenant un résidu hydrophobe lié au sucre) antagonise la liaison du RU486 sur son site. Par contre, la présence d'ATP n'influe pas la liaison des stéroïdes à leur site. Ceci montre que les sites à ATP et aux stéroïdes, même s'ils sont proches, ne se chevauchent pas.

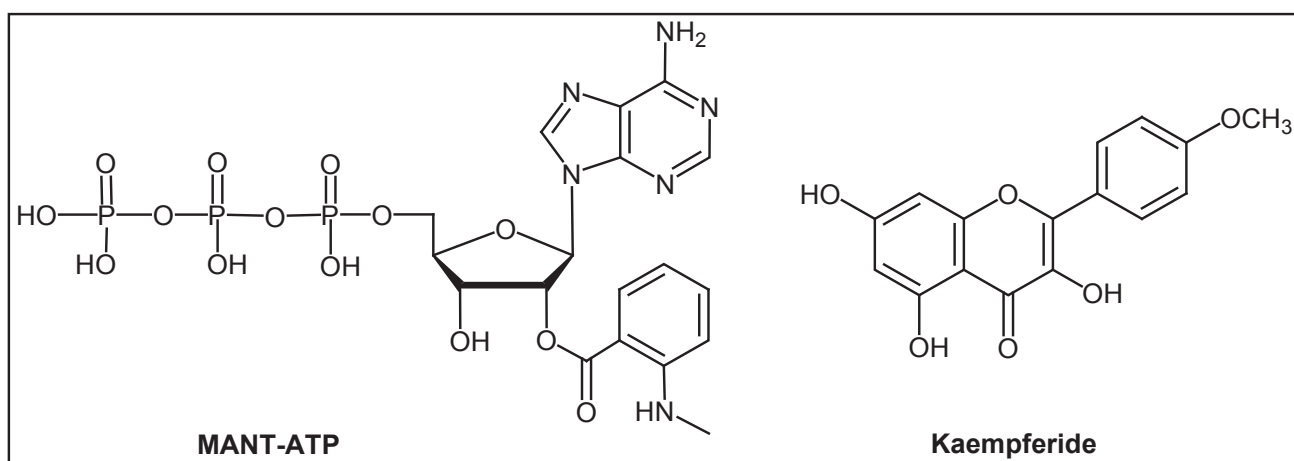


Figure 6.

Des résultats ultérieurs de la même équipe sont venus appuyer l'hypothèse de la proximité des deux sites de liaison³⁶. Cette fois, les auteurs ont exploré, selon la même méthode d'évaluation, un fragment cytosolique NBD2 recombinant, qui a montré les mêmes affinités que le fragment NBD1 vis-à-vis des stéroïdes, de l'ATP et du MANT-ATP.

Cette étude a montré que certains flavonoïdes, tels que le kaempferide (**figure 6**), empêchent simultanément la liaison, sur le NBD2, de l'ATP et des stéroïdes inhibiteurs comme le RU486. Ceci suggère fortement que les deux sites de liaison sont proches l'un de l'autre. C'est dans ce cadre-là, qu'une étude³⁷ a été menée au sein de notre équipe INSERM U863, dans le but de mettre en évidence le site de liaison de la progestérone sur la Pgp. Un photomarquage d'affinité a été réalisé par le biais de six dérivés de la progestérone,

porteurs d'un groupement photoactivable de type azoture d'aryle, en position 3, 7 ou 11 (**figure 7**). Après irradiation et digestion trypsique de la Pgp, les peptides marqués ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF, avec ou sans immunopurification préalable des peptides à l'aide d'anticorps anti-stéroïdes.

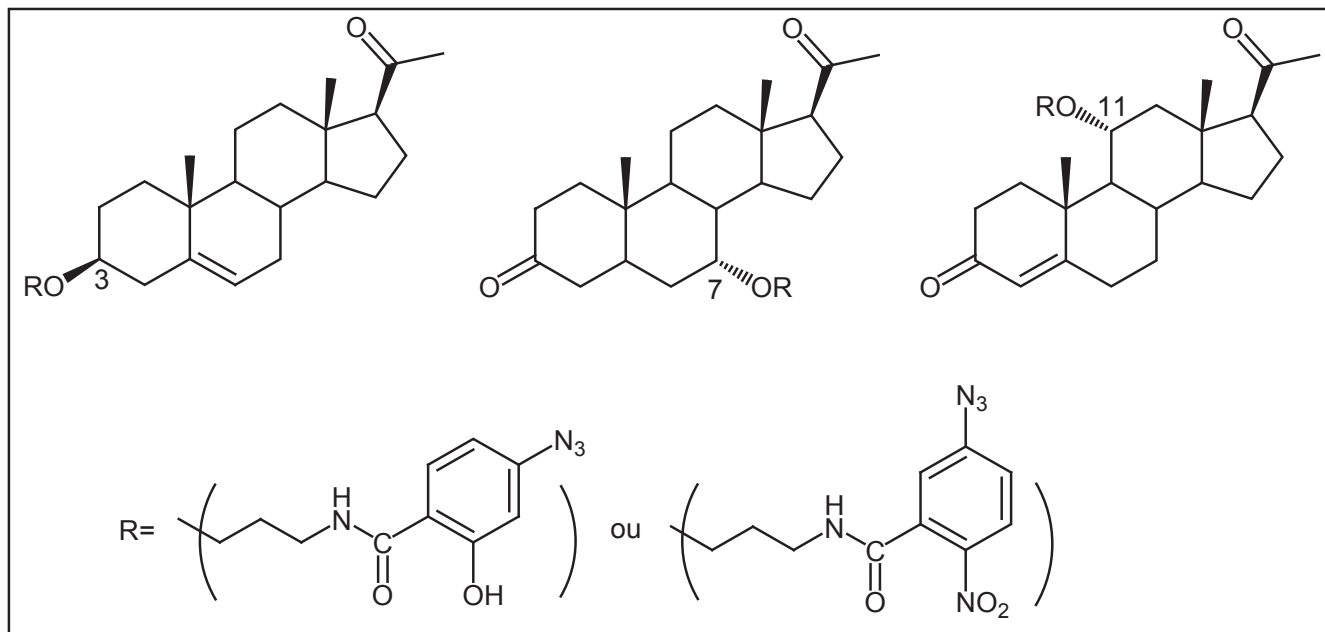
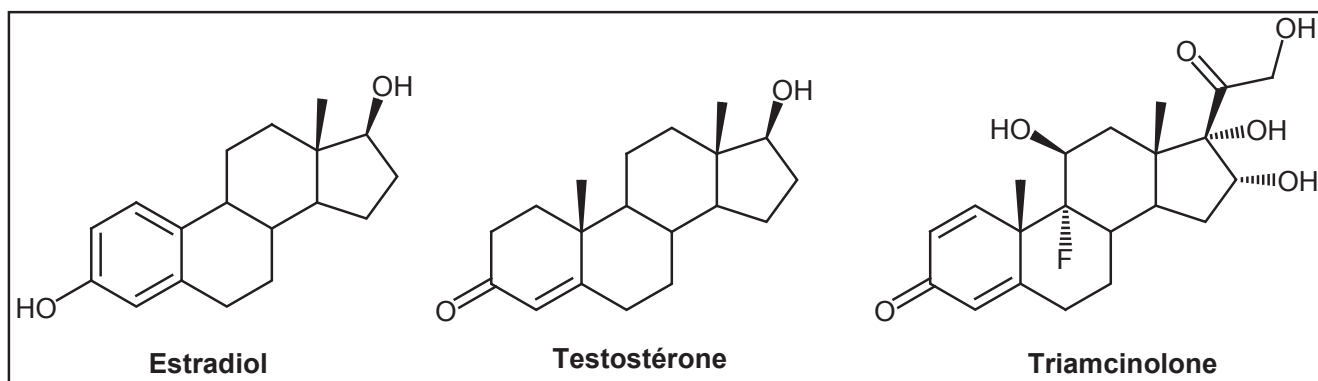


Figure 7.

Après confirmation préalable que ces marqueurs dérivés de la progestérone entrent bien en compétition avec cette dernière dans sa liaison sur la Pgp, l'étude a mis en évidence deux régions photomarquées : l'extrémité C-terminale du domaine NBD1 à proximité du segment transmembranaire TM7 (peptides 682 à 702), et la boucle intra-cytoplasmique comprise entre les segments transmembranaires TM8 et TM9 (peptides 799 à 808) (*cf. figure 1*).

Ces résultats confortent l'hypothèse d'une proximité entre les sites de l'ATP et de la progestérone, étant donné que des peptides photomarqués semblent proches du domaine NBD sur la structure primaire de la protéine. Néanmoins, des études de modélisation tridimensionnelle sont nécessaires pour pouvoir confirmer cette proximité dans l'espace.

Très récemment, Mares-Samano *et al.*³⁸ ont publié une étude *in silico* des interactions de différentes hormones stéroïdiennes (progestérone, estradiol, testostérone, cortisol) et de corticoïdes de synthèse (dexaméthasone, triamcinolone) (**figure 8**) avec le domaine NBD2 de la Pgp, bâti par homologie de séquence avec des transporteurs ABC bactériens dont la structure cristalline est connue (cette étude est antérieure à la publication de la structure cristalline de la Pgp de souris par Aller *et al.*¹⁶).

**Figure 8.**

Cette étude prédit le rôle de la séquence « P-loop » du NBD de la Pgp dans la liaison des stéroïdes. La séquence « P-loop », connue également sous le nom de séquence Walker A, fait partie du site liant l'ATP au niveau des groupements phosphates par l'intermédiaire de liaison hydrogène avec Gly 1073, Cys 1074, Gly 1075, Ser 1077 et Thr 1078. Le noyau adénine interagit, quant à lui, avec Tyr 1044. Le site liant les stéroïdes serait voisin de l'ATP, les deux sites pouvant comporter des régions communes. Les cycles A et B des stéroïdes donneraient lieu à des interactions hydrophobes avec Gly 1073, Gly 1075, Ser 1077 et Tyr 1044, de même que les cycles C et D avec Ile 1050 et Val 1052 (**figure 9**).

Cette figure ne peut pas être diffusée en accès libre.

Merci de consulter la publication d'origine (référence ci-dessous).

Figure 9. D'après Mares-Samano *et al.*³⁸ : modèle 3D du NBD2 de la Pgp.

a) progestérone (violet), dexaméthasone (gris), testostérone (vert clair), œstradiol (rose), corticostérone (bleu clair) ; **b)** cortisol (bleu clair), dihydrotestostérone (orange), lanostérol (marron), pregnanedione (vert), triamcinolone (bleu foncé). En rouge : ATP.

En résumé, plusieurs éléments sont en faveur de l'existence, sur le domaine cytosolique de la Pgp, d'un site de liaison des stéroïdes. L'affinité des stéroïdes vis-à-vis de ce site semble proportionnelle à leur hydrophobie, et ce sont les stéroïdes les moins bien transportés par la

Pgp qui ont la plus grande affinité pour ce site. Le site serait proche du site de liaison de l'ATP, et aurait un effet inhibiteur de l'action de la Pgp.

A l'heure actuelle, la présence d'autres sites de liaison des stéroïdes ne peut pas être exclue. Des recherches³⁹ ont mis en évidence un photomarquage d'affinité de la Pgp par des stéroïdes transportés, sans déterminer de site de liaison. D'autres études, basées sur des mutations ponctuelles de la Pgp⁴⁰, ont suggéré la présence d'un site aux stéroïdes dans le domaine transmembranaire de la protéine.

1.4. Mécanisme d'action de la Pgp

Vraisemblablement, la Pgp capte la molécule médicamenteuse depuis le feuillet cytoplasmique de la membrane cellulaire. Cette hypothèse a été suggérée par deux études^{17,18} menées sur deux molécules différentes transportées par la Pgp : le LDS-751 et le Hoechst 33342 (*figure 10*).

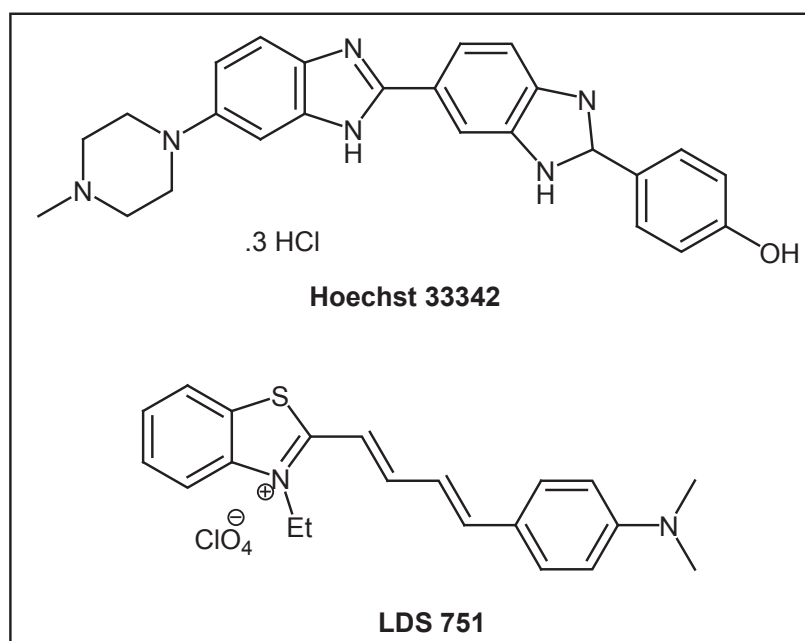


Figure 10.

Ces deux molécules ont la particularité d'être fluorescentes uniquement dans un environnement lipidique (par exemple la membrane cytoplasmique) et non en milieu aqueux. Ces deux composés ont montré une vitesse de diffusion entre les deux feuillets de la membrane beaucoup plus faible que leur vitesse de transport par la Pgp.

Dans cette expérience, les chercheurs utilisaient des vésicules à membranes inversées. La molécule fluorescente injectée dans le milieu se concentre dans le feuillet cytoplasmique

(qui est vers l'extérieur) avant de diffuser lentement vers le feuillet extracellulaire. Après un délai déterminé (T), le transport par la Pgp est initié en ajoutant de l'ATP dans le milieu.

La mesure de la vitesse initiale du transport (proportionnelle à la diminution de la fluorescence de la molécule qui est expulsée en milieu aqueux) est calculée pour des délais T variables. Ceci a montré que la vitesse initiale diminue avec l'augmentation du délai T. Ce profil est en faveur d'un transport à partir du feuillet cytoplasmique de la membrane (**figure 11**). En effet, la concentration dans ce feuillet diminue avec le temps à cause de la diffusion vers le feuillet externe. Si le transport se faisait à partir du feuillet extracellulaire, la vitesse initiale augmenterait avec l'augmentation du délai T, car la concentration dans le feuillet extracellulaire augmente, par diffusion, avec l'augmentation du délai T.

Par ailleurs, la présence d'un « portail » d'entrée à la cavité centrale de la Pgp, à partir du feuillet cytoplasmique de la membrane, a été confirmée par la structure tridimensionnelle de la protéine (cf. § 1.2. de ce chapitre).

Cette figure ne peut pas être diffusée en accès libre.
Merci de consulter la publication d'origine (référence ci-dessous).

Figure 11. Transport des substrats de la Pgp à partir du feuillet cytoplasmique de la membrane (vésicule à membrane inversée). Les losanges noirs symbolisent les molécules transportées (d'après Shapiro *et al.*¹⁷).

Récemment, Sauna *et al.*⁴¹ ont publié une revue des connaissances actuelles concernant le cycle de transport de la Pgp. Les points essentiels sont résumés dans ce qui suit :

- Il n'est pas encore mis en évidence si la liaison du substrat avec la Pgp est antérieure ou postérieure à la liaison de l'ATP sur ses sites. Mais il apparaît que la liaison d'un substrat ne change pas l'affinité de l'ATP pour la Pgp, elle augmente juste sa vitesse d'hydrolyse.

- La liaison de deux molécules d'ATP sur les deux NBDs induit la dimérisation de ces deux domaines. Chaque molécule d'ATP sera liée d'un côté aux motifs Walker A et B, la boucle Q et la boucle H du premier NBD, et de l'autre côté à la boucle D et à la séquence de signature (motif C) sur l'autre NBD.

- La Pgp, présentant des NBDs dimérisés, a moins d'affinité pour le substrat que la Pgp dont les NBDs sont séparés. Ceci explique la libération du substrat après liaison des deux molécules d'ATP. Par contre, les changements de conformation conduisant à cette baisse d'affinité ne sont pas encore élucidés (**figure 12**).

- L'hydrolyse de l'ATP en ADP déstabilise le dimère de NBDs, très probablement à cause de répulsions électrostatiques. Ceci contribue à restaurer la Pgp à son état initial, de nouveau prête à accueillir une nouvelle molécule de médicament.

Par contre, deux points restent à clarifier :

- L'événement qui déclenche l'hydrolyse de l'ATP.
- La libération des deux molécules d'ADP est-elle suffisante pour restaurer la Pgp à son état initial ou bien s'agit-il d'un processus multifactoriel ?

Cette figure ne peut pas être diffusée en accès libre.
Merci de consulter la publication d'origine (référence ci-dessous).

Figure 12. Représentation schématique du mécanisme d'action de la Pgp (d'après S.G.Aller *et al.*¹⁶)

A. Le médicament, coloré en rouge, est capté à partir du feuillet interne de la membrane cytoplasmique, il est lié à un site dans la cavité centrale de la Pgp. Deux molécules d'ATP (en jaune) se lient sur les deux NBDs.

B. La liaison des deux molécules d'ATP induit la dimérisation des NBDs et l'expulsion du médicament. L'hydrolyse de l'ATP (non-représentée) est suivie par la restauration de la Pgp à son état initial.

1.5. Rôle de la Pgp dans les tissus sains

- Dans les poumons : La Pgp est exprimée dans la surface apicale des bronches et des bronchioles, et sur la membrane des macrophages alvéolaires. Elle participerait à l'élimination des toxines inhalées⁴².
- Dans l'appareil digestif : La Pgp est rencontrée tout au long du tube digestif, sur la surface apicale des cellules épithéliales. Elle joue un rôle dans la protection de l'organisme contre différentes toxines, comme les pesticides⁴³ et module l'absorption des médicaments^{44,45}. Elle participerait également à la protection du tractus digestif contre les inflammations et les toxines bactériennes⁴⁶.
- Dans le foie : La Pgp fait partie d'un grand arsenal de transporteurs de la famille des ABC, rencontrés dans le foie^{47,48}. Elle est exprimée sur la surface apicale des hépatocytes, et participe à la détoxification de l'organisme en expulsant les xénobiotiques dans les canalicules biliaires^{49,50}.
- Dans les reins : La Pgp est trouvée sur la surface apicale des cellules épithéliales des tubules proximales¹¹. Elle est supposée participer à l'excrétion de molécules peu hydrophiles⁵¹.
- Dans la barrière hémato-encéphalique : La Pgp est exprimée sur la surface luminale des cellules de l'endothélium capillaire du système nerveux. Le rôle de la Pgp dans la protection du système nerveux central contre les xénobiotiques (en particulier les médicaments) a été très étudié⁵². Par ailleurs, des expériences ont montré l'effet délétère de l'absence de la Pgp chez des souris mutées, qui devenaient beaucoup plus sensibles aux agents neurotoxiques que les animaux normaux. Cette toxicité touchait autant le système nerveux central que le périphérique^{53,54}. Les recherches actuelles mettent en évidence l'influence de la Pgp dans l'échec du traitement chez certains épileptiques, en empêchant les antiépileptiques d'accéder au système nerveux⁵⁵.
- Dans le placenta : La Pgp est exprimée à la surface des cellules du syncytiotrophoblaste, du côté du sang maternel⁵⁶, où elle participe à la protection du fœtus contre les agressions des xénobiotiques. En effet, les fœtus d'animaux mutés dépourvus de Pgp ont montré une sensibilité anormalement élevée aux xénobiotiques^{57,58}.

1.6. La Pgp et la multichimiorésistance en clinique

1.6.1. Les méthodes de détection

Il existe plusieurs méthodes de détection de l'expression de la Pgp en clinique⁵⁹ :

- La détection de l'ARNm correspondant au gène *mdr1*, par amplification par RT-PCR (Reverse Transcription, Polymerase Chain Reaction), qui est la méthode de référence.
- La détection de l'expression de la protéine par immunohistochimie : à l'heure actuelle, plusieurs anticorps monoclonaux sont disponibles pour la détection de la Pgp, sur coupes tissulaires fixées. Cette méthode est moins quantitative que la précédente, mais offre une meilleure vue de la distribution tissulaire de la protéine.
- L'imagerie *in vivo*, qui est une méthode non-invasive permettant d'étudier, non pas uniquement la distribution tissulaire de la Pgp, mais également son état fonctionnel. Le marqueur le plus utilisé à l'heure actuelle est le ^{99m}Tc-sestamibi, un complexe organométallique comportant un atome de technétium radioactif⁶⁰ (**figure 13**). Ce complexe est transporté par la Pgp, et sa concentration intracellulaire diminue dans les cellules multichimiorésistantes. Après injection d'une dose de ce traceur, les techniques de tomographie par émission de photon permettent d'avoir une image radiographique de l'accumulation du traceur dans les tissus, qui est inversement proportionnelle à l'expression de la Pgp dans ces tissus.

Cette figure ne peut pas être diffusée en accès libre.

Merci de consulter la publication d'origine (référence ci-dessous).

Figure 13. D'après Luker *et al.*⁶¹ : image radiographique de l'accumulation du ^{99m}Tc-sestamibi, sans inhibiteur de la Pgp (à gauche), et avec inhibiteur (le valspodar ou PSC833, à droite).

- La cytométrie en flux, technique particulièrement utilisée dans le cas des hémopathies malignes, beaucoup moins dans les tumeurs solides. La Pgp est détectée au moyen d'anticorps couplés à un fluorochrome. La quantification est

ensuite réalisée par comptage des cellules fluorescentes à l'aide d'un cytomètre en flux.

1.6.2. Les implications cliniques de la multichimiorésistance

Même s'il est admis à l'heure actuelle que la surexpression de la Pgp et/ou des autres transporteurs de la famille des ABC confère aux cellules *in vitro* une multichimiorésistance, le rôle que jouent ces transporteurs dans la mauvaise réponse des cancers résistants est loin d'être compris en clinique. L'effet de l'inhibition de ces transporteurs dans l'amélioration du rendement des traitements anticancéreux reste également à confirmer.

La Pgp est rencontrée dans plusieurs hémopathies malignes. On estime que le tiers des malades souffrant de leucémie myéloïde aigüe (LMA) présente une surexpression de la Pgp au moment du diagnostic de la maladie, mais cette proportion dépasse la moitié des malades en rechute. Le niveau d'expression de la Pgp augmente avec l'âge du patient, et constitue un facteur de mauvais pronostic dans la LMA du patient adulte^{62,63,64,65}.

Dans les autres hémopathies malignes, le rôle de la Pgp est moins évident. Toutefois, les autres transporteurs de la famille des ABC, comme MRP1 et LRP (Lung Resistance-related Protein), joueraient un rôle dans la multichimiorésistance des leucémies lymphoïdes chroniques⁶⁶.

Le cas de la multichimiorésistance des tumeurs solides est souvent considéré comme plus difficile à étudier. Ceci est dû aux contraintes techniques liées à la collecte des échantillons, à leurs traitements, et puis aux méthodes d'évaluation de l'expression de la Pgp qui ne font pas consensus.

Une difficulté supplémentaire vient du fait que la Pgp est abondamment exprimée dans certains tissus sains (rein, colon, foie et glandes corticosurrénales), ce qui rend l'évaluation de son rôle dans les pathologies malignes de ces tissus encore plus difficile. La Pgp ne semble pas être un facteur déterminant dans la multichimiorésistance de ces tissus, qui s'étend à des médicaments non-transportés par cette protéine.

C'est dans les tumeurs des tissus qui n'expriment la Pgp qu'après traitement, que cette dernière semble jouer un rôle certain dans le phénomène de la multichimiorésistance. Dans le cancer du sein, il est estimé que 40% des malades surexpriment la Pgp, et il existerait une

corrélation avec une mauvaise réponse au traitement⁶⁷. La Pgp semble également jouer un rôle dans la multichimiorésistance des sarcomes^{68,69}.

1.7. Les inhibiteurs de la Pgp

Leonard *et al.*⁷⁰, Szakacs *et al.*⁷¹ et Colabufo *et al.*⁷² décrivent les différents inhibiteurs connus de la Pgp et leur développement en clinique, dans des revues datant respectivement de 2003, 2006 et 2010.

1.7.1. Les structures

Le premier inhibiteur connu de la Pgp est le vérapamil. Son pouvoir inhibiteur a été découvert d'une manière fortuite en 1981⁷³. Les auteurs étudiaient l'effet de plusieurs substances sur la restauration de la sensibilité des cellules résistantes aux alcaloïdes cytotoxiques de la Pervenche (la vincristine et la vinblastine). Le choix du vérapamil était basé sur sa capacité à interagir avec des protéines de transport membranaire, en particulier celles des ions Ca^{2+} . Le vérapamil s'est révélé efficace en co-administration avec les alcaloïdes anticancéreux, mais l'identification de la Pgp comme cible n'a été faite qu'en 1987⁷⁴ en montrant que le vérapamil inhibe le photomarquage d'affinité de la Pgp par la vinblastine.

Durant les années 80, plusieurs autres molécules bioactives ont été identifiées comme inhibiteurs du transport de la Pgp : la quinidine, la quinine, le tamoxifène, la réserpine, la ciclosporine A, la progestérone, etc. (**figure 14**).

Ces inhibiteurs, connus sous le nom d'inhibiteurs de première génération, ont en commun le fait d'être des molécules médicamenteuses, toxiques à partir d'une certaine concentration. Ainsi, les premiers essais cliniques sur l'homme ont révélé la difficulté d'atteindre des concentrations plasmatiques suffisantes en inhibiteur, tout en évitant ses effets toxiques^{75,76}.

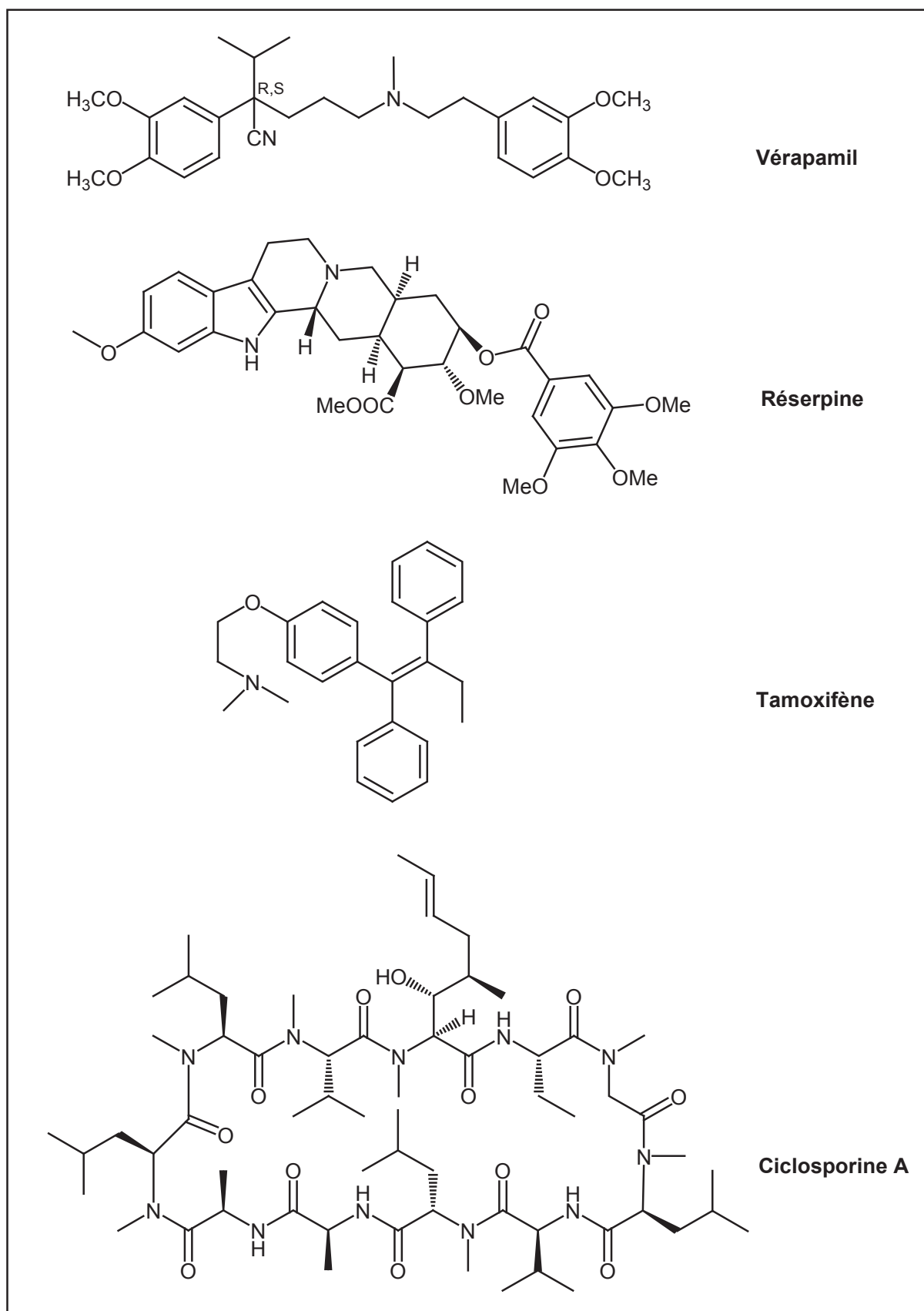


Figure 14. Quelques inhibiteurs de Pgp de première génération.

Les inhibiteurs de deuxième génération sont dérivés des précédents, conçus dans le but de diminuer leur toxicité et d'augmenter leur affinité pour la Pgp (**figure 15**). Ainsi, le valspodar, un analogue de la cyclosporine A synthétisé en 1988⁷⁷ et sans activité immunosuppressive, a montré une activité inhibitrice de la Pgp beaucoup plus intéressante que la cyclosporine⁷⁸.

Par ailleurs, des inhibiteurs de la Pgp de type analogues de reversin 121⁷⁹ ont été récemment développés par notre équipe⁸⁰.

D'autres molécules ayant une structure dérivée ou inspirée des inhibiteurs de première génération ont été synthétisées, citons : le S9788⁸¹, le biricodar (issu d'une famille d'immunosuppresseurs)⁸², et des dérivés de type aminoesters (apparentés au vérapamil, cf. chapitre 3, § 3).

Des études cliniques ont été menées sur le valspodar, le biricodar et le S9788 (pour une revue, réf.^{83,84}). Ces molécules ont montré une toxicité moins importante que celle des inhibiteurs de première génération, et leur concentration plasmatique thérapeutique était accessible. Néanmoins, des interactions pharmacocinétiques avec les anticancéreux ont limité leur intérêt thérapeutique. Ces interactions sont dues, en partie, à l'inhibition du métabolisme des anticancéreux par les modulateurs de la Pgp, ce qui entraîne une augmentation non prévisible de la toxicité systémique de l'anticancéreux. Afin de limiter cette toxicité, une diminution de la dose de l'anticancéreux s'est donc avérée nécessaire avec le valspodar⁸⁵ et le biricodar⁸⁶, ce qui a entraîné une diminution de l'efficacité du traitement.

En effet, en plus d'inhiber la Pgp, ces molécules inhibent le cytochrome P450⁸⁷, une enzyme très impliquée dans le métabolisme des médicaments, et qui a effectivement montré un profil d'affinité, vis-à-vis des ligands chimiques, assez proche de celui de la Pgp⁸⁸. Cette action inhibitrice contribue à augmenter la concentration sérique des anticancéreux et à prolonger leur demi-vie, augmentant ainsi leur toxicité.

D'autres phénomènes peuvent jouer un rôle dans ces interactions pharmacocinétiques, notamment au niveau de l'inhibition de l'excrétion rénale des anticancéreux et de leurs métabolites. Ceci serait dû à la faible spécificité de ces inhibiteurs, car ils sont également capables d'inhiber d'autres transporteurs ABC.

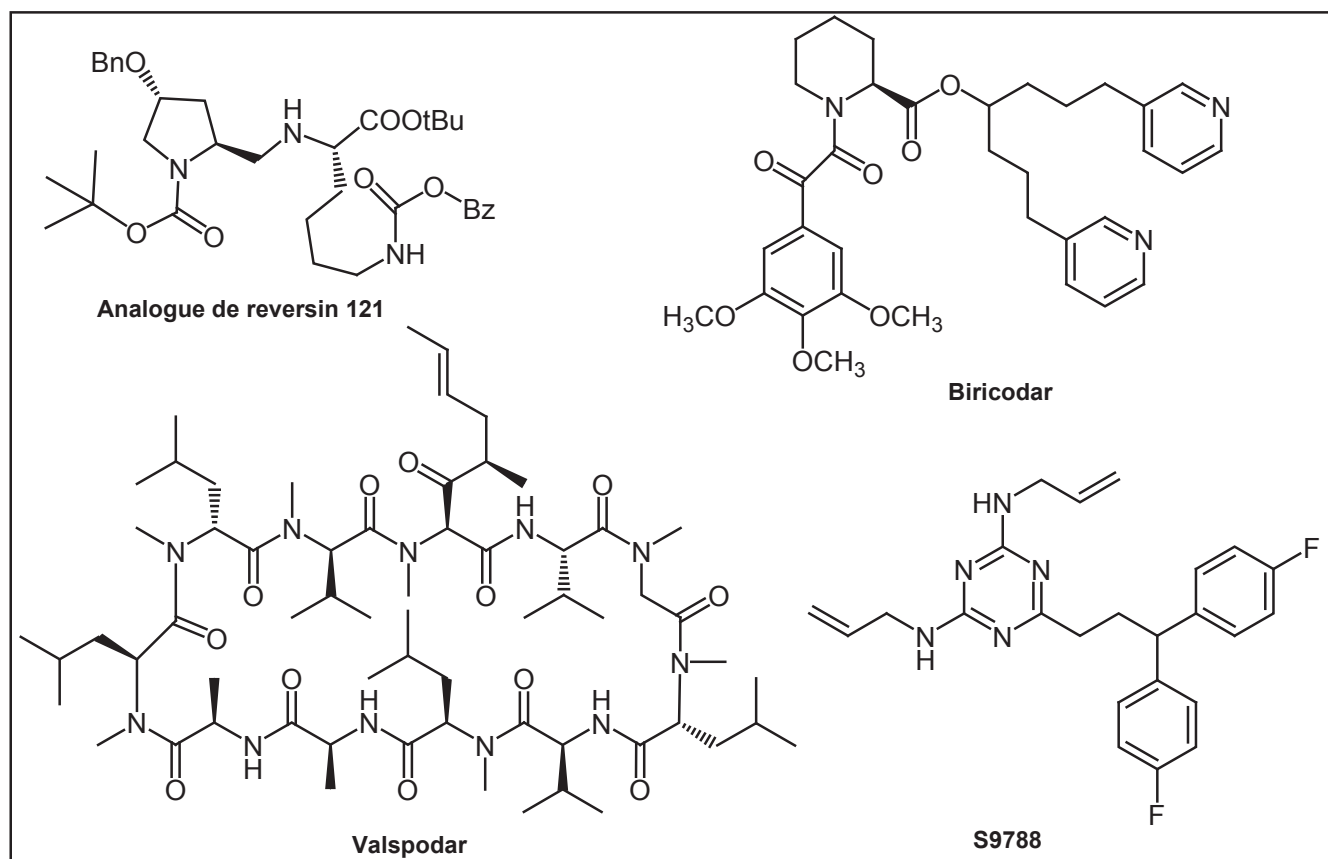


Figure 15. Quelques inhibiteurs de Pgp de deuxième génération.

La synthèse d'inhibiteurs de troisième génération a été entreprise en utilisant les méthodes de la chimie combinatoire et d'études de relation structure-activité. Plusieurs molécules ont vu le jour, entre autres : le zosuquidar⁸⁹ (LY335979), le OC144-093⁹⁰ et le tariquidar⁹¹ (XR9576) (**figure 16**). Elles possèdent une activité inhibitrice *in vitro* de l'ordre du nM, contrairement aux inhibiteurs de deuxième génération qui nécessitent une concentration de l'ordre du μM .

Ces molécules ont montré beaucoup moins d'interactions pharmacocinétiques avec d'autres principes actifs ; de plus, elles n'interagissent pas avec le cytochrome P450 aux concentrations requises pour inhiber la Pgp^{90,92,93}. De ce fait, la réduction de la dose en agent anticancéreux n'est pas nécessaire.

Les études en phase I, II ou III de ces inhibiteurs sont toujours en cours, mais les résultats cliniques sont, malheureusement, souvent décevants. Ainsi, une étude en phase III regroupant 304 patients, sur le tariquidar dans le traitement du cancer du poumon en association avec le paclitaxel ou la vinorelbine, a été interrompue en 2003 à cause d'une

importante toxicité⁹⁴. Depuis, aucune autre étude de cette ampleur n'a été menée sur ce modulateur, à notre connaissance. Le zosuquidar a été également évalué dans le cancer du sein en coadministration avec la paclitaxel. Une augmentation de l'hématotoxicité de l'anticancéreux a été observé, et aucune amélioration au niveau de la réponse au traitement n'a été observée⁹⁵.

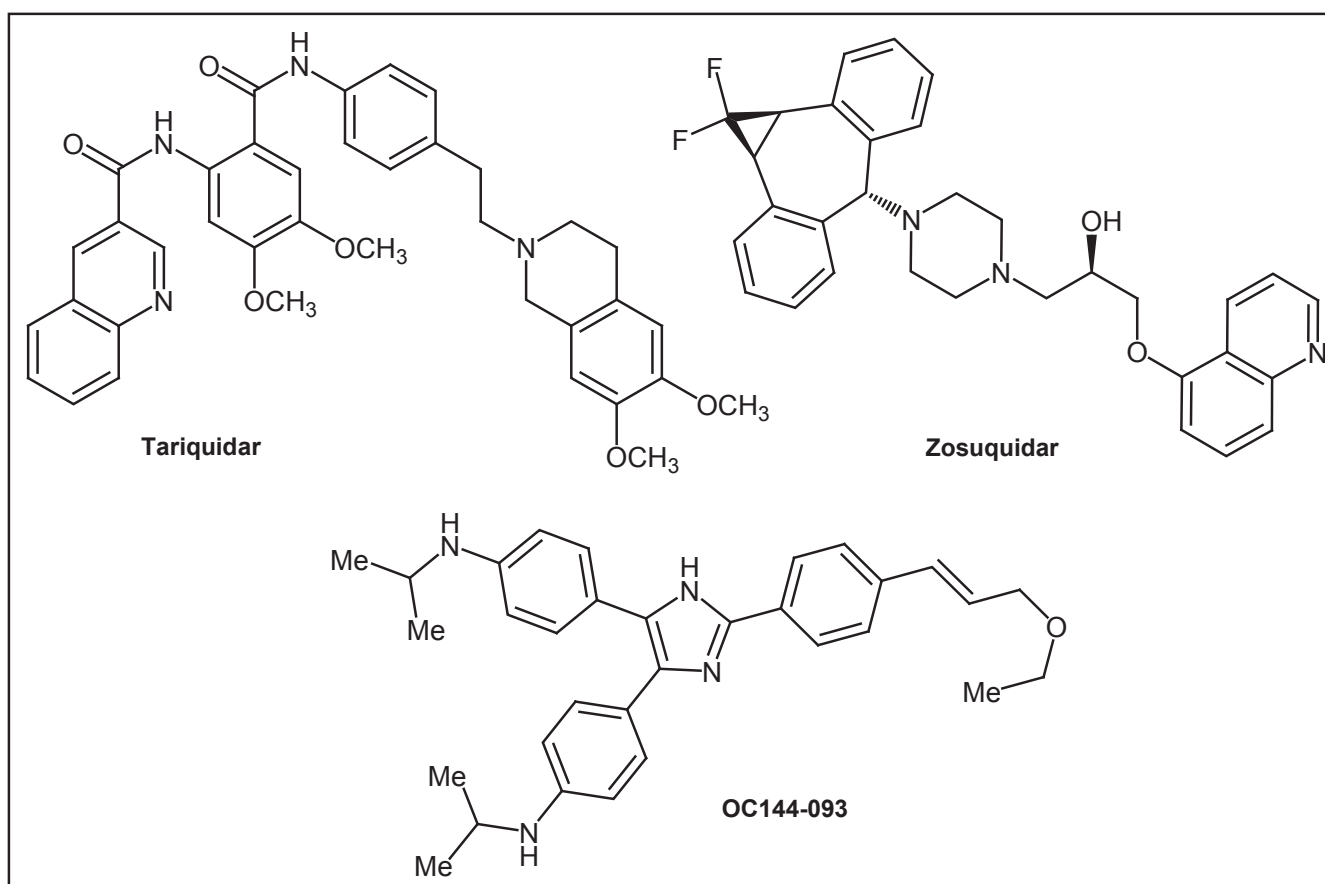


Figure 16. Quelques inhibiteurs de Pgp de troisième génération.

1.7.2. Mécanismes d'action

La plupart des inhibiteurs de la Pgp sont des inhibiteurs compétitifs, ils entrent donc en compétition avec les médicaments transportés sur leur site de liaison. Certains de ces inhibiteurs sont eux-mêmes transportés par la Pgp, comme le vérapamil⁹⁶ et la ciclosporine^{97,98}, mais d'autres ne le sont pas, comme le valspodar⁹⁹ et le zosuquidar¹⁰⁰.

Par contre, le tariquidar bloque le transport de la vinblastine et du paclitaxel d'une manière non-compétitive¹⁰¹, ce qui suggère une liaison à la protéine sur un site différent des sites de liaison de ces médicaments.

1.7.3. Perspectives

A l'heure actuelle, aucune des molécules inhibitrices de la Pgp n'a dépassé le stade des études cliniques. Les échecs de ces molécules sont généralement imputés à leur manque de spécificité vis-à-vis de la Pgp, et/ou aux interactions pharmacocinétiques qu'elles peuvent montrer avec d'autres principes actifs.

D'autres stratégies ont été évaluées pour inhiber la Pgp :

- Des anticorps dirigés contre les fragments extracellulaires de la Pgp ont montré une activité inhibitrice *in vitro* par augmentation de l'accumulation intracellulaire de médicaments transportés par la Pgp¹⁰². Une autre étude a évalué l'immunisation de la souris par des fragments peptidiques synthétiques correspondant aux boucles extracellulaires 1,2 et 4 de la Pgp. Les animaux préalablement immunisés ont alors montré une moindre chimiorésistance et un taux de survie plus important¹⁰³.
- Des peptides synthétiques analogues aux fragments transmembranaires de la Pgp ont montré un important pouvoir inhibiteur, et une faible toxicité. Le mécanisme d'action supposé pour ce type d'agents thérapeutiques serait une interférence stérique spécifique lors du repliement de la protéine empêchant son fonctionnement¹⁰⁴.
- Plusieurs études ont montré que l'encapsulation d'agents anticancéreux améliorait leur accumulation intracellulaire. Ainsi, l'administration de la doxorubicine encapsulée dans des liposomes PEGylés, associée au valspodar comme inhibiteur de la Pgp, améliore la réponse au traitement *in vivo* chez des souris xénogreffées avec des tumeurs multichimiorésistantes¹⁰⁵. Une étude plus récente a montré que l'utilisation de liposomes couplés à la transferrine (qui permet aux liposomes de cibler les cellules tumorales surexprimant, en général, le récepteur de la transferrine) permet d'améliorer significativement l'accumulation de la doxorubicine dans les cellules résistantes, *in vitro*¹⁰⁶.

2. Le transporteur CpABC3

Le *Cryptosporidium parvum* est un parasite unicellulaire de l'homme et des animaux, de l'embranchement des Apicomplexa. C'est un parasite à développement intracellulaire, qui colonise les cellules épithéliales des intestins. Il provoque la cryptosporidiose, caractérisée par des diarrhées et des gastroentérites généralement anodines. Toutefois, chez l'enfant en bas âge, et surtout chez l'individu immunodéprimé, l'infection peut se développer et devenir grave, voire mortelle¹⁰⁷. La contamination est féco-orale, à partir d'eau et de nourriture contenant les oocystes du parasite (stade extracellulaire du parasite pouvant rester viable plusieurs mois). La contamination des réservoirs d'eau potable peut conduire à des épidémies, et à des diarrhées néo-natales graves chez les ruminants.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace contre *C.parvum*¹⁰⁸. En effet, de nombreux antimicrobiens et antiparasitaires se sont révélés inefficaces pour traiter la cryptosporidiose. Cependant, certains antibiotiques permettent de diminuer la charge parasitaire (paromomycine, clarithromycine, nitazoxanide)¹⁰⁹ (**figure 17**).

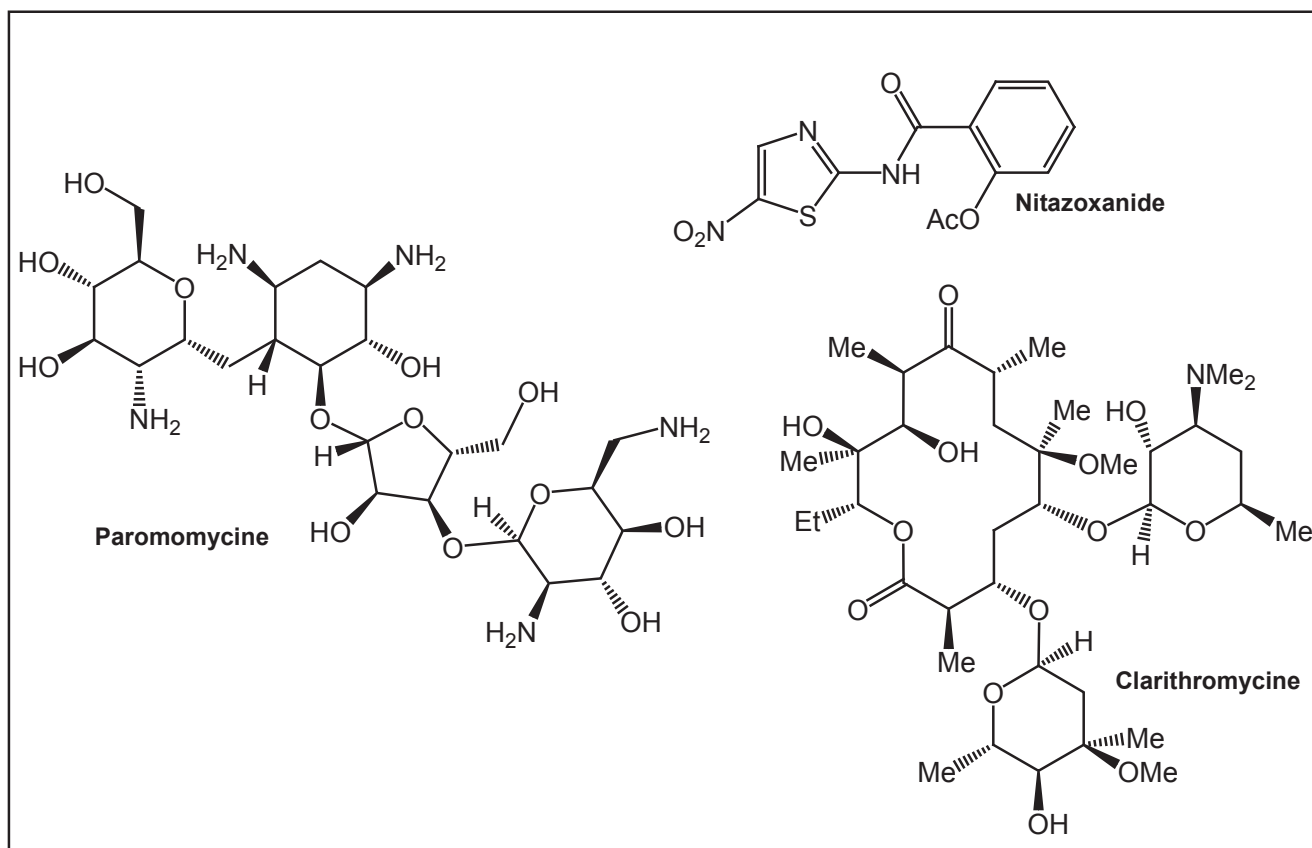


Figure 17. Antibiotiques utilisés pour le traitement de la cryptosporidiose

Des protéines de transport de la famille ABC ont été retrouvées chez plusieurs protozoaires (*Plasmodium*, *Leishmania*, Trypanosomes, *Entamoeba*, *Trichomonas*, *Cryptosporidium*). On suspecte l'implication de certaines d'entre elles dans la résistance des parasites à divers traitements : chez *Plasmodium falciparum* et *Leishmania* entre autres.

Chez *C. parvum*^{110,111}, deux protéines de transport ABC ont été étudiées, CpABC1 et 2, analogues des transporteurs MRP chez l'homme, ainsi que le gène d'une troisième CpABC3, apparentée à la glycoprotéine-P :

- CpABC1, localisée dans les sporozoïtes et les stades intracellulaires, supposée jouer un rôle dans les interactions métaboliques entre hôte et parasite ;
- CpABC2, localisée dans la pointe apicale des sporozoïtes, non détectée dans les stades intracellulaires, supposée jouer un rôle dans l'invasion et/ou les premiers stades du trophozoïte ;
- **CpABC3** (gene accession number AF315509), protéine d'environ 1394 acides aminés, non détectée jusqu'à présent dans les sporozoïtes mais exprimée dans les stades intracellulaires. Ce transporteur est constitué, à l'instar de la Pgp, de deux domaines transmembranaires TMD1 et TMD2, et de deux domaines cytosoliques, liant l'ATP, NBD1 et NBD2¹¹².

L'ADN génomique de ce pathogène a été utilisé pour l'amplification de la séquence voulue de CpABC3. Ce travail a été réalisé par le Dr Philippe LAWTON du laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Lyon. La séquence a été exprimée chez *E. coli* sous forme d'une protéine recombinante marquée par une séquence hexahistidine N-terminale. Le fragment H6-NBD1 comprend le site catalytique pour l'ATP appelé NBD1 (Nucleotide-Binding Domain 1) de la CpABC3, soit 198 AA. Il a été montré qu'il était pleinement fonctionnel vis-à-vis des ligands décrits pour ce type de fragment : 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophényl)adénosine 5'-triphosphate (TNP-ATP), quercétine, progestérone¹¹³. Les constantes cinétiques pour les trois substrats ATP, ADP et AMP ont été déterminées, ainsi que la constante d'inhibition K_i pour le TNP-ATP. Les tests d'inhibition de fluorescence, combinés à la détermination de l'activité ATPasique, peuvent indiquer si une molécule se lie au site catalytique, à proximité, ou sur une autre partie du H6-NBD1. Ce fragment recombinant peut donc constituer un modèle valable pour évaluer l'effet inhibiteur de

ligands potentiels du site à ATP présent notamment chez les transporteurs ABC humains, en particulier la Pgp.

CHAPITRE 2

Conception et synthèse de dérivés

d'imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-one

Dans le cadre de notre recherche concernant les inhibiteurs potentiels des transporteurs membranaires de la famille des ABC, nous nous sommes intéressés à des structures de type imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-ones qui peuvent être considérées comme des analogues d'adénine (**figure 18**).

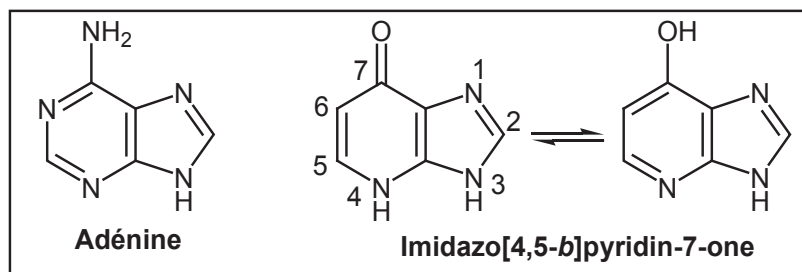


Figure 18

Ces composés sont susceptibles d'inhiber le fonctionnement du transporteur, en antagonisant la liaison de l'ATP sur son site, et ainsi, en empêchant la production d'énergie nécessaire à la protéine.

1. Les inhibiteurs d'ATPases

Les protéines à activité ATPasique sont très nombreuses dans l'organisme. Elles assurent des tâches qui ne sont thermodynamiquement possibles que si elles sont couplées à l'hydrolyse de l'ATP qui constitue la source d'énergie pour ces protéines.

Malgré leur grande diversité fonctionnelle, le domaine de ces protéines liant l'ATP a la particularité d'être bien conservé. A l'heure actuelle, il est admis que la liaison entre l'ATP et son récepteur résulte principalement de l'interaction des groupements phosphates de l'ATP avec le motif Walker A de la protéine (*cf figure 3*). Ceci constitue un défi pour les pharmacochimistes qui souhaitent synthétiser des inhibiteurs d'ATPases. En effet, les groupements poly-phosphates ne peuvent pas être incorporés dans des structures médicamenteuses en raison de leur instabilité dans les milieux biologiques, ce qui diminue la biodisponibilité du principe actif. Cette absence de groupements phosphates peut cependant être compensée par un hétérocycle analogue d'adénine conçu pour avoir la plus forte affinité possible vis-à-vis du site à ATP.

Chez les ATPases connues, il a été montré que très peu de liaisons hydrogène se formaient entre l'adénine et le site à ATP ¹¹⁴ ; par contre, l'adénine semble mettre en place

des interactions hydrophobes avec les résidus d'acides aminés à chaînes latérales aromatiques, qui se trouvent à proximité de ce site. Par ailleurs, chez certaines ATPases, le site de liaison à l'adénine est souvent adjacent à des poches hydrophobes qui restent inoccupées lors de la liaison de l'ATP. De nouveaux inhibiteurs plus affins et plus sélectifs pourraient donc être conçus présentant un noyau central analogue de l'adénine et des chaînes latérales capables de se lier à ces poches¹¹⁵.

La plupart des inhibiteurs d'ATPases utilisés en thérapie ne sont pas des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, mais inhibent l'action de la protéine en se liant sur d'autres sites : c'est le cas, par exemple, de la digoxine (hétéroside cardiotonique) qui inhibe la pompe Na^+/K^+ ATPase, ou de l'oméprazole (antiacide gastrique) qui inhibe la pompe H^+/K^+ ATPase. Récemment, des inhibiteurs compétitifs du site de l'ATP ont été conçus pour certaines ATPases : par exemple, le dérivé d'indazole 3,4-disubstitué présenté dans la **figure 19** qui a été conçu *in silico* puis synthétisé par Boehm *et al.*¹¹⁶. Ce composé a montré une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ADN-gyrase bactérienne dix fois plus élevée que la novobiocine.

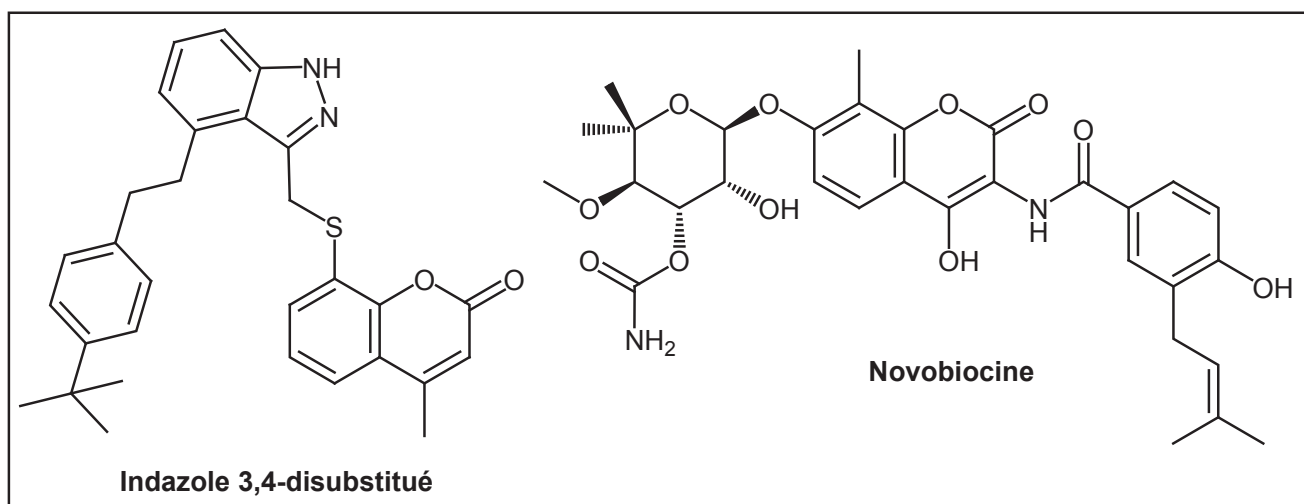


Figure 19. Inhibiteurs de l'ADN-gyrase.

Dans le cas des transporteurs ABC, bien que beaucoup d'inhibiteurs modulent l'activité ATPasique de la protéine, cette modulation est attribuée à des interactions allostériques plutôt qu'à une liaison avec le site à ATP. Les seuls inhibiteurs de l'activité ATPasique de la Pgp, connus pour avoir une liaison compétitive sur le site de l'ATP, sont certains flavonoïdes (*cf.* chapitre 1, § 1.3.3.). De ce fait, il paraît important d'explorer la possibilité de développer des inhibiteurs compétitifs du site de l'ATP des transporteurs de la famille des ABC, étant donné que c'est une stratégie qui n'a pas encore été suffisamment explorée.

2. Bibliographie concernant la synthèse des imidazo[4,5-*b*]pyridines

La famille des imidazo[4,5-*b*]pyridines est constituée de molécules à activités biologiques très variées. Ces composés sont des 1-deazapurines, et ont été développés à l'origine comme analogue de bases puriques dans l'objectif d'interférer avec le métabolisme de ces bases dans les bactéries et les virus¹¹⁷. La structure imidazo[4,5-*b*]pyridine a été choisie par notre laboratoire comme plateforme pour développer des analogues d'adénosine, susceptibles d'inhiber l'activité ATPasique de transporteurs transmembranaires tels que CpABC3 et la glycoprotéine-P.

La synthèse des imidazo[4,5-*b*]pyridines peut s'envisager selon deux approches différentes : à partir d'imidazoles avec construction du noyau pyridine, ou à partir de pyridines diaminées avec construction du cycle imidazole :

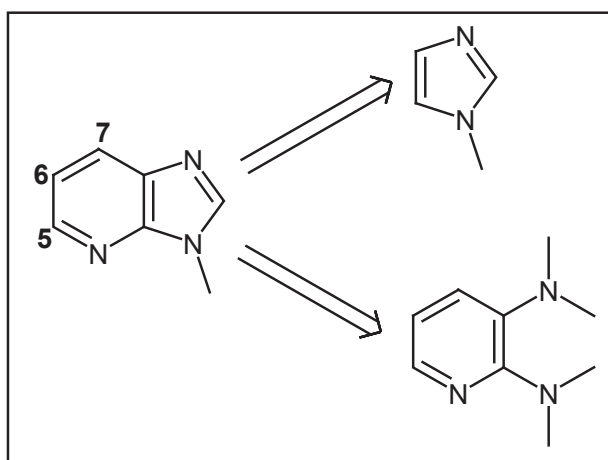


Figure 20

2.1. Synthèse du noyau imidazo[4,5-*b*]pyridine

2.1.1. Synthèses à partir du noyau imidazole

- À partir du 5-chloro-4-nitroimidazole

Tennant *et al.*¹¹⁸ ont décrit une synthèse de *N*-hydroxyimidazo[4,5-*b*]pyridin-7-ones à partir du 5-chloro-4-nitroimidazole¹¹⁹. Après substitution nucléophile aromatique de l'atome

de chlore par un groupement nitrile, le chlorure d'acide **(1)** est synthétisé. La réaction d'acylation en présence d'un énolate de magnésium de β -céto-ester, suivie de la cyclisation par hydrogénation catalytique de l'imidazole dicétoester intermédiaire obtenu, permet d'accéder avec un bon rendement à la *N*-hydroxyimidazo[4,5-*b*]pyridinone **(2)**.

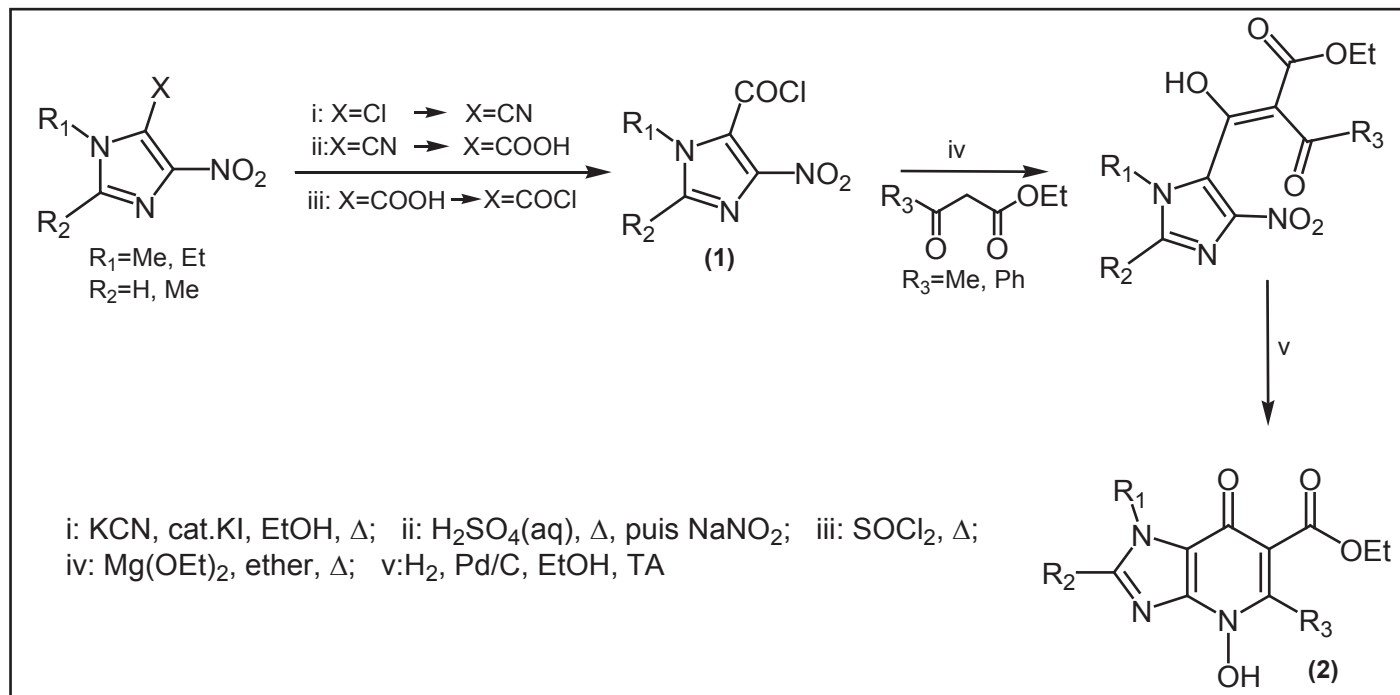


Schéma 1

Après réduction du dérivé *N*-hydroxy **(2)**, le groupement ester peut être éliminé par saponification et décarboxylation thermique.

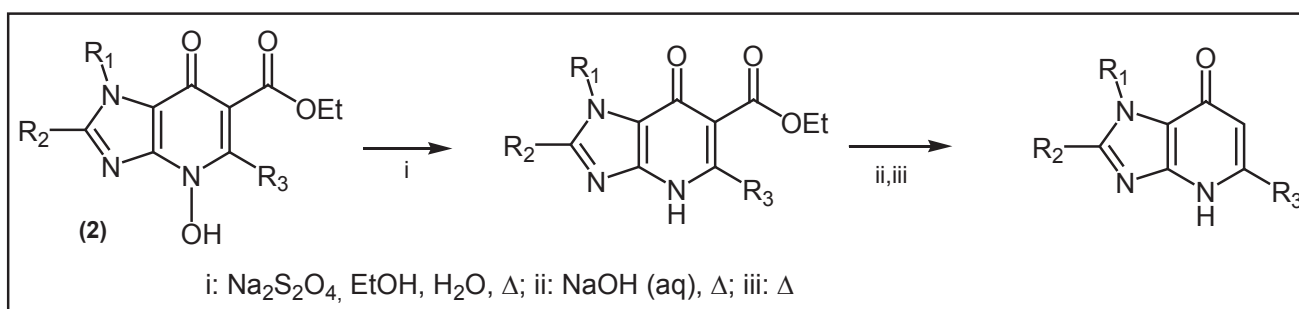


Schéma 2

• À partir de 5-aminoimidazole

Des imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-ones possédant une fonction ester ou acide en position 6 ont également pu être obtenues par cyclisation acido-catalysée des imidazoles **(3)**^{120,121} :

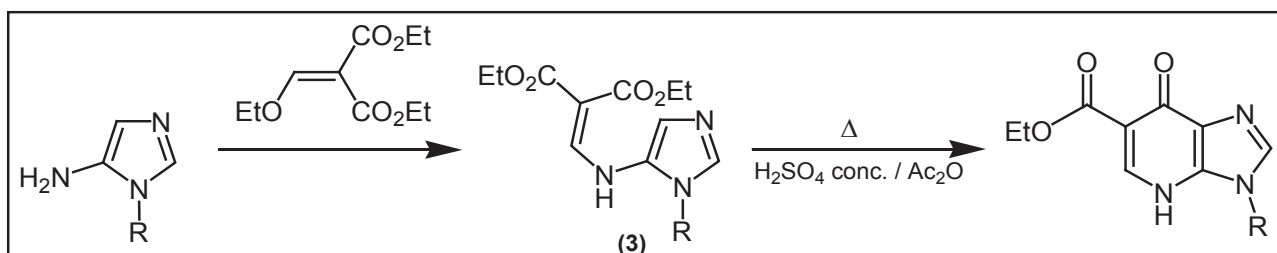


Schéma 3

Une cyclisation en milieu basique est également possible, à partir d'adduits dicyano. Ceci conduit à des imidazo[4,5-b]pyridines possédant une fonction amine en position 5¹²² :

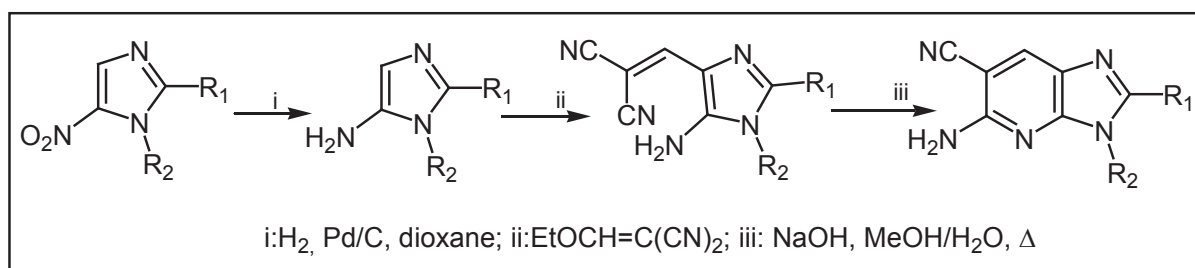


Schéma 4

L'intermédiaire de type 5-aminoimidazole peut également être préparé à partir de l'inosine en milieu légèrement basique, après protection de l'azote en position 1¹²³. Une substitution nucléophile par l'anion de l'acétonitrile sur l'amide (4), suivie d'une cyclisation en milieu basique par attaque nucléophile du groupement nitrile par le groupement amino, permet d'accéder à la déazaguanosine (5)¹²⁴ :

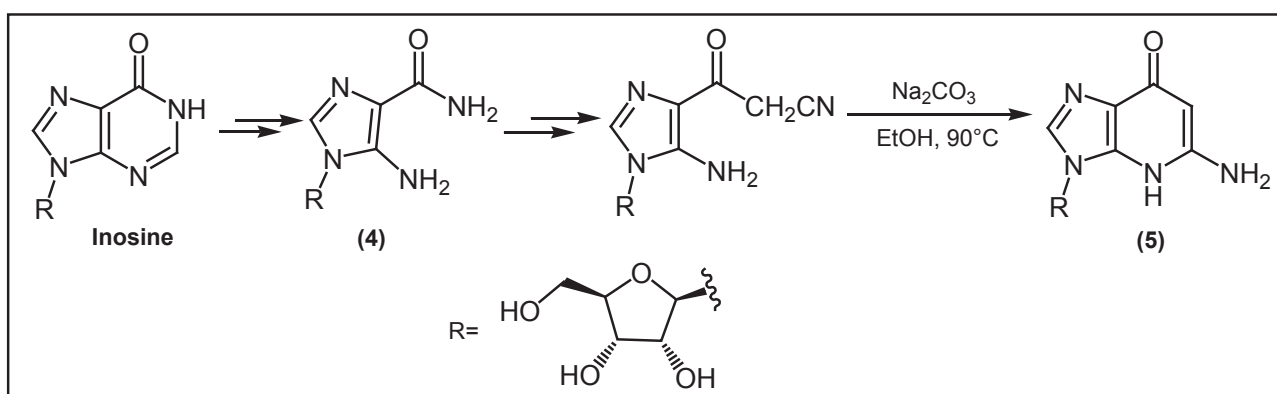


Schéma 5

2.1.2. Synthèses à partir de pyridines

• À partir de la 2,3-diaminopyridine

La méthode la plus couramment utilisée consiste à construire le cycle imidazole par cyclisation de la 2,3-diaminopyridine, commerciale, en présence d'un acide carboxylique¹²⁵.

La réaction peut être activée par les microondes¹²⁶ ou menée dans l'acide polyphosphorique utilisé comme solvant¹²⁷.

La nature de l'acide carboxylique utilisé détermine la nature du substituant en position 2 du noyau imidazopyridine. Cette méthode a permis la synthèse d'un large éventail de dérivés substitués en 2.

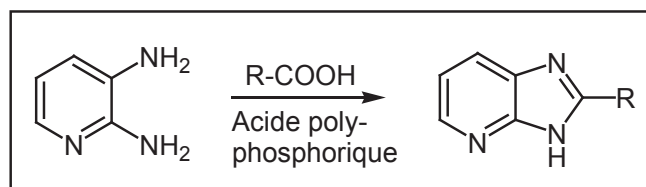


Schéma 6

L'acide carboxylique peut également être remplacé par l'orthoester en excès, la cyclisation s'effectuant en présence d'un acide (HCl ou pTSH) à chaud. Cette voie peut être illustrée par la synthèse régiosélective d'imidazopyridines *N*-alkylées décrite par Khanna *et al.*¹²⁸. En outre, ces auteurs proposent de pallier le problème de régiosélectivité de la *N*-alkylation des imidazo[4,5-*b*]pyridines en alkylant d'emblée la diaminopyridine. Du fait de la plus grande basicité de l'amine en position 3, le traitement de la 2,3-diaminopyridine par le benzaldéhyde conduit très majoritairement à l'imine **(6)**. La réduction, suivie de la cyclisation en présence d'orthoformiate d'éthyle, permet d'obtenir l'imidazopyridine *N1*-substituée :

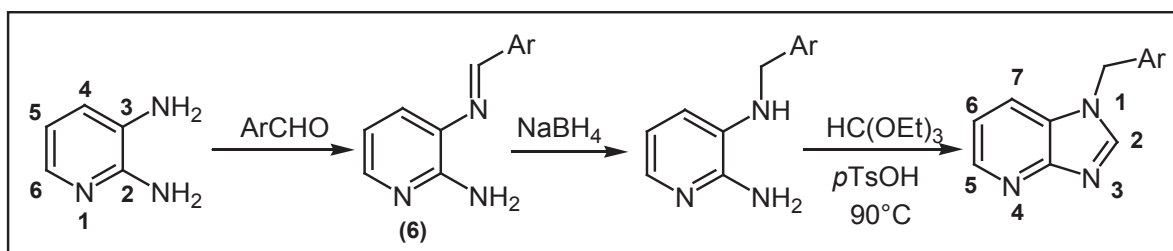


Schéma 7

Une dernière variante consiste à faire réagir une diaminopyridine avec un aldéhyde, puis à procéder à une cyclisation dans des conditions oxydantes¹²⁹ :

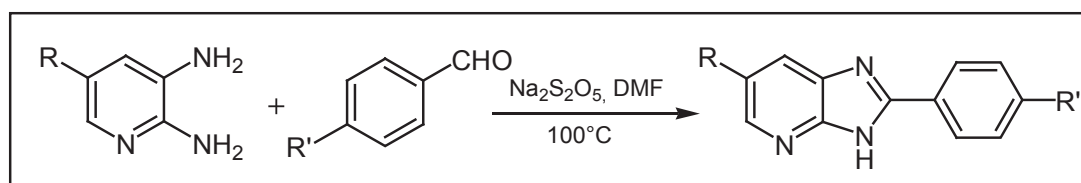


Schéma 8

• **À partir de la 2-chloro-3-nitropyridine**

Généralement, la 2-chloro-3-nitropyridine, très électrophile, est mise en œuvre dans une réaction de substitution nucléophile aromatique pour remplacer, dans des conditions douces, l'atome de chlore par un groupement amino. Le groupement NO₂ est ensuite réduit en amine :

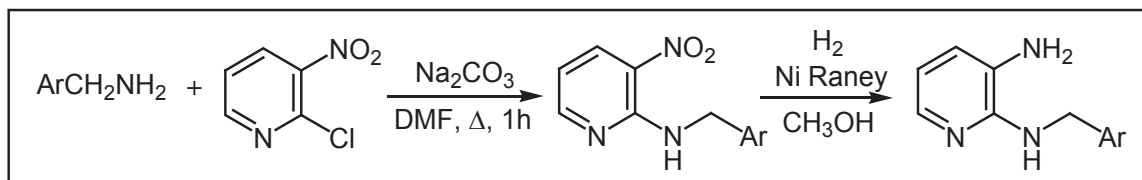


Schéma 9

La cyclisation finale est réalisée par couplage à un isothiocyanate suivie par une cyclodésulfuration en présence d'oxyde de mercure dans le THF¹³⁰ :

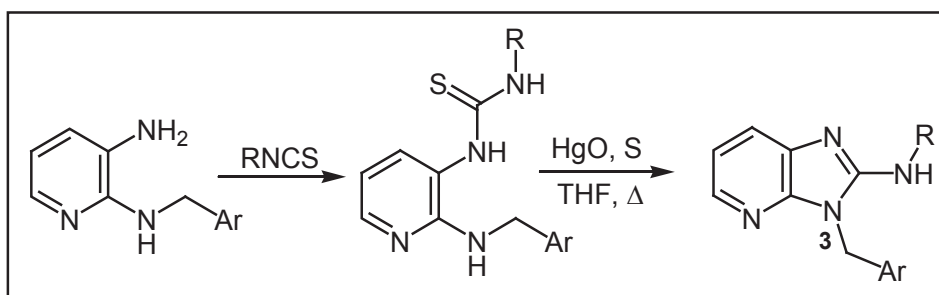


Schéma 10

A l'instar de la méthode de Khanna *et al.*¹²⁸, cette méthode met en œuvre une diaminopyridine régiosélectivement *N*-alkylée avant de réaliser la cyclisation.

Très récemment, Salomé *et al.*¹³¹ ont décrit une méthode d'accès direct à toute une série d'imidazo[4,5-*b*]pyridines diversement substituées à partir de 2-chloro-3-nitropyridine. L'étape clé de cette séquence réactionnelle est une amidation directe pallado-catalysée en présence d'amides primaires, secondaires ou cycliques, décrite par Buchwald *et al.*¹³².

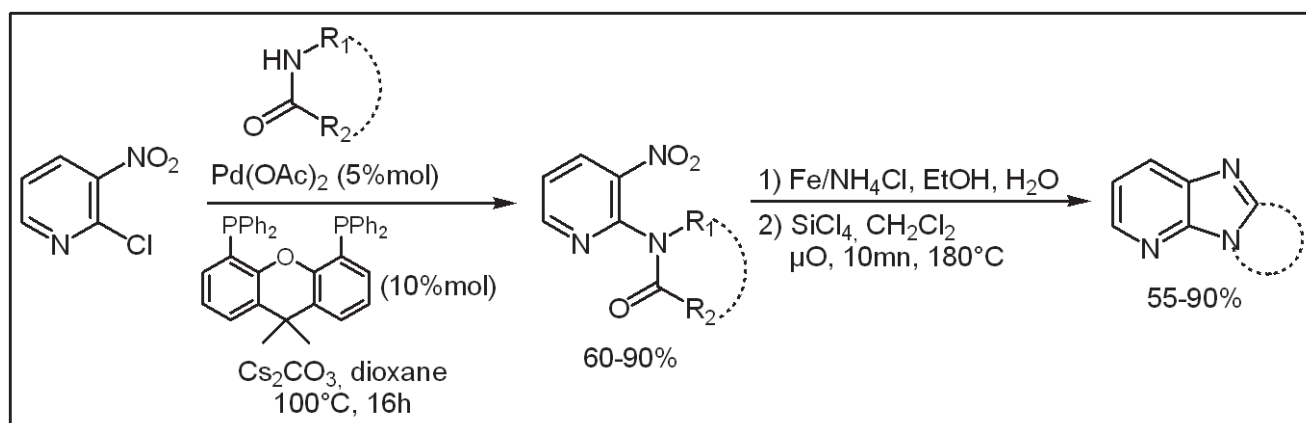


Schéma 11

2.2. Synthèses d'imidazo[4,5-b]pyridin-7-ones à partir d'imidazo[4,5-b]pyridines

2.2.1. À partir d'un groupement NO₂ en position 7

L'introduction d'un groupement nitro en position 7 de l'imidazopyridine nécessite une oxydation préalable de l'azote pyridinique. Antonini *et al.*¹³³ ont réalisé la nitration de l'imidazopyridine N4-oxyde en présence d'acide nitrique dans l'acide trifluoroacétique avec un bon rendement de 75% :

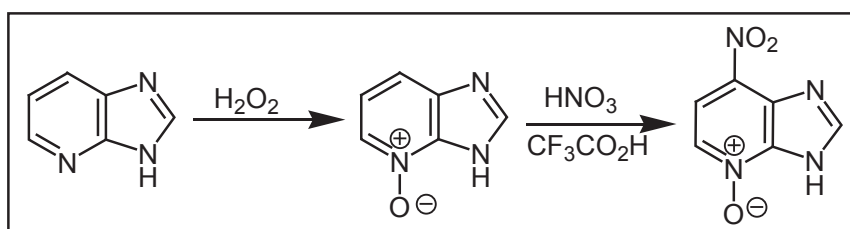


Schéma 12

Par la suite, la réduction de NO₂ et du N-oxyde pourrait s'envisager par hydrogénation catalytique, fournissant l'amine qui conduirait à la fonction hydroxy par diazotation, en suivant l'exemple décrit par Leroy *et al.*¹³⁴ à propos de la pyridine :

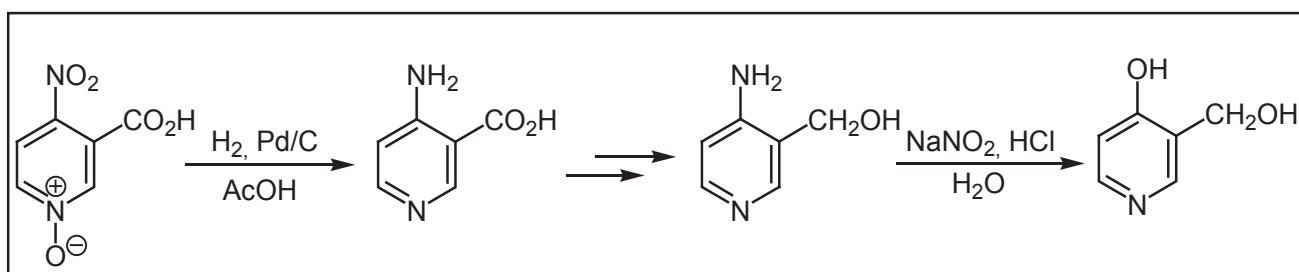


Schéma 13

2.2.2. À partir d'un chlore en position 7

L'oxydation de l'imidazopyridine en position 4 dirige la chloration par POCl₃ majoritairement vers la position 7 du noyau (sachant que le dérivé 5-chloro est souvent obtenu en mélange)¹³⁵.

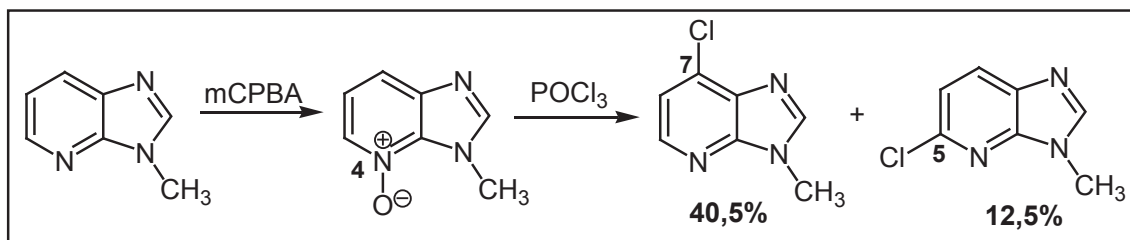


Schéma 14

À partir du dérivé chloré, plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour accéder au noyau pyridinone. La substitution de Cl par OH peut s'envisager :

- en milieu basique¹³⁶ :

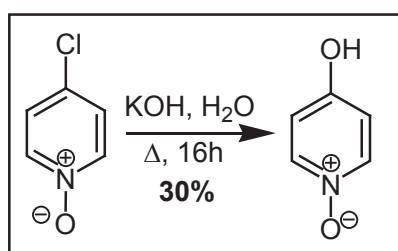


Schéma 15

- ou en milieu acide¹³⁷ :

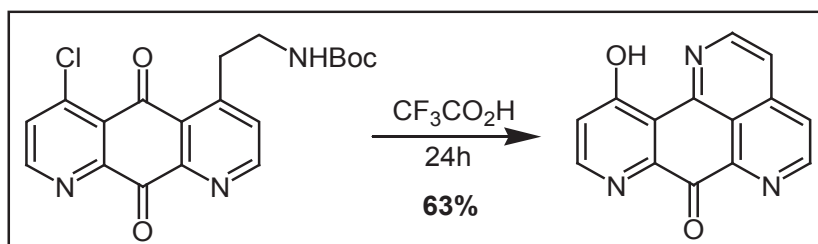


Schéma 16

La présence du chlorure offre également la possibilité d'effectuer une substitution nucléophile aromatique. Ainsi, un groupement benzyloxy a pu être introduit, avec des rendements néanmoins modestes. L'hydrogénolyse du benzyloxy permet d'accéder au noyau imidazopyridinone (ici une déazaguanine)¹³⁸ (schéma 17).

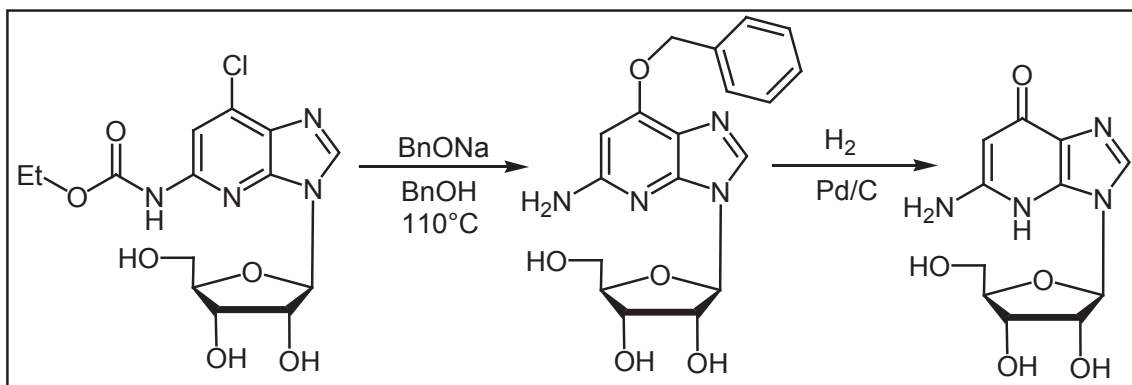


Schéma 17

Une deuxième méthode consiste à passer du dérivé chloré au dérivé méthoxylé, également par substitution nucléophile aromatique¹³⁹. Cela a permis d'accéder à la pyridinone en présence d'un agent déméthylant, comme l'iodure de triméthylsilyle¹⁴⁰ :

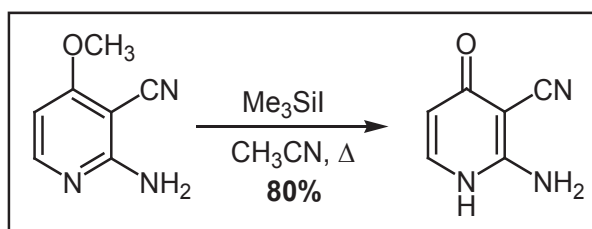


Schéma 18

3. Travaux personnels : Synthèse et évaluation des dérivés polysubstitués d'imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-one

La structure générale de nos molécules cibles est la suivante :

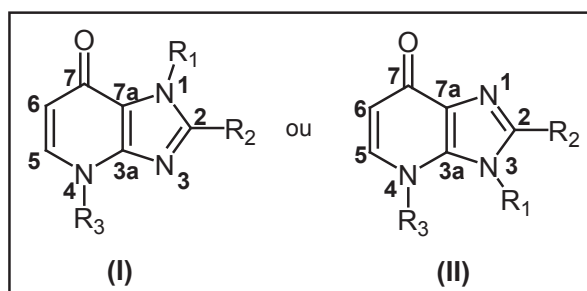


Figure 21

Une analyse rétrosynthétique nous a amené à envisager une stratégie de synthèse *via* un intermédiaire clé (III) de type 7-chloroimidazo[4,5-*b*]pyridine *N*-alkylé en position 1 ou 3. L'atome de chlore en position 7 pourra nous permettre d'introduire la fonction oxo afin

d'obtenir l'imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-one (**IV**). Enfin, les molécules cibles (**V**) seront préparées par *N*-alkylation de (**IV**) en position 4 :

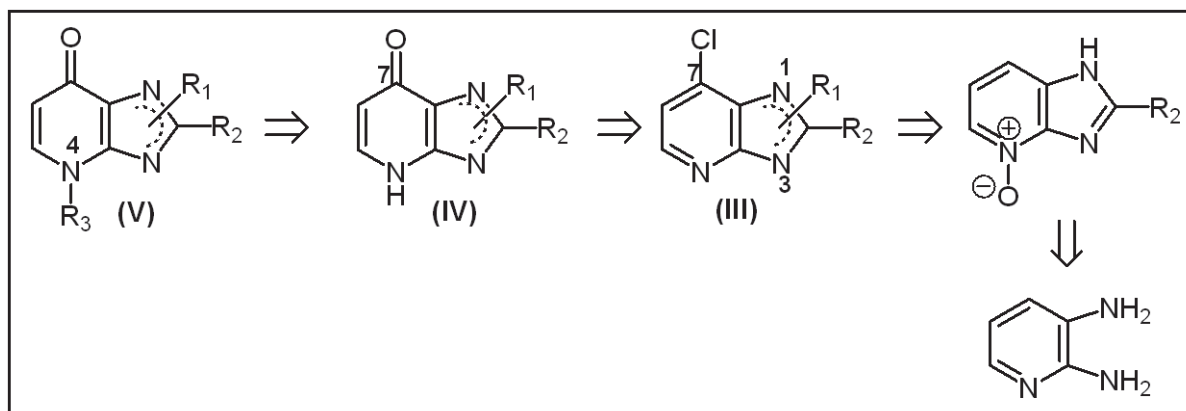


Figure 22

3.1. Synthèse des dérivés 7-chloroimidazo[4,5-*b*]pyridine (**III**)

3.1.1. Synthèse des dérivés N-oxydes (**9**) et (**10**)

La cyclisation de la 2,3-diaminopyridine en présence d'orthoformate d'éthyle ou d'orthoacétate d'éthyle, suivie d'un traitement en présence de l'acide chlorhydrique concentré à chaud, a permis d'obtenir les imidazo[4,5-*b*]pyridines (**7**)¹³³ et (**8**)¹⁴¹ avec des rendements respectifs de 74% et 78% après purification.

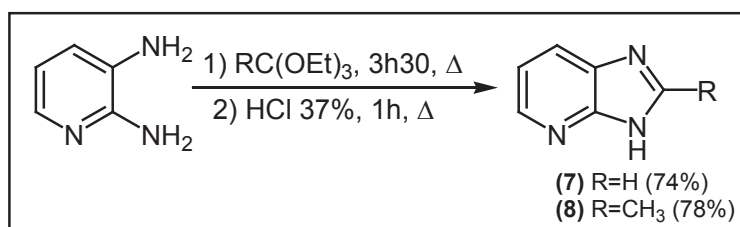
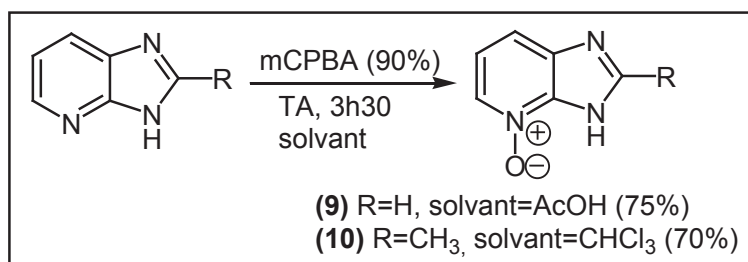


Schéma 19

Conformément au schéma rétrosynthétique, ces deux composés ont été oxydés par le mCPBA, selon la méthode de Ochiai¹⁴², pour donner respectivement la 3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridine-4-oxyde (**9**)¹³⁵ et la 2-méthyl-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridine-4-oxyde (**10**).

**Schéma 20**

Les premiers essais d'oxydation menés avec un lot commercial d'acide *méto*-chloroperbenzoïque (75 %m. de pureté) n'ont conduit qu'à de faibles rendements. Une purification préalable du peracide s'est avérée nécessaire pour obtenir des résultats satisfaisants et reproductibles. Cette purification a consisté à laver une solution de *m*CPBA dans le chloroforme avec un tampon phosphate à 0,1M (KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,5), puis, après séchage sur Na₂SO₄ anhydre et filtration, d'évaporer la phase chloroformée sous pression réduite et à froid. La pureté du peracide ainsi obtenu est déterminée par titrage iodométrique à 90 %m.¹⁴³.

Du fait de son insolubilité dans AcOH, le composé **(9)** a pu facilement être extrait du milieu réactionnel par simple filtration. Par contre, le dérivé *N*-oxyde **(10)**, soluble en milieu acide acétique, a été préparé dans le chloroforme et purifié par chromatographie sur colonne de silice afin d'éliminer l'acide *méto*-chlorobenzoïque formé.

3.1.2. Etude de la régiosélectivité de la *N*-benzylation des composés **(9)** et **(10)**

À ce stade, les imidazopyridines *N*4-oxydes **(9)** et **(10)** ont été *N*-benzylées dans les conditions classiques de substitution nucléophile utilisant K₂CO₃ anhydre dans le DMF pour générer les anions correspondants **(9')** et **(10')**^{144,145}. Quel que soit l'agent alkylant mis en œuvre (BnBr ou BnI), la réaction a conduit à un mélange de deux régioisomères N1 et N3 facilement séparables par chromatographie sur colonne de silice (**schéma 21** et **tableau 1**). Il est intéressant de noter que, dans les deux cas (R=H et R=CH₃), les isomères N1 se sont systématiquement révélés les plus polaires sur gel de silice^{146,147} et qu'ils ont montré les points de fusion les plus élevés (*cf.* partie expérimentale), par rapport aux isomères N3.

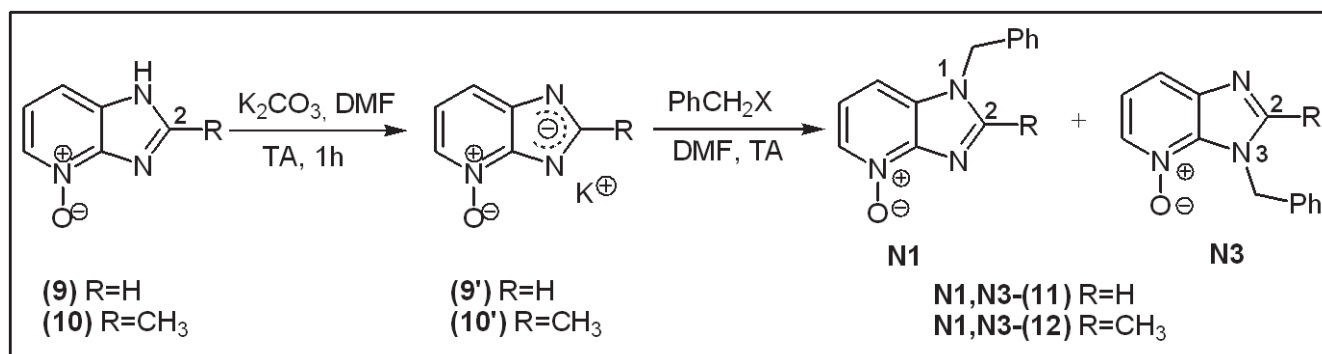


Schéma 21

Tableau 1. Résultats obtenus lors de la *N*-benzoylation des composés **(9)** et **(10)** dans les conditions décrites dans le **schéma 21**.

entrée	R	PhCH ₂ X	Temps de réaction	<i>N</i> -1/ <i>N</i> -3 ratio ^a [%: %]	Rdt [%] ^b
1	H	PhCH ₂ Br	20 h	N1-(11):N3-(11) 60:40	86
2	H	PhCH ₂ I	4 h	N1-(11):N3-(11) 70:30	84
3	CH ₃	PhCH ₂ Br	20 h	N1-(12):N3-(12) 40:60	60
4	CH ₃	PhCH ₂ I	4 h	N1-(12):N3-(12) 30:70	100

^a *N*-1/*N*-3 ratios ont été déterminés après purification et étude de la structure des régioisomères par RMN ¹H.

^b Rendements isolés globaux.

La structure des régioisomères **N1-(11)** et **N3-(11)** a été déterminée par expérience RMN de type NOE-différence. Comme le montre la **figure 23**, l'irradiation des signaux correspondants aux protons NCH₂ provoque un effet NOE sur le proton H7 pour **N1-(11)** et sur le proton H5 pour **N3-(11)**.

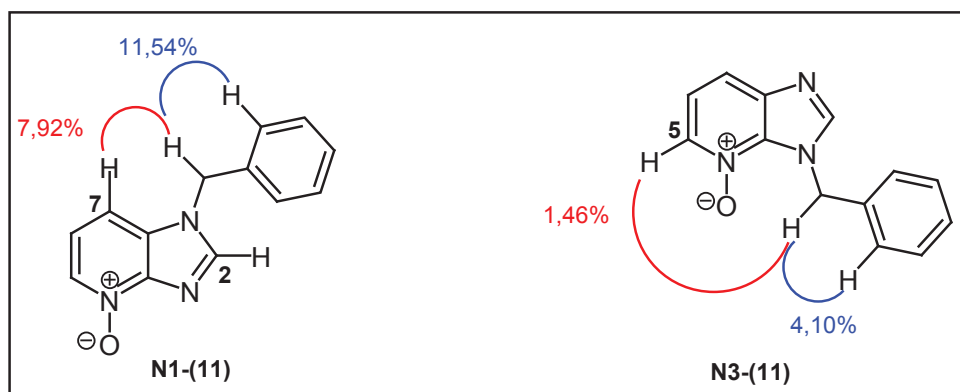


Figure 23. Détermination de la structure des régioisomères **N1-(11)** et **N3-(11)** par expériences de ^1H -RMN NOE-différence. Irradiation du signal du NCH_2 à $\delta=5,54$ ppm pour **N1-(11)** et $\delta=5,72$ ppm pour **N3-(11)**.

Une fois la régiosélectivité de la *N*-benzylation établie sans ambiguïté en série $\text{R}=\text{H}$, il est apparu que la comparaison des spectres RMN ^1H permettait de déterminer facilement la structure de chacun des régioisomères N1 et N3 (**tableau 2**).

Tableau 2. Attributions en RMN ^1H des régioisomères **N1,N3-(11)** et **N1,N3-(12)** synthétisés selon le **schéma 21**.

H	N1-(11)^a	N3-(11)^a	$\Delta\delta$	N1-(12)^a	N3-(12)^a	$\Delta\delta$
H-2	8,64 (s)	8,37 (s)		-	-	
CH_3	-	-		2,55 (s)	2,58 (s)	
H-5	8,20 (d)	8,39 (d)		8,12 (d)	8,17 (d)	
H-6	7,21 (dd)	7,17 (dd)		6,98 (dd)	7,03 (dd)	
H-7	7,60 (d)	8,32 (d)	-0.72	7,55 (d)	8,04 (d)	-0.49
N- CH_2	5,54 (s)	5,72 (s)	-0.18	5,53 (s)	5,67 (s)	-0.14

^a Spectres RMN ^1H enregistrés à 300MHz dans le $\text{DMSO}-d_6$ à 23°C. Les déplacements chimiques sont reportés en partie par million (ppm). La multiplicité est donnée entre parenthèses (constantes de couplage [*J*] en Hertz sont décrites dans la partie expérimentale).

En effet, les signaux des protons H7 et NCH_2 des isomères en série N1 sont significativement blindés par rapport aux mêmes protons en série N3 : $\Delta\delta=-0,72$ ou $-0,49$ pour H7 et $\Delta\delta=-0,18$ ou $-0,14$ pour NCH_2 .

Il est connu que la *N*-alkylation des imidazo[4,5-*b*]pyridines aboutit à la formation préférentielle du régioisomère N3^{117,128,148}. Notre étude a, quant à elle, montré que, quel que soit l'agent alkylant employé, la *N*-benzylation du dérivé 4-oxyde (**11**) conduisait majoritairement à l'isomère N1 (**tableau 1**, entrées 1 et 2) avec, certes, une faible régiosélectivité¹³⁵. Par contre, dans le cas du dérivé 4-oxyde (**12**) méthylé en position 2, nous avons observé une inversion de régiosélectivité (**tableau 1**, entrées 3 et 4). Enfin, de manière prévisible, l'utilisation de l'iodure de benzyle comme agent alkylant a permis une diminution significative du temps de réaction et une légère amélioration de la régiosélectivité (**tableau 1**, entrées 2 et 4).

Pour rationaliser ces résultats expérimentaux, nous avons sollicité le Dr Julien Pilmé du Laboratoire de Chimie Physique de la Faculté de Pharmacie de Lyonⁱ pour une étude théorique du mécanisme concernant cette réaction de *N*-benzylation. Les calculs ont été effectués au niveau *ab initio* par la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité ou DFT (B3LYP) afin de déterminer précisément les paramètres énergétiques et structuraux des composés impliqués dans les processus réactifs.

Dans un premier temps, ces calculs, en phase gaz ou solvant, ont montré qu'un mécanisme S_N2 impliquant une approche directe de l'halogénure de benzyle restait énergétiquement favorisé (stabilisation énergétique d'environ 30 kcal/mol) par rapport à un mécanisme S_N1 qui implique la formation d'un carbocation benzyle.

L'utilisation d'un modèle de continuum polarisable (PCM) a ensuite mis en évidence qu'un milieu polaire (DMF, $\epsilon=38$) stabilisait plus les isomères N1 que les isomères N3 (différence de 3 kcal/mol). En effet, dans le cas des deux dérivés 4-oxyde (**9**) et (**10**), l'analyse des facteurs électroniques (charges atomiques et polarisations dipolaires locales des azotes N1 et N3) a montré qu'ils favorisaient l'attaque nucléophile en position N1. L'azote N1 des anions solvatés (**9'**) et (**10'**) s'est révélé plus chargé que l'azote N3 (-0,94e vs -0,90e). Par ailleurs, il existe une forte interaction répulsive O⁻...X⁻ qui défavorise l'attaque nucléophile en N3.

ⁱ Situation à l'époque où ces travaux ont été effectués, depuis le Dr J. Pilmé a rejoint l'Université Paris VI.

Cependant, la régiosélectivité N1/N3 dépend essentiellement de la stabilité relative des états de transition impliqués dans le mécanisme S_N2 . Cette analyse a permis de mettre en évidence que les énergies d'état de transition dépendaient de la nature du groupement en position 2 en phase gaz ou solvant. Les calculs effectués en phase solvant sont apparus en bon accord avec nos résultats expérimentaux et avec les données de la littérature qui évoquent un contrôle stérique de la régiosélectivité des *N*-alkylations des systèmes hétérocycliques azotés¹⁴⁹. En effet, dans le cas où $R=H$, l'état de transition de **N1-(11)** est apparu très légèrement favorisé par rapport à une approche en N3, et ceci quel que soit l'halogène utilisé. Par contre, le groupement méthyle provoque une interaction stérique supplémentaire avec le groupement benzyle abaissant ainsi le niveau d'énergie de l'état de transition de **N3-(12)** par rapport à celui de **N1-(12)**.

L'optimisation de la géométrie des états de transitions a montré que le noyau aromatique de l'halogénure de benzyle se positionne toujours perpendiculairement au plan de l'imidazopyridine N4-oxyde (*figure 24*).

- Pour $R=H$: une interaction répulsive $X^{\cdots}O^{\cdots}N^+$ entre l'halogène partant et l'oxygène du N-oxyde en position 4 tend globalement à légèrement défavoriser une approche en N3, orientant ainsi la réaction vers la formation du produit N1 (*figures 24-A et 24-B*).
- Pour $R=CH_3$: le groupement méthyle en position 2 exerce une gêne stérique sur le phényle lors d'une approche en N1 de l'halogénure de benzyle (*figure 24-C*). Ceci favorise la formation du produit N3 malgré la répulsion $X^{\cdots}O^{\cdots}N^+$ toujours présente dans l'état de transition N3 (*figure 24-D*).

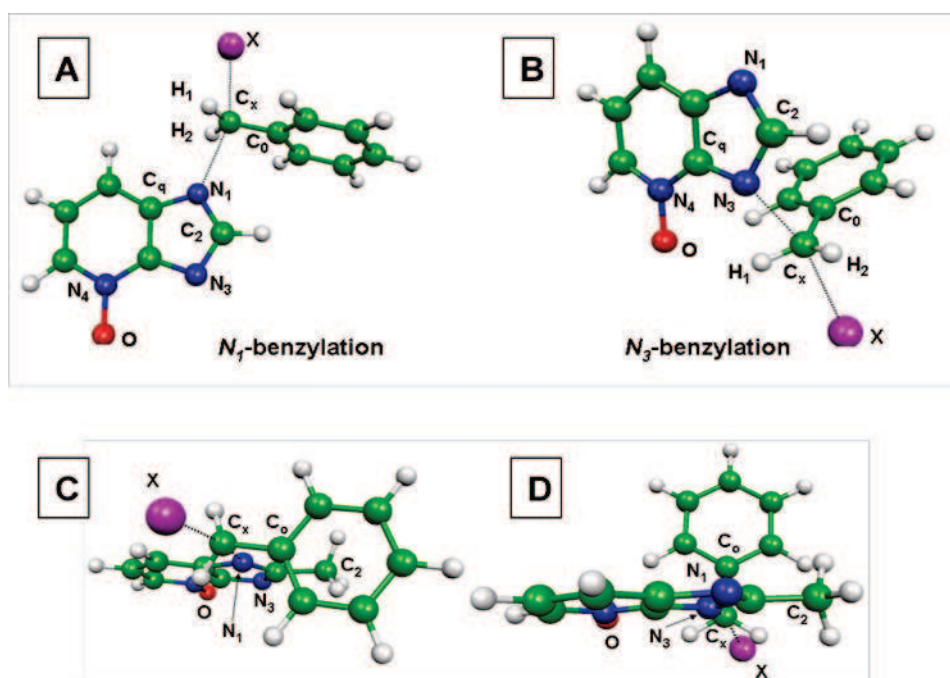


Figure 24. Structures optimisées par B3LYP des états de transition impliqués dans la *N*-benzylation des dérivés **(9)** et **(10)**. A : **N1-(11)** ; B : **N3-(11)** ; C : **N1-(12)** ; D : **N3-(12)**.

Cette étude de la régiosélectivité de la *N*-benzylation de dérivés d'imidazo[4,5-*b*]pyridine-4-oxyde a fait l'objet d'une publication dans Tetrahedron Letters en 2009¹⁵⁰.

3.1.3. Chloration des dérivés N4-oxyde benzylés N1-(11) et N3-(11)

La synthèse a été poursuivie sur les imidazopyridine-4-oxydes N1-benzylés présentant un atome d'hydrogène en position 2.

La chloration de la molécule **N1-(11)** par POCl₃, à reflux dans le chloroforme, a conduit très majoritairement à l'isomère **(13)** chloré en 7 avec un excellent rendement de 95% après purification par chromatographie sur gel de silice¹³⁵. L'analyse par RMN ¹H des autres fractions de colonne n'a montré que des traces de l'isomère **(13')** chloré en position 5 (*schéma 22*).

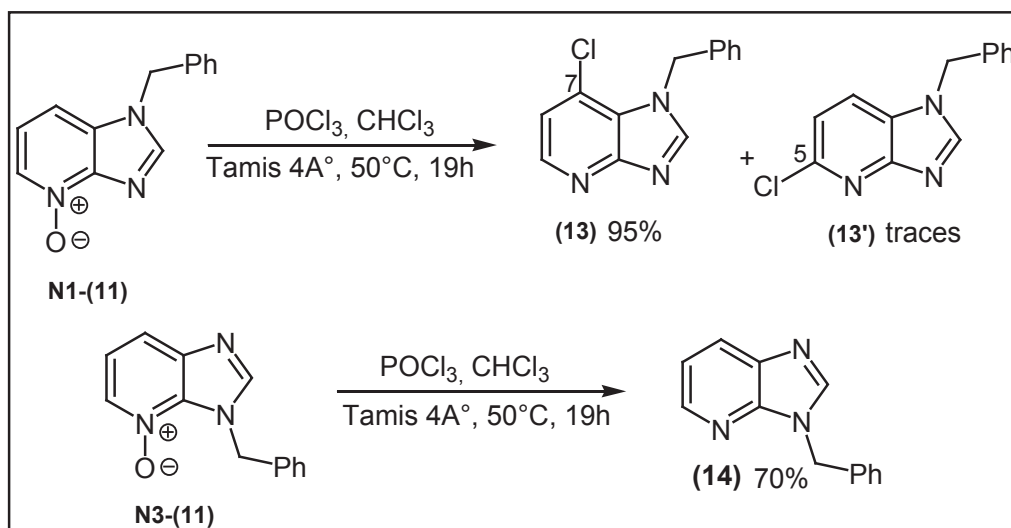


Schéma 22

La structure du régioisomère **(13)** a été déterminée par comparaison de son spectre RMN ^1H avec celui de son précurseur **N1-(11)**. Cette analyse met en évidence que le proton H5, qui est toujours le plus déblindé des protons pyridiniques, est encore présent dans le spectre du composé **(13)** sous la forme d'un doublet à 8,37 ppm présentant une constante de couplage de 5,3 Hz, valeur caractéristique d'un $^3J_{\text{HH}}$ entre les protons H5 et H6.

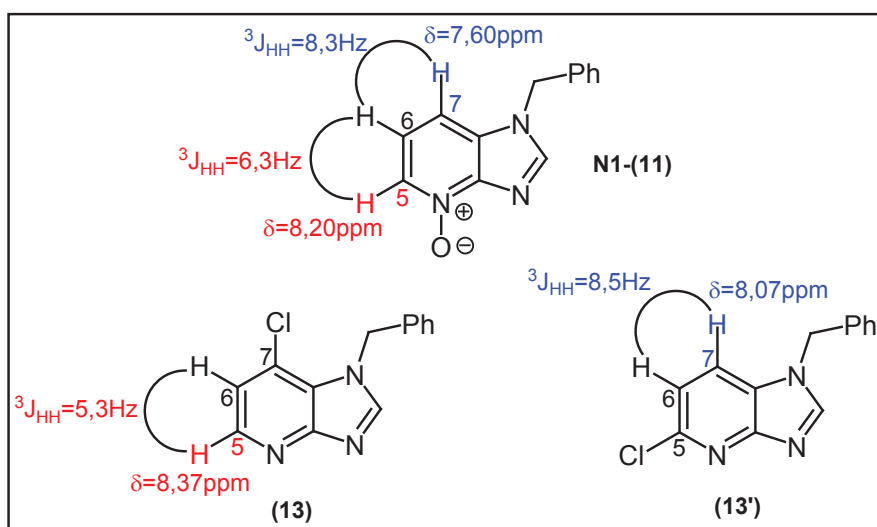


Figure 25

La structure de l'isomère **(13')**, quant à elle, a été confirmée par la présence d'un doublet plus grand ($^3J_{6,7} = 8,5$ Hz) attribué au proton H7 à 8,07 ppm.

Étrangement, la réaction de chloration menée dans les mêmes conditions sur le régioisomère **N3-(11)** n'a conduit qu'à la réduction du groupement *N*-oxyde pour obtenir la 3-benzylimidazo[4,5-*b*]pyridine **(14)** avec un rendement de 70%.

Nous avons alors décidé de poursuivre la synthèse des imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-ones (**IV**) à partir du dérivé chloré (**13**).

3.2. Synthèse des imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-ones (**V**)

3.2.1. Synthèse de l'imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-one (**15**)

Dans un premier temps, nous avons cherché à synthétiser l'imidazopyridinone (**15**) par hydrolyse directe du dérivé chloré (**13**) en milieu acide chlorhydrique concentré aqueux. Cette méthode nous a permis d'obtenir le composé (**15**) avec un rendement moyen de 52% après un reflux d'une semaine.

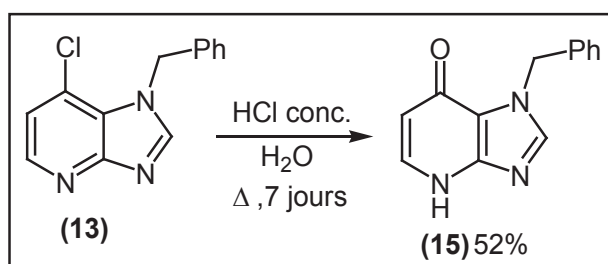


Schéma 23

Malheureusement, un meilleur rendement n'a pas pu être obtenu en utilisant une solution méthanolique de HCl¹⁵¹. Le mécanisme de cette réaction repose sur une substitution nucléophile aromatique de l'atome de chlore par le méthanol suivie d'une attaque S_N2 d'un ion chlorure sur le méthyl du groupe OCH₃ qui conduit finalement à l'hydroxypyridine et au chlorométhane (qui réagit directement avec le méthanol en excès pour donner du diméthyléther) (**schéma 24**).

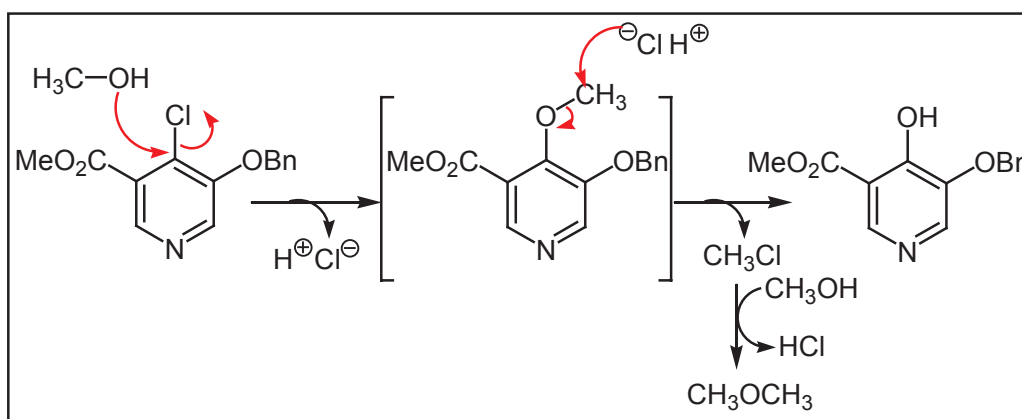
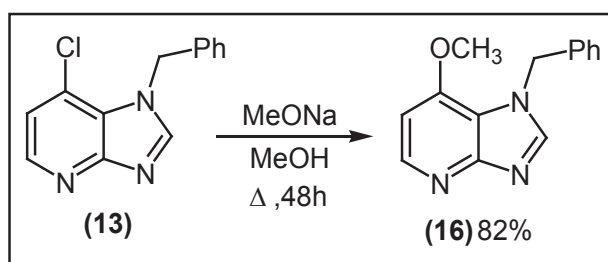


Schéma 24. Mécanisme d'hydrolyse d'une chloropyridine par MeOH/HCl¹⁵¹.

Par analogie, nous avons développé une séquence en deux étapes pour synthétiser l'imidazopyridinone (**15**) à partir du dérivé chloré (**13**) *via* l'intermédiaire méthoxylé (**16**). Le dérivé chloré (**13**) a donc été soumis à une réaction de substitution nucléophile aromatique, en présence du méthanolate de sodium. La réaction a conduit à un unique produit méthoxylé (**16**) avec un excellent rendement de 82% après purification.



La position du groupement benzyle a alors été confirmée par NOE-différence :

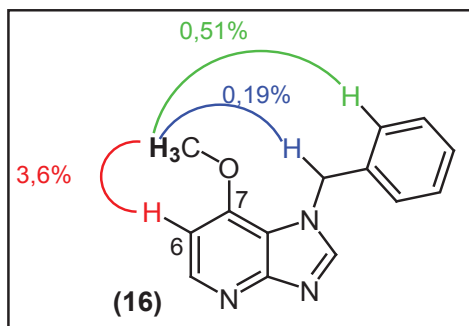


Figure 26. NOE-différence sur le composé (**16**) après irradiation du CH₃ à $\delta = 3,92$ ppm.

La déméthylation du produit (**16**) a ensuite été réalisée par attaque nucléophile d'un thiolate sur le groupement CH₃. Des réactions préliminaires ont été menées au laboratoire utilisant l'éthanethiolate de sodium comme agent nucléophile¹⁵² conduisant à l'imidazopyridin-7-one (**15**) en 3 heures avec un rendement de 90%. Cependant, en raison des nuisances olfactives inhérentes à l'utilisation de ce réactif, nous avons mené la déméthylation en présence du dianion de l'acide thioglycolique pour aboutir au même composé (**15**) avec cependant, un rendement plus faible (77%) et un temps de réaction plus long.

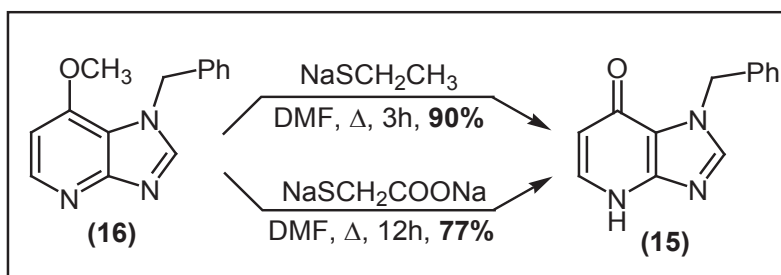


Schéma 26

Quel que soit l'agent de déméthylation utilisé, le processus séquentiel en deux étapes de méthylation / déméthylation s'est donc avéré plus efficace pour accéder à l'imidazopyridinone **(15)** (rendement global de 63 à 74%) que l'hydrolyse directe du dérivé chloré **(13)** (rendement de 52%).

3.2.2. Alkylation en N4 de l'imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-one (15)

A ce stade, nous avons obtenu l'intermédiaire clé de la synthèse qui va nous permettre d'accéder à toute une gamme d'imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-ones polysubstituées. En effet, notre objectif est d'introduire sur le noyau central « imidazopyridinone », ciblant potentiellement le site à ATP, des chaînes latérales de nature et de longueur diverses qui seraient capables de se lier aux poches adjacentes à ce site à ATP afin d'augmenter l'affinité et la sélectivité de ces molécules vis-à-vis de la protéine cible¹¹⁵. De plus, la chaîne latérale introduite sur l'azote N4 pourra constituer, à terme, le bras reliant l'imidazopyridinone au fragment stéroïde afin d'accéder à des composés bivalents analogues à ceux qui seront décrits dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

- **Travaux préliminaires**

La N-alkylation en position 4 de l'imidazopyridinone **(15)** a été mise au point lors de travaux antérieurs menés au laboratoire. Cette réaction avait alors été mise en œuvre en présence d'agents alkylants comme MeI ou de ω -halo alkyl esters dans une solution éthanolique de KOH à 90°C pour accéder, avec des rendements moyens à excellents, aux dérivés présentant un groupement méthyle ou une chaîne de type alkyl ester sur l'azote N4 (**schéma 27** et **tableau 3**). Dans tous les cas, la réaction a conduit à un seul régioisomère dont la structure a dû être confirmée par RMN. En effet, l'imidazopyridin-7-one **(15)** existant

sous la forme de deux tautomères (**figure 27**), l'alkylation peut se produire sur l'atome d'oxygène ou l'atome d'azote en 4.

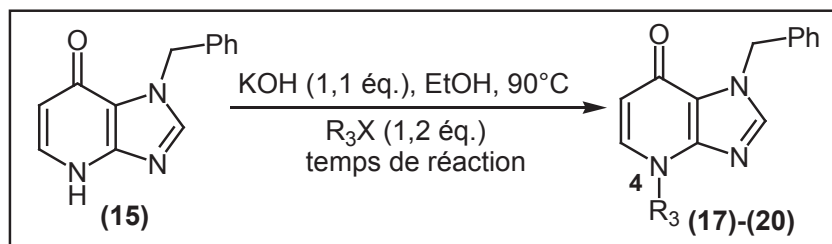


Tableau 3. Conditions opératoires et rendements de N4-alkylation de **(15)**.

R ₃ X	Produit	Temps	Rendements ^a
CH ₃ I	(17)	5h30	91%
BrCH ₂ CO ₂ Et	(18)	5h30	82%
Br(CH ₂) ₃ CO ₂ Et	(19)	22h30	64%
ClCH(CH ₃)CO ₂ Et rac./NaI	(20) rac.	22h30	51%

^a Rendements isolés.

Alors que le spectre NOE-différence du dérivé méthoxylé **(16)** montrait précédemment une corrélation entre les protons du CH₃ et le proton H6 du noyau imidazopyridinone ainsi que les protons *ortho* du groupement phényle (**figure 26**), les données enregistrées pour le composé **(17)** révèlent un couplage à travers l'espace entre les protons du CH₃ et le proton H5 du noyau imidazopyridinone (**figure 28**), confirmant la N-alkylation.

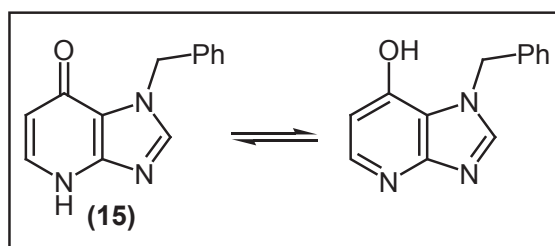


Figure 27. Deux formes tautomères de l'imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-one **(15)**.

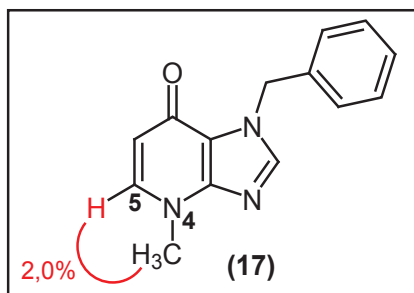


Figure 28. NOE-différence sur le composé **(17)** après irradiation du CH₃ à δ = 3,75 ppm.

Nous avons alors appliqué ces conditions de *N*-alkylation régiosélective à des chaînes amino-alkyles pour accéder à des imidazopyridin-7-ones possédant une fonction NHBoc en position N4.

• **Synthèse des précurseurs des chaînes amino-alkyles (**(21)**, **(22)** et **(23)**)**

Afin d'alkyler la molécule **(15)** en position N4 dans les conditions de substitution nucléophile décrite ci-dessus, nous avons procédé à la synthèse de plusieurs chaînes de différentes longueurs, substituées en positions terminales, d'une part, par un groupement partant de type halogène ou mésylate, et d'autre part, par un groupement amino-protégé. Les différents composés précurseurs disponibles commercialement comportaient 3, 4 ou 6 chaînons méthylène.

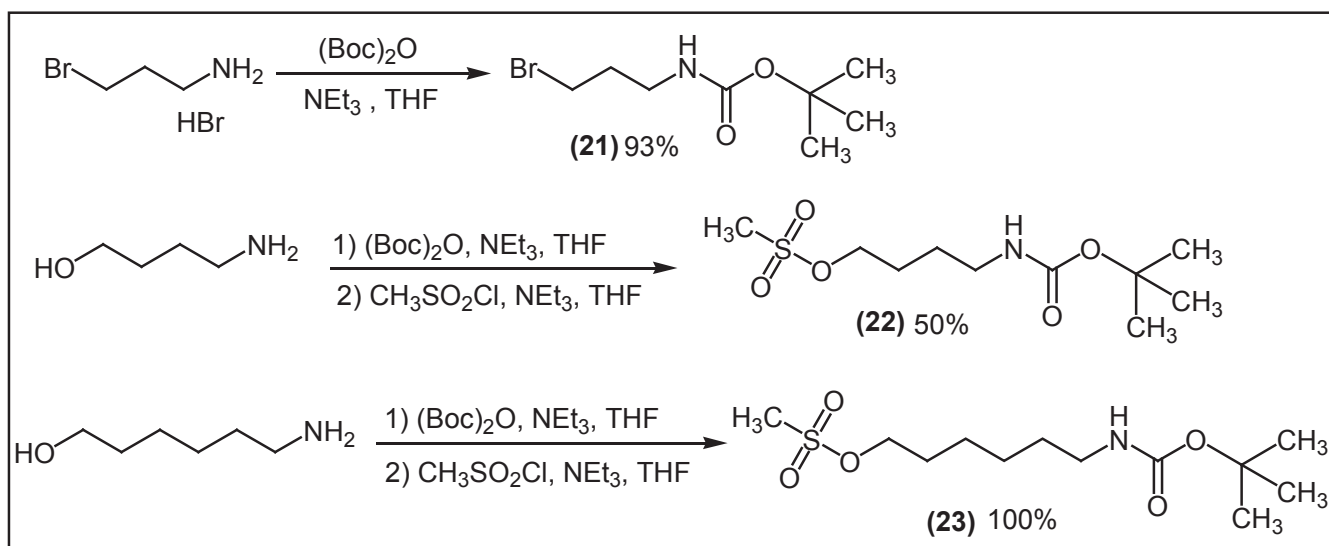


Schéma 28

Dans un premier temps, la fonction amine primaire des différents précurseurs a été protégée sous la forme d'un carbamate de *tert*-butyle résistant en milieu basique. Les groupements hydroxyle des deux dérivés amino alcools protégés ont ensuite été

transformés en mésylate pour pouvoir procéder à la substitution nucléophile. Les dérivés **(21)** et **(23)** ont été obtenus avec d'excellents rendements en une ou deux étapes (respectivement 93% et 100%), contrairement au composé **(22)** qui n'a pu être synthétisé qu'avec un rendement moyen de 50%. Cet amino mésylate comportant une chaîne de type –(CH₂)₄– s'est avéré instable : une cyclisation intramoléculaire par substitution nucléophile de l'azote sur le carbone porteur du groupe OSO₂CH₃ conduisant à la pyrrolidine *N*-Boc¹⁵³ pourrait expliquer ce mauvais résultat (**schéma 29**), même si nous n'avons pas pu isoler ce dérivé pyrrolidine.

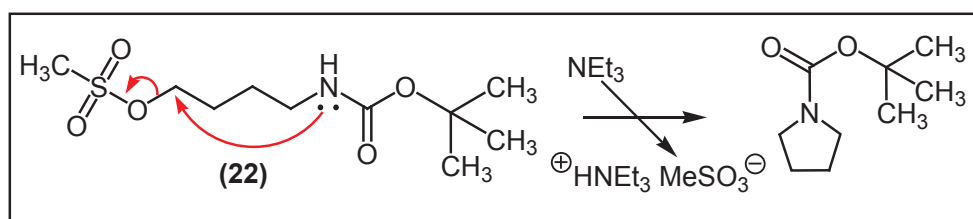


Schéma 29

En effet, des travaux de Berrée *et al.*¹⁵⁴ ont montré que l'oxamate *N*-alkylé **(24)** pouvait conduire facilement à la pyrrolidine *N*-Boc par traitements successifs par LiOH (élimination du groupement ethoxalyl) et par *t*BuOK (formation de l'amidure et substitution nucléophile intramoléculaire) (**schéma 30**).

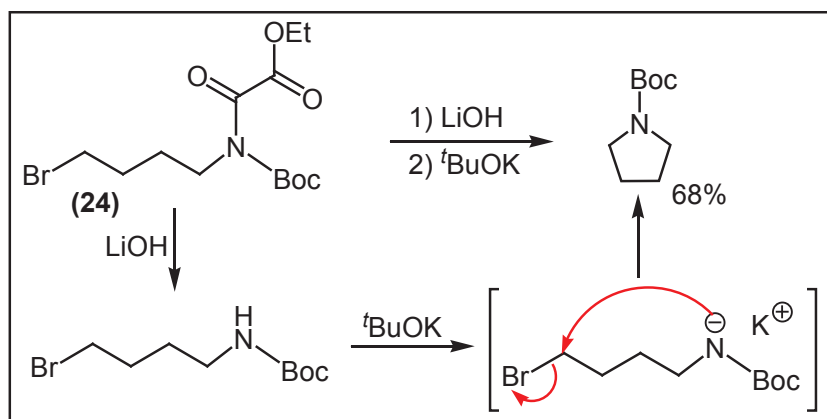


Schéma 30

- **Alkylation de l'imidazopyridine**

La *N*-alkylation de l'imidazopyridin-7-one **(15)** a été conduite dans les mêmes conditions que précédemment : c'est-à-dire dans l'éthanol, à chaud, mais en présence d'un plus grand excès d'agent alkylant (6 éq.) et de KOH (8 éq.). Le temps de réaction a également dû être

prolongé pour obtenir des rendements satisfaisants. Les produits **(25)** et **(27)** ont alors été obtenus, chacun avec un rendement de 60%.

Cette réaction de N-alkylation s'est avérée régiosélective, cependant dans le cas de l'alkylation en présence du bromure **(21)**, des traces du régioisomère O-alkylé **(26)** ont pu être isolées. Le spectre ^1H RMN du dérivé O-alkylé **(26)** met en évidence des signaux correspondants aux protons H5 et H6 analogues à ceux obtenus pour le composé méthoxylé en position 7 **(16)**.

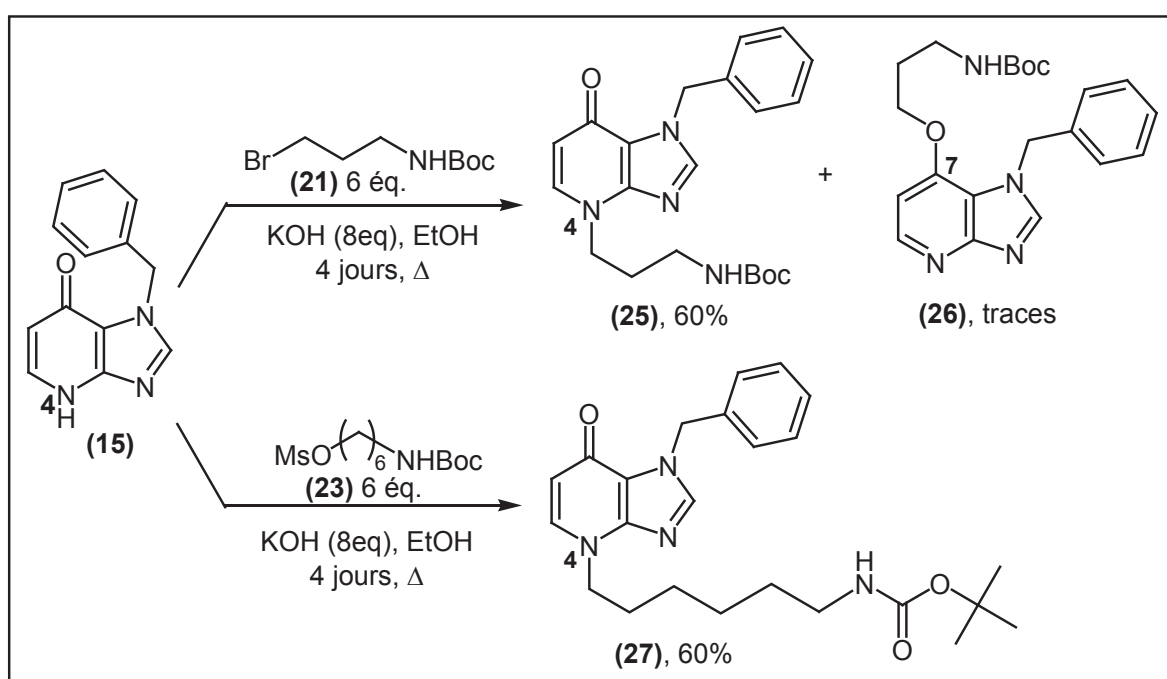


Schéma 31

Par contre, la réaction, menée en présence de 6 équivalents du mésylate **(22)** dans des conditions basiques analogues, n'a pas permis d'obtenir le produit de N-alkylation **(28)**. Le dérivé **(28)** a pu finalement être obtenu avec un faible rendement de 22% en utilisant des conditions plus douces (1,1 équ. de KOH ; 1,3 équ. de **(22)**, schéma 32).

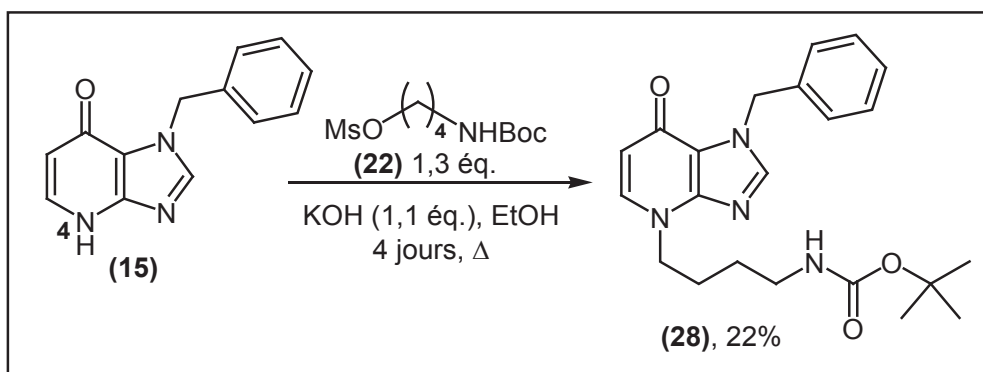
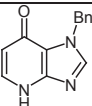
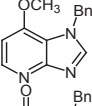
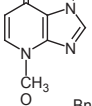
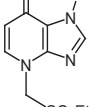
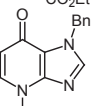
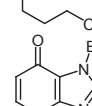
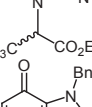
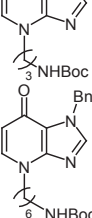


Schéma 32

3.3. Evaluation biologique

L'évaluation biologique des imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-ones **(15)**, **(17)**-(**20**), **(25)**, **(27)**, **(28)** et de la 7-méthoxy-1-benzylimidazo[4,5-*b*]pyridine **(16)** a été réalisée par le Dr P. Lawton du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Lyon. Cette étude a été menée sur le fragment recombinant H6-NBD1 du transporteur CpABC3 de *C. parvum* (cf. chapitre 1, § 2). L'affinité de liaison des molécules (100 μM) a été évaluée par la mesure du « quenching » de fluorescence intrinsèque du fragment H6-NBD1, qui montre un pic d'émission caractéristique à 328 nm dû à des résidus tryptophanes proches du site à ATP (**tableau 4**)¹¹³. L'imidazopyridinone **(28)**, obtenue en trop faible quantité et avec une pureté non satisfaisante, n'a pas pu être testée.

Tableau 4. Evaluation biologique des imidazo[4,5-*b*]pyridines synthétisées sur CpABC3.

Composé	Quenching de fluorescence ^a (% par rapport au contrôle)	Activité inhibitrice de l'ATPase (K _i , en μM)
 (15)	N.A. ^b	N.D. ^c
 (16)	N.A.	N.D.
 (17)	N.A.	N.D.
 (18)	85.5±1.8	N.D.
 (19)	80.1±8.2	N.D.
 (20) rac.	69.3±4.4	232.0±26.8
 (25)	96.1±17.4	538.9±73.4
 (27)	60.8±18.5	N.A.
TNP-ATP	33.1±7.9	36.6±4.5
Progestérone	71.7±5.1	N.D.

^a Mesures de fluorescence effectuées en triplicats. Les dérivés synthétisés et les références ont été testés à 100 μM. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence de la protéine en présence du composé testé par rapport à la protéine seule (plus ce pourcentage est bas, plus l'affinité du composé est grande) ; ^b N.A. : non actif ; ^c N.D. : non déterminé

Les deux molécules de références (100 μM) ont été d'une part, le TNP-ATP, inhibiteur compétitif de l'ATP¹⁵⁵, et d'autre part, la progestérone, modulateur stéroïdien connu de la Pgp¹⁵⁶ supposé se lier à un site proche de celui de l'ATP.

Les dérivés **(15)**, **(16)**, **(17)** et **(25)** n'ont montré aucune liaison au transporteur. Toutefois, les imidazopyridin-7-ones **(18)**-**(20)** et **(27)** provoquent, quant à elles, un faible quenching de fluorescence, proche de celui de la progestérone.

Le fragment recombinant H6-NBD1 possède également une activité ATPasique, qui, bien que plus faible que l'activité ATPasique du transporteur CpABC3 entier, a pu être exploitée pour évaluer l'action inhibitrice d'un panel de trois molécules (**tableau 4**) : le dérivé **(20)** comportant une fonction ester et les dérivés **(25)** et **(27)** possédant une fonction NHBoc.

Les dérivés **(20)** et **(25)** se sont révélés des inhibiteurs compétitifs (**figure 29**). Le composé **(25)** montre toutefois un pouvoir inhibiteur aussi faible que son affinité. Ces résultats soulignent cependant l'importance de la nature de la chaîne latérale en position 4 : il semblerait qu'une fonction ester soit préférable à une fonction NHBoc pour l'activité inhibitrice.

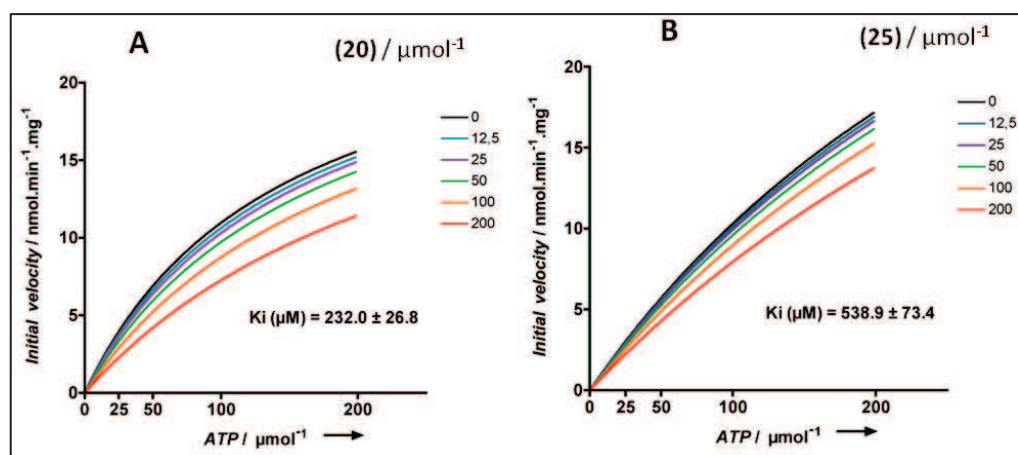


Figure 29. Inhibition compétitive de l'activité ATPasique par les composés **(20)** et **(25)**.

Enfin, il faut noter que l'inhibition de l'activité ATPasique par les dérivés **(20)** et **(25)** requiert des concentrations élevées, et que le composé **(27)** qui avait provoqué le meilleur quenching de fluorescence parmi l'ensemble des imidazopyridinones testées, n'a pas montré d'activité inhibitrice. Ceci pourrait être dû au fait que ces molécules formeraient une liaison sur CpABC3 comparable à celle de certains flavonoïdes sur la Pgp, qui se lieraient

simultanément sur le site de l'ATP et sur le site voisin lipophile liant les stéroïdes. Mais ceci reste à confirmer en testant un nombre de molécules plus important.

L'ensemble de cette étude concernant la synthèse et l'évaluation biologique des imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-ones N1- et N4-substituées a fait l'objet d'une publication dans *European Journal of Medicinal Chemistry* en 2010¹⁵⁷.

CHAPITRE 3

Conception, synthèse et évaluation biologique de dérivés bivalents progestérone-adénine comme inhibiteurs potentiels de la P-glycoprotéine

1. Le concept du ligand bivalent

Un ligand bivalent est une entité capable de se lier simultanément à deux sites distincts. Ce ligand peut être homo-bivalent, c'est-à-dire qu'il est constitué de deux structures identiques reliées par un bras, ou hétéro-bivalent avec deux motifs différents.

Les ligands bi- ou même polyvalents sont présents abondamment dans le monde vivant. A titre d'exemple, la liaison des virus aux surfaces cellulaires, la liaison des anticorps aux antigènes, les voies de signalisation intracellulaires, la liaison de facteurs de transcription à l'ADN, etc... Toutes ces liaisons évoquent des interactions polyvalentes.

Comme tout processus chimique, l'interaction entre un ligand et son récepteur peut être décrite thermodynamiquement par l'équation de l'énergie libre¹⁵⁸ :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

où G est l'enthalpie libre (dite de Gibbs),

H l'enthalpie,

S l'entropie de l'interaction,

et T est la température du milieu en Kelvin.

Plus l'enthalpie libre diminue, plus l'interaction est favorisée.

Pour évaluer le gain (ou la perte) d'affinité vis-à-vis du récepteur, provoqué(e) par le passage de deux ligands monovalents A et B à un ligand bivalent A-espaceur-B, il est utile de comparer la diminution d'enthalpie libre ΔG correspondant à chacun de ces deux processus, deux liaisons monovalentes *versus* une liaison bivalente :

- **L'enthalpie** de liaison d'un ligand bivalent avec son récepteur est souvent un facteur défavorisant l'interaction bivalente. En effet, sauf dans le cas peu probable où il est parfaitement adapté à ses deux sites, la liaison d'un ligand bivalent s'accompagne souvent d'une déformation du ligand qui engendre des contraintes stériques permettant aux deux motifs du ligand de mieux s'adapter à leurs sites respectifs. Ces contraintes de conformation sont consommatrices d'énergie, il en résulte donc une valeur de ΔH plus importante (moins négative) que la valeur de ΔH correspondant à une liaison des deux fragments monovalents avec leurs deux sites.

- L'effet de l'**entropie** sur la liaison bivalente dépend de deux facteurs :
 - ① Du fait même de la présence du bras espaceur, un ligand bivalent possède moins de degrés de liberté (rotation, translation) que les fragments monovalents. En solution, un ligand bivalent possède donc une entropie moins importante que les deux fragments monovalents. Il en résulte que la liaison d'un ligand bivalent avec ses récepteurs s'accompagne de moins de perte d'entropie que deux interactions monovalentes séparées. C'est un **facteur favorisant**, toujours présent.
 - ② Contrairement aux deux fragments monovalents, un ligand bivalent subit une perte de flexibilité intramoléculaire lors de sa liaison avec les récepteurs. Excepté le cas où le bras espaceur présente une très forte rigidité par nature, l'interaction du ligand bivalent avec ses récepteurs le rend toujours plus rigide et s'accompagne d'une perte d'entropie. C'est un **facteur défavorable**, mais qui **dépend de la nature** du bras espaceur : plus le bras est rigide, moins l'entropie de la molécule de départ est élevée, moins ce facteur est important.

En résumé, le ligand bivalent « thermodynamiquement » idéal doit être **le plus rigide possible**, pour limiter la perte entropique, mais **le plus adapté possible** à ses deux sites, pour limiter les contraintes stériques et les besoins énergétiques de l'interaction, donc pour limiter le gain d'enthalpie.

2. Exemples de ligands bivalents

- **Ligands des récepteurs aux opioïdes**

Les ligands bivalents destinés à interagir avec deux récepteurs aux opioïdes ont été largement étudiés¹⁵⁹. Actuellement, cette famille de récepteurs est classée comme suit : le récepteur μ (*mu*, MOP), le récepteur δ (*delta*, DOP), le récepteur κ (*kappa*, KOP) et le récepteur à la nociceptine / orphanine FQ (NOP). Les agonistes du récepteur MOP, avec la morphine comme chef de fil, sont responsables d'un puissant effet analgésique. Toutefois, ils ont des effets indésirables bien connus : dépression respiratoire, constipation, et surtout

la tolérance qui s'installe au cours des traitements chroniques. Il a été montré que les effets indésirables des dérivés morphiniques diminuaient en bloquant les récepteurs DOP et en activant les récepteurs MOP simultanément. Ainsi, le ligand bivalent MDAN-21, contenant deux pharmacophores — d'une part, l'oxymorphone (agoniste du récepteur MOP) et d'autre part, le naltrindole (antagoniste du récepteur DOP) — reliés par un bras à 21 chaînons (**figure 30**), permet d'activer le récepteur MOP à des doses 50 fois plus faibles que celles utilisées pour la morphine (DE_{50} (MDAN-21) 0,08 nM, DE_{50} (morphine) 4,1 nM) tout en réduisant le phénomène de tolérance et la dépendance physique *in vivo*¹⁶⁰.

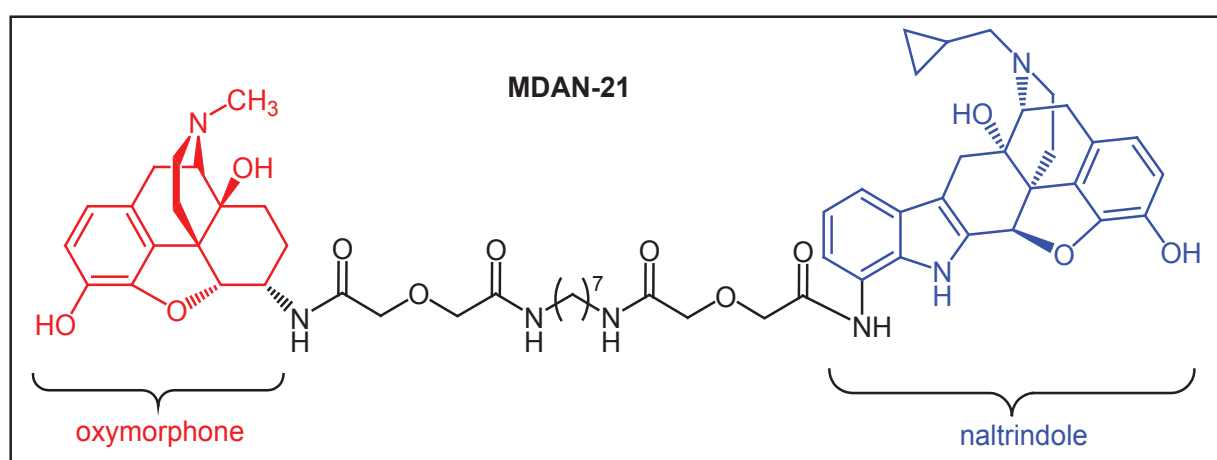


Figure 30. Ligand bivalent MDAN-21 comportant deux pharmacophores de type oxymorphone (agoniste du récepteur MOP) et naltrindole (antagoniste du récepteur DOP) reliés par un bras espaceur à 21 chaînons

- **Ligands de la pompe de recapture de la sérotonine**

L'inhibition de cette pompe, située au niveau des synapses du système nerveux central, est l'une des stratégies thérapeutiques utilisées contre la dépression nerveuse. Des ligands homo¹⁶¹ et hétéro-bivalents¹⁶² ont montré une meilleure efficacité dans l'inhibition de ces pompes que leurs analogues monovalents (**figure 31**). Deux explications peuvent être envisagées : l'existence de deux sites de liaison sur ces pompes ou une dimérisation de la protéine. Les inhibiteurs bivalents ont également montré une bien meilleure sélectivité envers les pompes de recapture de la sérotonine, par rapport aux autres pompes de recapture de neurotransmetteurs (dopamine et noradrénaline).

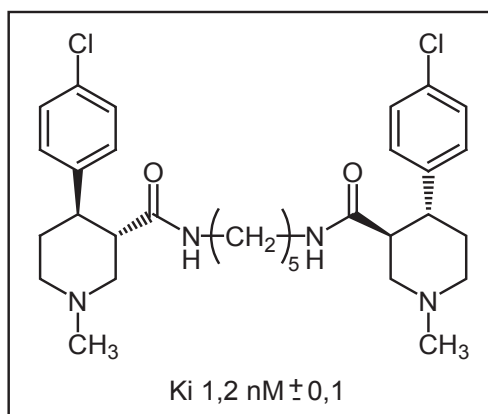


Figure 31. Ligand homo-bivalent inhibiteur sélectif du transporteur de la sérotonine.

- **Ligands de l'acétylcholinestérase**

Les inhibiteurs de cette enzyme sont notamment utilisés comme médicaments contre la maladie d'Alzheimer. L'acétylcholinestérase possède deux sites de liaisons (un site catalytique « enfoui » et un site périphérique, séparés de 14 Å) où des interactions de type π -cation se mettent en place entre les résidus Trp 84 et 279 et les groupements ammoniums quaternaires de l'acétylcholine. Des ligands bivalents destinés à se lier à ces deux sites ont été synthétisés, en partant soit d'inhibiteurs connus de l'acétylcholinestérase comme la tacrine (ex-Cognex®, qui n'est plus commercialisé)¹⁶³ ou l'huperzine A¹⁶⁴, soit d'amines plus simples comme l'hupyradone. Des homo- et des hétéro-bivalents ont été testés et ont montré une meilleure affinité de liaison vis-à-vis de l'acétylcholinestérase par rapport à celle montrée par les dérivés monovalents. L'étude cristallographique des complexes ligand-enzyme a confirmé la liaison simultanée de ces bivalents aux deux sites mentionnés ci-dessus (**figure 32**).

- **Ligands des récepteurs de l'adénosine A1 et A3**

Les agonistes de ces deux récepteurs, présents dans le muscle cardiaque, possèdent un effet protecteur contre les conséquences de l'ischémie cardiaque. L'activation de l'un de ces deux récepteurs, ou des deux à la fois, limite le phénomène de mort cellulaire provoquée par un manque d'oxygène. Il a été montré que des ligands bivalents (**figure 33**), réunissant un agoniste pour chacun des récepteurs A1 et A3, possèdent un effet protecteur du muscle cardiaque supérieur à l'effet protecteur obtenu avec deux ligands monovalents co-administrés¹⁶⁵.

Cette figure ne peut pas être diffusée en accès libre.
Merci de consulter la publication d'origine (référence ci-dessous).

Figure 32. Structure cristalline du complexe acétylcholinestérase d'électrocyte de *Torpedo californica* / (S,S)-(-)-bis(10)-hupyridone (d'après Wong *et al.* ¹⁶⁴).

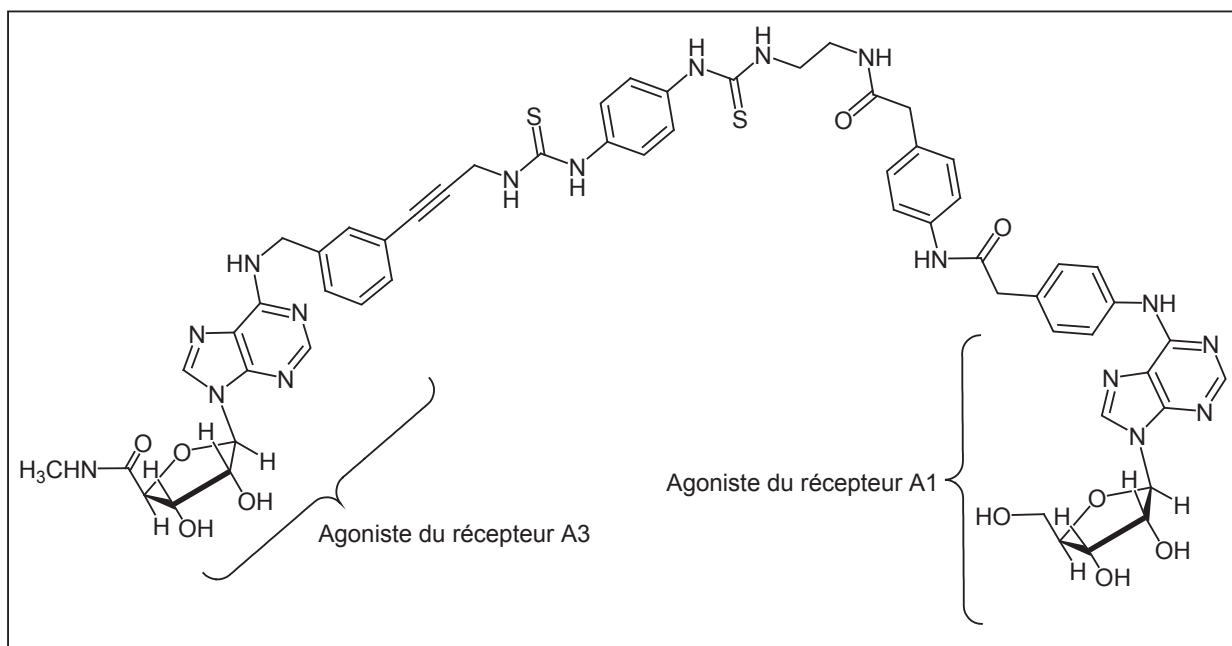


Figure 33. Exemple du MRS1741, ligand bivalent agoniste des récepteurs A1 et A3.

3. Les ligands bivalents de la Pgp dans la littérature

La Pgp est constituée de deux fragments homologues, répétés en tandem. Cette structure est idéale pour concevoir des ligands homo-bivalents, susceptibles d'interagir avec deux sites identiques en même temps. Quelques études, assez récentes, ont décrit de tels ligands.

- **Les dimères de stipiamide**¹⁶⁶

La stipiamide est un antibiotique d'origine fongique, qui a montré une certaine activité inhibitrice vis-à-vis de la Pgp. L'activité inhibitrice d'homodimères de stipiamide, où deux motifs stipiamide sont reliés par un bras polyéthylène glycol de longueur variable, s'est avérée dépendante de la longueur de ce bras. Les auteurs ont évalué plusieurs paramètres : l'augmentation de l'accumulation d'agents anticancéreux dans des cellules multichimiorésistantes, l'inhibition de la liaison de photomarqueurs d'affinité de la Pgp, et l'inhibition de l'activité ATPasique. Les résultats ont mis en évidence une longueur optimale de bras de 35 Å correspondant à $n = 8$ (**figure 34**). Enfin, cette étude a montré que les meilleurs bivalents avaient une affinité 11 fois plus importante pour la Pgp que le monomère de stipiamide.

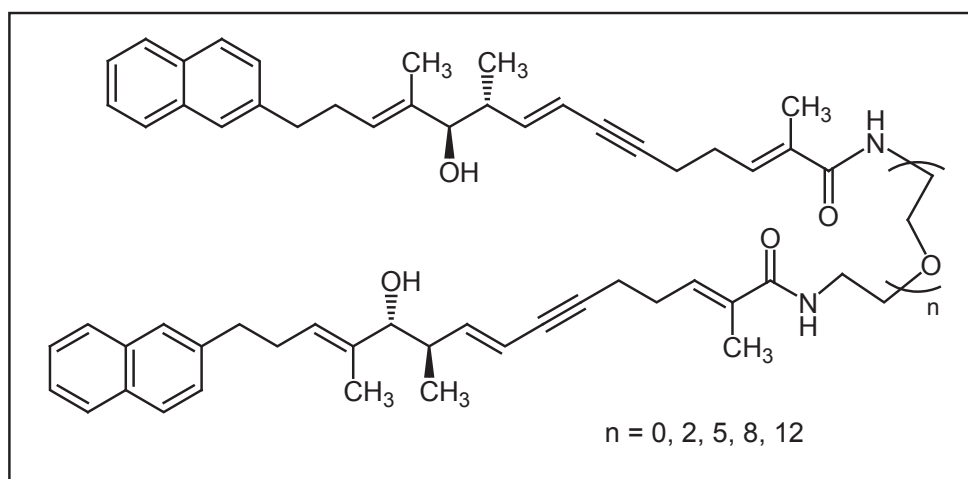


Figure 34. Homodimères de stipiamide.

- **Les dimères d'émétine**¹⁶⁷

L'émétine est un alcaloïde, extrait de l'Ipéca, qui inhibe la Pgp. Cet effet inhibiteur a pu être amélioré en synthétisant des homodimères d'émétine. Comme dans le cas de la stipiamide, la longueur du bras espaceur est un facteur déterminant dans l'efficacité des

bivalents. Toutefois, la longueur optimale du bras des dimères d'émétine s'est avérée moins importante que dans le cas de la stipiamide (10 Å correspondant à $n = 2$ dans la **figure 35** contre 35 Å). Enfin, les bras polyméthylènes ont permis d'améliorer l'efficacité de ces dérivés bivalents par rapport à celle observée pour l'émétine, alors que l'utilisation de bras à caractère hydrophile (comme les chaînes polyéthylène glycol utilisées dans les dimères de stipiamide) a diminué voire supprimé cet effet inhibiteur. Au vu de ces résultats, les auteurs ont conclu que les sites de liaison de l'émétine étaient situés dans un environnement différent de ceux de la stipiamide.

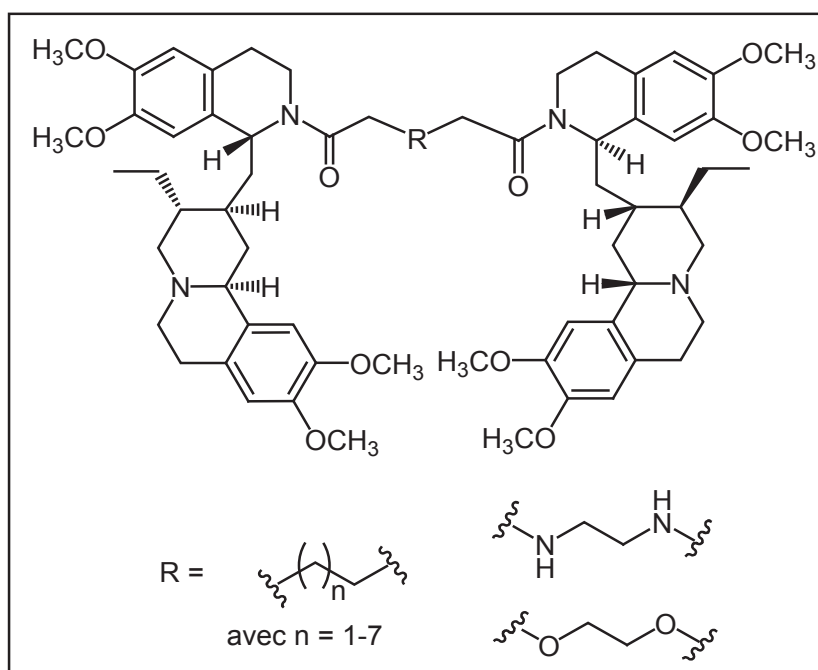


Figure 35. Homodimères d'émétine

- Les dimères de flavonoïdes ^{168, 169}

Certains de ces polyphénols d'origine naturelle ont une activité inhibitrice de la Pgp. Toutefois le mécanisme d'action peut être différent d'un flavonoïde à l'autre : les plus polaires sont supposés interagir avec les domaines NBD de la Pgp et inhiber l'activité ATPasique, tandis que les moins polaires pourraient être des substrats compétitifs qui se lieraient aux sites de liaison des substrats de la Pgp. Chan *et al.* ont synthétisés des dimères de dérivés d'apigénine et ont pu améliorer l'activité observée pour le monomère. Les auteurs ont fait varier la longueur de la chaîne PEG, la nature des substituants sur le noyau A, ainsi que le point d'attache du bras espaceur, pour finalement obtenir un dimère (**figure 36**) possédant, selon l'agent anticancéreux utilisé, une activité 10 à 40 fois plus importante

que l'apigénine elle-même. L'absence d'inhibition de l'activité ATPasique de ces dimères suggère qu'ils interagiraient avec les domaines transmembranaires de la Pgp plutôt qu'avec les domaines NBD.

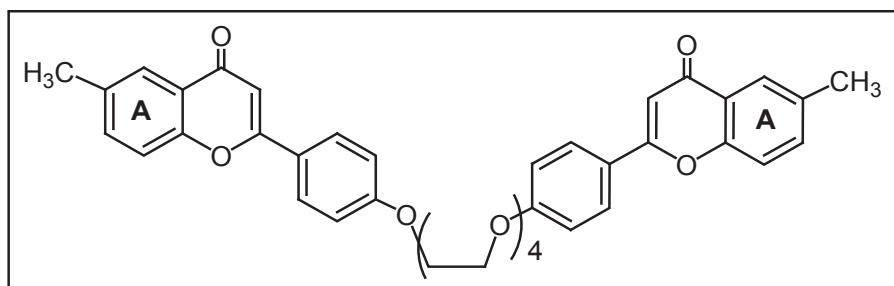


Figure 36. Homodimère de dérivé d'apigénine.

- **Les dimères de quinine et de quinidine**

Pires *et al.*¹⁷⁰ ont choisi de relier les deux monomères au bras espaceur par l'intermédiaire d'un groupement ester dans le but de favoriser l'élimination de ces dimères après hydrolyse de cette fonction, et ainsi de limiter l'apparition d'une toxicité additionnelle par rapport à celle observée pour les monomères. Cette étude a montré que certains dimères possédaient une activité significativement meilleure que celle des monomères, notamment un dimère de quinine comportant un bras polyméthylène à 8 chaînons (**figure 37**), 3000 fois plus actif que la quinine, qui a rendu leur complète sensibilité à des cellules cancéreuses résistantes au paclitaxel.

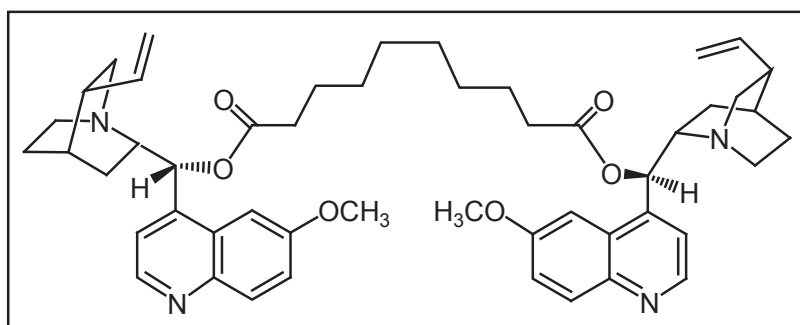


Figure 37. Homodimère de quinine.

- **Les dimères inspirés du vérapamil et de la pervilleine A**

Teodori *et al.*¹⁷¹ ont proposé une nouvelle approche pour l'élaboration d'inhibiteurs de la Pgp. Les auteurs se sont basés sur deux observations :

- ↳ Des études indiquent la présence d'une grande concentration d'acides aminés à chaîne latérale aromatique et d'acides aminés donneurs ou récepteurs de liaisons hydrogène dans la cavité centrale de la Pgp.
- ↳ La structure de deux inhibiteurs connus de la Pgp, le vérapamil et la pervilleine A, comprend deux résidus aromatiques (H1 et H2), reliés par un bras contenant un atome d'azote protonable (L) (**figure 38**).

Cette figure ne peut pas être diffusée en accès libre.
Merci de consulter la publication d'origine (référence ci-dessous).

Figure 38. D'après Teodori *et al.* ¹⁷¹, des molécules flexibles comportant des noyaux aromatiques séparés par différentes longueurs de bras peuvent s'adapter et se lier au site de reconnaissance de la Pgp avec une plus grande affinité.

Les auteurs ont alors conçu une nouvelle série de molécules qui, en plus de posséder les caractéristiques de la plupart des pharmacophores des substrats ou inhibiteurs connus de la Pgp (noyaux aromatiques et azote protonable), sont flexibles (**figure 39**). L'étude de l'inhibition de l'activité de la Pgp a montré que les produits étudiés étaient des inhibiteurs de la Pgp, et que leur activité devenait maximale pour une longueur du bras espaceur de l'ordre de 22 Å. Il a été montré également que la présence de noyaux anthracène ou fluorène et de groupements méthoxy augmentait l'affinité de liaison. De plus, ces travaux ont démontré que, lors de la liaison à la protéine, la perte d'entropie due à la flexibilité de ces molécules était compensée par une adaptation plus aisée des composés au site de liaison.

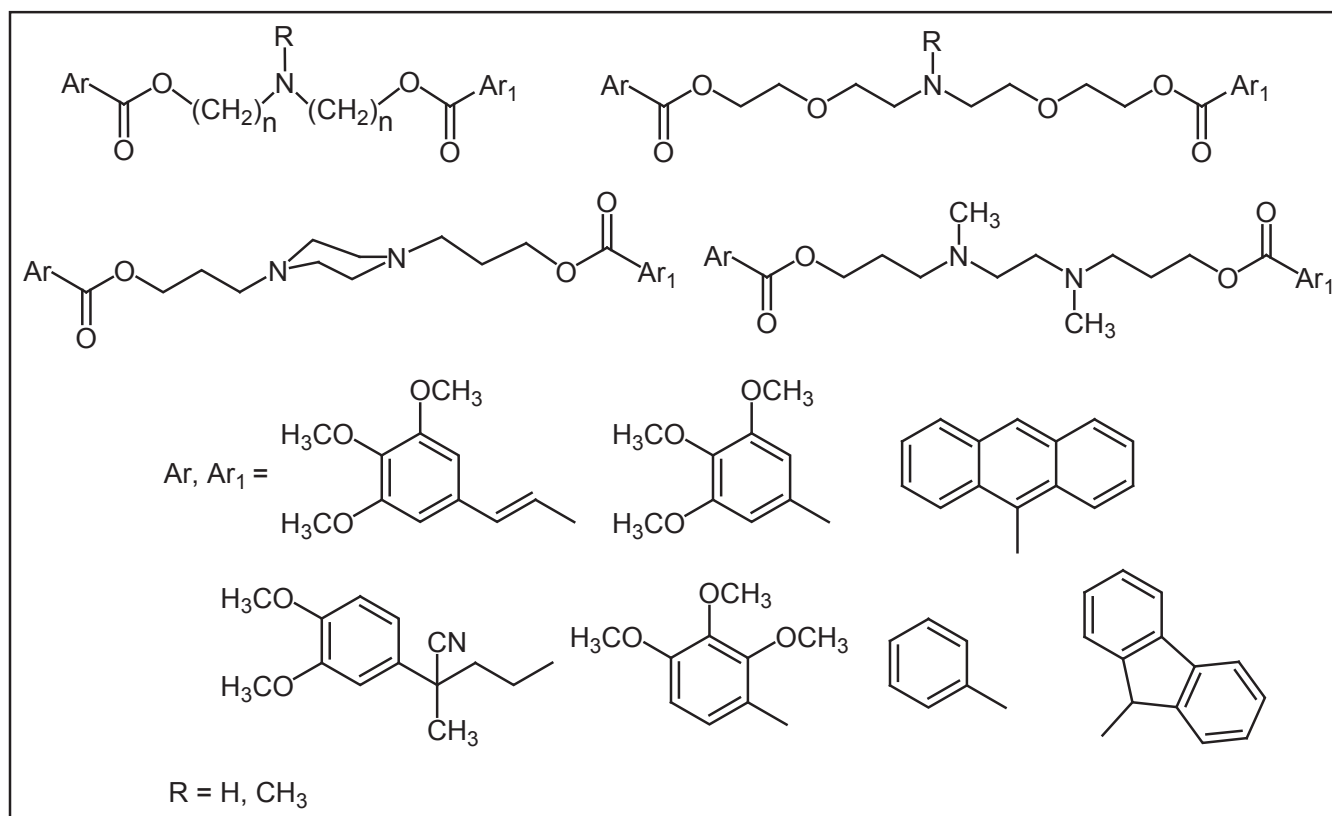


Figure 39

4. Conception, synthèse et évaluation biologique de dérivés bivalents progestérone-adénine comme inhibiteurs potentiels de la P-glycoprotéine

Lors de l'intégration de notre équipe dans l'unité Inserm U863 (dir. Pr. Michel Pugeat), le laboratoire a orienté un de ses axes de recherche vers la synthèse de ligands hétéro-bivalents susceptibles de se lier simultanément au site à stéroïdes et au site à ATP de la Pgp. En effet, plusieurs études ont suggéré la proximité de ces deux sites (*cf.* chapitre 1, § 1.3.3.).

Un ligand bivalent est susceptible de posséder une affinité plus forte et d'être plus spécifique de la protéine considérée qu'un dérivé monovalent^{172, 173}. L'inhibition de l'activité ATPasique par un analogue de l'ATP, couplée à une liaison au site des stéroïdes (connue pour inhiber la Pgp même si le mécanisme reste peu clair) permettrait donc de bloquer l'activité de la Pgp d'une manière la plus spécifique possible. Ainsi, la nature bivalente de ces inhibiteurs, en plus d'augmenter l'affinité du ligand pour la Pgp, diminuerait le risque de

liaison à d'autres protéines ou récepteurs analogues, tels que les récepteurs des hormones stéroïdes ou les autres transporteurs de la famille des ABC.

Nous avons alors entrepris de synthétiser des molécules bivalentes contenant un dérivé de progestérone relié à l'adénine par un bras (**figure 40**).

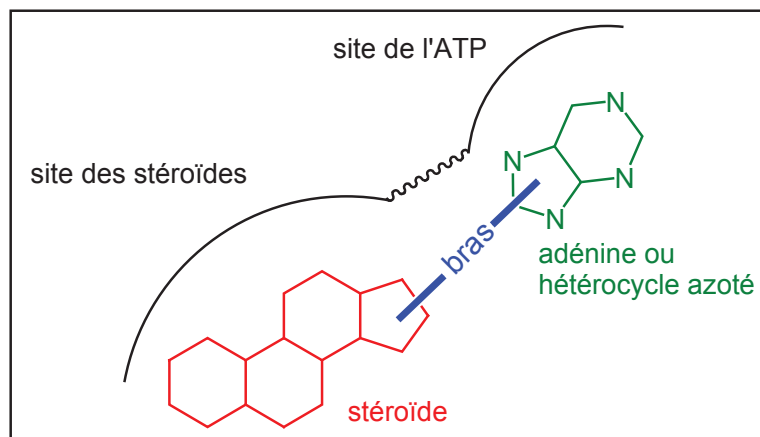


Figure 40

Historiquement, la progestérone est le premier stéroïde à avoir montré une activité inhibitrice vis-à-vis de la Pgp, sans toutefois être transportée par cette dernière, ce qui a permis d'avancer l'hypothèse de l'existence d'un site de liaison des stéroïdes distinct (cf. chapitre1, § 1.3.3.). L'adénine, quant à elle, est le ligand naturel des sites à ATP, cependant caractérisée par une faible affinité. Néanmoins, du fait même de leurs faibles activités, la progestérone et l'adénine vont constituer des monomères intéressants pour la conception de modulateurs hétéro-bivalents de la Pgp. En effet, ces deux synthons vont nous permettre d'optimiser la nature et la longueur du bras espaceur en vue d'obtenir les inhibiteurs les plus affins possibles. Enfin, la progestérone et l'adénine sont toutes deux disponibles commercialement, et offrent différentes possibilités d'ancrage du bras espaceur selon des procédés généralement bien connus.

Nous avons choisi de relier ces deux motifs par l'intermédiaire d'une fonction amide secondaire. En effet, les liaisons amides sont assez stables en milieu biologique, et il existe plusieurs méthodes chimiques disponibles pour effectuer des couplages peptidiques.

4.1. Synthèse des ligands bivalents adénine-progestérone

4.1.1. Fonctionnalisation de la progestérone

Afin d'obtenir des inhibiteurs de la Pgp plus affins et plus spécifiques, nous avons décidé de faire varier l'orientation du stéroïde dans son site de liaison en synthétisant deux séries de ligands bivalents qui diffèrent par la position du point d'ancrage du bras sur la progestérone : une première série en C20 et une deuxième en C7.

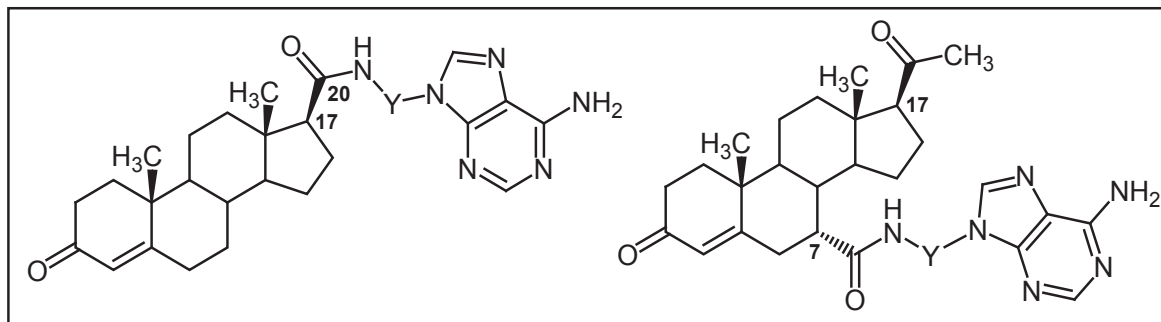


Figure 41. Ligands hétéro-bivalents cibles.

La série des dérivés bivalents en C7 a été choisie par analogie avec les inhibiteurs de Pgp développés par Leonessa *et al.*¹⁷⁴ dont la molécule phare est représentée dans la **figure 42**.

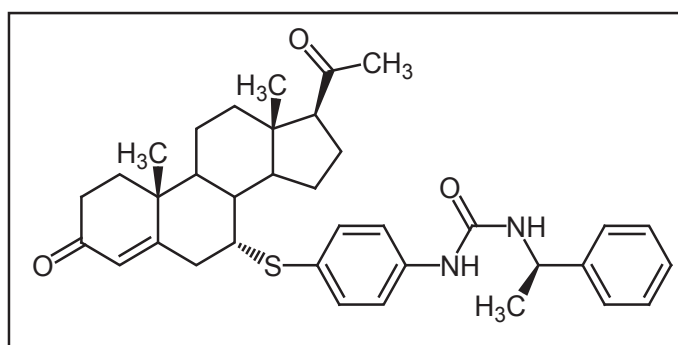


Figure 42. Dérivé de progestérone substitué en C7 inhibiteur de Pgp.

En vue d'un couplage peptidique entre le motif stéroïde et l'adénine, il était nécessaire d'introduire une fonction acide carboxylique sur la progestérone en position C17 et C7.

- **Introduction d'une fonction acide carboxylique en C17**

Pour accéder aux dérivés bivalents en C20, notre attention s'est naturellement portée sur le groupement méthylcétone porté par le carbone 17 de la progestérone. La réaction haloforme reste la méthode la plus couramment utilisée pour transformer ce groupement

en acide carboxylique même si d'autres procédés utilisant des conditions plus douces ont été développés pour pouvoir être appliqués à des stéroïdes baso-sensibles¹⁷⁵.

La réaction haloforme appliquée à la progestérone a été décrite en détail par Bessard *et al.*¹⁷⁶ et constitue une méthode directe pour obtenir l'acide carboxylique correspondant **(29)**. L'hypobromite de sodium (NaOBr) est préparé *in situ* à basse température par action d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium sur le dibrome sous atmosphère inerte. Ce réactif est ensuite rapidement additionné, à 0°C, sur l'énolate de la progestérone engendré en milieu basique. Après un traitement réducteur par Na₂SO₃, l'acide carboxylique **(29)** est obtenu par précipitation après acidification de la phase aqueuse avec 57% de rendement. Le composé **(29)** s'est avéré d'une pureté suffisante pour être directement utilisé dans la suite de la synthèse.

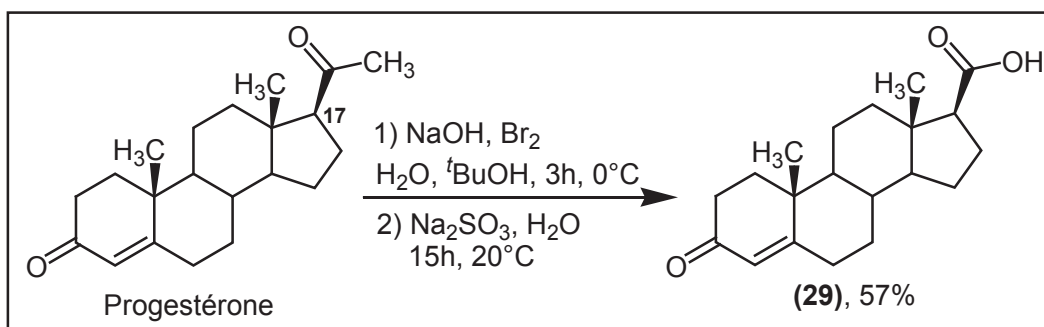


Schéma 33

- **Introduction d'une fonction acide carboxylique en C7**

L'acide **(30)** a été obtenu selon le *schéma* rétrosynthétique **34** où le cyanure **(32)** constitue l'intermédiaire clé de la synthèse.

Les dérivés de progestérone substitués en position 7 sont généralement obtenus par addition-1,6 d'un nucléophile sur la Δ^6 -progestérone **(31)**, elle-même obtenue par oxydation de la progestérone.

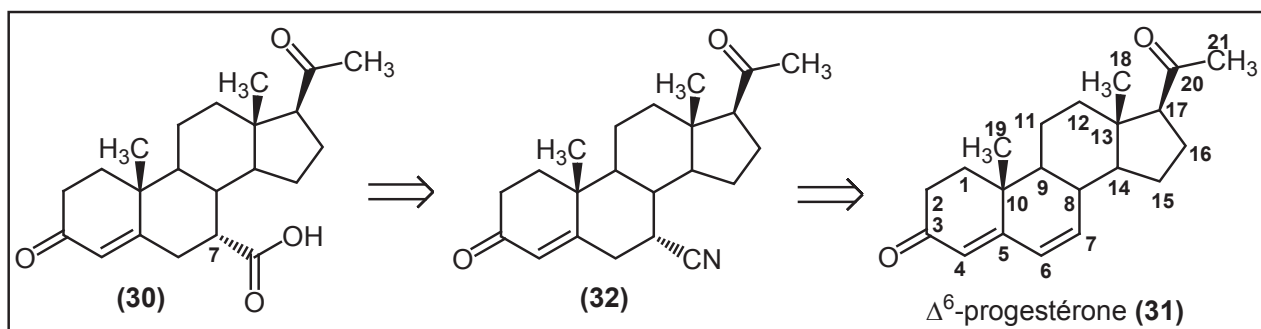
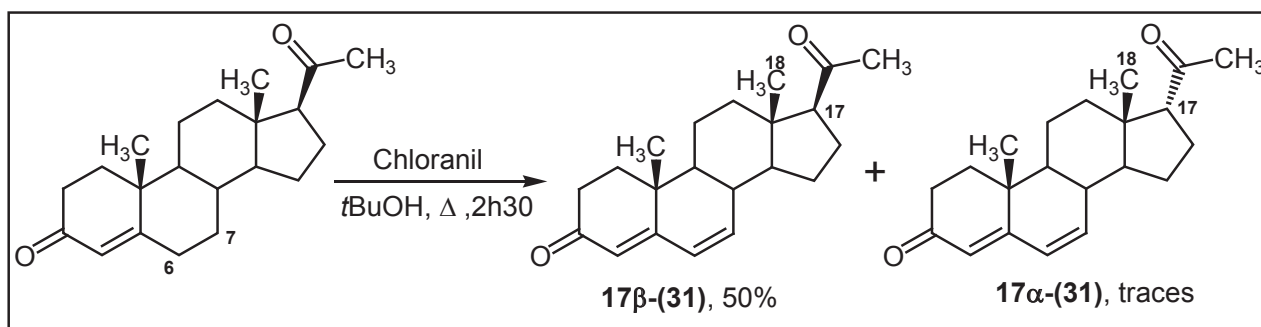


Schéma 34

La déshydrogénation des Δ^4 -3-céto stéroïdes a été décrite en présence de plusieurs oxydants. Parmi les plus utilisés, on trouve la tetrachloro-*p*-benzoquinone (ou chloranil). Cette réaction décrite par Agnello *et al.*¹⁷⁷ en 1957, a été menée dans différents solvants (toluène, xylène, *tert*-butanol, etc...), parfois en présence d'un catalyseur acide (souvent l'acide *p*-toluène sulfonique) qui favorise l'énolisation de la cétone α,β -insaturée. Les rendements obtenus s'échelonnent entre 40% et 80% selon le stéroïde.

La 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (ou DDQ) a été également mise en œuvre comme agent oxydant en utilisant l'acide chlorhydrique gazeux anhydre comme catalyseur. Ces conditions réactionnelles permettent d'obtenir majoritairement le dérivé 4,6-diène, et limitent la formation des dérivés polyconjugués de type 1,4-diène ou 1,4,6-triène¹⁷⁸.

Pour notre part, nous avons choisi d'oxyder la progestérone par le chloranil dans le *tert*-butanol utilisé comme solvant (**schéma 35**). Le mélange est chauffé au reflux jusqu'à disparition totale du stéroïde de départ. Le suivi de la réaction a été réalisé, non pas par chromatographie sur couche mince puisque le produit d'oxydation possède une polarité très proche de celle de la progestérone, mais par spectrométrie UV. Des prélèvements successifs ont alors été effectués et les spectres ultraviolets enregistrés, après filtration préalable du mélange réactionnel sur alumine et dilution dans l'éthanol. Le spectre UV a montré la disparition du pic d'absorption à 240 nm, caractéristique de la progestérone, et l'apparition d'un pic à 280 nm, caractéristique des stéroïdes 4,6-diène.



A l'issue de la réaction, aucun produit 1,4-diène ou 1,4,6-triène n'a été isolé, toutefois, leur formation n'est pas exclue. Par contre, l'oxydation a également conduit à la formation très minoritaire de l'épimère 17α de la Δ^6 -progestérone qui a rendu la purification de cette dernière difficile : plusieurs chromatographies sur gel de silice ont été nécessaires pour finalement isoler le dérivé **17β-(31)** avec une pureté satisfaisante mais un rendement moyen de 50%.

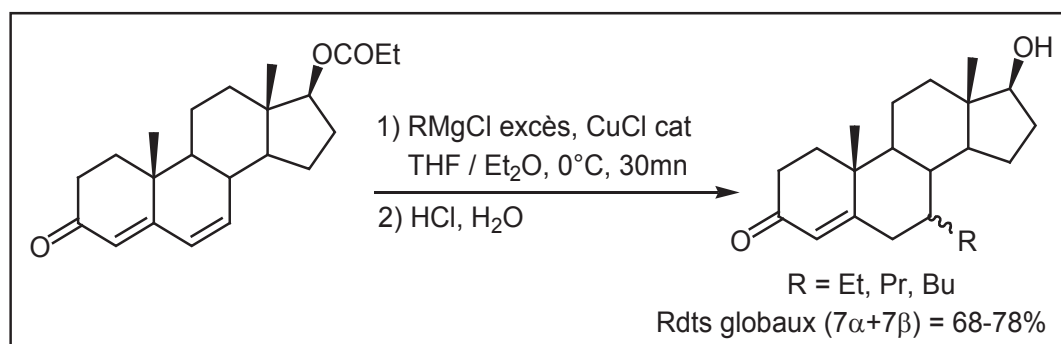
La structure de **17α-(31)** a pu être confirmée par spectrométrie RMN. En effet, par comparaison des spectres RMN ^1H enregistrés dans CDCl_3 , on constate que les signaux des protons du CH_3 -18 ($\delta = 0,96$ ppm) et H-17 ($\delta = 2,82$ ppm) de l'épimère **17α-(31)** sont significativement déblindés par rapport aux mêmes protons chez **17β-(31)** : $\delta(\text{CH}_3\text{-18}) = 0,70$ ppm et $\delta(\text{H-17}) = 2,55$ ppm¹⁷⁹. En RMN ^{13}C , les variations les plus significatives ont été constatées au niveau du carbone C17, centre de l'épimérisation : $\text{C17}[\text{17}\alpha\text{-(31)}] = 60$ ppm et $\text{C17}[\text{17}\beta\text{-(31)}] = 63$ ppm.

L'épimérisation des stéroïdes en position 17 est un processus connu qui se produit en milieu acide ou basique *via* la formation de l'énol ou de l'énolate de la méthylcétone. Dans des conditions équilibrantes, l'épimère 17β est généralement majoritaire dans une proportion de 75/25 ($17\beta/17\alpha$)¹⁸⁰.

Le schéma rétrosynthétique prévoyait ensuite de synthétiser le cyanure (**32**) à partir de la Δ^6 -progestérone **17β-(31)**. Plusieurs réactions d'addition-1,6 appliquées aux $\Delta^{4,6}$ -3-céto stéroïdes pour conduire à des dérivés substitués en position 7 ont été répertoriées dans la littérature :

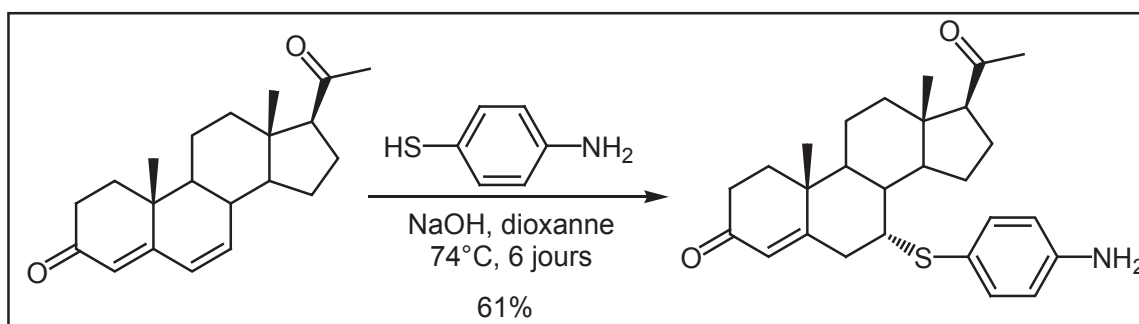
- Addition d'organocuprates

Les organocuprates sont préparés *in situ* à partir d'organomagnésiens et de chlorure cuivreux (CuCl) ou de iodure cuivreux (CuI). Ils sont ensuite mis en réaction avec les dérivés $\Delta^{4,6}$ -3-cétostéroïdes pour conduire à un mélange de diastéréoisomères avec l'isomère alkylé en 7α majoritaire. La séparation des deux isomères 7α et 7β est facilitée puisque seul l'isomère 7β peut subir une ré-oxydation par le chloranil pour donner une nouvelle diénone alkylée $\Delta^{4,6}$ -3-céto-7-alkyl ^{181, 182}.

Schéma 36 ¹⁸²

- Addition de thiols

Les thiols s'additionnent avec de bons rendements (60-80%) sur les $\Delta^{4,6}$ -3-céto stéroïdes ^{174,183,184,185}. La réaction est effectuée en milieu basique, et conduit stéréosélectivement à l'isomère 7α .

Schéma 37 ¹⁷⁴

- Hydrocyanation

L'addition d'un cyanure de sodium ou de potassium conduit à un mélange des deux diastéréoisomères 7α et 7β ¹⁸⁶. Cette absence de stéréosélectivité est probablement le résultat d'une épimérisation due aux conditions réactionnelles (chauffage) et à la basicité relative des sels de cyanure. Par contre, il a été montré que l'utilisation de cyanures

d'alkylaluminium, tel que $(\text{Et})_2\text{AlCN}$, conduit au seul isomère 7α . La formation de cet isomère résulte d'une attaque axiale du cyanure favorisée par un recouvrement orbitalaire avec les orbitales π de la diènone¹⁸⁷. De plus, les conditions douces de la réaction empêchent une épimérisation ultérieure.

Dans l'objectif d'introduire une fonction acide carboxylique en position 7α de la progestérone, nous avons effectué l'hydrocyanation de la Δ^6 -progestérone selon une méthode décrite pour un stéroïde analogue¹⁸⁸. La réaction a été effectuée dans un mélange THF/toluène, à température ambiante, en présence d'un excès de cyanure de diéthylaluminium pour obtenir le cyanure **(32)** avec un bon rendement :

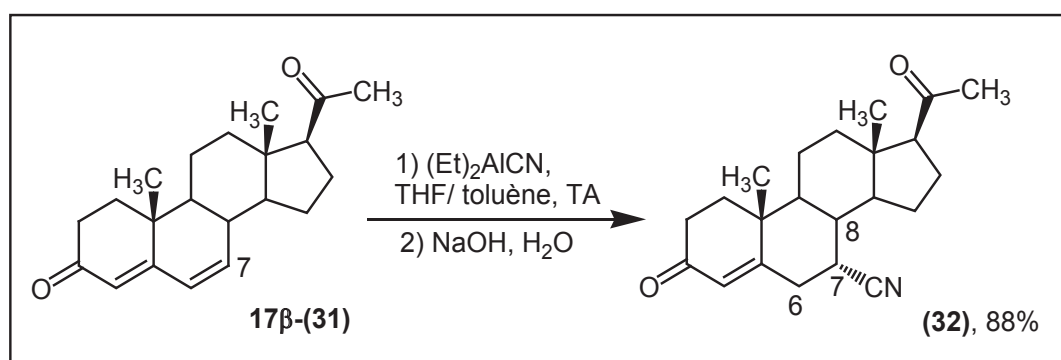


Schéma 38

Comme attendu, cette réaction d'hydrocyanation a conduit à un seul stéréoisomère. La stéréochimie 7α du cyanure **(32)** a été confirmée par l'étude du spectre RMN ^1H . En effet, le signal à $\delta = 3,01$ ppm correspondant au proton H7 présente une largeur à mi-hauteur de 8,30 Hz, ce qui est caractéristique d'un proton équatorial et exclut la présence de couplages de type axial-axial (*figure 43*).

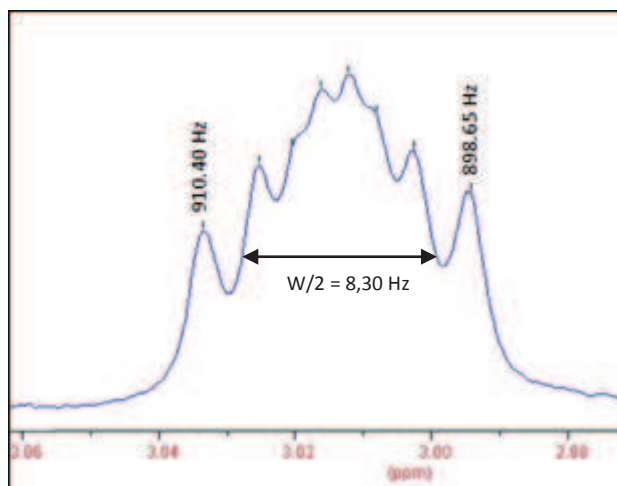
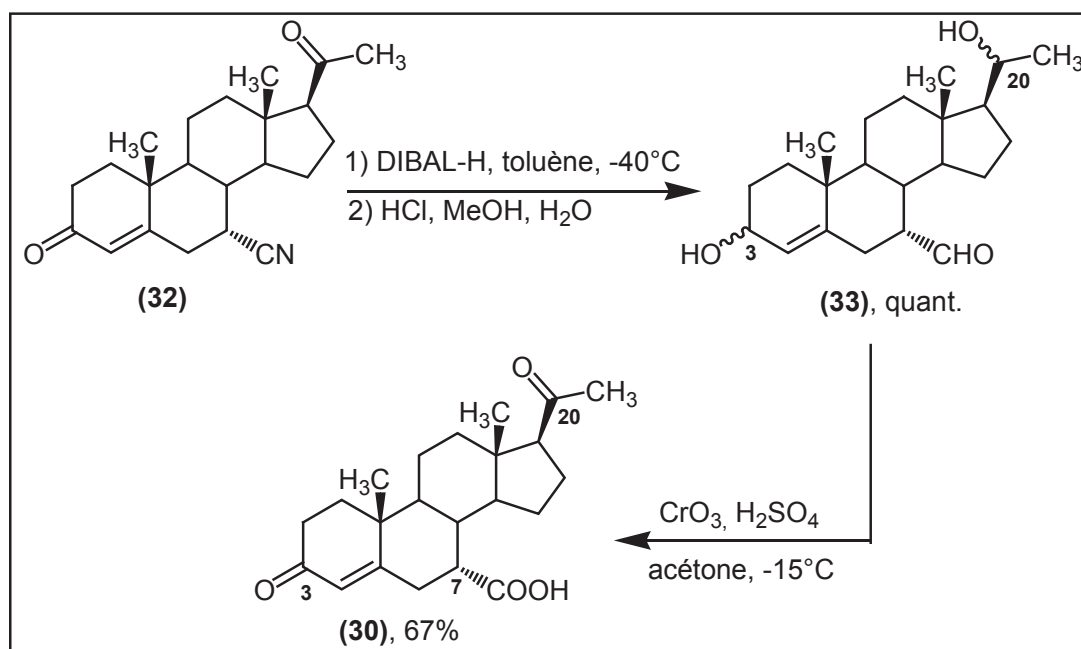


Figure 43. Multiplet correspondant au proton H-7 β dans le composé **(32)**.

La synthèse s'est poursuivie par la réduction du cyanure **(32)** en présence d'hydruure de diisobutylaluminium (DIBAL-H). La réaction a été conduite dans le toluène anhydre, à -40°C , pour obtenir quantitativement l'aldéhyde **(33)** sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères du fait de la réduction concomitante des fonctions cétones en positions 3 et 20. La RMN du proton du mélange montre clairement l'apparition de signaux correspondant aux protons aldéhydiques des différents isomères.



Le mélange **(33)** a finalement été mis en œuvre, sans purification supplémentaire, dans une oxydation de Jones (CrO_3 , H_2SO_4), à basse température, pour obtenir une fonction acide

carboxylique en 7α et régénérer les deux fonctions cétones en 3 et en 20. L'acide **(30)** a été isolé par précipitation en milieu aqueux acide avec un rendement satisfaisant sous la forme d'un unique isomère.

4.1.2. Synthèse des dérivés adénine-bras-NH₂

Dans cette partie, nous allons décrire la synthèse des différents dérivés adénine-bras-NH₂ qui vont constituer les précurseurs directs des composés cibles. Les dérivés adénine-bras-NH₂ sont issus du couplage des bras espaceurs à l'adénine. Les différents bras envisagés (**figure 44**) devront donc comporter deux fonctions terminales différentes : l'une de type alcool qui rendra possible le couplage à la purine, l'autre de type amine primaire permettant de procéder au couplage peptidique avec les acides **(29)** et **(30)**. Notre choix s'est porté vers la synthèse de 7 bras comportant tous une structure centrale carbonée mais de longueur et surtout de flexibilité variables.

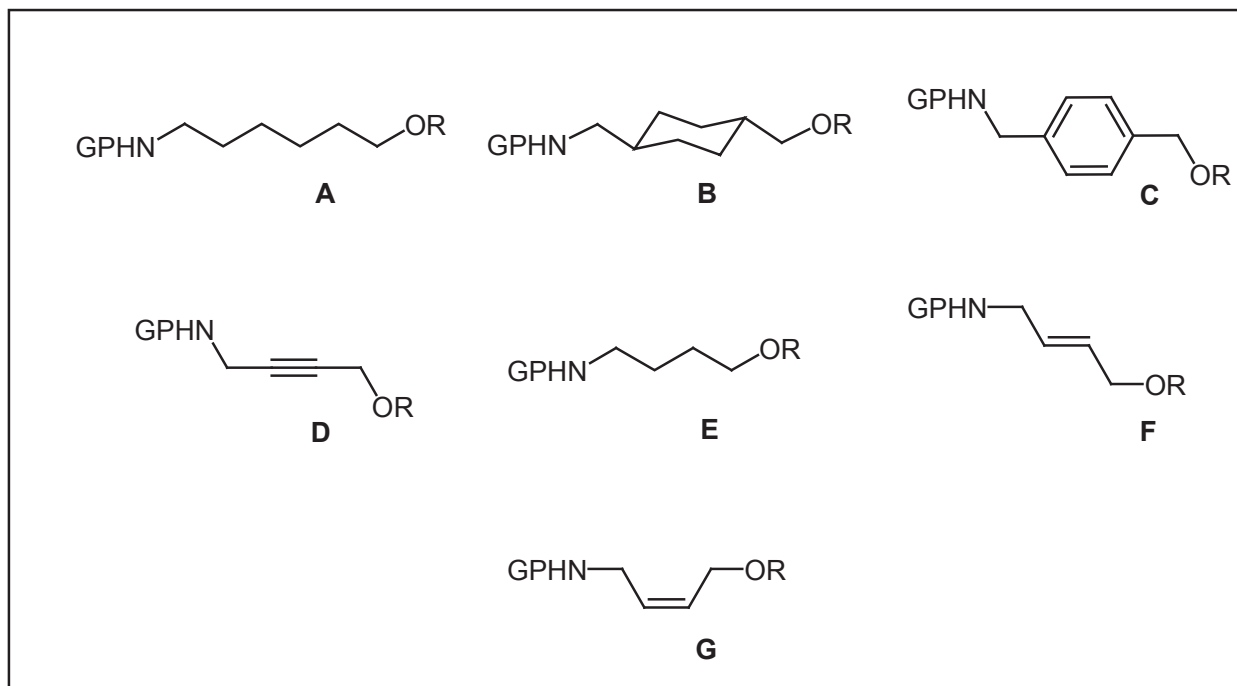
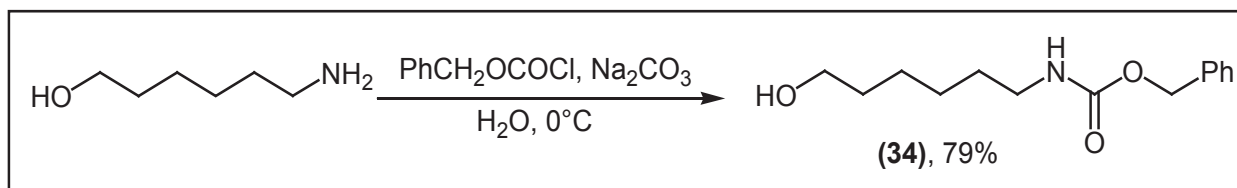


Figure 44. Structures de bras envisagées.

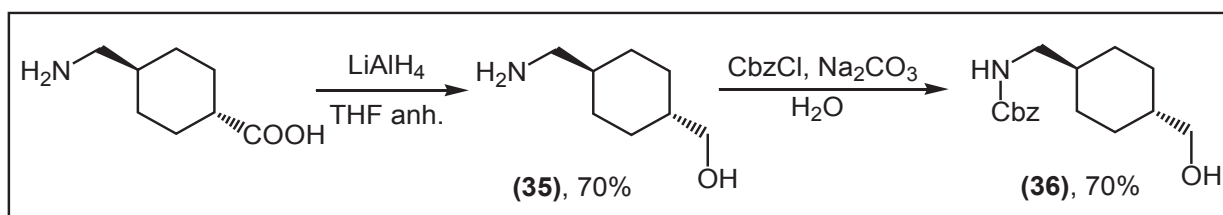
- **Synthèse des bras A,B et C, et leur couplage à l'adénine :**

Le bras **A** comportant une chaîne hexaméthylénique a été facilement préparé à partir du 6-aminohexan-1-ol commercial par simple protection de la fonction amine sous forme de

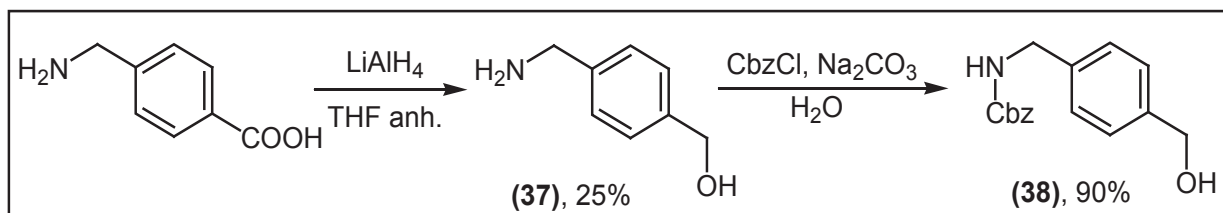
carbamate de benzyle. L'amino alcool protégé **(34)** a été obtenu avec un bon rendement (79%) après recristallisation dans le cyclohexane.



Les bras **B** et **C** contenant des structures cycliques ont ensuite été préparés en utilisant comme précurseurs les amino acides correspondants, commercialement disponibles. Le bras de type cyclohexyle **(36)** a été facilement synthétisé à partir de l'acide *trans*-4-(aminométhyl)cyclohexane carboxylique, par réduction de la fonction acide carboxylique en alcool primaire suivie de la protection de l'amine sous forme de carbamate de benzyle (*schéma 41*).



Le bras **(38)**, contenant un noyau phényle, a été synthétisé selon la même séquence réactionnelle, à partir de l'acide *p*-(aminométhyl)benzoïque, commercial, avec un rendement global plus faible que celui obtenu pour le dérivé **(36)**. En effet, dans ce cas, nous avons rencontré des difficultés pour purifier l'amino alcool **(37)**.



Nous avons ensuite procédé aux couplages des bras **(34)**, **(36)** et **(38)** à l'adénine par réaction de Mitsunobu. Les premiers travaux concernant l'alkylation de l'adénine par cette méthode ont été publiés par Overberger *et al.*¹⁸⁹ en 1989. Les agents activants de la

triphénylphosphine les plus souvent utilisés sont l'azadicarboxylate de diéthyle¹⁹⁰ (DEAD) ou l'azadicarboxylate de diisopropyle¹⁹¹ (DIAD), généralement dans le dichlorométhane ou le tétrahydrofurane. Enfin, la réaction de Mitsunobu est régiospécifique et ne conduit qu'aux dérivés alkylés en N9.

Ainsi, nous avons pu obtenir les dérivés **(39)**, **(40)** et **(41)**, toutefois avec des rendements moyens. La purification par chromatographie sur gel de silice de ces dérivés d'adénine s'est souvent avérée difficile ce qui a entraîné cette perte de rendement. Dans une dernière étape, le groupement Cbz des dérivés **(39)**, **(40)** et **(41)** a été éliminé par hydrogénation catalytique sur Pd/C (la pression d'hydrogène et le temps de réaction nécessaires pour que la réaction soit complète sont indiqués dans le **schéma 43**) pour accéder aux amines **(42)**, **(43)** et **(44)** avec des rendements bons à excellents.

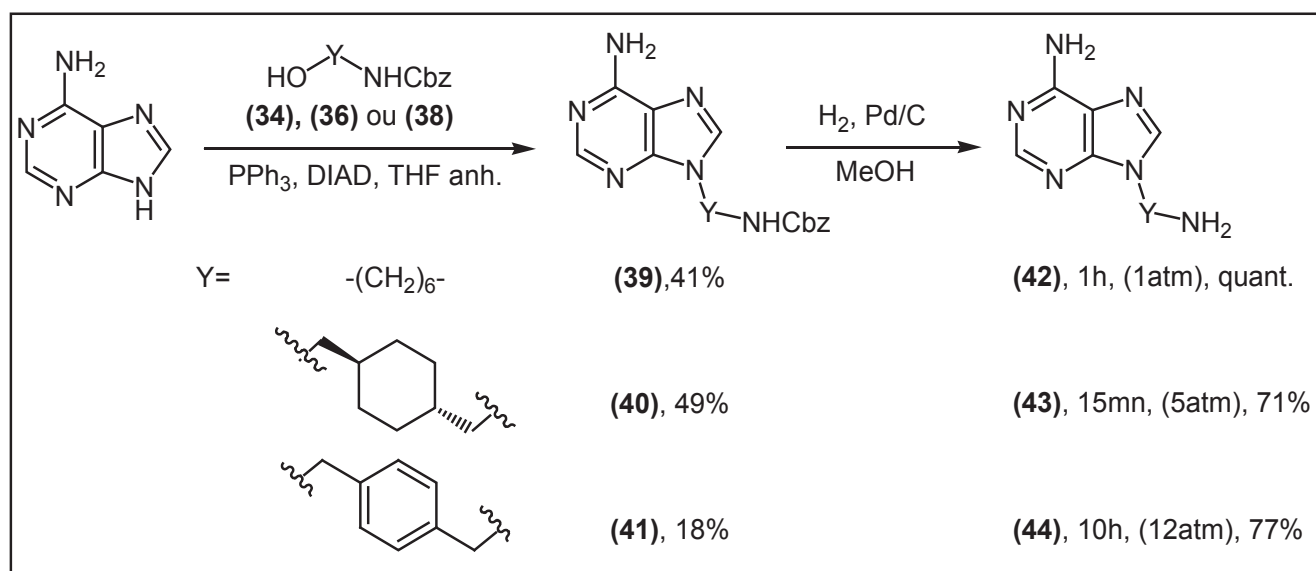


Schéma 43

- Synthèse des bras D, E, F et G et leur couplage à l'adénine :**

Nous avons pu accéder aux trois dérivés adénine-bras-NH₂ **(46)**, **(47)** et **(48)** par réduction partielle ou totale de la fonction alcyne d'un précurseur commun **(45)**.

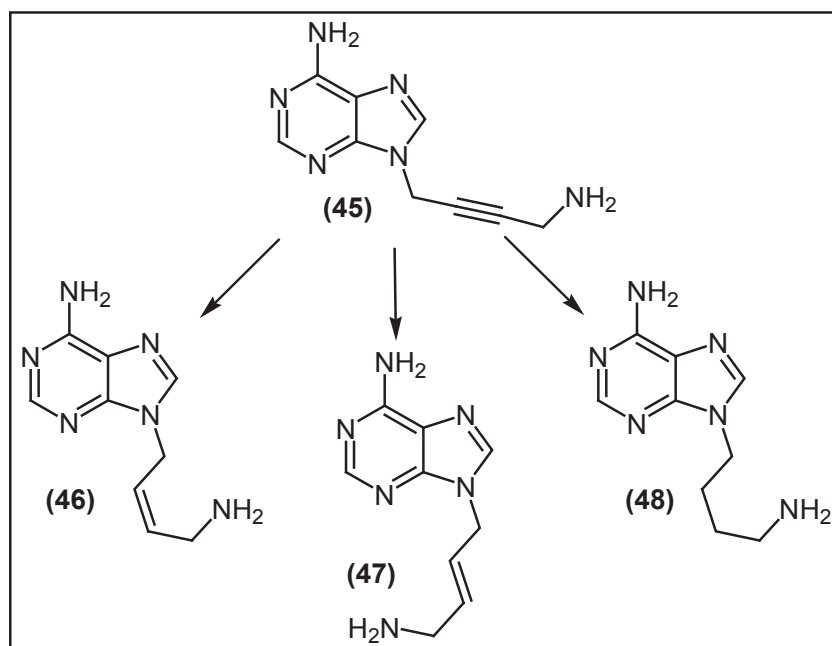


Schéma 44

Pour obtenir le composé **(45)**, nous avons dû préalablement préparer un dérivé *N*-protégé du 4-aminobut-2-yn-1-ol à partir du but-2-yn-1,4-diol commercial. Après plusieurs essais infructueux de couplage de ce bras de type amino-alcool par réaction de Mitsunobu, nous avons décidé de synthétiser le dérivé **(45)** par substitution nucléophile de l'adénine sur un mésylate propargylique (*schéma 45*).

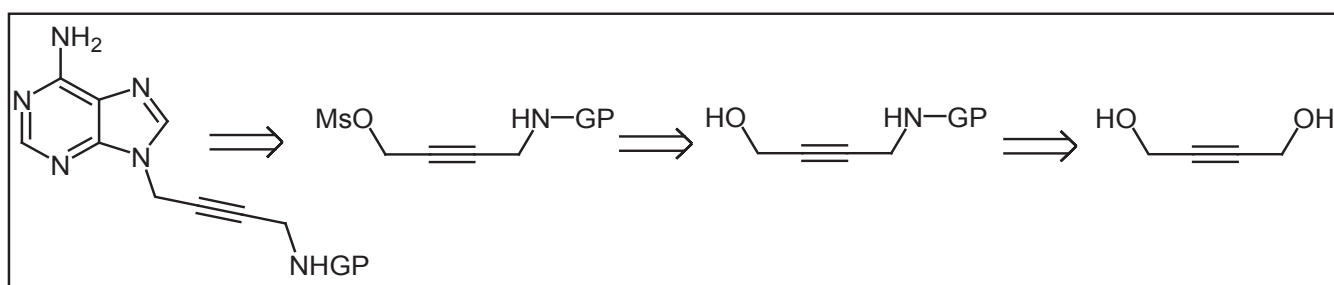


Schéma 45

L'introduction de la fonction amine sur le but-2-yn-1,4-diol commercial a été réalisée *via* une monomésylation de ce diol, suivie par un traitement par l'ammoniaque de l'alcool obtenu **(49)**. L'amino alcool **(50)** a alors pu être facilement isolé avec un bon rendement (76%) après passage sur résine basique échangeuse d'anions. L'amine a ensuite été protégée sous forme de carbamate de *tert*-butyle dans les conditions usuelles pour aboutir au

composé **(51)**. Enfin, le dérivé **(52)** est quantitativement obtenu après activation de la fonction alcool primaire de **(51)** (**schéma 46**).

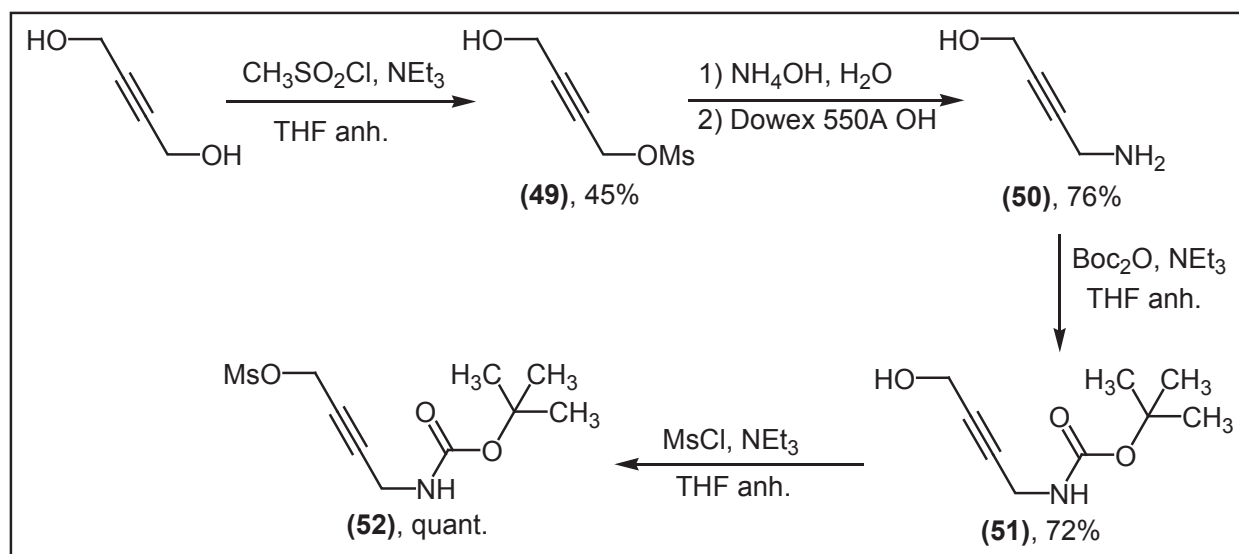


Schéma 46

Après l'obtention du mesylate **(52)**, nous avons procédé à son couplage à l'adénine par substitution nucléophile. Plusieurs bases peuvent être utilisées pour générer l'anion adéninyle, citons : l'hydruide de sodium¹⁹², le carbonate de césium¹⁹³, le carbonate de potassium ou la triéthylamine¹⁹⁴ dans un solvant polaire comme le DMF ou le DMSO. L'agent électrophile est un halogénure^{195,196} ou un ester sulfonique^{197,198,199}. Les iodures de tétra-alkylammonium ont également été utilisés pour favoriser la réaction²⁰⁰. Ces *N*-alkylations sont connues pour être régiosélectives et conduire majoritairement au produit alkylé en N9.

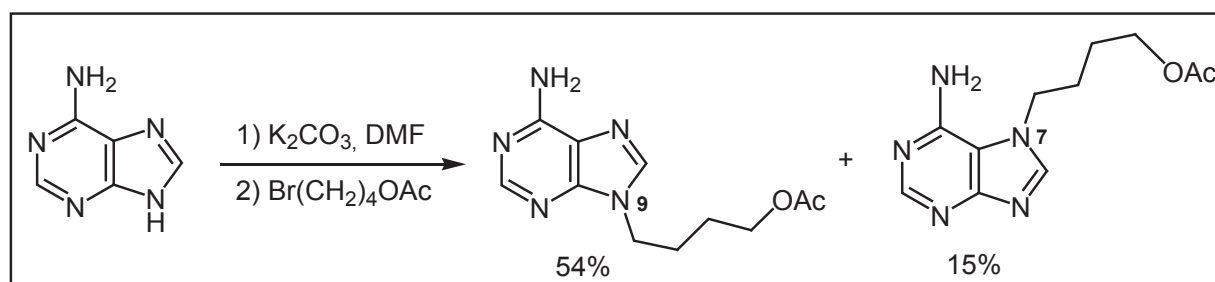


Schéma 47. D'après Volpini *et al.*²⁰¹

Le greffage du bras **(52)** sur l'adénine a alors été réalisé dans des conditions de substitution nucléophile en utilisant le carbonate de potassium dans le DMF. Après 2h30 à 75°C, la réaction a conduit régiosélectivement à l'isomère alkylé en N9 **(53)** avec un

rendement de 75%. Il est à noter qu'aucune trace d'isomère N7 n'a pu être observée. La déprotection de la fonction amine en milieu acide chlorhydrique a ensuite conduit au chlorhydrate d'amine correspondant qui a été neutralisé par passage sur la résine basique DOWEX® 550A OH pour finalement obtenir le dérivé **(45)** avec un bon rendement global (*schéma 48*).

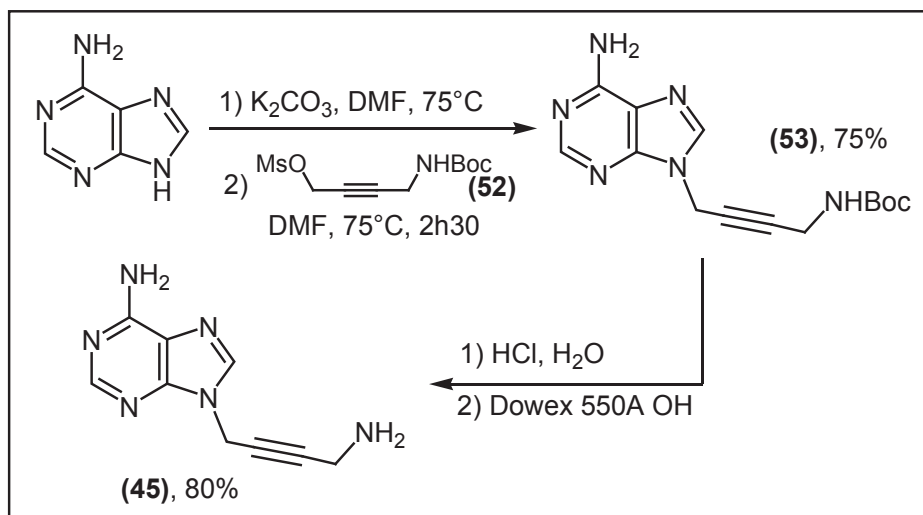


Schéma 48

Le dérivé adénine-bras-NH₂ (**45**) a alors servi de précurseur commun pour accéder aux amines **(46)**, **(47)** et **(48)** par réduction partielle ou totale de la triple liaison (*schéma 49*).

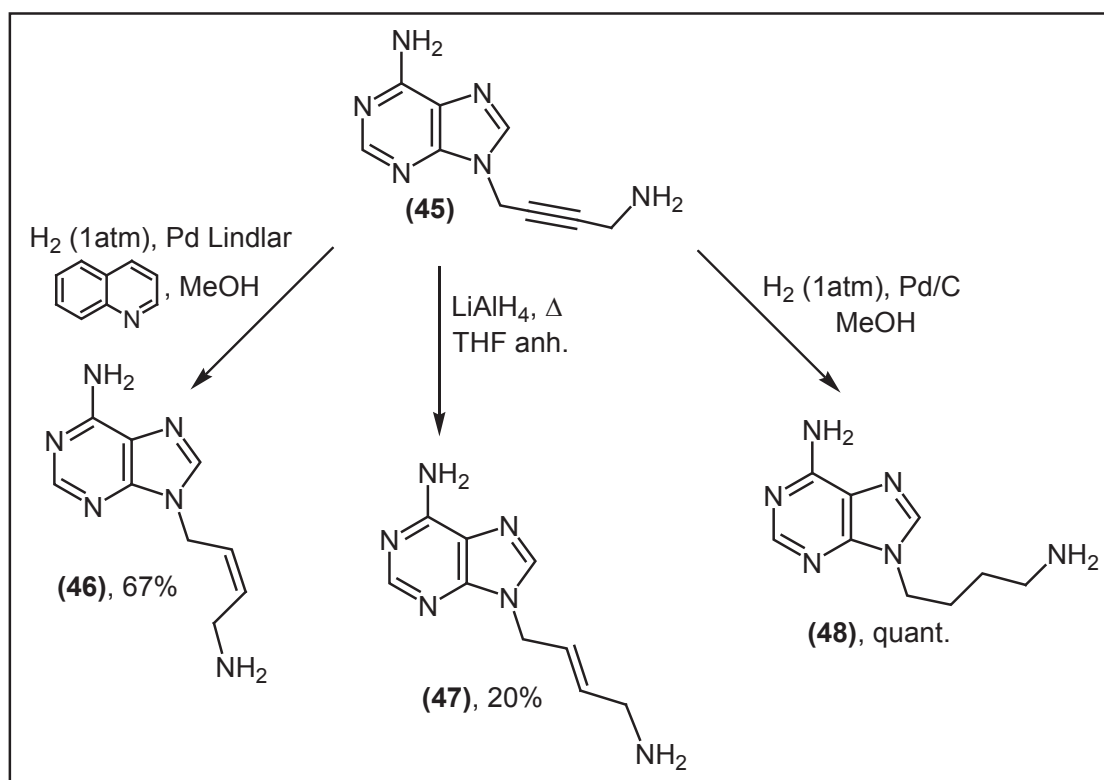


Schéma 49

L'amine allylique (**46**) de configuration Z est obtenue, avec 67% de rendement, par hydrogénation catalytique de la fonction alcyne de (**45**) en présence de palladium Lindlar et de quinoléine. La réduction de la triple liaison avec de l'hydruire de lithium et d'aluminium dans du THF à reflux a conduit, quant à elle, à l'allylamine *trans* (**47**) avec un très faible rendement (de nombreux produits de dégradation ont été observés par CCM). Enfin, l'hydrogénation catalytique sur palladium sur charbon a permis d'accéder au dérivé saturé (**48**) quantitativement.

- **Régiosélectivité de l'alkylation de l'adénine :**

Quelle que soit la méthode utilisée, la réaction de *N*-alkylation de l'adénine a toujours conduit à un seul régioisomère qui, au vu des données de la littérature, correspondait très probablement à l'isomère alkylé en position N9. Toutefois, nous avons effectué une étude RMN bidimensionnelle pour confirmer la régiosélectivité de nos produits d'alkylation. Cette étude a été réalisée sur les composés (**39**) et (**47**) issus d'une alkylation menée respectivement par réaction de Mitsunobu ou par substitution nucléophile. Les spectres HMBC (corrélation hétéronucléaire $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ longue distance, $^3J_{\text{C,H}}$) ont été enregistrés pour chacun de ces deux dérivés (*figure 45*).

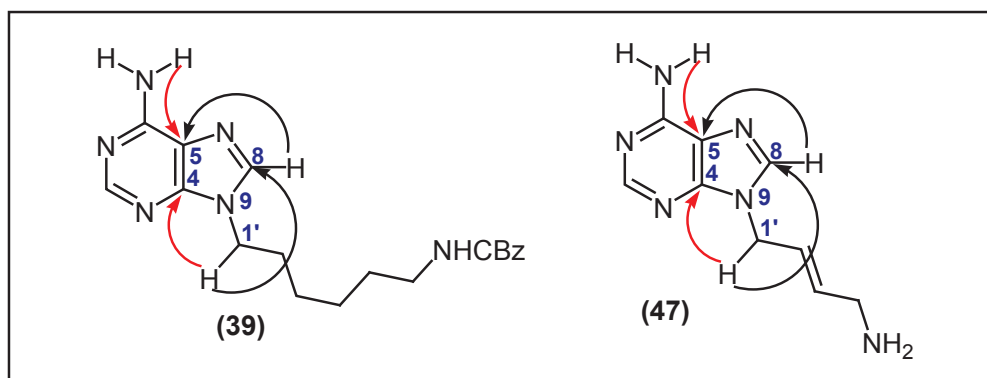


Figure 45. Corrélations $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ observées sur les spectres HMBC des dérivés (**39**) et (**47**)

Dans les deux cas, il existe une corrélation entre les protons du groupement NH_2 de l'adénine avec le carbone quaternaire C5 ($\delta = 119\text{ppm}$) alors que les protons du $\text{CH}_2(1')$ directement lié à l'adénine corrélient avec les carbones C8 et C4 (respectivement $\delta = 140\text{ ppm}$ et 149 ppm). Ces résultats sont donc en accord avec une régiosélectivité de la *N*-alkylation en faveur de l'isomère N9.

Les spectres UV de nos produits confirment également cette régiosélectivité. En effet, plusieurs études^{201,202} ont signalé une différence de longueur d'onde d'absorption en spectrométrie UV pour les isomères N7 et N9 de l'adénine : le pic d'absorption des dérivés N7 est légèrement supérieur à 270 nm alors que celui des dérivés N9 se trouve vers 260 nm. Or, nos produits ont montré un pic d'absorption à 260-261 nm, ce qui était en accord avec des dérivés d'adénine N9-alkylés.

- **Voies de synthèse infructueuses :**

↳ **Pour le composé (46)**

Avant d'obtenir ce composé par réduction partielle de la triple liaison du composé **(45)**, nous avons exploré une voie de synthèse à partir du but-2-ène-1,4-diol, commercial (**schéma 50**). L'adénine pouvant être *N*-alkylée par substitution nucléophile, nous avons décidé de préparer le mésylate **(55)** en deux étapes à partir du diol. L'alcool **(54)** est tout d'abord préparé par monoprotection du diol avec un groupement 2-tétrahydropyranyle. La fonction hydroxyle résiduelle de **(54)** est ensuite quantitativement mésylée dans les conditions classiques. Le mésylate **(55)** a alors pu être mis en œuvre dans une réaction de *N*-alkylation de l'adénine par substitution nucléophile.

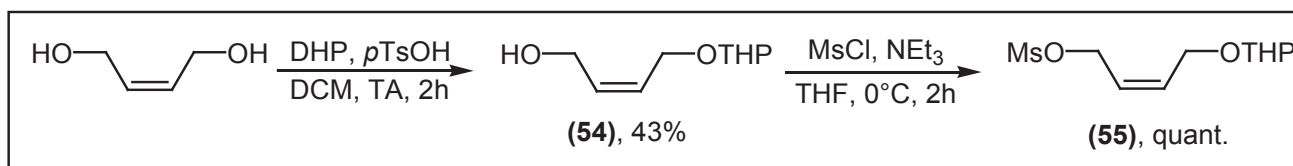


Schéma 50

La *N*-alkylation de l'adénine par le mésylate **(55)** a été menée dans le DMF en utilisant K_2CO_3 comme base et a conduit après 1h30 à 70°C au dérivé alkylé en N9 **(56)** avec 47% de rendement.

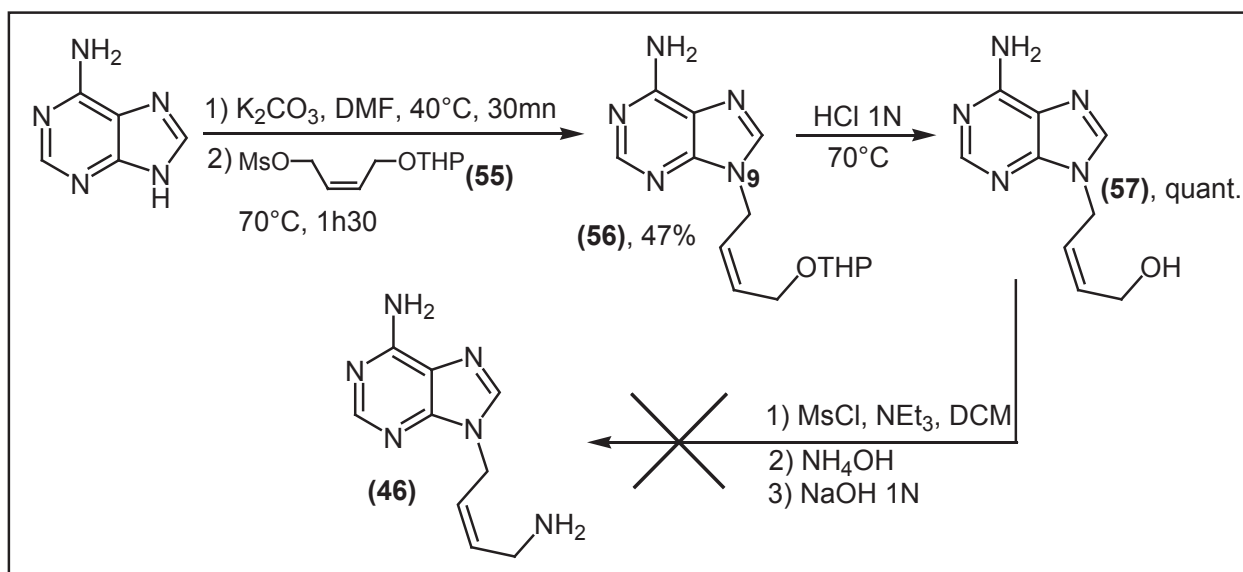


Schéma 51. Tentative de synthèse du dérivé adénine-bras-NH₂ (**46**).

Nous avons ensuite tenté de préparer l'amine (**46**) à partir de l'alcool (**57**), obtenu après hydrolyse du groupement THP en milieu acide. La stratégie envisagée consistait à introduire la fonction amine *via* une activation de l'alcool (**57**) sous forme de mésylate directement traité par l'hydroxyde d'ammonium. Cependant, le dérivé (**46**) n'a pas pu être extrait du milieu réactionnel aqueux malgré des lavages basiques pour obtenir l'amine libre. Cette voie a donc été abandonnée.

✎ Pour le composé (**45**)

Préalablement à la synthèse du bras (**52**) exposée dans le **schéma 46**, nous avons tenté d'introduire la fonction NH₂ sur le but-2-yn-1,4-diol en utilisant la réaction de Gabriel. Le *N*-alkylphthalimide (**58**) a été synthétisé par réaction de Mitsunobu appliquée à une des fonctions hydroxyle du diol en présence de triphénylphosphine et d'azadicarboxylate de diisopropyle (DIAD)²⁰³. Le produit (**58**) a été obtenu avec un rendement moyen de 44%, du fait de la formation probable du dérivé bis-phthalimide.

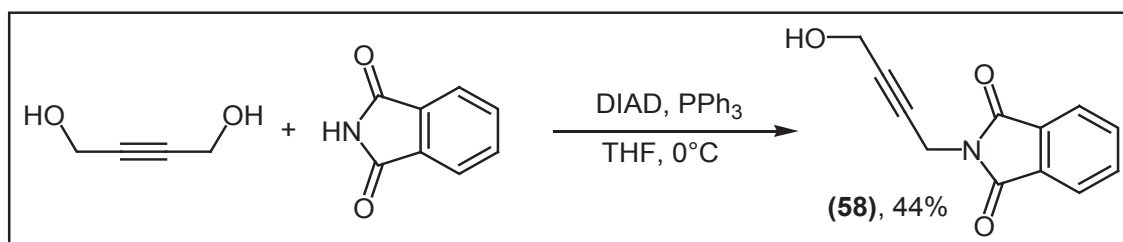


Schéma 52

Le motif phthalimide étant un groupement protecteur de l'amine primaire, nous avons directement couplé l'alcool **(58)** à l'adénine par réaction de Mitsunobu. Le couplage a conduit au produit attendu **(59)** avec toutefois un très faible rendement. De plus, une tentative d'ouverture du groupement phthalimide par une solution aqueuse de méthylamine n'a pas abouti à l'amine désirée **(45)** (*schéma 53*).

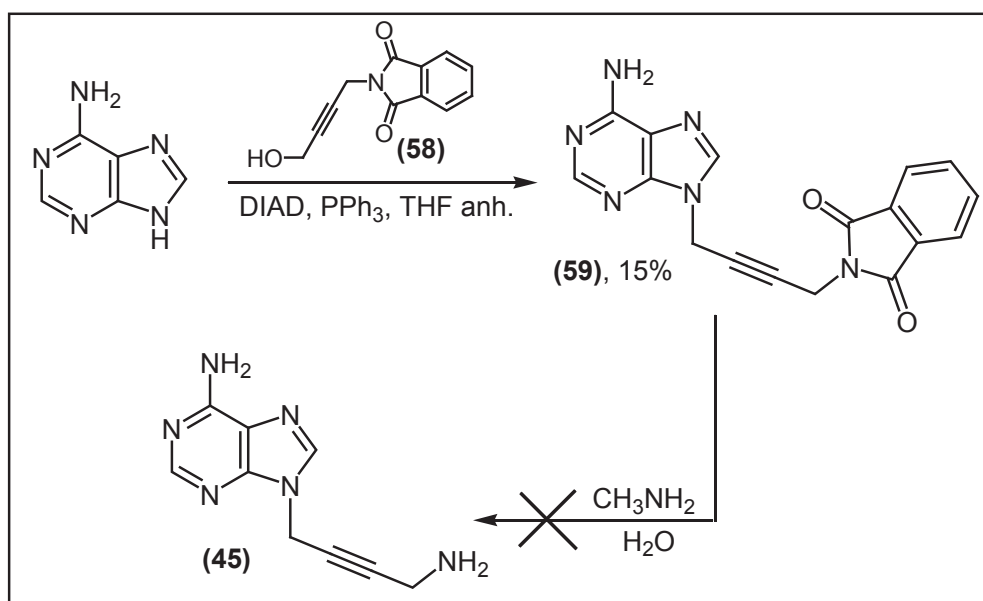


Schéma 53

Au vu de ces résultats, le groupement phthalimide a été remplacé par un groupement carbamate de benzyle. Le dérivé *N*-Cbz du 4-aminobut-2-yn-1-ol a été synthétisé à partir du composé **(58)** (*schéma 54*). Après déprotection par MeNH₂, l'amine alcool intermédiairement obtenue est transformée en chlorhydrate **(50).HCl** pour permettre sa purification par précipitation en milieu organique. Cet ammonium a directement été mis en œuvre dans une réaction de protection par le groupement benzyloxycarbonyl pour finalement donner le produit **(60)** avec un rendement global de 40% par rapport à **(58)**.

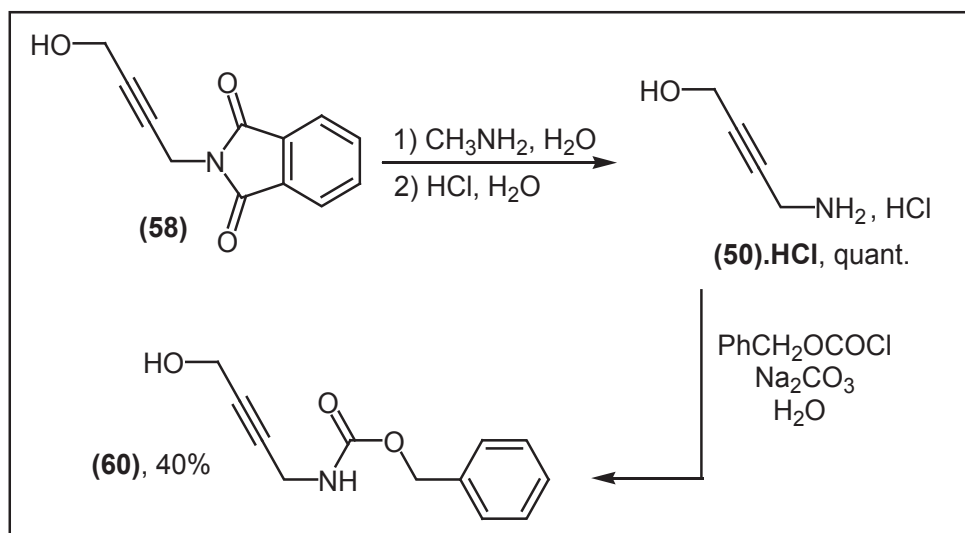


Schéma 54

Le couplage entre l'alcool (60) et l'adénine par réaction de Mitsunobu a conduit au produit d'alkylation N9 (61) mais toujours avec un faible rendement (17%). L'hydrogénation catalytique ne pouvant pas être appliquée en raison de la présence de la triple liaison, nous avons eu recours à un agent nucléophile pour éliminer le groupement Cbz. Le carbamate (61) a donc été traité par TMS-I, engendré *in situ* à partir du chlorure de triméthylsilyle et de l'iodure de sodium. Malheureusement, cette réaction n'a donné que des produits de dégradations, ce qui nous a obligé à abandonner cette voie pour privilégier la stratégie *via* une substitution nucléophile décrite plus haut.

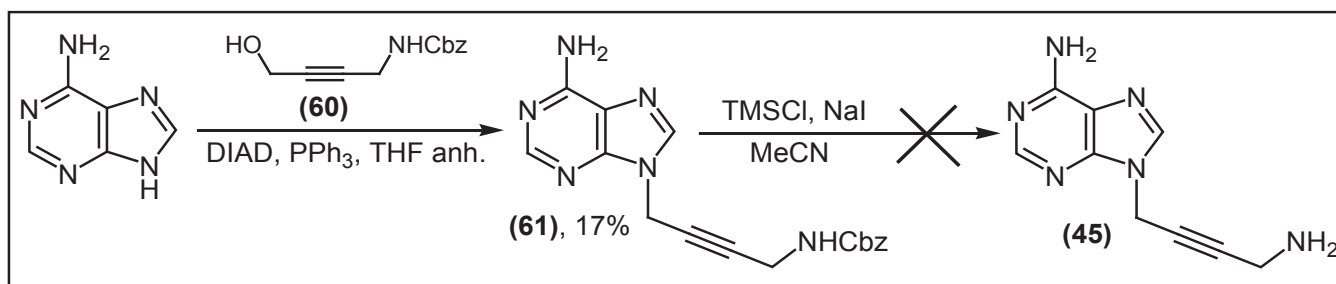


Schéma 55

4.1.3. Couplage des dérivés adénine-bras-NH₂ avec les acides (29) et (30)

Les différents composés bivalents ont été obtenus dans les conditions classiques de couplage peptidique réalisé entre les amines synthétisées précédemment et les dérivés de progestérone (29) et (30) comportant une fonction COOH respectivement en position 17 et

7. Les acides carboxyliques **(29)** et **(30)** ont été préalablement transformés en esters activés par réaction avec le N-hydroxysuccinimide (HOSu) en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Ces esters activés ont ensuite été mis en réaction avec les différentes amines pour accéder aux deux séries de ligands bivalents en C20 et en C7.

Dans le cas des couplages en position 20 de la progestérone, l'ester activé **(62)**²⁰⁴ a non seulement pu être purifié mais il a montré une bonne stabilité dans le temps, ce qui a permis de le stocker en vue des couplages suivants.

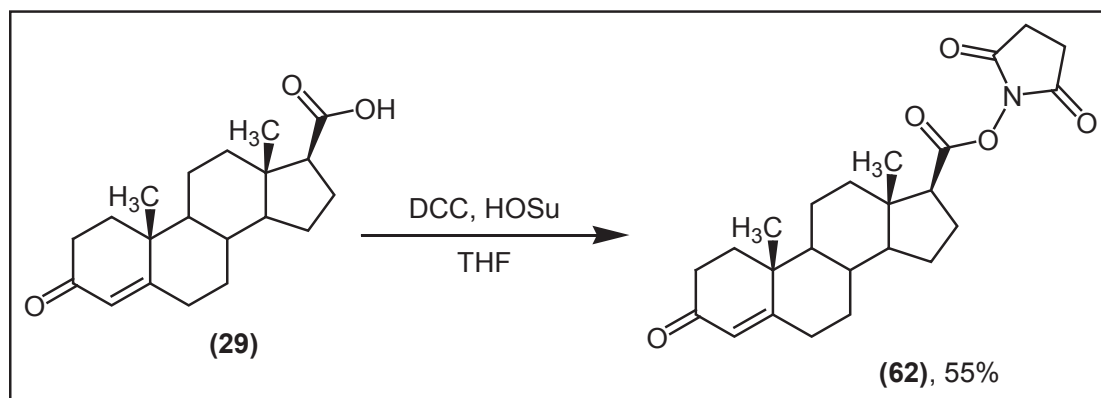


Schéma 56

Les réactions de couplage ont alors été effectuées dans le DMF en présence de diisopropyléthylamine (DIEA) pour maintenir un milieu alcalin nécessaire à ce type de réaction (*schéma 57*). Sept composés bivalents en série C20 ont été obtenus avec des rendements moyens à excellents (*tableau 5*).

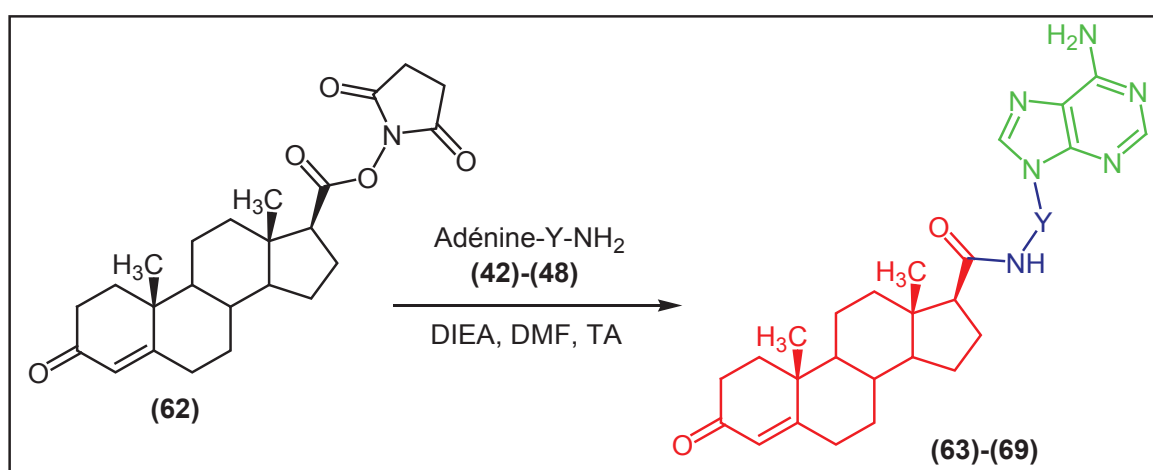
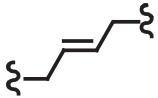
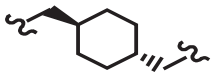
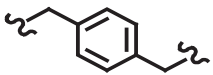


Schéma 57

Tableau 5. Rendements de couplage peptidique en série C20.

Y	Bivalents C20	Rendements (%) ^a
-(CH ₂) ₄ -	(63)	77
-(CH ₂) ₆ -	(64)	79
	(65)	92
	(66)	55
	(67)	40
	(68)	60
	(69)	61

^a Rendements isolés

Les couplages en série C7, quant à eux, ont été effectués d'une manière un peu différente. En effet, l'ester activé, synthétisé de manière analogue, s'est dégradé sur plaque CCM préparative. Le couplage peptidique a donc été réalisé selon un processus séquentiel « one-pot ».

L'acide **(30)** a été activé par le N-hydroxysuccinimide en présence de DCC dans le DMF pendant la nuit à température ambiante. Chacun des cinq dérivés adénine-bras-NH₂ **(42)** et **(45)-(48)** a ensuite été additionné pour conduire dans tous les cas et de manière inattendue, à deux composés en proportion égale : le produit de couplage peptidique (série **a**) et le produit résultant de l'ouverture du cycle succinimide par attaque nucléophile de l'amine sur l'un des deux carbonyles de ce noyau (série **b**). Ces deux séries de bivalents ont été obtenus avec des rendements globaux moyens à faibles (*schéma 58, tableau 6*).

L'ouverture du cycle succinimide a rarement été décrite dans la littérature. Il existe cependant quelques exemples d'attaque nucléophile d'une amine secondaire²⁰⁵, ou d'un alcool²⁰⁶ sur l'un de ses groupements carbonyles. Dans notre cas, l'encombrement stérique

de l'ester activé plus important en C7 qu'en C20 doit probablement défavoriser les attaques nucléophiles sur cet ester tout en favorisant celles qui peuvent se tenir sur des sites électrophiles plus éloignés du squelette stéroïdien.

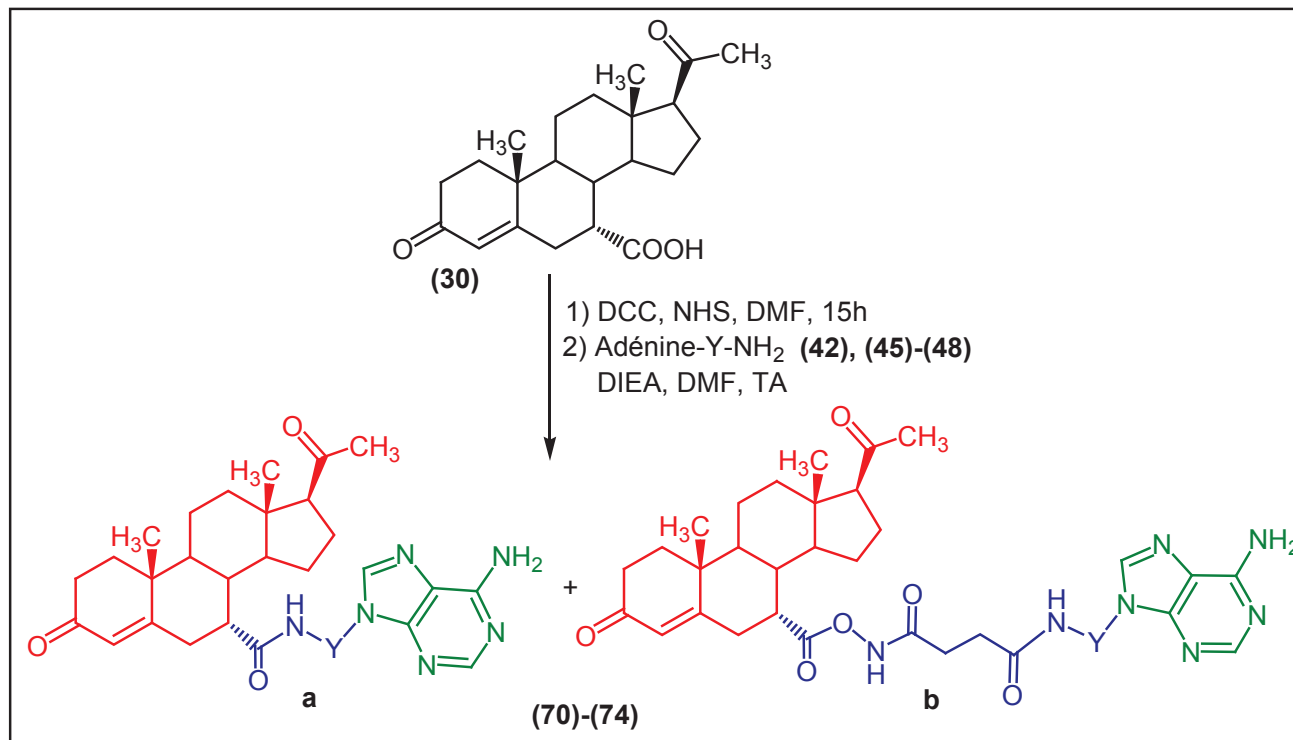
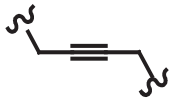
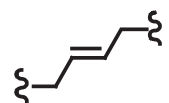


Schéma 58

Tableau 6. Rendements de couplage peptidique en série C7.

Y	Bivalents C7a/C7b	Rendements (%) ^a
-(CH ₂) ₄ -	(70)-a/(70)-b	32 / 23
-(CH ₂) ₆ -	(71)-a/(71)-b	37 / 31
	(72)-a/(72)-b	9 / 5
	(73)-a/(73)-b	22 / 21
	(74)-a/(74)-b	28 / 26

^a Rendements isolés

4.2. Evaluation biologique des ligands bivalents progestérone-adénine

L'évaluation biologique des dix-sept composés bivalents synthétisés dans le cadre de cette thèse a été réalisée en premier lieu, par le Dr Catherine Grenot (MCU-PH) et le Dr. Ghina Alameh (thèse soutenue en 2009) de notre équipe INSERM U863/EA 4443, puis par M^{me} Eva Matera de l'équipe du Pr. Charles Dumontet (INSERM U590, Faculté de Pharmacie de Lyon) après le départ de Ghina Alameh.

4.2.1 Principe du test

L'activité inhibitrice de nos composés bivalents vis-à-vis de la Pgp a été évaluée en mesurant l'augmentation de l'accumulation de la daunorubicine (anticancéreux fluorescent) dans des lignées cellulaires tumorales surexprimant la Pgp (cellules leucémiques humaines K562/R7), par cytométrie en flux.

- **La culture cellulaire :**

La lignée cellulaire K562/R7 est issue d'une lignée de leucémie myéloïde chronique humaine sensible à la doxorubicine (lignée K562/S). Cette lignée a été rendue résistante en induisant l'expression de la Pgp par exposition à la doxorubicine à des concentrations variables (de 0.5 à 10 nM). Les cellules résistantes ainsi obtenues sont ensuite maintenues dans un milieu nutritionnel (milieu RPMIⁱ 1640 + sérum de veau fœtal 10% PAA) supplémenté en antimicrobiens : pénicilline (100 UI/mL), streptomycine (100 µg/mL) et nystatine (20 UI/mL). La résistance cellulaire est conservée grâce à la présence d'une concentration constante de doxorubicine (5nM). La surexpression du gène *mdr1* a été vérifiée dans cette lignée par PCR quantitative, et la présence de la Pgp confirmée par Western Blot.

- **Le substrat fluorescent :**

La daunorubicine (DNR) (**figure 46**) est un agent intercalant et inhibiteur de la topoisomérase II, de la famille des anthracyclines, utilisé dans le traitement de certaines leucémies et lymphomes. La DNR est un substrat transporté par la Pgp²⁰⁷.

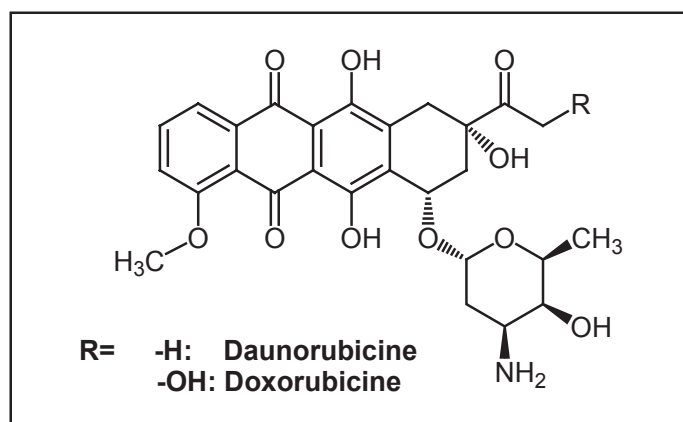


Figure 46

- **Mesure de l'accumulation de la daunorubicine :**

Les cellules K562/R7 (environ 10^6 cellules) sont incubées dans 1 mL de milieu RPMI 1640 pendant 1 heure à 37°C sous 5% CO₂, avec 17 µM de DNR, en absence ou en présence d'un inhibiteur de la Pgp (10 µM ou 50µM). Un témoin d'autofluorescence des cellules (sans DNR

ⁱ RPMI : milieu de culture cellulaire humaine développé par Moore *et al.* au Roswell Park Memorial Institute ; PAA : société produisant des cultures cellulaires.

ni modulateur) ainsi qu'un témoin négatif (DNR seule) sont également préparés. La mesure de l'accumulation de la DNR est réalisée par un cytomètre FACS-II après lavage par un tampon PBS afin d'éliminer toute fluorescence extracellulaire. L'augmentation de la fluorescence intracellulaire est synonyme d'augmentation de l'accumulation de la DNR, et donc d'une inhibition de la Pgp par le modulateur testé.

- **Les contrôles positifs :**

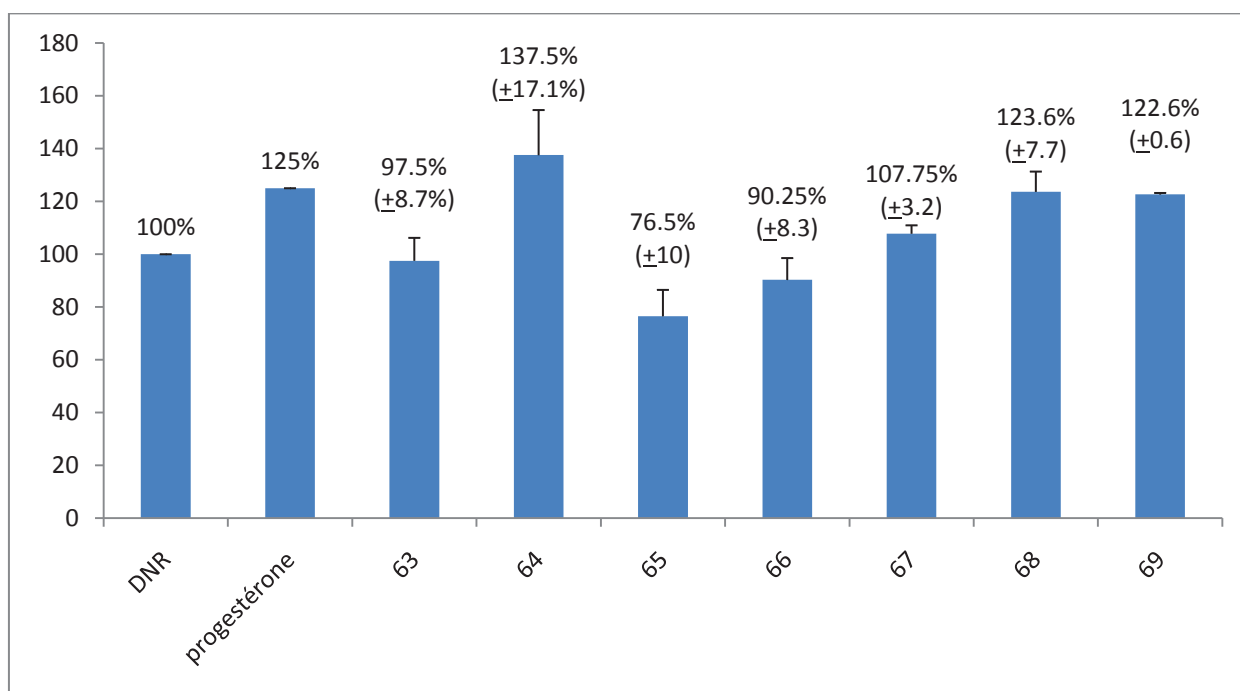
L'accumulation de la DNR après incubation avec les modulateurs à tester est comparée à son accumulation après incubation avec les inhibiteurs de référence : la progestérone (10 μ M ou 50 μ M) ou la ciclosporine A (3.3 μ M).

4.2.2. Résultats et discussion

Une première campagne de tests a été réalisée par le Dr Catherine Grenot et Ghina Alameh sur les sept dérivés bivalents progestérone-adénine en position C20, **(63)-(69)**. La synthèse et l'évaluation biologique de ces composés en tant que modulateurs de la Pgp ont été publiées dans *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* en 2010²⁰⁸.

Les résultats des tests d'accumulation de la DNR menés sur ces sept dérivés sont présentés dans la **figure 47** où l'accumulation de la DNR sans modulateur a été considérée comme référence (100%). Ces composés ont été testés à la concentration de 10 μ M. Il faut noter qu'à cette concentration, leur cytotoxicité s'est avérée nulle vis-à-vis des cellules K562 ne surexprimant pas la Pgp. En effet, dans tous les cas, la survie cellulaire, après 24h d'incubation en présence de progestérone ou de modulateurs **(63)-(69)**, était comprise entre 80% et 100% par rapport au contrôle.

Ces bivalents en C20 se sont avérés des modulateurs de la Pgp peu actifs à une concentration de 10 μ M. Quelle que soit leur rigidité, les composés possédant les bras espaceurs les plus longs ont montré une activité inhibitrice analogue voire un peu supérieure à celle de la progestérone (cas du dérivé **(64)** avec une chaîne hexaméthylénique). Par contre, les composés à chaîne courte **(63)**, **(65)**, **(66)** et **(67)** ont montré une activité nulle ou inférieure à celle de la progestérone. Ce résultat semble suggérer que, dans le cas de ces quatre derniers dérivés, le motif progestérone ne se positionnerait pas correctement dans son site sur la Pgp du fait de la présence du motif adénine-bras, trop encombrant.

**Figure 47**

M^{me} Eva Matera du laboratoire du Pr. Charles Dumontet a réalisé une deuxième série de tests qui a permis d'évaluer l'activité inhibitrice des dix dérivés bivalents en C7 précédemment obtenus. Pour comparaison, nous y avons également inclus les deux composés en C20, **(64)** et **(65)**, qui avaient respectivement montré l'activité la meilleure et la plus faible à une concentration de 10 μ M. Les mêmes conditions expérimentales ont été appliquées que précédemment. Néanmoins, ces tests ont été réalisés en présence de 10 μ M ou 50 μ M de progestérone et de modulateurs. Cette dernière concentration a été choisie afin de se placer dans des conditions où la progestérone montre une activité inhibitrice significative vis-à-vis de la Pgp, car à 10 μ M, la progestérone n'a montré qu'une faible activité inhibitrice (**figure 47**).

Ainsi, les résultats de tests des dix produits bivalents en C7 présentant une liaison amide (série **a**) ou un radical succinimidyle (série **b**) - **(70)-a,b**, **(71)-a,b**, **(72)-a,b**, **(73)-a,b**, et **(74)-a,b** - sont présentés dans la **figure 48**. L'accumulation de la DNR sans modulateur est toujours considérée comme référence (100%).

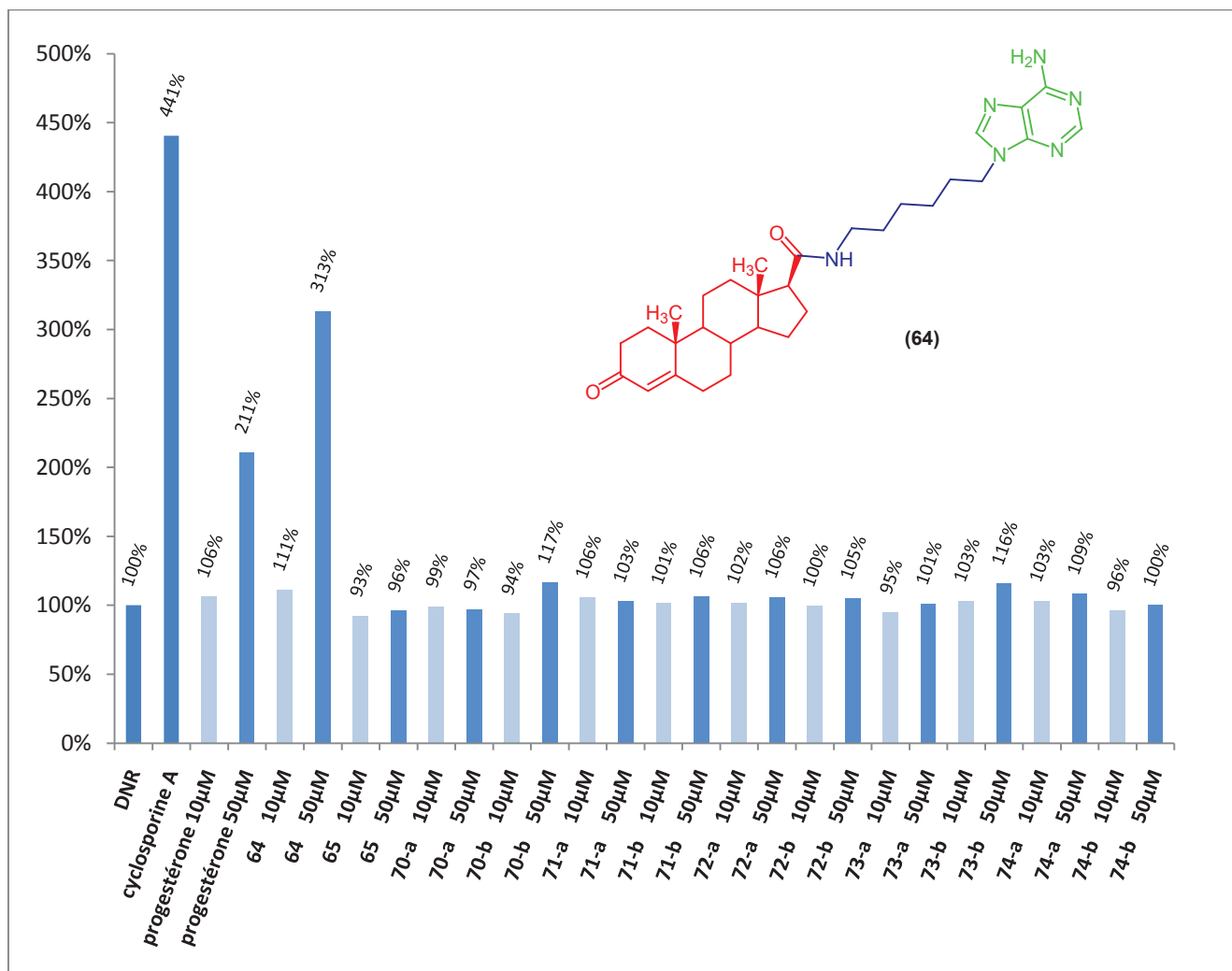


Figure 48

Les résultats de ces tests ont confirmé que, contrairement à 10 μM, la progestérone montrait une activité inhibitrice significative de la Pgp pour une concentration de 50 μM. Par contre, quelle que soit la concentration utilisée, et contrairement aux dérivés développés par Leonessa *et al.*¹⁷⁴, aucune inhibition n'est observée en présence de nos dérivés bivalents en C7. Par contre, ces tests ont confirmé les résultats précédemment obtenus concernant le composé **(64)**, qui a montré une activité inhibitrice significativement plus importante que la progestérone à 50 μM.

En conclusion, parmi les dix-sept composés bivalents synthétisés et testés, le composé **(64)** où l'adénine est reliée à la progestérone par un bras hexaméthylène en position 20 s'est avéré le plus actif puisqu'il a montré une activité inhibitrice une fois et demie supérieure à celle de la progestérone. Bien que la concentration requise pour cette activité (50 μM) soit trop élevée pour que **(64)** soit considéré comme un bon inhibiteur de la Pgp, l'amélioration

constatée par rapport à la progestérone pourrait signifier que l'affinité de liaison du noyau progestérone à la Pgp serait renforcée par la fixation simultanée du motif adénine au site à ATP. Cette hypothèse pourra être confirmée par une étude actuellement en cours (par le Dr P.Lawton du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Lyon) sur la capacité éventuelle du composé bivalent **(64)** à inhiber l'activité ATPasique du fragment recombinant H6-NBD1 de CpABC3, apparentée à la glycoprotéine-P.

Cette première étude visant à concevoir et à synthétiser des inhibiteurs bivalents de la Pgp a donc conduit à une première piste intéressante qui mérite d'être exploitée dans le cadre du développement de nouveaux composés bivalents plus actifs.

CHAPITRE 4

Synthèse de bras de type oligocyclohexylidène

Dans le cadre de notre recherche sur les composés bivalents possédant une activité biologique, nous nous sommes intéressés à la synthèse de bras espaceurs de type oligocyclohexylidène, oligomères constitués de groupes cyclohexyles reliés entre eux par les positions-1,4 *via* des doubles liaisons exocycliques. Ces structures rigides, connues pour présenter une bonne inertie chimique, offrent la possibilité de constituer des bras de longueur bien définie, qui peut être incrémentée en ajoutant de nouvelles unités cyclohexylidène.

1. Rappels bibliographiques

1.1. Méthode de Barton et Kellogg ^{209, 210, 211}

Le traitement de la cyclohexanone, ou de ses dérivés substitués, par l'hydrazine, conduit à la formation de la bicyclohexylidène azine, correspondant à la condensation de deux molécules de cyclohexanone avec une molécule d'hydrazine. Le traitement de l'azine par H_2S gazeux, utilisé comme agent de transfert de soufre, permet la formation du noyau thiadiazolidine qui est ensuite oxydé en thiadiazoline en présence d'acétate de plomb. La liaison éthylénique est finalement générée par extrusion de diazote et désulfuration en présence de triphénylphosphine à chaud.

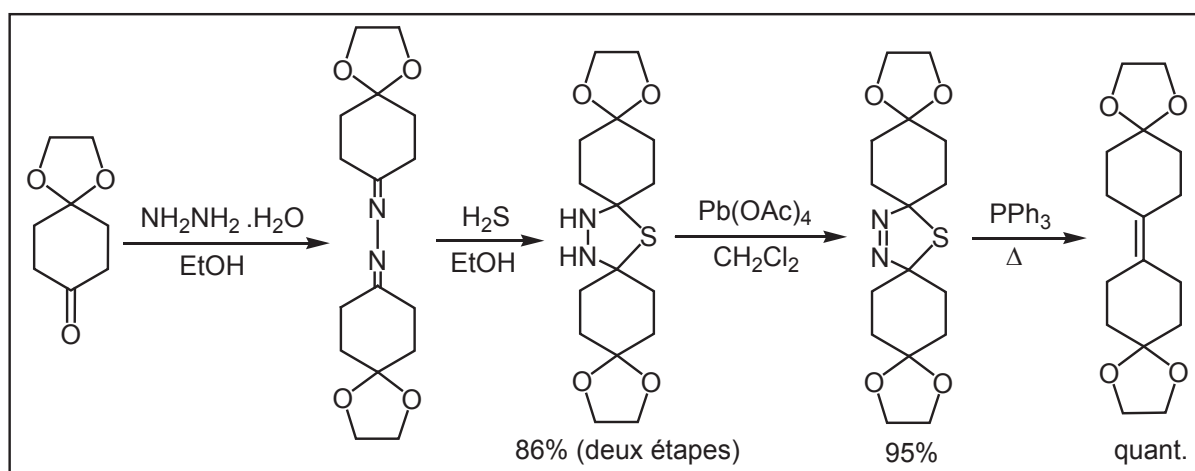


Schéma 59. Synthèse d'oligocyclohexylidène selon Barton.²⁰⁹

Afin d'obtenir des bicyclohexylidènes asymétriques, Hoogesteger *et al.*²¹² ont proposé une méthode basée sur la synthèse d'azines asymétriques préparées par réaction de Horner-Emmons entre une hydrazone et une cétone. Les dérivés oligocyclohexylidènes sont ensuite obtenus selon la méthodologie précédente.

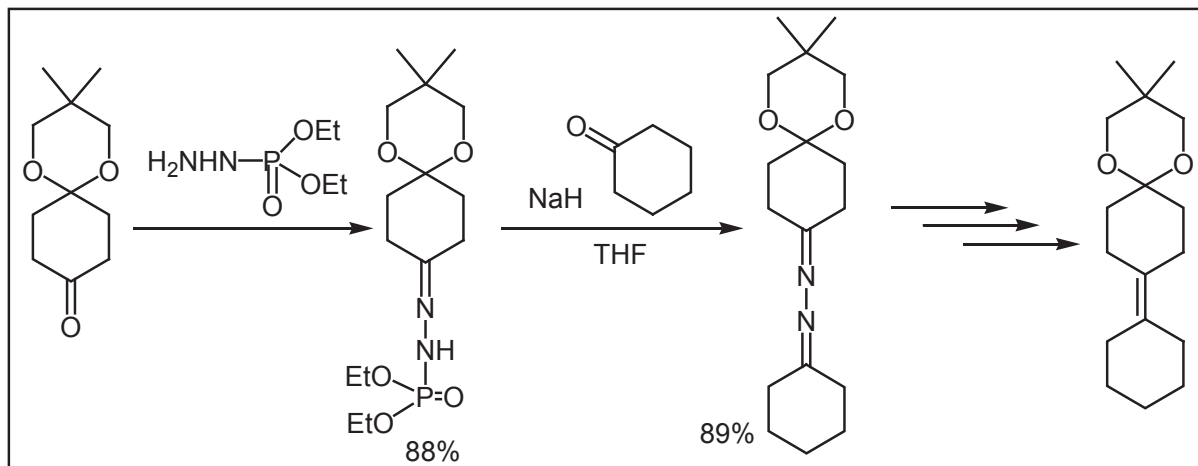


Schéma 60. Synthèse d'oligocyclohexylidène selon Hoogesteger²¹²

Il faut cependant noter une baisse des rendements en série asymétrique qui s'explique par l'échange des groupements alkyles des azines asymétriques conduisant à des azines symétriques :

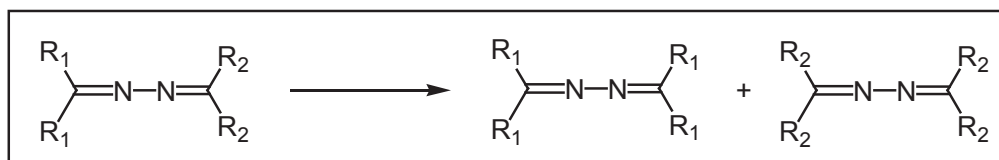


Schéma 61

Cette réaction secondaire constitue une limitation majeure à cette méthode puisque le nombre de sous-produits augmente proportionnellement avec le nombre d'unités cyclohexylidènes.

1.2. Synthèse par réaction de Grignard

Humphreys *et al.*²¹³ ont développé une synthèse de 4-(cyclohexylidène)cyclohexèn-2-one *via* une réaction de Grignard du bromure de *p*-méthoxyphénylmagnésium sur la cyclohexanone suivie d'une réduction de Birch qui conduit, après acidification, à la diènone conjuguée.

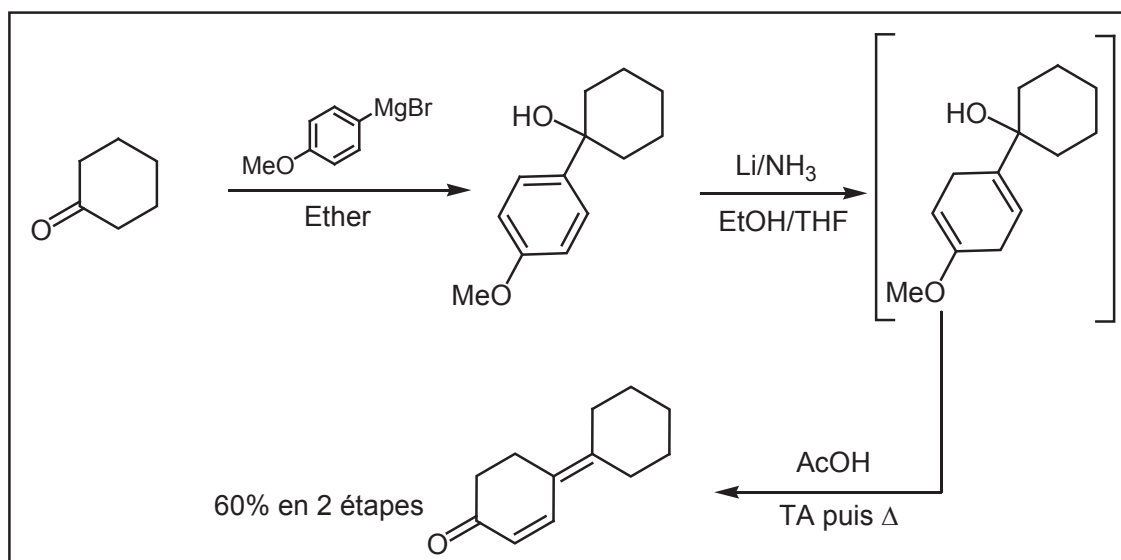


Schéma 62

Cette diène s'est avérée instable dans la plupart des conditions classiques de réduction qui ont conduit à la migration de la double liaison exocyclique dans le cycle. Par contre, une réduction préalable de la diène en diénol par le borohydrure de sodium, suivie d'une réduction sélective de la double liaison la moins encombrée en β du groupement hydroxyle par le diimide, engendré *in situ* à partir d'hydrazine, a permis d'obtenir majoritairement le bicyclohexylidène désiré.

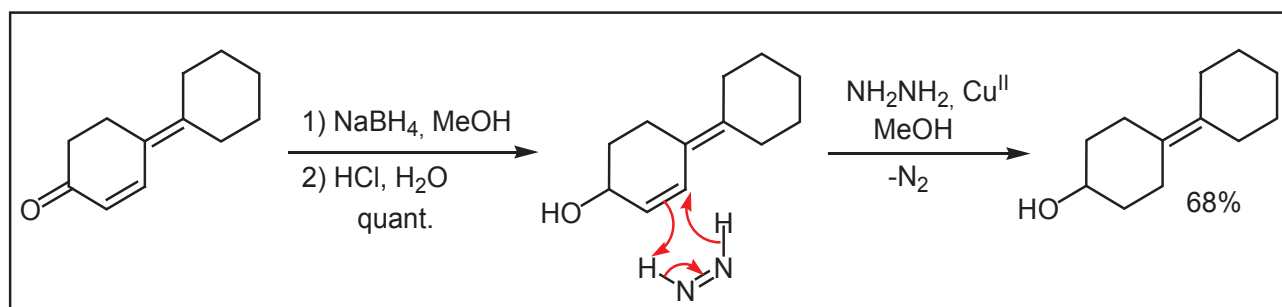


Schéma 63

1.3. Synthèse *via* des composés dinitrés vicinaux^{214, 215}

Les composés dinitrés vicinaux sont préparés par substitution nucléophile du groupement nitro d'un α,α -dinitrocycloalcane par le sel lithien d'un nitrocycloalcane. Cette réaction est catalysée par la lumière visible. Le dérivé bicyclohexylidène est obtenu après élimination des deux groupements nitro par irradiation du produit dinitré en présence d'un

réducteur comme le sulfure de sodium. Bien qu'il n'ait pas été déterminé avec précision, le mécanisme de cette réaction est supposé radicalaire.

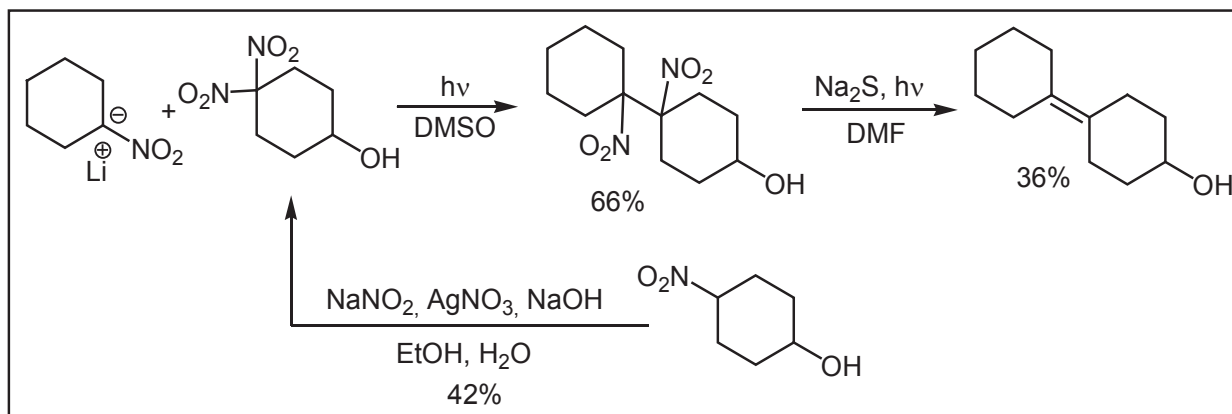


Schéma 64

Le précurseur dinitré est préparé par nitration oxydante du dérivé mononitré correspondant en présence de nitrite de sodium et de nitrate d'argent en milieu alcalin.

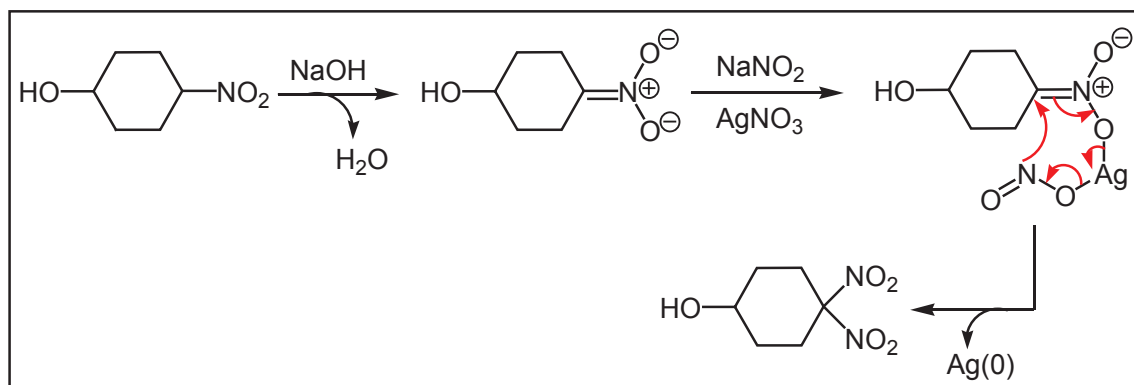


Schéma 65

1.4. Synthèse par réaction de McMurry

Cette réaction a été appliquée à la synthèse de bicyclohexylidènes symétriques²¹⁶. A notre connaissance, il n'existe pas d'exemple dans la littérature rapportant la synthèse d'oligocyclohexylidènes substitués par la méthode de McMurry.

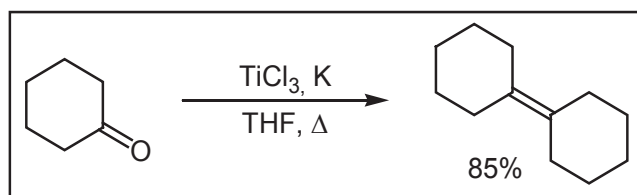


Schéma 66

1.5. Synthèse via des acides β -hydroxycarboxyliques

Humphreys *et al.*²¹⁷ ont proposé une méthode de synthèse de bicyclohexylidènes 4,4'-disubstitués par pyrolyse d'une β -lactone, elle-même issue d'un acide β -hydroxycarboxylique. Ce dernier est synthétisé par addition nucléophile du dianion lithié d'un acide cyclohexanecarboxylique sur une cyclohexanone. La lactonisation de l'acide β -hydroxycarboxylique peut ensuite être menée en présence de différents agents d'activation de la fonction hydroxyle (anhydride acétique, chlorure de benzènesulfonyle ou chloroformiate d'éthyle). La double liaison exocyclique est finalement obtenue par pyrolyse de la lactone à reflux dans un solvant hydroxylé comme le 2-méthoxyéthanol qui a conduit aux meilleurs rendements.

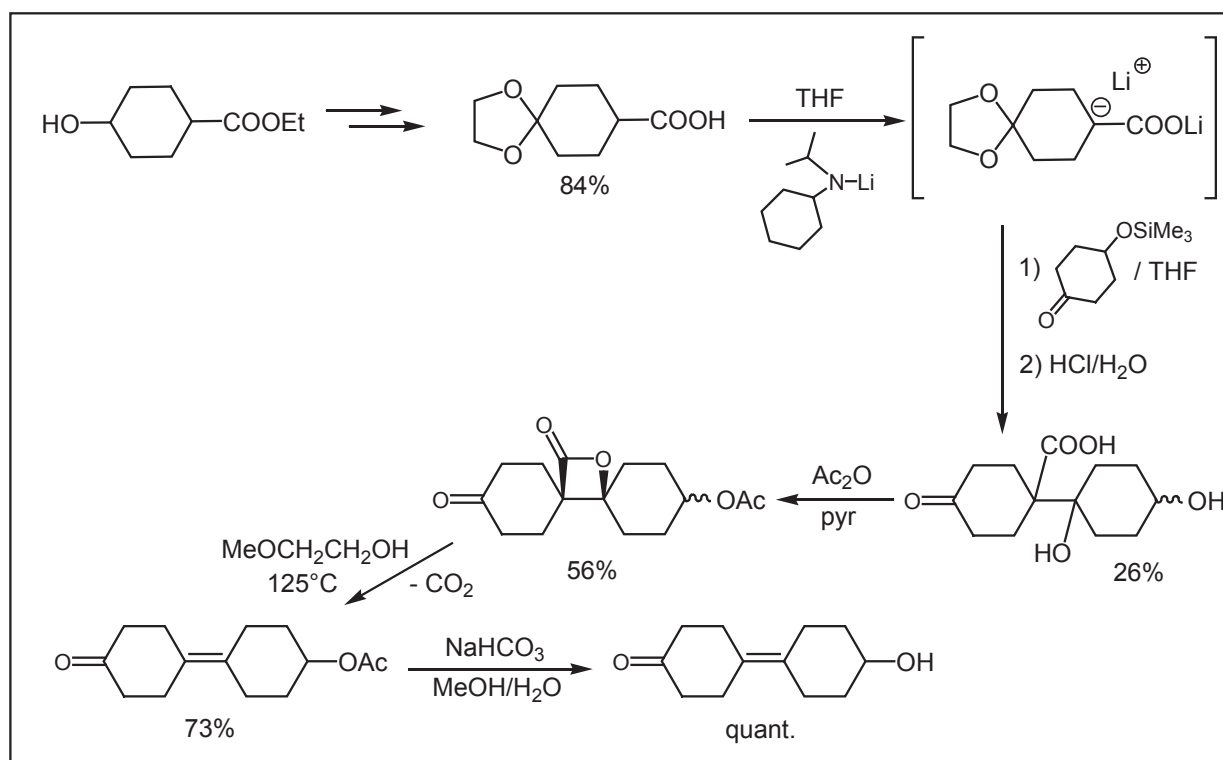
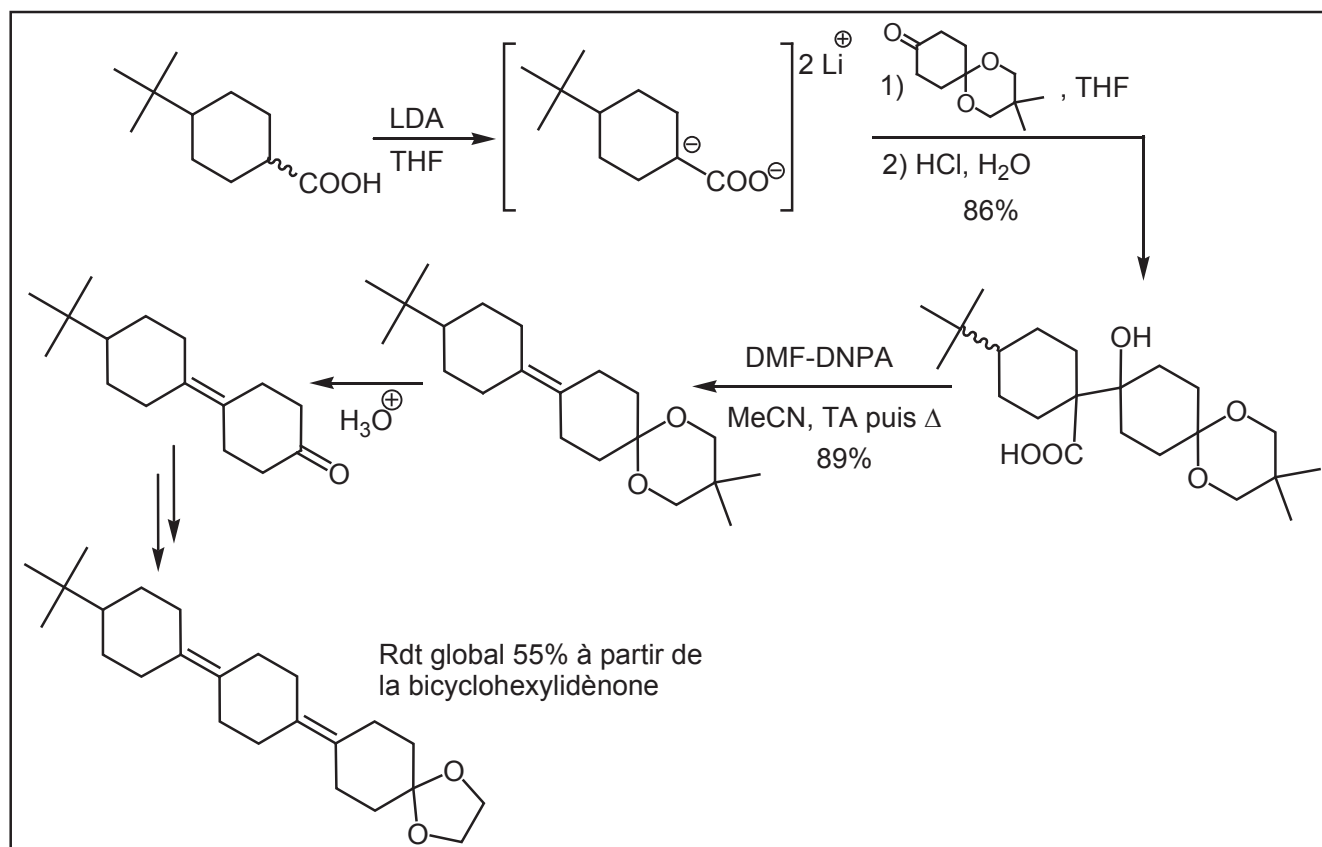


Schéma 67

En raison des résultats peu satisfaisants obtenus lors de la synthèse d'oligocyclohexylidènes, à longue chaîne ou substitués, selon la méthodologie *via* les azines développée par Barton et Kellogg, Hoogesteger *et al.*²¹² ont proposé une nouvelle méthode itérative qui, comme précédemment, passe par un acide β -hydroxycarboxylique. Dans ce cas, la double liaison exocyclique est formée par réaction de déshydratation-décarboxylation sur cet acide en présence du *N,N*-diméthylformamide dineopentylacétal (DMF-DNPA).

Schéma 68. D'après Hoogesteger et al.²¹²

Cette méthode itérative permet de facilement allonger la chaîne après déprotection de la fonction cétone en milieu acide, addition nucléophile du dianion d'un acide cyclohexanecarboxylique suivie d'une réaction de déshydratation-décarboxylation.

Le mécanisme de cette réaction implique une rétro-cycloaddition [2+2+2] thermique sur l'intermédiaire cyclique formé par substitution nucléophile des deux groupements neopentyloxy du DMF-DNPA par les fonctions OH et COOH de l'acide β-hydroxycarboxylique. Cette fragmentation conduit à l'alcène avec dégagement de dioxyde de carbone et formation de diméthylformamide²¹⁸.

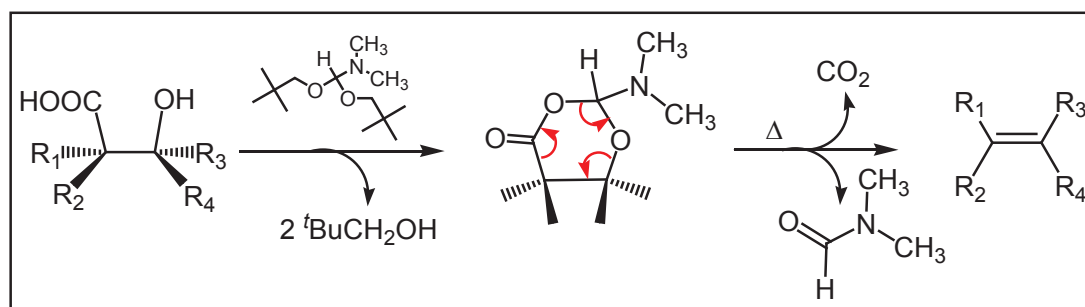


Schéma 69

Il faut noter que les acétals du DMF peu encombrés sont connus pour être des agents alkylants des acides carboxyliques pour conduire aux esters correspondants. L'étape limitante du mécanisme d'estérification est l'alkylation du carboxylate par le cation alkoxyiminium selon une substitution nucléophile de type S_N2 (**schéma 70**)²¹⁹. Or, l'utilisation d'un acétal encombré comme le DMF-DNPA permet d'éviter la réaction d'estérification. En effet, dans ce cas, le cation iminium réagit très lentement avec le carboxylate.

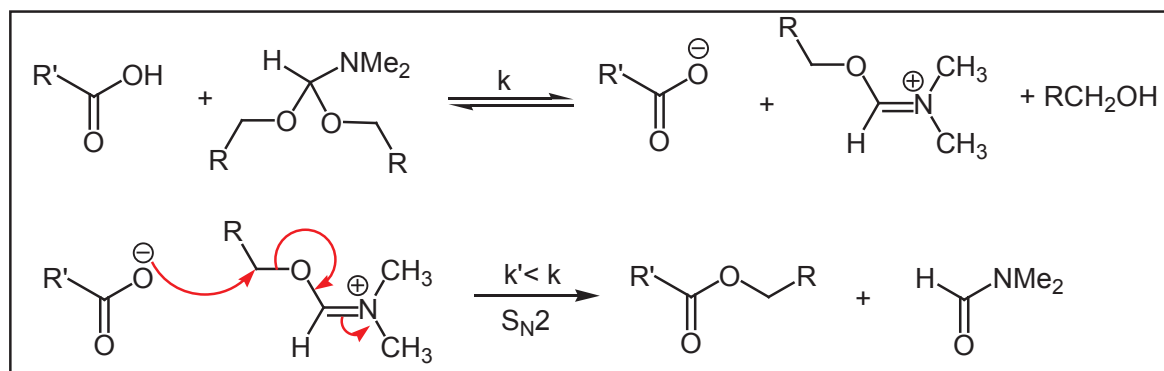


Schéma 70

1.6. Structure

Le système bicyclohexylidène peut adopter deux conformations (**figure 49**). Le passage d'une conformation à l'autre est possible à température ambiante, mais l'équilibre est en faveur de la conformation *anti* qui ne présente pas d'interactions stériques 1,6-diaxiales.

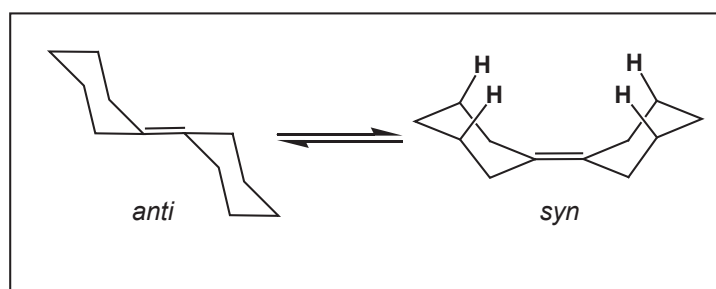
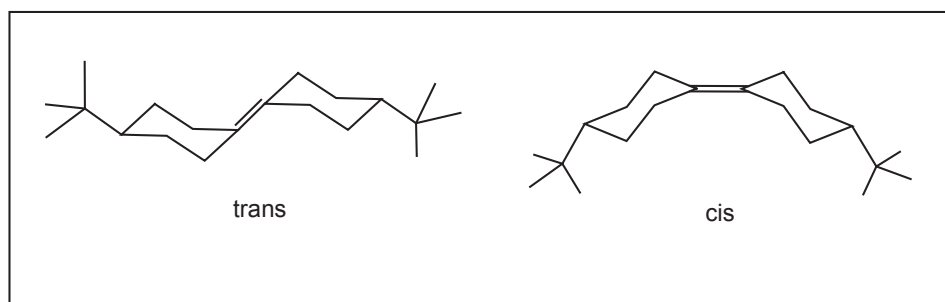


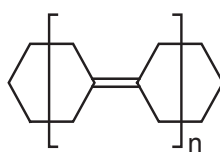
Figure 49

Les bicyclohexylidènes substitués en position 4 et 4' peuvent être bloqués dans l'une des deux conformations si les substituants sont suffisamment encombrants. Ainsi, les deux isomères *cis* et *trans* du 4,4'-di-*tert*-butyl-bicyclohexylidène sont bloqués chacun dans une conformation puisque le groupement *tert*-butyle occupe forcément la position équatoriale. L'isomère *trans* est plus stable que l'isomère *cis* ($\Delta\Delta G_{30^\circ C} = 0,95$ kcal/mol)²²⁰.

**Figure 50**

Plus récemment, Hoogesteger *et al.*²¹² ont effectué une étude structurale plus approfondie des oligocyclohexylidènes, par modélisation moléculaire et diffraction des rayons X. L'étude de modélisation, par méthode semi-empirique ou par calculs *ab initio*, a prédit que les oligocyclohexylidènes s'agencent sous forme d'une chaîne d'unités cyclohexylidène en conformation chaise. Chaque unité cyclohexylidène incrémente la chaîne d'une longueur de 4,1 Å (**tableau 7**).

La cristallographie par diffraction des rayons X du *trans*-4,4''-diheptyl-1,1':4',1''-tercyclohexylidène a confirmé d'une part, la géométrie du système en conformation chaise et d'autre part, l'incrémentation de 4,1 Å par unité cyclohexylidène (**figure 51**).

**Tableau 7.** Longueur des oligocyclohexylidènes calculée par méthodes semi-empiriques et *ab initio* (d'après Hoogesteger *et al.*²¹²)

n	Distance H...H ^a (Å)	Distance C...C ^b (Å)
1	9,05 (9,03) ^c	7,11 (7,16)
2	13,05 (13,19)	11,29 (11,39)
3	17,33 (17,35)	15,48 (15,60)
4	21,43	19,64

^a Distance entre les deux hydrogènes terminaux équatoriaux (méthode semi-empirique).

^b Distance entre les deux carbones terminaux (méthode semi-empirique).

^c Valeurs entre parenthèses : calculs *ab initio*.

Cette figure ne peut pas être diffusée en accès libre.

Merci de consulter la publication d'origine (référence ci-dessous).

Figure 51. Représentation de la structure cristalline par diffraction des rayons X du *trans*-4,4''-diheptyl-1,1':4',1''-tercyclohexylidène, la distance entre les deux carbones terminaux est mesurée à 11,42 Å (d'après Hoogesteger *et al.*²¹²).

2. Travaux personnels : Résultats et discussion

Dans le cadre de notre recherche concernant les ligands bivalents progestérone-adénine, nous avons envisagé de synthétiser des bras espaceurs de type oligocyclohexylidène fonctionnalisés en position 4 et 4' afin d'être en mesure de réaliser les couplages sur l'adénine (ou tout autre hétérocycle azoté) et la progestérone (**figure 52**). Pour accéder à ces structures, nous avons exploré différentes méthodes « classiques » de formation de double liaison.

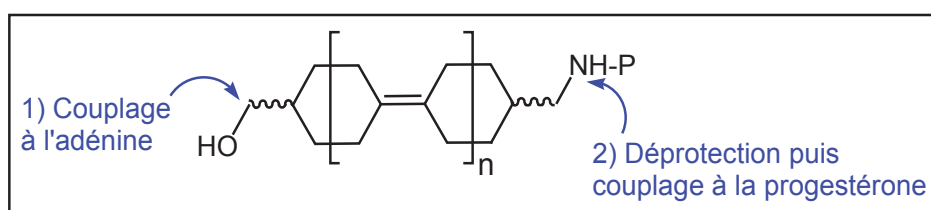


Figure 52

2.1. Essais par réaction de Wittig

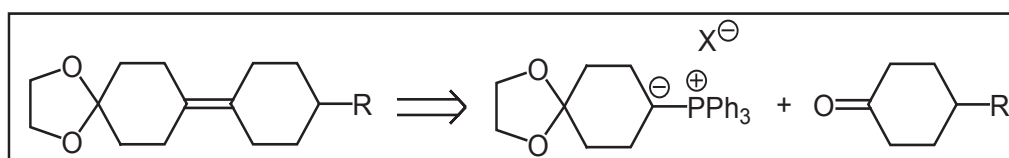


Schéma 71

Le sel de phosphonium nécessaire pour le couplage de Wittig a été synthétisé à partir de la cyclohexane-1,4-dione mono protégée commerciale, le 1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one.

Une réduction par le borohydrure de sodium dans le méthanol, permet de préparer le cyclohexanol **(75)** quantitativement.

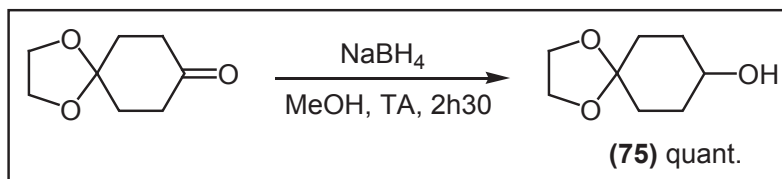


Schéma 72

Nous avons ensuite tenté de substituer directement le groupement hydroxyle par un atome de brome. Pour ce faire, nous avons reproduit la méthode utilisée par Kabalka *et al.*²²¹ pour synthétiser le même bromure **(76)** utilisant du tétrabromure de carbone en présence de triphénylphosphine dans du dichlorométhane. Malgré les bons résultats décrits dans la littérature, nous n'avons obtenu qu'un faible rendement du composé attendu qui était accompagné de beaucoup de sous-produits non-identifiés.

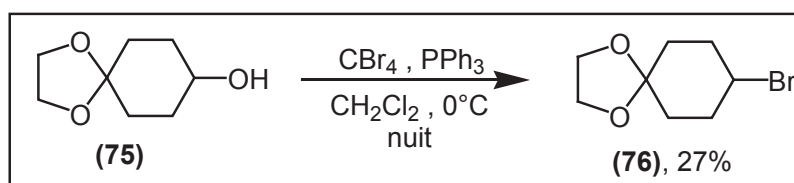


Schéma 73

Nous avons alors opté pour une méthode alternative, en activant l'alcool sous forme de tosylate puis en effectuant une substitution nucléophile par le bromure de lithium au reflux du THF. Après plusieurs essais de bromation infructueux en conditions thermiques classiques, notre choix s'est porté sur l'activation micro-onde qui a donné de meilleurs résultats : rendement supérieur, moins de sous-produits et un temps de réaction beaucoup plus court par rapport à celui nécessaire sous reflux.

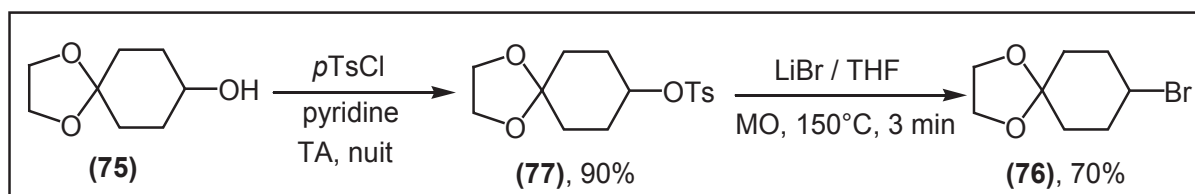


Schéma 74

Malheureusement, la synthèse du bromure de phosphonium à partir de **(76)** n'a pas abouti, malgré les différents essais menés pour mettre au point la réaction (*schéma 75*). La

réaction a été conduite soit sous reflux du xylène, soit sous activation micro-onde dans différents solvants (toluène, chloroforme ou DMF) et à différentes températures. Dans tous les cas, la réaction n'évoluait pas, et aucun produit correspondant au bromure de phosphonium **(78)** n'a pu être isolé.

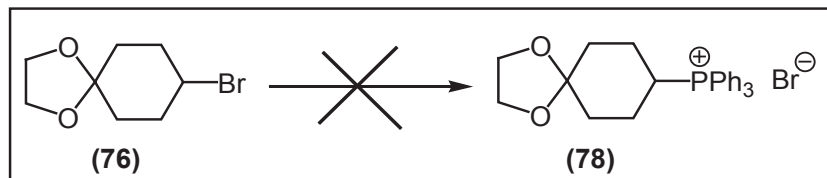


Schéma 75

Par conséquent, nous avons décidé d'explorer la synthèse du tosylate de phosphonium **(79)** à partir de **(77)**. Sous reflux du xylène pendant trois jours, la réaction donne le sel **(79)** avec un rendement de 40% après purification sur colonne. La réaction de Wittig étant généralement décrite avec des halogénures de phosphonium, nous avons procédé à un échange d'anions par passage sur résine Dowex[®] pour remplacer l'anion tosylate par un chlorure. Le chlorure de phosphonium **(80)** a été obtenu avec un rendement quantitatif.

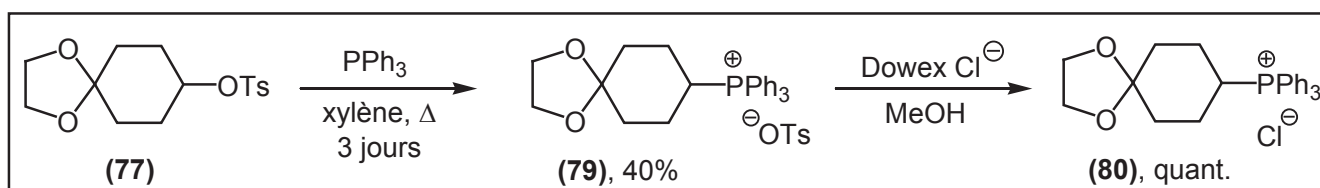


Schéma 76

Le premier partenaire du couplage de Wittig en main, nous avons ensuite procédé à la synthèse du deuxième, la cétone **(82)** à partir du *trans*-4-aminocyclohexanol, commercial. Après protection de la fonction amine sous forme de carbamate et oxydation de la fonction alcool par le chlorochromate de pyridinium, nous avons obtenu la cyclohexanone **(82)** avec un excellent rendement global (97% pour deux étapes).

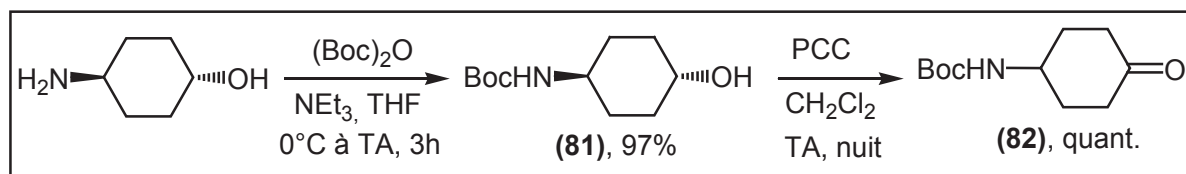


Schéma 77

Le composé *N,N*-diprotégé **(83)** a également été synthétisé à partir de l'amine monoprotégée **(82)** en utilisant le même groupement protecteur. Les deux composés ont été engagés dans les essais de couplage suivants.

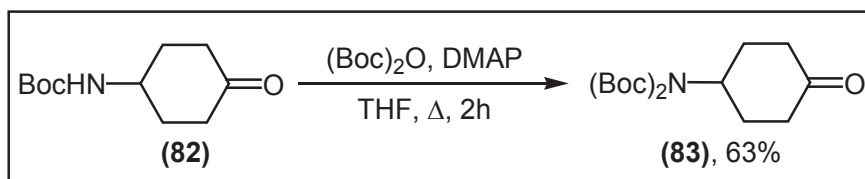


Schéma 78

Plusieurs tentatives de réactions de Wittig ont ensuite été effectuées (**tableau 8**) en présence des sels de phosphonium **(79)** et **(80)**. Quelles que soient les conditions de solvant et de température et quel que soit le dérivé carbonyle utilisé, aucun essai n'a abouti au produit de couplage attendu. L'utilisation de *n*BuLi dans le THF à 0°C a toutefois permis d'observer des traces de l'alcène **(85)** produit de la réaction de Wittig entre le phosphonium **(80)** et le benzaldéhyde. Le dérivé **(85)** a uniquement pu être identifié par son spectre RMN ^1H . Bien que l'anion ylure semble avoir été engendré à chaque essai, comme en témoignait la coloration rouge du milieu, le couplage avec le dérivé carbonyle présent n'a jamais abouti, probablement en raison de l'encombrement stérique du phosphonium et/ou de la cétone. Les seuls produits qui ont été isolés après réaction étaient la cétone ou l'aldéhyde de départ dans leur presque totalité, et l'oxyde de diphénylphosphine **(84)** résultant de l'hydrolyse de l'ylure de phosphonium. La formation de ce dérivé **(84)** a été observée à l'issue de chaque tentative de couplage. Il a été isolé et identifié une seule fois (**tableau 8**, entrée 4) avec 80% de rendement calculé par rapport au phosphonium de départ.

Suite à ces résultats, le couplage par réaction de Wittig a été abandonné.

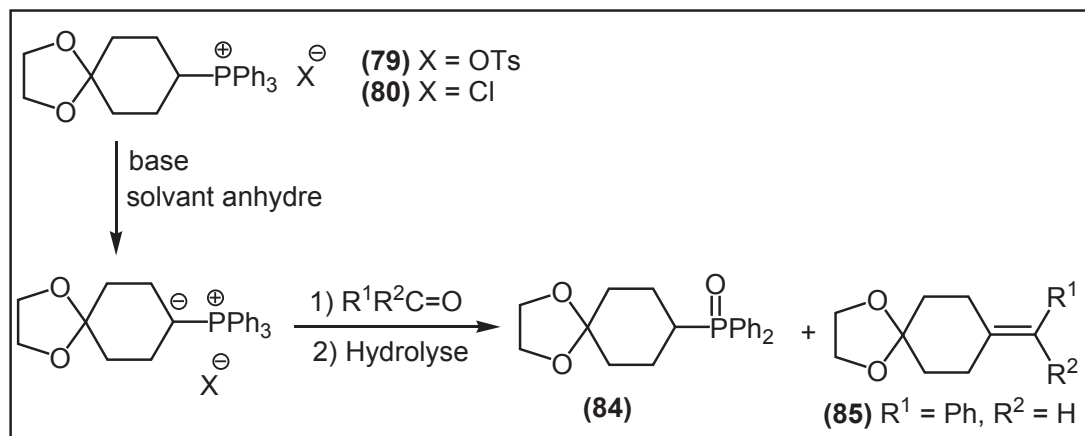
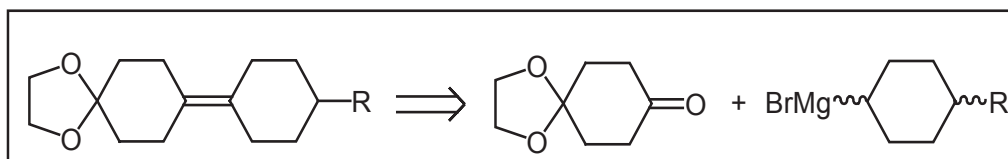


Schéma 79

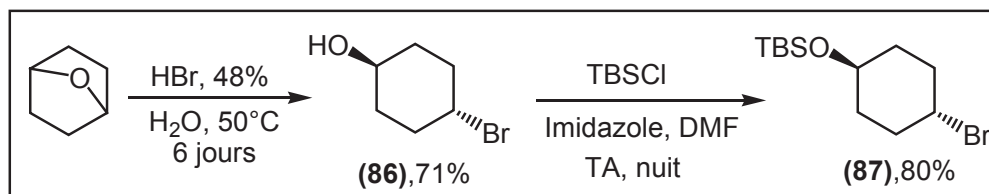
Tableau 8. Tableau récapitulatif des essais de réactions de Wittig.

Entrée	$RPPH_3^+X^-$	$R^1R^2C=O$	Base	Conditions	Produit de couplage
1	(79)	(82)	NaH	DMSO, 50°C	-
2	(79)	benzaldéhyde	NaH	DMSO, 50°C	-
3	(79)	benzaldéhyde	<i>n</i> BuLi	THF, 0°C	-
4	(80)	benzaldéhyde	<i>n</i> BuLi	THF, 0°C	(85) traces
5	(80)	(83)	<i>n</i> BuLi	THF, 0°C	-
6	(80)	(83)	NaH	THF, reflux	-
7	(80)	cyclohexanone	NaH	THF, reflux	-
8	(80)	cyclohexanone	NaH	DMSO, 60°C	-

2.2. Essais par réaction de Grignard

**Schéma 80**

Afin de synthétiser le bromure précurseur du magnésien, le 7-oxabicyclo[2.2.1]heptane commercial a été mis en réaction avec l'acide bromhydrique pour obtenir après une semaine le *trans*-4-bromocyclohexanol (86). La fonction alcool a ensuite été protégée sous forme d'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle, groupement protecteur connu pour sa bonne stabilité dans les conditions de la réaction de Grignard.

**Schéma 81**

La formation du magnésien à partir du bromure (87) a été maîtrisée après quelques essais. La réaction est effectuée sous reflux du THF, en présence de traces de 1,2-dibromoéthane comme activateur. Après consommation du magnésium, la solution est

refroidie à 0°C et la cyclohexane-1,4-dione monoprotégée est ajoutée. Le suivi CCM de la réaction montre que la cétone est consommée au bout d'une heure environ. A l'issue de la réaction, plusieurs produits ont pu être séparés par chromatographie :

- L'alcool attendu (**88**) a été isolé avec un rendement de 32% (par rapport à la cétone), sous la forme d'un mélange de deux isomères *cis/trans* qui n'ont pas pu être séparés. Cependant, sans pouvoir attribuer chaque stéréochimie, le spectre RMN ^{13}C montre que l'un de ces isomères est majoritaire.
- Le composé (**89**) qui résultait d'une réaction d'aldolisation a été isolé avec un rendement de 62% (par rapport à la cétone). Le magnésien agit dans ce cas-là en tant que base et non pas en tant que nucléophile.

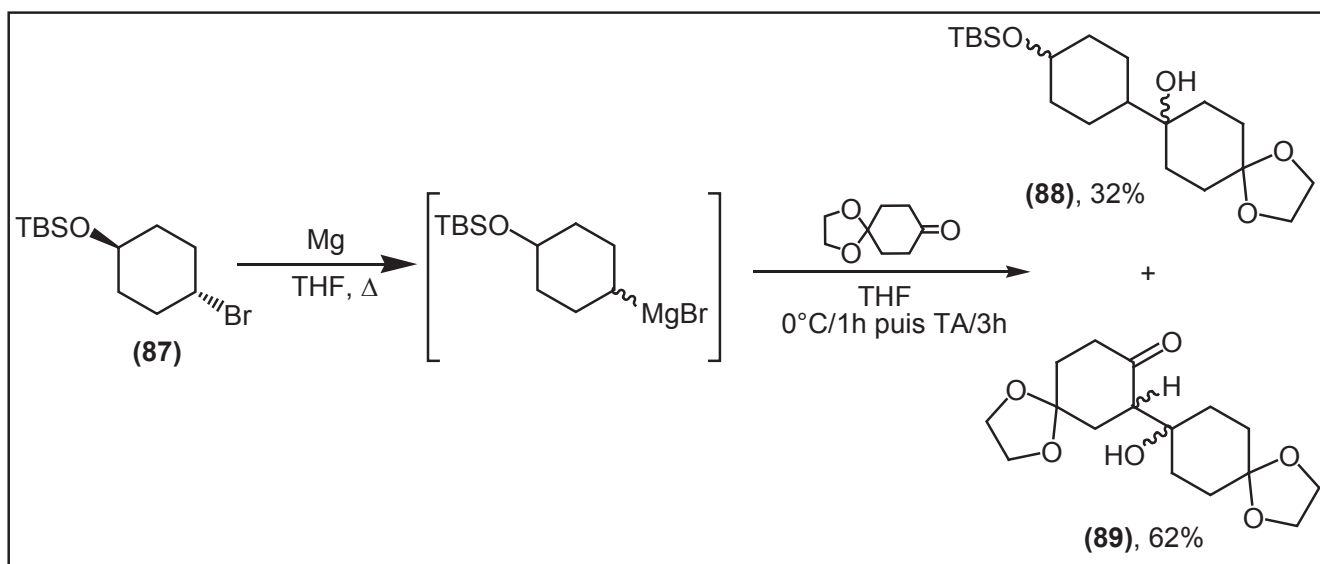


Schéma 82

L'utilisation d'organocériques est l'une des méthodes connues pour limiter les réactions secondaires liées à la basicité des organomagnésiens. Ces organométalliques possèdent une basicité plus faible et conduisent à de meilleurs rendements que les réactifs de Grignard lors d'une addition nucléophile sur une cétone énolisable²²². Nous avons préparé l'organocérique *in situ* à partir de l'organomagnésien et de CeCl_3 anhydre, lui-même préparé par séchage du chlorure de cérium heptahydraté ($\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), commercial, selon des méthodes décrites dans la littérature²²³. Pour engendrer l'organocérique, le chlorure de cérium doit être préalablement activé par chauffage ou par ultra-sons²²⁴ dans du THF anhydre. On procède ensuite aux additions successives du réactif de Grignard puis de la

cétone. Malheureusement, malgré plusieurs essais, cette méthode nous a toujours conduit à des rendements en alcool **(88)** plus faibles que ceux obtenus sans chlorure de cérium.

A ce stade de l'étude, nous avons décidé de procéder à des essais préliminaires de déshydratation pour nous assurer que nous serions en mesure d'atteindre le bicyclohexylidène **(90)** à partir de l'alcool **(88)**.

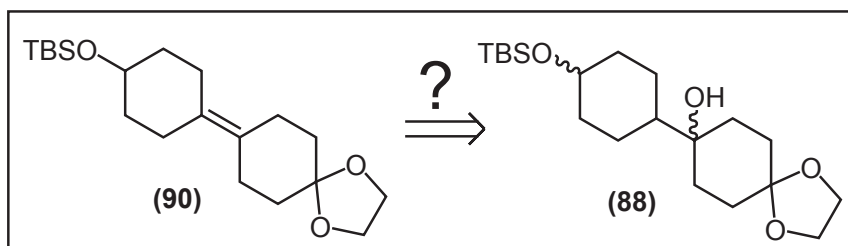


Schéma 83

Un essai de déshydratation a donc été mené par action du chlorure de thionyle sur l'alcool **(91)**, analogue de l'alcool **(88)** et préparé par réaction de Grignard du bromure de cyclohexyl magnésium sur la même cétone. Une fois obtenu, l'alcool **(91)** est mis en réaction avec SOCl_2 dans la pyridine à 0°C . Après une heure, deux nouveaux produits, dont l'un très majoritaire, sont apparus sur CCM. Après traitement et purification par chromatographie sur gel de silice, seul le produit majoritaire a pu être isolé et identifié comme le produit d'élimination avec la double liaison endocyclique **(93)**. Le second produit a été obtenu à l'état de traces et en mélange avec le produit **(93)**. L'étude du spectre RMN ^1H de cette fraction de mélange a montré que dans le produit minoritaire, les deux noyaux cyclohexyles étaient présents, ainsi que la protection dioxolane, par contre ce produit ne contenait pas d'hydrogènes éthyléniques. Ajoutons à cela le fait que ce produit possède un R_f très proche de **(93)** sur CCM, et que les deux produits se révèlent par KMnO_4 (indiquant la présence d'une double liaison). Ces observations nous permettent de supposer que le produit minoritaire serait le bicyclohexylidène **(92)**.

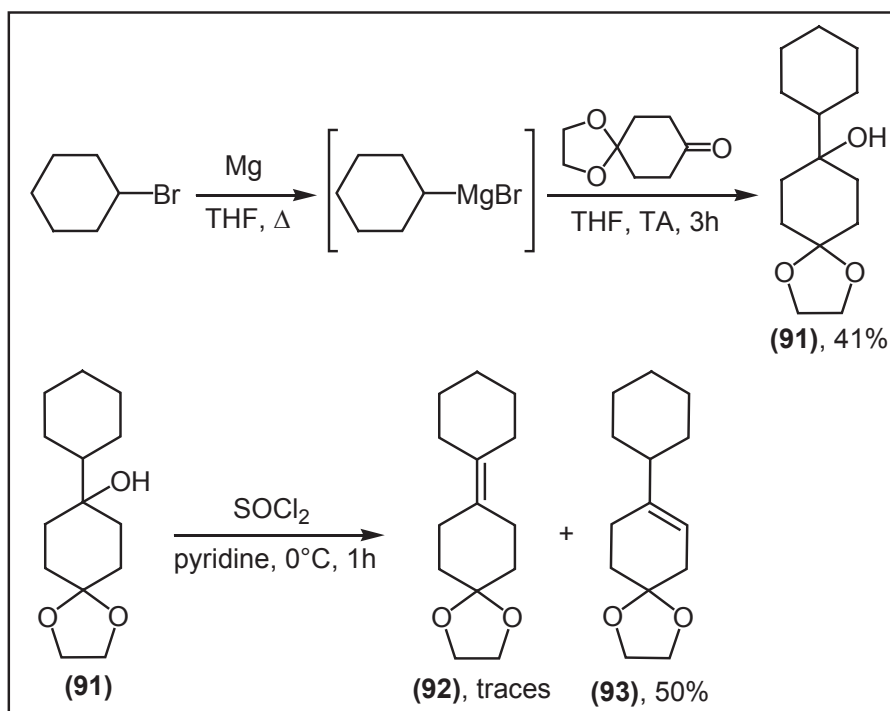


Schéma 84

L'ensemble de ces résultats (faibles rendements d'addition nucléophile et difficulté d'obtention de la double liaison exocyclique par déshydratation) nous ont amené à envisager une autre voie de synthèse des dérivés bicyclohexylidènes.

2.3. Essais par réaction de déshydratation-décarboxylation

Nous avons finalement appliqué la méthode décrite par Hoogesteger *et al.*²¹², à des synthons nous permettant de répondre à notre objectif de construire des bras espaceurs de composés bivalents.

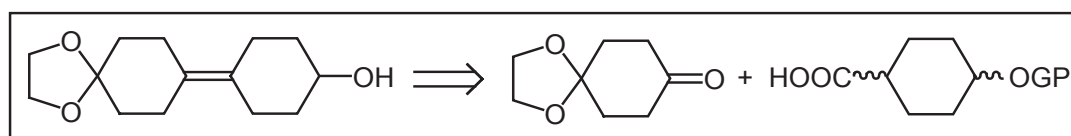


Schéma 85

L'acide cyclohexanecarboxylique (95) a été synthétisé, en deux étapes et avec un excellent rendement, à partir du (4-hydroxycyclohexyl)carboxylate d'éthyle, commercialement disponible sous forme d'un mélange de deux isomères. Dans un premier temps, la fonction alcool a été protégée par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle dans les conditions classiques. L'ester a ensuite été hydrolysé par LiOH pour conduire à l'acide (95)

dont la purification par chromatographie sur gel de silice s'est avérée nécessaire pour le bon déroulement des étapes suivantes. Cet acide s'est avéré hygroscopique, et a été conservé dans un dessiccateur sur P_2O_5 .

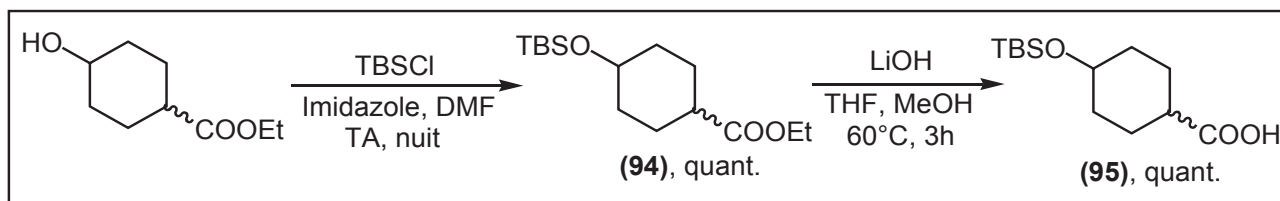


Schéma 86

Le couplage entre l'acide (95) et la cyclohexane-1,4-dione monoprotégée a ensuite été réalisé dans le THF anhydre. Dans un premier temps, le dianion lithié de l'acide (95) est préparé à basse température, en utilisant le LDA comme base. Le dianion donne une couleur rouge à la solution. La cétone est alors ajoutée. Après disparition de cette dernière, le milieu a été acidifié et l'acide β -hydroxycarboxylique (96) a été isolé, après chromatographie sur colonne de silice, avec un rendement satisfaisant. Comme attendu, ce produit intermédiaire a été obtenu sous forme d'un mélange de deux isomères, qui ont pu être séparés. Toutefois, leur séparation n'est pas nécessaire en raison de la formation de la double liaison à l'étape suivante. Nous avons également constaté la formation de deux produits de dégradation de l'acide (95) qui apparaissent avant l'addition de la cétone. Leurs structures n'ont pas pu être élucidées mais l'utilisation cet acide en excès pourrait constituer un moyen d'optimiser le rendement d'addition nucléophile.

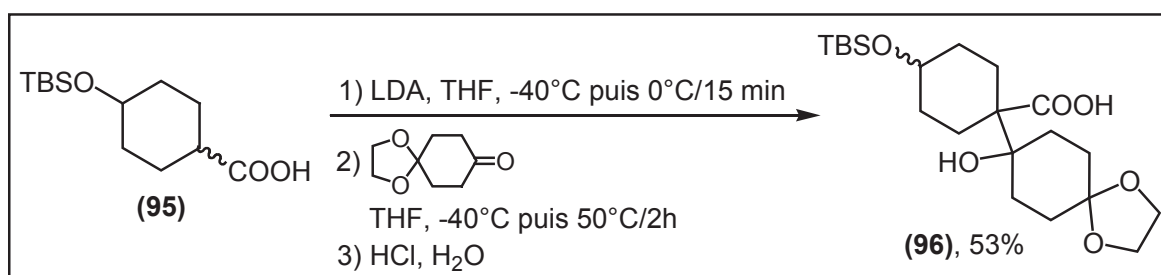


Schéma 87

Nous avons ensuite tenté d'effectuer la réaction de déshydratation-décarboxylation avec l'acétal de DMF que nous avons à notre disposition dans le laboratoire, c'est-à-dire le diméthylformamide diméthylacétal (DMF-DMA). Comme décrit dans la littérature (*cf* § 1.5.

de ce chapitre), le produit attendu **(90)** a été obtenu avec un faible rendement, la réaction conduisant essentiellement à l'ester méthylique **(97)**.

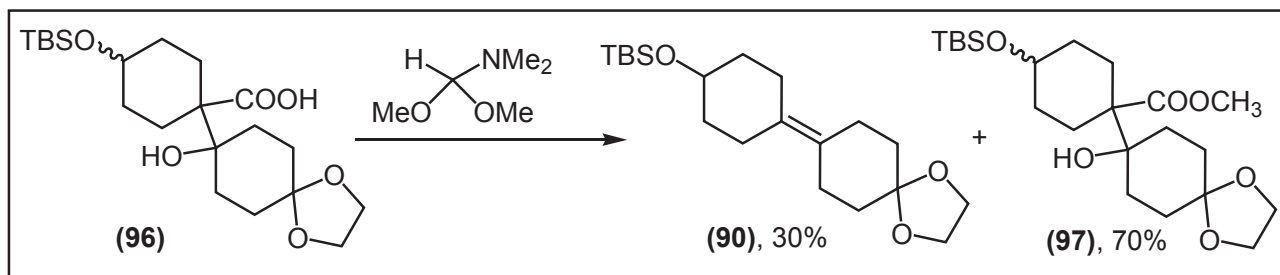


Schéma 88

Comme décrit par Hoogesteger *et al.*²¹², nous avons par la suite utilisé le DMF-dinéopentylacétal (DMF-DNPA) au reflux de l'acétonitrile, pour obtenir le bicyclohexylidène **(90)** avec un bon rendement après purification (*schéma 89*).

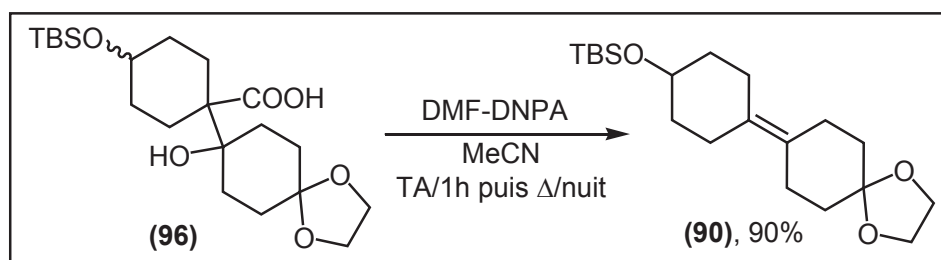


Schéma 89

Afin de poursuivre l'élongation de la chaîne et coupler un deuxième motif cyclohexylidène, la fonction alcool du composé **(90)** a été déprotégée par le TBAF puis oxydée en cétone par le PDC pour obtenir la cétone **(99)** avec un excellent rendement global de 81% en deux étapes.

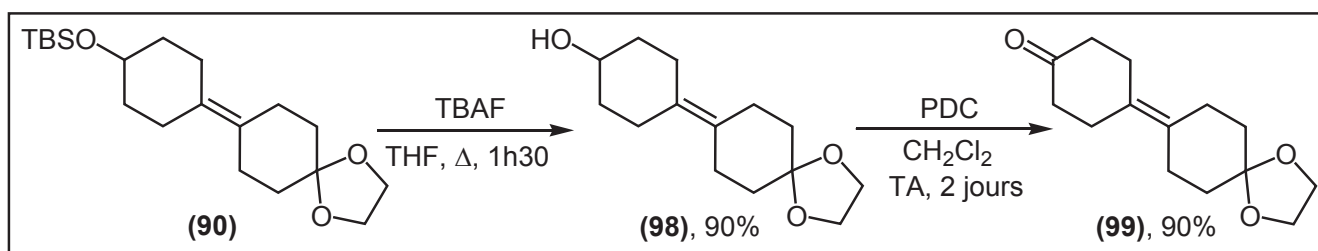


Schéma 90

Le couplage avec l'acide **(95)** a été effectué dans les mêmes conditions que précédemment, après formation du dianion lithié. Nous avons de cette manière obtenu l'acide β -hydroxycarbolique **(100)** sous forme d'un mélange de deux isomères avec un

rendement correct. Cet acide a été mis dans les conditions de réaction de déshydratation-décarboxylation en présence de DMF-DNPA pour conduire au tercyclohexylidène **(101)** avec un rendement satisfaisant.

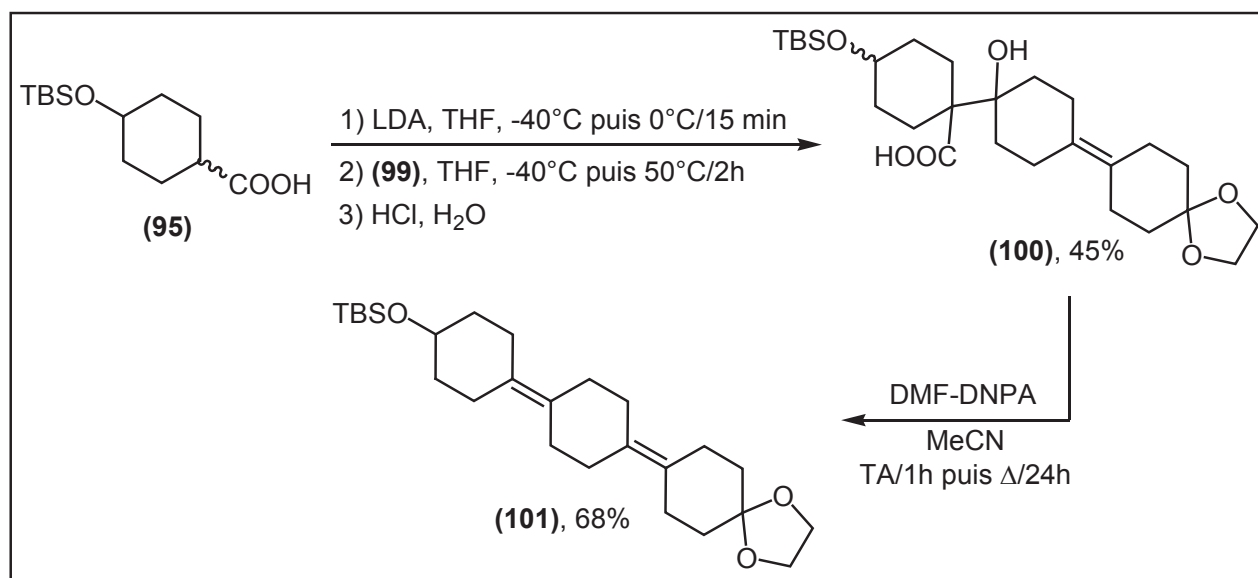


Schéma 91

2.4. Fonctionnalisation des oligocyclohexylidènes

Dans l'objectif de coupler les bras oligocyclohexylidènes obtenus à l'adénine, d'une part, et à la progestérone d'autre part, nous avons envisagé d'introduire un groupement hydroxyméthyle en position 4, et un groupement aminométhyle en position 4'. Ce carbone supplémentaire éloignera les fonctions alcool et amine du système oligocyclohexylidène facilitant ainsi les réactions de couplage à l'hétérocycle azoté et au stéroïde. De plus, il confèrera une plus grande flexibilité au bras espaceur. Les premiers essais de fonctionnalisation ont été menés sur le système bicyclohexylidène.

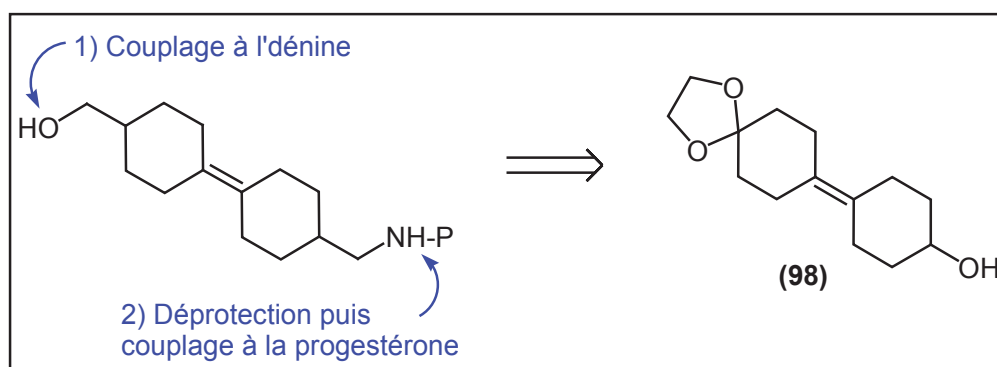


Schéma 92

Dans cette perspective, nous avons choisi de remplacer la fonction alcool du produit **(98)** par un groupement cyanure qui constitue un précurseur du groupement aminométhyle. Pour cela, nous avons essayé une méthode directe, décrite par Iranpoor *et al.*²²⁵, qui peut être considérée comme une réaction de Mitsunobu modifiée, utilisant la triphénylphosphine, la dichlorodicyanobenzoquinone (DDQ) comme électrophile et le cyanure de *tétra*-butylammonium comme source de cyanure. Malheureusement, plusieurs essais, dans des conditions identiques à celles de la publication d'origine, n'ont donné aucun produit, et le produit de départ a été totalement récupéré.

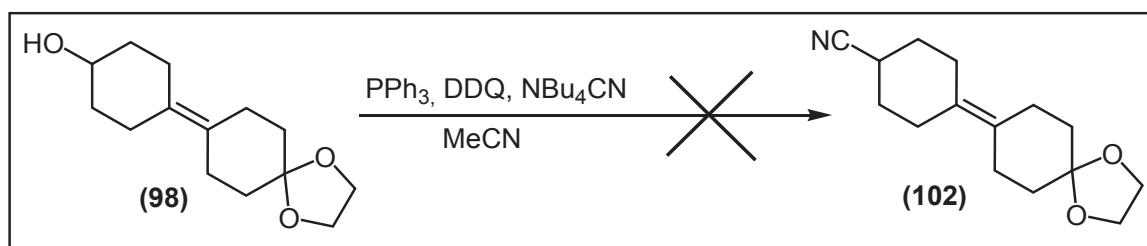


Schéma 93

Une deuxième voie de synthèse a alors été mise en œuvre par activation de la fonction alcool sous forme de mésylate suivie du déplacement du sulfonate par un cyanure. Ainsi, le mésylate **(103)** a été synthétisé à partir de **(98)**, dans des conditions classiques, avec un excellent rendement. Le groupement cyanure a été ensuite introduit en faisant réagir **(103)** avec le cyanure de *tétra*-butylammonium. La réaction menée dans des conditions thermiques classiques évolue très lentement et aboutit à un grand nombre de sous-produits. Par contre, sous activation micro-onde, elle devient très rapide, et donne majoritairement le produit désiré, accompagné toutefois de deux sous-produits : le produit d'élimination **(104)**, et très minoritairement, l'isonitrile **(105)**. Cet isomère a été identifié par son spectre RMN ^1H où on observe un multiplet à 3,78 ppm correspondant au proton en α de l'isonitrile alors que le proton correspondant dans le cyanure **(102)** se trouve à 2,79 ppm, et par son spectre infrarouge, présentant une forte bande d'absorption à 2139 cm^{-1} , contre une bande d'absorption moyenne à 2233 cm^{-1} pour le cyanure **(102)**.

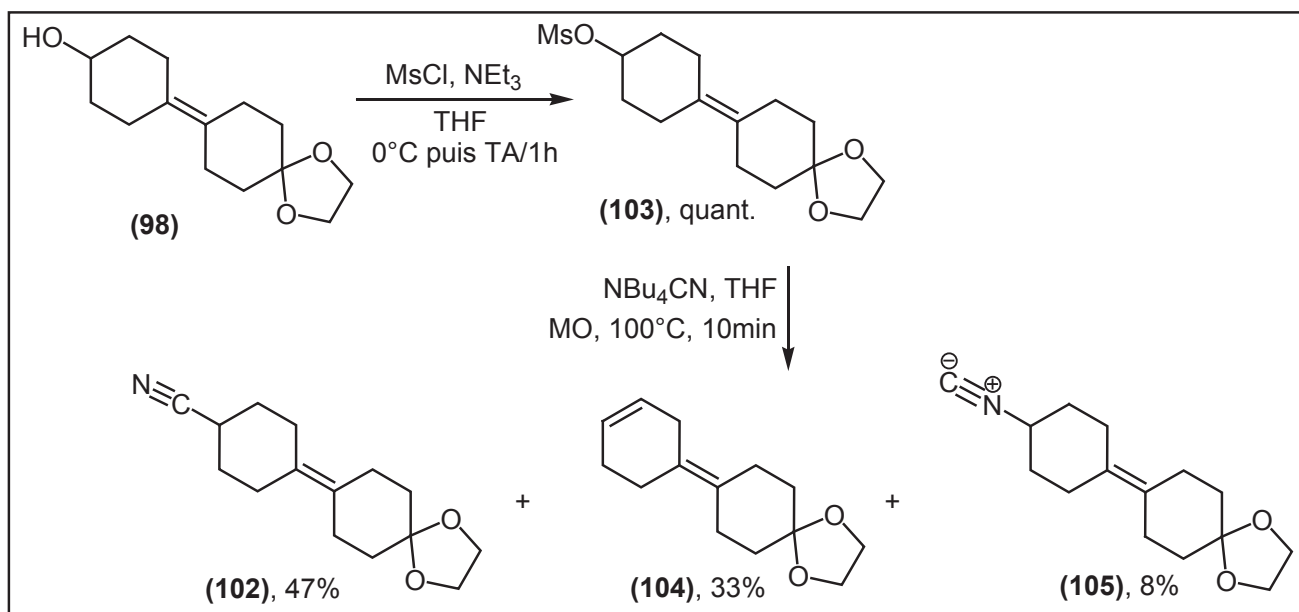


Schéma 94

Un essai sous micro-ondes, à 150°C , pendant 3 minutes a conduit à des rendements presque identiques.

La synthèse s'est poursuivie par la déprotection de la fonction cétone du cyanure (102), par hydrolyse acide du cétal. Les conditions douces de déprotection ont conduit à la cétone (106) avec un rendement quantitatif.

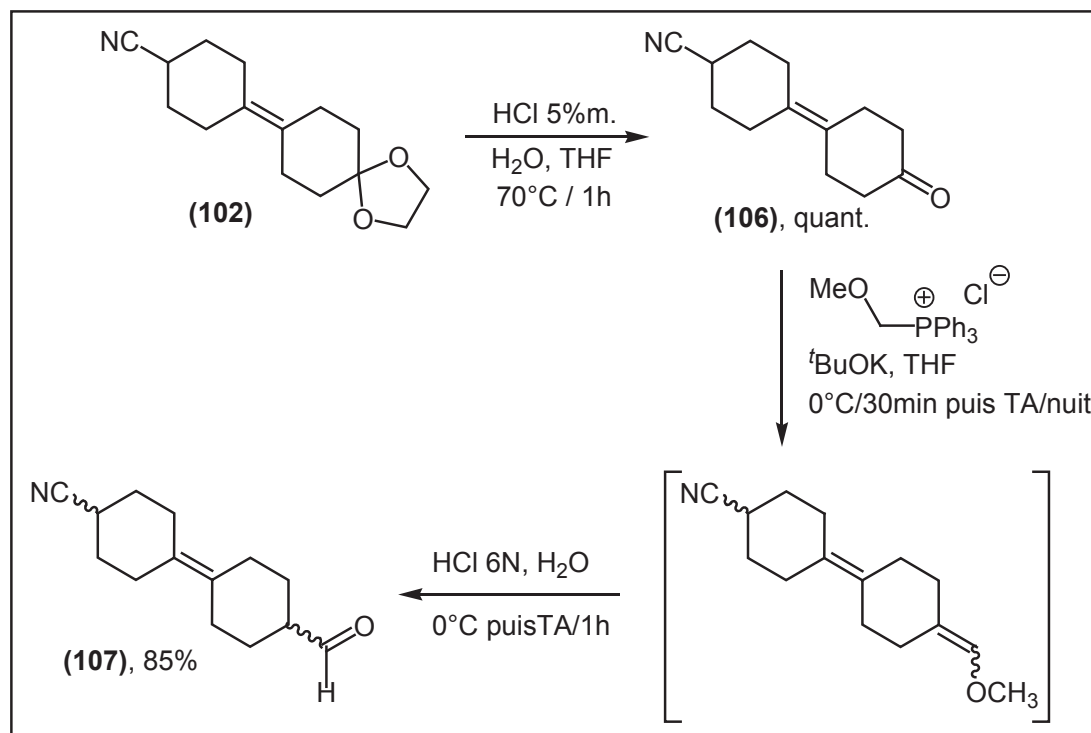


Schéma 95

Nous avons ensuite envisagé l'insertion d'une fonction aldéhyde comme précurseur du groupement hydroxyméthyle. Une réaction de Wittig a donc été réalisée sur la cétone **(106)** (*schéma 95*) en présence du chlorure de méthoxyméthyltriphenylphosphonium pour conduire intermédiairement à un éther d'énol, qui est hydrolysé en condition acide fort pour donner l'aldéhyde **(107)**. Le produit **(107)** a été obtenu sous forme d'un mélange de deux isomères *cis* et *trans*.

La suite de la synthèse a été effectuée sur ce mélange, les deux isomères n'étant séparés qu'à la dernière étape. Nous avons alors effectué la réduction simultanée des fonctions aldéhyde et cyanure du dérivé **(107)** par LiAlH_4 dans le THF anhydre. Après deux heures de reflux, la réaction nous a permis d'obtenir le composé **(108)** présentant le groupe hydroxyméthyle en position 4 et le groupe aminométhyle en position 4'. Cet amino-alcool, toujours sous la forme d'un mélange de stéréoisomères *cis/trans*, a été engagé sans purification supplémentaire dans la réaction suivante qui consiste à protéger la fonction amine par un groupement fluorenylméthoxycarbonyl (Fmoc). Le choix de ce groupement protecteur relevait de considérations pratiques. En effet, il rend le composé visible à l'UV, ce qui a permis la séparation des deux isomères *cis* et *trans* **(109a,b)** par chromatographie sur couche mince, après plusieurs éluions successives.

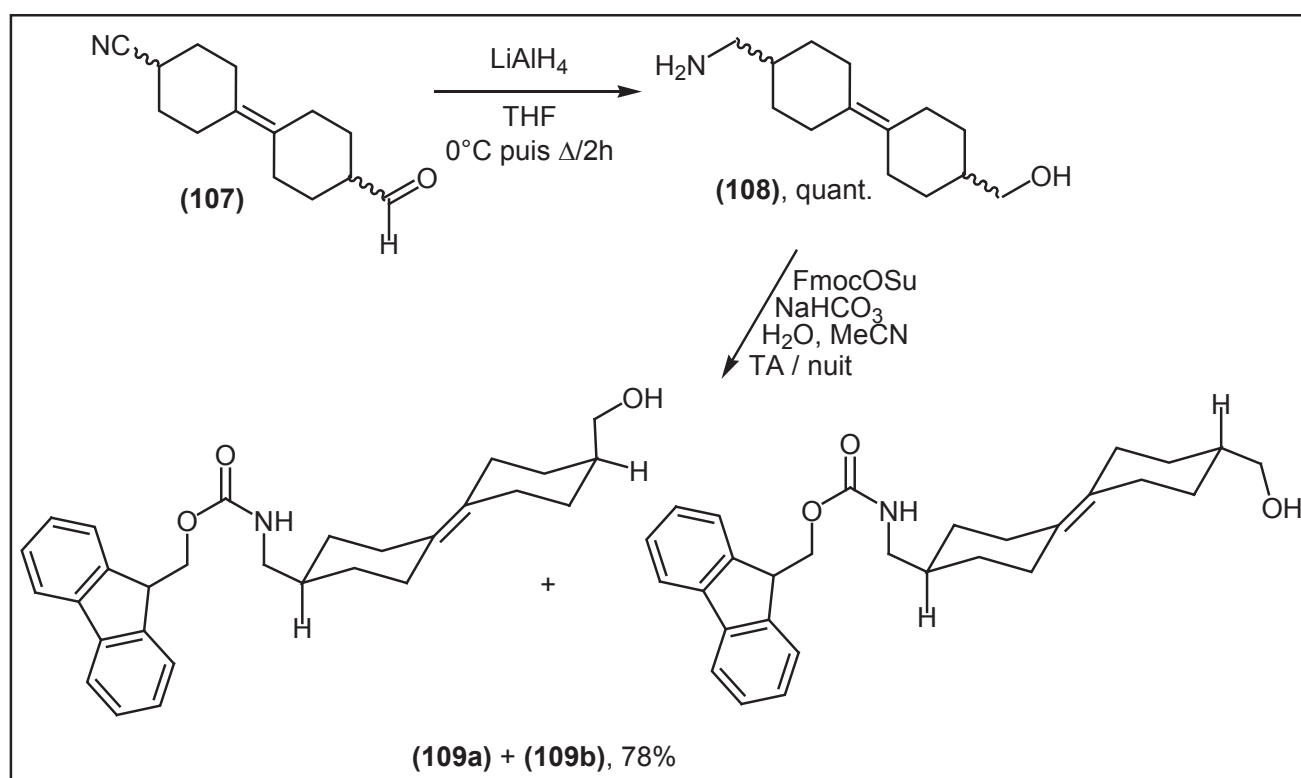


Schéma 96

Afin de déterminer la stéréochimie de chacun des deux composés (**109a**) et (**109b**), des essais de cristallisation sont en cours, en vue d'obtenir leur structure cristallographique par diffraction des rayons X.

Nous n'avons pas pu effectuer des essais de couplage de ces composés à l'adénine et à la progestérone dans le temps imparti à ce travail de thèse.

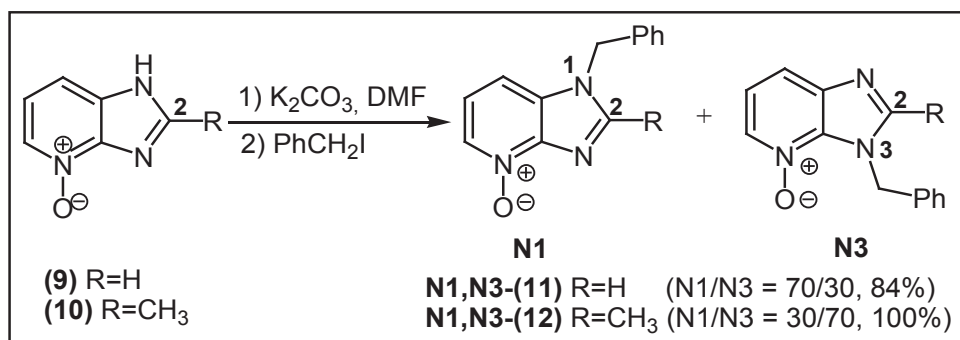
Conclusion et perspectives

La multichimiorésistance liée aux transporteurs de la famille des ABC occupe une place centrale parmi les mécanismes de résistance des cancers vis-à-vis des traitements chimiothérapeutiques. Plusieurs transporteurs membranaires sont impliqués dans cette résistance pléiotropique aux agents anticancéreux, dont la glycoprotéine-P (Pgp) qui est la plus étudiée et la mieux connue. Son inhibition reste un défi majeur pour la recherche dans le domaine de la cancérologie depuis les deux dernières décennies.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la synthèse et à l'évaluation de molécules susceptibles d'inhiber la Pgp, et de ce fait, augmenter la sensibilité des tumeurs aux chimiothérapies.

Nous avons mis au point une nouvelle voie de synthèse d'hétérocycles azotés de type imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-one, substitués en position 1, 2 et 4. Ces hétérocycles possèdent une homologie de structure avec le noyau adénine, ce qui leur permettrait d'être des inhibiteurs potentiels des ATPases, en particulier des transporteurs ABC.

Dans un premier temps, nous avons étudié la régiosélectivité de la *N*-alkylation des imidazo[4,5-*b*]pyridine-4-oxydes en rationalisant notre travail expérimental par des calculs théoriques.



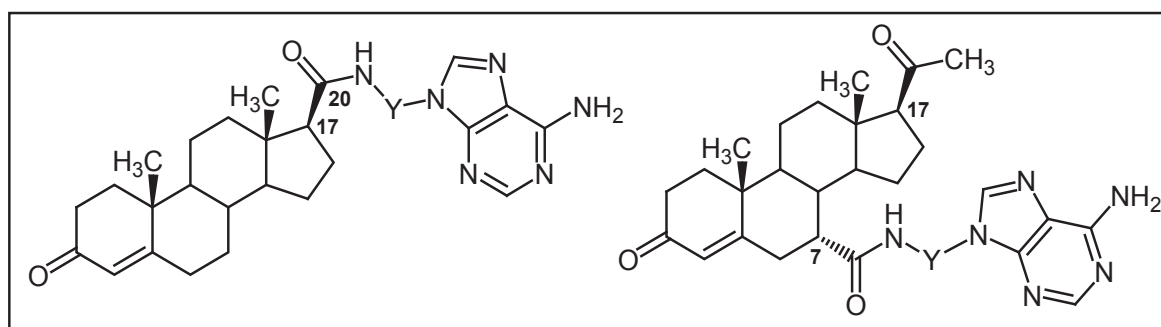
Il s'est avéré que, dans tous les cas, une interaction répulsive $X^{\cdots}O^{\ominus} \cdots N^{+}$ entre l'halogène partant et l'oxygène du N-oxyde en position 4 tend globalement à légèrement défavoriser une approche en N3, orientant ainsi la réaction vers la formation du produit N1. Cependant, le groupement méthyle en position 2 exerce une telle gêne stérique sur le phényle lors d'une approche en N1 de l'halogénure de benzyle qu'il favorise la formation du produit N3 malgré la répulsion $X^{\cdots}O^{\ominus} \cdots N^{+}$ toujours présente dans l'état de transition N3.

La synthèse a ensuite été poursuivie ce qui nous a permis de décrire trois nouveaux produits possédant le noyau imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-one, substitués en position 1 par un groupement benzyle, et en position 4 par une chaîne *tert*-butoxycarbonyl aminoalcane à 3, 4 ou 6 unités méthylène. Le composé ayant une chaîne hexaméthylénique se lie faiblement au fragment recombinant H6-NBD1 du transporteur CpABC3 (analogue de la Pgp), toutefois il n'inhibe pas son activité ATPasique. La comparaison avec des imidazopyridinones précédemment synthétisées dans notre laboratoire suggère qu'une fonction ester sur la chaîne en position 4 soit préférable à une fonction NHBoc pour l'activité inhibitrice.

Par la suite, le noyau imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-one peut constituer un « châssis moléculaire » permettant la synthèse de dérivés polysubstitués. Il est connu que le site de liaison de l'adénine dans les ATPases est adjacent à plusieurs poches hydrophobes, et le ciblage de ces poches par des substituants adaptés pourrait augmenter l'affinité du noyau hétérocyclique (dans notre cas l'imidazopyridinone) vis-à-vis du site à ATP.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes également intéressés à la synthèse de dérivés bivalents, contenant un noyau adénine, lié par un bras variable en position 7 ou 20 de la progestérone. Ces bivalents ont été conçus dans l'objectif de cibler simultanément le site à ATP et le site aux stéroïdes de la Pgp.

Ainsi, nous avons décrit la synthèse de dix-sept composés bivalents, dont le motif adénine-bras est lié par une liaison amide à la position 7 ou 20 de la progestérone. L'activité inhibitrice de ces composés a été évaluée en mesurant l'augmentation de l'accumulation intracellulaire, chez des lignées cellulaires surexprimant la Pgp (cellules leucémiques humaines K562/R7), d'un substrat fluorescent transporté par la Pgp (la daunorubicine). Parmi tous les composés testés, seul le composé bivalent possédant un bras hexaméthylénique couplé en position 20 du stéroïde, a montré une activité inhibitrice supérieure à celle de la progestérone.



Ce premier résultat pourrait constituer une base pour l'élaboration ultérieure de bivalents ciblant la Pgp :

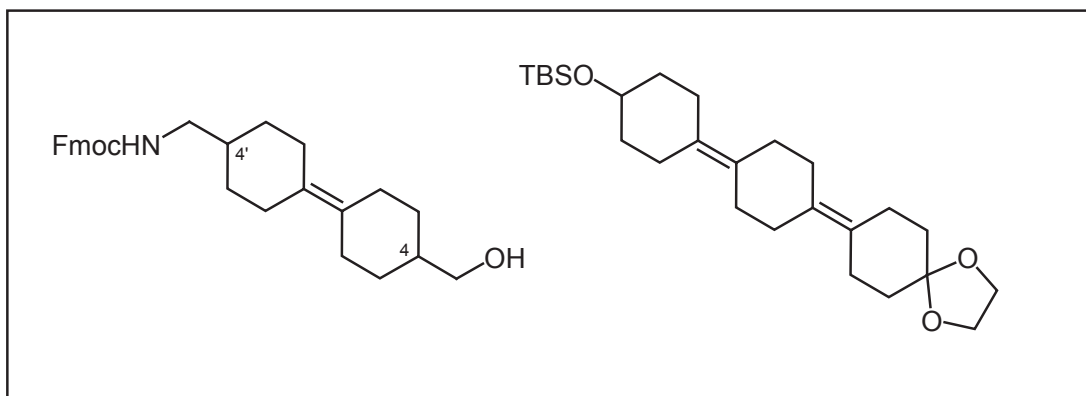
- Dans un premier temps, la position 20 du stéroïde pourra être conservée comme point de couplage. La progestérone pourra être remplacée par des squelettes stéroïdes plus affins, dont la structure pourra s'inspirer d'autres stéroïdes inhibiteurs de la Pgp, tel que le RU486.
- L'adénine pourra également être remplacée par un hétérocycle possédant une plus forte affinité pour le site à ATP. L'évaluation préalable de l'activité anti-ATPasique de ces hétérocycles vis-à-vis du fragment H6-NBD1 de CpABC3 va constituer un outil précieux pour aider au choix des meilleurs ligands du site à ATP, avant de procéder à leur couplage.
- Enfin, la synthèse de bras espaceurs plus longs devra être effectuée. La structure polyméthylénique de ces bras pourra être maintenue dans un premier temps. En effet, des tests d'activité inhibitrice ont été effectués en parallèle sur des bivalents adénine-progestérone ⁱ, possédant des bras de nature polyéthylène glycol (PEG). Les tests biologiques ont montré que les bivalents en C20 de la progestérone, avec un bras à deux ou trois unités polyéthylèneglycol, possédaient une activité moins importante que le bivalent analogue à bras hexaméthylénique.

Dans le cadre de notre recherche concernant les composés bivalents, nous nous sommes particulièrement intéressés à la synthèse de bras de type oligocyclohexylidène. Ces composés possèdent une structure rigide et s'agencent sous forme d'une chaîne à longueur bien déterminée. De ce fait, ils pourraient constituer des bras rigides adaptés aux composés bivalents.

Nous avons synthétisé un composé à deux unités cyclohexylidène, substitué sur les carbones terminaux par un groupement hydroxyméthyle en position 4, et par un groupement aminométhyle en 4'. Ces groupements fonctionnels ont été choisis pour permettre des couplages ultérieurs analogues à ceux décrits dans cette thèse. Nous avons

ⁱ Synthèse effectuée au sein de notre équipe EA 4443, sous la direction du Pr. Roland Barret et du Dr Thierry Lomberget.

également montré que cette méthode itérative pouvait être adaptée à des dérivés fonctionnalisés par la synthèse d'un composé à trois unités cyclohexylidène.



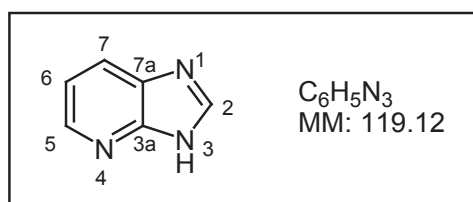
Partie expérimentale

Partie Expérimentale Chimie

Matériels et méthodes

Toutes les réactions sensibles à l'air ou à l'humidité ont été réalisées sous atmosphère d'argon. Les points de fusion ont été mesurés avec un appareil Barnstead Electrothermal 9200 et n'ont pas été corrigés. Les spectres infrarouges ont été enregistrés en utilisant des pastilles de KBr ou des films sur NaCl avec un appareil Perkin-Elmer FT-IR SPECTRUM ONE. Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker ALS300, Bruker DRX300 ou Bruker DRX400 à transformée de Fourier, avec un lock interne sur le deuterium, en opérant à une fréquence de 300 MHz ou de 400MHz. Les spectres RMN ^{13}C ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker DRX300 ou Bruker DRX400 à transformée de Fourier, avec un lock interne sur le deuterium, en opérant à une fréquence de 75 MHz ou de 100MHz. Tous les spectres ont été enregistrés à 25°C. Les déplacements chimiques ont été exprimés en partie par million (ppm) par rapport au signal résiduel du solvant deutéré ($\delta = 2.50$ ppm en RMN ^1H et $\delta = 39.52$ ppm en RMN ^{13}C pour le DMSO- d_6 , $\delta = 7.26$ ppm en RMN ^1H et $\delta = 77.16$ ppm en RMN ^{13}C pour CDCl_3 , $\delta = 3.34$ ppm en RMN ^1H et $\delta = 49.86$ ppm en RMN ^{13}C pour le CD_3OD). La multiplicité du carbone a été déterminée par des expériences DEPT. La spectrométrie de masse à basse et haute résolution a été enregistrée avec un appareil ThermoQuest FINNIGAN MAT 95 XL fonctionnant à 70eV. La purification des produits par chromatographie sur colonne de silice a été réalisée avec de la silice Merck Kieselgel 60 Å (40 -63 μm). La chromatographie analytique sur couche mince (CCM) a été réalisée à l'aide de plaques Merck (silice Kieselgel 60 F254, épaisseur 200 μm sur aluminium). La chromatographie préparative sur couche mince a été réalisée à l'aide de plaques Merck 20×20 cm, Kieselgel 60 F254 (épaisseur 250 μm). Tous les réactifs chimiques commerciaux ont été utilisés sans purification, sauf mention contraire. Les masses molaires (MM) indiquées dans la partie expérimentale sont exprimées en g/mol.

• **3H-Imidazo[4,5-*b*]pyridine (7)** ¹³³



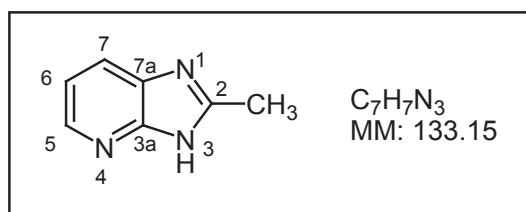
La 2,3-diaminopyridine (4,00g, 36,7mmol) et l'orthoformate de triéthyle (80mL, 483mmol) sont introduits dans un ballon équipé d'un réfrigérant. Le mélange réactionnel est porté au reflux (150°C) pendant 3h. Après évaporation des produits volatils, le résidu marron est traité par une solution aqueuse de HCl (37%, 40mL) et le reflux est poursuivi pendant 1h. Le milieu réactionnel est ensuite neutralisé par K₂CO₃ solide jusqu'à pH=7. La phase aqueuse est extraite par l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄ puis concentrées pour donner le produit **(7)** sous la forme d'un solide blanc (3.23g, 74%) sans autre purification.

Pf= 152-154°C (litt.152-153°C)

¹H RMN (300MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.84 (bs, 1H, NH), 8.43 (s, 1H, H2), 8.35 (dd, 1H, *J*₁= 1.5Hz, *J*₂= 4.7Hz, H5), 8.02 (dd, 1H, *J*₁=1.5Hz, *J*₂= 7.9Hz, H7), 7.23 (dd, 1H, *J*₁=4.7, *J*₂= 7.9 Hz, H6).

IR (KBr) ν(cm⁻¹): 3135, 3093, 3028, 2981, 2921, 2855, 2810, 1475, 1436, 1385, 1344, 1315, 1277, 1235, 1226, 1115, 954, 898, 789, 777.

• **2-Méthyl-3H-Imidazo[4,5-*b*]pyridine (8)** ¹⁴¹



La 2,3-diaminopyridine (1 g, 9.1 mmol) est mise en solution dans 20mL d'orthoacétate de triéthyle. Le mélange est chauffé au reflux sous agitation pendant 3h30. Ensuite, le solvant est évaporé sous vide. L'acide chlorhydrique (37%, 10mL) est alors additionné au résidu. Le mélange est chauffé au reflux sous agitation pendant 1 heure à 105°C. Après

refroidissement, le mélange est neutralisé avec Na_2CO_3 solide jusqu'à $\text{pH}=6-7$. Après extraction avec AcOEt , la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. La purification du résidu par chromatographie sur gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH , 90/10) conduit au produit **(8)** ($R_f=0,2$) sous la forme de cristaux bruns (780 mg, 78%).

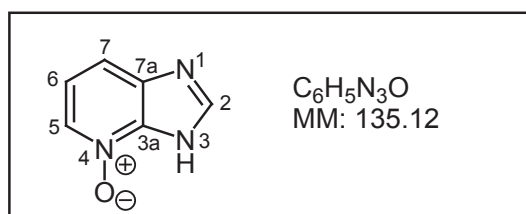
Pf= 195-196°C (litt. 195-197°C).

^1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 12.69 (bs, 1H, NH), 8.23 (d, 1H, $J=4.9$ Hz, H5), 7.86 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, H7), 7.16 (dd, 1H, $J_1=4.9$ Hz, $J_2=7.9$ Hz, H6), 2.53 (s, 3H, CH_3).

^{13}C RMN (75MHz, DMSO- d_6) δ : 153.54* (C2), 151.92* (C3a), 142.53 (CH-5), 131.90 (C7a), 122.51 (CH-7), 117.14 (CH-6), 15.02 (CH_3). (Les déplacements chimiques marqués d'un astérisque (*) peuvent être interchangeables ; les signaux sont très élargis du fait de la présence des 2 tautomères).

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3066-2661, 1413, 1265, 775.

• **3H-Imidazo[4,5-*b*]pyridine-4-oxyde (9)** ¹³⁵



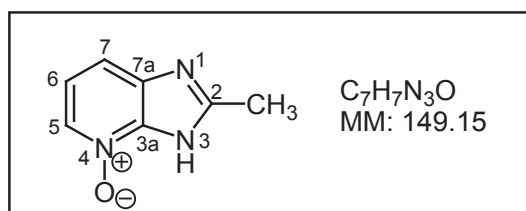
mCPBA (60-70%) est préalablement lavé par une solution tampon phosphate ($\text{pH}=7,5$) puis titré par dosage iodométrique pour obtenir un péricarboxyde à 90% de pureté. *mCPBA* (90%, 7g, 40,6mmol) est additionné, sous agitation et à 0°C, à une solution du composé **(7)** (2.18g, 18.3mmol) dans de l'acide acétique glacial (40mL). Après dissolution totale, l'agitation est arrêtée pour permettre la précipitation du produit. Après 3h, le mélange réactionnel est filtré. Le composé **(9)** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (1.86g, 75%) sans autre purification.

Pf= 255-258°C (litt.¹²⁹ 250-253°C).

^1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 13.27 (bs, 1H, NH), 8.43 (s, 1H, H2), 8.20 (dd, 1H, $J_1=0.8\text{Hz}$, $J_2=6.3\text{Hz}$, H5), 7.60 (1H, dd, $J_1=0.8\text{Hz}$, $J_2=8.1\text{Hz}$, H7), 7.21 (dd, 1H, $J_1=6.3\text{Hz}$, $J_2=8.1\text{Hz}$, H6).

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3349, 3118, 2868, 2764, 1678, 1585, 1472, 1438, 1400, 1351, 1306, 1275, 1258.

• **2-Méthyl-3H-imidazo[4,5-*b*]pyridine-4-oxyde (**10**)**



*m*CPBA (60-70%) est préalablement lavé par une solution tampon phosphate (pH=7,5) puis titré par dosage iodométrique pour obtenir un péricide à 90% de pureté. *m*CPBA (90%, 7g, 40.6mmol), sous agitation à 0°C, à une suspension du composé (**8**) (1.59g, 12mmol) dans du chloroforme (80mL). Après 4h30, les produits volatils sont évaporés. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (THF/CH₂Cl₂/MeOH, 5/7/2,5). Le composé (**10**) (*R_f*=0.14 dans THF/MeOH, 8/2) est obtenu sous la forme d'un solide jaune (1.24g, 70%).

Pf=266-269°C.

¹H RMN (300MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.09 (d, 1H, *J*=6.4 Hz, H5), 7.50 (d, 1H, *J*= 8.1Hz, H7), 7.14 (dd, 1H, *J*₁= 6.4Hz, *J*₂=8.1Hz, H6), 2.53 (s, 3H, CH₃).

¹³C RMN (75MHz, DMSO-*d*₆) δ : 153.6 (C3a et C7a), 132.3 (CH-5), 118.1 (CH-6 et CH-7), 111.3 (C2), 14.82 (CH₃).

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3332, 3098, 2968, 2895, 2791, 2753, 2716, 2637, 2555, 1587, 1524, 1463, 1446, 1407, 1384, 1319, 1279, 1233, 1165, 994, 873, 838, 785, 772, 738.

SM (ESI), *m/z* : 172 ([M+Na]⁺, 11%), 150 ([M+H]⁺, 100%), 149 (M⁺, 5%), 133 (15%).

HRMS (CI) : calc. pour C₇H₇N₃O + H: 150.0667, trouvée: 150,0666.

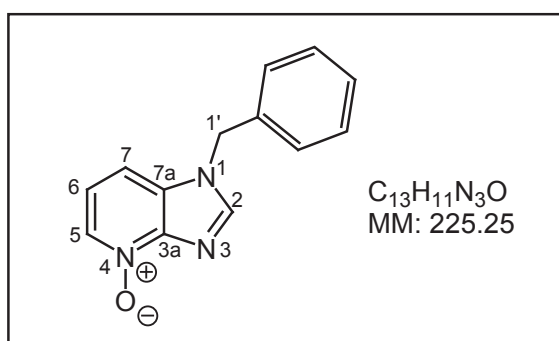
N-Benzylation des imidazopyridines N-oxyde (9) et (10)

De l'iodure de benzyle est préparé comme suit : un mélange d'acide iodhydrique aqueux (57%, 8.18mL, 36.4mmol) et de bromure de benzyle (1.09mL, 9.1mmol) est chauffé à 105°C, pendant 10 min, puis refroidi en ajoutant de la glace dans le milieu réactionnel. La phase aqueuse est ensuite extraite trois fois par CH₂Cl₂, la phase organique résultante est lavée deux fois par une solution aqueuse de bisulfite de sodium (5%*m*) et une fois avec de l'eau, ensuite elle est séchée par Na₂SO₄, et le solvant est évaporé pour obtenir 1.96 g d'un liquide marron qui est mis en œuvre sans autre purification.

1) N-benzylation de l'imidazopyridine N-oxyde (9)

K₂CO₃ (0.37g, 2.66mmol) est ajouté à une solution de composé **(9)** (0.3g, 2.22mmol) dans du diméthylformamide (5mL). Le mélange est agité pendant 50 minutes à température ambiante, puis l'iodure de benzyle (400μL, 3.2mmol) préalablement préparé est ajouté. Le mélange est agité pendant 3h30, puis les produits volatils sont évaporés sous vide. Le résidu huileux marron est partagé entre CH₂Cl₂ et H₂O. La phase aqueuse est extraite par CH₂Cl₂, les phases organiques réunies sont ensuite séchées sur Na₂SO₄ et le solvant est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice, (CH₂Cl₂/méthanol, 95/5) pour obtenir deux produits : **N3-(11)** solide blanc (0.13g, 26%, R_f=0,08) et **N1-(11)** solide beige (0.29g, 58%, R_f=0.22).

- 1-Benzyl-1H-imidazo[4,5-*b*]pyridine-4-oxyde, N1-(11):**



Pf= 174-176°C.

¹H RMN (300MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.64 (s, 1H, H2), 8.20 (dd, 1H, *J*₁= 0.7Hz, *J*₂= 6.3Hz, H5), 7.60 (dd, 1H, *J*₁=0.7Hz, *J*₂=8.3 Hz, H7), 7.40-7.25 (m, 5H, H arom.), 7.21 (dd, 1H, *J*₁= 6.3Hz, *J*₂=8.3Hz, H6), 5.54 (s, 1H, CH₂).

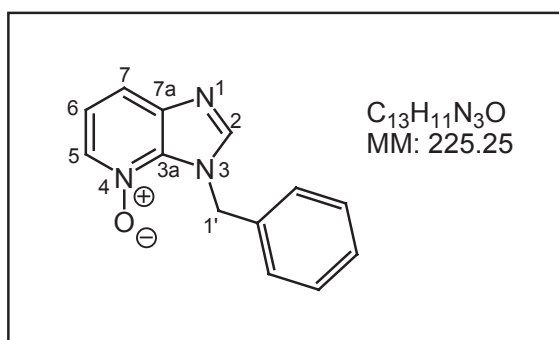
^{13}C RMN (75MHz, DMSO- d_6) δ : 147.5* (C3a), 146.0* (C7a), 136.8 (CH-2), 134.1 (CH-5), 131.2 (C ipso, Ph), 129.7 (2xCH arom., Ph), 129.2 (CHpara, Ph), 128.4 (2xCH arom., Ph), 120.0 (CH-7), 110.7 (CH-6), 49.4 (CH₂). (Les déplacements chimiques marqués d'un astérisque (*) peuvent être interchangeés).

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3112, 3087, 2957, 2931, 1618, 1584, 1497, 1480, 1468, 1449, 1434, 1381, 1251, 1230, 1206, 1004, 752, 736.

SM (EI), m/z : 225 (M^+ , 4%), 209 ($[\text{M-O}]^+$, 54%), 208 ($[\text{M-OH}]^+$, 96%), 195 (42%), 119 (16%), 91 (C_7H_7^+ , 100%), 77 (14%), 65 (16%).

HRMS (CI) : calc. pour $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O} + \text{H}$: 226.0980, trouvée: 226.0977.

• **3-Benzyl-3H-imidazo[4,5-*b*]pyridine-4-oxyde, N3-(11):**



Pf= 101-103°C.

^1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8.39 (d, 1H, $J=6.8$ Hz, H5), 8.37 (s, 1H, H2), 8.32 (d, 1H, $J=7.7$ Hz, H7), 7.51-7.39 (m, 5H, H arom.), 7.17 (dd, 1H, $J_1=6.8\text{Hz}$, $J_2=7.7$ Hz, H6), 5.72 (s, 2H, CH₂).

^{13}C RMN (75MHz, DMSO- d_6) δ : 160.2 (CH-2), 146.3* (C3a), 146.1* (C7a), 133.0 (Cipso, Ph), 129.9 (2xCHarom., Ph), 129.5 (CH-5), 129.4 (CH para), 128.9 (CH-7), 128.6 (2xCH arom., Ph), 112.0 (CH-6), 80.1 (CH₂). (Les déplacements chimiques marqués d'un astérisque (*) peuvent être interchangeés).

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3095, 3088, 3022, 2956, 2923, 2896, 1618, 1580, 1477, 1436, 1394, 1379, 1297, 1264, 1234, 1185, 1161, 1066, 1024, 938, 910, 843, 789, 747, 713, 697, 645.

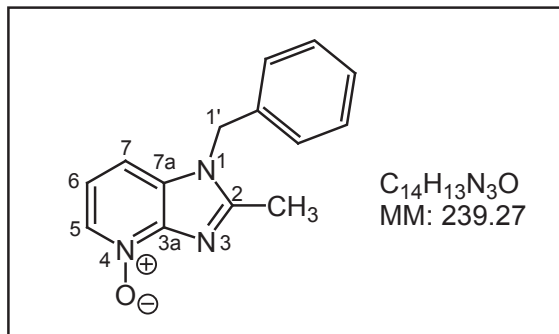
SM (ESI), m/z : 226 ($\text{M}^+ + \text{H}$, 100%), 210 ($[\text{M-O}]^+ + \text{H}$, 13%).

HRMS (EI): calc. pour $C_{13}H_{11}N_3O$: 225,0902, trouvée: 225,0903.

2) N-benzylation de l'imidazopyridine N-oxyde (**10**)

K_2CO_3 (0,33g, 2,4mmol) est ajouté à une solution de composé (**10**) (0.30g, 2.01mmol) dans du diméthylformamide (5mL). Le mélange est agité pendant 50 minutes à température ambiante, puis l'iodure de benzyle (350 μ L, 2.8mmol) préalablement préparé est ajouté. Le mélange est agité pendant 5h, puis les produits volatils sont évaporés sous vide. Le résidu huileux marron est partagé entre CH_2Cl_2 et H_2O . La phase aqueuse est extraite par CH_2Cl_2 , les phases organiques réunies sont ensuite séchées sur Na_2SO_4 et le solvant est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH_2Cl_2 /méthanol, 95/5) pour obtenir deux produits : **N3-(12)** solide blanc (0.35g, 71%, $R_f=0,62$, CH_2Cl_2 /MeOH, 90/10) et **N1-(12)** solide blanc (0.14g, 29%, $R_f=0.25$, CH_2Cl_2 /MeOH, 90/10).

- **1-Benzyl-2-méthyl-1H-imidazo[4,5-b]pyridine-4-oxyde, N1-(12):**



Pf. = 194-196°C.

1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8.12 (d, 1H, $J=6.4$ Hz, H5), 7.55 (d, 1H, $J=8.3$ Hz, H7), 7.38-7.27 (m, 3H, 3H arom.), 7.20-6.97 (m, 3H, H6 et 2H arom.), 5.53 (s, 2H, CH_2), 2.55 (s, 3H, CH_3).

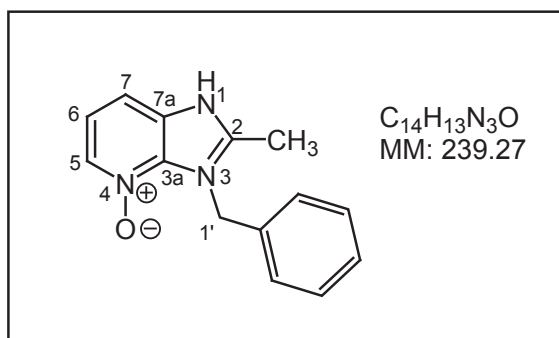
^{13}C RMN (75MHz, DMSO- d_6) δ : 171.51 (C2), 149.91* (C7a), 148.34* (C3a), 134.02 (CH-5), 130.75 (2 $\times$ CHarom. Ph), 130.34 (Cipso, Ph), 129.50 (2 $\times$ CHarom. Ph), 127.63 (CHpara), 126.63 (CH-7), 112.19 (CH-6), 80.66 (CH_2), 19.56 (CH_3). (Les déplacements chimiques marqués d'un astérisque (*) peuvent être échangés).

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3083, 3034, 2922, 2853, 1581, 1508, 1446, 1404, 1372, 1319, 1248, 1058, 716.

SM (ESI), m/z : 501 ($2\text{M}^+ + \text{Na}^+$, 25%), 240 (MH^+ ; 100%).

HRMS (EI) : calc. pour $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$: 239.1059, trouvée: 239,1057.

• **3-Benzyl-2-méthyl-3H-imidazo[4,5-*b*]pyridine-4-oxyde N3-(12):**



Pf. = 100-102°C.

^1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8.18 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz, H5), 8.05 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H7), 7.50-7.41 (m, 5H, H arom.), 7.03 (dd, 1H, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 7.7$ Hz, H6), 5.67 (s, 2H, CH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3).

^{13}C RMN (75MHz, DMSO- d_6) δ : 162.86 (C2), 154.71* (C3a), 146.52* (C7a), 133.75 (CH-5), 132.78 (Cipso), 129.78 ($2 \times \text{CH}$ arom. Ph), 128.71 (CH para), 127.67 ($2 \times \text{CH}$ arom. Ph), 119.25 (CH-7), 109.72 (CH-6), 47.93 (CH_2), 14.69 (CH_3). (Les déplacements chimiques marqués par un astérisque (*) peuvent être interchangés).

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3107, 2924, 1614, 1570, 1446, 1370, 1325, 1270, 1240, 1216, 750, 697.

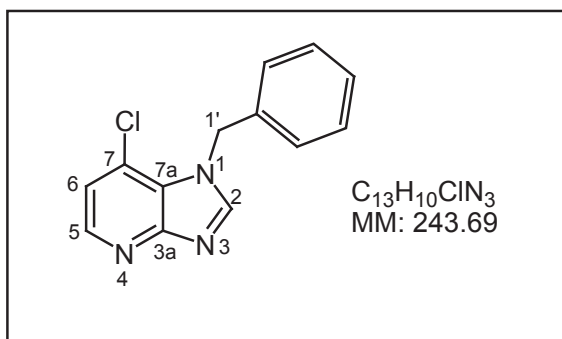
SM (ESI) , m/z : 240 (MH^+ ; 100%), 134 (13%).

HRMS (EI) : calc. pour $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ 239.1059, trouvée: 239.1054.

Chloration de l'imidazopyridine N-oxyde N1-(11)

POCl_3 (2.4mL, 25.8 mmol) est ajouté à une solution de composé **N1-(11)** (1.1g, 4.8mmol) dans du chloroforme (30mL) en présence d'un tamis moléculaire 4Å. Le mélange réactionnel est chauffé à 50°C pendant 24h, puis il est neutralisé avec une solution aqueuse de NaHCO_3 (0.6M, 100mL). La phase aqueuse est ensuite extraite avec du chloroforme. Les phases organiques réunies sont séchées (Na_2SO_4), filtrées et le solvant est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH_2Cl_2 /méthanol, 95/5) pour obtenir le produit **(13)** ($R_f=0.45$) sous la forme d'un solide jaune (1.15g, 95%) et des traces de produit **(13')**.

- **1-Benzyl-7-chloro-1H-imidazo[4,5-b]pyridine (13)**



Pf. = 162-164°C.

^1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8.78 (s, 1H, H2), 8.37 (d, 1H, $J=5.3$ Hz, H5), 7.36 (d, 1H, $J=5.3$ Hz, H6), 7.33 (d, 2H, $J=7.2$ Hz, 2xHméta), 7.28 (t, 1H, $J=7.2$ Hz, Hpara), 7.12 (d, 2H, $J=7.2$ Hz, 2xHortho), 5.75 (s, 2H, CH_2).

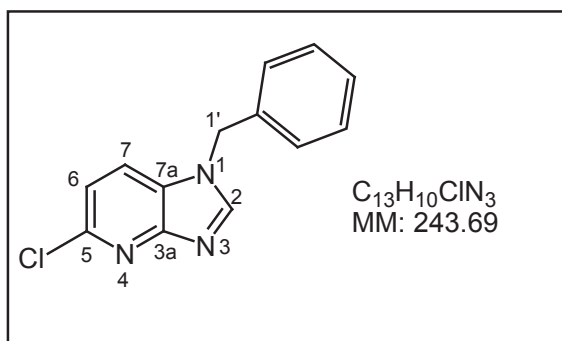
^{13}C RMN (75MHz, DMSO- d_6) δ : 158.5 (C3a), 149.6 (CH-5), 145.7 (CH-2), 138.4 (C7), 129.6 (2xCHarom. Ph), 128.4 (CHpara), 127.1 (2x CHarom. Ph), 126.6 (Cipso Ph), 123.3 (C7a), 120.1 (CH-6), 50.2 (CH_2).

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3073, 2926, 1604, 1551, 1495, 1362, 1339, 1315, 1177, 957, 733.

SM (EI) , m/z : 245 (13%, [^{37}Cl]M $^+$), 243 (92%, [^{35}Cl]M $^+$), 242 (41%, M $^+$ -H), 91 (100%), 65 (8%).

HRMS (CI): calc. pour $\text{C}_{13}\text{H}_{10}^{37}\text{ClN}_3$: 244.0641, trouvée : 244,0641.

- **1-Benzyl-5-chloro-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridine (13')**

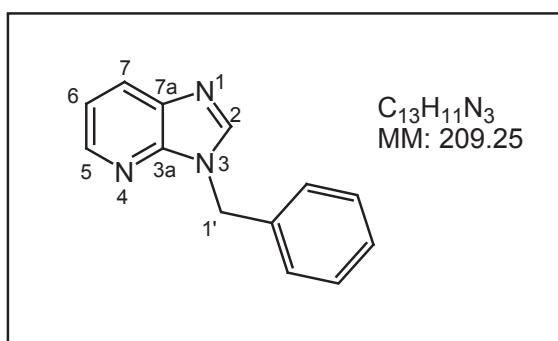


1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8.74 (s, 1H, H2), 8.07 (d, 1H, J = 8.5 Hz, H7), 7.38-7.11 (m, 6H, H6, H-arom), 5.55 (s, 2H, CH₂).

Chloration de l'imidazopyridine N-oxyde N3-(11)

POCl₃ (2.4mL, 25.8 mmol) est ajouté à une solution de composé **N3-(11)** (1.1g, 4.8mmol) dans du chloroforme (30mL) en présence d'un tamis moléculaire 4Å. Le mélange réactionnel est chauffé à 50°C pendant 24h, puis il est neutralisé avec une solution aqueuse de NaHCO₃ (0.6M, 100mL). La phase aqueuse est ensuite extraite avec du chloroforme. Les phases organiques réunies sont séchées (Na₂SO₄), filtrées et le solvant est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/méthanol, 95/5) pour obtenir le produit **(14)** sous la forme d'une huile incolore (0.70g, 70%).

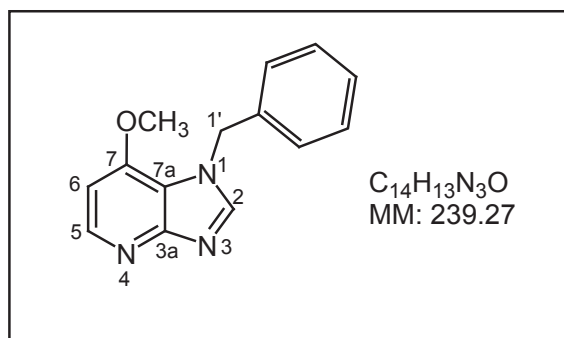
- **3-Benzyl-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridine (14)**



1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8.70 (s, 1H, H2), 8.41 (d, 1H, J = 4.7 Hz, H5), 7.98 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H7), 7.34-7.31 (m, 5H, H-arom), 7.24 (dd, 1H, J_1 = 4.7 Hz, J_2 = 8.0 Hz, H7), 5.55 (s, 2H, CH₂).

SM (ESI) , m/z: 441 (40) [$2M^+ + Na$], 232 (9) [$M^+ + H$], 210 [MH^+].

• **1-Benzyl-7-méthoxy-1H-imidazo[4,5-b]pyridine (16)**



Une solution de CH_3ONa dans du méthanol est préparée par addition de sodium (2.16g, 94mmol) dans du méthanol (75mL). Le composé **(13)** est ensuite ajouté à la solution maintenue sous argon. Le mélange réactionnel est porté au reflux pendant 48h, puis le solvant est évaporé. Le résidu solide beige est partagé entre CH_2Cl_2 et H_2O . La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane, et les phases organiques réunies sont lavées une fois à l'eau, séchées sur Na_2SO_4 puis filtrées. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH_2Cl_2 /méthanol, 95/5) pour obtenir le produit **(16)** ($R_f=0.2$) sous la forme d'un solide blanc (0.9g, 82%).

Pf. = 169-170 °C (décomposition).

1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8.50 (s, 1H, H2), 8.26 (d, 1H, $J=5.5$ Hz, H5), 7.36-7.22 (m, 5H, H phényl), 6.87 (d, 1H, $J=5.5$ Hz, H6), 5.55 (s, 2H, CH_2), 3.92 (s, 2H, CH_3).

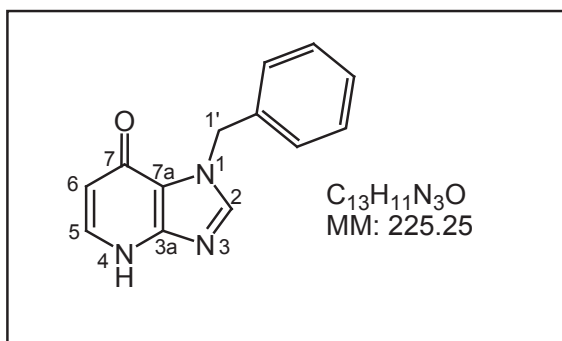
^{13}C RMN (75MHz, DMSO- d_6) δ : 157.84 (C3a), 153.38 (C-7), 145.96 (CH-5), 145.42 (CH-2), 137.87 (Cipso), 128.68 (2xCHméta), 127.73 (CHpara), 127.16 (2xCHortho), 115.61 (C7a), 101.20 (CH-6), 56.01 (CH_3), 49.93 (CH_2). (L'attribution des déplacements chimiques des CH et d'une partie des C quaternaires a été déterminée par corrélations de type COSY hétéronucléaire $\{^1H; ^{13}C\}$ longue distance ou HMBC).

IR (KBr) $\nu(cm^{-1})$: 3081, 3026, 2924, 2848, 1618, 1568, 1495, 1455, 1397, 1374, 1322, 1297, 1280, 1237, 1206, 1184, 1124, 1098, 967, 908, 813, 778, 743.

SM (EI), m/z: 239 (M^+ , 100%), 224 ($[M-CH_3]^+$, 6%), 209 (8%), 91 (60%), 65 (6%).

HRMS (CI) : calc. pour $C_{14}H_{13}N_3O + H$: 240,1137, trouvée: 240,1138.

• **1-Benzyl-1,4-dihydro-imidazo[4,5-*b*]pyridin-7-one (15)**



NaH (60%, 8,84g, 220mmol) est additionné à une solution d'acide thioglycolique (7,66mL, 110mmol) dans du diméthylformamide DMF (10mL) sous atmosphère d'argon. Après 15 minutes, cette solution est ajoutée à une solution de composé **(16)** (1.76g, 7.4mmol) solubilisé dans du DMF (10mL). Le mélange est maintenu sous argon et chauffé au reflux du DMF. Après 24h, le milieu est neutralisé avec une solution aqueuse d'acide acétique jusqu'à pH=7. La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont ensuite séchées sur Na₂SO₄ et filtrées. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par recristallisation (méthanol, acétate d'éthyle, éther de pétrole). Le produit **(15)** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (1.27g, 77%).

Pf. = 236-237°C.

¹H RMN (300MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.32 (bs, 1H, NH ou OH), 8.23 (s, 1H, H2), 7.62 (d, 1H, *J*= 7.3 Hz, H5), 7.43-7.26 (m, 5H, Harom. Ph), 6.00 (d, 1H, *J*= 7.3Hz, H6), 5.68 (s, 2H, CH₂).
Echange D₂O : disparition du signal large à 12,32 ppm.

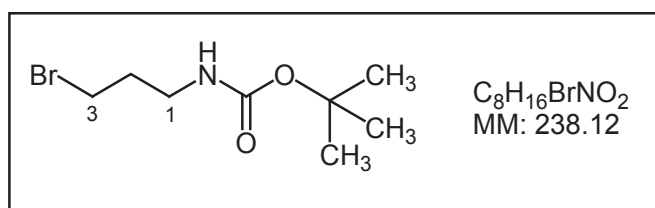
¹³C RMN (75MHz, DMSO-*d*₆) δ: 170.6 (C7), 147.6 (C3a), 142.4 (CH-2), 139.03 (Cipso), 135.3 (CH-5), 129.4 (2xCHméta), 128.53 (2xCHortho), 128.51 (CHpara), 120.1 (C7a), 112.4 (CH-6), 49.5 (CH₂).

IR (KBr) ν(cm⁻¹): 3436, 2962, 2925, 2854, 2525, 1613, 1532, 1517, 1478, 1261, 1217, 1078, 1092, 1026, 803, 731.

SM (CI), m/z: 226 ([M+H]⁺, 100%) , 89 (<3%).

HRMS (CI): calc. pour C₁₃H₁₁N₃O + H : 226,0980, trouvée: 226,0982.

• **3-Bromopropyl carbamate de tert-butyle (21)** ²²⁶

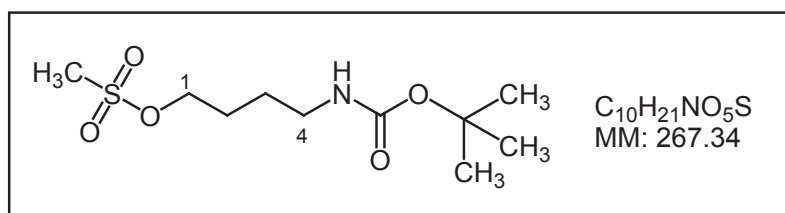


(Boc)₂O (1.05g, 4.60mmol) est additionné à 0°C à une solution de bromhydrate de 3-bromo-propan-1-amine (1g, 4.56mmol) dans du THF anhydre (25mL) maintenu sous atmosphère d'argon. La triéthylamine (0.65mL, 4.66mmol) est ensuite ajoutée. Le milieu réactionnel est alors agité à température ambiante pendant 24h. Après évaporation du solvant, le résidu est partagé entre CH₂Cl₂ et H₂O. La phase organique est lavée deux fois avec de l'eau, puis concentrée pour donner le produit **(21)** sous forme d'une huile jaune (1.06g, 93%) qui est mise en réaction sans autre purification.

¹H RMN (300MHZ, DMSO-d₆) δ: 4.70 (bs, 1H, NH), 3.44 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, H₃), 3.27 (q, 2H, *J* = 6.27 Hz, H₁), 2.04 (qn, 2H, *J* = 6.5 Hz, H₂), 1.44 (s, 9H, t-Bu).

IR (KBr) ν(cm⁻¹): 3349, 3005, 2978, 2934, 1811, 1690, 1521, 1451, 1392, 1367, 1251, 1213, 1171, 1120, 1076, 1043, 986, 871, 779.

• **Méthanesulfonate de 4-(tert-butoxycarbonyl)aminobutyle (22)**



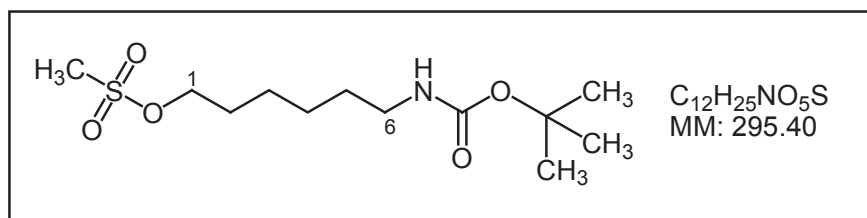
(Boc)₂O (1.31g, 6.2mmol) est additionné à 0°C à une solution de 4-aminobutanol (560μL, 6.0mmol) dans du THF anhydre (20mL) maintenu sous atmosphère d'argon. La triéthylamine (840μL, 6.0mmol) est ensuite ajoutée. Le mélange réactionnel est ensuite agité à température ambiante pendant 24h. Après évaporation du solvant, le résidu est partagé entre CH₂Cl₂ et H₂O. La phase organique est lavée deux fois avec de l'eau puis concentrée pour donner le produit NHBoc sous forme d'un solide jaune (0.64g, 61%) qui est mis en réaction sans autre purification.

Du chlorure de méthanesulfonyl (290µL, 3.7mmol) est ajouté à une solution du dérivé NHBoc (0.64g, 3.7mmol) dans du THF anhydre (18mL) maintenue sous argon à 0°C. La triéthylamine (570µL, 4mmol) est ensuite ajoutée. Le mélange est agité à température ambiante pendant 24h. Après évaporation le résidu est repris dans CH₂Cl₂ et la phase organique est lavée successivement avec une solution aqueuse saturée de K₂CO₃, une solution aqueuse d'acide acétique (5%), et de la saumure. Après séchage (Na₂SO₄), filtration et évaporation, le produit **(22)** est obtenu sous la forme d'une huile jaune (0.8g) avec un rendement global de 50%.

¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 4.59 (bs, 1H, NH), 4.26 (t, 2H, *J*= 6.3Hz, -CH₂O-), 3.17 (q, 2H, *J*= 6.6Hz, -CH₂N-), 3.02 (s, 3H, CH₃SO₂-), 1.80 (m, 2H, CH₂), 1.63 (m, 2H, CH₂), 1.45 (s, 9H, tBu).

IR (NaCl) ν(cm⁻¹): 3403, 3352, 2977, 2938, 2873, 1707, 1523, 1353, 1252, 1173, 975, 935, 830, 736.

• Méthanesulfonate de 6-(*tert*-butoxycarbonyl)aminohexyle (**23**)²²⁷



(Boc)₂O (1.86g, 8.8mmol) est additionné à 0°C à une solution de 6-aminohexanol (1g, 8.5mmol) dans du THF anhydre (50mL) maintenue sous atmosphère d'argon. La triéthylamine (1.2mL, 8.6mmol) est ensuite ajoutée. Le mélange réactionnel est ensuite agité à température ambiante pendant 24h. Après évaporation du solvant, le résidu est partagé entre CH₂Cl₂ et H₂O. La phase organique est lavée deux fois avec de l'eau, puis concentrée pour donner le produit NHBoc sous la forme d'un solide blanc (1.83g, quant.) qui est mis en réaction sans autre purification.

Du chlorure de méthanesulfonyl (360µL, 4.6mmol) est ajouté à une solution du dérivé NHBoc (0.93g, 4.3mmol) dans THF anhydre (16mL) maintenue sous argon à 0°C. La triéthylamine (725µL, 5.2mmol) est ensuite ajoutée. Le mélange est agité à température

ambiante pendant 24h. Après évaporation le résidu est repris dans CH₂Cl₂ et la phase organique est lavée successivement avec une solution aqueuse saturée de K₂CO₃, une solution aqueuse d'acide acétique (5%), et de la saumure. Après séchage (Na₂SO₄), filtration et évaporation, le produit **(23)** est obtenu sous la forme d'une huile jaune (1,22g) avec un rendement global quantitatif.

¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 4.55 (bs, 1H, NH), 4.22 (t, 2H, J= 6.5Hz, -CH₂O-), 3.10 (q, 2H, -CH₂N), 3.00 (s, 3H, CH₃SO₂-), 1.75 (qn, 2H, J=6.5Hz, CH₂CH₂O), 1.60-1.30 (m, 15H, tBu+ 3xCH₂).

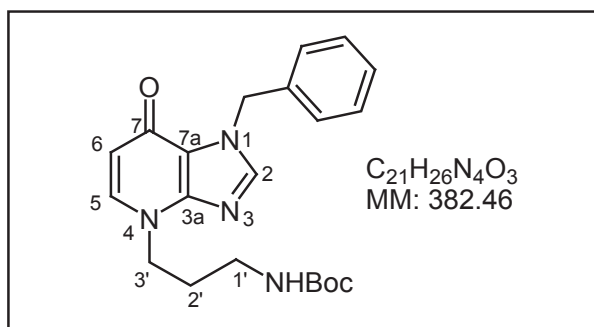
IR (KBr) ν(cm⁻¹): 3371, 2978, 2964, 2943, 2857, 1691, 1656, 1528, 1465, 1366, 1344, 1328, 1301, 1277, 1173, 1163, 1096, 1063, 1038, 1020, 1008, 984, 954, 926, 840, 822 776, 735, 626, 529.

N4-alkylation de l'imidazopyridinone (15)

Mode opératoire général:

L'agent alkylant est additionné à une solution de KOH dans l'éthanol absolu. Après addition de l'imidazopyridinone **(15)**, le mélange est porté au reflux jusqu'à ce que la réaction n'évolue plus (suivi CCM). Après évaporation de l'éthanol, le résidu est partagé entre CH₂Cl₂ et H₂O. La phase aqueuse est extraite trois fois par CH₂Cl₂. Après séchage des phases organiques réunies (Na₂SO₄), filtration et évaporation, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/méthanol, 95/5).

- **[3-(1-Benzyl-7-oxo-1,7-dihydro-imidazo[4,5-*b*]pyridin-4-yl)propyl]carbamate de tert-butyle (25)**



-Imidazopyridinone (**15**) : (0.13g, 0.58mmol)

-Agent alkylant : (**21**) (0.83g, 3.5mmol)

-Base : KOH (0.26g, 4.6mmol)

-Solvant : éthanol (9mL)

-Durée de la réaction : 4jours

-Rendement : 60%, 0.14g, solide blanc

Rf: 0.3 (CH₂Cl₂/méthanol, 95/5).

Pf.=136-137°C.

¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ : 8.23 (1H, s, H2), 7.71 (d, 1H, *J*= 7.5 Hz, H5), 7.55-7.23 (m, 5H, phényl), 6.90 (m, 1H, NH), 5.98 (d, 1H, *J*= 7.5 Hz, H6), 5.66 (s, 2H, CH₂-phényl), 4.15 (t, 2H, *J*= 7.0 Hz, H3'), 2.90 (q, 2H, *J*= 6.5 Hz, H1'), 1.86 (qn, 2H, *J*= 7.0 Hz, H2'), 1.36 (s, 9H, tBu).

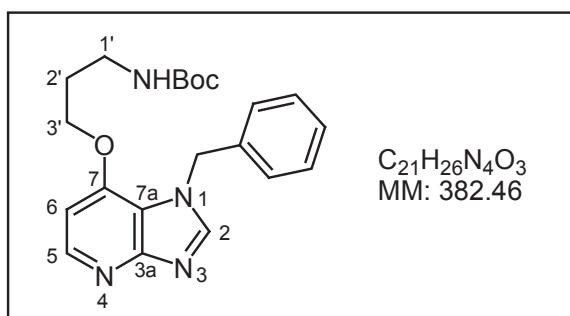
¹³C RMN (75MHz, DMSO-d₆) δ : 169.9 (C7), 156.4 (NHCO^tBu), 147.4 (C3a), 142.0 (C2), 138.8 (C-phényl ipso), 138.7 (C5), 129.5 (2×CH, C-phényl meta), 128.65 (2×CH, C-phényl ortho), 128.6 (C-phényl para), 120.1 (C7a), 112.6 (C6), 78.5 (C(CH₃)₃), 49.5 (NCH₂Ph), 48.4 (NCH₂(CH₂)₂NHBoc), 38.0 (CH₂NHBoc), 30.5 (CH₂), 29.1 (3×C, C(CH₃)₃).

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3373, 3093, 2979, 2967, 2937, 1709, 1638, 1573, 1505, 1466, 1269, 1256, 1163, 1144, 971, 955, 819, 787, 724, 700, 632.

SM (ESI), *m/z*: 1168 ([3M+Na]⁺, 16%), 787 ([2M+Na]⁺, 46%), 405 ([M+Na]⁺, 33%), 383 ([M+H]⁺, 100%), 327 ([M-C₄H₈]⁺, 64%).

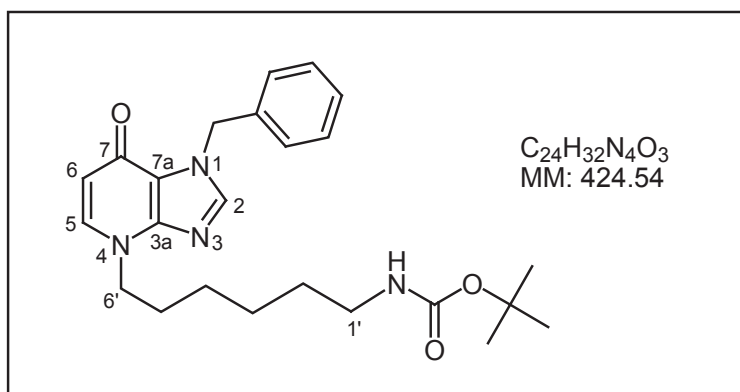
HRMS (ESI): calc. pour C₂₁H₂₆N₄O₃+H: 383.2083, trouvée: 383.20823.

- [3-(1-Benzyl-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-7yloxy)propyl]carbamate de tert-butyle (**26**)



¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.47 (s, 1H, H2), 8.23 (d, 1H, *J*=5.5Hz, H5), 7.38-7.17 (m, 5H, phényl), 6.91-6.82 (m, 1H, NH), 6.81 (d, 1H, *J*=5.5Hz, H6), 5.58 (s, 2H, CH₂-phényl), 4.10 (t, 2H, H3'), 3.04 (q, 2H, H1'), 1.82 (qn, 2H, H2'), 1.35 (s, 9H, tBu).

- **[6-(1-Benzyl-7-oxo-1,7-dihydro-imidazo[4,5-*b*]pyridin-4-yl)hexyl]carbamate de tert-butyle (27)**



-Imidazopyridinone (**15**): (0.16g, 0.71mmol)

-Agent alkylant : (**23**) (1.22g, 4.1mmol)

-Base : KOH (0.23g, 4.1mmol)

-Solvant : éthanol (15mL)

-Durée de la réaction : 4jours

-Rendement : 60%, 0.18g, huile incolore

Rf: 0,6 (CH₂Cl₂/méthanol, 95/5).

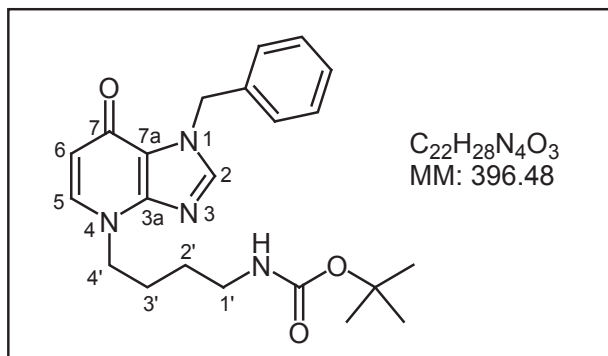
¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.22 (s, 1H, H2), 7.69 (d, 1H, *J*= 7.4 Hz, H5), 7.39-7.23 (m, 5H, H phényl), 6.74 (m, 1H, NH), 5.97 (d, 1H, *J*= 7.4 Hz, H6), 5.65 (s, 2H, CH₂Ph), 4.13 (t, 2H, *J*= 7.1 Hz, H6'), 2.91-2.82 (m, 4H, H5'+H1'), 1.74 (m, 2H, H2'), 1.36-1.23 (m, 13H, tBu+H3'+H4').

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ: 170.7 (C7), 156.4 (NHCO^tBu), 147.4 (C3a), 140.5 (C2), 137.1 (C5), 136.9 (C-phényl ipso), 129.3 (2×CH, C-phényl meta), 128.8 (2×CH, C-phényl ortho), 128.6 (C-phényl para), 120.7 (C7a), 113.4 (C6), 79.4 (C(CH₃)₃), 51.1 (CH₂, NCH₂), 50.5 (NCH₂), 33.0 (CH₂NHBoc), 30.2 (CH₂), 30.0 (CH₂), 28.8 (C(CH₃)₃), 26.6 (CH₂), 26.5 (CH₂).

SM (ESI), m/z: 447 ($[M+Na]^+$, 18%), 425 ($[M+H]^+$, 65%), 369 ($[M-C_4H_8]^+$, 100%).

HRMS (ESI): calc. pour $C_{24}H_{32}N_4O_3+H$: 425.2553, trouvée: 425.25522.

- **[4-(1-Benzyl-7-oxo-1,7-dihydro-imidazo[4,5-b]pyridin-4-yl)butyl]carbamate de tert-butyle (28)**



-Imidazopyridinone (**15**) : (0.11g, 0.49mmol)

-Agent alkylant : (**22**) (0.17g, 0.65mmol)

-Base : KOH (0.03g, 0.55mmol)

-Solvant : éthanol (5mL)

-Durée de la réaction : 2 jours

-Rendement : 22%, 0.042g, huile jaune

Rf: 0.6 (CH₂Cl₂/méthanol, 90/10).

¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.23 (s, 1H, H2), 7.69 (d, 1H, *J*=7.53Hz, H5), 7.34-7.26 (m, 5H, H phényle), 6.80 (bt, 1H, *J*= 5.56 Hz, NH), 5.98 (d, 1H, *J*= 7.53 Hz, H6), 5.66 (s, 2H, NCH₂Ph), 4.14 (t, 2H, *J*=7.1Hz, H4'), 2.90 (m, 2H, H1'), 1.73 (qn, 1H, *J*=7.4 Hz, CH₂), 1.38-1.22 (m, 11H, t-Bu+CH₂).

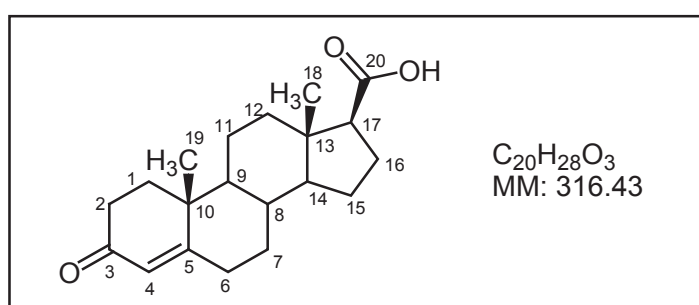
¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ: 170.8 (C7), 156.5 (NHCO^tBu), 147.3 (C3a), 140.3 (C2), 137.1 (C5), 136.8 (C-phényle ipso), 129.3 (2×CH, C-phényle meta), 128.8 (2×CH, C-phényle ortho), 128.7 (C-phényle para), 120.8 (C7a), 113.6 (C6), 79.7 (C(CH₃)₃), 50.7 (CH₂, NCH₂), 50.5 (NCH₂), 30.1 (CH₂NHBoc), 30.2 (CH₂), 28.8 (C(CH₃)₃), 27.5 (CH₂), 27.3 (CH₂).

SM (ESI), m/z: 815 ($[2M+Na]^+$, 23%), 419 ($[M+Na]^+$, 25%), 397 ($[M+H]^+$, 100%), 341 ($[M-C_4H_8]^+$, 50%).

HRMS (ESI): calc. pour $C_{22}H_{28}N_4O_3+H$: 397.2240, trouvée: 397.2244.

Remarque : les pouvoirs rotatoires des composés chiraux, non décrits dans la littérature, présentés dans le chapitre 3 de cette thèse n'ont pas pu être déterminés pour cause de quantité synthétisée insuffisante.

• **Acide 17 β -(3-oxoandrost-4-ènyl)carboxylique (29)** ¹⁷⁵



Une solution d'hypobromite de sodium est préparée en ajoutant lentement du dibrome (0.73 mL, 14.2 mmol) à une solution d'hydroxyde de sodium (1.205 g, 30.1 mmol) dans de l'eau distillée (5 mL) sous atmosphère d'argon. Cette solution est agitée pendant 1 heure pour donner une couleur orange. En parallèle, une solution d'hydroxyde de sodium (0.625 g, 15.6 mmol) dans de l'eau distillée (5 mL) est ajoutée à une solution de progestérone (1.00 g, 3.18 mmol) dans du *tert*-butanol (10 mL) à température ambiante. Le mélange est agité pendant 1 heure puis est refroidi dans un bain de glace, avant d'être traité par la solution préalablement préparée d'hypobromite de sodium. Le mélange résultant est rigoureusement agité à 0°C pendant 3 heures puis la réaction est stoppée par addition d'une solution aqueuse de sulfite de sodium (2.1M, 1.5 mL). L'agitation est maintenue la nuit à température ambiante. Ensuite le mélange est concentré sous vide, et extrait par le toluène. Les extraits organiques réunies sont acidifiés par HCl concentré jusqu'à pH 0. Le précipité résultant est filtré et séché sous vide pour donner le composé **(29)** sous la forme d'un solide blanc (0.570 g, 57 %) qui est recristallisé dans un mélange méthanol/eau.

Pf (décomp.)

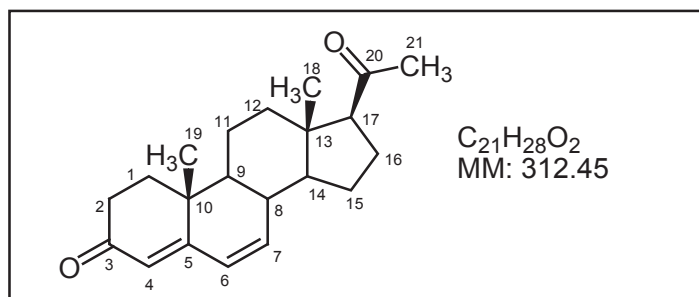
1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 5.62 (s, 1H, H4), 2.40-0.80 (m, 17H), 1.14 (s, 3H, CH₃), 0.67 (s, 3H, CH₃).

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3435, 2941, 2853, 1728, 1702, 1658, 1383, 1189, 1164.

Oxydation de la progesterone par la DDQ

La tétrachlorobenzoquinone (4.6g, 18.7mmol) est additionnée à une solution de progestérone (2.44g, 7.8mmol) dans du *tert*-butanol (170mL). Le mélange est chauffé sous reflux pendant une heure, puis refroidi et filtré. Le précipité est lavé avec du chloroforme. Les filtrats réunis sont concentrés, puis repris avec 200mL de chloroforme. La phase organique est lavée à l'eau (3*20mL), puis avec une solution aqueuse de NaOH (5%*m.*, 4*20mL), puis de nouveau avec de l'eau (4*20mL). La phase organique est séchée sur papier séparateur de phase et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle/cyclohexane, 1/2) pour donner le composé (**17 β -31**) sous la forme d'un solide blanc (1.23g, 50%) et des traces de son épimère (**17 α -31**).

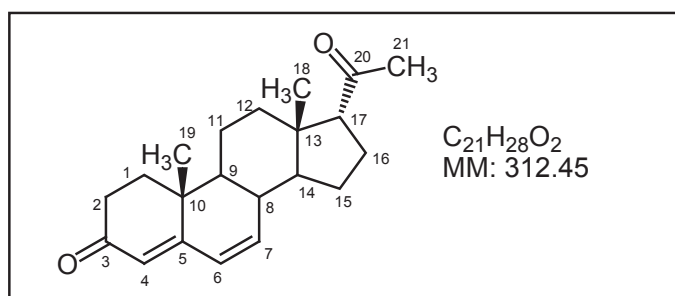
- **Δ^6 -Progestérone (17 β -31)**



¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ : 6.10 (m, 2H, H-6 et H-7), 5.67 (s, 1H, H-4), 2.64-2.51 (m, 2H), 2.42 (m, 1H), 2.29-1.10 (m, 13H), 2.12 (s, 3H, CH₃-21), 1.10 (s, 3H, CH₃-19), 0.70 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ : 209.15 (C-20), 199.58 (C-3), 163.53 (C-5), 140.64 (CH-7), 128.26 (CH-6), 123.92 (CH-4), 63.37 (CH-17), 53.79 (CH), 50.68 (CH), 44.84 (C), 38.69 (CH₂), 37.72 (CH), 36.16 (C), 34.03 (2*CH₂), 31.64 (CH₃-21), 24.02(CH₂), 23.02 (CH₂), 20.76 (CH₂), 16.42 (CH₃-19), 13.39 (CH₃-18).

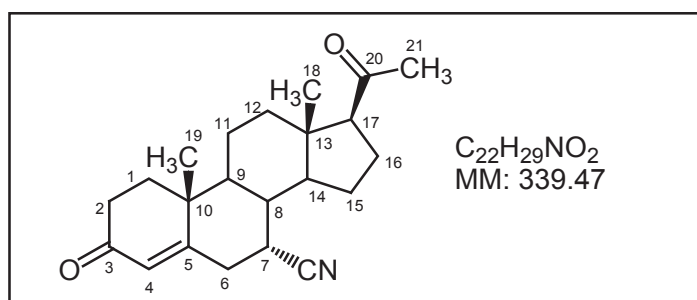
• **17- α - Δ^6 -Progestérone (17 α -31)**



1H RMN (400MHz, $CDCl_3$) δ : 6.10 (dd, 1H, $J_1=9.8Hz$, $J_2= 1.5Hz$, H-6), 6.05 (dd, 1H, $J_1=9.8Hz$, $J_2= 2.5Hz$, H-7), 5.62 (s, 1H, H-4), 2.82 (dd, 1H, $J_1=8.3Hz$, $J_2=2.0Hz$, H-17), 2.60-2.42 (m, 1H), 2.60-2.42 (m, 1H), 2.39-2.29 (m, 1H), 2.15-1.10 (m, 13H), 2.10 (s, 3H, CH_3 -21), 1.06 (s, 3H, CH_3 -19), 0.96 (s, 3H, CH_3 -18).

^{13}C RMN (100MHz, $CDCl_3$) δ : 212.45 (C-20), 199.48 (C-3), 163.59 (C-5), 141.28 (CH-7), 127.87 (CH-6), 123.69 (CH-4), 60.77 (CH-17), 50.05 (CH), 47.48 (CH), 46.33 (C), 37.79 (CH), 36.03 (C), 34.92 (CH_2), 33.96 (CH_2), 33.92 (CH_2), 32.95 (CH_3 -21), 25.29 (CH_2), 24.48 (CH_2), 20.62 (CH_3 -18 + CH_2), 16.36 (CH_3 -19).

• **7 α -(3,20-dioxopregn-4-ènyl)carbonitrile (32)**



Une solution de cyanure de diéthylaluminium (1M dans toluène, 16mL, 16mmol) est additionnée à une solution de Δ^6 -progestérone (**17 β -31**) (1.23g, 3.9mmol) dans un minimum de THF anhydre à température ambiante. Après deux heures, le mélange est refroidi dans un bain de glace et une solution aqueuse de NaOH (0.5N, 80mL) est ajoutée. Le milieu est ensuite extrait avec du dichlorométhane, puis la phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et concentrée. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice

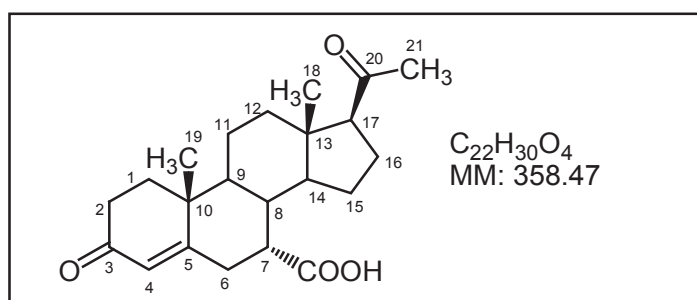
(cyclohexane/acétate d'éthyle, 1/1), pour donner le composé **(32)** sous la forme d'un solide blanc (1.17g, 88%).

Pf= 164-165°C

^1H RMN (400MHz, CDCl_3) δ : 5.87 (d, 1H, H-4), 3.01 (ddd, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=4.27$ Hz, $J_3=2.21$ Hz, 1H, H-7), 2.71-1.16 (m, 18H), 2.13 (s, 3H, CH_3 -21), 1.19 (s, 3H, CH_3 -19), 0.68 (s, 3H, CH_3 -18).

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ : 208.85 (C-20), 198.37 (C-3), 163.13 (C-5), 127.26 (CH-4), 118.96 (CN), 63.08 (CH-17), 52.82 (CH), 48.72 (CH), 43.97 (C), 38.34 (C), 37.88 (CH_2), 36.77 (CH), 35.37 (CH_2), 34.96 (CH_2), 33.90 (CH_2), 32.96 (CH), 31.63 (CH_3 -21), 23.90 (CH_2), 22.94 (CH_2), 20.90 (CH_2), 17.49 (CH_3 -19), 13.39 (CH_3 -18).

• Acide 7 α -(3,20-dioxopregn-4-ènyl)carboxylique (**30**)



Une solution d'hydrure de diisobutylaluminium (1M dans toluène, 20.7mL, 20.7mmol) est ajoutée goutte à goutte à une solution du composé **(32)** (1.17g, 3.4mmol) dans du toluène (80mL) refroidie à -40°C. Le milieu est agité pendant deux heures. Le mélange, maintenu à -40°C, est ensuite traité avec du méthanol (15mL), puis avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (1N, 30mL), puis le milieu est laissé remonter à température ambiante. Le milieu est extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite lavée à l'eau, séchée sur papier séparateur de phases, puis concentrée pour donner le produit **(33)** sous la forme d'un solide blanc (1.2g, rendement quantitatif) qui est utilisé sans purification dans l'étape suivante.

Le réactif de Jones (8N, 4.32mL) est ajouté goutte à goutte à une solution du produit **(33)** (1.2g) dans l'acétone (60mL) refroidie à -15°C. Le milieu est maintenu sous agitation pendant une demi-heure. Ensuite, l'excès du réactif est détruit en ajoutant 40mL de méthanol. Le

milieu est partagé entre l'acétate d'éthyle et l'eau. La phase aqueuse est extraite plusieurs fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution saturée de NaCl, séchées (Na_2SO_4) puis concentrées pour donner un résidu solide (1.1g) qui est repris dans le minimum d'acétate d'éthyle.

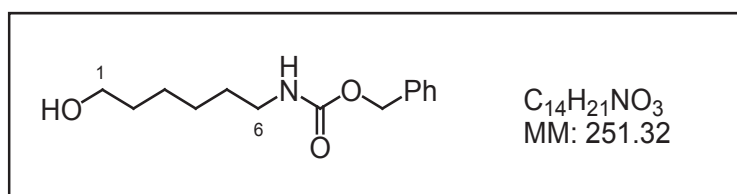
Cette phase organique est extraite deux fois avec une solution saturée de NaHCO_3 . Les phases aqueuses réunies sont refroidies dans un bain de glace puis acidifiées avec HCl concentré jusqu'à pH 3. Le milieu est extrait deux fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO_4 , filtrées puis concentrées pour donner le composé (**30**) sous la forme d'un solide blanc (0.83g, 67% pour les deux étapes : réduction et oxydation).

Pf=224-226°C

^1H RMN (400MHz, DMSO-d_6) δ : 5.74 (s, 1H, H-4), 2.84 (bs, 1H), 2.74-2.31 (m, 5H), 2.28-1.13(m, 13H), 2.12 (s, 3H, CH_3 -21), 1.20 (s, 3H, CH_3 -19), 0.66 (s, 3H, CH_3 -18).

^{13}C RMN (100MHz, DMSO-d_6) δ : 208.53 (C-20), 197.74 (C-3), 174.46 (COOH), 169.35 (C-5), 124.39 (CH-4), 62.40 (CH-17), 51.93 (CH), 45.71 (CH), 43.57 (C), 42.96 (CH), 37.92 (C), 37.64 (CH_2), 36.23 (CH), 35.17 (CH_2), 34.79 (CH_2), 33.67 (CH_2), 31.18 (CH_3 -21), 23.65 (CH_2), 22.21 (CH_2), 20.74 (CH_2), 17.33 (CH_3 -19), 12.76 (CH_3 -18).

• 6-(N-benzyloxycarbonylamino)hexan-1-ol (**34**)



A une solution, refroidie dans un bain de glace, de carbonate de sodium (2.12 g, 20 mmol) et de 6-aminohexan-1-ol (1.17 g, 10 mmol) dans l'eau (30 mL) est ajouté goutte à goutte le chloroformiate de benzyle (2.41 mL, 17 mmol). Le mélange est agité la nuit à température ambiante, puis filtré. Le résidu est solubilisé dans du dichlorométhane, et la phase organique est lavée avec de l'eau, séchée sur Na_2SO_4 , filtrée puis concentrée pour donner un solide qui est recristallisé dans du cyclohexane pour donner le composé (**34**) sous la forme d'un solide blanc (1.98 g, 79%).

Pf=80-81°C

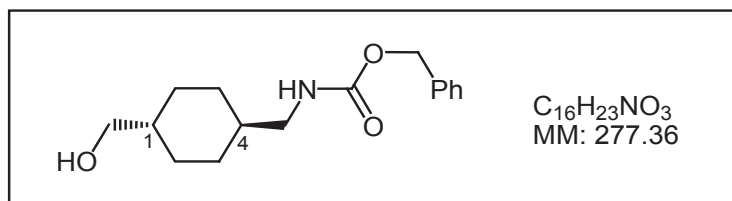
^1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 7.39-7.23 (m, 5H, 5×H-phényl), 7.21 (m, 1H, NH), 5.00 (s, 2H, CH_2Ph), 4.33 (t, 1H, $J=5.2\text{Hz}$, OH), 3.36 (q, 2H, $J=5.2\text{Hz}$, CH_2O), 2.97 (q, 2H, $J=6.6\text{Hz}$, CH_2N), 1.40-1.20 (m, 8H, 4× CH_2).

^{13}C RMN (75MHz, DMSO- d_6) δ : 156.9 (NHCOO), 138.18 (C-phényl ipso), 129.19 (2×C-phényl meta, C-phényl para), 128.56 (2×C-phényl ortho), 65.91 (OCH_2Ph), 61.50 (CH_2OH), 41.11 (CH_2), 33.34 (CH_2), 30.33 (CH_2), 27.02 (CH_2), 26.08 (CH_2).

SM (ESI) m/z : 827 (50%), 577 (53%), 561 (43%), 525 ($[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 70%), 274 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 83%), 252 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

HRMS (ESI): calc pour $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_3+\text{Na}$: 274.1419; trouvée: 274.1423.

• [Trans-4-(N-benzyloxycarbonylaminométhyl)cyclohexyl]méthanol (**36**)



A une suspension refroidie dans un bain de glace d'hydrure de lithium et d'aluminium (0.302 g, 7.9 mmol) dans du THF anhydre (20 mL) est ajoutée une suspension d'acide *trans*-4-(aminométhyl)cyclohexylcarboxylique (0.500 g, 3.18 mmol) dans du THF anhydre (20 mL). Le mélange est agité à 0°C pendant 1 heure puis chauffé au reflux pendant 3 heures. Ensuite, le mélange est refroidi à température ambiante et de l'eau est ajoutée. La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane. L'addition de quelques gouttes d'une solution aqueuse du sel de Rochelle empêche la formation d'émulsion. Les phases organiques réunies sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis concentrées sous vide pour donner le [trans-4-(aminométhyl)cyclohexyl]méthanol (**35**) sous la forme d'une huile jaune (0.320 g, 70%) qui doit être immédiatement utilisée.

IR (NaCl) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3357, 3289, 2915, 2850, 1578, 1448, 1378, 1324, 1040.

A une solution refroidie dans un bain de glace du composé (**35**) (0.320 g, 2.23 mmol) et de carbonate de sodium (0.475 g, 4.48 mmol) dans l'eau (20 mL) est ajouté goutte à goutte

le chloroformiate de benzyle (540 μ L, 3.79 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant la nuit, puis filtré. Le précipité est lavé avec de l'eau puis recristallisé dans du cyclohexane pour donner le composé **(36)** sous la forme d'un solide blanc (0.432 g, 70%).

Pf = 95-96°C.

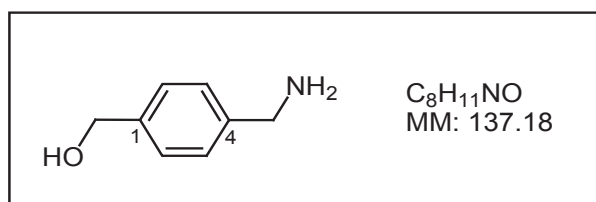
^1H RMN (300MHz, CDCl_3) δ : 7.40-7.30 (m, 5H, 5×H-phényl), 5.09 (s, 2H, CH_2Ph), 4.80 (bs, 1H, NH), 3.45 (d, 2H, $J=6.2$ Hz, CH_2O), 3.05 (t, 2H, $J=6.3$ Hz, CH_2N), 1.9-0.9 (m, 11H, 10×H-cyclohexyl, OH).

^{13}C RMN (75MHz, CDCl_3) δ : 156.7 (COO), 136.8 (C-phényl ipso), 128.7 (2×C-phényl meta), 128.29 (2×C-phényl ortho), 128.26 (C-phényl para), 68.6 (OCH_2), 66.8 (OCH_2), 47.4 (NCH_2), 40.6 (CH), 38.5 (CH), 30.1 (2× CH_2 cyclohexyl), 29.0 (2× CH_2 cyclohexyl).

SM (ESI) m/z : 577 ($[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 100%), 300 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 65%).

HRMS(ESI): calc. pour $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_3+\text{Na}$: 300.1570; trouvée: 300.1577.

• **(4-aminométhylphényl)méthanol (37)** ²²⁸

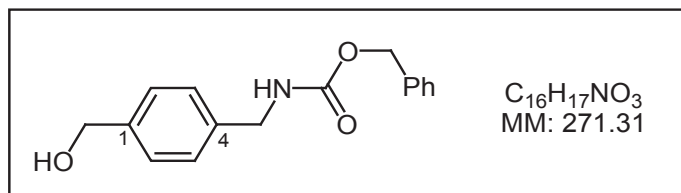


A une solution refroidie dans un bain de glace d'hydrure de lithium et d'aluminium (0.629 g, 16.55 mmol) dans du THF anhydre (40 mL), est ajouté, par portions, l'acide 4-(aminométhyl)benzoïque (1.0 g, 6.62 mmol). Le mélange est agité à 0°C pendant 1 heure puis chauffé au reflux pendant 3 heures. Le mélange est ensuite refroidi à 0°C et de l'eau est ajoutée. La phase aqueuse est extraite avec un mélange dichlorométhane/isopropanol (4/1). L'addition de quelques gouttes d'une solution aqueuse du sel de Rochelle empêche la formation d'émulsion. Les phases organiques réunies sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis concentrées sous vide pour donner le composé **(37)** sous la forme d'un solide jaune (0.250 g, 28%).

^1H RMN (300MHz, CD_3OD) δ : 7.32 (m, 4H, H-phényl), 4.58 (s, 2H, OCH_2), 3.79 (s, 2H, NCH_2).

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3364, 3286, 2923, 2852, 1595, 1480, 1465, 1364, 1028, 941.

• 4-[(N-benzyloxycarbonylamino)méthylphényl]méthanol (**38**)



A une suspension, refroidie par un bain de glace, du composé (**37**) (0.240 g, 1.75 mmol) et de carbonate de sodium (0.371 g, 3.5 mmol) dans l'eau (20 mL) est ajouté goutte à goutte le chloroformate de benzyle (420 μ L, 2.97 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 3 heures puis la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau, séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis le filtrat est concentré sous vide pour donner un solide blanc qui est recristallisé dans l'acétate d'éthyle/cyclohexane pour donner le composé (**38**) sous la forme d'un solide blanc (0.425 g, 90%).

Pf=112-113°C

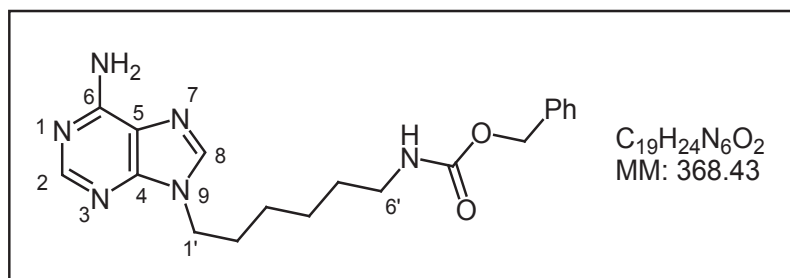
¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ : 7.40-7.20 (m, 9H, 9×H-phényl), 5.14 (s, 2H, CH₂CONH), 5.04 (m, 1H, NH), 4.68 (d, 2H, J= 4.4Hz, CH₂OH), 4.38 (d, 2H, J=5.8 Hz, CH₂NH), 1.61 (m, 1H, OH).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ : 156.54 (COO), 140.36 (C-phényl ipso), 137.99 (C-phényl ipso), 136.58 (C-phényl ipso), 128.69 (CH-phényl), 128.32 (CH-phényl), 128.30 (CH-phényl), 127.89 (CH-phényl), 127.47 (CH-phényl), 67.05 (CH₂), 65.17 (CH₂), 45.02 (CH₂).

SM (ESI) m/z : 564 ([2M+Na]⁺, 18%), 294 ([M+Na]⁺, 100%).

HRMS(ESI): calc. pour C₁₆H₁₇NO₃+Na: 294.1101; trouvée: 294.1092.

• **9-[(6-N-benzyloxycarbonylamino)hexyl]adénine (**39**)**



A une suspension d'adénine (1.61 g, 11.9 mmol) et de triphénylphosphine (2.34 g, 8.9 mmol) dans du THF anhydre (10 mL) sous atmosphère d'argon, est ajoutée une solution du composé (**34**) (1.74 g, 6.9 mmol) et de DIAD (1.77 mL, 8.9 mmol) dans du THF anhydre (10 mL). Le mélange est agité à température ambiante pendant la nuit, puis le solvant est évaporé. Le résidu est solubilisé dans du dichlorométhane puis filtré. Le filtrat est concentré sous vide et le résidu purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5) pour donner un solide qui est recristallisé dans du méthanol pour donner le composé (**39**) sous la forme d'un solide blanc (1.05g, 41%).

Pf=132-133°C.

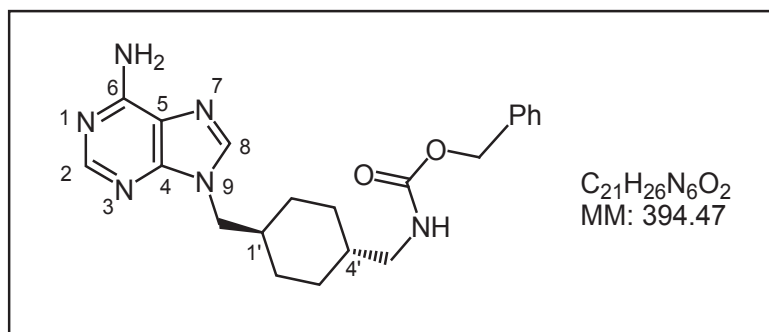
¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.15 (s, 1H, H-2), 8.13 (s, 1H, H-8), 7.40-7.10 (m, 8H, 5×H-phényl, NH₂, NHCOO), 4.99 (s, 2H, CH₂Ph), 4.11 (t, 2H, *J*=7Hz, CH₂-1'), 2.96 (q, 2H, *J*=6.3Hz, CH₂-6'), 1.77 (m, 2H, CH₂), 1.45-1.15 (m, 6H, 3×CH₂).

¹³C RMN (75MHz, DMSO-d₆) δ: 156.93 (NHCOO), 156.82 (C-6), 153.21 (C-2), 150.39 (C-4), 141.67 (C-8), 138.16 (C-phényl ipso), 129.17 (2×C-phényl meta, C-phényl para), 128.56 (2×C-phényl ortho), 119.61 (C-5), 65.93 (CH₂Ph), 43.67 (CH₂), 40.98 (CH₂), 30.21 (CH₂), 30.07 (CH₂), 26.56 (CH₂), 26.51 (CH₂).

SM (ESI) m/z : 758 ([2M+Na]⁺, 13%), 629 (76%), 369 ([M+H]⁺, 100%).

HRMS (ESI): calc. pour C₁₉H₂₄N₆O₂+H: 369.2039; trouvée 369.2035.

• 9-[*Trans*-4-(*N*-benzyloxycarbonylaminométhyl)cyclohexylméthyl]adénine (**40**)



A une solution refroidie dans un bain de glace de triphénylphosphine (0.993 g, 3.79 mmol) dans du THF anhydre (15 mL), est ajouté goutte à goutte le DIAD (0.750 mL, 3.79 mmol). Le mélange est agité pendant 30 minutes à température ambiante puis il est additionné à une suspension dans le THF anhydre (3 mL) d'adénine (0.511 g, 3.79 mmol) et de composé (**36**) (0.350 g, 1.26 mmol). Le mélange est agité pendant la nuit puis filtré. Le précipité est lavé avec un mélange dichlorométhane/méthanol (90:10) puis les filtrats réunis sont concentrés sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5) pour donner le composé (**40**) sous la forme d'un solide blanc (0.287 g, 49 %).

Pf=229°C.

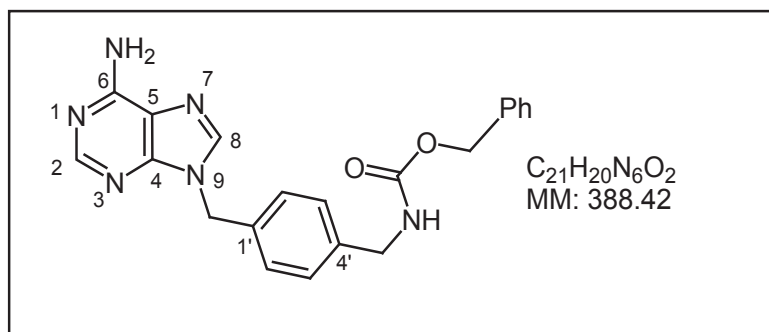
¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.12 (s, 1H, H-2), 8.08 (s, 1H, H-8), 7.37-7.21 (m, 5H, 5×H-phényl), 7.16 (s, 2H, NH₂), 4.98 (s, 2H, CH₂-Ph), 3.97 (d, 2H, J=7.0 Hz, CH₂-adénine), 2.82 (t, 2H, J=6.1 Hz, CH₂NHCbz), 1.80-0.70 (m, 10H, 10×H-cyclohexyl).

¹³C RMN (75MHz, DMSO-d₆) δ: 156.23 (NHCOO), 155.94 (C-6), 152.36 (C-2), 149.72 (C-4), 141.20 (C-8), 137.30 (C-phényl ipso), 128.32 (2×C-phényl meta, C-phényl para), 127.70 (2×C-phényl ortho), 118.64 (C-5), 65.09 (CH₂Ph), 48.72 (CH₂), 46.46 (CH₂), 29.50 (2×CH₂), 29.40 (2×CH₂), 37.67 (2×CH).

SM (ESI) m/z : 538 (100%), 417 ([M+Na]⁺, 36%), 395 ([M+H]⁺, 6%), 304 (18%).

HRMS (ESI): calc pour C₂₁H₂₆N₆O₂+Na: 417.2015; trouvée: 417.2012.

• **9-[4-(N-benzyloxycarbonylaminométhyl)phénylméthyl]adénine (41)**



A une solution refroidie dans un bain de glace de triphénylphosphine (1.160 g, 4.42 mmol) dans du THF anhydre (18 mL), est ajouté goutte à goutte le DIAD (0.880 mL, 4.44 mmol). Le mélange est agité pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, l'adénine (0.598 g, 4.43 mmol) et une solution du composé **(38)** (0.400 g, 1.47 mmol) dans du THF anhydre (10mL) sont ajoutées. Le mélange est agité à température ambiante pendant la nuit, puis filtré. Le précipité est lavé avec un mélange dichlorométhane/méthanol (90/10) puis les filtrats réunis sont concentrés sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur couche mince de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5) pour donner le composé **(41)** sous la forme d'un solide blanc (0.100 g, 18 %).

Pf=227-228°C.

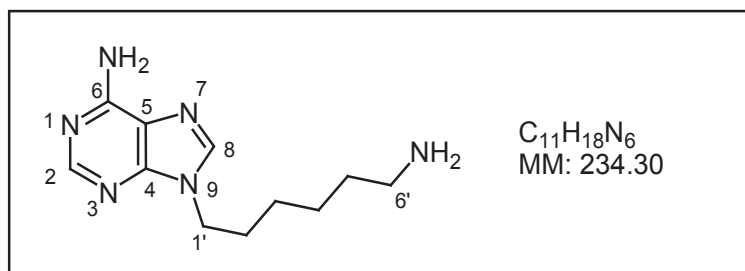
¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.26 (s, 1H, H-2), 8.16 (s, 1H, H-8), 7.79 (t, 1H, *J*=6.1 Hz, NH), 7.48-7.18 (m, 11H, 9×H-phényl+NH₂), 5.33 (s, 2H, CH₂-adénine), 5.01 (s, 2H, CH₂OCO_{NH}), 4.15 (d, 2H, *J*=6.1 Hz, CH₂NH).

¹³C RMN (75MHz, DMSO-d₆) δ: 156.31(NHCOO), 155.58 (C-6), 152.09 (C-2), 149.36 (C-4), 140.95 (C-8), 139.32 (C-phényl ipso), 137.12 (C-phényl ipso), 135.58 (C-phényl ipso), 128.33 (CH-phényl), 127.78 (CH-phényl), 127.74 (CH-phényl), 127.56 (CH-phényl), 127.34 (CH-phényl), 118.64 (C-5), 65.37 (CH₂OCO), 45.96 (CH₂), 43.50 (CH₂).

SM (ESI) m/z : 798 ([2M+Na]⁺, 72%), 776 ([2M+H]⁺, 17%), 649 (40%), 411 ([M+Na]⁺, 29%), 389 ([M+H]⁺, 100%).

HRMS (ESI): calc. pour C₂₁H₂₀N₆O₂+H: 389.1721; trouvée: 389.1705.

• **9-(6-aminohexyl)adénine (42)**



Une suspension de palladium sur charbon (400 mg, 10%*m.*) et du composé **(39)** (0.95 g, 2.58 mmol) dans du méthanol (50 mL) est maintenue sous atmosphère d' H_2 (1 atm.) pendant 1 heure. Ensuite, le mélange est filtré sur célite, et le filtrat est concentré sous vide pour donner le composé **(42)** sous la forme d'un solide blanc (600 mg, 100%).

Pf=160-161°C.

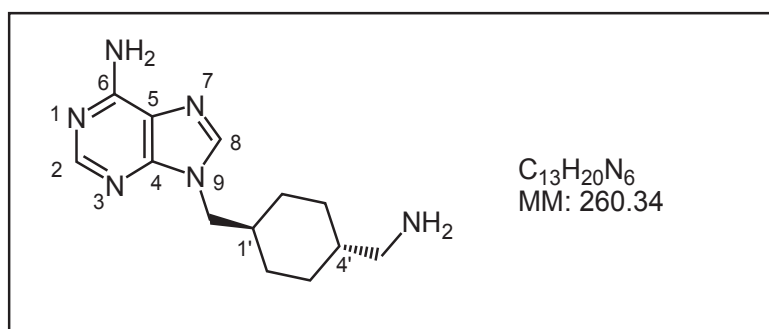
1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8.13 (s, 1H, H-2), 8.12 (s, 1H, H-8), 7.17 (s, 2H, NH_2), 4.11 (t, 2H, $J=7.1Hz$, CH_2-1'), 2.93 (bs, 2H, NH_2), 2.47 (m, 2H, CH_2-6'), 1.78 (qn, 2H, $J=7.2 Hz$, CH_2), 1.35-1.15 (m, 6H, $3 \times CH_2$).

^{13}C RMN (75MHz, DMSO- d_6) δ : 155.94 (C-6), 152.33 (C-2), 149.54 (C-4), 140.83 (C-8), 118.73 (C-5), 42.83 (CH_2), 41.37 (CH_2), 32.91 (CH_2), 29.39 (CH_2), 25.92 (CH_2), 25.79 (CH_2).

SM (CI) m/z : 235 ($[M+H]^+$, 100%), 219 (73%).

HRMS (CI): calc. pour $C_{11}H_{18}N_6+H$: 235.1671; trouvée: 235.1671.

• **9-(*Trans*-4-aminométhylcyclohexylméthyl)adénine (43)**



Une suspension de palladium sur charbon (0.100g, 10%*m.*) et du composé **(40)** (0.255 g, 0.65 mmol) dans du méthanol (20 mL) est maintenue sous une pression de H_2 (5 atm) pendant 15 minutes. Ensuite, le mélange est filtré sur célite et le filtrat concentré sous vide.

Le résidu est purifié par chromatographie sur couche mince de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}_{\text{aq.}}$, 80/20/1) pour donner le composé **(43)** sous la forme d'un solide blanc (0.120 g, 71%).

Pf (décomp.).

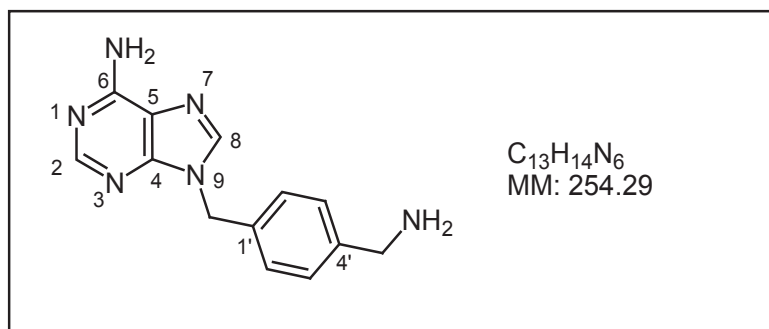
^1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8.12 (s, 1H, H-2), 8.10 (s, 1H, H-8), 7.61(bs, 2H, NH_2), 7.18 (s, 2H, NH_2), 3.98 (d, 2H, $J=7.1$ Hz, CH_2 -adénine), 2.59 (d, 2H, $J=7.1$ Hz, CH_2NH_2), 1.89-1.68 (m, 3H, 3 $\times$ H-cyclohexyl), 1.60-1.44 (m, 3H, 3 $\times$ H-cyclohexyl), 1.05-0.78 (m, 4H, 4 $\times$ H-cyclohexyl).

^{13}C -RMN (75MHz, DMSO- d_6) δ : 155.93 (C-6), 152.36 (C-2), 149.70 (C-4), 141.24 (C-8), 118.64 (C-5), 48.61 (CH_2), 44.17 (CH_2), 29.14 ($2\times\text{CH}_2$), 28.92 ($2\times\text{CH}_2$), 37.29 (CH), 35.37 (CH).

SM (CI) m/z : 261 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%), 257 (24%), 225 (20%).

HRMS (ESI): calc. pour $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_6+\text{H}$: 261.1828, trouvée: 261.1826.

• **9-(4-aminométhylphénylméthyl)adénine (44)**



Une suspension de palladium sur charbon (0.080g, 10%*m.*) et du composé **(41)** (0.080 g, 0.20mmol) dans un mélange de méthanol (30 mL) et d'acétate d'éthyle (30mL) est maintenue sous une pression d' H_2 (13 atm) pendant la nuit. Le mélange est ensuite filtré sur célite, puis concentré sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10 puis $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}_{\text{aq.}}$, 90/10/2) pour donner le composé **(44)** sous la forme d'un solide blanc (0.040 g, 77%).

Pf (décomp.).

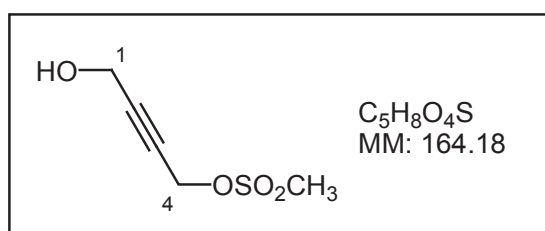
^1H RMN (300MHz, CD_3OD) δ : 8.20 (s, 1H, H-2), 8.18 (s, 1H, H-8), 7.41-7.18 (m, 6H, H-phényl+ NH_2), 5.45 (s, 2H, CH_2 -adénine), 3.98 (s, 2H, CH_2NH_2).

^{13}C -RMN (75MHz, CD_3OD) δ : 157.38 (C-6), 153.91 (C-2), 150.68 (C-4), 142.59 (C-8), 138.04 (C-phényl ipso), 137.44 (C-phényl ispo), 130.07 (CH-phényl), 129.35 (CH-phényl), 120.00 (C-5), 47.72 (CH_2), 44.66 (CH_2).

SM (ESI) m/z : 296 (19%), 255 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%), 238 (44%).

HRMS (ESI): calc. pour $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_6+\text{H}$: 255.1353; trouvée 255.1342.

• **4-(Mesyloxy)but-2-yn-1-ol (49)**

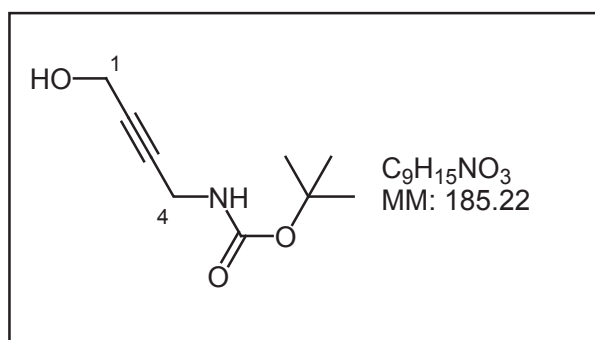


Le chlorure de méthanesulfonyle (2.30 mL, 30 mmol) et la triéthylamine (4.20 mL, 30 mmol) sont ajoutés, goutte à goutte, à une solution, refroidie dans un bain de glace, de but-2-yne-1,4-diol (2.58 g, 30 mmol) dans du THF anhydre (35 mL). Ensuite, le mélange est laissé monter à température ambiante. Après 17h d'agitation, le mélange est concentré sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH_2Cl_2 / méthanol, 97/3) pour donner le produit **(49)** sous la forme d'une huile incolore (2.23 g, 45%).

^1H RMN (300MHz, CDCl_3) δ : 4.89 (t, 2H, $J=1.8$ Hz, CH_2OMs), 4.34 (m, 2H, CH_2OH), 3.12 (s, 3H, CH_3), 1.92(m, 1H, OH).

IR (NaCl) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3524, 3029, 2939, 2871, 1632, 1444, 1414, 1351, 1258, 1219, 1172, 1140, 1019, 1140, 1019, 976, 939, 808.

• 4-(N-*tert*-butyloxycarbonylamino)but-2-yn-1-ol (**51**)²²⁹



Le produit (**49**) (1.02 g, 6.02 mmol) est traité par une solution saturée d'hydroxyde d'ammonium (15mL), et le mélange est agité pendant 1 heure. Après évaporation du solvant, le résidu est passé sur une résine Dowex 1X8 R₃N⁺Cl⁻, préalablement lavée avec une solution aqueuse de NaOH (4%*m.*). Le filtrat est concentré et séché sous vide pour donner le 4-aminobut-2-yn-1-ol (**50**) sous la forme d'un solide jaune (0.88 g, 76%), qui est remis immédiatement en réaction.

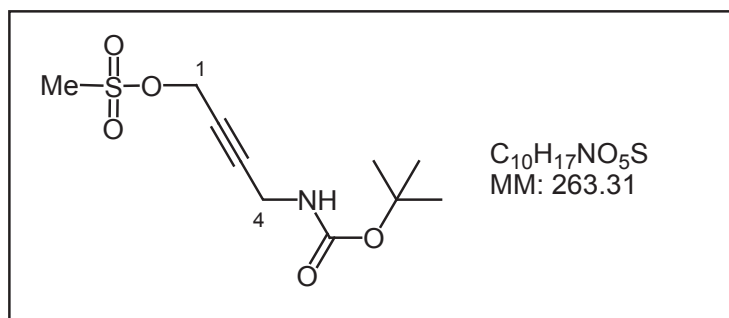
Pf = 58°C (lit.²³⁰ 60-61°C).

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 4.22 (t, 2H, *J*=1.9 Hz, CH₂O), 3.45 (t, 2H, *J*=1.9 Hz, CH₂N), 3.42 (s, 1H, OH), 2.50 (s, 2H, NH₂).

A une solution du composé (**50**) (0.65 g, 7.64 mmol) et de dicarbonate de di-*tert*-butyle (1.67 g, 7.66 mmol) dans du THF anhydre (30mL) est ajoutée, goutte à goutte, la triéthylamine (1.08 mL, 7.69 mmol) à 0°C. Le mélange est agité à température ambiante pendant la nuit, puis le solvant est évaporé et le résidu repris dans du dichlorométhane. La phase organique est lavée deux fois avec de l'eau, et la phase aqueuse extraite avec du dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5) pour donner le composé (**51**) sous la forme d'une huile incolore (1.03 g, 73%).

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 5.18 (bs, 1H, NH), 4.18 (d, 2H, *J*=5.2 Hz, CH₂O), 3.88 (d, 2H, *J*=5.2 Hz, CH₂N), 3.71 (m, 1H, OH), 1.38 (s, 9H, (CH₃)₃C).

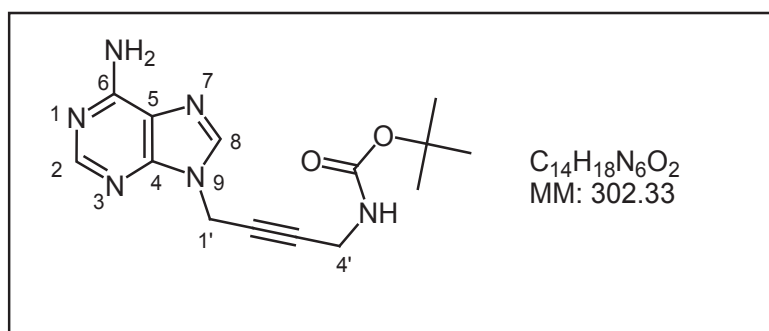
• **1-Mesyloxy-4-(N-*tert*-butyloxycarbonylamino)but-2-yne (52)**



A une solution du composé **(51)** (0.26 g, 1.40 mmol) dans du THF anhydre (5mL) à 0°C sont ajoutés le chlorure de méthanesulfonyle (0.13 mL, 1.68 mmol) et la triéthylamine (240 μ L, 1.71 mmol). Après l'addition, le mélange est laissé monter à température ambiante, et l'agitation est maintenue pendant 17 h. Le mélange est ensuite filtré puis le filtrat est concentré sous vide. Le résidu est repris dans du dichlorométhane. Cette solution est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 , filtrée puis concentrée sous vide pour donner le composé **(52)** sous la forme d'une huile incolore (0.38 g, 76%) qui est immédiatement remise en réaction.

IR (NaCl) $\nu(cm^{-1})$: 3402, 2979, 2937, 1694, 1514, 1367, 1250, 1174, 944, 807.

• **9-[(4-N-*tert*-butyloxycarbonylamino)but-2-ynyl]adénine (53)**



Une suspension d'adénine (0.380 g, 2.8 mmol) et de carbonate de potassium (0.233 g, 1.68 mmol) dans du DMF (40 mL) est chauffée à 75°C pendant 1 heure. Ensuite, une solution du composé **(52)** (0.370 g, 1.4 mmol) dans un mélange de DMF (10 mL) et de dichlorométhane (1 mL) est ajoutée à ce mélange. La réaction est laissée sous agitation à 75°C pendant 1h30 puis les solvants sont évaporés sous vide. Le résidu est partagé entre dichlorométhane et eau. La phase aqueuse est extraite par du CH_2Cl_2 et les extraits

organiques réunis sont séchés (Na_2SO_4), filtrés puis concentrés. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95/5) pour donner le composé **(53)** sous la forme d'un solide blanc (0.320 g, 75%).

Pf=200°C (déc.).

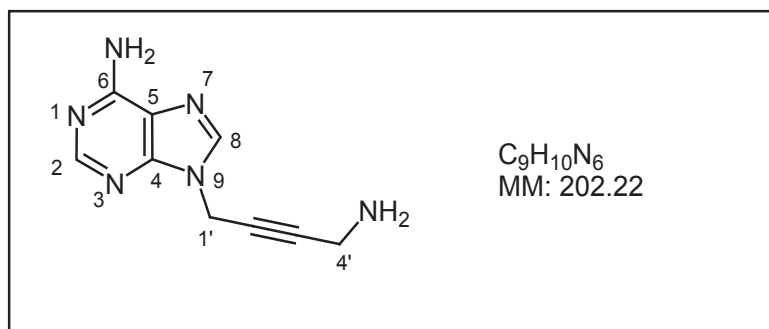
^1H RMN (300MHz, DMSO-d_6) δ : 8.18 (s, 1H, H-2), 8.15 (s, 1H, H-8), 7.26 (s, 2H, NH_2), 5.00 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-1'}$), 3.75 (d, 2H, $J=5.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-4'}$), 1.36 (m, 10H, NH, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$).

^{13}C RMN (75MHz, DMSO-d_6) δ : 155.99 (C-6), 155.23 (NHCOO), 152.64 (C-2), 149.06 (C-4), 140.03 (C-8), 118.54 (C-5), 82.61 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 78.27 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 75.79 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.47 (CH_2), 29.50 (CH_2), 28.15 ($3\times\text{CH}_3$).

SM (CI) m/z : 303 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

HRMS (ESI): calc. pour $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2+\text{H}$: 303.1569, trouvée: 303.1568.

• 9-(4-aminobut-2-ynyl)adénine (**45**)



A une suspension du composé **(53)** (0.280 g, 0.93 mmol) dans l'eau (15 mL), est ajouté goutte à goutte du HCl concentré (3 mL) sous agitation vigoureuse. Le mélange est agité pendant quelques minutes puis le solvant est évaporé. Le résidu est solubilisé dans de l'eau puis traité par une résine Dowex 1X8 $\text{R}_3\text{N}^+\text{Cl}^-$ préalablement lavée par une solution aqueuse de NaOH (4% m.). Le filtrat est concentré et séché sous vide pour donner le composé **(45)** sous la forme d'un solide blanc (150 mg, 80%) qui est recristallisé dans du méthanol.

Pf=135°C (déc.).

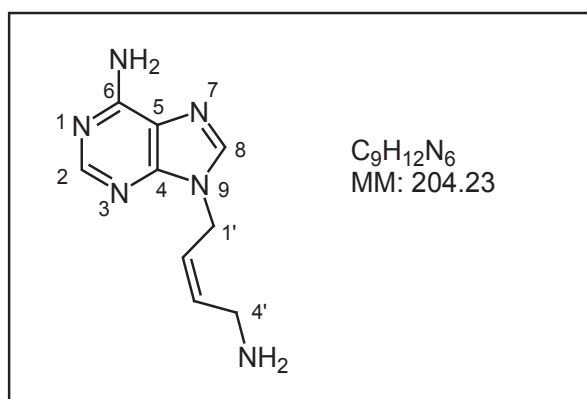
^1H RMN (300MHz, DMSO-d_6) δ : 8.24 (s, 1H, H-2), 8.16 (s, 1H, H-8), 7.76 (bs, 2H, NH_2), 7.29 (s, 2H, NH_2), 5.10 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-1'}$), 3.71 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-4'}$).

^{13}C RMN (75MHz, CD_3OD) δ : 157.34 (C-6), 153.88 (C-2), 150.20 (C-4), 142.04 (C-8), 119.93 (C-5), 86.94 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 76.26 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 34.22 (CH_2), 31.41 (CH_2).

SM (CI) m/z : 203 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

HRMS (CI): calc. pour $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_6+\text{H}$: 203.1045, trouvée: 203.1043.

• (Z)-9-(4-aminobut-2-ényl)adénine (**46**)²³¹

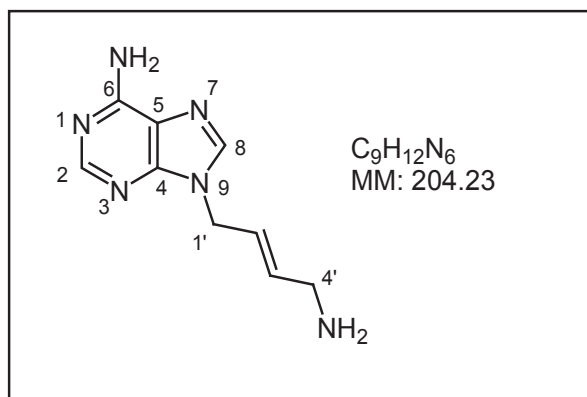


Une solution de palladium de Lindlar (7 mg, 5% m/m), de deux gouttes de quinoléine et du composé (**45**) (0.070 g, 0.35 mmol) dans du méthanol (70 mL) est maintenue sous pression atmosphérique de H_2 (1 atm) jusqu'à consommation du produit de départ (contrôle CCM). Ensuite, le mélange est filtré sur célite et le filtrat est concentré sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur couche mince de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}_{\text{aq.}}$, 30/20/1) pour donner le composé (**46**) sous la forme d'un solide blanc (0.047 g, 67%).

^1H RMN (300MHz, CD_3OD) δ : 8.17 (s, 1H, H-2), 8.09 (s, 1H, H-8), 5.79 (dt, 1H, $J_1=10.5\text{Hz}$, $J_2=7.0\text{Hz}$, $\text{HC}=\text{CH}$), 5.65 (dt, 1H, $J_1=10.5\text{Hz}$, $J_2=7.0\text{Hz}$, $\text{HC}=\text{CH}$), 5.00-4.70 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-1}' + 2\times\text{NH}_2$), 3.53 (d, 2H, $J=6.8\text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-4}'$).

^{13}C RMN (75MHz, CD_3OD) δ : 157.28 (C-6), 153.70 (C-2), 150.46 (C-4), 142.34 (C-8), 134.46 ($\text{CH}=\text{CH}$), 126.19 ($\text{CH}=\text{CH}$), 120.01 (C-5), 41.45 (CH_2), 38.58 (CH_2).

• **(E)-9-(4-aminobut-2-ényl)adénine (47)** ²³¹

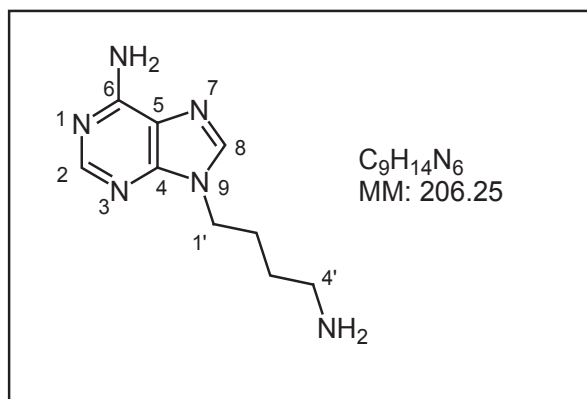


A une suspension du composé **(45)** (0.200 g, 1 mmol) dans du THF anhydre (10 mL) est ajouté de l'hydruide de lithium et d'aluminium (0.400 g, 20 mmol). Le mélange est agité pendant deux jours à température ambiante puis une solution aqueuse de NaOH (1N, 5 mL) est ajoutée. Le précipité est filtré puis lavé avec de l'acétate d'éthyle. Les filtrats réunis sont concentrés sous vide puis purifiés par chromatographie sur gel de silice ($CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH_{aq.}$, 20/20/1) pour donner le composé **(47)** sous la forme d'un solide blanc (0.057 g, 29%).

¹H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8.13 (s, 1H, H-2), 8.10 (s, 1H, H-8), 7.21 (s, 2H, NH_2), 5.82 (m, 1H, $\underline{H}C=CH$), 5.67 (dt, 1H, $J_1=15.5Hz$, $J_2=4.8Hz$, $HC=\underline{C}H$), 4.73 (d, 2H, $J=5.4 Hz$, CH_2-1'), 3.40-3.10 (m, 4H, $CH_2-2' + NH_2$).

¹³C RMN (75MHz, DMSO- d_6) δ : 155.94 (C-6), 152.46 (C-2), 149.32 (C-4), 140.53 (C-8), 135.54 ($\underline{C}H=CH$), 123.61 ($CH=\underline{C}H$), 118.65 (C-5), 44.11 (CH_2), 42.52 (CH_2).

• **9-(4-aminobutyl)adénine (48)**



Une suspension de palladium sur charbon (200 mg, 10%*m.*) et du composé **(45)** (0.250 g, 1.24 mmol) dans du méthanol (70 mL) est maintenue sous pression atmosphérique de H₂ (1 atm) jusqu'à consommation du produit de départ (contrôle CCM). Ensuite, le mélange est filtré sur célite et le filtrat concentré sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH_{aq.}, 20:20:1) pour donner le composé **(48)** sous la forme d'un solide blanc (0.227 g, 90%).

Pf=164-166°C.

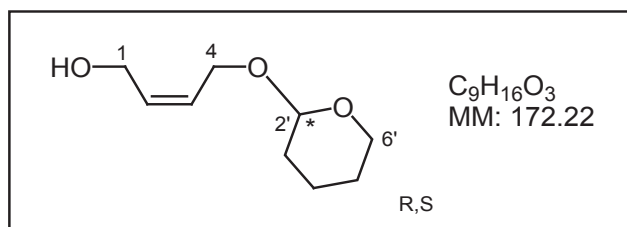
¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.14 (s, 1H, H-2), 8.12 (s, 1H, H-8), 7.17 (s, 2H, NH₂), 4.12 (t, 2H, *J*=7.3 Hz, CH₂-1'), 1.81 (qn, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂-4'), 1.28 (qn, *J*=6.9 Hz, 4H, 2×CH₂).

¹³C RMN (75MHz, DMSO-d₆) δ: 155.93 (C-6), 152.33 (C-2), 149.54 (C-4), 140.83 (C-8), 118.73 (C-5), 42.85 (CH₂), 41.08 (CH₂), 30.26 (CH₂), 26.99 (CH₂).

SM (CI) m/z : 282 (12%), 219 (15%), 207 ([M+H]⁺, 100%).

HRMS (CI): calc. pour C₉H₁₄N₆+H: 207.1358; trouvée: 207.1361.

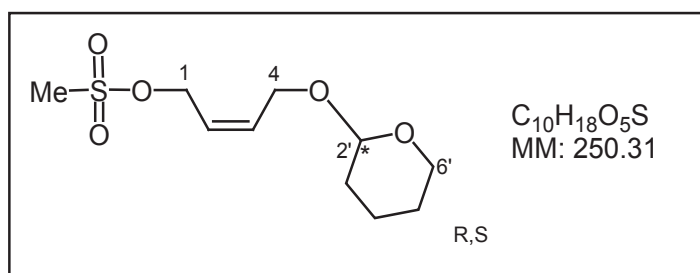
• **(Z)-4-(Tétrahydropyran-2-yloxy)-but-2-èn-1-ol, R et S (54)**



Le DHP (1.80mL, 20mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de but-2-ène-1,4-diol (1.76g, 20mmol) et d'acide *p*-toluènesulfonique monohydraté (0.19g, 1mmol) dans du dichlorométhane (30mL). Le mélange est agité pendant 2 heures à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé, et le résidu purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 98.5/1.5) pour donner le produit **(54)** sous la forme d'une huile jaune (1.48g, 43%).

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 5.80 (dtt, 1H, *J*₁=11.5Hz, *J*₂=6.4Hz, *J*₃=1.3Hz, CH=CH), 5.73-5.60 (m, 1H, CH=CH), 4.65 (t, 1H, *J*=3.5Hz, CH-2'), 4.29-4.05 (m, 4H, CH₂CH=CHCH₂), 3.82 (m, 1H, CH_a-6'), 3.49 (m, 1H, CH_b-6'), 2.58 (bs, 1H, OH), 1.90-1.30 (m, 6H, 3×CH₂).

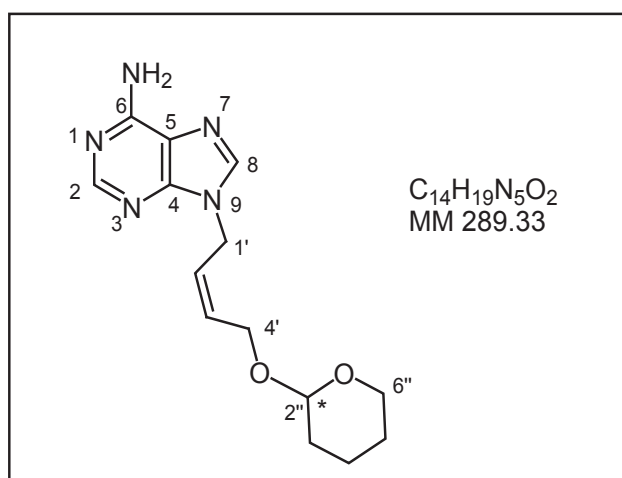
• **(Z)-1-Mésyloxy-4-(tétrahydropyran-2-yloxy)-but-2-ène, R et S (55)**



Le chlorure de méthanesulfonyl (680µL, 8.8mmol) et la triéthylamine (1.23mL, 8.8mmol) sont ajoutés, goutte à goutte, à une solution du composé **(54)** (1.37 g, 8mmol) dans du THF anhydre (25 mL), refroidie dans un bain de glace. Ensuite, le mélange est laissé monter à température ambiante pendant 2 heures. Le milieu est ensuite filtré, et le filtrat concentré, puis le résidu est repris dans du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄ puis concentrée pour donner le produit **(55)** sous la forme d'une huile jaune (1.81g, quant.).

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 5.90 (dtt, J₁=11.5 Hz, J₂=5.5 Hz, J₃=1.0 Hz, 1H, CH=CH), 5.73 (dtt, J₁=11.5 Hz, J₂=6.8 Hz, J₃=1.5 Hz, 1H, CH=CH), 4.86 (d, 2H, J=6.8Hz, CH₂OMs), 4.62 (t, 1H, J=3.2Hz, CH-2'), 4.40-4.05 (m, 2H, CH₂OTHP), 3.83 (m, 1H, CH_a-6'), 3.52 (m, 1H, CH_b-6'), 2.99 (s, 3H, CH₃), 2.58 (bs, 1H, OH), 1.90-1.30 (m, 6H, 3xCH₂).

• **(Z)-9-[4-(Tétrahydropyran-2-yloxy)-but-2-ényl]adénine, R et S (56)**

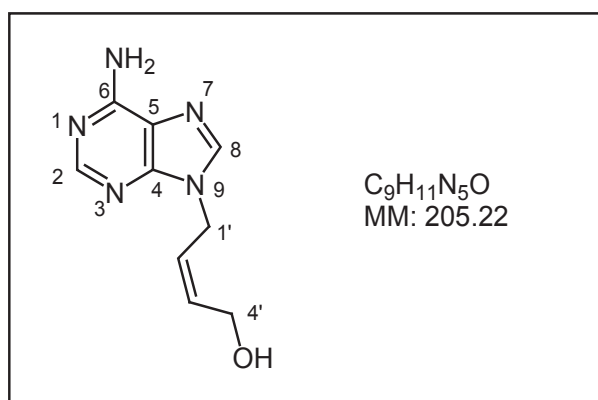


Une suspension d'adénine (2.31g, 17.1mmol) et de carbonate de potassium (1.42g, 10.2mmol) dans du DMF (80 mL) est chauffée à 75°C pendant 30 minutes. Ensuite, une

solution du composé **(55)** (2.14g, 8.56mmol) dans du DMF (10 mL) est ajoutée. Le mélange est laissé sous agitation à 75°C pendant 1h30 puis les solvants sont évaporés sous vide. Le résidu est partagé entre dichlorométhane et eau. La phase aqueuse est extraite par du CH₂Cl₂ et les extraits organiques réunis sont séchés (Na₂SO₄) puis concentrés. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 96/4) pour donner le composé **(37)** sous la forme d'un solide blanc (1.12g, 47%).

¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.13 (s, 1H, H-2), 8.10 (s, 1H, H-8), 7.20 (s, 2H, NH₂), 5.90-5.75 (m, 2H, CH=CH), 4.83 (d, 2H, J=5.3Hz, CH₂-1'), 4.66 (bs, 1H, CH-2''), 4.40-4.20 (m, 2H, CH₂-4'), 3.80 (m, 1H, CH_a-6''), 3.44 (m, 1H, CH_b-6''), 1.80-1.35 (m, 6H, 3xCH₂).

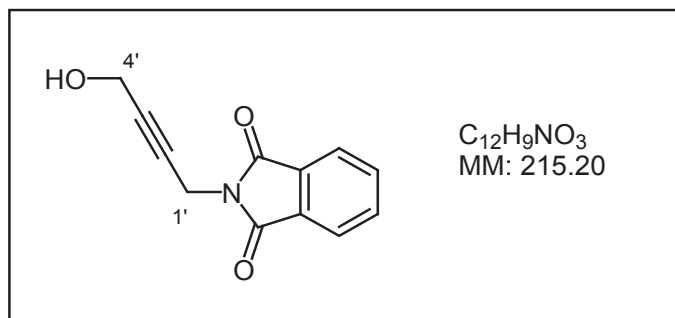
• **(Z)-9-(4-hydroxybut-2-ènyl)adénine (57)**



Le composé **(56)** (0.15g, 0.52mmol) est suspendu dans de l'eau distillée (10mL). Une solution aqueuse de HCl (1N, 10mL) est ensuite ajoutée goutte à goutte, puis le mélange est chauffé à 70°C jusqu'à la disparition du produit de départ (contrôle CCM). Le milieu est neutralisé jusqu'à pH=10 par une solution aqueuse saturée de NaHCO₃, puis le solvant est évaporé. Le solide est ensuite lavé plusieurs fois avec un mélange dichlorométhane/méthanol (8/2), puis les filtrats réunis sont concentrés et le résidu purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 90/10) pour donner le composé **(57)** sous la forme d'un solide blanc (0.12g, quant.).

¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.13 (s, 1H, H-2), 8.11 (s, 1H, H-8), 7.21 (s, 2H, NH₂), 5.73 (dt, J₁=10.9Hz, J₂=5.9Hz, 1H, CH=CH), 5.59 (dt, J₁=10.9Hz, J₂=6.8Hz, J₃=1.4Hz, 1H, CH=CH), 4.95 (bs, 1H, OH), 4.82 (d, 2H, J=7.1Hz, CH₂-adénine), 4.19 (s, 2H, CH₂OH).

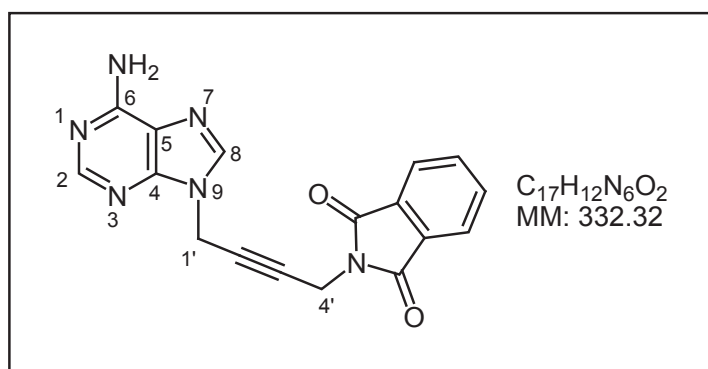
• **N-(4-Hydroxy-but-2-ynyl)phthalimide (58)** ²⁰³



Le but-2-yne-1,4-diol (0.860g, 10mmol), la triphénylphosphine (1.83g, 7mmol) et le phthalimide (1.03g, 7mmol) sont solubilisés dans du THF anhydre (40mL), et la solution est refroidie à 0°C. Le DIAD (1.386mL, 7mmol) est ensuite ajouté et le milieu est agité à 0°C pendant la nuit. Le solvant est ensuite évaporé, et le mélange repris dans du dichlorométhane. La phase organique est ensuite lavée avec de l'eau et concentrée, puis le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, 6/4) pour donner le produit (**58**) sous la forme d'un solide blanc (0.950g, 44%).

¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 7.89-7.85 (m, 4H, H arom.), 5.17 (t, 1H, J=5.9Hz, OH), 4.39 (s, 2H, CH₂-N), 4.02 (d, 2H, J=5.9Hz, CH₂-O).

• **9-[4-Phtalimidylbut-2-ynyl]adénine (59)**

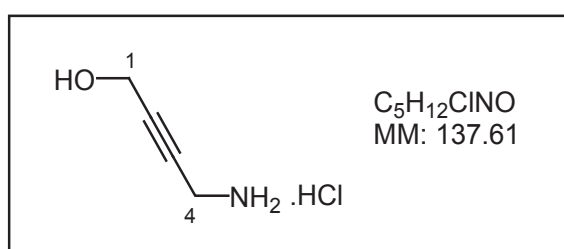


L'adénine (0.234g, 1.73mmol), la triphénylphosphine (0.473g, 1.80mmol) et le composé (**58**) (0.311g, 1.44mmol) sont mis en suspension dans du THF anhydre (30mL) et le milieu est refroidi à 0°C. Le DIAD (358μL, 1.80mmol) est ensuite ajouté goutte à goutte et le milieu est maintenu à 0°C pendant 2 heures puis porté au reflux pendant la nuit. Le lendemain, le

milieu est filtré et le filtrat concentré pour donner un résidu, qui est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 95/5) pour donner le produit **(59)** sous la forme d'un solide blanc (0.09g, 15%).

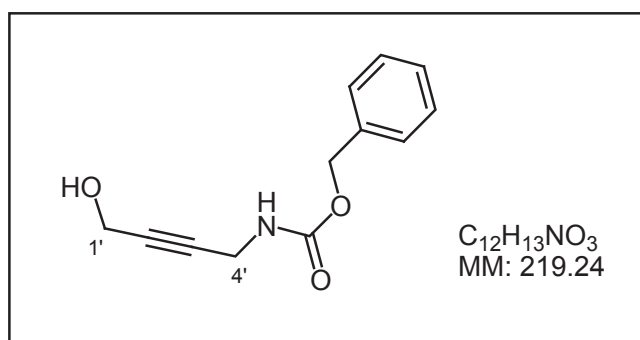
^1H RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8.16 (s, 1H, H-2), 8.11 (s, 1H, H-8), 7.92-7.84 (m, 4H, H phthalimide), 7.26 (s, 2H, NH_2), 5.02 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-1}'$), 4.42 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-4}'$).

• Chlorhydrate de 4-aminobut-2-yn-1-ol (**50**).HCl



Le composé **(58)** (0.950g, 4.41mmol) est solubilisé dans une solution de méthylamine dans l'eau (40%, 14mL). Après 15 minutes, le milieu est concentré sous vide, et le résidu repris dans un mélange eau/éthanol (1/1). HCl concentré est alors ajouté (37%, 3.5mL) et le mélange est chauffé à 70°C pendant 15 minutes. Les solvants sont ensuite évaporés, et le résidu lavé plusieurs fois au dichlorométhane jusqu'à l'obtention d'un solide blanc (0.530g, quant.) qui a été utilisé dans la réaction suivante sans purification supplémentaire.

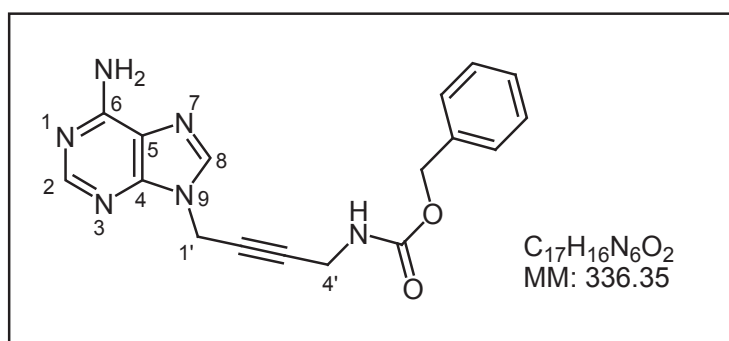
• 4-(N-benzyloxycarbonylamino)but-2-yn-1-ol (**60**)



Le composé **(50).HCl** (0.53g, 4.38mmol) et le carbonate de sodium (0.928g, 8.76mmol) sont mis en suspension dans l'eau (20mL). Le chloroformate de benzyle (930μL, 6.57mmol) est ensuite ajouté. La réaction est agitée pendant 1 heure à température ambiante, ensuite le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 96/4) pour donner le produit **(60)** sous la forme d'une huile incolore (0.39g, 40%).

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, CDCl_3) δ : 7.39 (m, 5H, H arom.), 5.21 (bs, 1H, NH), 5.10 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.23 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-1'}$), 3.99 (d, 2H, $J=5.1\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-4'}$), 2.69 (bs, 1H, OH).

• 9-[4-(N-benzyloxycarbonylamino)but-2-ynyl]adénine (61)

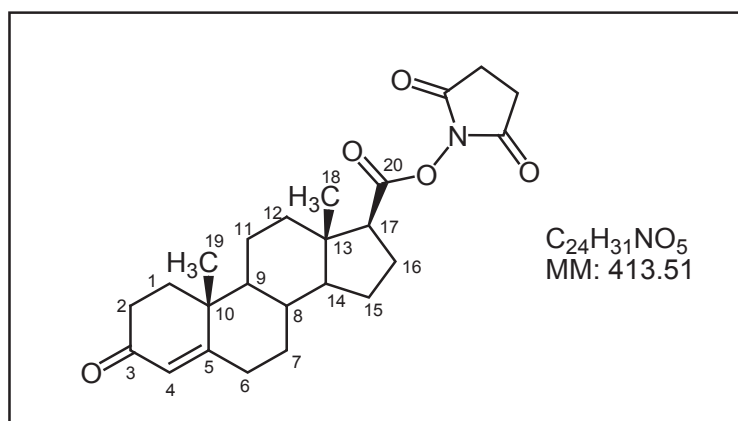


L'adénine (0.314g, 2.35mmol), la triphénylphosphine (0.508g, 1.93mmol) et le composé **(60)** (0.340g, 1.55mmol) sont mis en suspension dans du THF anhydre (30mL) et le milieu est refroidi à 0°C. Le DIAD (358μL, 1.93mmol) est ensuite ajouté goutte à goutte et le milieu est maintenu à 0°C pendant 2 heures puis remonté à température ambiante pendant la nuit. Le lendemain, le milieu est filtré et le filtrat concentré pour donner un résidu, qui est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 95/5) pour donner le produit **(61)** sous la forme d'un solide blanc (0.130g, 17%).

$^1\text{H RMN}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ : 8.17 (s, 1H, H-2), 8.15 (s, 1H, H-8), 7.42 (m, 5H, phényle), 7.22 (s, 2H, NH_2), 5.13 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.03 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-1'}$), 3.95 (d, 2H, $J=5.3\text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-4'}$).

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1730, 1683, 1613.

• **17β-(3-Oxoandrost-4-ényl)carboxylate de N-succinimidyle (62)**²⁰⁴



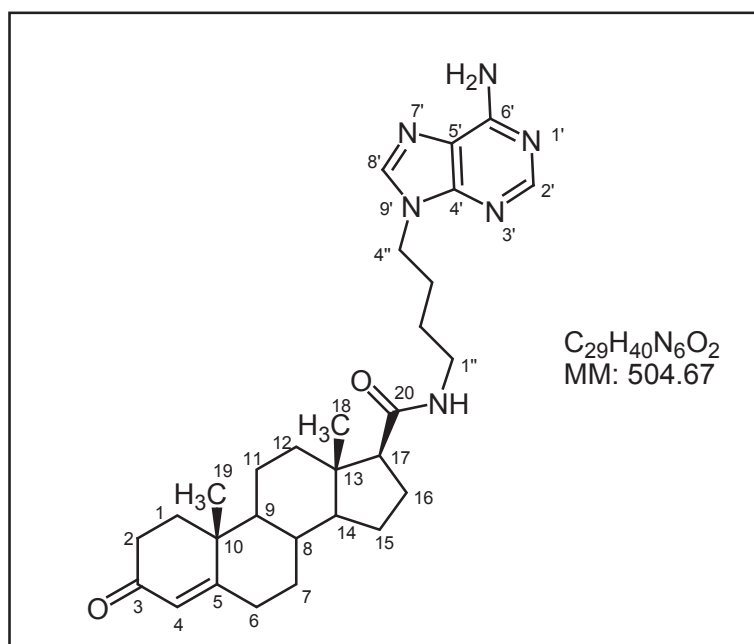
A une solution de N-hydroxysuccinimide (0.110 g, 0.96 mmol) et du composé **(29)** (0.300 g, 0.95 mmol) dans du THF anhydre (6 mL) est ajoutée une solution de DCC (0.195 g, 0.95 mmol) dans du THF anhydre (3 mL). Le mélange est agité pendant la nuit à température ambiante, puis il est filtré et le filtrat concentré sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 99/1) suivie d'une recristallisation dans un mélange méthanol/eau pour donner le composé **(62)** sous la forme d'un solide blanc (0.216 g, 55%).

Pf=233-236°C (Litt. 236-238°C).

¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 5.64 (s, 1H, H-4), 2.81 (m, 4H, 2×CH₂-succinimide), 2.50-0.90 (m, 20H), 1.16 (s, 3H, CH₃-19), 0.78 (s, 3H, CH₃-18).

IR (KBr) ν(cm⁻¹): 3457, 2938, 2850, 1809, 1776, 1745, 1673, 1657, 1609, 1362, 1209, 1063.

• **17β-[4-(6-Aminopurin-9-yl)butylcarbamoyl]androst-4-èn-3-one (63)**



Une solution du composé **(48)** (0.080 g, 0.39 mmol), du composé **(62)** (0.160 g, 0.39 mmol) et de la diisopropyléthylamine (0.136 mL, 0.78 mmol) dans du DMF (10 mL) est agitée pendant la nuit à température ambiante. Le solvant est évaporée sous vide et le résidu solubilisé dans du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 98/2 puis 95/5) pour donner le composé **(63)** sous la forme d'un solide blanc (0.150 g, 77%).

Pf=178°C.

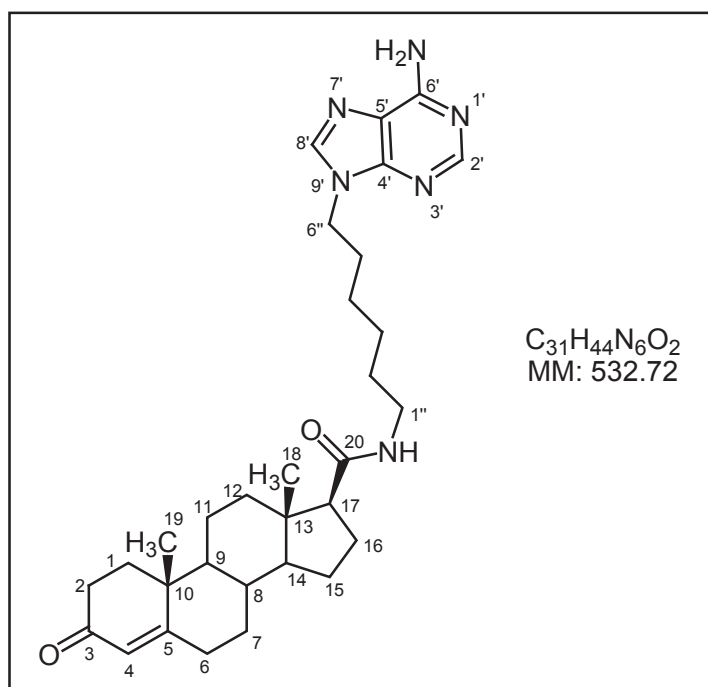
¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.12 (s, 1H, H-2'), 8.11 (s, 1H, H-8'), 7.45 (t, 1H, *J* =5.6Hz, NH), 7.19 (s, 2H, NH₂), 5.62 (s, 1H, H-4), 4.13 (t, 2H, *J*=6.8 Hz, CH₂-adénine), 3.21 (m, 1H, NHCH_aH_b), 2.90 (m, 1H, NHCH_aH_b), 2.50-0.78 (m, 24H), 1.13 (s, 3H, CH₃-19), 0.50 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (75MHz, DMSO-d₆) δ: 198.91 (C-3), 172.29 (CONH), 171.85 (C-5), 156.79 (C-6'), 153.18 (C-2'), 150.34 (C-4'), 141.68 (C-8'), 123.99 (CH-4), 119.59 (C-5'), 56.34 (CH), 55.78 (CH), 54.12 (CH), 44.03 (C), 43.47 (CH₂), 39.05 (C), 38.65 (CH₂), 38.38 (CH₂), 35.97 (CH₂), 35.79 (CH), 34.49 (CH₂), 32.85 (CH₂), 32.53 (CH₂), 27.98 (CH₂), 27.58 (CH₂), 25.02 (CH₂), 24.05 (CH₂), 21.21 (CH₂), 17.71 (CH₃-19), 14.06 (CH₃-18).

SM (CI) m/z : 1031 ([2M+Na]⁺, 6%), 894 (7%), 505 ([M+H]⁺, 100%).

HRMS (ESI): calc pour C₂₉H₄₀N₆O₂+H: 505.3291, trouvée: 505.3287.

• **17β-[6-(6-Aminopurin-9-yl)hexylcarbamoyl]androst-4-èn-3-one (64)**



Une solution du composé **(42)** (0.234 g, 1 mmol), du composé **(62)** (0.413 g, 1 mmol) et de la diisopropyléthylamine (200 µL, 1.15 mmol) dans du DMF (30 mL) est agitée pendant la nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu est solubilisé dans du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis concentrée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5) pour donner le composé **(64)** sous la forme d'un solide blanc (0.420 g, 79%).

Pf=115°C

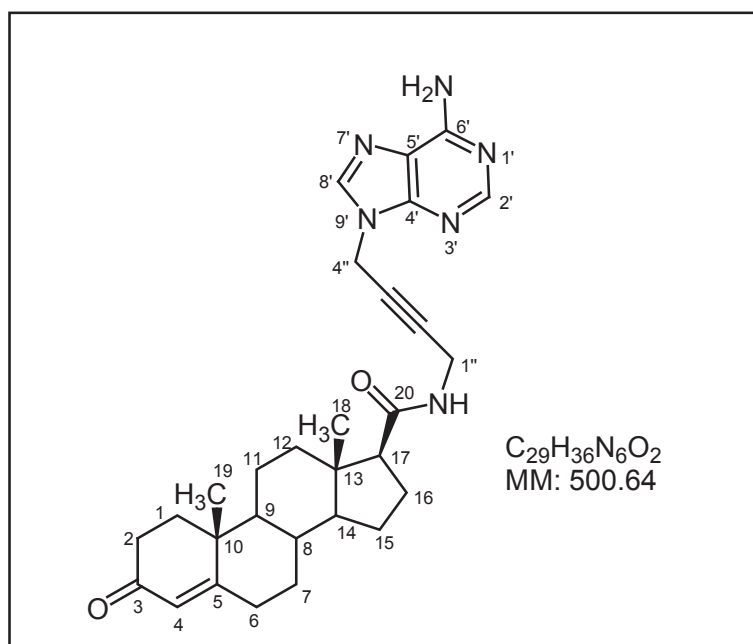
¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.13 (s, 1H, H-2'), 8.12 (s, 1H, H-8'), 7.41 (t, 1H, J=5.8 Hz, NH), 7.17 (s, 2H, NH₂), 5.62 (s, 1H, H-4), 4.11 (t, 2H, J=7.0 Hz, CH₂-6''), 3.14 (m, 1H, NHCH_aH_b), 2.87 (m, 1H, NHCH_aH_b), 2.50-0.82 (m, 28H), 1.12 (s, 3H, CH₃-19), 0.58 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ: 199.63 (C-3), 172.58 (CONH), 171.18 (C-5), 155.57 (C-6'), 153.08 (C-2'), 150.24 (C-4'), 140.57 (C-8'), 124.03 (CH-4), 119.79 (C-5'), 57.16 (CH), 55.65 (CH), 53.91 (CH), 43.91 (CH₂), 43.77 (C), 39.29 (CH₂), 38.74 (C), 38.52 (CH₂), 35.86 (CH₂), 35.73 (CH), 34.08 (CH₂), 32.92 (CH₂), 32.06 (CH₂), 30.13 (CH₂), 29.89 (CH₂), 26.44 (CH₂), 26.33 (CH₂), 24.53 (CH₂), 23.72 (CH₂), 21.06 (CH₂), 17.50 (CH₃-19), 13.36 (CH₃-18).

SM (CI) m/z : 1072 (8%), 793 (9%), 533 ([M+H]⁺, 100%).

HRMS (ESI): calc pour C₃₁H₄₄N₆O₂+H: 533.3604; trouvée: 533.3609.

• **17β-[4-(6-Aminopurin-9-yl)but-2-ynylcarbamoyl]androst-4-èn-3-one (65)**



Une solution du composé **(45)** (0.070 g, 0.35 mmol), du composé **(62)** (0.182 g, 0.44 mmol) et de la diisopropyléthylamine (200 µL, 0.49 mmol) dans du DMF (7 mL) est agitée pendant la nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu repris dans du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis concentrée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5 puis 93/7) pour donner le composé **(65)** sous la forme d'un solide blanc (0.160 g, 92%).

Pf=232°C.

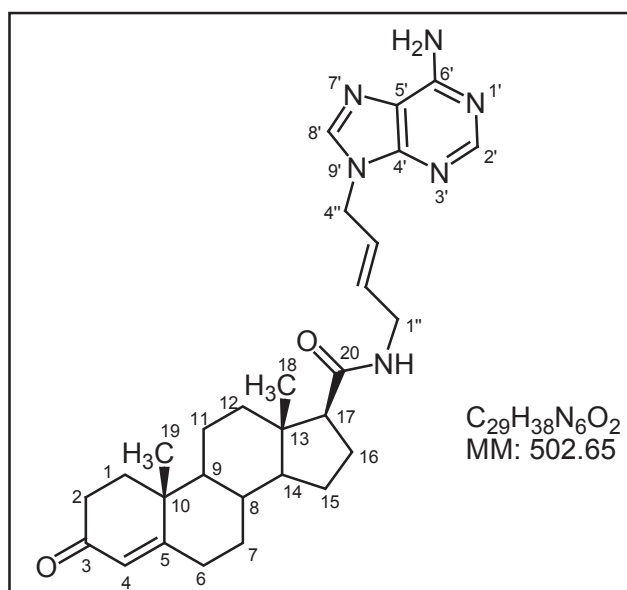
¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.16 (s, 1H, H-2'), 8.14 (s, 1H, H-8'), 7.88 (t, 1H, *J*=5.7 Hz, NH), 7.25 (s, 2H, NH₂), 5.62 (s, 1H, H-4), 5.00 (s, 2H, CH₂-4''), 3.94 (dd, 1H, *J*=17.2Hz, 5.7Hz, CH_aH_bNH), 3.80 (dd, 1H, *J*=17.2Hz, 5.7Hz, CH_aH_bNH), 2.50-0.80 (m, 20H), 1.14 (s, 3H, CH₃-19), 0.50 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ: 199.64 (C-3), 172.50 (CONH), 171.07 (C-5), 155.54 (C-6'), 153.40 (C-2'), 149.81 (C-4'), 139.97 (C-8'), 124.07 (CH-4), 119.67 (C-5'), 83.03 (C≡C), 75.37 (C≡C), 56.87 (CH), 55.67 (CH), 53.92 (CH), 44.03 (C), 38.74 (C), 38.50 (CH₂), 35.89 (CH₂), 35.72 (CH), 34.09 (CH₂), 33.47 (CH₂), 32.90 (CH₂), 32.05 (CH₂), 29.29 (CH₂), 24.52 (CH₂), 23.66 (CH₂), 21.01 (CH₂), 17.50 (CH₃-19), 13.36 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z : 501 ([M+H]⁺, 100%).

HRMS (ESI): calc. pour C₂₉H₃₆N₆O₂+H: 501.2978; trouvée: 501.2979.

• **(E)-17β-[4-(6-Aminopurin-9-yl)but-2-ènylcarbamoyl]androst-4-èn-3-one (66)**



Une solution du composé **(47)** (0.030 g, 0.15 mmol), du composé **(62)** (0.60 g, 0.15 mmol) et de la diisopropyléthylamine (36 µL, 0.20 mmol) dans du DMF (4 mL) est agitée pendant la nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu solubilisé dans du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis concentrée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5 puis 80/20) pour donner le composé **(66)** sous la forme d'un solide blanc (0.040 g, 55%).

Pf=206°C.

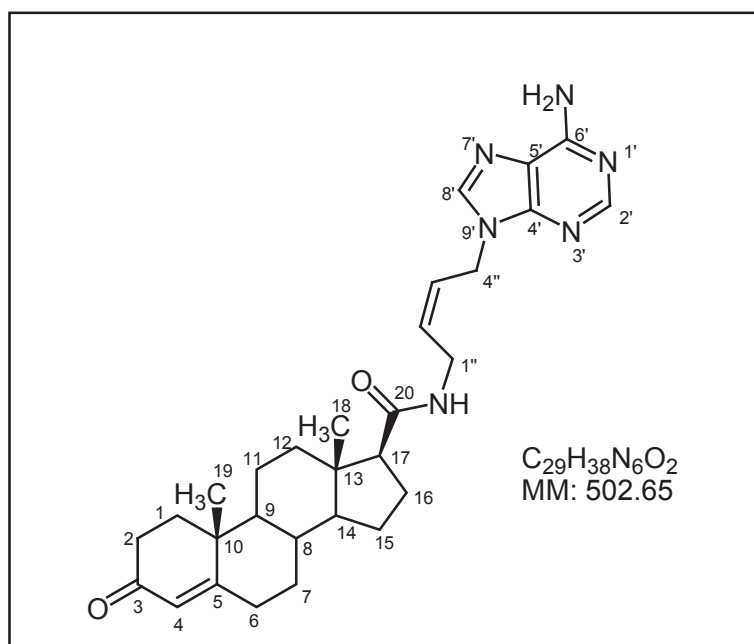
¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.12 (s, 1H, H-2'), 8.07 (s, 1H, H-8'), 7.63 (t, 1H, J=5.6 Hz, NH), 7.19 (s, 2H, NH₂), 5.62 (s, 1H, H-4), 5.76 (m dont J1=16Hz, 1H, HC=CH), 5.57 (m dont J1=16Hz, 1H, HC=CH), 4.73 (d, 2H, J=5.6 Hz, CH₂-4''), 3.85-3.73 (m, 1H, NHCH_aH_b), 3.58-3.47 (m, 1H, NHCH_aH_b), 2.50-0.75 (m, 20H), 1.14 (s, 3H, CH₃-19), 0.49 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃+10% CD₃OD) δ: 200.55 (C-3), 173.20 (CONH), 172.36 (C-5'), 155.62 (C-6'), 152.87 (C-2'), 149.39 (C-4'), 140.42 (C-8'), 131.51 (CH=CH), 125.21 (CH=CH), 123.70 (CH-4), 119.06 (C-5'), 56.80 (CH), 55.49 (CH), 53.76 (CH), 45.02 (CH₂), 43.87 (C), 40.41 (CH₂), 38.72 (C), 38.18 (CH₂), 35.63 (CH₂), 35.60 (CH), 33.84 (CH₂), 32.88 (CH₂), 31.93 (CH₂), 24.44 (CH₂), 23.62 (CH₂), 20.90 (CH₂), 17.33 (CH₃-19), 13.20 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z : 525 ([M+Na]⁺, 28%), 503 ([M+H]⁺, 100%), 368 ([M-adénine]⁺, 35%), 205 (23%).

HRMS (ESI): calc pour C₂₉H₃₈N₆O₂+H: 503.3134; trouvée: 503.3132.

• **(Z)-17β-[4-(6-Aminopurin-9-yl)but-2-ènylcarbamoyl]androst-4-èn-3-one (67)**



Une solution du composé **(46)** (0.070 g, 0.34 mmol), du composé **(62)** (0.140 g, 0.34 mmol) et de la diisopropyléthylamine (90 µL, 0.51 mmol) dans du DMF (25 mL) est agitée pendant la nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu solubilisé dans du chloroforme. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis concentrée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur couche mince de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 38/3) pour donner le composé **(67)** sous la forme d'un solide blanc (0.070 g, 40%).

Pf=234°C.

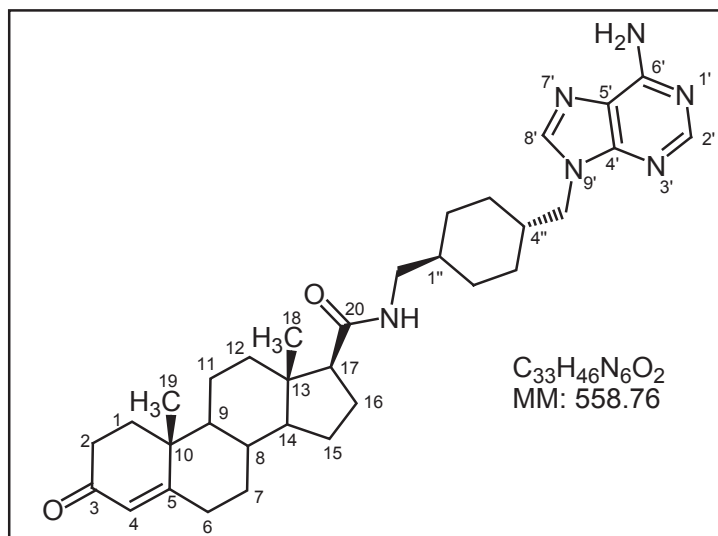
¹H RMN (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.14 (s, 2H, H-2', H-8'), 7.75 (bt, 1H, NH), 7.21 (s, 2H, NH₂), 5.62 (s, 1H, H-4), 5.72-5.51 (m, 2H, HC=CH), 4.86 (d, 2H, *J*= 6.5Hz, CH₂-4''), 4.07-3.78 (m, 2H, CH₂NH), 2.77-0.80 (m, 20H), 1.13 (s, 3H, CH₃-19), 0.61 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ: 199.62 (C-3), 172.77 (CONH), 171.14 (C-5), 155.57 (C-6'), 153.01 (C-2'), 150.05 (C-4'), 140.08 (C-8'), 130.92 (CH=CH), 126.06 (CH=CH), 124.07 (CH-4), 120.00 (C-5'), 57.13 (CH), 55.71 (CH), 53.85 (CH), 44.02 (C), 40.69 (CH₂), 38.74 (C), 38.50 (CH₂), 35.86 (CH₂), 35.79 (CH₂), 34.09 (CH₂), 32.93 (CH₂), 32.07 (CH₂), 24.63 (CH₂), 23.86 (CH₂), 21.04 (CH₂), 35.76 (CH), 17.50 (CH₃-19), 13.49 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z : 525 ([M+Na]⁺, 45%), 503 ([M+H]⁺, 100%), 368 ([M-adénine]⁺, 17%).

HRMS (ESI): calc pour C₂₉H₃₈N₆O₂+H: 503.3134; trouvée: 503.3134.

- 17β-[[*Trans*-4-(6-Aminopurin-9-ylméthyl)cyclohexylméthyl]carbamoyl]androst-4-èn-3-one (**68**)



Une solution du composé (**43**) (0.090 g, 0.35 mmol), du composé (**62**) (0.119 g, 0.29 mmol) et de la diisopropyléthylamine (0.105 mL, 0.6 mmol) dans du DMF (5 mL) est agitée pendant la nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu est solubilisé dans du chloroforme. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur couche mince de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 90/10) pour donner le composé (**68**) sous la forme d'un solide blanc (0.115 g, 60%).

Pf=127°C.

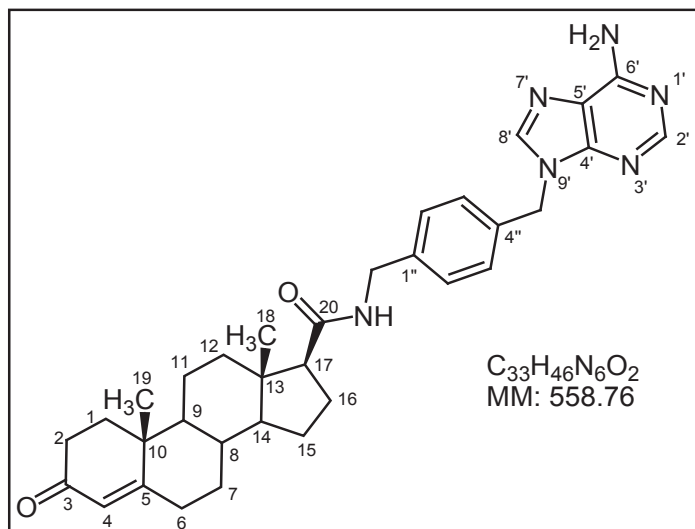
¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 8.34 (s, 1H, H-2'), 7.75 (s, 1H, H-8'), 6.01 (s, 2H, NH₂), 5.71 (s, 1H, H-4), 5.37 (t, 1H, *J*=5.9 Hz, NH), 4.02 (d, 2H, *J*=7.2 Hz, CH₂-adénine), 3.18 (m, 1H, NHCH₂H_b), 3.01 (m, 1H, NHCH₂H_b), 2.49-0.73 (m, 30H), 1.17 (s, 3H, CH₃-19), 0.70 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ: 199.60 (C-3), 172.64 (CONH), 171.13 (C-5), 155.37 (C-6'), 152.74 (C-2'), 150.40 (C-4'), 141.21 (C-8'), 124.07 (CH-4), 119.67 (C-5'), 57.26 (CH), 55.69 (CH), 53.93 (CH), 50.02 (CH₂), 45.56 (CH₂), 43.78 (C), 38.75 (C), 38.58 (CH₂), 38.39 (CH), 38.01 (CH), 35.76 (CH), 35.89 (CH₂), 34.10 (CH₂), 32.93 (CH₂), 32.07 (CH₂), 30.13 (CH₂), 30.08 (CH₂), 30.03 (CH₂), 29.83 (CH₂), 24.53 (CH₂), 23.79 (CH₂), 21.11 (CH₂), 17.52 (CH₃-19), 13.40 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z : 559 ([M+H]⁺, 100%), 261 (22%).

HRMS (ESI): calc pour C₃₃H₄₆N₆O₂+H: 559.3760; trouvée: 559.3760.

- 17β-[[4-(6-Aminopurin-9-ylméthyl)phénylméthyl]carbamoyl]androst-4-èn-3-one (69)



Une solution du composé **(44)** (0.030 g, 0.12 mmol), du composé **(62)** (0.049 g, 0.12 mmol) et de la diisopropyléthylamine (0.110 mL, 0.18 mmol) dans du DMF (2 mL) est agitée pendant 20h à 35°C. Le mélange est dissous dans l'acétate d'éthyle et la phase organique lavée avec de l'eau. La phase aqueuse est extraite de nouveau avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont concentrées sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur couche mince de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 92/8) pour donner le produit **(69)** sous la forme d'un solide blanc (0.040 g, 61%).

Pf=155-157°C.

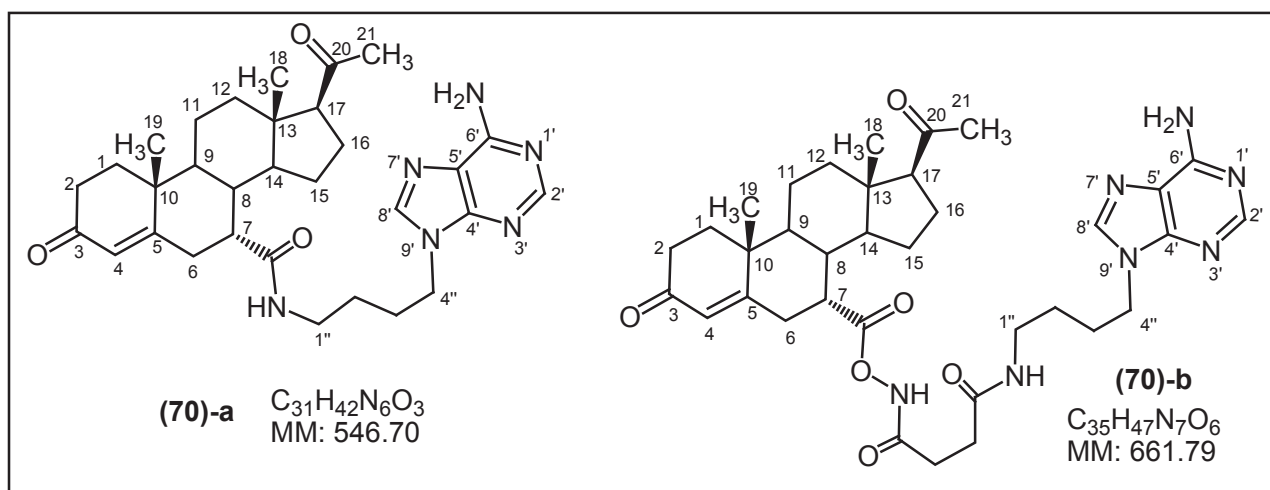
¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 8.39 (s, 1H, H-2'), 7.76 (s, 1H, H-8'), 7.25 (m, 4H, H-phényl), 5.71 (m, 3H, H-4 + NH₂), 5.63 (t, 1H, J=5.8 Hz, NH), 5.35 (s, 2H, CH₂-adénine), 4.49 (dd, 1H, J₁= 14.8Hz, J₂= 5.8Hz, NHCH_aH_b), 4.37 (dd, 1H, J₁=14.8Hz, J₂= 5.8Hz, NHCH_aH_b), 2.50-0.83 (m, 20H), 1.17 (s, 3H, CH₃-19), 0.73 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ: 199.59 (C-3), 172.61 (CONH), 171.09 (C-5), 155.59 (C-6'), 153.42 (C-2'), 150.35 (C-4'), 140.49 (C-8'), 139.27 (C-phényl ipso), 134.91 (C-phényl ipso), 128.63 (2xCH-phényl), 128.22 (2xCH-phényl), 124.05 (CH-4), 119.68 (C-5'), 57.11 (CH), 55.69 (CH), 53.87 (CH), 47.04 (CH₂), 43.95 (C), 43.30 (CH₂), 38.73 (C), 38.54 (CH₂), 35.86 (CH₂), 35.72 (CH), 34.07 (CH₂), 32.90 (CH₂), 32.05 (CH₂), 24.52 (CH₂), 23.81 (CH₂), 21.06 (CH₂), 17.50 (CH₃-19), 13.43 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z : 1127 ([2M+Na]⁺, 9%), 1105 ([2M+H]⁺, 7%), 553 ([M+H]⁺, 100%), 418 ([M-adénine]⁺, 10%).

HRMS (ESI): calc pour $C_{33}H_{40}N_6O_2+H$: 553.3286; trouvée 553.3292.

- **7 α -[4-(6-Aminopurin-9-yl)butylcarbamoyl]pregn-4-èn-3,20-dione (70)-a** et **N-(3,20-dioxopregn-4-èn-7-carboxyloxy)-N'-[4-(6-aminopurin-9-yl)butyl]succinamide (70)-b**



Le DCC (0.058g, 0.28mmol) et le N-hydroxysuccinimide (0.032g, 0.28mmol) sont ajoutés à une solution d'acide **(30)** (0.1g, 0.28mmol) dans DMF anhydre (4mL). Le mélange est laissé sous agitation pendant la nuit à température ambiante. Le lendemain, le composé **(48)** (0.068g, 0.33mmol) puis la diisopropyléthylamine (0.072mL, 0.41mmol) sont ajoutés. L'agitation est poursuivie pendant trois heures supplémentaires. Le solvant est ensuite évaporé, et le mélange partagé entre dichlorométhane et eau. La phase aqueuse est extraite plusieurs fois au dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont concentrées, et le résidu est purifié par chromatographie sur couche mince de silice (dichlorométhane/méthanol, 93/7) pour donner deux produits : **(70)-a**, Rf 0.35, (0.048g, 32%) et **(70)-b**, Rf 0.3 (0.035g, 23%).

(70)-a : solide blanc

1H RMN (400MHz, $CDCl_3$) δ : 8.32 (s, 1H, H-2'), 7.82 (s, 1H, H-8'), 6.03 (t, 1H, $J=5.8$ Hz, NH), 5.95 (s, 2H, NH_2), 5.66 (d, 1H, $J=1.2$ Hz, H-4), 4.25 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, CH_2N), 3.27 (m, 2H, $NHCH_2$), 2.66 (m, 1H), 2.54-1.14 (m, 22H), 2.09 (s, 3H, CH_3 -21), 1.18 (s, 3H, CH_3 -19), 0.62 (s, 3H, CH_3 -18).

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ : 209.30 (C-20), 198.88 (C-3), 173.13 (CONH), 169.06 (C-5), 155.47 (C-6'), 152.61 (CH-2'), 150.13 (C-4'), 140.83 (CH-8'), 125.46 (CH-4), 119.79 (C-5'), 63.16 (CH-17), 52.20 (CH), 46.10 (CH), 44.95 (CH), 44.40 (C), 43.40 (CH_2), 38.32 (CH_2), 38.26 (C), 38.20 (CH_2), 37.80 (CH), 36.54 (CH_2), 35.53 (CH_2), 34.04 (CH_2), 31.67 (CH_3 -21), 27.63 (CH_2), 26.60 (CH_2), 24.75 (CH_2), 22.85 (CH_2), 21.41 (CH_2), 17.99 (CH_3 -19), 13.25 (CH_3 -18).

SM (ESI) m/z : 569 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 5%), 547 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

HRMS (ESI): calc pour $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_3+\text{H}$: 547.3391; trouvée: 547.3392.

(70)-b: solide blanc

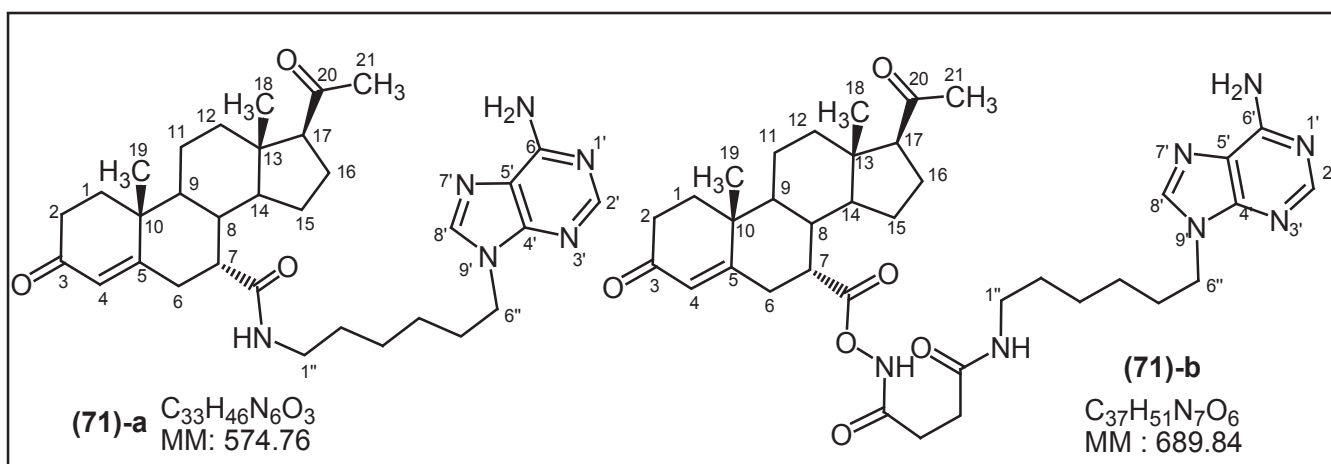
^1H RMN (400MHz, CDCl_3) δ : 8.31 (s, 1H, H-2'), 7.92 (s, 1H, H-8'), 6.60 (t, 1H, $J=5.5$ Hz, CONH), 6.40 (s, 2H, NH_2), 5.69 (s, 1H, H-4), 4.21 (t, 2H, $J=7.0$ Hz, CH_2N), 3.28 (m, 2H, NHCH_2), 2.97 (bs, 1H, H-7), 2.73-1.10 (m, 22H), 2.56 (m, 4H, $\text{CO-CH}_2\text{CH}_2\text{-CO}$), 2.07 (s, 3H, CH_3 -21), 1.18 (s, 3H, CH_3 -19), 0.63 (s, 3H, CH_3 -18).

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ : 209.44 (C-20), 199.20 (C-3), 172.46 (CO), 171.25 (C-5), 167.46 (CO), 155.52 (C-6'), 152.45 (CH-2'), 149.94 (C-4'), 141.17 (CH-8'), 125.99 (CH-4), 119.56 (C-5'), 63.16 (CH-17), 51.87 (CH), 46.32 (CH), 44.26 (C), 43.48 (CH_2), 41.60 (CH), 38.82 (CH_2), 38.33 (C), 38.05 (CH_2), 37.42 (CH), 35.56 (CH_2), 35.14 (CH_2), 34.08 (CH_2), 31.61 (CH_3 -21), 27.42 (CH_2), 26.22 (CH_2), 24.16 (CH_2), 22.95 (CH_2), 21.20 (CH_2), 17.76 (CH_3 -19), 13.15 (CH_3 -18).

SM (ESI) m/z : 684 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, <5%), 662 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%), 382 (15%).

HRMS (ESI): calc pour $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}_6+\text{H}$: 662.3661; trouvée: 662.3675.

- **7 α -[6-(6-Aminopurin-9-yl)hexylcarbamoyl]pregn-4-èn-3,20-dione (71)-a** et **N-(3,20-dioxopregn-4-èn-7-carbonyloxy)-N'-[6-(6-aminopurin-9-yl)hexyl]succinamide (71)-b**



Le DCC (0.058g, 0.28mmol) et le N-hydroxysuccinimide (0.032g, 0.28mmol) sont ajoutés à une solution d'acide **(30)** (0.1g, 0.28mmol) dans du DMF anhydre (4mL). Le mélange est laissé sous agitation pendant la nuit à température ambiante. Le lendemain, le composé **(42)** (0.078g, 0.38mmol) puis la diisopropyléthylamine (0.072mL, 0.41mmol) sont ajoutés. L'agitation est poursuivie pendant trois heures supplémentaires. Le solvant est ensuite évaporé, et le mélange partagé entre dichlorométhane et eau. La phase aqueuse est extraite plusieurs fois au dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont concentrées, et le résidu est purifié par colonne sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 92/8) pour donner deux produits : **(71)-a**, Rf 0.35, (0.058g, 38%) et **(71)-b**, Rf 0.3 (0.047g, 31%).

(71)-a : solide blanc

$^1\text{H RMN}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.32 (s, 1H, H-2'), 7.81 (s, 1H, H-8'), 5.89 (s, 2H, NH_2), 5.72 (t, 1H, $J=6.0$ Hz, NH), 5.68 (s, 1H, H-4), 4.17 (t, 2H, $J=7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-6''}$), 3.16 (q, 2H, $J=6.0$ Hz, NHCH_2), 2.73-0.99 (m, 27H), 2.09 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-21}$), 1.18 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-19}$), 0.62 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-18}$).

$^{13}\text{C RMN}$ (100MHz, CDCl_3) δ : 209.81 (C-20), 199.42 (C-3), 172.97 (CONH), 170.02 (C-5), 155.54 (C-6'), 152.81 (CH-2'), 149.77 (C-4'), 140.48 (CH-8'), 125.15 (CH-4), 119.20 (C-5'), 63.18 (CH-17), 52.15 (CH), 46.02 (CH), 44.77 (CH), 44.42 (C), 43.88 (CH_2), 38.80 (CH_2), 38.23 (C), 38.14 (CH_2), 37.72 (CH), 36.52 (CH_2), 35.39 (CH_2), 33.91

(CH₂), 31.59 (CH₃-21), 30.05 (CH₂), 26.27 (CH₂), 26.16 (CH₂), 24.98 (CH₂), 24.61 (CH₂), 22.81 (CH₂), 21.35 (CH₂), 17.92 (CH₃-19), 13.17 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z : 597 ([M+Na]⁺, <5%), 575 ([M+H]⁺, 100%).

HRMS (ESI): calc. pour C₃₃H₄₇N₆O₃+H: 575.3704; trouvée: 575.3710.

(71)-b: solide blanc

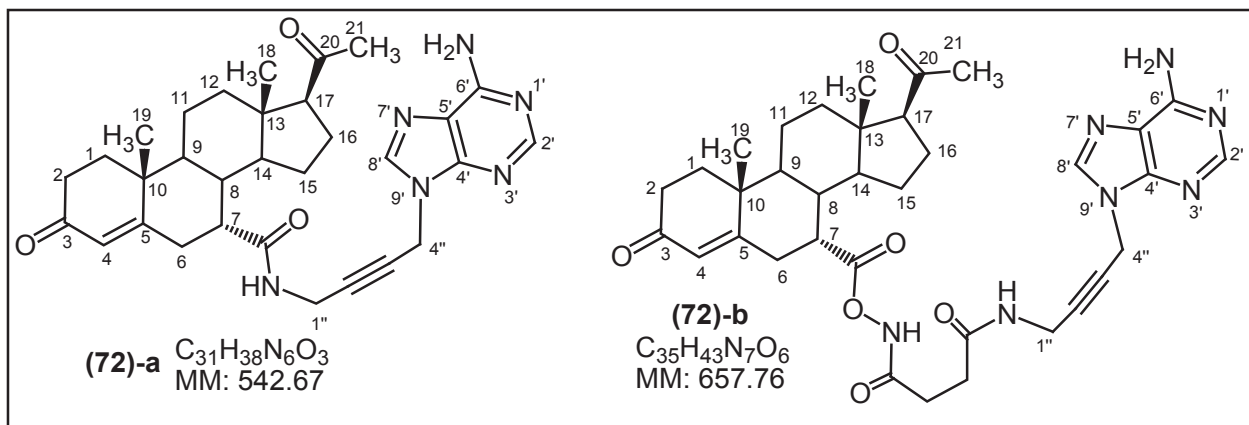
¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ: 8.32 (s, 1H, H-2'), 7.86 (s, 1H, H-8'), 6.13 (m, 3H, NH₂+NHCO), 5.70 (s, 1H, H-4), 4.19 (t, 2H, *J*=6.9 Hz, CH₂N), 3.19 (q, 2H, *J*=6.4 Hz NHCH₂), 2.95 (bs, 1H, H-7), 2.74-1.10 (m, 26H), 2.54 (m, 4H, CO-CH₂CH₂-CO), 2.07 (s, 3H, CH₃-21), 1.19 (s, 3H, CH₃-19), 0.63 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ: 210.09 (C-20), 199.82 (C-3), 172.36 (CO), 170.83 (C-5), 168.12 (CO), 155.46 (C-6'), 152.60 (CH-2'), 149.62 (C-4'), 140.58 (CH-8'), 125.72 (CH-4), 119.05 (C-5'), 63.15 (CH-17), 51.77 (CH), 46.25 (CH), 44.26 (C), 43.94 (CH₂), 41.50 (CH), 39.28 (CH₂), 38.28 (C), 37.99 (CH₂), 37.26 (CH), 35.35 (CH₂), 35.09 (CH₂), 33.84 (CH₂), 31.48 (CH₃-21), 31.10 (CH₂), 28.96 (CH₂), 28.52 (CH₂), 26.13 (CH₂), 26.11 (CH₂), 24.02 (CH₂), 22.84 (CH₂), 21.14 (CH₂), 17.64 (CH₃-19), 13.01 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z : 690 ([M+H]⁺, 100%), 410 (36%).

HRMS (ESI): calc pour C₃₇H₅₂N₇O₆+H: 690.3974; trouvée: 690.3974.

- **7α-[4-(6-Aminopurin-9-yl)but-2-ynylcarbamoyl]pregn-4-èn-3,20-dione (72)-a** et **N-(3,20-dioxopregn-4-èn-7-carbonyloxy)-N'-[4-(6-aminopurin-9-yl)but-2-ynyl]succinamide (72)-b**



Le DCC (0.058g, 0.28mmol) et le N-hydroxysuccinimide (0.032g, 0.28mmol) sont ajoutés à une solution d'acide **(30)** (0.1g, 0.28mmol) dans du DMF anhydre (4mL). Le mélange est laissé sous agitation pendant la nuit à température ambiante. Le lendemain, le composé **(45)** (0.068g, 0.33mmol) puis la diisopropyléthylamine (0.072mL, 0.41mmol) sont ajoutés. L'agitation est poursuivie toute la journée. Le solvant est ensuite évaporé, et le mélange partagé entre dichlorométhane et eau. La phase aqueuse est extraite plusieurs fois au dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont concentrées, et le résidu est purifié par chromatographie sur couche mince de silice (dichlorométhane/méthanol, 93/7) pour donner deux produits : **(72)-a**, Rf 0.35, (0.013g, 9%) et **(72)-b**, Rf 0.3 (0.007g, 5%).

(72)-a : solide blanc

¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ: 8.32 (s, 1H, H-2'), 8.00 (s, 1H, H-8'), 6.24 (t, 1H, J=4.8 Hz, NH), 6.19 (s, 2H, NH₂), 5.68 (s, 1H, H-4), 4.95 (bs, 2H, CH₂-4'), 4.02 (bs, 2H, NHCH₂), 2.79-1.05 (m, 19H), 2.08 (s, 3H, CH₃-21), 1.17 (s, 3H, CH₃-19), 0.60 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ: 209.38 (C-20), 199.01 (C-3), 172.74 (CONH), 168.86 (C-5), 155.56 (C-6'), 153.03 (CH-2'), 149.57 (C-4'), 140.05 (CH-8'), 125.55 (CH-4), 119.47 (C-5'), 82.59 (C≡C), 75.65 (C≡C), 63.16 (CH-17), 52.06 (CH), 46.16 (CH), 44.53 (CH), 44.40 (C), 38.28 (C), 38.15 (CH₂), 37.81 (CH), 36.22 (CH₂), 35.50 (CH₂), 34.03 (CH₂), 33.49 (CH₂), 31.65 (CH₃-21), 29.19 (CH₂), 24.65 (CH₂), 22.88 (CH₂), 21.39 (CH₂), 17.96 (CH₃-19), 13.19 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z : 543 ([M+H]⁺, 100%).

HRMS (ESI): calc. pour C₃₁H₃₈N₆O₃+H: 543.3078; trouvée: 543.3086.

(72)-b: solide blanc

¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ: 8.29 (s, 1H, H-2'), 8.09 (s, 1H, H-8'), 6.93 (bs, 1H, CONH), 6.51 (s, 2H, NH₂), 5.70 (s, 1H, H-4), 4.93 (bs, 2H, CH₂N), 4.04 (bs, 2H, NHCH₂), 2.97 (bs, 1H, H-7), 2.86-1.10 (m, 18H), 2.58 (m, 4H, CO-CH₂CH₂-CO), 2.07 (s, 3H, CH₃-21), 1.18 (s, 3H, CH₃-19), 0.62 (s, 3H, CH₃-18).

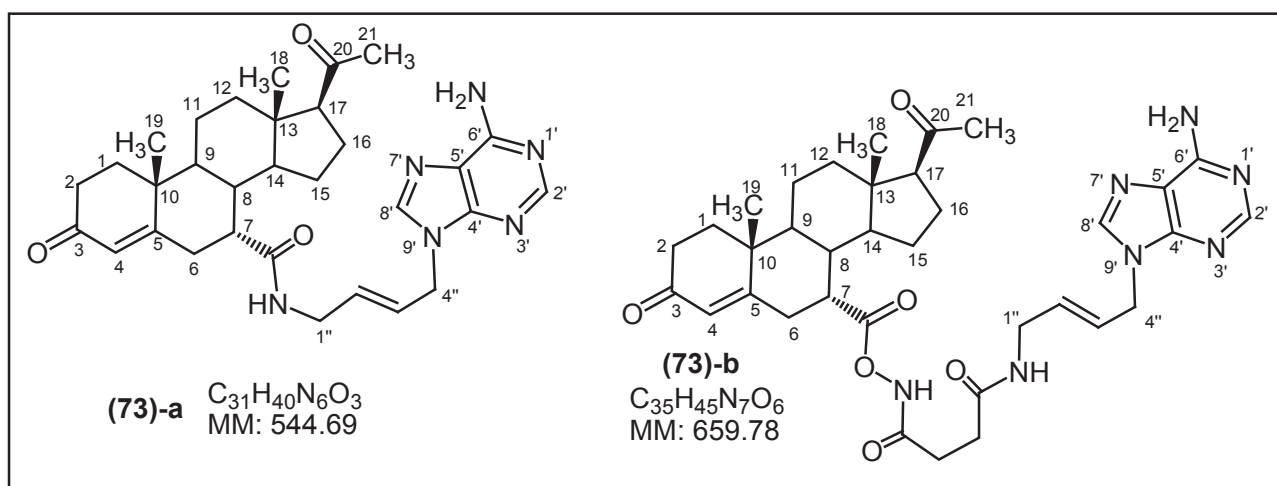
¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ: 209.51 (C-20), 199.38 (C-3), 172.20 (CO), 171.28 (C-5), 170.50 (CO), 155.55 (C-6'), 152.88 (CH-2'), 149.45 (C-4'), 140.44 (CH-8'), 126.00 (CH-4), 119.31 (C-5'), 83.02 (C≡C), 75.46 (C≡C), 63.16 (CH-17), 51.91 (CH), 46.39 (CH),

44.27 (C), 41.64 (CH), 38.34 (C), 38.06 (CH₂), 37.40 (CH), 35.54 (CH₂), 35.16 (CH₂), 34.07 (CH₂), 33.73 (CH₂), 31.61 (CH₃-21), 29.83 (CH₂), 29.64 (CH₂), 24.17 (CH₂), 22.94 (CH₂), 21.22 (CH₂), 17.77 (CH₃-19), 13.15 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z : 680 ([M+Na]⁺, 7%), 658 ([M+H]⁺, 100%).

HRMS (ESI): calc pour C₃₅H₄₃N₇O₆+H: 658.3348; trouvée: 658.3348.

- **(E)-7α-[4-(6-Aminopurin-9-yl)but-2-énylcarbamoyl]pregn-4-èn-3,20-dione (73)-a** et **N-(3,20-dioxopregn-4-èn-7-carbonyloxy)-N'-[(E)-4-(6-aminopurin-9-yl)but-2-ényl]succinamide (73)-b**



Le DCC (0.058g, 0.28mmol) et le N-hydroxysuccinimide (0.032g, 0.28mmol) sont ajoutés à une solution d'acide **(30)** (0.1g, 0.28mmol) dans du DMF anhydre (4mL). Le mélange est laissé sous agitation pendant la nuit à température ambiante. Le lendemain, le composé **(47)** (0.072g, 0.35mmol) puis la diisopropyléthylamine (0.072mL, 0.41mmol) sont ajoutés. L'agitation est poursuivie pendant quatre heures supplémentaires. Le solvant est ensuite évaporé, et le mélange partagé entre dichlorométhane et eau. La phase aqueuse est extraite plusieurs fois au dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont concentrées, et le résidu est purifié par chromatographie sur couche mince de silice (dichlorométhane/méthanol, 90/10) pour donner deux produits : **(73)-a**, R_f 0.35, (0.033g, 22%) et **(73)-b**, R_f 0.3 (0.031g, 21%).

(73)-a : solide blanc

¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ: 8.32 (s, 1H, H-2'), 7.81 (s, 1H, H-8'), 5.84 (t, 1H, J=5.6 Hz, NH), 6.01 (s, 2H, NH₂), 5.80 (dt, 1H, J₁=15.3Hz, J₂=5.7Hz, CH=), 5.62 (s, 1H, H-4), 5.58 (dt, 1H, J₁=15.3Hz, J₂=5.5Hz, CH=), 4.78 (d, 2H, J=5.7Hz, CH₂-4''), 3.92-3.75 (m, 2H, NHCH₂), 2.74-2.60 (m, 1H), 2.64-1.10 (m, 19H), 2.08 (s, 3H, CH₃-21), 1.17 (s, 3H, CH₃-19), 0.61 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ: 209.30 (C-20), 198.90 (C-3), 172.79 (CONH), 168.91 (C-5), 155.55 (C-6'), 152.96 (CH-2'), 149.95 (C-4'), 140.50 (CH-8'), 130.86 (HC=), 125.93 (HC=), 125.51 (CH-4), 119.63 (C-5'), 63.14 (CH-17), 52.12 (CH), 46.05 (CH), 44.87 (CH), 44.83 (CH₂), 44.38 (C), 40.37 (CH₂), 38.26 (C), 38.15 (CH₂), 37.80 (CH), 36.47 (CH₂), 35.49 (CH₂), 34.03 (CH₂), 31.65 (CH₃-21), 24.74 (CH₂), 22.81 (CH₂), 21.38 (CH₂), 17.99 (CH₃-19), 13.22 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z : 567 ([M+Na]⁺, 14%), 545 ([M+H]⁺, 100%).

HRMS (ESI): calc pour C₃₁H₄₀N₆O₃+H: 545.3235; trouvée: 545.3239.

(73)-b: solide blanc

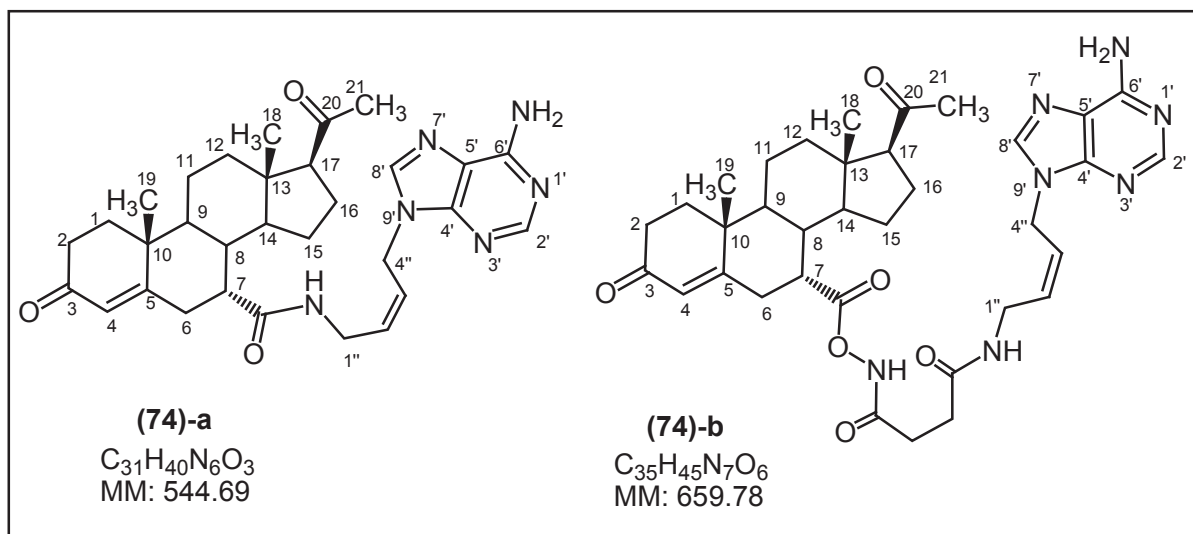
¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ: 11.19 (bs, 1H, NHOCO), 8.28 (s, 1H, H-2'), 7.87 (s, 1H, H-8'), 6.77 (bs, 1H, CONH), 6.47 (s, 2H, NH₂), 5.82 (dt, 1H, J₁=15.3Hz, J₂=5.8Hz, HC=), 5.68 (s, 1H, H-4), 5.62 (dt, 1H, J₁=15.3Hz, J₂=5.1Hz, HC=), 4.75 (d, 2H, J=5.1Hz, CH₂-4''), 3.83 (bs, 2H, NHCH₂), 2.94 (bs, 1H, H-7), 2.78-1.00 (m, 18H), 2.55 (m, 4H, CO-CH₂CH₂-CO), 2.06 (s, 3H, CH₃-21), 1.17 (s, 3H, CH₃-19), 0.61 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ: 209.64 (C-20), 199.44 (C-3), 172.38 (C), 171.35 (C), 170.58 (C), 167.65 (C), 155.68 (C-6'), 152.89 (CH-2'), 149.86 (C-4'), 140.89 (CH-8'), 131.35 (CH=), 126.05 (CH=), 125.55 (CH-4), 119.45 (C-5'), 63.25 (CH-17), 51.97 (CH), 46.47 (CH), 45.06 (CH₂), 44.35 (C), 41.70 (CH), 40.92 (CH₂), 38.42 (C), 38.15 (CH₂), 37.47 (CH), 35.63 (CH₂), 35.24 (CH₂), 34.15 (CH₂), 31.70 (CH₃-21), 24.23 (CH₂), 23.01 (CH₂), 21.30 (CH₂), 17.84 (CH₃-19), 13.24 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z: 660 ([M+H]⁺, 100%)

HRMS (ESI): calc pour C₃₅H₄₅N₇O₆+H: 660.3504; trouvée: 660.3513.

- **(Z)-7 α -[4-(6-Aminopurin-9-yl)but-2-ènylcarbamoyl]pregn-4-èn-3,20-dione (74)-a et N-(3,20-dioxopregn-4-èn-7-carbonyloxy)-N'-[(Z)-4-(6-aminopurin-9-yl)but-2-ènyl]succinamide (74)-b**



Le DCC (0.058g, 0.28mmol) et le N-hydroxysuccinimide (0.032g, 0.28mmol) sont ajoutés à une solution d'acide **(30)** (0.1g, 0.28mmol) dans du DMF anhydre (4mL). Le mélange est laissé sous agitation pendant la nuit à température ambiante. Le lendemain, le composé **(46)** (0.068g, 0.33mmol) puis la diisopropyléthylamine (0.072mL, 0.41mmol) sont ajoutés. L'agitation est poursuivie pendant quatre heures supplémentaires. Le solvant est ensuite évaporé, et le mélange partagé entre dichlorométhane et eau. La phase aqueuse est extraite plusieurs fois au dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont concentrées, et le résidu est purifié par chromatographie sur couche mince de silice (dichlorométhane/méthanol, 90/10) pour donner deux produits : **(74)-a**, Rf 0.35, (0.041g, 28%) et **(74)-b**, Rf 0.3 (0.040g, 26%).

(74)-a : solide blanc

$^1\text{H RMN}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.29 (s, 1H, H-2'), 7.87 (s, 1H, H-8'), 7.41 (t, 1H, $J=5.2$ Hz, NH), 5.94 (s, 2H, NH_2), 5.79 (dd, 1H, $J_1=10.4\text{Hz}$, $J_2=7.8\text{Hz}$, CH=), 5.66 (m, 1H, CH=), 5.67 (s, 1H, H-4), 4.89 (d, 2H, $J=7.3\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-}4''$), 4.15-3.95 (m, 2H, NHCH_2), 2.68 (m, 1H), 2.61-1.13 (m, 18H), 2.09 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-}21$), 1.19 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-}19$), 0.63 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-}18$).

$^{13}\text{C RMN}$ (100MHz, CDCl_3) δ : 209.33 (C-20), 198.95 (C-3), 172.92 (CONH), 169.09 (C-5), 155.65 (C-6'), 152.39 (CH-2'), 149.76 (C-4'), 140.86 (CH-8'), 130.31 (HC=), 126.63 (HC=), 125.42 (CH-4), 120.11 (C-5'), 63.21 (CH-17), 52.20 (CH), 46.11 (CH),

44.90 (CH), 44.46 (C), 41.07 (CH₂), 38.23 (CH₂), 37.85 (CH), 36.48 (CH₂), 35.51 (CH₂), 35.03 (CH₂), 34.06 (CH₂), 31.67 (CH₃-21), 24.60 (CH₂), 22.89 (CH₂), 21.46 (CH₂), 18.02 (CH₃-19), 13.25 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z: 567 ([M+Na]⁺, 12%), 545 ([M+H]⁺, 100%).

HRMS (ESI): calc pour C₃₁H₄₀N₆O₃+H: 545.3235; trouvée: 545.3225.

(74)-b: solide blanc

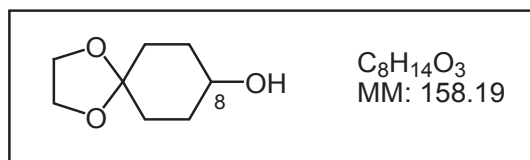
¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ: 11.00 (bs, 1H, NHOCO), 8.32 (s, 1H, H-2'), 7.96 (s, 1H, H-8'), 7.59 (bs, 1H, CONH), 6.34 (s, 2H, NH₂), 5.82-5.60 (m, 2H, HC=CH), 5.71 (s, 1H, H-4), 4.90 (d, 2H, *J*=7.3Hz, CH₂-4''), 4.05 (t, 2H, *J*=6.3Hz, NHCH₂), 2.98 (bs, 1H, H-7), 2.70-1.10 (m, 18H), 2.62 (m, 4H, CO-CH₂CH₂-CO), 2.06 (s, 3H, CH₃-21), 1.18 (s, 3H, CH₃-19), 0.62 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ: 209.62 (C-20), 199.35 (C-3), 172.36 (C), 171.33 (C), 170.77 (C), 167.58 (C), 155.69 (C-6'), 152.59 (CH-2'), 149.80 (C-4'), 141.18 (CH-8'), 130.49 (CH=), 126.60 (CH=), 126.10 (CH-4), 119.79 (C-5'), 63.26 (CH-17), 51.92 (CH), 48.58 (CH), 46.35 (CH), 44.36 (C), 41.72 (CH), 41.02 (CH₂), 38.43 (C), 38.12 (CH₂), 37.55 (CH), 36.22 (CH₂), 35.16 (CH₂), 35.24 (CH₂), 34.17 (CH₂), 31.71 (CH₃-21), 24.29 (CH₂), 23.07 (CH₂), 21.29 (CH₂), 17.85 (CH₃-19), 13.25 (CH₃-18).

SM (ESI) m/z: 660 ([M+H]⁺, 100%).

HRMS (ESI): calc pour C₃₅H₄₅N₇O₆+H: 660.3504; trouvée: 660.3510.

• **1,4-Dioxa-spiro[4.5]décan-8-ol (75)²³²**

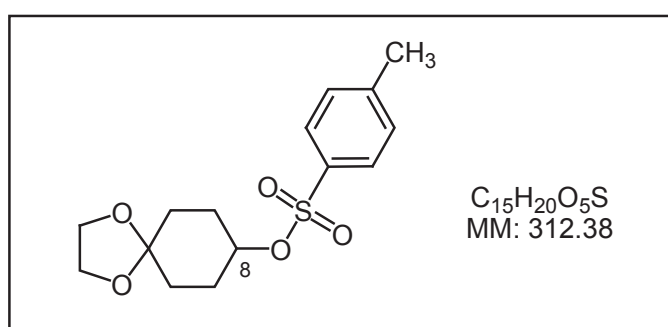


NaBH₄ (0.49g, 12.8mmol) est ajouté lentement (dégagement gazeux) à une solution de 1,4-dioxa-spiro[4.5]décan-8-one (1.0g, 6.41mmol) dans du méthanol (10mL). Après 2.5 heures, le mélange est concentré sous vide, et 20mL d'une solution aqueuse de NaOH (0.1M) sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite plusieurs fois avec un mélange

chloroforme/2-propanol (4/1). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO_4 , filtrées puis concentrées sous vide pour donner le composé **(75)** sous la forme d'une huile incolore (1.0g, quant.).

^1H RMN (300MHz, CDCl_3) δ : 3.92 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.78 (m, 1H, CH-OH), 1.89-1.76 (m, 4H), 1.69-1.51 (m, 5H).

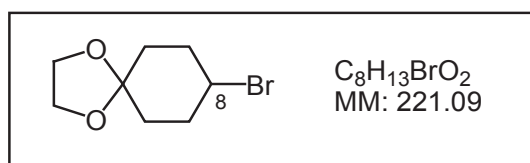
• **8-Tosyloxy-1,4-dioxa-spiro[4.5]décane (77)** ²³³



Le composé **(75)** (0.6g, 3.79mmol) et *p*-TsCl (0.86g, 4.55mmol) sont solubilisés dans de la pyridine (4mL). Le mélange est laissé sous agitation pendant la nuit. Le lendemain, une solution aqueuse saturée de NaCl (5mL) est ajoutée, puis le mélange est extrait avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont lavées successivement avec une solution aqueuse de HCl (3M), une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 , puis une solution aqueuse saturée de NaCl. Après séchage sur MgSO_4 et filtration, elles sont concentrées sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle, 3/1 puis 2/1) pour donner le composé **(77)** sous la forme d'un solide blanc (1.05, 90%).

^1H RMN (300MHz, DMSO) δ : 7.48 (d, 2H, $J=8.1$ Hz, CH-ortho), 7.14 (d, 2H, $J=8.1$ Hz, CH-méta), 4.69 (m, 1H, CH-OTs), 4.20 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.00–1.92 (m, 2H), 1.80-1.69 (m, 3H), 1.42–1.08 (m, 3H).

• **8-Bromo-1,4-dioxa-spiro[4.5]décane (76)** ²²¹

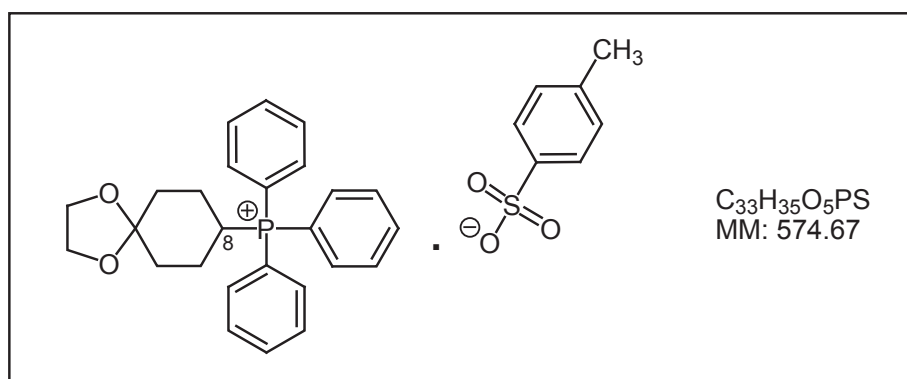


Méthode 1 : Une solution du composé **(75)** (0.2g, 1.26mmol), de CBr_4 (0.42g, 1.26mmol) et de triphénylphosphine (0.33g, 1.26mmol) dans du dichlorométhane anhydre (5mL) est agitée à 0°C pendant la nuit. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu repris dans de l'éther éthylique puis filtré, et le filtrat est concentré sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle, 9/1) pour obtenir le composé **(76)** sous la forme d'une huile incolore (0.08g, 27%).

Méthode 2 : Un mélange du produit **(77)** (0.5g, 1.6mmol) et de bromure de lithium (0.66g, 7.6mmol) dans du THF anhydre (15mL) est chauffé sous micro-ondes à 150°C pendant 3 minutes. Le solvant est ensuite évaporé, et le résidu repris dans du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse de $NaHCO_3$ (1M), puis elle est concentrée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, 9/1) pour donner le produit **(76)** sous la forme d'une huile incolore (0.25g, 70%).

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ : 4.34-4.28 (m, 1H, CH-Br), 3.98-3.88 (m, 4H, OCH_2CH_2O), 2.20-2.01 (m, 4H), 1.95-1.86 (m, 2H), 1.64-1.56 (m, 2H).

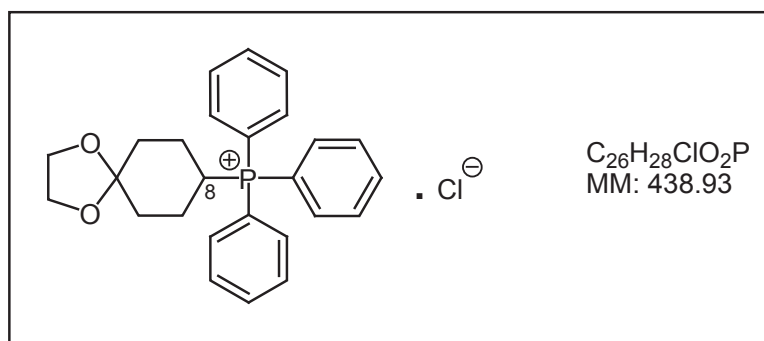
• **Para-toluènesulfonate de (1,4-dioxa-spiro[4.5]déc-8-yl)triphénylphosphonium (79)**



Un mélange du composé **(77)** (3.7g, 11.8mmol) et de triphénylphosphine (3.12g, 11.8mmol) dans du xylène (8mL) est chauffé au reflux pendant 3 jours. Ensuite, le mélange est refroidi jusqu'à 100°C. Le précipité apparu est filtré, puis purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 94/6) pour donner le produit **(79)** sous la forme d'un solide blanc (2.7g, 40%).

^1H RMN (300MHz, DMSO) δ : 7.93-7.76 (m, 15H, 3xphényl), 7.47 (d, 2H, $J=8.1$ Hz, CH-ortho tosyl), 7.10 (d, 2H, $J=8.1$ Hz, CH-méta tosyl), 4.24 (m, 1H, CH-PPh_3), 4.03-3.84 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.28 (s, 3H, CH_3), 2.01–1.97 (m, 2H), 1.80-1.69 (m, 3H), 1.43–1.10 (m, 3H).

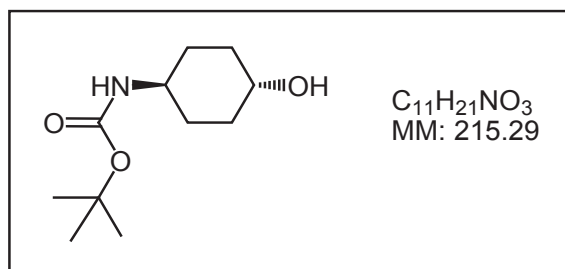
• Chlorure de (1,4-Dioxa-spiro[4.5]déc-8-yl)triphénylphosphonium (80)



Une résine Dowex 1X8 est lavée plusieurs fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl, puis avec du méthanol. Le composé **(79)** (2.7g, 4.7mmol) est dissous dans le minimum de méthanol, puis passé sur cette résine. Le solvant est évaporé, le résidu repris dans l'acétone puis filtré. Le filtrat est concentré pour donner le produit **(80)** sous la forme d'un solide jaune (1.97g, quant.)

^1H RMN (300MHz, CD_3OD) δ : 7.92-7.76 (m, 15H, 3xphényl), 4.12–3.89 (m, 5H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O} + \text{CH-PPh}_3$), 2.20–1.70 (m, 5H), 1.50-1.10 (m, 3H).

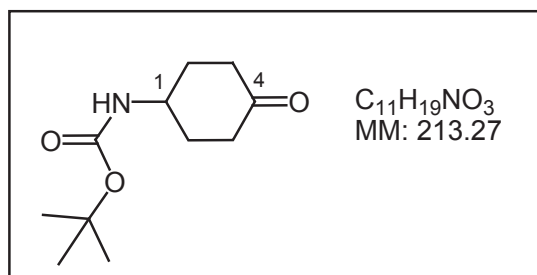
• **(*Trans*-4-hydroxycyclohexyl)carbamate de *tert*-butyle (81)**



Le dicarbonate de di-*tert*-butyle (1.9g, 8.7mmol) puis la triéthylamine (1.22mL, 8.7mmol) sont ajoutés à une solution de *trans*-4-aminocyclohexanol (1.0g, 8.7mmol) dans le THF anhydre (50mL) maintenue à 0°C. Après 3 heures d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé et le résidu repris dans du dichlorométhane. La phase aqueuse est lavée à l'eau, puis concentrée pour donner le produit **(81)** sous la forme d'un solide blanc (1.84g, 97%).

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ : 4.34 (bs, 1H, NH), 3.61 (m, 1H, CH), 3.49 (bs, 1H, CH), 2.05-1.97 (m, 4H), 1.55-1.25 (m, 3H), 1.46 (s, 9H, tBu), 1.25-1.1 (m, 2H).

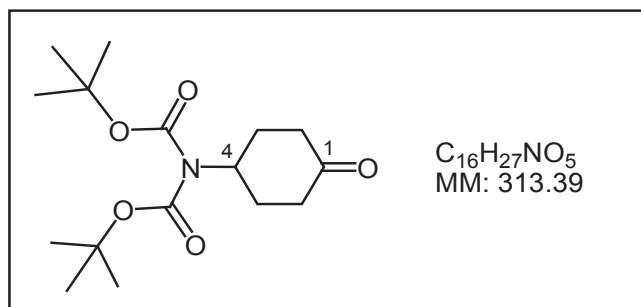
• **(4-Oxocyclohexyl)carbamate de *tert*-butyle (82) ²³⁴**



Le chlorochromate de pyridinium (0.45g, 2.1mmol) est ajouté, à température ambiante, à une solution du composé **(81)** (0.3g, 1.4mmol) dans du dichlorométhane anhydre (30mL). La réaction est agitée pendant la nuit. Le lendemain, le milieu est repris dans de l'éther éthylique, puis filtré sur célite qui est rincée plusieurs fois à l'éther éthylique. Les filtrats réunis sont concentrés sous vide, et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 99.5/0.5) pour donner le produit **(82)** sous la forme d'un solide blanc (0.3g, quant.).

^1H RMN (300MHz, CDCl_3) δ : 4.49 (bs, 1H, NH), 3.92 (bs, 1H, CH-N), 2.47-2.35 (m, 4H), 2.30-2.17 (m, 2H), 1.75-1.55 (m, 2H), 1.45 (s, 9H, *t*Bu).

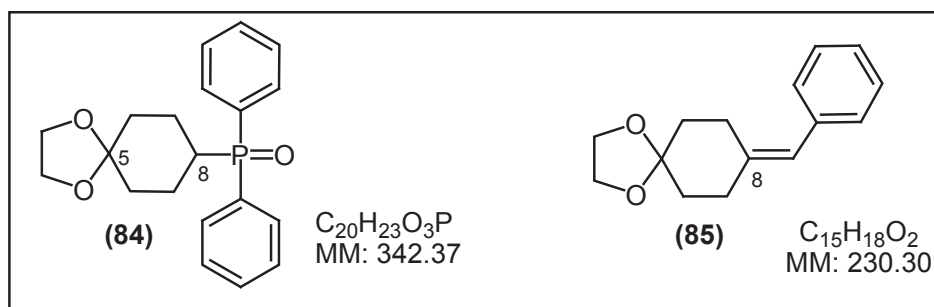
• 4-(*N,N*-Bis-*tert*-butoxycarbonylamino)cyclohexanone (**83**)²³⁵



Une solution du composé (**82**) (1.4g, 6.5mmol), de dicarbonate de di-*tert*-butyle (4.3g, 19.5mmol) et de 4-diméthylaminopyridine (2.4g, 19.5mmol) dans du THF anhydre (10mL) est chauffée au reflux pendant 2 heures. Ensuite, le solvant est évaporé, et le résidu repris dans de l'eau. La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH=4-5, puis elle est extraite avec de l'éther éthylique. Après séchage (Na_2SO_4) et filtration, la phase organique est concentrée sous vide, puis le résidu purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle, 9/1) pour donner le produit (**83**) sous la forme d'un solide blanc (1.3g, 63%).

^1H RMN (300MHz, CDCl_3) δ : 4.48 (m, 1H, CH-N), 2.42-2.24 (m, 6H), 2.10-1.95 (m, 2H), 1.48 (s, 18H, 2xtBu).

- Oxyde de (1,4-dioxaspiro[4.5]déc-8-yl)diphénylphosphine (**84**)
- 8-Benzylidène-1,4-dioxaspiro[4.5]décane (**85**)



n-BuLi (2.5M dans hexane, 60μL, 0.15mmol) est ajouté goutte à goutte à une suspension, maintenue à 0°C, du composé **(80)** (0.065g, 0.15mmol) dans du THF anhydre (2mL). Le benzaldéhyde (14μL, 0.15mmol) est ensuite ajouté, et le mélange est agité à température ambiante. Après 2 heures, CH₃OH est ajouté et les solvants sont évaporés. Le résidu est repris dans du dichlorométhane, puis la phase organique est lavée avec de l'eau, séchée (Na₂SO₄), filtrée puis concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/ acétate d'éthyle, 95/5 puis 70/30) pour donner le produit de couplage **(85)**, isolé à l'état de traces, et l'oxyde de phosphine **(84)** (0.041g, 80%).

(84): solide blanc

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 7.80-7.60 (m, 4H, CH ortho), 7.48-7.40 (m, 6H, CH meta+para), 3.87-3.79 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 2.62 (bs, 1H, CH-P), 1.80-1.35 (m, 8H).

¹³C RMN (75MHz, CDCl₃) δ: 132.28 (d, *J*_{C,P}= 96Hz, Cipso phenyl), 132.06 (d, *J*_{C,P}= 95Hz, Cipso phenyl), 131.98 (d, *J*_{C,P}= 2.7Hz, CHpara phenyl), 131.95 (d, *J*_{C,P}= 2.2Hz, CHpara phenyl), 131.42 (d, *J*_{C,P}= 8.8 Hz, 2×CHméta phenyl), 129.04 (d, *J*_{C,P}= 11Hz, CHortho phenyl), 128.98 (d, *J*_{C,P}= 11Hz, CHortho phenyl), 108.90 (d, *J*_{C,P}= 14.8Hz, C5), 64.40 (CH₂O), 64.29 (CH₂O), 35.40 (d, *J*_{C,P}= 73Hz, CH-8), 34.91 (s, CH₂), 33.64 (d, *J*_{C,P}= 2.7Hz, CH₂), 24.12 (CH₂), 23.91 (d, *J*_{C,P}= 3.3Hz, CH₂).

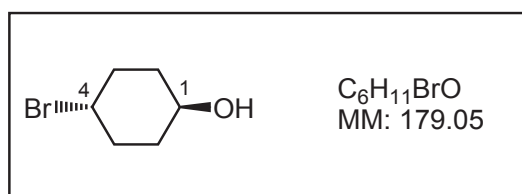
³¹P RMN (121.5MHz, CDCl₃) δ: 34.77.

SM (CI) *m/z* : 343 (MH⁺, 100%).

(85):

¹H RMN (CDCl₃) δ: 7.3-7.1 (m, 5H, H arom.), 6.4 (s, 1H, CH-phényl), 3.90 (d, 4H, *J*=2.8Hz, OCH₂CH₂O), 2.56 (s, 2H), 2.30-2.20 (m, 2H), 1.85-1.65 (m, 4H).

• **Trans-4-bromocyclohexanol (86)** ²³⁶

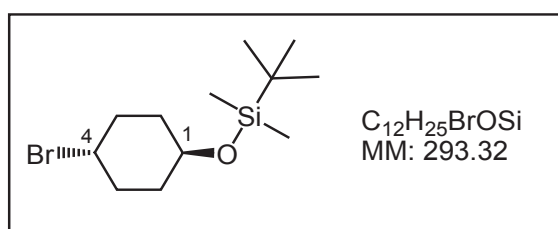


Un mélange de 7-oxabicyclo[2.2.1]heptane (3.0 g, 30.6mmol) et d'une solution aqueuse d'acide bromhydrique (48%, 3.6mL) est chauffé à 50°C pendant 6 jours. Ensuite, le mélange est extrait à l'éther éthylique, puis la phase organique lavée successivement avec une solution saturée de Na₂CO₃, puis avec de l'eau. La phase éthérée est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis concentrée sous vide pour donner le produit **(86)** sous la forme d'un solide blanc (3.9 g, 71%).

Pf : 81-82°C (litt.81-82°C)

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 4.14 (m, 1H, CH-1), 3.77 (m, 1H, CH-4), 2.31-2.24 (m, 2H), 2.07-1.95 (m, 2H), 1.90-1.75 (m, 2H), 1.50-1.22 (m, 3H).

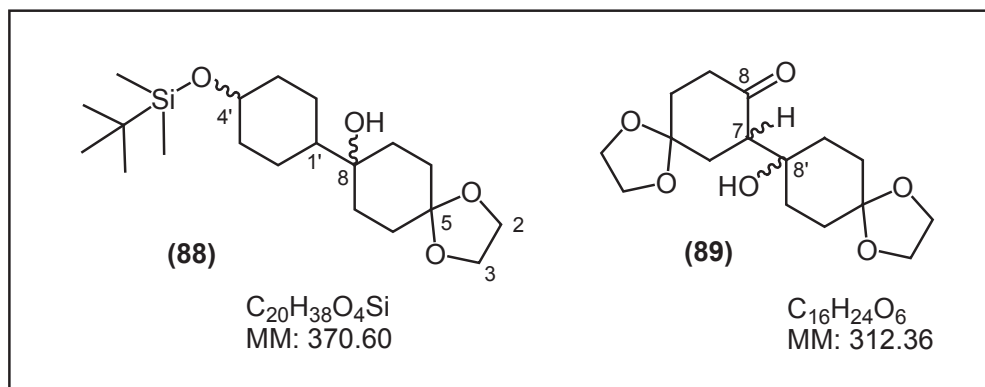
• **Trans-4-bromo-1-tert-butyldiméthylsilyloxycyclohexane (87)²³⁷**



Le composé **(86)** (1.122 g, 6.2mmol), le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (1.325 g, 8.8mmol), et l'imidazole (1.193g, 17.5mmol) sont solubilisés dans du DMF anhydre (2mL). Le mélange est agité à température ambiante pendant la nuit. Le lendemain, de l'eau (10mL) est ajoutée et la phase aqueuse est extraite avec du cyclohexane. La phase organique est séchée (Na₂SO₄), filtrée et concentrée. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, 99/1) pour donner le produit **(87)** sous la forme d'une huile incolore (1.46g, 80%).

¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 4.24 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 2.29-2.21 (m, 2H), 1.94-1.75 (m, 4H), 1.48-1.35 (m, 2H), 0.87 (s, 9H, tBu), 0.04 (s, 6H, 2xCH₃).

- 8-[4-(*tert*-Butyldiméthylsilyloxy)cyclohexyl]-1,4-dioxaspiro[4.5]décan-8-ol (**88**)
- 7-(8-Hydroxy-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-one (**89**)



Une solution du composé (**87**) (0.73g, 2.5mmol) dans du THF anhydre (3mL) est additionnée goutte à goutte sur des tournures de magnésium (0.06g, 2.5mmol) maintenues sous atmosphère d'argon. La réaction est initiée en ajoutant une goutte de 1,2-dibromoéthane, le milieu est ensuite chauffé entre 60°C et 70°C. Après consommation du magnésium, le milieu est refroidi à 0°C et une solution de 1,4-dioxa-spiro[4.5]décan-8-one (0.096g, 0.62mmol) dans du THF anhydre (2mL) est ajoutée goutte à goutte. La réaction est maintenue 1 heure à 0°C puis laissée monter à température ambiante pendant 3 heures. Ensuite, une solution aqueuse saturée de NH_4Cl est ajoutée (5mL) puis le milieu est extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée successivement avec une solution aqueuse saturée de $NaHCO_3$ puis avec de l'eau. Elle est ensuite séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 99/1) suivie d'une deuxième colonne (cyclohexane/acétate d'éthyle, 2/1) pour isoler le produit de l'addition de Grignard (**88**) (solide blanc, 0.075g, 32%) et le produit d'aldolisation (**89**) (solide blanc, 0.060g, 62%).

(88):

1H RMN (400MHz, $CDCl_3$) (mélange de deux isomères) δ : 3.96-3.89 (m, 4H, OCH_2CH_2O), 3.54-3.41 (m, 1H, CH-4'), 1.95-1.48 (m, 11H), 1.40-1.05 (m, 6H), 0.87 (s, 9H, tBu), 0.04 (s, 6H, $2 \times CH_3$).

^{13}C RMN (100MHz, $CDCl_3$) (isomère majoritaire) δ : 108.92 (C5), 72.12 (C8), 71.85 (CH-4'), 64.40 ($O-CH_2-CH_2-O$), 64.29 ($O-CH_2-CH_2-O$), 47.31 (CH-1'), 36.09 (CH_2), 32.22 (CH_2), 30.44 (CH_2), 26.07 ($C(CH_3)_3$), 25.20 (CH_2), 18.39 ($C(CH_3)_3$), -4.44 ($2 \times CH_3$).

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) (isomère minoritaire) δ : 71.58 ($\text{CH-4}'$), 63.84 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 47.43 ($\text{CH-1}'$), 37.00 (CH_2), 35.96 (CH_2), 34.45 (CH_2), 25.39 (CH_2). (Il y a recouvrement de certains pics de l'isomère minoritaire avec ceux de l'isomère majoritaire)

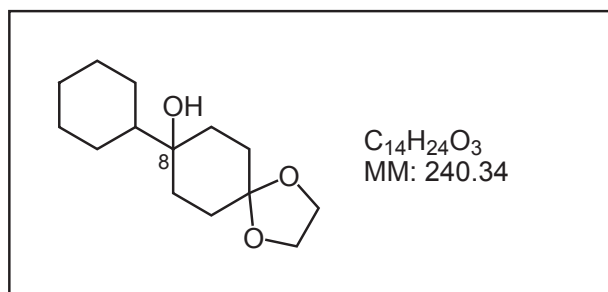
SM (ESI) m/z : 393 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100%), 353 ($[\text{M}-\text{OH}]^+$, 43%), 221 ($[\text{M}-\text{OTBS}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 72%).

HRMS (ESI): calc. pour $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{Si}+\text{Na}^+$: 393.2432 ; trouvée : 393.2446.

(89) :

^1H RMN (300MHz, CDCl_3) (mélange de deux isomères) δ : 4.05-3.95 (m, 8H, $2\times\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.95-3.85 (m, 8H, $2\times\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.80-2.55 (m, 4H), 2.36 (t, 1H, $J=4.1\text{Hz}$, CH-7), 2.31 (t, 1H, $J=4.1\text{Hz}$, CH-7), 2.15-1.40 (m, 26H).

• **8-Cyclohexyl-1,4-dioxaspiro[4.5]décan-8-ol (91)**

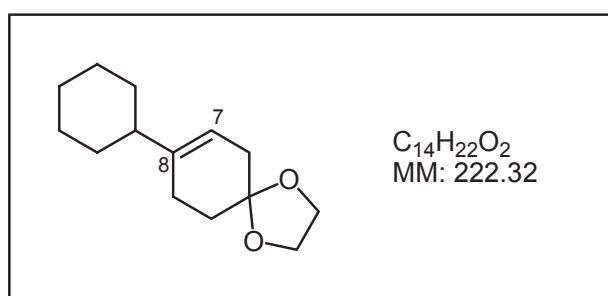


Une solution de bromure de cyclohexyle (1.96mL, 16mmol) dans du THF anhydre (10mL) est additionnée goutte à goutte sur des tournures de magnésium (0.39g, 16mmol) maintenues sous atmosphère d'argon. La réaction est initiée en ajoutant une goutte de 1,2-dibromoéthane, le milieu est ensuite chauffé entre 40°C et 45°C. Après consommation du magnésium, le milieu est refroidi à température ambiante, et une solution de 1,4-dioxaspiro[4.5]décan-8-one (0.5g, 3.2mmol) dans du THF anhydre (3mL) est ajoutée goutte à goutte. La réaction est agitée pendant 3 heures à température ambiante. Ensuite, une solution aqueuse saturée de NH_4Cl est ajoutée (10mL) puis le milieu est extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée successivement avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 , puis avec de l'eau. Elle est ensuite séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et concentrée. Le

résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, 3/1) suivie d'une deuxième colonne (dichlorométhane / méthanol, 99/1) pour isoler le produit **(91)** (0.32g, 41%) sous la forme.

^1H RMN (300MHz, CDCl_3) δ : 3.95-3.85 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.00-1.52 (m, 13H), 1.35-0.95 (m, 7H).

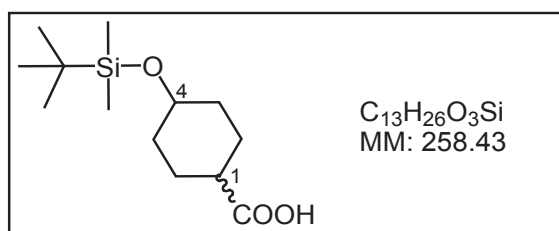
• **8-Cyclohexyl-1,4-dioxa-spiro[4.5]déc-7-ene (93)**



Le chlorure de thionyle (9 μL , 0.62mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution du composé **(91)** (0.03g, 0.12mmol) dans la pyridine anhydre (0.4mL) maintenue sous atmosphère d'argon et refroidie dans un bain de glace. Après une heure, le milieu est repris dans l'eau, et la phase aqueuse est extraite avec de l'éther éthylique. La phase organique est séchée (Na_2SO_4), filtrée et concentrée, puis le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 97.5/2.5) pour séparer deux fractions, la première contenant le produit **(93)** pur (0.015g, 50%), la deuxième consistant en un mélange de **(93)** et probablement de **(92)** présent sous forme de traces.

(93) : ^1H RMN (300MHz, CDCl_3) δ : 5.27 (m, 1H, CH éthylénique), 3.98-3.89 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.35-2.27 (m, 2H), 2.25-2.15 (m, 2H), 1.85-1.50 (m, 9H), 1.35-1.05 (m, 4H).

• **Acide 4-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)cyclohexanecarboxylique (*cis* et *trans*) (95)** ²³⁸



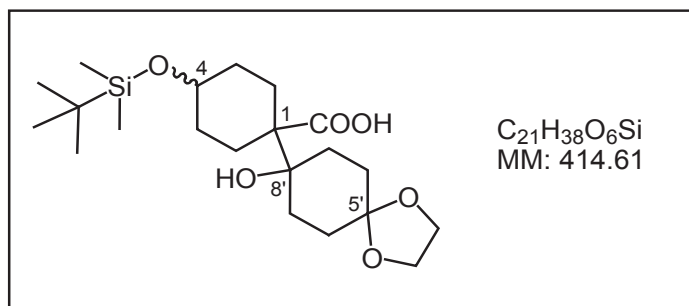
Le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (2.63g, 17.4mmol) est ajouté à une solution de (4-hydroxycyclohexyl)carboxylate d'éthyle (*cis* et *trans*) (2.5g, 14.5mmol) et d'imidazole (1.97g, 29mmol) dans du DMF anhydre (20mL). Le mélange est agité pendant la nuit à température ambiante. Le lendemain, l'éther éthylique (60mL) est ajouté, suivi par 60mL d'une solution aqueuse de HCl (1M, 60mL). La phase aqueuse est ensuite extraite à l'éther éthylique plusieurs fois. Les phases organiques réunies sont lavées successivement avec une solution aqueuse de HCl (1M), puis par de la saumure. Elles sont ensuite séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis concentrées sous vide pour donner le produit **(94)** sous la forme d'une huile incolore (4.26g, quant.). Ce produit est engagé dans la réaction suivante sans purification.

L'ester **(94)** (4.26g, 14.5mmol) est solubilisé dans un mélange de THF (20mL) et de méthanol (12mL). Ensuite, l'hydroxyde de lithium (0.7g, 29mmol) est ajouté et le mélange est chauffé à 60°C pendant 3 heures. Les solvants sont ensuite évaporés et le résidu repris dans de l'eau. La phase aqueuse est lavée à l'éther éthylique, refroidie dans un bain de glace puis acidifiée avec une solution aqueuse de HCl (1M) jusqu'à pH=1. Le mélange est ensuite extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont séchées (Na₂SO₄), filtrées et concentrées et le résidu purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, 1/1) pour donner le produit **(95)** sous la forme d'une huile incolore (3.48g, quant.).

¹H RMN (400MHz, CDCl₃) (mélange de deux isomères) δ: 10.84 (m, 2H, 2xCOOH), 3.89 (bs, 1H, CH-4), 3.56 (m, 1H, CH-4), 2.41-2.18 (m, 2H, 2xCH-1), 2.10-1.83 (m, 6H), 1.74-1.59 (m, 4H), 1.58-1.23 (m, 6H), 0.88 (s, 9H, tBu), 0.87 (s, 9H, tBu), 0.05 (s, 6H, 2xMe), 0.03 (s, 6H, 2xMe).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) (mélange de deux isomères) δ: 181.81 (2xCOOH), 70.48 et 66.70 (2xCH-4), 42.05 et 41.87 (2xCH-1), 34.77, 32.86, 27.08 et 23.39 (8xCH₂), 26.01 et 25.96 (2xC(CH₃)₃), 18.32 et 18.23 (2xC(CH₃)₃), -4.50 et -4.69 (4xMe).

- **Acide 4-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-1-(8-hydroxy-1,4-dioxaspiro[4.5]déc-8-yl) cyclohexanecarboxylique (96)**



*n*BuLi (1.8M dans hexane, 6.45mL, 11.6mmol) est ajouté à une solution de diisopropylamine (1.63mL, 11.6mmol) dans du THF anhydre (20mL) à -40°C. Le mélange est agité à -40°C pendant 15 minutes, ensuite la température est remontée à 0°C pendant 15 minutes, puis le milieu est de nouveau refroidi à -40°C. Une solution du composé **(95)** (1.5g, 5.8mmol) dans le THF anhydre (5mL) est ajoutée à la solution précédente de LDA maintenue à -40°C. Le mélange est agité pendant 15 minutes à cette température, puis il est chauffé à 50°C pendant 2 heures, puis refroidi de nouveau à -40°C. Une solution de 1,4-dioxaspiro[4.5]déc-8-one (0.907g, 5.8mmol) dans le THF anhydre (3mL) est ensuite ajoutée au dianion lithié précédemment obtenu. Le mélange est laissé à -40°C pendant 15 minutes, puis il est chauffé à 50°C pendant 1h30. Le milieu est ensuite refroidi dans un bain de glace, et un volume équivalent d'eau est ajouté. Après évaporation des solvants organiques, la phase aqueuse est acidifiée avec une solution aqueuse de HCl (1N) jusqu'à pH=1, puis elle est extraite avec du dichlorométhane. Les extraits organiques sont séchés (Na₂SO₄), filtrés et concentrés, puis le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 93/7) pour donner le produit **(96)** sous forme d'un solide blanc (1.27g, 53%), mélange de deux isomères. Un échantillon pur de chaque isomère a pu être obtenu après une deuxième purification sur colonne (dichlorométhane/méthanol, 97/3).

¹H RMN (400MHz, CDCl₃):

Isomère **a**, δ: 4.00-3.87 (m, 5H, OCH₂CH₂O + CH-4), 2.09-1.38 (m, 16H), 0.88 (s, 9H, *t*Bu), 0.01 (s, 6H, 2xMe).

Isomère **b**, δ: 4.00-3.85 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 3.55 (m, 1H, CH-4), 2.27-1.20 (m, 16H), 0.88 (s, 9H, *t*Bu), 0.07 (s, 6H, 2xMe).

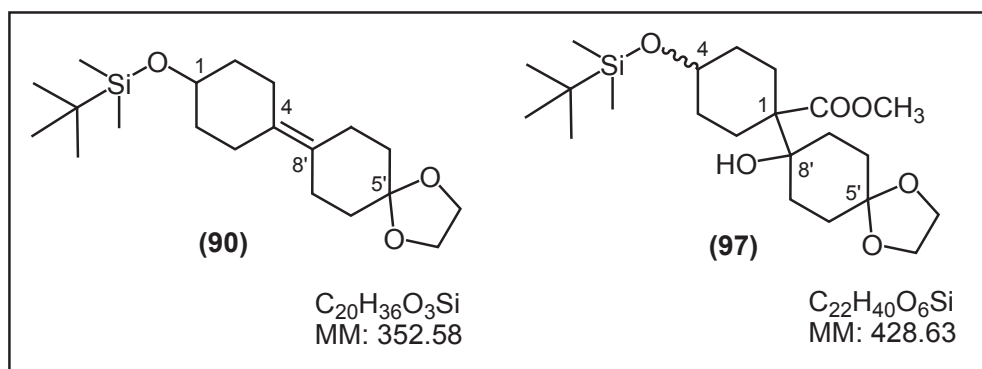
¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) (sur le mélange de **a** et **b**) δ: 180.50 et 179.20 (2xCOOH), 108.64 et 108.57 (2xC-5'), 74.04 et 73.54 (2xC-8'), 72.15 et 65.31 (2xCH-4), 64.45, 64.31,

64.23 et 63.80 ($2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 55.34 et 54.69 ($2 \times \text{C}-1$), 33.20, 31.20, 30.43, 30.38, 30.23, 29.91, 27.49, et 22.26 ($16 \times \text{CH}_2$), 26.01 et 25.96 ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18.45 et 18.15 ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), -4.61 et -4.75 ($4 \times \text{Me}$).

SM (ESI) m/z : 437 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100%), 375 (42%).

HRMS (ESI) (sur le mélange de **a** et **b**): calc. pour $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{Si}+\text{Na}$: 437.2335, trouvée : 437.2337.

- **1-(tert-butyl diméthylsilyloxy)-4-(1,4-dioxaspiro[4.5]déc-8-ylidène)cyclohexane (90)**
- **4-(tert-butyl diméthylsilyloxy)-1-(8-hydroxy-1,4-dioxaspiro[4.5]déc-8-yl)cyclohexyl carboxylate de méthyle (97)**



Méthode 1 : Le DMF-DMA (162 μL , 1.2mmol) est ajouté à une suspension de composé **(96)** (0.1g, 0.24mmol) dans l'acétonitrile anhydre (4 mL). Le mélange est agité pendant une heure à température ambiante, il est ensuite chauffé au reflux pendant la nuit. Le lendemain, l'acétonitrile est évaporé, et le résidu purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, 95/5 puis 80/20) pour isoler le produit de déshydratation décarboxylante **(90)** sous la forme d'un solide blanc (0.025g, 30%) et le produit d'estérification **(97)** sous la forme d'un solide blanc (0.072g, 70%), mélange de deux isomères **(97a)** et **(97b)**, dont un échantillon pur a pu être obtenu pour chacun après séparation par chromatographie sur couche mince de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, 95/5).

(90):

Pf=72-73°C.

^1H RMN (400MHz, CDCl_3) δ : 3.93 (s, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.82 (m, 1H, CH-1), 2.59-2.45 (m, 2H), 2.41-2.18 (m, 4H), 2.03-1.83 (m, 3H), 1.80-1.60 (m, 5H), 1.51-1.32 (m, 2H), 0.88 (s, 9H, tBu), 0.05 (s, 6H, 2xMe).

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ : 129.71 ($\text{C}=\text{C}$), 127.46 ($\text{C}=\text{C}$), 109.16 (C-5'), 70.18 (CH-1), 64.41 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 36.86 (CH_2), 36.42 (CH_2), 26.68 (CH_2), 26.45 (CH_2), 26.02 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18.30 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), -4.50 (2x CH_3).

SM (ESI) m/z : 353 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 95%), 239 (17%), 221 ($[\text{M}-\text{OTBS}]^+$, 100%).

HRMS (ESI) calc. pour $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_3\text{Si}+\text{H}$: 353.2512, trouvée: 353.2510.

(97a):

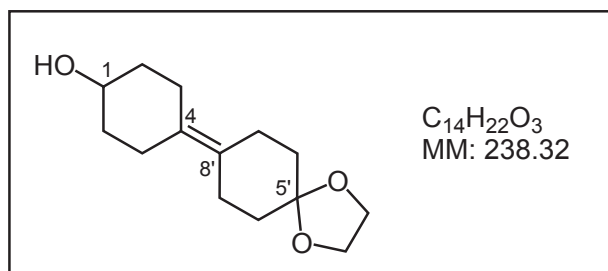
^1H RMN (300MHz, CDCl_3) δ : 3.93 (m, 5H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ + CH-1), 3.73 (s, 3H, COOCH_3), 2.50 (s, 1H, OH), 2.00-1.30 (m, 16H), 0.87 (s, 9H, tBu), 0.01 (s, 6H, 2xMe). Le proton à 2.50 ppm est échangeable dans D_2O .

(97b):

^1H RMN (300MHz, CDCl_3) δ : 4.05-3.85 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.74 (s, 3H, COOCH_3), 3.44 (m, 1H, CH-1), 2.43 (s, 1H, OH), 2.25-2.15 (m, 2H), 2.05-1.65 (m, 7H), 1.62-1.25 (m, 7H), 0.86 (s, 9H, tBu), 0.03 (s, 6H, 2xMe). Le proton à 2.43 ppm est échangeable dans D_2O .

Méthode 2: Le DMF-DNPA (1.22mL, 7.92mmol) est ajouté à une suspension du composé **(96)** (0.55g, 1.32mmol) dans l'acétonitrile anhydre (20 mL). Le mélange est agité pendant une heure à température ambiante, il est ensuite chauffé au reflux pendant la nuit. Le lendemain, l'acétonitrile est évaporé, et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, 95/5) pour isoler le produit **(90)** (0.42g, 90%).

• 4-(1,4-Dioxaspiro[4.5]déc-8-ylidène)cyclohexan-1-ol (**98**)



Une solution du composé (**90**) (0.6g, 1.7mmol) et de fluorure de tétrabutylammonium (1M dans THF, 4.5mL, 4.49mmol) dans le THF anhydre est chauffée au reflux pendant 1h30. Le solvant est évaporé et le résidu est repris dans le dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 , filtrée puis concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 97/3) pour donner le produit (**98**) sous la forme d'un solide blanc (0.36g, 90%).

Pf= 120-121°C.

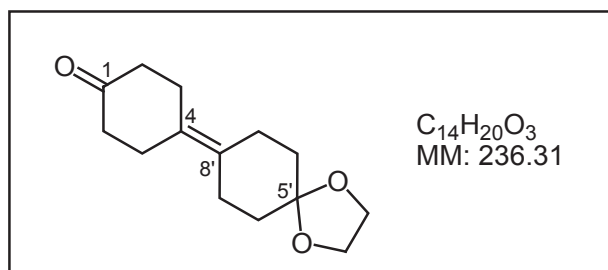
1H RMN (400MHz, $CDCl_3$) δ : 3.96 (s, 4H, OCH_2CH_2O), 3.83 (m, 1H, CH-1), 2.63-2.56 (m, 2H), 2.39-2.24 (m, 4H), 1.98-1.82 (m, 4H), 1.69-1.58 (m, 4H), 1.57 (s, 1H, OH), 1.42-1.30 (m, 2H).

^{13}C RMN (100MHz, $CDCl_3$) δ : 128.93 ($\underline{C}=\underline{C}$), 128.20 ($C=\underline{C}$), 109.08 (C-5'), 70.13 (CH-1), 64.41 ($O\underline{C}H_2\underline{C}H_2O$), 36.52 (2x $\underline{C}H_2$), 36.36 (2x $\underline{C}H_2$), 26.73 (2x $\underline{C}H_2$), 26.60 (2x $\underline{C}H_2$).

SM (EI) m/z: 238 (M^{+} , 40%), 220 ($[M-H_2O]^{+}$, 10%), 176 (38%), 86 (100%).

HRMS (EI) calc. pour $C_{14}H_{22}O_3$:238.1569, trouvée: 238.1568.

• 4-(1,4-Dioxaspiro[4.5]déc-8-ylidène)cyclohexan-1-one (**99**)



Le composé (**98**) (0.100g, 0.42mmol) et le dichromate de pyridinium (0.189g, 0.50mmol) sont solubilisés dans le dichlorométhane anhydre (10mL) sous atmosphère d'argon. Le

mélange est agité pendant 2 jours à température ambiante, puis il est filtré sur célite et le filtrat est concentré. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, 2/1) pour donner le produit **(99)** sous la forme d'un solide blanc (0.090g, 90%).

Pf=100°-102°C.

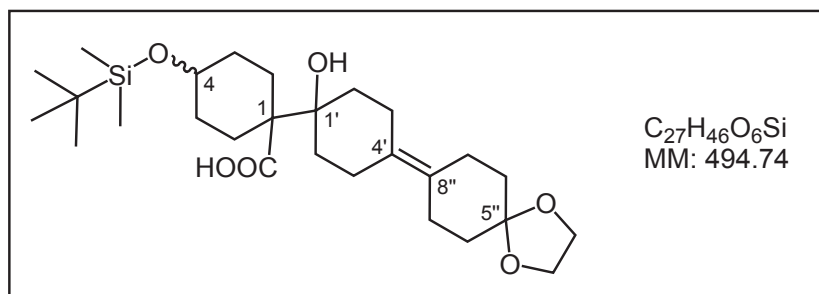
¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ: 3.94 (s, 4H, OCH₂CH₂O), 2.57-2.53 (m, 4H), 2.39-2.31 (m, 8H), 1.67-1.63 (m, 4H).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ: 212.61 (C=O), 130.97 (C=C), 124.92 (C=C), 108.76 (C-5'), 64.42 (OCH₂CH₂O), 40.70 (CH₂), 35.90 (CH₂), 26.80 (CH₂), 26.76 (CH₂).

SM (EI) m/z: 236 (M⁺, 27%), 86 (100%).

HRMS (EI) calc. pour C₁₄H₂₀O₃: 236.1412, trouvée: 236.1411.

- **Acide** **4-(tert-butyldiméthylsilyloxy)-1-[1-hydroxy-4-(1,4-dioxaspiro[4.5]déc-8-ylidène)cyclohexyl]cyclohexanecarboxylique (100)**



LDA (1.4M dans hexane, 625μL, 0.87mmol) est additionné à une solution du composé **(95)** (0.109g, 0.42mmol) dans le THF anhydre (0.5mL) à -40°C. Le mélange est agité pendant 15 minutes à cette température, puis il est chauffé à 50°C pendant 2 heures, enfin de nouveau refroidi à -40°C. Une solution de la cétone **(99)** (0.236g, 0.87mmol) dans le THF anhydre (1mL) est ajoutée au dianion lithié précédemment obtenu. Le mélange est agité à -40°C pendant 15 minutes, puis il est chauffé à 50°C pendant 2h30. Le milieu est ensuite refroidi dans un bain de glace, et 2mL d'eau sont ajoutés. Les solvants organiques sont évaporés. La phase aqueuse est acidifiée avec une solution aqueuse de HCl (1N) jusqu'à pH=1 et elle est extraite avec du dichlorométhane. Les extraits organiques sont lavés avec une solution aqueuse saturée de NaCl, puis ils sont concentrés, et le résidu est purifié par

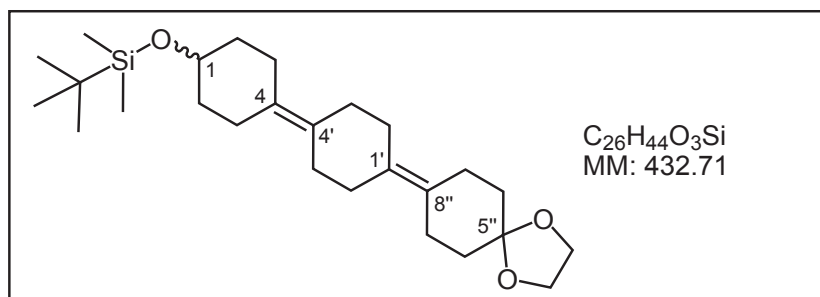
chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 98/2 puis 90/10) pour donner le produit **(100)** sous la forme d'un solide blanc (0.095g, 45%), mélange équimolaire de deux isomères, **(100a)** et **(100b)**.

$^1\text{H RMN}$ ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, 3/1) δ : 3.92 (s, 8H, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.92 (m, 1H, CH-4 **100a**), 3.44 (m, 1H, CH-4 **100b**), 2.58-1.97 (m, 10H), 1.92-1.26 (m, 14H), 0.83 et 0.81 (s, 18H, $2 \times \text{tBu}$), 0.00 et -0.03 (s, 12H, $4 \times \text{Me}$).

SM (ESI) m/z: 1011 ($[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 100%), 517 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 72%).

HRMS (ESI) calc. pour $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_6\text{Si} + \text{Na}$: 517.2956, trouvée: 517.2930.

- 1-(*Tert*-butyldiméthylsilyloxy)-1'-(1,4-dioxaspiro[4.5]déc-8-ylidène)-4,4'-bicyclohexylidène (**101**)



Le DMF-DNPA (112 μL , 0.40 mmol) est ajouté à une suspension de composé **(100)** (0.050g, 0.10 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (1.5 mL). Le mélange est agité pendant une heure à température ambiante, il est ensuite chauffé au reflux pendant 1 jour. L'acétonitrile est ensuite évaporé, et le résidu purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, 94/6) pour isoler le produit **(101)** sous la forme d'un solide blanc (0.030g, 68%).

Pf= 137-138°C.

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.91 (s, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.76 (m, 1H, CH-1), 2.53-2.38 (m, 2H), 2.31-2.07 (m, 12H), 1.93-1.79 (m, 2H), 1.76-1.55 (m, 6H), 1.44-1.26 (m, 2H), 0.83 (s, 9H, tBu), 0.00 (s, 6H, $2 \times \text{Me}$).

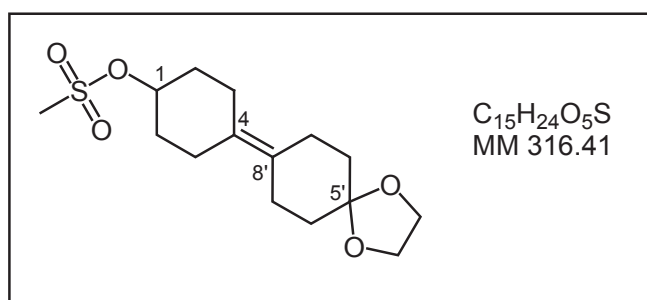
$^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 129.75 (C éthylénique), 128.92 (C éthylénique), 128.59 (C éthylénique), 127.51 (C éthylénique), 109.28 (C-5''), 70.40 (CH-1), 64.41 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 36.74

(CH₂), 36.24 (CH₂), 29.70 (CH₂), 29.59 (CH₂), 26.58 (CH₂), 26.33 (CH₂), 26.04 (C(CH₃)₃), 18.31 (C(CH₃)₃), -4.48 (2xCH₃).

SM (ESI) m/z: 433 ([M+H]⁺, 17%), 301 ([M-OTBS]⁺, 100%), 239 (16%).

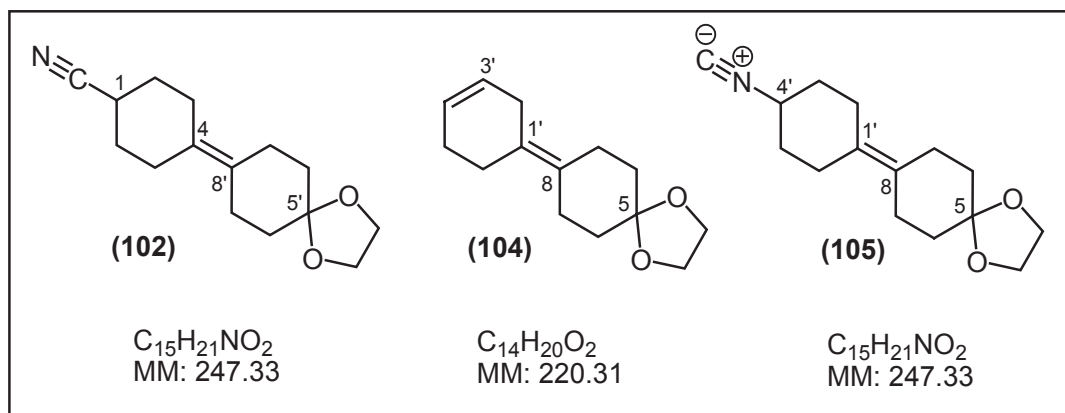
HRMS (ESI) calc. pour C₂₆H₄₄O₃Si+H: 433.3138, trouvée: 433.3130.

• **4-(1,4-Dioxa-spiro[4.5]déc-8-ylidène)-1-mésyloxycyclohexane (103)**



MsCl (118μL, 1.52mmol) et la triéthylamine (258μL, 1.80mmol) sont ajoutés à une solution d'alcool **(98)** (0.330g, 1.38mmol) dans le THF anhydre (11mL) maintenue à 0°C. Le mélange est remonté à température ambiante pendant 1 heure, le solvant est ensuite évaporé. Le résidu est repris dans de l'acétate d'éthyle, et la phase organique est lavée à l'eau, puis séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous vide pour donner le produit **(103)** sous la forme d'un solide blanc (0.415g, 95%) qui est engagé dans la réaction suivante sans purification supplémentaire.

- 4-(1,4-Dioxa-spiro[4.5]déc-8-ylidène)cyclohexanecarbonitrile (**102**)
- 8-(Cyclohex-3-énylidène)-1,4-dioxaspiro[4.5]décane (**104**)
- 8-(4-isocyanocyclohexylidène)-1,4-dioxaspiro[4.5]décane (**105**)



Une solution du composé (**103**) (0.150g, 0.47mmol) et de cyanure de tétrabutylammonium (0.752g, 2.80mmol) dans le THF anhydre (15mL) est chauffée sous micro-ondes à 100°C pendant 10 minutes. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu repris dans l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée sur papier séparateur de phase, puis concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/ acétate d'éthyle, 90/10), pour isoler trois produits :

(**102**) : solide blanc, (0.055g, 47%)

Pf=126°C.

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ : 3.96 (s, 4H, OCH_2CH_2O), 2.77 (m, 1H, CH-1), 2.54-2.45 (m, 2H), 2.32-2.28 (m, 4H), 2.19-2.10 (m, 2H), 1.93-1.62 (m, 8H).

IR (KBr) cm^{-1} : 2233

HRMS (EI) calc. pour $C_{15}H_{21}NO_2$: 247.1572, trouvée: 247.1559.

(**104**) : solide blanc (0.035g, 33%)

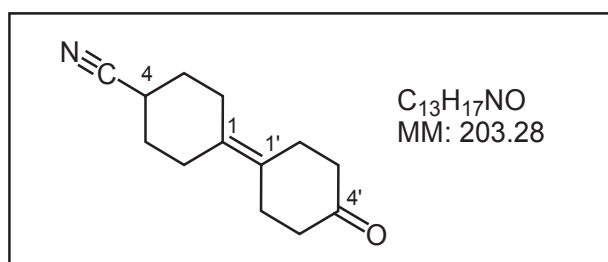
1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ : 5.76-5.62 (m, 2H, HC=CH), 3.95 (s, 4H, OCH_2CH_2O), 2.81 (bs, 2H), 2.36-2.28 (m, 6H), 2.08 (bs, 2H), 1.67-1.62 (m, 4H).

(**105**) : solide blanc (0.010g, 8%)

1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) δ : 3.96 (s, 4H, OCH_2CH_2O), 3.77 (m, 1H, CH-4'), 2.51-2.42 (m, 2H), 2.33-2.29 (m, 4H), 2.19-2.10 (m, 2H), 1.91-1.62 (m, 8H).

IR (KBr) cm^{-1} : 2139.

• **4'-Oxo-1,1'-bicyclohexylidène-4-carbonitrile (**106**)**



Le composé (**102**) (0.093g, 0.37mmol) est dissous dans un mélange de THF (2mL) et d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (5%, 2mL). Le mélange est chauffé à 70°C pendant 1 heure. Le solvant est ensuite évaporé, et le résidu repris dans du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée sur $MgSO_4$, filtrées puis concentrée sous vide pour donner le produit (**106**) sous la forme d'un solide blanc (0.076g, quant.).

Pf=66-68°C.

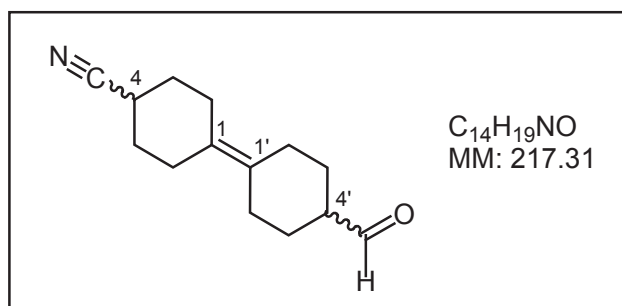
1H RMN (400MHz, $CDCl_3$) δ : 2.80 (m, 1H, CH-4), 2.58-2.37 (m, 10H), 2.22-2.14 (m, 2H), 1.95-1.73 (m, 4H).

^{13}C RMN (100MHz, $CDCl_3$) δ : 212.24 (C=O), 129.59 ($\underline{C}=\underline{C}$), 126.12 (C= $\underline{C}$), 122.09 (CN), 40.44 (CH_2), 30.51 (CH_2), 28.14 ($\underline{C}H-4$), 27.46 (CH_2), 26.50 (CH_2).

SM (ESI) m/z: 204 ($[M+H]^+$, 100%).

HRMS (ESI) calc. pour $C_{13}H_{17}NO+H$: 204.1388, trouvée: 204.1380.

• **4'-Formyl-1,1'-bicyclohexylidène-4-carbonitrile, *cis* et *trans* (**107**)**



Le chlorure de (méthoxyméthyl)triphenylphosphonium (0.710g, 2.06mmol) et le *t*-BuOK (0.229g, 2.06mmol) sont mis en suspension dans du THF anhydre (10mL) à 0°C. Le mélange est agité à cette température pendant 30 minutes, puis une solution de cétone (**106**)

(0.210g, 1.03mmol) dans du THF anhydre (3.5mL) est ajoutée. Le mélange est agité pendant la nuit à température ambiante. Le lendemain, le mélange est refroidi à 0°C, puis de l'eau (0.8mL) est ajoutée, suivie d'une solution aqueuse de HCl (6N, 2.8mL). Le mélange est remonté à température ambiante pendant 1 heure. Le solvant est ensuite évaporé, et le résidu repris dans du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée (Na_2SO_4), filtrée et concentrée. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle, 4/1) pour donner le composé **(107)** sous la forme d'un solide blanc, mélange de deux isomères (0.188g, 85%).

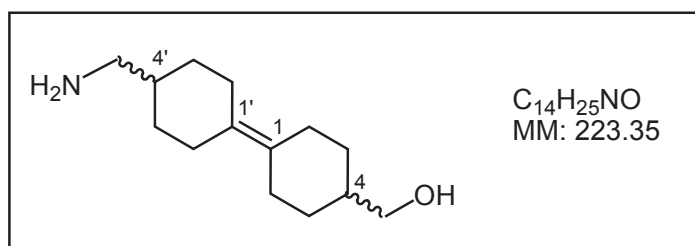
^1H RMN (400MHz, CDCl_3) δ : 9.64 (s, 1H, CHO), 2.78 (m, 1H, CH-4'), 2.66-2.36 (m, 5H), 2.22-2.06 (m, 2H), 2.03-1.66 (m, 8H), 1.54-1.36 (m, 2H).

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ : 204.32 et 204.27 (CHO), 129.83 ($2\times\text{C}=\text{C}$), 127.16 ($2\times\text{C}=\text{C}$), 122.25 et 122.23 (CN), 49.95 et 49.86 (CH-4'), 30.86 et 30.83 (CH_2), 28.31 et 28.28 (CH-4), 28.09 et 28.06 (CH_2), 27.35 et 27.30 (CH_2).

SM (CI) m/z: 218 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%), 200 (84%).

HRMS (CI) calc. pour $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}+\text{H}$: 218.1545, trouvée: 218.1533.

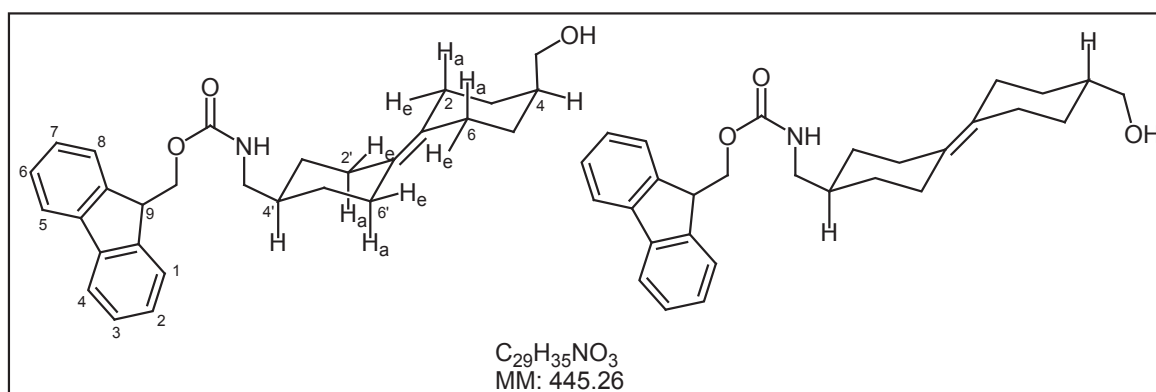
• **(4'-Aminométhyl-1,1'-bicyclohexylidène-4-yl)méthanol, *cis* et *trans* (108)**



Une solution du composé **(107)** (0.196g, 0.90mmol) dans le THF anhydre (5mL) est ajoutée à une suspension de LiAlH_4 (0.111g, 2.92mmol) dans le THF anhydre (9mL) maintenue à 0°C. Le mélange est ensuite chauffé au reflux pendant 2 heures puis refroidi à température ambiante. Une solution aqueuse de NaOH (15%, 20mL) est ajoutée. Le solvant organique est évaporé, et la phase aqueuse est extraite plusieurs fois à l'acétate d'éthyle. Les extraits organiques sont séchés (Na_2SO_4), filtrés et concentrés sous vide pour donner le produit **(108)** sous forme d'un solide blanc (0.200g, quant.). Ce matériel brut est utilisé sans purification supplémentaire dans la réaction suivante.

^1H RMN (300MHz, CDCl_3) (mélange de deux isomères) δ : 3.49-3.38 (4H, $2\times\text{CH}_2\text{OH}$), 2.73 (bd, 8H, $J=13.4\text{Hz}$), 2.58-2.48 (4H, $2\times\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.22 (m, 6H, $2\times\text{NH}_2+2\times\text{OH}$), 1.91-1.60 (18H), 1.03-0.77 (10H).

- **{4'-[N-(9H-fluoren-9-yl-méthyloxycarbonyl)aminométhyl]-1,1'-bicyclohexylidène-4-yl}méthanol, *cis* et *trans* (109a,b)**



Une suspension du composé (**108**) (0.200g, 0.89mmol), FmocOSu (0.360g, 1.07mmol) et de bicarbonate de sodium (0.090g, 1.07mmol) dans un mélange d'eau (20mL) et d'acétonitrile (20mL) est agitée pendant la nuit à température ambiante. Le lendemain, les solvants sont évaporés, et le résidu repris dans du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée (Na_2SO_4), filtrée puis concentrée. Une première purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol, 99/1) permet d'avoir le produit (**109**) sous forme de mélange de deux isomères (0.311g, 78%). Une purification supplémentaire par chromatographie sur couche mince de silice (dichlorométhane/éther éthylique, 95/5) permet de séparer les deux isomères, après plusieurs éluions successives.

(109a) : solide blanc (0.104g)

Pf=173-175°C.

^1H RMN (400MHz, CDCl_3) δ : 7.76 (d, 2H, $J=7.4\text{Hz}$, H4 et H5 fluorène), 7.59 (d, 2H, $J=7.4\text{Hz}$, H1 et H8 fluorène), 7.40 (t, 2H, $J=7.2\text{Hz}$, H2 et H7 fluorène), 7.29 (td, 2H, $J_1=7.2\text{Hz}$, $J_2=1.2\text{Hz}$, H3 et H6 fluorène), 4.79 (bs, 1H, NH), 4.41 (d, 2H, $J=6.7\text{Hz}$, CH_2OCO), 4.21 (t, 1H, $J=6.7\text{Hz}$, H9 fluorène), 3.46 (d, 2H, $J=6.2\text{Hz}$, CH_2OH), 3.04 (t, 2H,

$J=6.4\text{Hz}$, CH_2NH), 2.72 (bd, $J=13.4\text{Hz}$, 4H, Hax-2,2',6,6'), 1.90-1.60 (m, 8H), 1.05-0.78 (m, 4H).

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ : 156.69 (C=O), 144.15 (C arom.), 141.46 (C arom.), 129.47 ($\text{C}=\text{C}$), 128.96 ($\text{C}=\text{C}$), 127.78 (2xCH arom.), 127.14 (2xCH arom.), 125.15 (2xCH arom.), 120.09 (2xCH arom.), 68.32 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 66.55 ($\text{CH}_2\text{-OCO}$), 47.49 (CH-9 fluorène), 46.92 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 40.83 (CH), 38.61 (CH), 31.96 (CH_2), 30.88 (CH_2), 28.89 ($2\times\text{CH}_2$).

SM (ESI) m/z : 468 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 94%), 446 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%), 338 (30%), 224 ($[\text{M-Fmoc}+\text{H}]^+$, 12%).

HRMS (ESI) calc. pour $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{NO}_3+\text{H}$: 446.2690, trouvée: 446.2670.

(109b) solide blanc (0.140g) :

Pf=66°-68°C. (déc.)

^1H RMN (400MHz, CDCl_3) δ : 7.76 (d, 2H, $J=7.3\text{Hz}$, H4 et H5 fluorène), 7.59 (d, 2H, $J=7.3\text{Hz}$, H1 et H8 fluorène), 7.40 (t, 2H, $J=7.3$, H2 et H7 fluorène), 7.30 (td, 2H, $J_1=7.3\text{Hz}$, $J_2=1.0\text{Hz}$, H3 et H6 fluorène), 4.80 (bs, 1H, NH), 4.41 (d, 2H, $J=6.8\text{Hz}$, CH_2OCO), 4.21 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 1H, H9 fluorène), 3.46 (d, 2H, $J=6.2\text{Hz}$, CH_2OH), 3.05 (t, 2H, $J=6.5\text{Hz}$, CH_2NH), 2.72 (bd, $J=13.4\text{Hz}$, 4H, Hax-2,2',6,6'), 1.92-1.56 (m, 8H), 1.04-0.77 (m, 4H).

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ : 156.70 (C=O), 144.15 (C arom.), 141.47 (C arom.), 129.70 ($\text{C}=\text{C}$), 129.18 ($\text{C}=\text{C}$), 127.79 (2xCH arom.), 127.15 (2xCH arom.), 125.16 (2xCH arom.), 120.10 (2xCH arom.), 68.37 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 66.56 ($\text{CH}_2\text{-OCO}$), 47.51 (CH-9 fluorène), 46.96 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 41.01 (CH), 38.82 (CH), 32.36 (CH_2), 31.29 (CH_2), 28.98 (CH_2), 28.95 (CH_2).

SM (ESI) m/z : 468 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100%), 446 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 32%), 372 (6%), 224 ($[\text{M-Fmoc}+\text{H}]^+$, 6%).

HRMS (ESI) calc. pour $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{NO}_3+\text{Na}$: 468.2509, trouvée: 468.2495.

Partie Expérimentale Biologie

- **Tests de la liaison au fragment H6-NBD1 du CpABC3 et de l'inhibition de l'activité ATPasique de ce fragment (effectués par le Dr P. Lawton, laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie de Lyon) :**

- **Production de la protéine recombinante H6-NBD1 :** la protéine recombinante est surexprimée dans *E.coli* BL21(DE3)pLysS et sa production est effectuée dans un réacteur en verre de 3,5 L, sous contrôle du logiciel BioXpert 1.3 (Applikon, Systeme C Industrie, St-Paul-Trois-Châteaux, France). La température est réglée à 37°C, le pH à 7.0 et l'oxygène dissous à 20%. Trois heures après l'inoculation, la synthèse est induite par l'IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside) à 0.1mM, puis laissée se poursuivre pendant 2 h. Les culots bactériens sont ensuite conservés à -80°C. Le fragment H6-NBD1 est purifié par chromatographie d'affinité sur des colonnes Ni-NTA (nitrilotriacétate de Nickel (II)) puis dialysé pendant la nuit contre une solution aqueuse à pH 7,3, contenant : du Tris (2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol) à 50mM, du KCl à 100mM, de l'HECAMEG (6-O-[(N-heptylcarbamoyl)méthyl]- α -D-glucopyranoside) à 0,02% et de la glycérine à 20% (v/v). La protéine est utilisée directement pour les essais ou conservée à -80°C.
- **Tests de liaison par « quenching » de fluorescence :** Les tests de quenching de fluorescence sont réalisés en triplicat à l'aide d'un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS-3B, dans des microcuvettes en quartz de 1 cm. La protéine recombinante est diluée à une concentration de 0.25-0.5 μ M dans 390 μ L d'une solution aqueuse à pH 7,3, contenant : du Tris à 50mM, du KCl à 100mM et de l'HECAMEG à 0.02%. Les produits à tester sont dilués dans le même tampon, à partir de solutions mères à 10^{-2} M dans le DMSO, jusqu'à une concentration finale de 4 mM. Un volume de 10 μ L de cette solution finale est introduit sur la suspension protéique. Le mélange est

ensuite incubé pendant 30 minutes à 20°C. Les contrôles sont constitués du même solvant de dialyse mentionné ci-dessus, et contiennent la même concentration finale en DMSO que les produits testés (ne dépassant pas 2,5%). La liaison des produits testés est mesurée par le quenching de la fluorescence intrinsèque à 328nm après excitation à 295nm. Les données sont analysées à l'aide du logiciel Graph-Pad Prism 4.

- **Tests d'inhibition de l'activité ATPasique** : l'activité inhibitrice des produits à tester est mesurée pour différentes concentrations en produit après incubation pendant 10 min à 37°C avec le fragment recombinant H6-NBD1 purifié (2,5 µM finale, en protéine), dans une solution aqueuse à pH 7,3, contenant : du Tris à 50mM, du KCl à 100mM, de l'HECAMEG à 0.02% et du MgCl₂ à 4mM, en présence d'ATP à différentes concentrations. Les produits de l'hydrolyse de l'ATP sont mesurés en triplicat par HPLC en phase inverse sur une colonne de 5mm d'Hypersil (Interchim, Montluçon, France) avec 1,8% de méthanol (v/v) dans 25 mM (NH₄)H₂PO₄ aqueux comme éluant. Le volume d'injection est de 20µl et le débit de 0.5 ml/min, avec une détection UV à 254 nm. Les données sont analysées par régression non-linéaire à l'aide du logiciel Graph-Pad Prism 4.

- **Tests de l'inhibition de la Pgp dans les cellules K562/R7 (effectués d'une part par Dr C. Grenot et Dr G. Alameh, INSERM U863, et d'autre part par Pr. C. Dumontet et M^{me} E. Matera, INSERM U590):**

La culture cellulaire est supplémentée en milieu RPMI complet la veille du test, pour s'assurer d'une croissance exponentielle le jour même du test. Le lendemain, les cellules sont reprises dans du milieu RPMI sans antibiotiques et réparties dans des tubes de façon à avoir 0,5-1,0 x 10⁶ cellules dans 1mL de suspension. Quatre témoins sont réalisés :

- Témoin d'autofluorescence des cellules : contenant uniquement 1mL de la suspension cellulaire.
- Témoin d'autofluorescence de la molécule à tester : contenant 1mL de la suspension cellulaire avec la molécule à tester à la concentration voulue.

- Témoin négatif : contenant 1mL de la suspension cellulaire avec la daunorubicine à 17 μ M (ajout de 4,6 μ L d'une solution mère à 3,68mM).
- Témoin positif : contenant 1mL de la suspension cellulaire avec la daunorubicine à 17 μ M et la ciclosporine A à 3,3 μ M (ajout de 8 μ L d'une solution mère à 0,41mM).

En parallèle, dans des tubes contenant 1mL de la suspension cellulaire avec la daunorubicine à 17 μ M, les molécules à tester sont introduites de telle sorte à obtenir la concentration voulue (10 ou 50 μ M), à partir de dilutions dans le milieu RPMI de solutions mères à 10⁻² M dans le DMSO. Les tests, ainsi que les témoins, sont réalisés en double.

Les cellules sont incubées 1 heure à 37°C sous 5% de CO₂. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 5 minutes à 700 g et les culots lavés dans du tampon PBS 1X. Les tubes sont centrifugés de nouveau, puis les culots repris dans 1mL de tampon PBS 1X et analysés par le cytomètre en flux FACS-Calibur (Becton-Dickinson), avec une mesure de la fluorescence de la daunorubicine à 560nm après excitation à 488nm.

Références :

- ¹ M.M. Gottesman, V. Ling *FEBS Lett.* **2006**, 580, 998-1009.
- ² P.D.W. Eckford, F.J. Sharom *Chem. Rev.* **2009**, 2989-3011.
- ³ R.L. Juliano, V. Ling *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)*. **1976**, 455, 152-162.
- ⁴ Y.P. Seea, S.A. Carlsena, J. Tilla, V. Ling *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)*. **1974**, 373, 242-252.
- ⁵ N.Kartner, J.R.Riordan, V. Ling *Science*. **1983**, 221, 1285-1288.
- ⁶ I.B.Roninson, H.T.Abelson, D.E.Housman, N.Howell, A.Varshavsky *Nature*. **1984**, 309, 626-628.
- ⁷ P.Gros, J.M.Croop, I.Roninson, A.Varshavsky, D.E.Housman *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*. **1986**, 83, 337-341.
- ⁸ J.R.Riordan , K.Deuchars, N.Kartner, N.Alon, J.Trent, V.Ling *Nature*. **1985**, 316, 817-819.
- ⁹ K.Ueda, M.M.Cornwell, M.M.Gottesman, I.Pastan, I.B. Roninson, V.Ling, J.R.Riordan *Biochem Biophys Res Commun*. **1986**, 141, 956-962.
- ¹⁰ D.R.Bell, J.M.Trent, H.F.Willard, J.R.Riordan, V.Ling *Cancer Genet. Cytogenet.* **1987**, 25, 141-148.
- ¹¹ F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M.M. Gottesman, I. Pastan, M.C. Willingham *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1987**, 84, 7735-7738.
- ¹² A.T. Fojo, K. Ueda, D.J. Slamon, D.G. Poplack, M.M. Gottesman, I.Pastan *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 265-269.
- ¹³ J.E. Walker, M. Saraste, M.J. Runswick, N.J. Gay *EMBO J.* **1982**, 1, 945–951.
- ¹⁴ C.-H. Choi. *Cancer Cell International*. **2005**, 5, 30.
- ¹⁵ J.H. Gerlach, J.A. Endicott, P.F. Juranka, G. Henderson, F. Sarangi, K.L. Deuchars, V. Ling *Nature*, **1986**, 324, 485-489.

- ¹⁶ S.G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P.M. Harrell, Y.T. Trinh, Q. Zhang, I.L. Urbatsch, G. Chang *Science* **2009**, 323, 1718-1722.
- ¹⁷ A.B. Shapiro, V. Ling *Eur. J. Biochem.* **1997**, 250, 122-129.
- ¹⁸ A.B. Shapiro, V. Ling *Eur. J. Biochem.* **1998**, 254, 181-188.
- ¹⁹ H. Hamada, T. Tsuruo *J.Biol.Chem.* **1988**, 263, 1454-1458.
- ²⁰ M. Azzaria, E. Schurr, P. Gros *Mol.Cell.Biol.* **1989**, 9, 5289-5297.
- ²¹ S.V. Ambudkar, I.-W. Kim, D. Xia, Z.E. Sauna *FEBS Letters*, **2006**, 580, 1049–1055.
- ²² G. Tomblin, A. Muharemagic, L.B. White, A.E. Senior *Biochemistry* **2005**, 44, 12879-12886.
- ²³ R.J.P. Dawson, K.P. Locher *Nature*, **2006**, 443, 180-185.
- ²⁴ B.M.J. Foxwell, A. Mackie, V. Ling, B. Ryffel *Mol. Pharmacol.*, **1989**, 36, 543–546.
- ²⁵ R. Busche, B. Tümmler, J.R. Riordan, D.F. Cano-Gauci *Mol.Pharmacol.*, **1989**, 35, 414–421.
- ²⁶ A.R. Safa *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, 85, 7187–7191.
- ²⁷ L.M. Greenberger, C.-P.H. Yang, E. Gindin, S.B. Horwitz *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 4394–4401.
- ²⁸ A.R. Safa, C.J. Glover, M.B. Meyers, J.L. Biedler, R.L. Felsted *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 6137–6140.
- ²⁹ R.A. Shilling, H. Venter, S. Velamakanni, A. Bapna, B. Woebking, S. Shahi, H.W.van Veen *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 27, 195-203.
- ³⁰ C.P. Yang, S.G. DePinho, L.M. Greenberger, R.J. Arceci, S.B. Horwitz *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 782-788.
- ³¹ X.D. Qian, W.T. Beck *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 18753-18756.
- ³² K. Ueda, N. Okamura, M. Hirai, Y. Tanigawara, T. Saeki, N. Kioka, T. Komano, R.J. Hori *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 24248-24252.
- ³³ G.F. Fleming, J.M. Amato, M. Agresti, A. Safa *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1992**, 29, 445-449.
- ³⁴ D.J. Gruol, M.C. Zee, J. Trotter, S. Bourgeois *Cancer Res.* **1994**, 54, 3088-3091.
- ³⁵ G. Dayan, J.-M. Jault, H. Baubichon-Cortay, L.G. Baggetto, J.-M. Renoir, E.-E. Baulieu, P. Gros, A. Di Pietro *Biochemistry* **1997**, 36, 15208-15215.

-
- ³⁶ G. Conseil, H. Baubichon-Cortay, G. Dayan, J.-M. Jault, D. Barron, A. Di Pietro *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1998**, *95*, 9831–9836.
- ³⁷ L. El Jawad, « Etude par photomarquage d'affinité du site de fixation des modulateurs stéroïdes sur la glycoprotéine-P humaine », Thèse, Biochimie, Lyon, **2008**, n°180.
- ³⁸ S. Mares-Samano, R. Badhan, J. Penny *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3601–3611.
- ³⁹ D.C. Wolf, S.B. Horwitz *Int. J. Cancer*. **1992**, *52*, 141-146.
- ⁴⁰ D.J. Gruol, M.N. King, M.E. Kuehne *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 1238-48.
- ⁴¹ Z.E. Sauna, S.V. Ambudkar *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 13-23.
- ⁴² G.L. Scheffer, A.C. Pijnenborg, E.F. Smit, M. Müller, D.S. Postma, W. Timens, P. van der Valk, E.G. de Vries, R.J. Scheper *J. Clin. Pathol.* **2002**, *55*, 332-339.
- ⁴³ M. Drozdziak, M. Bialecka, K. Mysliwiec, K. Honczarenko, J. Stankiewicz, Z. Sych. *Pharmacogenetics*. **2003**, *13*, 259-263.
- ⁴⁴ J. Van Asperen, O. Van Tellingen, J.H. Beijnen *Pharmacol Res.* **1998**, *37*, 429-435.
- ⁴⁵ T. Murakami, M. Takano *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 923-939.
- ⁴⁶ C.M. Panwala, J.C. Jones, J.L. Viney *J. Immunol.* **1998**, *161*, 5733-5744.
- ⁴⁷ P. Chandra, K.L. Brouwer *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 719-735.
- ⁴⁸ J.W. Jonker, C.A. Stedman, C. Liddle, M. Downes *Front. Biosci.* **2009**, *14*, 4904-4920.
- ⁴⁹ H. Kusuhaara, H. Suzuki, Y. Sugiyama *J. Pharmacol. Sci* **1998**, *87*, 1025-1040.
- ⁵⁰ K.V. Speeg, A.L. Maldonado. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1994**, *34*, 133-136.
- ⁵¹ H. Gutmann, D.S. Miller, A. Droulle, J. Drewe, A. Fahr, G. Fricker *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 251– 256.
- ⁵² G. Fricker, D.S. Miller *Pharmacology*. **2004**, *70*, 169–176.
- ⁵³ A.H. Schinkel, J.J.M. Smit, O. vanTellingen, J.H. Beijnen, E. Wagenaar, L. vanDeemter, C.A.A.M. Mol, M.A. van der Valk, E.C. Robanus-Maandag, H.P.J. te Riele, A.J.M. Berns, P. Borst. *Cell*. **1994**, *77*, 491-502.
- ⁵⁴ T. Saito, Z.J. Zhang, T. Ohtsubo, I. Noda, Y. Shibamori, T. Yamamoto, H. Saito *Acta Otolaryngol.* **2001**, *121*, 735-742.
- ⁵⁵ A. Lazarowski, L. Czornyj, F. Lubienieki, E. Girardi, S. Vazquez, C. D'Giano *Epilepsia*. **2007**, *48 Suppl. 5*, 140-149.
- ⁵⁶ K. Vähäkangas, P. Myllynen *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 665-678.

- ⁵⁷ G.R. Lankas, M.E. Cartwright, D. Umbenhauer *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1997**, *143*, 357-365.
- ⁵⁸ J.W. Smit, M.T. Huisman, O.van Tellingen, H.R. Wiltshire, A.H. Schinkel *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 1441-1447.
- ⁵⁹ W.T. Beck, T.M. Grogan, C.L. Willman, C. Cordon-Cardo, D.M. Parham, J.F. Kuttesch, M. Andreeff, S.E. Bates, C.W. Berard, J.M. Boyett, N.A. Brophy, H.J. Broxterman, H.S.L. Chan, W.S. Dalton, M. Dietel, A.T. Fojo, R.D. Gascoyne, D. Head, P.J. Houghton, D.K. Srivastava, M. Lehnert, C.P. Leith, E. Paietta, Z.P. Pavelic, L. Rimsza, I.B. Roninson, B.I. Sikic, P.R. Twentyman, R. Warnke, R. Weinstein *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3010-3020.
- ⁶⁰ D. Piwnica-Worms, M.L. Chiu, M. Budding, J.F. Kronauge, R.A. Kramer, J.M. Croop *Cancer Res.* **1993**, *53*, 977-984.
- ⁶¹ G.D. Luker, P.M. Fracasso, J. Dobkin, D. Piwnica-Worms *J. Nucl. Med.* **1997**, *38*, 369-372.
- ⁶² K. Han, J. Kahng, M. Kim, J. Lim, Y. Kim, B. Cho, H.K. Kim, W.S. Min, C.C. Kim, K.Y. Lee, B.K. Kim, C.S. Kang *Acta Haematol.* **2000**, *104*, 174-180.
- ⁶³ O. Legrand, G. Simonin, A. Beauchamp-Nicoud, R. Zittoun, J.P. Marie *Blood.* **1999**, *94*, 1046-1056.
- ⁶⁴ C.P. Leith, K.J. Kopecky, I-M. Chen, L. Eijdens, M.L. Slovak, T.S. McConnell, D.R. Head, J. Weick, M.R. Grever, F.R. Appelbaum, C.L. Willman *Blood.* **1999**, *94*, 1086-1099.
- ⁶⁵ M. Pallis, N. Russell *Leukemia.* **2004**, *18*, 1927-1930.
- ⁶⁶ H. Burger, K. Nooter, G.J. Zaman, P. Sonneveld, K.E. van Wingerden, R.G. Oostrum, G. Stoter *Leukemia.* **1994**, *8*, 990-997.
- ⁶⁷ B.J. Trock, F. Leonessa, R. Clarke *J. Natl. Cancer Inst.* **1997**, *89*, 917-931.
- ⁶⁸ H.S.L. Chan, P.S. Thorner, G. Haddad, V. Ling *J. Clin. Oncol.* **1990**, *50*, 2818-2822.
- ⁶⁹ H.S.Chan, T.M.Grogan, G.Haddad, G.DeBoer, V.Ling *J. Natl. Cancer Inst.* **1997**, *89*, 1706-1715.
- ⁷⁰ G.D. Leonard, T. Fojo, S.E. Bates *Oncologist.* **2003**, *8*, 411-424.
- ⁷¹ G. Szakács, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M.M. Gottesman *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 219-234.

-
- ⁷² N.A. Colabufo, F. Berardi, M. Cantore, M. Contino, C. Inglese, M. Niso, R. Perrone *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1883–1897.
- ⁷³ T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai *Cancer Res.* **1981**, *41*, 1967–1972.
- ⁷⁴ M.M. Cornwell, I. Pastan, M.M. Gottesman *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 2166–2170
- ⁷⁵ C.D. Pennock, W.S. Dalton, W.R. Roeske, C.P. Appleton, K. Mosley, P. Pleaia, T.P. Miller, S.E. Salmon *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 105–110.
- ⁷⁶ J. Verweij, H. Herweijer, R. Oosterom, M.E. van der Burg, A.S. Planting, C. Seynaeve *Br. J. Cancer.* **1991**, *64*, 361–364.
- ⁷⁷ Brevet: P. Bollinger, J.J. Boelsterli, J.-F. Borel, M. Krieger, T.G. Payne, R.P. Traber, R. Wenger *Eur. Pat. Appl.* **1988**, EP296122.
- ⁷⁸ C. Gaveriaux, D. Boesch, B. Jachez, P. Bollinger, T. Payne, F. Loo *J. Cell. Pharmacol.* **1991**, *2*, 225–234.
- ⁷⁹ F.J. Sharom, X. Yu, P. Lu, R. Liu, J.W. Chu, K. Szabo, M. Muller, C.D. Hose, A. Monks, A. Varadi, J. Seprodi, B. Sarkadi *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 571–586.
- ⁸⁰ O. Arnaud, A. Koubeissi, L. Ettouati, R. Terreux, G. Alamé, C. Grenot, C. Dumontet, A. Di Pietro, J. Paris, P. Falson *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6720–6729.
- ⁸¹ A. Dhainaut, G. Regnier, G. Atassi, A. Pierré, S. Leonce, L. Kraus-Berthier, J.F. Prost *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2481–2496.
- ⁸² U.A. Germann, D. Shlyakhter, V.S. Mason, R.E. Zelle, J.P. Duffy, V. Galullo, D.M. Armistead, J.O. Saunders, J. Boger, M.W. Harding *Anti-cancer Drugs* **1997**, *8*, 125–140.
- ⁸³ R. Krishna, L.D. Mayer *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11*, 265–283.
- ⁸⁴ C.A. McDevitt, R. Callaghan *Pharmacol. Therapeut.* **2007**, *113*, 429–441.
- ⁸⁵ S. Bates, M. Kang, B. Meadows, P. Choyke, M. Merino, B. Goldspiel, I. Chico, T. Smith, C. Chen, R. Robey, R. Bergan, W.D. Figg, T. Fojo *Cancer* **2001**, *92*, 1577–1590.
- ⁸⁶ E.K. Rowinsky, L. Smith, Y.M. Wang, P. Chaturvedi, M. Villalona, E. Campbell, C. Aylesworth, S.G. Eckhardt, L. Hammond, M. Kraynak, R. Drengler, J. Stephenson Jr., M.W. Harding, D.D. Von Hoff *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 2964–2976.
- ⁸⁷ V. Fischer, A. Rodriguez-Gascon, F. Heitz, R. Tynes, C. Hauck, D. Cohen, A.E. Vickers. *Drug Metab. Dispos.* **1998**, *26*, 802–811.
- ⁸⁸ V.J. Wachter, C.Y. Wu, L.Z. Benet *Mol. Carcinog.* **1995**, *13*, 129–134.

-
- ⁸⁹ J.J. Starling, R.L. Shepard, J. Cao, K.L. Law, B.H. Norman, J.S. Kroin, W.J. Ehlhardt, T.M. Baughman, M.A. Winter, M.G. Bell, C. Shih, J. Gruber, W.F. Elmquist, A.H. Dantzig *Adv. Enzyme Regul.* **1997**, *37*, 335-347.
- ⁹⁰ M.J. Newman, J.C. Rodarte, K.D. Benbatoul, S.J. Romano, C. Zhang, S. Krane, E.J. Moran, R.T. Uyeda, R. Dixon, E.S. Guns, L.D. Mayeret *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2964-2972.
- ⁹¹ M. Roe, A. Folkes, P. Ashworth, J. Brumwell, L. Chima, S. Hunjan, I. Pretswell, W. Dangerfield, H. Ryder, P. Charlton *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 595-600.
- ⁹² A.H. Dantzig, R.L. Shepard, K.L. Law, L. Tabas, S. Pratt, J.S. Gillespie, S.N. Binkley, M.T. Kuhfeld, J.J. Starling, S.A. Wrighton. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *290*, 854-862.
- ⁹³ P. Mistry, A.J. Stewart, W. Dangerfield, S. Okiji, C. Liddle, D. Bootle, J.A. Plumb, D. Templeton, P. Charlton. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 749-758.
- ⁹⁴ Communiqué de presse de la société QLT Inc. : <http://www.qltinc.com/newsCenter/2003/030512.htm>
- ⁹⁵ P. Ruff, D.A. Vorobiof, J.P. Jordaan, G.S. Demetriou, S.D. Moodley, A.L. Nosworthy, I.D. Werner, J. Raats, L.J. Burgess *Cancer Chemoth. Pharm.* **2009**, *64*, 763-768.
- ⁹⁶ K. Yusa, T. Tsuruo. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 5002-5006.
- ⁹⁷ I. Tamai, A.R. Safa. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 16509-16513.
- ⁹⁸ H. Goldberg, V. Ling, P.Y. Wong, K. Skorecki *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *152*, 552-558.
- ⁹⁹ A. Archinal-Mattheis, R.W. Rzepka, T. Watanabe, N. Kokubu, Y. Itoh, N.J. Combates, K.W. Bair, D. Cohen. *Oncol. Res.* **1995**, *7*, 603-610.
- ¹⁰⁰ A. Dantzig, R. Shepard, J. Cao, K. Law, W. Ehlhardt, T. Baughman, T. Bumol, J. Starling. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 4171-4179.
- ¹⁰¹ C. Martin, G. Berridge, P. Mistry, C. Higgins, P. Charlton, R. Callaghan. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 403-411.
- ¹⁰² E.B. Mechetner, I.B. Roninson *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 5824-5828.
- ¹⁰³ C. Pawlak-Roblin, P.-F. Tosi, L. Perrin, J. Devy, L. Venteo, P. Albert, C. Nicolau, C. Madoulet *Eur. J. Cancer* **2004**, *40*, 606-613
- ¹⁰⁴ N.I. Tarasova, R. Seth, S.G. Tarasov, T. Kosakowska-Cholody, C.A. Hrycyna, M.M. Gottesman, C.J. Michejda. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3768-3775.

-
- ¹⁰⁵ R. Krishna, M. St-Louis, L.D. Mayer. *Int. J. Cancer*. **2000**, 85, 131–141.
- ¹⁰⁶ T. Kobayashi, T. Ishida, Y. Okada, S. Ise, H. Harashima, H. Kiwada *Int. J. Pharm.* **2007**, 329, 94–102.
- ¹⁰⁷ R.A. Dillingham, A.A. Lima, R.L. Guerrant. *Microbes Infect.* **2002**, 4, 1059-1066.
- ¹⁰⁸ E.M. Zardi, A. Picardi, A. Afeltra. *Chemotherapy*. **2005**, 51, 193–196.
- ¹⁰⁹ H.V. Smith, G.D. Corcoran. *Current Opin. Infect. Dis.* **2004**, 17, 557-564.
- ¹¹⁰ M.-T. Bonafonte, P.A. Romagnoli, N. McNair, A.P. Shaw, M. Scanlon, G.J. Leitch, J.R. Mead *Exp. Parasitol.* **2004**, 106, 126–134.
- ¹¹¹ F. Zapata, M.E. Perkins, Y.A. Riojas, T.W. Wu, S.M. Le Blancq *Mol. Biochem. Parasit.* **2002**, 120, 157-161.
- ¹¹² A. Klokouzas, S. Shahi, S.B. Hladky, M.A. Barrand, H.W. Van Veen *Int. J. Antimicrob. Agents*. **2003**, 22, 301–317.
- ¹¹³ P. Lawton, M. Pélandakis, A.-F. Pétavy, N. Walchshofer *Mol. Biochem. Parasit.* **2007**, 152, 101–107.
- ¹¹⁴ S.L. Moodie, J.B.O. Mitchell, J.M. Thornton *J. Mol. Biol.* **1996**, 263, 486–500.
- ¹¹⁵ P. Chène *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 665-673.
- ¹¹⁶ H.-J. Boehm, M. Boehringer, D. Bur, H. Gmuender, W. Huber, W. Klaus, D. Kostrewa, H. Kuehne, T. Luebbers, N. Meunier-Keller, F. Mueller *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2664-2674.
- ¹¹⁷ Y.M. Yutilov *Adv. Heterocycl. Chem.* **2005**, 89, 159–270 et références citées.
- ¹¹⁸ G. Tennant, C.J. Wallis, G. Weaver *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **1999**, 629-640 et références citées.
- ¹¹⁹ J. Suwinski, E. Salwinska, J. Watras, M. Widel *Pol. J. of Chem.* **1982**, 56, 1261-1272.
- ¹²⁰ A.H.M. Al-Shaar, R.K. Chambers, D.W. Gilmour, D.J. Lythgoe, I. McClenaghan, C.A. Ramsden *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 2789-2811.
- ¹²¹ G. Sant-Ruf, B. Loukakou, C. N'Zouzi *J. Hetrocycl. Chem.* **1981**, 18, 1565-1570.
- ¹²² A.H. Al-Shaar, D.W. Gilmour, D.J. Lythgoe, I. McClenaghan, C.A. Ramsden *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 551-552.
- ¹²³ N. Kohyama, Y. Yamamoto *Synthesis* **2003**, 17, 2639-2642.
- ¹²⁴ N. Kojima, K. Inoue, R. Nakajima-Shibata, S. Kawahara, E. Ohtsuka *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 7175-7188.

-
- ¹²⁵ D.L. Garmaise, J. Komlossy *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3403-3405.
- ¹²⁶ S.-Y. Lin, Y. Isome, E. Stewart, J.-F. Liu, D. Yohannes, L. Yu *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2883-2886.
- ¹²⁷ A.G. Arvanitis, J.T. Rescinito, C.R. Arnold, R.G. Wilde, G.A. Cain, J.H. Sun, J.-S. Yan, C.A. Teleha *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 289-291.
- ¹²⁸ I. Khanna, R.M. Weier, K.T. Lentz, L. Swenton, D.C. Lankin *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 960-965.
- ¹²⁹ K.J. McClure, L. Huang, K.L. Arienti, F.U. Axe, A. Brunmark, J. Blevitt, G. Breitenbucher. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1921-1928.
- ¹³⁰ F. Janssens, J. Torremans, M. Janssen, R.A. Stokbroekx, M. Luyckx P.A. Janssen *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1943-1947.
- ¹³¹ C. Salomé, M. Schmitt, J.-J. Bourguignon *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 3798-3800.
- ¹³² J. Yin, S.L. Buchwald *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6043-6048.
- ¹³³ I. Antonini, G. Cristalli, P. Franchetti, M. Grifantini, S. Martelli, F. Petrelli *J. Pharm. Sci.* **1984**, *73*, 367-369.
- ¹³⁴ F. Leroy, P. Després, M. Bigan, D. Blondeau *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 2257-2272.
- ¹³⁵ T. Itoh, K. Ono, T. Sugawara, Y. Mizuno *J. Heterocycl. Chem.* **1982**, *19*, 513-517.
- ¹³⁶ E.C. Taylor, J.S. Driscoll. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 3001-3002.
- ¹³⁷ E. Delfourne, R. Kiss, L. Le Corre, F. Dujols, J. Bastide, F. Collignon, B. Lesur, A. Frydman, F. Darro *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3536-3545.
- ¹³⁸ B.L. Cline, R.P. Panzica, L.B. Townsend *J. Heterocycl. Chem.* **1978**, *15*, 839-847.
- ¹³⁹ E. Spinner, J.C.B. White. *Chem. Ind.-London* **1967**, *42*, 1784.
- ¹⁴⁰ J.L. Girardet, E. Gunic, C. Esler, D. Cieslak, Z. Pietrzkowski, G. Wang. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3704-3713.
- ¹⁴¹ M. Korabik, M. Materny, W. Surga, T. Glowiak, J. Mrozinski *J. Mol. Struct.* **1998**, *443*, 255.
- ¹⁴² E.J. Ochiai *J. Org. Chem.* **1953**, *18*, 534-551.
- ¹⁴³ D.D. Perrin, W.L.F. Armarego, D.R. Perrin *Purification of Laboratory Chemicals*. 2e éd., Oxford : Pergamon Press, **1980**, pp 455-457.
- ¹⁴⁴ G.R. Geen, P.M. Kinsey, P.G. Spoors *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1781-1784.

-
- ¹⁴⁵ J. Novak, I. Linhart, H. Dvarakova, V. Kubelka *Org. Lett.* **2003**, *5*, 637-639.
- ¹⁴⁶ T. Wenzel, F. Seela *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 169-178.
- ¹⁴⁷ G.R. Geen, T.J. Grinter, P.M. Kinsey, R.L. Jarvest *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6903-6914.
- ¹⁴⁸ I.C. Chang, J.K. von Frijtag Drabbe Künzel, T. Mulder-Krieger, J. Westerhout, T. Spangenberg, J. Brusse, A.P. IJzerman *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 828-834.
- ¹⁴⁹ M.R. Haque, M. Rasmussen *Tetrahedron* **1994**, *50*, 5535-5554.
- ¹⁵⁰ W. Zeinyeh, J. Pilmé, S. Radix, N. Walchshofer *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1828-1833.
- ¹⁵¹ M. Rommel, A. Ernst, U. Koert *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 4408-4430.
- ¹⁵² K. Lal, S. Ghosh, R.G. Salomon *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1072-1078.
- ¹⁵³ R.K. Dieter, S. Li *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7726-7735.
- ¹⁵⁴ F. Berrée, J.-P. Bazureau, G. Michelot, M. Le Cone *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 2685-2693.
- ¹⁵⁵ R. Liu, F.J. Sharom *Biochemistry* **1997**, *36*, 2836-2843.
- ¹⁵⁶ C.P. Yang, D. Cohen, L.M. Greenberger, S.L. Hsu, S.B. Horwitz *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10282-10285.
- ¹⁵⁷ W. Zeinyeh, H. Xia, P. Lawton, S. Radix, C. Marminon, P. Nebois, N. Walchshofer *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2480-2488.
- ¹⁵⁸ M. Mammen, S.-K. Choi, G.M. Whitesides *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
- ¹⁵⁹ N. Dietis, R. Guerrini, G. Calo, S. Salvadori, D.J. Rowbotham, D.G. Lambert *Brit. J. Anaesth.* **2009**, *103*, 38-49.
- ¹⁶⁰ J.D. Daniels, N.R. Lenard, C.L. Etienne, P.-Y. Law, S.C. Roerig, P.S. Portoghese *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 19208-19213.
- ¹⁶¹ A.P. Tamiz, J. Zhang, M. Zhang, C.Z. Wang, K.M. Johnson, A.P. Kozikowski *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5393-5394.
- ¹⁶² A.P. Tamiz, P. Conti, M. Zhang, K.M. Johnson, A.P. Kozikowski *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2741-2743.
- ¹⁶³ P.R. Carlier, E.S.-H. Chow, Y. Han, J. Liu, J.El Yazal, Y.-P. Pang *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4225-4231.
- ¹⁶⁴ D.M. Wong, H.M. Greenblatt, H. Dvir, P.R. Carlier, Y.-F. Han, Y.-P. Pang, I. Silman, J.L. Sussman *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 363-373.

-
- ¹⁶⁵ K.A. Jacobson, R. Xie, L. Young, L. Chang, B.T. Liang *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30272-30279.
- ¹⁶⁶ Z.E. Sauna, M.B. Andrus, T.M. Turner, S.V. Ambudkar *Biochemistry* **2004**, *43*, 2262-2271.
- ¹⁶⁷ M.M. Pires, C.A. Hrycyna, J. Chmielewski *Biochemistry* **2006**, *45*, 11695-11702.
- ¹⁶⁸ K.-F. Chan, Y. Zhao, B.A. Burkett, I.L.K. Wong, L.M.C. Chow, T.H. Chan *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6742-6759.
- ¹⁶⁹ K.-F. Chan, Y. Zhao, T.W.S. Chow, C.S.W. Yan, D.L. Ma, B.A. Burkett, I.L.K. Wong, L.M.C. Chow, T.H. Chan *Chem. Med. Chem.* **2009**, *4*, 594-614.
- ¹⁷⁰ M.M. Pires, D. Emmert, C.A. Hrycyna, J. Chmielewski *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 92-100.
- ¹⁷¹ E. Teodori, S. Dei, A. Garnier-Suillerot, F. Gualtieri, D. Manetti, C. Martelli, M. Novella Romanelli, S. Scapecchi, P. Sudwan, M. Salerno *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7426-7436.
- ¹⁷² S.C. Meyer, C.D. Shomin, T. Gaj, I. Ghosh *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13811-13813.
- ¹⁷³ S. Halazy, M. Perez, C. Fourrier, I. Pallard, P.J. Pauwels, C. Palmier, G.W. John, J.-P. Valentin, R. Bonnafoos, J. Martinez *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4920-4927.
- ¹⁷⁴ F. Leonessa, J.-Y.K. Kim, A. Ghiorghis, R.J. Kulawiec, C. Hammer, A. Talebian, R.J. Clarke *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 390-398.
- ¹⁷⁵ S.W. Ashford, K.C. Grega *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1523-1524.
- ¹⁷⁶ Brevet: Y. Bessard, D. Kuo. PCT Int. Appl., 2006002966, 12 Jan **2006**.
- ¹⁷⁷ E.J. Agnello, G.D. Laubach *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1257-1258.
- ¹⁷⁸ H.J. Ringold, A. Turner *Chem. Ind.-London* **1962**, *5*, 211-212.
- ¹⁷⁹ J. Stoelwinder, W.J. van Zoest, A.M. van Leusen *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2252-2257.
- ¹⁸⁰ M.B. Rubin *Steroids* **1963**, *2*, 561-581.
- ¹⁸¹ J.A. Campbell, J.C. Babcock *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4069-4074.
- ¹⁸² S.P. Modi, J.O. Gardner, A. Milowsky, M. Wierzba, L. Forgione, P. Mazur, A.J. Solo *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2317-2321.
- ¹⁸³ G.Li, Y.Zhang. *Steroids*. **2007**, *72*, 569-572.
- ¹⁸⁴ J.H.Wynne, C.T.Lloyd, G.W.Mushrush *Synthetic Commun.* **2003**, *33*, 885-893.
- ¹⁸⁵ R.W.Brueggemeier, E.E.Floyd, R.E.Counsell. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 1007-1011.

-
- ¹⁸⁶ Brevet: A. Bowers, H.J. Ringold. US 3050534, 21 Aug **1962**.
- ¹⁸⁷ W. Nagata, M. Yoshioka *Organic Reactions* **1977**, *25*, 255-476.
- ¹⁸⁸ K. Nickisch, D. Bittler, H. Laurent, W. Losert, Y. Nishino, E. Schillinger, R. Wiechert *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 509-513.
- ¹⁸⁹ C.G. Overberger, J.Y. Chang *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 51-54.
- ¹⁹⁰ P. Marcé, Y. Diaz, M.I. Matheu, S. Castillon *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4735-4738.
- ¹⁹¹ H.-M. Guo, Y.-Y. Wu, H.-Y. Niu, D.-C. Wang, G.-R. Qu *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3863-3866.
- ¹⁹² M.K. Schlegel, E. Meggers *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4615-4618.
- ¹⁹³ D. Hocková, A. Holy, M. Masojídková, D.T. Keough, J. de Jersey, L.W. Guddat *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6218-6232.
- ¹⁹⁴ B.A. Trofimova, A.G. Mal'kina, V.V. Nosyreva, O.A. Shemyakina, A.P. Borisova, L.I. Larina, O.N. Kazheva, G.G. Alexandrov, O.A. Dyachenko *Tetrahedron* **2010**, *66*, 1699-1705.
- ¹⁹⁵ F. Hamon, B. Violeau, F. Turpin, M. Bellot, L. Bouteiller, F. Djedaini-Pilard, C. Len *Synlett.* **2009**, *17*, 2875-2879.
- ¹⁹⁶ C. Lambertucci, I. Antonini, M. Buccioni, D. Dal Ben, D.D. Kachare, R. Volpini, K.-N. Klotz, G. Cristalli *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2812-2822.
- ¹⁹⁷ D. Rejman, R. Pohl, P. Kocalka, M. Masojidkova, I. Rosenberg *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3673-3681.
- ¹⁹⁸ Y.-M. Zhang, Y. Ding, W. Tang, W. Luo, M. Gu, W. Lu, J. Tang, J.-P. Zuo, F.-J. Nan. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9212-9216.
- ¹⁹⁹ S. Rodriguez Ropero, D. Edmont, C. Mathé, C. Périgaud *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2007**, *26*, 1111-1114.
- ²⁰⁰ I. Cerna, R. Pohl, B. Klepetarova, M. Hocek *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2302-2308.
- ²⁰¹ R. Volpini, R. Chandra Mishra, D.D. Kachare, D. Dal Ben, C. Lambertucci, I. Antonini, S. Vittori, G. Marucci, E. Sokolova, A. Nistri, G. Cristalli *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4596-4603.
- ²⁰² J.-H. Kim, H.O. Kim, K.M. Lee, M.W. Chun, H.R. Moon, L.S. Jeong *Tetrahedron* **2006**, *62*, 6339-6342.
- ²⁰³ D.W. Thomson, A.G.J. Commeureuc, S. Berlin, J.A. Murphy *Synthetic Commun.* **2003**, *33*, 3631-3641.

-
- ²⁰⁴ R.M. Hoyte, W. Rosner, I.S. Johnson, J. Zielinski, R.B. Hochberg *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1695-1699.
- ²⁰⁵ C. Degrand, B. Limoges *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2573-2577.
- ²⁰⁶ J. Liu, J.K. Clegg, R. Codd *Acta Cryst.* **2009**, *E65*, o1742–o1743.
- ²⁰⁷ N. Kartner, M. Shales, J.R. Riordan, V. Ling *Cancer Res.* **1983**, *43*, 4413-4419.
- ²⁰⁸ W. Zeinyeh, G. Alameh, S. Radix, C. Grenot, C. Dumontet, N. Walchshofer *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3165-3168.
- ²⁰⁹ D.H.R. Barton, B.J. Willis *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1972**, 305-310.
- ²¹⁰ J. Buter, S. Wassenaar, R.M. Kellogg *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 4045-4060.
- ²¹¹ L.D. Pedersen, L. Weiler *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 782-784.
- ²¹² F.J. Hoogesteger, R.W.A. Havenith, J.W. Zwikker, L.W. Jenneskens, H.Kooijman, N. Veldman, A.L. Spek *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4375-4384.
- ²¹³ D.J. Humphreys, P.M. Lawrence, C.E. Newall, G.H. Phillipps, P.A. Wall *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **1978**, 24-33.
- ²¹⁴ K. Kornblum, S.F. Boyd, H.W. Pinnick, R.G. Smith *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4316-4318.
- ²¹⁵ D.J. Humphreys, P.M. Lawrence, C.E. Newall *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **1978**, 19-23.
- ²¹⁶ J.E. Mc Murry, M.P. Fleming *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 896-897.
- ²¹⁷ D.J. Humphreys, C.E. Newall *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **1978**, 33-45.
- ²¹⁸ S. Hara, H. Taguchi, H. Yamamoto, H. Nozaki *Tetrahedron Lett.* **1975**, *19*, 1545-1548.
- ²¹⁹ R.F. Abdulla, R.S. Brinkmeyer *Tetrahedron* **1979**, *35*, 1675-1735.
- ²²⁰ E.W.H. Asveld, R.M. Kellogg *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1250-1257.
- ²²¹ G.W. Kabalka, Z.Z. Wu, M-L. Yao, N. Natarajan *Appl. Rad. Isotopes* **2004**, *61*, 1111-1115.
- ²²² T. Imamoto, T. Kusumoto, Y. Tawarayama, Y. Sugiura, T. Mita, Y. Hatanaka, M. Yokoyama *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3904-3912.
- ²²³ N. Takeda, T. Imamoto *Org. Synth.* **1999**, *76*, 228-233.
- ²²⁴ D.A. Conlon, D. Kumke, C. Moeder, M. Hardiman, G. Hutson, L. Sailer *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 1307-1315.

-
- ²²⁵ N. Iranpoor, H. Firouzabadi, B. Akhlaghinia, N. Nowrouzi *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2562-2564.
- ²²⁶ N.S. Georgiades, J. Clardy *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4091-4094.
- ²²⁷ D.E. Berbreiter, P.L. Osburn, C.Li. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 737-740.
- ²²⁸ D. Haddenham, L. Pasumansky, J. DeSoto, S. Eagon, B. Singaram *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1964.
- ²²⁹ D.A. Spiegel, F.C. Schroeder, J.R. Duvall, S.L. Schreiber *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14766-14767
- ²³⁰ E.C. Juenge, P.J. Spangler *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 226-228.
- ²³¹ V. Krištafor, S. Raić-Malić, M. Cetina, M. Kralj, L. Šuman, K. Pavelić, J. Balzarini, E. De Clercq, M. Mintas *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8126-8138.
- ²³² C.-Y. Cheng, S.-C. Wu, L.-W. Hsin, S. W. Tam *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2243-2247.
- ²³³ Y. Kitano, T. Ito, T. Suzuki, Y. Nogata, K. Shinshima, E. Yoshimura, K. Chiba, M. Tada, I. Sakaguchi *J. Chem. Soc. Perkin trans I*, **2002**, 2251-2255.
- ²³⁴ B. T. Gregg, K. C. Golden, J. F. Quinn. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5890-5893.
- ²³⁵ V. K. Aggarwal, B. Olofsson *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5516–5519.
- ²³⁶ D. S. Noyce, B. N. Bastian, P. T. S. Lau, R. S. Monson, B. Weinstein *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 1247-1252.
- ²³⁷ T. A. Grese, S. Cho, H. U. Bryant, H. W. Cole, A. L. Glasebrook, D. E. Magee, D. L. Phillips, E. R. Rowley, L. L. Short *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 201-206.
- ²³⁸ Brevet: D. J. Madar, S. W. Djuric, M. J. Michmerhuizen, H. A. Kopecka, X. Li, K. L. Longenecker, Z. Pei, D. Pireh, H. Sham, K. D. Stewart, B. G. Szczepankiewicz, P. E. Wiedeman, H. Yong. US20050215784, **2005**.