N° d'ordre : 3900

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par **Damien JAMES**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : CHIMIE ORGANIQUE

****

DEVELOPPEMENT D'OUTILS ORGANOMETALLIQUES EN VUE DU TRANSFERT DE METHYLE, APPLICATION A LA SYNTHESE DE RADIOTRACEURS POUR LA TEP

****

Soutenue le : 30 novembre 2009

Après avis de :

M.	F. DENAT	Professeur, Université de Bourgogne	**Rapporteur**
Mme.	I. GILLAIZEAU	Maître de Conférences, Université d'Orléans	**Rapporteur**

Devant la commission d'examen formée de :

Mme.	M. ALLARD	Professeur, Université de Bordeaux 2	**Examinateur**
M.	F. DENAT	Professeur, Université de Bourgogne	**Rapporteur**
Mme.	I. GILLAIZEAU	Maître de Conférences, Université d'Orléans	**Rapporteur**
M.	J.M. ESCUDIER.	Chargé de Recherche CNRS, Université de Toulouse 3	**Examinateur**
M.	B. BENNETAU	Directeur de Recherche CNRS, Université de Bordeaux 1	**Examinateur**
Mme.	M. SZLOSEK-PINAUD	Maître de conférences, Université de Bordeaux 1	**Co-directrice de thèse**
M.	E. FOUQUET	Professeur, Université de Bordeaux 1	**Directeur de thèse**

- 2009 -

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier les personnes qui ont composé le jury lors de ma soutenance : Pr. Michèle Allard, Pr. Bernard Benetau, Dr. Jean-Marc Escudier et plus particulièrement Dr. Isabelle Gillaizeau et Pr. Franck Denat qui ont bien voulu rapporter mon manuscrit. Je les remercie pour les remarques constructives qui ont permis d'améliorer la qualité de mon manuscrit de thèse.

Je remercie également mes directeurs de thèse, le Pr. Eric Fouquet ainsi que le Dr. Magali Slozek-Pinaud pour leur disponibilité et leur confiance tout au long de ces trois années pour mener un projet si intéressant. Magali, nous avons eu des hauts et des bas mais avec du recul je pense que nous avons fait du bon travail ensemble.

Je ne saurais continuer ces remerciements sans remercier Jean-Marc Escudier. Je suis vraiment très heureux d'avoir pu collaborer avec toi et je peux dire que sans toi, le projet n'aurait pu se développer de cette manière. Durant mes différents séjours dans ton laboratoire, tu m'as fait partager ton expérience des nucléosides et oligonucléotides qui m'a permis de mieux appréhender les différentes synthèses de thymidines modifiées. J'ai vraiment apprécié tes qualités humaines (surtout ton sens de l'humour), ta disponibilité et ton immense culture générale.

Je remercie l'ensemble du service d'analyses du CESAMO et plus particulièrement Jean-Claude Lartigues et Noël Pinaud pour leur disponibilité et leur aide en RMN, Christiane Vitry et Claire Mouche pour la masse. Christiane, merci de t'avoir donné autant de mal pour analyser mes oligonucléotides.

Je tiens également à remercier deux personnes : Fabrice et Titi pour leur sympathie et surtout leur sens de l'humour un peu « gras » mais toujours le bienvenu.

Mes remerciements vont également aux membres permanents du groupe Synthèse, Yannick Landais, François-Xavier, Fred et Valérie. Valérie, ce fut un réel plaisir d'évaluer ton sens de l'humour en te taquinant pendant ces trois années. Merci également à Jürgen, le râleur invétéré du grand labo et fan de Patrick Sébastien pour sa chanson « le petit bonhomme en mousse ». Je me souviendrai longtemps de notre petite partie de rugby à la campagne. Mis à part ton côté bout en train, toujours prêt à dire ou à faire une blague, je te remercie pour ton aide et ta collaboration. Je ne pourrais oublier Anil, ta générosité, ta gentillesse ainsi que ton savoir m'ont marqué à vie.

Je remercie également les techniciens, anciens et nouveaux, du groupe Synthèse : Fifine, Mumu, Marie-Hélène et le nouveau venu Dimitri.

Merci à tous les thésards et post-doc du groupe Synthèse pour leur bonne humeur et les bons moments partagés ensemble. Tout d'abord les anciens : Isabelle « Zaza », toujours à l'affût du moindre potin mais aussi toujours là pour me faire rater une distillation de « Stanny », Edouard, le chimiste le plus talentueux que j'ai rencontré et véritable SciFinder ambulant, Géraldine dit Gégé, vive St Lambert du Lattay et la douceur angevine. Puis les actuels : les « radicalistes », Lolo, tu es un personnage à part entière ne change rien, merci, Guy, Emeline ; le « grand labo », Dawood, courage c'est bientôt fini,

Sylvestre, ta gentillesse et ton sens de l'humour m'ont vraiment touché, Redouane Beniazou, toujours à marchander, ce qui est normal pour un marocain, j'espère que l'on ne se perdra pas de vue et merci pour ton thé à la menthe, Anthony et Thomas, ce fut bref mais j'ai été ravi de passer quelques mois avec vous, Thomas je te laisse le sujet avec confiance, je sais que tu en feras quelque chose de bien ; la team Fouquet, Eric le Barbu, quelques kilos de brutalité dans un monde de douceur, merci pour ton aide et tes conseils Professeur Tournesol, Sandy, Mlle Ouech-Ouech, merci pour tes petites histoires dans lesquelles tu es dans des situations impossibles et enfin Luma, la douceur incarnée avec tout de même une sacrée pointe d'humour.

Je voudrais également remercier « en vrac » les thésards des autres groupes pour leur sympathie à chaque fois que l'on s'est croisé dans les couloirs ou en RMN : Elodie, Claire, Abdou et Daniel.

Je tiens à remercier Séverine et Nico ainsi qu'Emilie et Olivier avec qui j'ai eu la chance de tisser des liens d'amitié au cours de soirées bien arrosées et de discussions enflammées.

Au cours de cette thèse, une personne spéciale a croisé mon chemin, Mademoiselle Julie DUNET. Je te dois tout ce qui m'est arrivé de merveilleux pendant ces trois années. Tu as été là dans les moments heureux comme dans les moments de découragements où tu as su me redonner confiance. Je te remercie du plus profond du cœur.

Je remercie également la famille Dunet d'avoir veiller à ma santé mentale grâce à mes nombreux séjours dans le pays du Lot et Garonne.

Enfin je souhaite remercier ma famille qui m'a poussé et a cru en moi tout au long de mon cursus. Cet aboutissement a également été rendu possible grâce à vous.

SOMMAIRE

ABBREVIATIONS **1**

INTRODUCTION **3**

PARTIE A : LA TOMOGRAPHIE PAR EMISSION DE POSITONS **7**

1 Généralités **9**

1.1 Principe 9

1.2 Les émetteurs β^+ 10

2 TEP et diagnostic **12**

2.1 Mise en place d'un examen TEP 12

2.2 Conditions requises pour l'exploitation optimale d'un radiotraceur en TEP pour le diagnostic 14

2.3 Les radiopharmaceutiques utilisés en routine dans les services de médecine nucléaire pour le diagnostic 15

2.3.1 Le 2-deoxy-2-[^{18}F]-Fluoro-D-glucose ([^{18}F]-FDG) 15

2.3.2 La 2'-déoxy-2'-[^{18}F]-fluorothymidine ([^{18}F]-FLT) 16

2.3.3 La 6-[^{18}F]-Fluoro-L-DOPA ([^{18}F]-FDOPA) 18

2.3.4 Conclusion 21

PARTIE B : CARBONE 11 ET BIOMOLECULES **23**

1 Méthodes d'introduction du carbone 11 dans des molécules organiques **25**

1.1 Les réactions de cyanation 26

1.1.1 [^{11}C]-Cyanation nucléophile 26

1.1.2 [^{11}C]-Cyanation pallado-assistée 27

1.2 Les réactions de [^{11}C]-méthylation 28

1.2.1 Les [^{11}C]-Méthylations électrophiles 28

1.2.1.1 $^{11}CH_3I$ et $^{11}CH_3OTf$ 28

1.2.1.1.1 *N*-alkylation 30

1.2.1.1.2 *O*-Alkylation 44

1.2.1.1.3 *S*-alkylation 50

1.2.2 Les [^{11}C]-méthylations nucléophiles 51

1.2.2.1 Le couplage de Suzuki 52

1.2.2.2 Le couplage avec les organoétains 53

1.2.2.2.1 Le couplage de Stille « classique » 53

1.2.2.2.2 Le Couplage de Stille selon Vedejs 55

1.2.2.2.3 Le couplage de Stille modifié 56

1.2.2.3 Hydrozirconation 58

1.3 Réactions de [^{11}C]-carbonylation 59

1.3.1 Synthèse de [^{11}C-carbonyle]-cétones 59

1.3.2 Synthèse d'amides 61
1.3.3 Synthèse d'urées et carbamates 64
1.3.4 Synthèse d'acides carboxyliques 65
1.3.5 Formation d'[^{11}C]-iodoalcanes 66
1.4 Conclusion 67

2 Application au marquage de biomolécules au ^{11}C pour la TEP 67
2.1 Définition d'une biomolécule organique 68
2.2 Les monomères 68
2.2.1 Les acides aminés 68
2.2.2 Les mono-saccharides 72
2.2.2.1 Traceur des transporteurs de glucose 72
2.2.2.2 Visualisation de l'expression du gène LacZ 73
2.2.3 Les nucléosides 74
2.2.3.1 Substrats et inhibiteurs d'enzymes 74
2.2.3.2 Evaluation de l'expression de gènes 76
2.2.3.3 Prolifération cellulaire 77
2.3 Les polymères biologiques 77
2.3.1 Marquage avec d'autres émetteurs β^+ que le ^{11}C 78
2.3.2 Introduction du ^{11}C 79
2.3.2.1 Peptides et protéines 79
2.3.2.2 Oligonucléotides 82

3 Conclusion 84

PARTIE C : MODIFICATION DE NUCLEOSIDES ET TRANSFERT DE METHYLE 85

1 Introduction 87
1.1 Les aptamères 87
1.2 Stratégie envisagée 91

2 Synthèse des nucléosides modifiés 92
2.1 Les phosphorothioesters 92
2.2 Les 5'-(*N*-carboxamido)-adénosines 94
2.3 La 5'-(*N*-(3-iodobenzyl)-carboxamido)-thymidine 96
2.4 Les thymidines 5'-C-substituées 102
2.4.1 La (5'S)-C-(1-(pent-3-ényl)-(4-(4-iodophénoxy)-méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine 355 103
2.4.2 Les 5'-C-(1, 2, 3-triazol-4-yl)-thymidines 107
2.4.2.1 Introduction de la partie alcyne sur la thymidine : 107
2.4.2.2 Synthèse des partenaires azotures 110
2.4.2.3 Formation des 5'-C-(1, 2, 3-triazol-4-yl)-thymidines 111
2.5 Conclusion 112

3 Etude du transfert de méthyle sur les nucléosides modifiés 113

3.1 Généralités 113
3.1.1 Le couplage de Stille 113
3.1.2 Couplage de Stille modifié 115
3.1.2.1 En chimie du ^{12}C 115
3.1.2.2 En chimie du ^{11}C 117
3.2 Les phosphorothioesters 117
3.2.1 Choix du solvant de réaction 118
3.2.2 Influence de la température 119
3.2.3 Influence du ligand 120
3.3 Les amides 121
3.3.1 Les 5'-(N-carboxamido)-adénosines 304 et 305 121
3.3.2 La 5'-(*N*-(4-iodobenzyl)carboxyamido)-thymidine 332 123
3.4 Les triazolyl-thymidines 127
3.4.1 Sur la (5'S)-C-(1-(pent-3-ényl)-(4-(4-iodophénoxy)-méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (*S*)-358 127
3.4.1.1 Influence de la nature du catalyseur 127
3.4.1.2 Influence de l'ajout d'un additif 128
3.4.2 Sur la 5'-C-(1-(4-iodobenzyl)-4-méthyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine 371 .. 129
3.4.3 Sur la 5'-C-(1-(2-(2-(4-iodophénoxy)éthoxy)éthyl)-4-méthyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine 372 131
3.5 Conclusion : 132

4 Application à la méthylation sur des nucléosides halogénés sur la base azotée 135

PARTIE D : TRANSFERT DE METHYLE SUR DES OLIGONUCLEOTIDES 139

1 Incorporation des thymidines modifiées 141
1.1 Synthèse des phosphoramidites 141
1.2 Synthèse et purification des oligonucléotides 142

2 Etude de la méthylation des ODN 149
2.1 Première approche et limites de l'étude préliminaire 149
2.2 Adaptation des conditions à la spécificité du substrat 150
2.2.1 Adaptation du système aux conditions diluées 150
2.2.1.1 Sur un monomère 150
2.2.1.1.1 Influence de l'additif 150
2.2.1.1.2 Détermination d'un système de solvants adéquates 151
2.2.1.2 Sur un dinucléotide 153
2.2.1.2.1 Synthèse d'un dinucléotide 153
2.2.1.2.2 Etude du transfert de méthyle 154
2.2.1.3 Applications de conditions à la méthylation des ODN 154
2.2.2 Adaptation du système à la complexation du palladium 155
2.2.2.1 Augmentation de la charge en palladium 155

2.2.2.2 Utilisation de phosphines 157
2.2.2.2.1 Sur le dinucléotide 157
2.2.2.2.2 Sur les ODNs 158
3 Conclusion 159
CONCLUSION 161
EXPERIMENTAL PART 167

ABBREVIATIONS

ADN:	acide 2'-désoxyribonucléique
APTS :	acide *para*-toluènesulfonique
ARN:	acide ribonucléique
BINAP:	2,2′-bis(diphénylphosphino)-1,1′-binaphthalène
DIEA:	N,N-diisopropyl-éthyl-amine
DMF:	N,N,-diméthylformamide
DMSO:	diméthylsulfoxyde
dppf:	1,1′-bis(diphénylphosphino)ferrocène
Eq:	équivalents
GABA:	acide gamma-aminobutyrique
GFAP :	acide protéique fibrillaire glial
iPr:	*iso*-propyle
K_{222} :	Kryptofix® 222
M:	mole par litre
NMP:	1-méthyl-2-pyrrolidinone
Ns :	nosyle
RRC :	rendement radiochimique corrigé de la décroissance
TBAF:	fluorure de tétrabutylammonium
TBAH:	hydroxyde de tétrabutylammonium
TBDPS:	*tert*-butyldiphénylsilyle
tBu:	*tert*-butyle
Tf:	triflate
THF:	tétrahydrofurane
TMS:	triméthylsilyle
Ts:	tosyle
VEGF :	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, la Tomographie par Emission de Positons (TEP) est devenue un outil performant pour visualiser de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques. Son principe est basé sur l'utilisation *in-vivo* d'éléments radioactifs, principalement le carbone 11 et le fluor 18. Ces radioéléments doivent être introduits chimiquement au sein de vecteurs de façon rapide et avec une radioactivité spécifique élevée. Récemment, de nouveaux vecteurs oligonucléotidiques ont été mis au point. Ces oligonucléotides, appelés aptamères, possèdent une affinité et une spécificité, pour une cible considérée, supérieures aux vecteurs traditionnels. Ils apparaissent donc comme des radiotraceurs potentiels. Il est alors nécessaire de développer des méthodes de radiomarquage compatibles à la fois avec la courte demi-vie des radioéléments et la nature du substrat.

L'équipe du Pr. Fouquet a montré que le couplage de Stille modifié, en présence de monométhylétain activé par une source de fluor, permettait la [^{11}C]-méthylation de modèles aromatiques, hétéro-aromatiques dans des conditions rapides respectant la durée de vie du carbone 11 et était applicable à la radiosynthèse de ligands des récepteurs NK3. Cette méthode a donc été envisagée pour la [^{11}C]-méthylation d'oligonucléotides.

Tout d'abord, la TEP ainsi que les différents radiotraceurs utilisés dans les services de médecine nucléaire seront présentés. Les méthodes d'introduction du carbone 11 au sein de molécules organiques et bio-organiques seront ensuite décrites en mettant en avant l'intérêt de la [^{11}C]-méthylation par couplage de Stille modifié. Puis la synthèse de différents nucléosides et d'un nucléotide ainsi que les résultats de l'étude méthodologique de transfert de méthyle en chimie du carbone 12 sur ces substrats seront présentés. Enfin, l'étude de la méthylation de 2 oligonucléotides modèles, obtenus par incorporation des nucléosides les plus prometteurs, sera discutée avant de conclure sur des perspectives.

PARTIE A :

LA TOMOGRAPHIE PAR EMISSION DE POSITONS

PARTIE A : LA TOMOGRAPHIE PAR EMISSION DE POSITONS

1 Généralités

1.1 Principe

La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une technique d'imagerie médicale fonctionnelle non invasive reposant sur l'utilisation de molécules marquées par un radioélément émetteur de positons β+. Elle permet de mettre en évidence des phénomènes biologiques au niveau moléculaire tels que les divisions cellulaires, l'activité de macromolécules biologiques (récepteurs, enzymes, anticorps). Elle peut également apporter des données concernant la pharmacocinétique et le mode d'action d'un principe actif facilitant ainsi son développement et aidant à déterminer la dose minimum efficace[1].

La TEP repose sur la détection par une caméra de paires de photons γ de 511 KeV émis en coïncidence (à 180° l'un de l'autre). Ceux-ci sont produits lors du phénomène d'annihilation résultant de la rencontre entre une particule β^+, générée au cours de la désintégration du radioélément, et d'un électron de la matière (Figure 1).

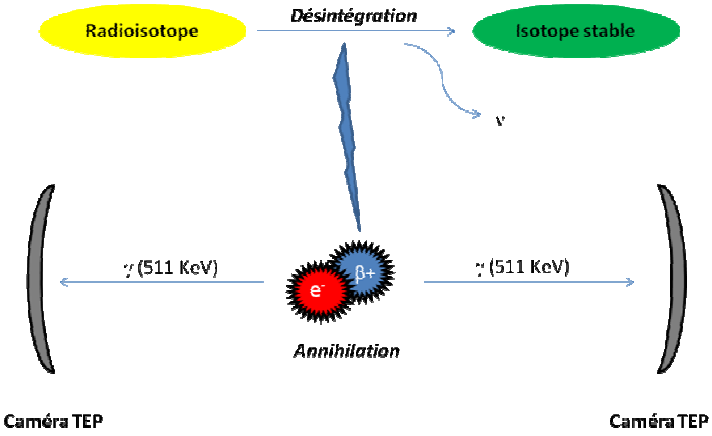


Figure 1 : Principe de la TEP : annihilation du positon émis.

Les coïncidences sont converties en images tomographiques grâce à l'utilisation de techniques de reconstruction mathématique. L'enregistrement de millions de coïncidences est nécessaire pour construire une image TEP tridimensionnelle.

Les contraintes de la TEP tiennent principalement à la courte période caractérisant les radionucléides utilisés et au coût engendré par des installations. De ce fait, il est nécessaire que la synthèse du radiotraceur, son injection au patient ainsi que la TEP elle-même soient réalisées

[1] Wang, J. L.; Maurer, L.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, 5, 1053.

dans un temps très court. Pour cela le cyclotron, le laboratoire de radiosynthèse et la caméra TEP sont généralement installés sur le même site.

Néanmoins, la courte demi-vie des radioisotopes est également son principal avantage car elle limite le temps d'irradiation du patient et les quantités de radiotraceurs injectées (10-100 nmoles) grâce à une radioactivité spécifique particulièrement élevée. De plus, la TEP est une technique d'imagerie médicale présentant une bonne résolution spatiale puisqu'elle est théoriquement de l'ordre de 3-4 mm[2]. Cependant, en pratique clinique elle est de l'ordre de 5 à 10 mm.

En 2007, la France comptait 27 cyclotrons et près de 15 centres médicaux sont actuellement équipés de caméra TEP dont Bordeaux, Toulouse, Lyon, Caen, Rennes, Nantes et Orsay.

1.2 Les émetteurs β^+

Près de 40% des atomes possèdent des isotopes émetteurs β^+, dont les atomes constitutifs des molécules du vivant : ^{11}C, ^{13}N et ^{15}O. Ils sont produits par réaction nucléaire au sein d'un cyclotron.

Comme tout radioélément, les émetteurs de β^+ sont caractérisés par :

- ✓ un temps de demi-vie (temps au cours duquel la moitié des atomes se désintègrent) calculé à partir de la constante de désintégration λ, caractéristique du noyau radioactif (Figure 2).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

Figure 2: Temps de demi-vie $t_{1/2}$.

- ✓ un mode de décroissance. Un émetteur β^+ se désintègre en émettant un positon, un neutrino (ν) et l'élément situé à gauche dans la classification périodique des éléments. Par exemple, le ^{11}C se désintègre en ^{11}B et le ^{19}F en ^{18}O (Figure 3).

$$^{11}C \longrightarrow {}^{11}B + \beta^+ + \nu$$

$$^{18}F \longrightarrow {}^{18}O + \beta^+ + \nu$$

Figure 3: Désintégration du ^{11}C et du ^{18}F.

[2] Guilbaud, N. *Bull. Cancer.* **2005**, 92, 1, 45.

- ✓ une radioactivité spécifique RAS (nombre de désintégrations par unité de temps et par mole). Elle est inversement proportionnelle au temps de demi-vie du radioélément (Figure 4). Les émetteurs de positons ont donc une RAS élevée.

$$RAS=\lambda Na=\frac{\ln 2}{t_{1/2}\times 60}\times 6.02\times 10^{23}$$ (Na : nombre d'Avogadro)

Figure 4 : RadioActivité Spécifique RAS

Le tableau ci-dessous présente les propriétés physiques des principaux émetteurs de positons employés pour la TEP.

Radioélément	$t_{1/2}$ (min)	RAS (GBq/mol)	Mode de décroissance (%)	Produit de désintégration
^{18}F	109.8	$6.33\ 10^{10}$	β^+ (96.9)	^{18}O
^{11}C	20.4	$3.41\ 10^{11}$	β^+ (99.8)	^{11}B
^{13}N	9.96	$6.98\ 10^{11}$	β^+ (100)	^{13}C
^{15}O	2.08	$3.36\ 10^{12}$	β^+ (99.9)	^{15}N
^{68}Ga	68.1	1.02 1011	β+ (89%)	^{68}Ge
^{64}Cu	762	9.13 109	β+ (59%)	^{64}Ni

Tableau 1: Principaux émetteur de β^+.

En raison de leur période trop courte, la chimie impliquant l'oxygène 15 et l'azote 13 reste très limitée à l'inverse du ^{11}C et du ^{18}F.

La présence d'atome de carbone dans les molécules naturelles et pharmaceutiques font du carbone 11 un émetteur de positons très attractif. En effet, les molécules marquées au carbone 11 se comporteront de la même façon, biologiquement et chimiquement que leur homologues non-marqués. De plus, la chimie du carbone étant très vaste, elle offre la possibilité d'un large éventail de réaction pour introduire un atome de ^{11}C. Néanmoins, du fait de sa courte durée de demi-vie ($t_{1/2}$ = 20.4 min), le radiomarquage au ^{11}C doit être réalisé à la dernière étape de synthèse. La radio-synthèse multi-étape sera donc difficilement envisageable.

Concernant le ^{18}F, les molécules organo-fluorés biologiquement actives sont peu nombreuses. Cela implique la nécessité d'introduire un atome de fluor sur une molécule n'en contenant pas par fluoration direct ou en faisant intervenir un groupement prosthétique (groupement alkyl ou aryle synthétisé en quelques étapes) contenant un atome de fluor. Les effets de cette modification sur les propriétés biologiques devront être étudiés et comparés avec la molécule non fluorée.

2 TEP et diagnostic

2.1 Mise en place d'un examen TEP

Dans sa globalité, l'examen TEP se déroule en 4 étapes (Figure 5) :

1) Le cyclotron génère le radioélément voulu par réaction nucléaire. Dans le cas du ^{11}C seul les précurseurs primaires ($^{11}CH_4$, $^{11}CO_2$) sont produits.

2) Le radiochimiste synthétise le radiotraceur adapté en incorporant le radioélément par réaction chimique à un ligand le plus pertinent pour visualiser le phénomène souhaité. La radiosynthèse, la purification et le conditionnement sont réalisés dans une cellule blindée en plomb.

3) Le médecin nucléaire injecte le traceur radioactif dans le patient et le place au centre de la couronne de détecteurs de la caméra TEP qui détectent les rayonnements γ émis à la suite de la désintégration du radioélément.

4) Le traitement informatique des enregistrements des détecteurs permet d'élaborer des images tridimensionnelles de la zone où le radiotraceur s'est accumulé. Le médecin peut alors faire son diagnostic.

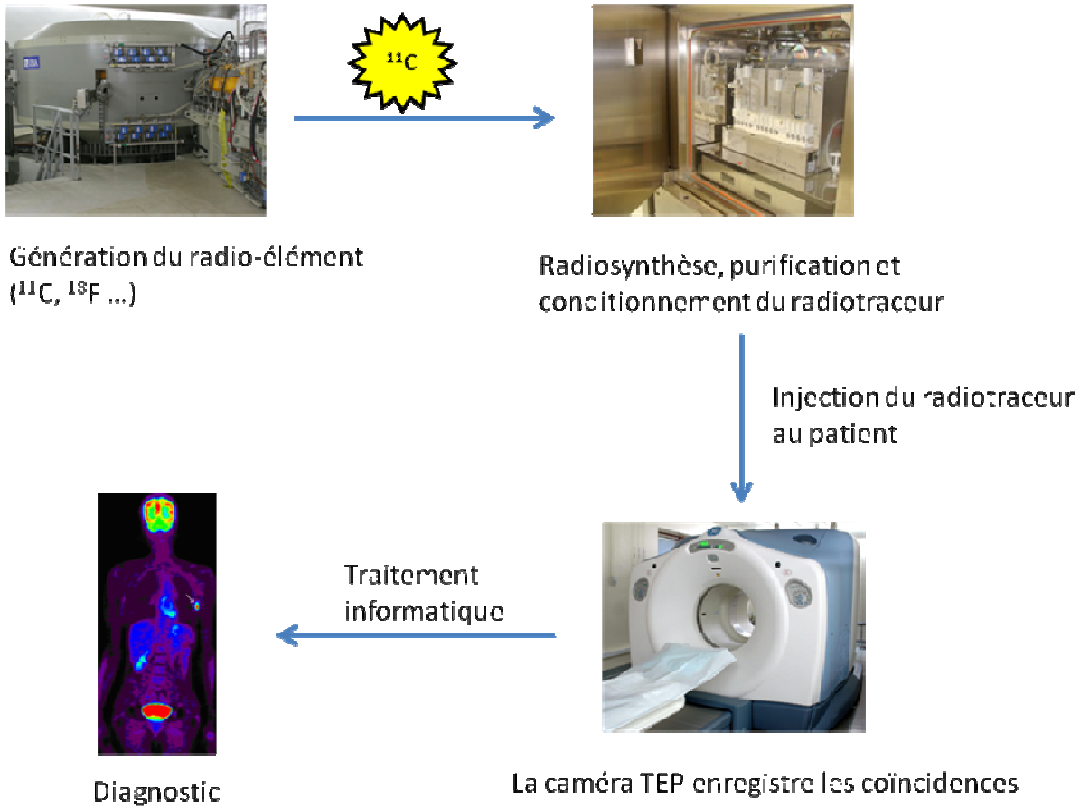


Figure 5: Les différentes étapes de l'examen TEP.

La TEP est utilisée dans différents domaine de la médecine :

- En oncologie pour le diagnostic de tumeurs. L'accumulation et la métabolisation du radiotraceur au sein de l'organisme va permettre de diagnostiquer la présence ainsi que la progression des cellules tumorales[3,4,5].

- En cardiologie pour mettre en évidence les troubles cardiaques au niveau du myocarde[6,7,8].

- En neurologie pour étudier des neuropathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson[9,10] et en psychatrie.

[3] Wood, K. A.; Hoskin, P. J.; Saunders, M. I.; *Clin. Oncol.* **2007**, 19, 237.
[4] Weber, W. A. ; *J. Clin. Oncol.* **2006**, 24, 3282.
[5] Oriuchi, N.; Higuchi, T.; Ishikita, T.; Miyakubo, M.; Hanaoka, H.; Iida, Y.; Endo, K.; *Cancer Sci.* **2006**, 97, 1291.
[6] Schwaiger, M.; Ziegler, S.; Nekolla, S. G.; *J. Nucl. Med.* **2005**, 46, 1664.
[7] Di Carli, M. F.; Dorbala, S.; Meserve, J.; El Fakhri, G.; Sitek, A.; Moore, S. C.; *J. Nucl. Med.* **2007**, 48, 783.
[8] Dekemp, R .A.; Yoshinaga, K.; Beanlands, R. S. B.; *J. Nucl. Cardiol.* **2007**, 14, 380.
[9] Herholz, K.; Heiss, W. D.; *Mol. Imaging Biol.* **2004**, 6, 239.
[10] Cai, L. S.; Innis, R. B.; Pike, V. W.; *Curr. Med. Chem.* **2007**, 14, 19.

2.2 Conditions requises pour l'exploitation optimale d'un radiotraceur en TEP pour le diagnostic

Afin de permettre l'utilisation routinière de radiopharmaceutiques dans les services de médecine nucléaire, ils doivent répondre à plusieurs exigences:

- ✓ L'échange d'un isotope stable constitutif par son radioisotope ne doit pas modifier l'interaction *in-vivo* de la molécule. Néanmoins, si on réalise l'incorporation d'un radioélément dont son isotope stable n'est pas présent initialement dans la molécule, le radiotraceur devra être étudié tout d'abord *in-vivo* afin de déterminer son affinité pour la cible considérée.

- ✓ Le radiotraceur doit présenter une haute sélectivité et affinité vis-à-vis d'une cible étudiée pour que les résultats soient interprétés avec le plus de fiabilité possible.

- ✓ Sa stabilité dans les conditions physiologiques doit être étudiée. Sa métabolisation dans le corps humain par l'action d'enzymes peut être une limite de son utilisation. De plus, les radiométabolites générés peuvent perturber les mesures et donc fausser les interprétations faites par le médecin. Pour pallier à ce problème, la radiosynthèse peut être modifiée afin de générer des métabolites « froids » non détectables.

- ✓ Le radiotraceur doit avoir une pharmacocinétique appropriée par rapport à la période du radioisotope.

- ✓ La radioactivité spécifique du radiotraceur synthétisé doit être la plus élevée possible afin que les quantités injectées au patient soient les plus faibles. Une injection importante pourra causer une saturation dans le cas de l'étude de récepteurs présents en faible quantités. La production du radionucléide par le cyclotron, le temps de synthèse et la pureté radiochimique du radioligand font l'objet d'optimisation permanente. Pour une utilisation optimale du radiopharmaceutique, le temps qui s'écoule entre la production de radionucléide, la synthèse, le contrôle qualité et le conditionnement du radiopharmaceutique ne doit pas dépasser 3 temps de demi-vie du radioélément.

On distingue principalement trois types de radiotraceurs utilisés en médecine nucléaire et particulièrement en TEP pour le diagnostic en fonction de la nature du ligand:

- ✓ des substances endogènes telles que des aminoacides, neurotransmetteurs ou hormones.

- ✓ des composés spécialement synthétisés pour réaliser des mesures physiologiques (pression artérielle, vasodilatation).

- ✓ des ligands spécifiques de protéines, récepteurs ou inhibiteurs d'enzymes.

2.3 Les radiopharmaceutiques utilisés en routine dans les services de médecine nucléaire pour le diagnostic

L'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) est une autorisation nationale ou européenne pour la commercialisation après évaluation de la qualité, de la sécurité et de l'efficacité d'une spécialité pharmaceutique. Ce document officiel est constitué d'une décision et d'annexes dont le résumé des caractéristiques du produit, la notice et l'étiquetage. (Art. L.5121-8 du Code de la Santé Publique).

A ce jour plus de 600 composés ont déjà été marqués par un émetteur de positons mais seulement 3 d'entre eux ont reçu l'AMM afin d'être utilisés en routine dans les services de médecine pour le diagnostic. Les autres candidats sont pour l'instant utilisés sur le petit animal dans les centres de recherche.

2.3.1 Le 2-désoxy-2-[^{18}F]-Fluoro-D-glucose ([^{18}F]-FDG)

Le [^{18}F]-FDG est un analogue du glucose au niveau duquel l'hydroxyle en position 2 est substitué par un atome de fluor 18 (Figure 6).

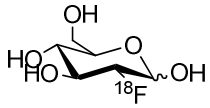


Figure 6: 2-deoxy-2-[^{18}F]-fluoro-D-glucose ou [^{18}F]-FDG.

Il se comporte de la même manière que le glucose *in-vivo*. Il est transporté vers les tissus cibles par le plasma et phosphorylé par une hexokinase en position 6. La suite de la métabolisation (conversion glucose/fructose) est alors stoppée du fait de la présence d'un atome de fluor 18 à la place de l'hydroxyle en 2. Une accumulation du [^{18}F]-FDG-6-phosphate, appelée alors impasse métabolique, est donc observée dans la cellule. Un examen par TEP permettra de visualiser cette accumulation. Les cellules cancéreuses étant de grosses consommatrices de glucose, le [^{18}F]-FDG est donc utilisé en tant que radiotraceur pour le diagnostic en oncologie. Pour cela, il a reçu l'AMM en 1998.

Le [^{18}F]-FDG a été synthétisé pour la première fois décrit par Tatsuo Ido et Alfred Wolf en 1977[11]. Depuis les méthodes de synthèse ont été constamment optimisée. En 1984, Ehrenkaufer *et al*.[12] décrive la synthèse du [^{18}F]-FDG par fluoration directe du D-glucal en

[11] Ido T., Wan C. N., Fowler J. S., Wolf A. P., *J. Org. Chem*. **1977**, 42, 2341.
[12] Ehrenkaufer R. E., Potocki J. F., Jewett D. M., *J. Nucl. Med.* **1984**, 25, 333.

présence d'[^{18}F]-hypofluorite d'acétyle (Figure 7) avec un rendement radiochimique corrigé de la décroissance (RRC) de 36% et une pureté radiochimique supérieure à 95 %.

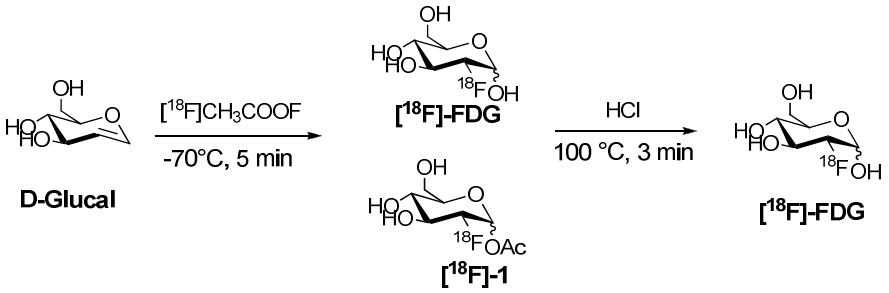


Figure 7: Synthèse du [^{18}F]-FDG à partir du D-glucal.

Actuellement, le [^{18}F]-FDG est synthétisé en routine par substitution nucléophile à partir du 2-triflate-β-mannose tetra-acétylé **2** en présence de [^{18}F]-KF en 30 minutes avec un RRC de 70% (Figure 8) selon la méthode décrite par Hamacher *et al.*[13]

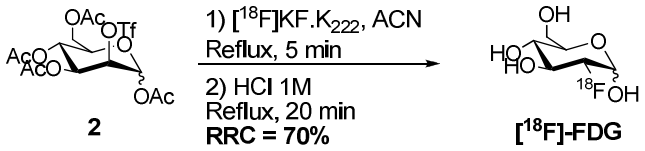


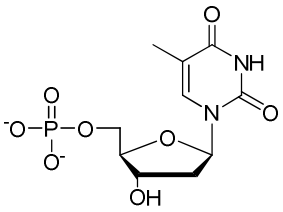
Figure 8: Synthèse du [^{18}F]-FDG à partir d'un dérivé du mannose[13].

Le [^{18}F]-FDG est considéré comme le radiotraceur de choix pour le diagnostic et la stadification de cancers par TEP. Actuellement, plus de 90 % des études TEP sont réalisées en utilisant le [^{18}F]-FDG. Bien qu'il donne des résultats satisfaisants, sa principale limitation est son manque de spécificité à l'origine de faux positifs. En effet, certaines cellules saines ou affectées par d'autres processus pathologiques (inflammation) consomment également du glucose en grande quantité seront donc également visibles lors d'un examen TEP. C'est ainsi que la plupart des cancers au niveau cérébral ne pourront pas être diagnostiqués en utilisant le [^{18}F]-FDG. Par ailleurs, certaines tumeurs avec un haut potentiel métastatique (cancer de la prostate) n'absorbent que peu de glucose ce qui les rend indétectables par imagerie TEP-[^{18}F]-FDG.

2.3.2 La 2'-désoxy-2'-[^{18}F]-fluorothymidine ([^{18}F]-FLT)

Il existe de nombreux phénomènes biologiques mettant en évidence la présence de cellules cancéreuses. Visualiser un de ces phénomènes grâce à un radiotraceur spécifique constitue une alternative intéressante à l'utilisation du [^{18}F]-FDG. Parmi ces phénomènes, l'augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire est l'un des plus importants. Ainsi, le cycle cellulaire produisant l'ADN utilise la thymidine phosphorylé en 5' **3,** par la thymidine kinase I (Figure 9), enzyme dont l'activité dans les cellules malignes est trois fois supérieure à l'activité normale[14].

[13] Hamacher K., Coenen H. H., Stoicklin G., *J. Nucl. Med.* **1986**, 27, 235.
[14] Boothmann D. A., Davis T. W., Sahijdak W. M., *Int. J. Radit. Oncol. Biol. Phys.* **1994**, 30, 391-398.



3

Figure 9: Thymidine phosphorylée en 5'.

Le radiotraceur de prolifération cellulaire qui a été développé est la 3'-désoxy-3'-[^{18}F]-fluoro-thymidine ou [^{18}F]-FLT (Figure 10).

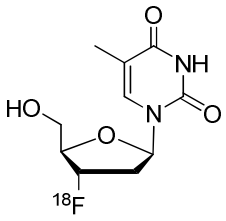


Figure 10: [^{18}F]-FLT.

Les recherches menées par l'équipe de J. S. Rasey [15] ont montré que la présence d'un atome de fluor en position 3' sur la thymidine ne modifie pas l'activité de la Thymidine Kinase I (TK_1) mais que le cycle cellulaire est interrompu après la première phosphorylation (Figure 11).

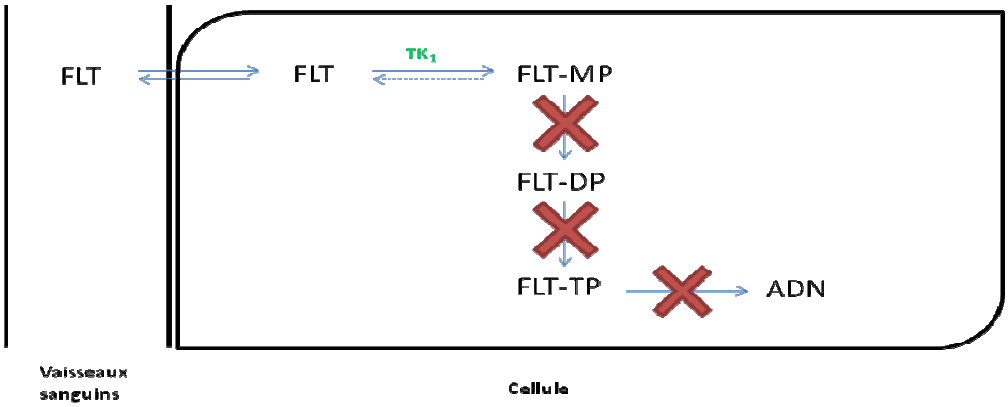


Figure 11: Métabolisation de la FLT au sein d'une cellule.

Les études sur la [^{18}F]-FLT utilisé comme radiotraceur de la prolifération cellulaire montrent une meilleures spécificité mais un manque de sensibilité par rapport au [^{18}F]-FDG[16]. Ce défaut de sensibilité peut être expliqué par deux facteurs. Tout d'abord, la présence du fluor en position 3' de la thymidine diminue l'affinité de la FLT pour les transporteurs spécifiques présents dans les vaisseaux sanguins par rapport à la thymidine[17]. De plus, l'affinité de la [^{18}F]-FLT pour la TK_1

[15] Rasey J. S., Grierson J. R., Wiens L. W., Kolb P.D., Schwartz J.L., *J. Nucl. Med.* **2002**, 43, 1210-1217.
[16] Been L. B., Suurmeijer A. J. H., Cobben D. C., Jager P. L., Hoekstra H. J., Helsinga P. H., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2004**, 31, 12, 1659.
[17] Gati W. P., Misra H. K., Knaus E. E., Wiebe L.I., *Biochem Pharmacol* **1984**, 33, 3325.

est 30 % inférieure à l'affinité de la thymidine[18] pour cette même enzyme. Ces mécanismes mènent à une meilleure assimilation et phosphorylation de la thymidine que de la [^{18}F]-FLT.

La [^{18}F]-FLT est synthétisée par fluoration nucléophile selon deux stratégies utilisant deux précurseurs différents (Figure 12): un dérivé protégé de la thymidine **4** et un dérivé de la 2,3'-anhydrothymidine **5**.

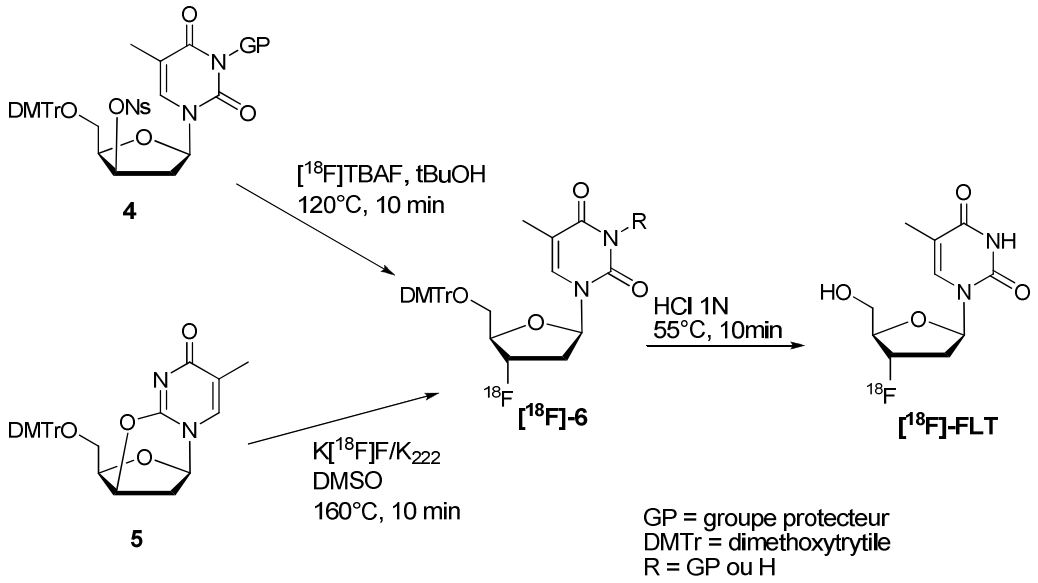


Figure 12: Synthèse de la [^{18}F]-FLT.

L'approche utilisant le nosylate **4** a été publiée pour la première fois par Grierson et Shields[19] en 2000 avec un RRC de 13 % et un temps de synthèse de 100 min. Les optimisations successives[20,21,22,23] ont permis de produire la [^{18}F]-FLT avec un RRC de 40 % en 60 min. Actuellement, cette méthode est la plus utilisée. La seconde stratégie fut décrite en 2000 par Machulla *et al.*[24] quelques mois après la publication de Grierson et Shields[19]. Le précurseur utilisé est l'anhydrothymidine protégée **5**. Le [^{18}F]-FLT est obtenue avec un RRC de 14 %

2.3.3 La 6-[^{18}F]-Fluoro-L-DOPA ([^{18}F]-FDOPA)

La dopamine est un des neurotransmetteurs majeur du système nerveux central. Elle joue un rôle important dans différentes fonctions incluant les mouvements, la cognition ou le comportement. Les troubles tels que la maladie de Parkinson et la schizophrénie sont le résultat de dysfonctionnements du système dopaminergique. La neurodégénérescence des neurones à dopamine entraîne la maladie de Parkinson tandis que l'augmentation

[18] Eriksson S., Kierdaszuk B., Munch-Petersen B., Oberg B., Johansson N. G., *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, 176, 586.
[19] Grierson J. R., Shields A. F., *Nucl Med Biol* **2000**, 27, 143.
[20] Martin S. J., Eisenbarth J. A., Wagner-Utermann U., Mier W., Haberkorn U., Eisenhut M., *J. Nucl. Med.* **2000**, 41, 255.
[21] Mosdzianowski C., Nader M., Korenjak C., Martin S. J., Eisenbarth J. A., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2001**, 28, 1228.
[22] Yun M., Oh S. J., Ha H. J., Ryu J. S., Moon D.H., *Nuc.l Med. Bio.l* **2003**, 30, 151.
[23] Moon B. S., Shim A. Y., Kim D. W., Kim S. E., Yand S. D., Chi D. Y., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **2003**, 46, S122.
[24] Machulla H. J., Blochter A., Kuntzsh M., Piert M., Wei R., Grierson J. R., J. Radioanal. Nucl. Chem. 2000, 243, 843.

dopaminergique caractérise la schizophrénie. La dopamine est biosynthétisée à partir de la L-p-tyrosine (Figure 13). La L-p-tyrosine est convertie en L-DOPA par la Tyrosine Hydroxylase (TH) qui est convertie rapidement en dopamine par l'enzyme Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (AAAD). La monoamine oxydase (MOA) permet d'obtenir la DOPAC. Les hydroxyles en position 3 sont ensuite méthylés par la catéchol-*O*-methyltransférase (COMT) présente dans les cellules sanguines, le foie et les tissus.

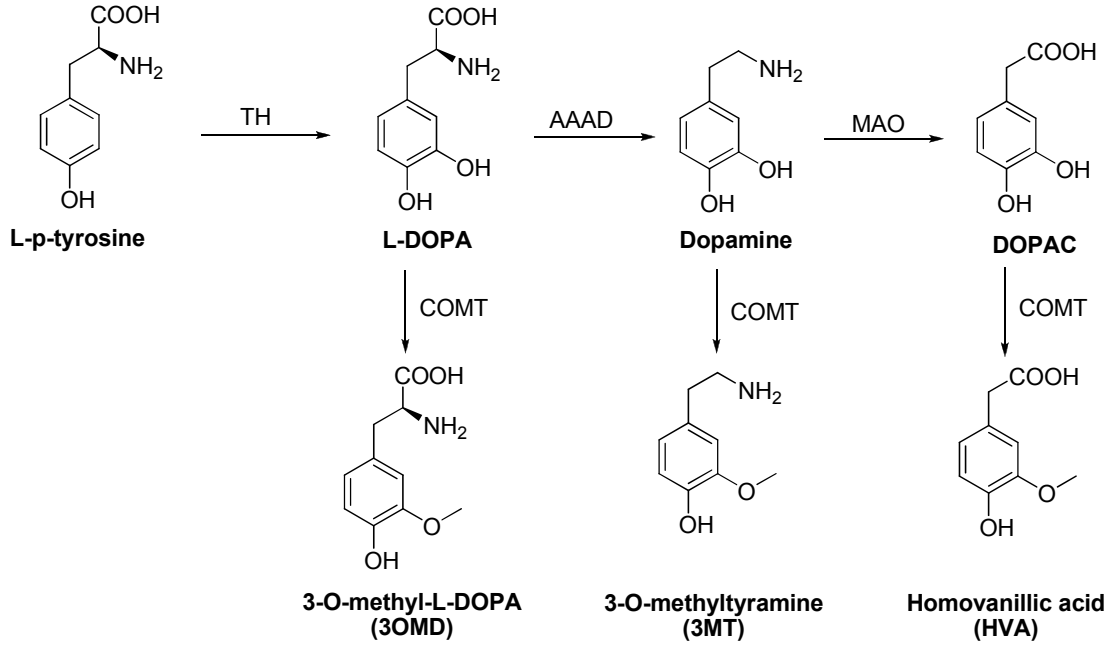


Figure 13: Métabolisme de la Dopamine.

La 6-[^{18}F]-Fluoro-L-DOPA a été le premier traceur du système dopaminergique. La première synthèse a été décrite en 1973 par Firnau[25] et les premiers essais sur l'homme ont été réalisés en 1983 par Garnett[26]. Depuis elle est utilisée pour diagnostiquer des troubles neuropsychiatriques telles que la maladie de Parkinson[27], la Schizophrénie[28], l'autisme[29] ou l'addiction aux drogues[30]. Elle a reçu l'AMM en novembre 2006.

La [^{18}F]-FDOPA suit parfaitement les étapes métaboliques de la L-DOPA. De ce fait, la 3-*O*-methyl-[^{18}F]-FDOPA ([^{18}F]-3OMFD) ainsi formée pénètre dans le cerveau et est distribuée uniformément. Ceci entraîne une augmentation du bruit de fond et une diminution du contraste compliquant ainsi l'analyse des images obtenues. Afin de quantifier l'absorption de la [^{18}F]-FDOPA dans le cerveau, des analyses sanguines sont réalisées régulièrement au cours du scanner TEP et le taux de [^{18}F]-3OMFD est déterminé. Ces prises de sang ont également pour but de diminuer la présence de [^{18}F]-3OMFD. Pour pallier ce problème, des inhibiteurs de

[25] Firnau G., Nahmias C., Garnett E. S., *Int. J. Radiat. Isot* **1973**, 24, 182.
[26] Garnett E. S., Firnau G., Nahmias C., *Nature* **1983**, 305, 137.
[27] Calne D. B., de la Fuente-Hernandez R., Kishore A., *J. Neural. Transm. Suppl.* **1997**, 50, 47.
[28] Hietala J., Syvalahti E., Vilkman H., Vuorio K., Raikkolainen V., *Schizophr. Res.* **1999**, 351, 41.
[29] Ernst M., Zametkin A. J., Matochik J.A., Pascualvaca D., Cohen R. M., *Lancet.* **1997**, 350, 638.
[30] Wu J. C., Bell K., Najafi A., Widmark C., Keator D., Tang C., Klein E., Bunney B. G., Fallon J., Bunney W. E., *Neuropsychopharmacology* **1997**, 176, 402.

COMT sont aussi utilisés[31] mais leurs effets secondaires sur le cerveau posent quelques problèmes[32].

La [^{18}F]-FDOPA est synthétisée selon 2 stratégies :

- Par <u>radiofluorodéstannylation</u> : la fluoration est réalisée sur le dérivé stannylé et protégé **9** de la L-DOPA commerciale en présence de fluor électrophile. Une déprotection en milieu acide permet d'obtenir la [^{18}F]-DOPA (Figure 14) avec Un RRC de 26% en 50 minutes à compter de la fin du bombardement[33]. Actuellement, c'est la méthode utilisée en routine.

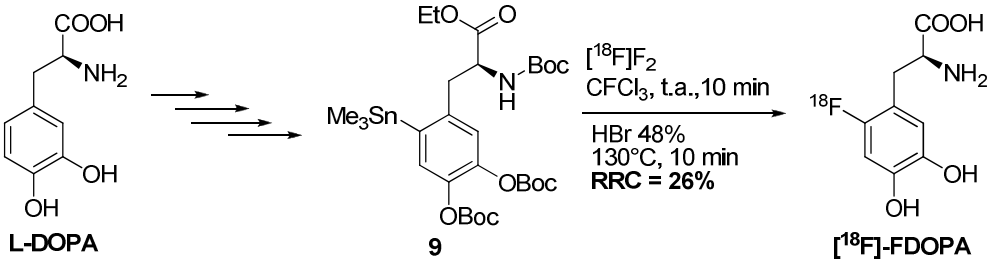


Figure 14: Synthèse de la [^{18}F]-DOPA par radiofluorodestannylation.

- Par <u>induction énantiosélective</u> : en 1994, Lemaire *et al.*[34] a décrit l'alkylation énantiosélective de l'imidazolidinone **14** par l'iodure de 2-[^{18}F]-Fluoro-4,5-diméthoxybenzyle **15**. La [^{18}F]-FDOPA est obtenue ensuite par hydrolyse en milieu acide (Figure 15). Cette synthèse est réalisée en 90 minutes avec un rendement radiochimique global de 23% et un excès énantiomérique supérieur à 95%.

[31] Doudet D. J., Chan G. L., Holden J. E., Morrison K. S., Wyatt R. J., Ruth T. J., *Neuropharmacology* **1997**, 6, 363.
[32] Leger G., Gjedde A., Kuwabara H., Gttman M., Cumming P., *Synapse* **1998**, 30, 351.
[33] Dollé F., Demphel S., Hinnen F., Fournier D., Vauffrey F., Crouzel C., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **1998**, 41, 105.
[34] Lemaire C., Damhaut P., Plenevaux A., Comar D., *J. Nucl. Med.* **1994**, 35, 12, 1996.

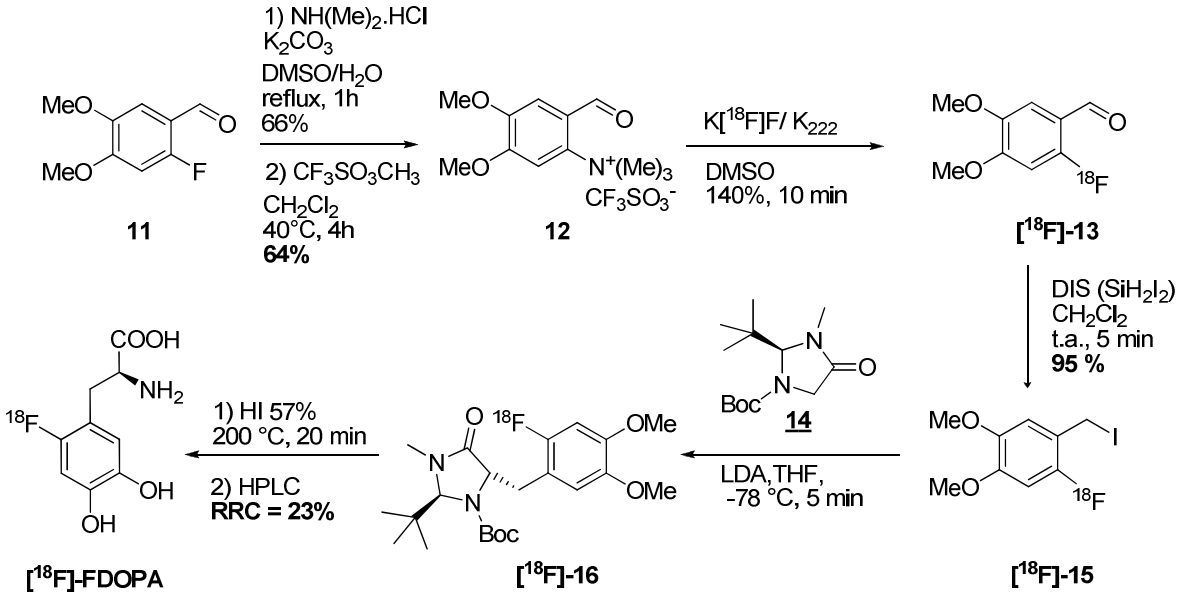


Figure 15: Synthèse de la [^{18}F]-DOPA par alkylation énantioselective de l'imidazolidinone.

En 2002, Zhang *et al.*[35] décrit la synthèse de la [^{18}F]-DOPA par alkylation énantiosélective en présence de l'agent d'un transfert de phase chiral élaboré par Lemaire *et al.*[36]. Cette méthode permet d'obtenir la [^{18}F]-FDOPA en 80 min avec un rendement radiochimique de 15 % et un excès énantiomérique de 98%.

2.3.4 Conclusion

Actuellement, compte tenu des problèmes techniques et économiques liés à la courte demi-vie du ^{11}C, aucun radiotraceur marqué au ^{11}C n'a reçu l'AMM. Néanmoins, la richesse de la chimie du ^{12}C a permis le développement de nombreuses conditions de marquage au ^{11}C utilisées en recherche.

[35] Zhang L., Tang G., Yin D., Tang X., Wang Y., *Appl. RadiatI Isot.* **2002**, 57, 145.
[36] Lemaire C., Guillouet S., Brihaye C., *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1999**, 42 (suppl. 1), s113.

PARTIE B :

CARBONE 11 ET BIOMOLECULES

PARTIE B : CARBONE 11 ET BIOMOLECULES

1 Méthodes d'introduction du carbone 11 dans des molécules organiques

Le carbone est un élément constitutif des molécules organiques. L'échange d'un carbone 12 par un carbone 11 ne modifiera donc pas les propriétés biologiques de la molécule. La chimie du carbone 11 tire sa force dans la variété de réaction permettant de former des liaisons carbone-carbone ou carbone-hétéroatome et fait du carbone 11 un radioélément prometteur.

Le ^{11}C est produit par irradiation d'une cible gazeuse d'azote enrichie d'oxygène ou d'hydrogène[37,38] selon la réaction nucléaire $^{14}N(p,\alpha)^{11}C$ sous forme de ^{11}CO, de $^{11}CO_2$ et de $^{11}CH_4$. Ces 3 précurseurs primaires peuvent ensuite être convertis chimiquement en un panel important de précurseurs marqués secondaires, multipliant les possibilités d'introduction du ^{11}C sur les molécules à marquer (Figure 16).

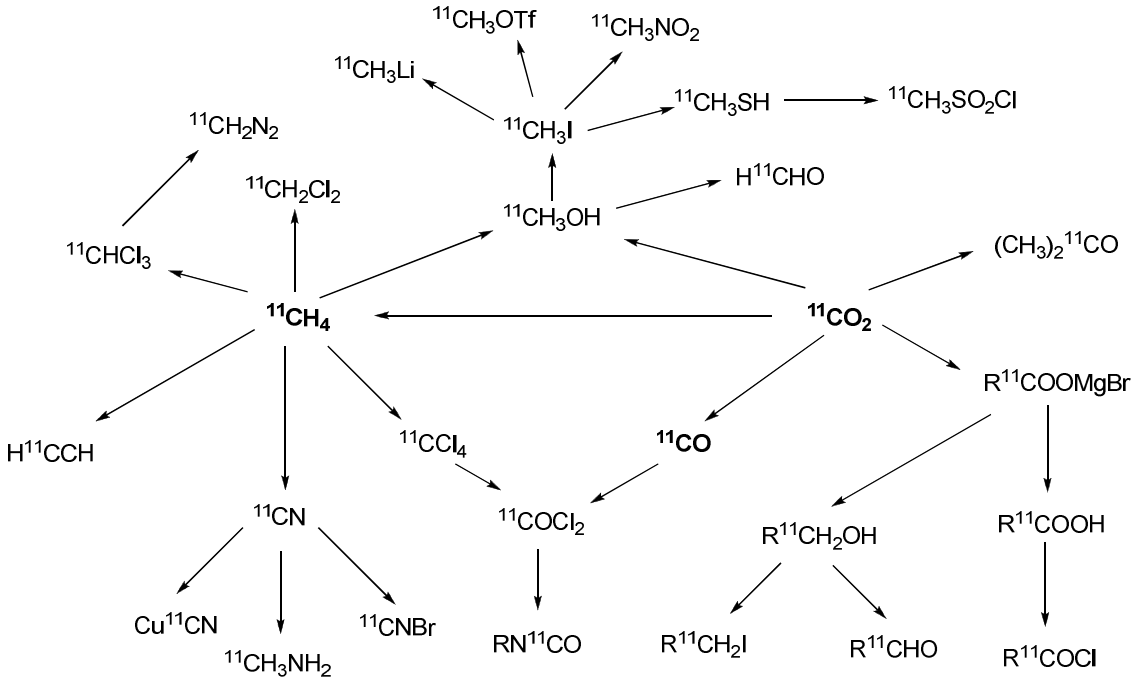


Figure 16: Précurseurs obtenus à partir de $^{11}CH_4$, $^{11}CO_2$ et ^{11}CO.

Malgré le nombre important de précurseurs secondaires disponibles, peu de synthons sont effectivement utilisés pour la synthèse de radiotraceurs. Depuis l'an 2000, l'iodure de [^{11}C]-méthyle ($^{11}CH_3I$) ainsi que son homologue le triflate de [^{11}C]-méthyle ($^{11}CH_3OTf$) sont les deux

[37] Bida, G.T. ; Ruth, T.J. ; Wolf, A.P. *Radiochim. Acta.* **1978**, 27, 181.
[38] Christman, D.R. ; Finn, R.D. ; Karlstöm, K.; Wolf A.P. *Int. J. Appl. Radiat. Isot* **1975**, 26, 435.

sources de ^{11}C électrophiles les plus utilisées avec respectivement 42% et 22% des publications. On peut également rajouter le monoxyde de [^{11}C]-carbone (^{11}CO) dont le nombre de publication est en constante augmentation (10%) ainsi que l'ion [^{11}C]-cyanure sous ses diverses formes qui est un des rares sources de carbone nucléophile. Ce chapitre a pour but de répertorier ces réactions et d'illustrer les larges possibilités du ^{11}C par les exemples les plus prometteurs.

1.1 Les réactions de cyanation

1.1.1 [^{11}C]-Cyanation nucléophile

$H^{11}CN$ est souvent utilisé comme précurseur de départ. Il est obtenu par réaction en phase gazeuse de l'ammoniac sur le [^{11}C]-méthane en présence de platine[39]. $H^{11}CN$ peut être utilisé directement[40,41] mais également sous la forme de [^{11}C]-cyanure de cuivre ou de potassium. Ainsi $Cu^{11}CN$ a permis à Dannal *et al.*[42] de synthétiser le [^{11}C]-LY2232645 (Figure 17) utilisé pour étudier les récepteurs métabotropiques de type 5 du glutamate.

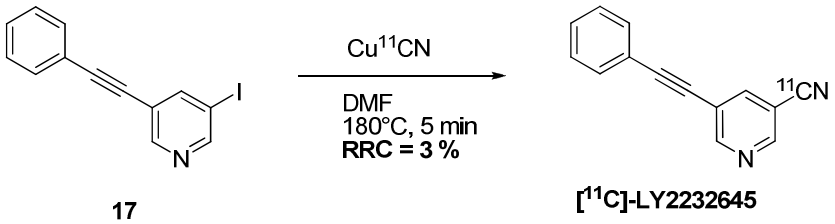


Figure 17: Synthèse du [^{11}C]-LY2232645.

De part sa réactivité, le groupement nitrile peut être converti en fonctions amide, amine, tétrazole, amidine ou acide carboxylique présents dans de nombreux radiotraceurs potentiels comme le [^{11}C]-GVG (Gamma Vinyl Gaba) synthétisé en « one pot » par Zhang[43]. Le [^{11}C]-GVG est un inhibiteur suicide de la GABA transaminase, il est utilisé pour étudier l'addiction aux drogues et pour réaliser le suivi de son traitement. Le ^{11}CN- produit est piégé dans une solution solide de Kryptofix et de K_2CO_3 et mis en réaction avec le bromure de γ-vinyl-γ-aminobutyle **18** dans le DMF. Le [^{11}C]-GVG est obtenu après hydrolyse acide de la fonction [^{11}C]-nitrile du composé **19** avec un RRC de 27% (Figure 18).

[39] Iwata R., Ido T., Takahashi T., Nakanishi H., Iida S., *Appl. Radiot. Isot.* **1987**, 38, 97.
[40] Smawardhana C.W., Sajjad M., Lambrecht R.M., *J. Chem. Soc. Chem. commun.* **1990**, 370.
[41] Gillings N.M., Gee A.D., *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2001**, 44, 909.
[42] Mathews W.B., Monn J.A., Ravert H.T., Holt D.P., Schoepp D.D, Dannals R.F., *J. Labelled Cmpds. Radiopharm.* **2006**, 49, 829.
[43] Zhang Z., Ding Y.S., Studenov A.R., Geramisov, M.R., Ferrieri R.A., *J. Label. Cpd. Radiopharm.* **2002**, 45, 199.

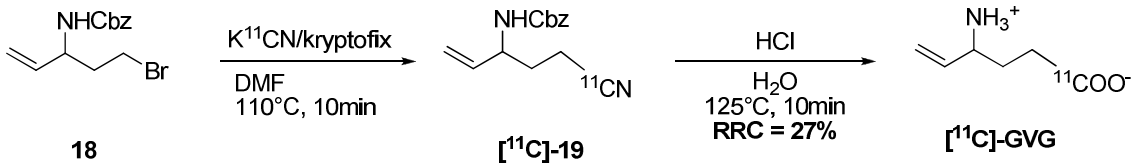


Figure 18: Synthèse du [^{11}C]-GVG.

1.1.2 [^{11}C]-Cyanation pallado-assistée

La réaction de [^{11}C]-cyanation assistée par le palladium (Figure 19) est plus utilisée du fait de la variété de réaction décrite en chimie du carbone 12[44]. L'étape clé est l'échange de ligand entre le complexe cyano palladié **20** et le complexe halogéno palladié **24** issu de l'addition oxydante du catalyseur PdL_4 sur l'halogénure d'aryle **23**.

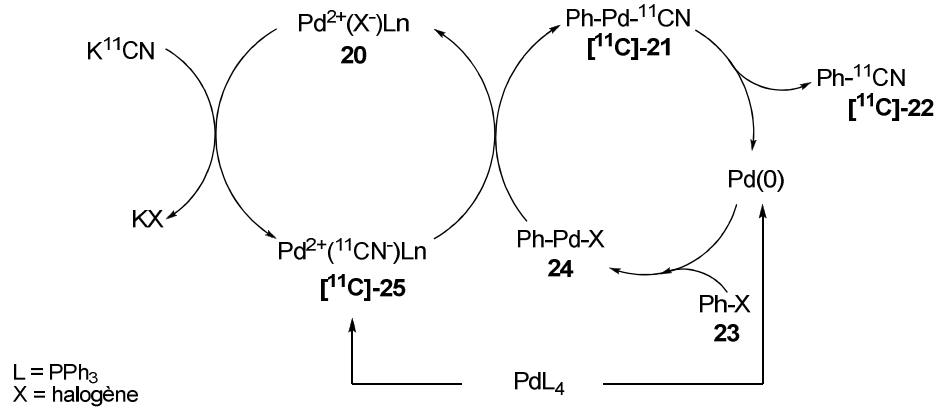


Figure 19: Cycle catalytique simplifié de la réaction de [^{11}C]-cyanation pallado-assistée.

En 2008, Airaksinen et son équipe[45] ont réalisé la synthèse du [^{11}C]-ximélagatran en marquant la partie *N*-hydroxyamidine du dérivé **26** par [^{11}C]-cyanation en présence de $Pd(PPh_3)_4$ suivie par une réaction avec l'hydroxylamine avec un RRC de 44% (Figure 20).

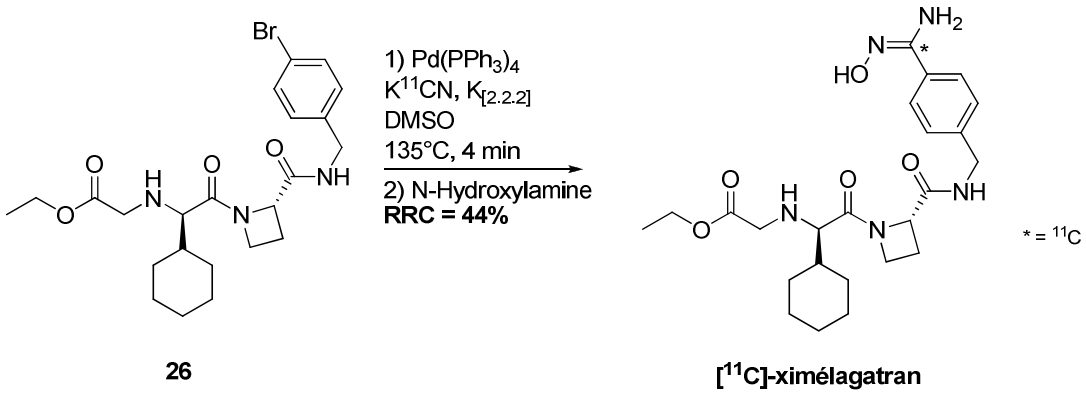
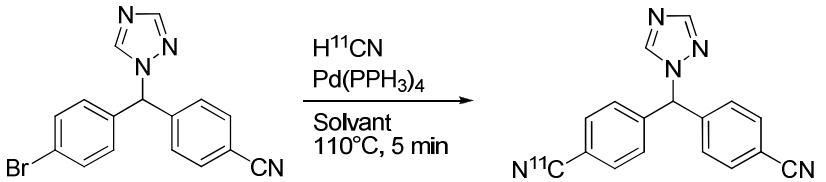


Figure 20: Synthèse du [^{11}C]-ximélagatran.

[44] Sundermeyer M., Zapf A., Beller M., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 3513-3526.
[45] Airaksinen A.J., Andersson J., Truong P., Karlsson O., Halldin C., J. Label. Cpd. Radiopharm. 2008, 51, 1-5.

Le ximélagatran est une prodrogue du mélagatran, un inhibiteur peptidomimétique de la thrombine appartenant à la classe des inhibiteurs de la sérine protéase. Une fois marqué, il permet d'évaluer la biodisponibilité du mélagatran dans le corps humain.

Plus récemment, le létrozole, un inhibiteur de l'aromatase, a été marqué au carbone 11 par [^{11}C]-cyanation dans le but d'imager les tumeurs cérébrales. La cyanation est réalisée en présence de $Pd(PPh_3)_4$ et de $H^{11}CN$ selon une méthode décrite par Kil *et al.*[46]. Les meilleurs RRC sont obtenus dans des solvants polaires aprotiques comme le DMF et le DMSO (Figure 21).



27 **[^{11}C-cyano]-letrozole**

THF, RRC = 29%
Diglyme, RRC = 43%
DMF, RRC = 58%
DMSO, RRC = 80%

Figure 21: Radiosynthèse du [^{11}C]-letrozole.

Du fait de son manque de spécificité et d'affinité, le [^{11}C-cyano]-létrozole ne peut être utilisé comme radiotraceur pour diagnostiquer des tumeurs cérébrales. Toutefois, il permet d'étudier la biodistribution et la pharmacocinétique du létrozole, utilisé pour le traitement de cancers cérébraux.

1.2 Les réactions de [^{11}C]-méthylation

1.2.1 Les [^{11}C]-Méthylations électrophiles

1.2.1.1 $^{11}CH_3I$ et $^{11}CH_3OTf$

L'alkylation d'amine, d'alcool ou de thiol libres par substitution nucléophile dans des conditions douces en présence de l'iodure de [^{11}C]-méthyle ($^{11}CH_3I$) et le triflate de [^{11}C]-méthyle ($^{11}CH_3OTf$) est de loin le moyen le plus efficace et le plus utilisé pour radiomarquer des molécules biologiquement intéressantes.

La première synthèse du $^{11}CH_3I$ a été décrite par Langström[47] en 1976. Aujourd'hui, il est produit par réduction du dioxyde de [^{11}C]-carbone suivit par une réaction d'halogénation en

[46] Kil K.E., Biegon A., Ding Y.S., Fischer A., Ferrieri R.A., Kim S.W., Pareto D., Schueller M.J., Fowler J.S. Nucl*. Med. Biol.* **2009**, 36, 215-223.
[47] Langström B, Lundqvist H., *Int. J. Radiat. Isot.* **1976**, 27, 357-363.

présence d'acide iodhydrique sur le [^{11}C]-méthanol formé [48] ou par iodation radicalaire du [^{11}C]-méthane en phase gaz [49] (Figure 22)
Le $^{11}CH_3OTf$, quant à lui, est produit à partir de l'iodure de [^{11}C]-méthyle en présence de triflate d'argent à 200°C[50] (Figure 22)

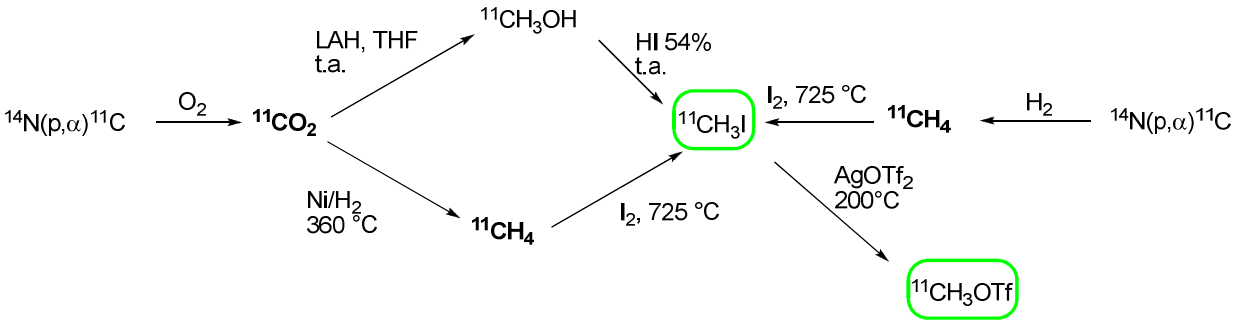


Figure 22: Synthèse de l'iodure de [^{11}C]-méthyle et du triflate de [^{11}C]-méthyle.

Leur utilisation est dictée par les résultats expérimentaux. Généralement si de mauvais résultats sont obtenus avec le $^{11}CH_3I$, la réaction sera tentée avec le $^{11}CH_3OTf$. Sa réactivité supérieure permet de réaliser des [^{11}C]-méthylation dans des conditions plus rapide ou sans chauffer mais une étape supplémentaire est nécessaire pour le produire.

Expérimentalement, les précurseurs marqués sont ajoutés à une solution contenant la molécule à marquer et le mélange réactionnel est chauffé jusqu'à une température de consigne pendant un temps inférieur à 10 minutes. Actuellement, la plupart des radiosynthèses sont automatisées (synthèses « in-loop »). Une solution micromolaire de molécule à marquer est injectée dans une boucle en polymère ou en acier puis le précurseur marqué passe dans la boucle. Cette méthode permet de minimiser la quantité de solvants et de précurseurs. Couplée à un appareil de purification, la perte de radioactivité est ainsi minimisée.

Les applications étant nombreuses, les réactions de méthylation en présence de $^{11}CH_3I$ et $^{11}CH_3OTf$ peuvent être rangées en fonction de l'hétéro-atome considéré. De plus, parmi les très nombreux exemples de la littérature mettant en jeu cette méthodologie, les plus prometteurs sur le plan de leur application médicale, classés en fonction de la cible biologique, ont été choisis pour illustrer la diversité des substrats concernés

[48] Langström B, Antoni G., Gullberg P., Halldin C., Malmborg P., Nagren K., Rimland A., Svard H., *J. Nucl. Chem.* **1987**, 28, 1037.
[49] Larsen P., Ulin J., Dahlstrom K., Jensen M., *Appl. Radiat. Isot.* **1997**, 48, 153.
[50] Booth B. L., Haszeldine R. N., Laali K., *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1980,** 2887**.**

1.2.1.1.1 *N*-alkylation

La *N*-alkylation a permis de synthétiser un nombre important de radiopharmaceutiques ayant des cibles biologiques très diverses à partir de leur précurseurs déméthylés (Figure 25) avec des RRC satisfaisants. Les solvants les plus utilisés sont le DMF, le DMSO ou l'acétonitrile.

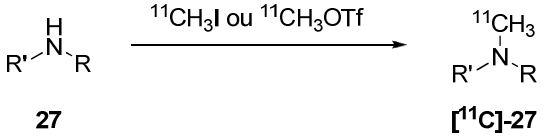


Figure 23: Réaction de *N*-[^{11}C]-méthylation.

L'emploi de groupement prosthétique est également utilisé en chimie du ^{11}C. En 2008, Jacobson et Mishani[51] ont mis au point l'alkylation de différents précurseurs bromés (**30** - **33**) par la *N,N*-[^{11}C]-diméthylamine **[^{11}C]-29**, obtenue elle-même par alkylation de la *N*-méthylamine en présence de $^{11}CH_3I$ avec un RRC de 70%[52] (Figure 24). Le marquage par la *N,N*-[^{11}C]-diméthylamine **[^{11}C]-29** constitue donc une alternative intéressante à l'utilisation directe du $^{11}CH_3I$

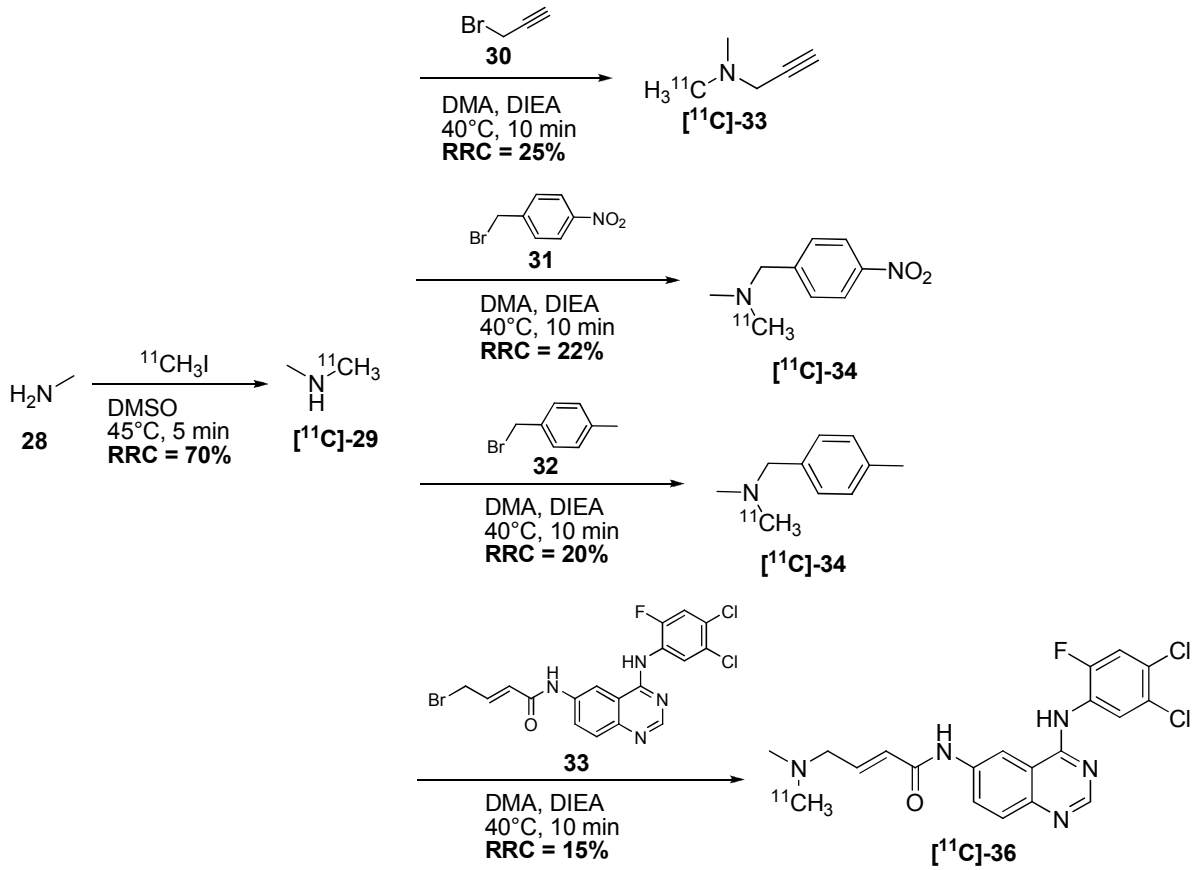


Figure 24: Alkylation de différents précurseurs bromés en présence de *N,N*-[^{11}C]-diméthylamine.

[51] Jacobsob O., Mishani E., *Appl. Radiat. Isot.* **2008**, 66, 188.
[52] Crouzel C., Langström B, Pike V.W., Coenen H.H., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1987**, 38, 601-604.

Le système sérotoninergique

Les altérations du système sérotoninergique jouent un rôle important dans les désordres psychiatriques et les maladies neurodégénératives telles que la dépression[53], les maladies d'Alzheimer[54] et de Parkinson[55]. Pour étudier ces phénomènes, plusieurs antagonistes des récepteurs de la sérotonine ont été radiomarqués par *N*-alkylation en présence de $^{11}CH_3I$ (Figure 25) telles que la [^{11}C]-mianserine[56] (antagoniste du récepteur 5-HT_2), le [^{11}C]-mirtazapine[57] (antagoniste du récepteur 5-HT_3) et le [^{11}C]-DR4446 (antagoniste du récepteur 5-HT_7)[58].

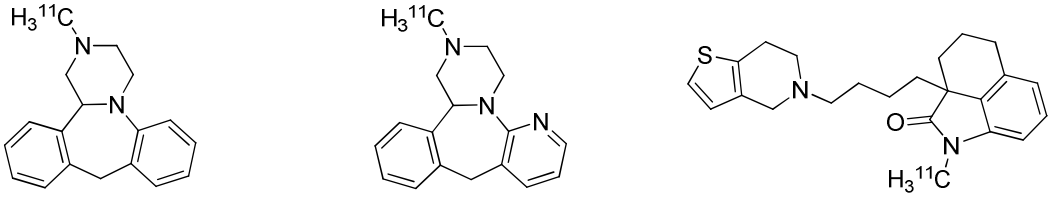


Figure 25: Radiotraceurs des récepteurs sérotoninergiques.

Les récepteurs 5-HT_3 ont également été étudiés avec les dérivés benzoxazoles **[^{11}C]-41** - **[^{11}C]-44** synthétisés par [^{11}C]-méthylation en présence de [^{11}C]-CH_3OTf[59].

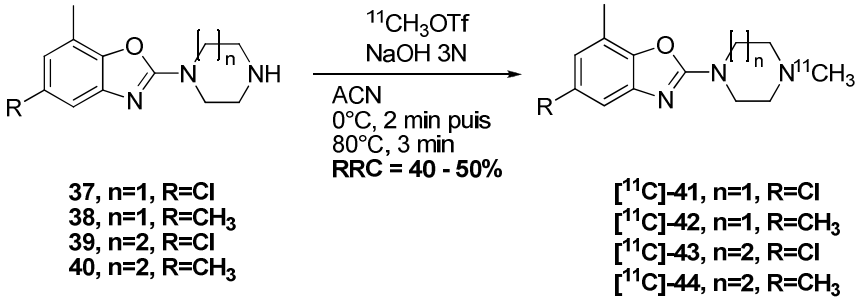


Figure 26: *N*-[^{11}C]-méthylation d'analogues benzoxazoles

Par ailleurs, le dysfonctionnement des transporteurs de la sérotonine (SERT) est également impliqué dans ces maladies. Les transporteurs de sérotonine sont des protéines présentes au niveau des neurones sérotoninergiques présynaptiques qui régulent la neurotransmission de la sérotonine. Couplée au marquage des récepteurs sérotoninergiques, la visualisation des SERT permet de comprendre dans la globalité le système sérotoninergique et son implication dans les maladies neurodégénératives.

[53] Owen M.J., Nemeroff C.B., *Depress Anxiety* **1998**, 8 (suppl. 1), 5.
[54] Palmer A.M., Francis P.T., Benton J.S., Sims N.R., Mann D.M., Neary D., *J. Neurochem.* **1987**, 48, 8.
[55] Cash R., Raisman R., Ploska A.Y., *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, 117, 71.
[56] Marthi K., Bender D., Smith D.F., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2001**, *44*, 121.
[57] Marthi K., Bender, D., Gjedde A., Smith D.F., *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2002**, *12*, 427.
[58] Zhang M. R., Haradahira T., Maeda J., Okauchi T., Kida T., Obayashi S., Suzuki K., Suhara T., J. Label. Compd. *Radiopharm.*, **2002**, *45*, 857.
[59] Gao M., Wang M, Hutchins G.D., Zheng Q., *Eur. J. Med. Chem* **2008**, 43, 1570.

Le ZIET[60] marqué au ^{11}C dans la série des nortropanes a été proposé comme radiotraceur potentiel de SERT. Le NS 4196[61] et le NS 2495[62] on été identifiés comme inhibiteurs de l'absorption de la sérotonine[63,64] cependant les études ont montré un manque de spécificité au niveau cérébral. Récemment, une nouvelle classe de radiotraceur basé sur des motifs biarylsulfures a été développée. Les [^{11}C]-ADAM[65], [^{11}C]-MADAM[66], [^{11}C]-DAPA[67], [^{11}C]-AFA[68], [^{11}C]-AFM[69], [^{11}C]-AFE[70], [^{11}C]-EADAM[71] et [^{11}C]-HOMADAM[72] ont été préparés par *N*-alkylation des précurseurs *N*-déméthylés **45** - **52** correspondants (Figure 27).

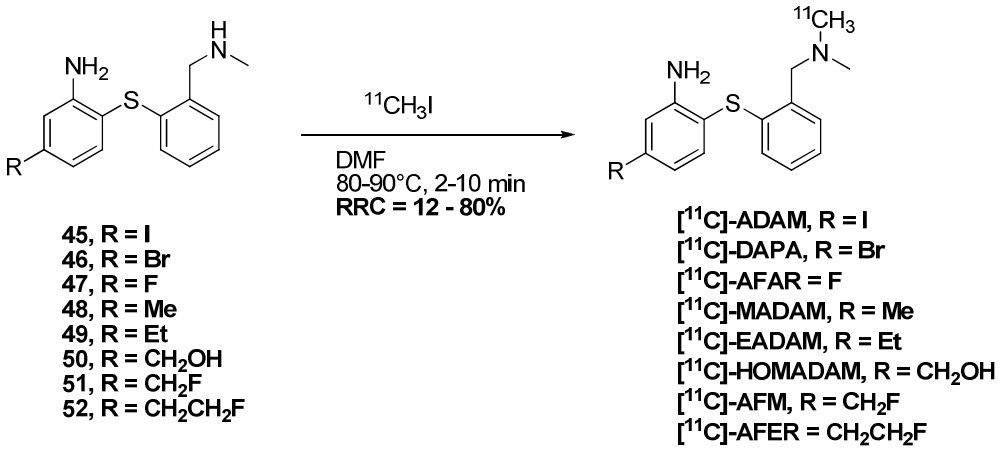


Figure 27: Radiotraceurs arylbisulfures des transporteurs de sérotonines.

Les études *in-vivo* réalisées sur le [^{11}C]-HOMADAM mettent en évidence une meilleure affinité pour les transporteurs de sérotonine cérébraux[72] que les autres biarylsulfures précités. Le [^{11}C]-

[60] Plisson C., McConathy J., Martarello L., Malveaux E.J., Camp V. M., Williams L., Votaw J.R., Goodman M.M., *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1122.
[61] Jensen S.B., Bender D., Smith D.F., Scheel-Krüger J., Nielsen E.Ø., Olsen G. M., Peters D., Gjedde A., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2002**, 45, 181.
[62] Audrain H., Bender D., Scheel-Krüger J., Nielsen E.Ø., Olsen, G. M., Peters D., Cumming P., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2003**, 46,873.
[63] Smith D.F., Gee A.D., Hansen S.B., Moldt P., Østergaard N.E., Scheel-Krüger J., Gjedde A., *Eur. Neuropsychopharmacol.* **1999**, 9, 351.
[64] Smith D.F., Bender D., Marthi K., Cumming P., Hansen S.B., Peters D., Østergaard N.E., Scheel-Krüger J., Gjedde A., *Nucl. Med. Biol.* **2001**, 28, 265.
[65] Vercouillie J., Tarkiainen J., Halldin C., Edmond P., Chalon S., Sandell J., Langer O., Guilloteau D., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2001**, 44, 113.
[66] Tarkiainen J., Vercouillie J., Edmond P., Sandell J., Hiltunen J., Frangin Y., Guilloteau D., Halldin C., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2001**, 44, 1013.
[67] Huang Y., Hwang D.R., Zhu Z., Bae S.A., Guo N., Sudo Y., Kegeles L.S., Laruelle M., *Nucl. Med. Biol.* **2000**, 29, 741.
[68] Huang Y., Narendran R., Bae S.A., Erritzoe D., Guo N., Zhu Z., Hwang D.R., Laruelle M., *Nucl. Med. Biol.* **2004**, 31, 727.
[69] Huang Y., Hwang D.R., Bae S.A., Sudo Y., Guo N., Zhu Z., Narendran R., Laruelle M., *Nucl. Med. Biol*. **2004**, 31, 543.
[70] Zhu Z., Guo N., Narendran R., Erritzoe D., Ekelund J., Hwang D.R., Bae S.A., Laruelle M., Huang Y., *Nucl. Med. Biol.* **2004**, 31, 983.
[71] Jarkas N., McConathy J., Votaw J.R., Voll R.J., Malveaux E.J., Camp V. M., Williams L., Goodman R.R., Kilts C.D., Goodman M.M., *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32, 75.
[72] Jarkas N., Votaw J.R., Voll R.J., Williams L., Camp V.M., Owens M.J., Purselle D.C., Bremner J.D., Kilts C.D., Nemeroff C. B., Goodman M.M., *Nucl. Med. Biol.*, **2005**, 32, 211.

HOMADAM apparaît donc comme étant un radiopharmaceutique de choix pour visualiser les dysfonctionnements des SERT par TEP.

Le système glutamatergique de type N-methyl-D-aspartate (NMDA)

Les maladies neurodégénératives et les troubles neuropsychiatriques telles que la schizophrénie peuvent être diagnostiqués par TEP en radiomarquant le transporteur de la glycine. Ce transporteur a pour but de diminuer la concentration de glycine qui agit comme un co-modulateur du système NMDA. En 2001, Dannals *et al.*[73] décrit la radiosynthèse du [^{11}C]-ALX-5407, antagoniste des transporteurs de la glycine de type 1, par *N*-alkylation du dérivé **53** en présence de $^{11}CH_3I$ avec un RRC de 8 % et une radioactivité spécifique de 3909 mCi.µmol-1 (Figure 28).

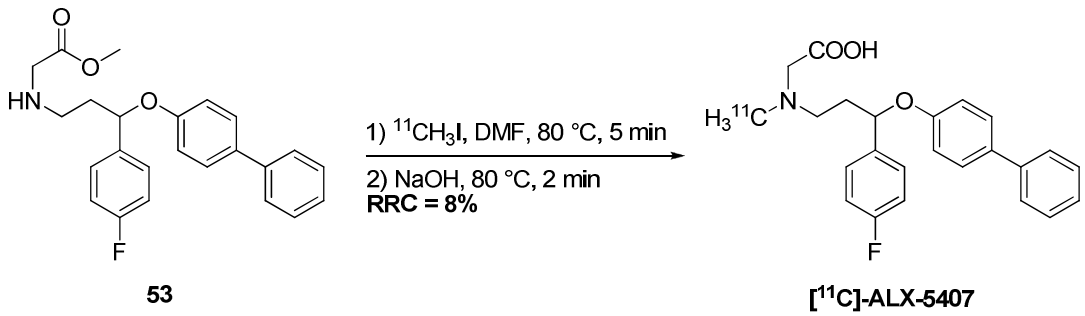


Figure 28: Synthèse du [^{11}C]-ALX-5407.

Le [^{11}C]-MMMHC, une prodrogue du NMDA, a également été synthétisée par *N*-[^{11}C]-méthylation de l'amine **54**[74] (Figure 29). Les études montrent que le radiopharmaceutique passe la barrière hépato-encéphalique et se fixe de façon réversible sur les récepteurs métabotropiques[74].

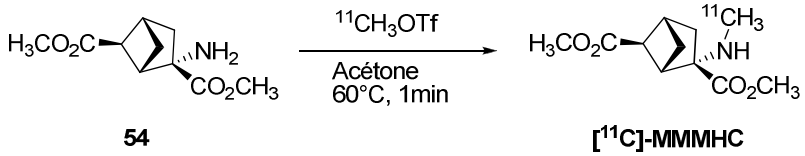
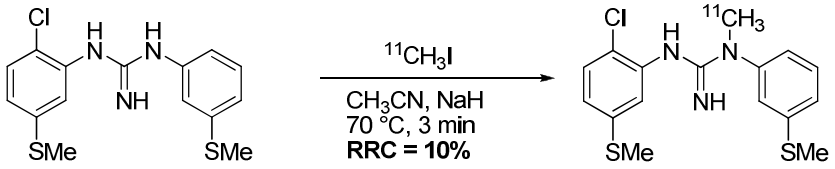


Figure 29: Synthèse du [^{11}C]-MMMHC.

Visant ces mêmes récepteurs, le Ro-647312 a été marqué en utilisant le $^{11}CH_3OTf$[75]. Cependant les évaluations *in-vivo* ont conclu que le [^{11}C]-Ro-647312 ne possédait pas les propriétés requises en tant que radiotraceur des récepteurs à NMDA.

[73] Ravert H.T., Mathews W.B., Klitenick M.A., Wong D.F.; Dannals R.F., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2001**, *44*, 241.
[74] Yu M., Någren K., Chen Y.I., Livni E., Elmaleh D., Kozokowski A.,Wang X., Jokivarsi K., Brownell A.L. *Life Sci.*, **2003**, 73, 1577.
[75] Dollé, F., Valette H., Demphel S., Coulon C., Ottaviani M., Bottlaender M., Kassiou M.*J,. Label. Compd. Radiopharm.*, **2004**, 47, 911.

Le système NMDA peut également être étudié en marquant un ligand ayant pour cible biologique le site de fixation de la phencyclidine (PCP). La PCP est un antagoniste non compétitif des récepteurs au glutamate de type *N*-méthyl-D-Aspartate. Elle agit en se fixant sur un site situé à l'intérieur du canal qui n'est accessible que quand le canal est ouvert. Elle a été développée en tant qu'anesthésique, mais a été retirée du marché à cause de ses effets secondaires (hallucinations, agitation). Ainsi, le CNS 5161, utilisé efficacement en thérapie, se révèle être une molécule intéressante pour le développement de radiotraceurs pour la TEP. Sa radiosynthèse est décrite selon la méthode de Årstad[76] par *N*-alkylation du précurseur guanidinique **55** (Figure 30). Ce motif étant moins réactif, une base est nécessaire pour former l'amidure qui réagit avec $^{11}CH_3I$. La procédure a été automatisée pour atteindre un RRC de 10 %.

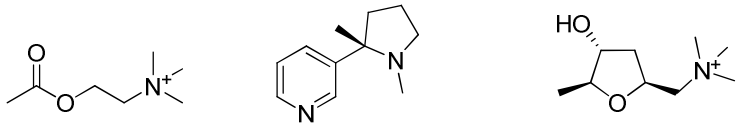


55 **[^{11}C]-CNS 5161**

Figure 30: Synthèse du [^{11}C]-CNS 5161.

Le système cholinergique

Les récepteurs de l'acétylcholine AChRs sont des récepteurs cholinergiques à canaux ioniques présents dans les neurones post-synaptiques. En présence d'agonistes comme la nicotine (pour les récepteurs nicotinique nAChRs), la muscarine (pour les récepteurs muscarinique mAChRs) ou l'acétylcholine (pour les nAChRs et les mAChRs), la conformation de la structure protéique des récepteurs post-synaptique se modifie, les canaux ioniques s'ouvrent laissant ainsi passer les ions tels que Na^+, K^+ ou Ca^{2+} et permettant la propagation de l'influx nerveux.



Acétylcholine **Nicotine** **Muscarine**

Figure 31: Structure de l'acétylcholine, de la nicotine et de la muscarine.

Les nAChrs sont présents dans tous les tissus. Une diminution de leur densité est responsable de divers maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Il est donc important de les étudier et de quantifier leur activité. La TEP est la technique de choix pour réaliser ces mesures.

[76] Zhao Y., Robins E., Turton D., Brady F., Luthra S.K., Årstad E., *J. Label.Compd. Radiopharm.* **2006**, *49*, 163.

La mécamylamine, un antagoniste des nAChRs, a été marquée au carbone 11 par *N*-alkylation selon la méthode décrite par l'équipe de Stone[77] avec un RRC de 30 à 40%. Les études *in-vivo* sur des rats et primates[78] ont montré la lente distribution dans le cerveaux ainsi que la non spécificité de la [^{11}C]-mécamylamine. Ces caractéristiques n'étant pas compatible avec la TEP au carbone 11, les évaluations ont été stoppées à ce stade.

En 2006, le [^{11}C]-FPVC est synthétisé par Ravert *et al.*[79] par *N*-alkylation du précurseur **56** avec un RRC de 19 % (Figure 32). Les études sur l'animal sont en cours afin de mettre en évidence l'activité des nAChR $\alpha4\beta2$ (récepteur de type neuronal).

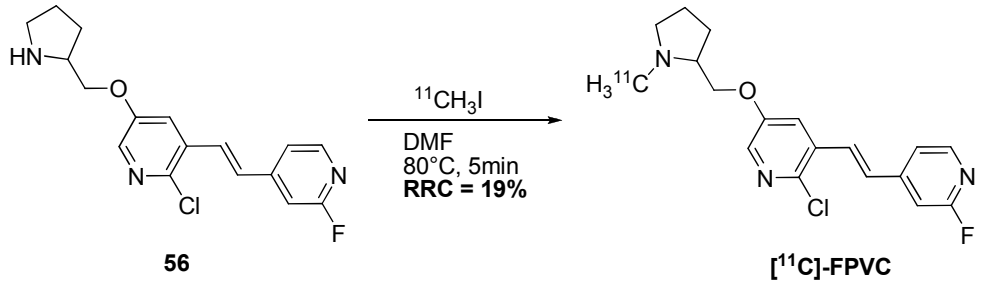


Figure 32: Synthèse du [^{11}C]-FPVC

La méthode de marquage élaboré par cette équipe a été appliquée à la radiosynthèse d'autres analogues du [^{11}C]-FPVC (**[^{11}C]-57** - **[^{11}C]-59**) dans le but d'améliorer la spécificité vis-à-vis des récepteurs nAChRs $\alpha4\beta2$[80,81] (Figure 33). Les résultats sur les cerveaux de rat et de babouin montrent une haute affinité pour ces récepteurs.

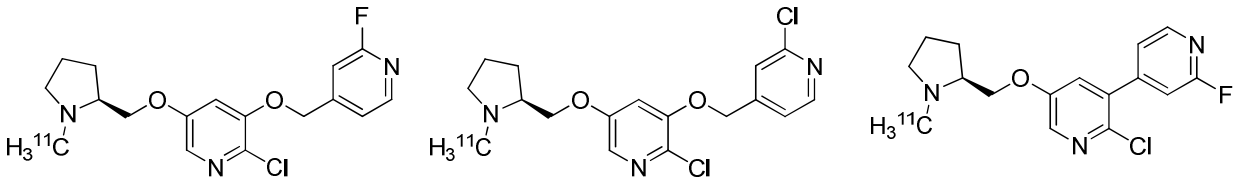


Figure 33: Structure des nouveaux analogues du PVC marqués par *N*-[^{11}C]-méthylation.

La même année, McLeod *et al.*[82] a marqué au ^{11}C le tiotropium et l'ipratropium par quaternarisation des amines tertiaires **60** et **61** en présence de $^{11}CH_3I$ avec des rendements

[77] Stone C.A., Torchiana M.L., Meckelnberg K.L., Stavorski J., Sletzinger M., Stein G.A., Ruyle W.V., Reinhold D.F., Gaine W.A., Arnold H., Pfister K., *J. Med. Pharm. Chem.***1962**, 5, 664.
[78] Sobrio F., Debruyne D., Dhilly M., Chazalviel L., Camsonne R., Kakiuchi T., Tsukada H., Barré L., *Neurochem. Int.* **2005**, *46*, 479.
[79] Ravert H.T., Zhang Y., Horti A., Dannals R.F, *J. Label. Compd. Radiopharm* **2006**, *49*, 459.
[80] Gao Y., Ravert H.T., Kuwabara H, Xiao Y., Endres C., Hilton J., Holt D.P., Kumar A., Alexander M., Wong D.F., Danals R. F., Horti A.G., *Biorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 4367.
[81] Gao Y., Ravert H.T., Holt D.P., Danals R. F., Horti A.G., *Appl. Radiat. Isot.* **2007**, 65, 947.
[82] Issa F., Kassiou M., Chan, H.K., Mcleod M.D., *Aust. J. Chem.* **2006**, 59, 53.

radiochimiques non corrigés (RR) faibles de 0,5 et 0,3% (Figure 34) expliqués par la plus faible réactivité des amines tertiaires par rapport aux amines primaires et secondaires. Toutefois, ces radiotraceurs ont été utilisés afin d'étudier les résidus de drogues inhalées déposés sur les poumons.

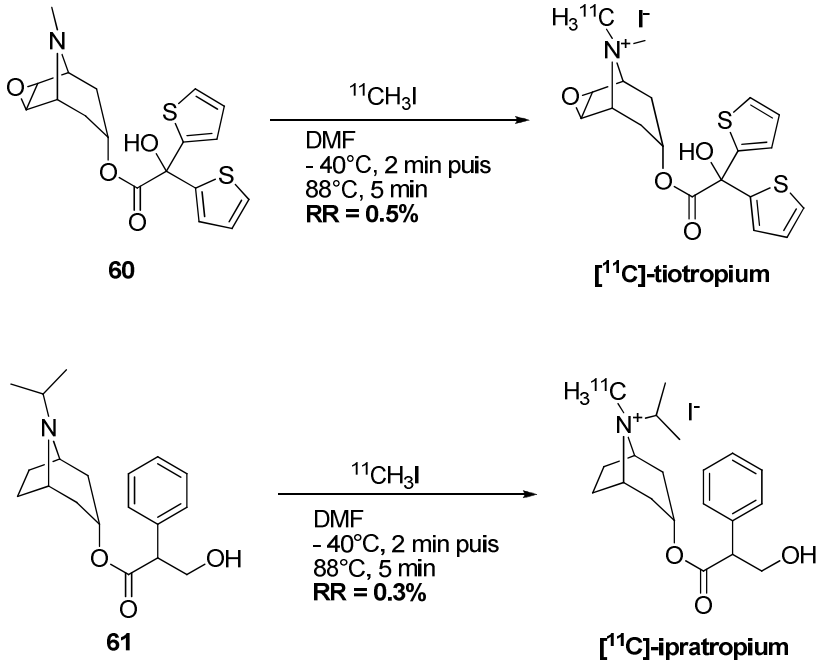


Figure 34: Synthèse de [^{11}C]-tiotropium et [^{11}C]-ipratropium.

En 2008, les récepteur nAChRs ont été également visualisés grâce au [^{11}C]-SIB-1553A, un antagoniste des nAChRs, obtenu par *N*-[^{11}C]-méthylation du précurseur **62** en présence de $^{11}CH_3I$ avec un RRC de 55 à 65% (Figure 35) [83]. Son analogue non marqué, le SIB-1553A, est actuellement étudié en Phase I pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

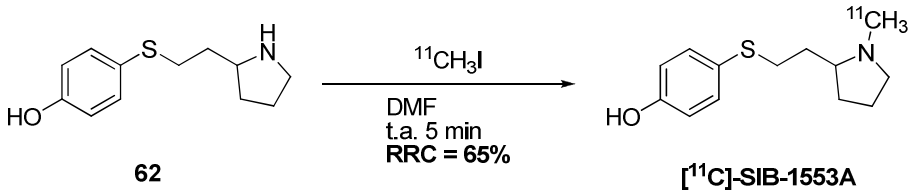
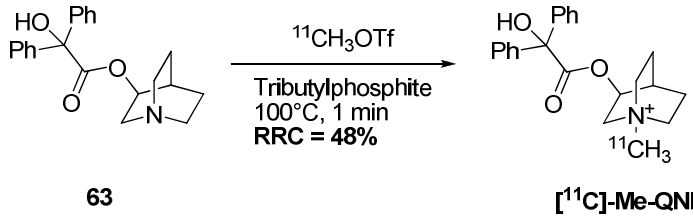


Figure 35: Radiosynthèse du [^{11}C]-SIB-1553A

Le [^{11}C]-Me-QNB a permis d'étudier les récepteurs muscariniques mAChRs. Un RRC de 48% a pu être obtenu en utilisant le $^{11}CH_3OTf$ et en réalisant la réaction dans un solvant très polaire (Figure 36)[84]. Un RRC moins bon de 23% a également été obtenu en présence de $^{11}CH_3I$ dans les mêmes conditions de température et de solvant.

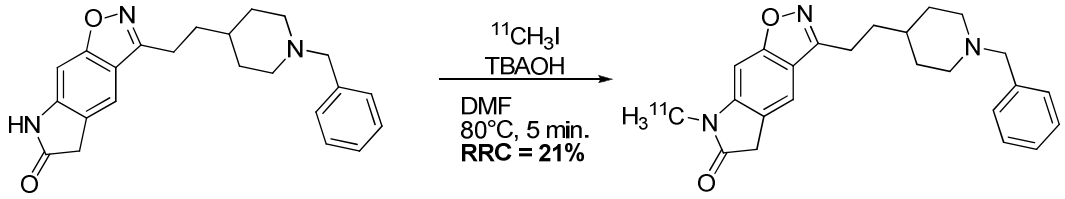
[83] Sobrio F., Quentin T., Dhilly M, Bourdier T., Tymciu S., Debruyne D., Barré L., *Nucl. Med. Biol.* **2008**, 35, 377.
[84] Dolle F., Hinnen F., Vaufrey F. Demphel S., Bramoulle Y., Fournier D., Ponchant M., Valette H., Crouzel C., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2001**, 44, 337.



63 [11C]-Me-QNB

Figure 36: Synthèse de [11C]-Me-QNB.

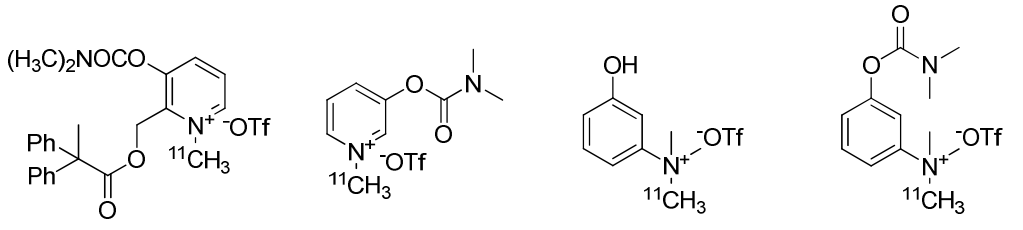
Le système cholinergique met aussi en jeu des enzymes telles que l'acetylcholinesterase (AChE). En effet, une fois l'acétylcholine libérée dans la fente synaptique, elle est hydrolysée par cette enzyme en acétate et en choline de manière à réguler la quantité d'acétylcholine agissant sur les neurones post-synaptique. Des études ont montré que le [^{11}C]-CP-126,998, synthétisé par *N*-[^{11}C]-méthylation du CP-118,954 en présence de $^{11}CH_3I$ et d'une base avec un RRC de 21% (Figure 37) constitue un radiotraceur efficace de l'AChE, utilisable pour la stadification de la maladie d'Alzheimer[85].



CP-118,954 [11C]-CP-126,998

Figure 37: Radiosynthèse de [^{11}C]-CP-126,998.

L'AChE cardiaque ainsi que ses dysfonctionnements ont été étudiés grâce à différents radiotraceurs de type pyridinium et anilinium radiosynthétisés en phase gaz en présence de $^{11}CH_3OTf$ par quaternarisation des pyridines et aniline correspondantes (Figure 38) [86,87].



[11C]-MDDP [11C]-pyridostigmine [11C]-edrophonium [11C]-neostigmine

Figure 38: Structure des radiotraceurs de l'AChE cardiaques

[85] Musachio J.L., Flesher J.E., Scheffel U.A., Rauseo P., Hilton J., Mathews W.B., Ravert H.T., Dannals R.F., Frost J.J., *Nucl. Med. Biol.* **2002**, 29, 547.
[86] Zheng Q.H. Liu X., Fei X., Wang J.Q., Mock B.H., Glick-Wilson B.E., Sullivan M.L., Hutchins G.D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 1787.
[87] Wang J.Q., Miller M.A., Fei X., Stone K.L., Lopshire J.C., Groh W.J., Zipes D.P., Hutchins G.D., Zheng Q.H., *Nucl. Med. Biol.*, **2004**, 31, 957.

Enfin, l'optimisation de la synthèse du [^{11}C]-MP4A par *N*-alkylation en présence de $^{11}CH_3I$ (RRC = 20-60%) a permis d'étudier la neurotransmission cholinergique au niveau présynaptique[88] (Figure 39).

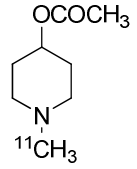


Figure 39: [^{11}C]-MP4A.

L'étude du système cholinergique a été complétée par la visualisation de la choline présynaptique grâce à deux radiotraceurs [^{11}C]-HC-3[89] et [^{11}C]-HC-15[90], inhibiteurs de l'HACU (High Affinity Choline Uptake), synthétisé par *N*-[^{11}C]-méthylation en présence de triflate de [^{11}C]-méthyle (Figure 40).

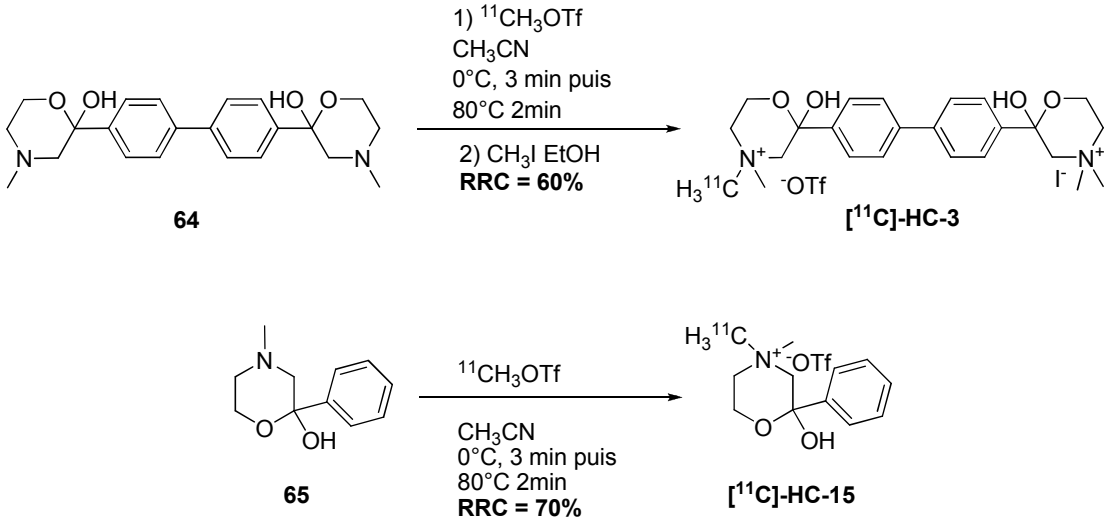


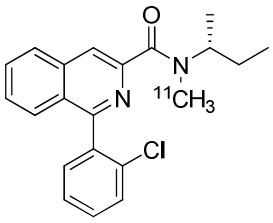
Figure 40: Radiosynthèse de HC-3 et HC-15.

Les récepteurs périphériques aux benzodiazépines (PBR)

Le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR) est une protéine membranaire initialement mise en évidence pour ses propriétés de liaison au diazépam dans les tissus n'appartenant pas au système nerveux central. Cette localisation s'accompagne de propriétés pharmacologiques qui le distinguent du récepteur central aux benzodiazépines, encore appelé récepteur GABAa. Plusieurs classes de ligands ont été testées et une isoquinoline, le PK 11195, a été décrite comme étant le ligand le plus spécifique du PBR.

[88] Carpinelli A., Magni F., Cattaneo M., Matarrese M., Turolla E., Todde S., Bosso N., Galli Kienle M., Fazio F., *Appl. radiat. Isot.* **2006**, 64, 182.
[89] Zheng Q.H., Gao M., Mock B.H., Wang S., Hara T., Nazih R., Miller M.A., Receveur T.J., Lopshire J.C., Groh W.J., Zipes D.P., Hutchins G.D., Degrado T.R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 2220.
[90] Gao M., Miller M.A., Degrado T.R., Mock B.H., Lopshire J.C., Rosenberger J.G., Dusa C., Das M.K., Groh W.J., Zipes D.P., Hutchins G.D., Zheng Q.H., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 1289.

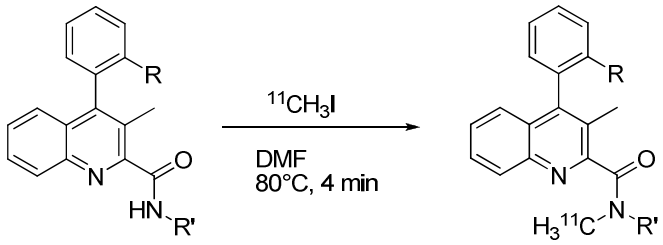
Les processus neurodégénératifs présents dans la maladie d'Alzheimer[91], de multiples scléroses[92] ou la maladie d'Huntington[93] impliquent une neuro-inflammation se traduisant par le dysfonctionnement des PBR. Ils sont donc une cible intéressante pour l'étude de l'évolution de ces maladies par TEP. Bien que l'analogue marqué au ^{11}C par *N*-[^{11}C]-méthylation du (*R*)-PK11195[94], antagoniste des PBR, (Figure 41) ait été largement utilisé chez l'homme, il présente des inconvénients liés à une haute lipophilie (log P = 3.4) et une faible biodisponibilité (88% sont fixés sur les protéines présentes dans le plasma)[95].



[^{11}C]-PK11195

Figure 41: Structure de [^{11}C]-PK11195

Pour résoudre ces problèmes, trois analogues du PK11195 ont été marqués par *N*-[^{11}C]-méthylation à partir des quinoline-2-carboxamides **129** - **131** selon la méthode développé par Matarese *et al.*[96] (Figure 42). Les études sur le rat montrent que le dérivé benzylamide **[^{11}C]-132** possède une meilleure biodistribution dans les organes riches en PBR (cœur, fois, glandes surrénales, rein, rate) ainsi qu'une meilleure spécificité que le [^{11}C]-PK11195 pour les récepteurs aux PBR.



66- 68 **[^{11}C]-69 - [^{11}C]-71**

N°	R	R'	RRC (%)
66, **[^{11}C]-69**	H	Benzyle	84
67, **[^{11}C]-70**	H	*sec*-Butyle	84
68, **[^{11}C]-71**	F	*sec*-Butyle	84

Figure 42: Synthèse de nouveaux radiotraceurs PBR

[91] Diorio D., Welner S.A., Butterworth: R.F., Meaney M.J., Suranyi-Cadotte, *Neurobiol. Aging* **1991**, 12, 255-258.
[92] Vowinckel E., Reutens D., Becher B., Verge G., Evans A., Owens T., Antel J.P., *J. Neurosci. Res.* **1997**, *50*, 345-353.
[93] Schoemaker H., Morelli M., Deshmukh P., *Brain Res.* **1982**, 248, 396-401.
[94] Shah F., Hume S.P., Pike V.W., Ashworth S., McDermott J,. *Nucl. Med. Biol.* **1994**, 21, 573-581.
[95] Petit-Tabouè M.C., Baron J.C., Barrè L., Travère J. M., Speckel D., Camsonne R., MacKenzie E.T., *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, 200, 347-351.
[96] Matarrese M. *et al.*, *J. Med. Chem*. **2001**, 44, 579-585.

En 2007, Thominiaux *et al.*[97] a décrit le marquage par *N*-[^{11}C]-méthylation d'un nouveau radiotraceur de PBR de la famille des imidazo-pyridinyl-acétamides, le [^{11}C]-CLINME (Figure 43), avec un RRC de 23%.



Figure 43: Synthèse du [^{11}C]-CLINME.

Par la suite, quatre radiotraceurs appartenant à cette famille ont été préparés par *N*-[^{11}C]-méthylation[98] en milieu basique en présence $^{11}CH_3I$ ou $^{11}CH_3OTf$ (Figure 44).

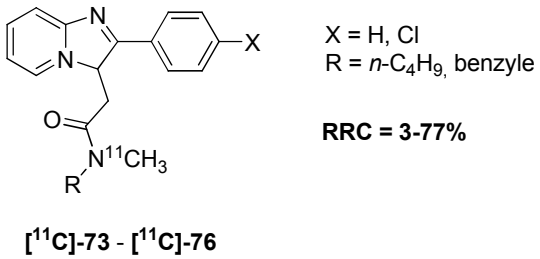


Figure 44: Radiotraceurs de la famille des imidazopyridinylacetamide.

Enfin la méthode de solvant captif a permis de réduire et de simplifier la synthèse du [^{11}C]-flumazenil[99] (Figure 45), un antagoniste des benzodiazépines. La réaction est conduite dans un micro réacteur couplé à une HPLC permettant de réaliser la purification avec une perte de radioactivité minimale. Un RRC de 80% est alors obtenu.

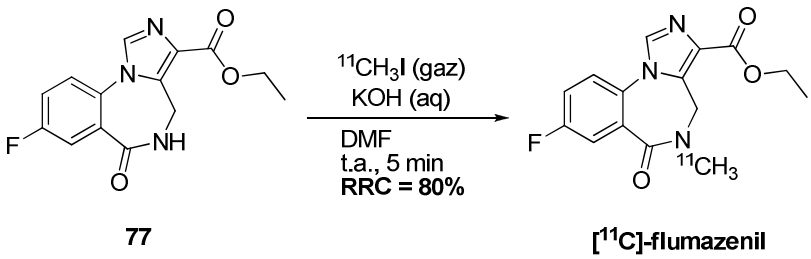
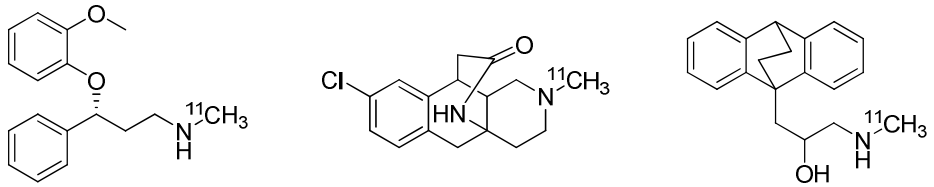


Figure 45: Synthèse du [^{11}C]-flumazenil.

[97] Thominiaux C., Mattner F., Greguric I., Boutin H., Chaveau F., Kuhnat B., Grégoire M.C., Loc'H C., Valette H., Bottlaender M., Hantraye P.; Tativian B., Katsifis A., Dollé F., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2007**, 50, 229.
[98] Sekimata K., Hatano K., Ogawa M., Abe J., Magata Y., Biggio G., Serra M., Laquintana V., Denora N., Latrofa A., Trapani G, Liso G., Ito K., *Nucl. Med. Chem.* **2008**, 35, 327-334.
[99] Cleij M.C., Clark J.C., Baron J.C., Algbirhio F.I., *J. Label. Compd. Radiopharm* **2007**, *50*, 19.

Les transporteurs de la norépinéphrine (NET)

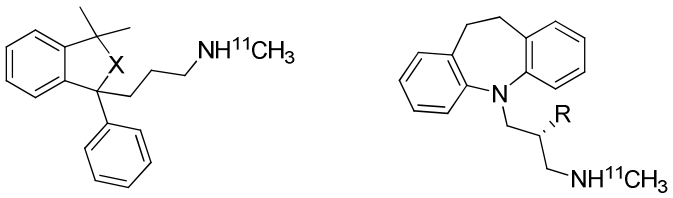
La norépinéphrine encore appelée noradrénaline est un neurotransmetteur présent dans les neurones du système nerveux central et périphérique. Elle joue un rôle clé dans le sommeil, les émotions ou l'apprentissage. Les transporteurs de la norépinéphrine la véhiculent dans les vésicules pour y être stockée. Un dysfonctionnement de la recapture neuronale entraîne des troubles telles que la dépression. La TEP a permis d'étudier ce phénomène en marquant la nisoxetine, la lortalamine et l'oxaprotiline, des antidépresseurs sélectifs des NET, par *N*-[^{11}C]-méthylation en présence de $^{11}CH_3I$ avec des RRC de 63 à 97 % et une pureté radiochimique supérieure à 99% [100].



[^{11}C]-nisoxetine **[^{11}C]-lortalamine** **[^{11}C]-oxaprotiline**

Figure 46: Structures de [^{11}C]-nisoxetine, [^{11}C]-lortalamine et [^{11}C]-oxaprotiline.

Les inhibiteurs des NET ont également été marqués par *N*-[^{11}C]-méthylation en présence de $^{11}CH_3OTf$. C'est le cas du DMI, du Talopram, du Talsupram et du (*R*)-OHDMI marqués en 2006 et 2007 par l'équipe de Schou[101,102].



[^{11}C]-talopram, X = O
[^{11}C]-talsupram, X = S

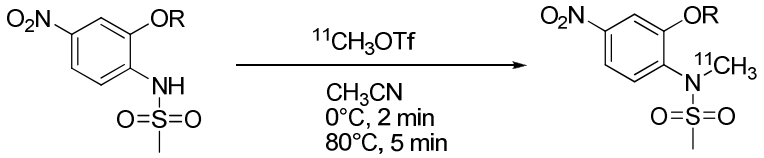
[^{11}C]-DMI, R = H
(R)-[^{11}C]-OHDMI, R = OH

Figure 47: Structure du [^{11}C]-talopram, [^{11}C]-talsupram, [^{11}C]-DMI et (R)-[^{11}C]-OHDMI.

Substrats et inhibiteurs d'enzymes

En 2007, une série de sulfonamides a été marquée par *N*-[^{11}C]-méthylation en milieu basique[103] (Figure 48) afin d'étudier leur affinité pour l'aromatase. Cette enzyme intervient dans la synthèse d'œstrogène et de stéroïdes et constitue une cible intéressante pour déceler des cancers du sein.

[100] Lin K.S., Ding Y.S., Nishimura S., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 4658.
[101] Schou M., Sovago J., Pike V.W., Gulyas B., Bøgesø K.P., Farde L., Halldin C., *Mol. Imaging Biol.* **2006**, 8:1.
[102] Schou M., Sovago J., Pike V.W., Gulyas B., Gallagher P., Dobson D.R., Farde L., Halldin C, *Bioorg. Med. Chem*. **2007**, 15, 616.
[103] Wang M., Lacy G., Gao M., Miller K.D., Sledge G.W., Zheng Q.H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 332.



78 - 83 **[^{11}C]-84 - [^{11}C]-89**

R = $CH_2CH_2CH_3$, $CH(CH_3)_2$, $CH(CH_2CH_3)_2$, C_5H_9, C_6H_{11}, $CH_2CH_2C_6H_{11}$

Figure 48: Radiosynthèse de dérivés sulfonamides pour le marquage de l'aromatase.

En 2009, *Kim et al.*[104] a montré que le [^{11}C]-vorozole, un inhibiteur de l'aromatase synthétisé par *N*-[^{11}C]-méthylation avec un RRC de 30%[105] (Figure 49), permettait d'étudier l'aromatase chez les babouins.

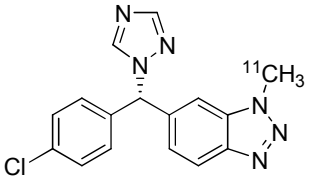
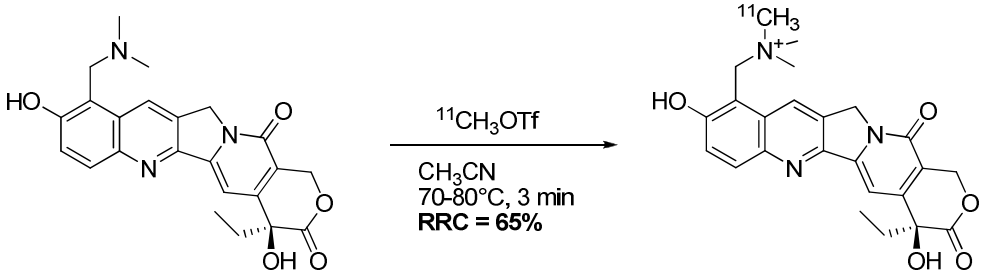


Figure 49: Structure du [^{11}C]-vorozole.

Les radiotraceurs peuvent être aussi un moyen efficace pour mesurer les effets d'un traitement médicamenteux. Par exemple, le dérivé de la camptothécine **[^{11}C]-91** a été marqué par quaternarisation de l'amine tertiaire **90** en présence de triflate de [^{11}C]-méthyle afin de suivre le traitement de plusieurs cancers traités par le 9-nitro-20(*S*)-camptothecin (9-NC) [106].



90 **[^{11}C]-91**

Figure 50: Radiosynthèse du dérivé 91

Radiotraceur des plaques amyloïde β

Le dépôt de plaques amyloïdes dans le cerveau a été mis en évidence en tant que symptômes dans la maladie d'Alzheimer. En 2002, le radiotraceur [^{11}C]-BF-145[107] a été synthétisé afin d'étudier ce phénomène encore mal connu.

[104] Kim S.W., Biegon A., Katsamanis Z.E., Ehrlich C., Hooker J.M., Shea C., Muench L., Xu Y., King P., Carter P., Alexoff D.L., Fowler J.S., *Nucl. Med. Biol.* **2009**, 36, 323.
[105] Takahashi K., Bergstrom M., Frandberg P., Vesstrom E.L., Watanabe Y., langström B., *Nucl. Med. Biol.* **2006**, 33, 599.
[106] Gao M., Miller K.D., Sledge G.W., Zheng, Q.H., *Bioorg. Med. Chem.Lett.*, **2005**, 15, 3865.
[107] Goethals P., Volkaert A., *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **2002**, 45, 213

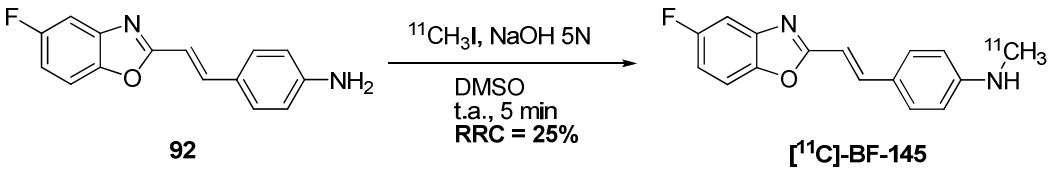


Figure 51: Radiosynthèse du [^{11}C]-BF-145.

Plus récemment les équipes de Serdons[108] et de Solbach[109] a mis au point la radiosynthèse d'analogues du composé de Pittsburgh B ([^{11}C]-PIB) (Figure 52).

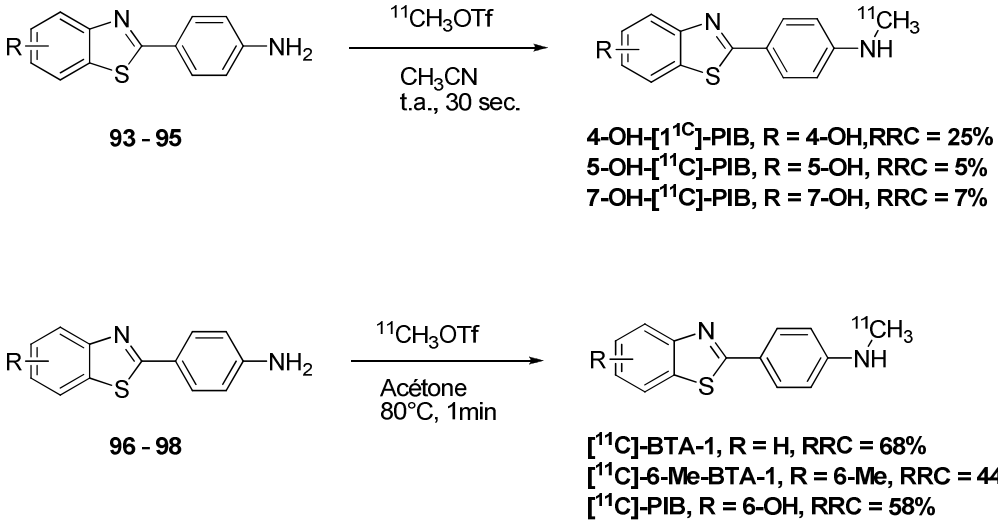
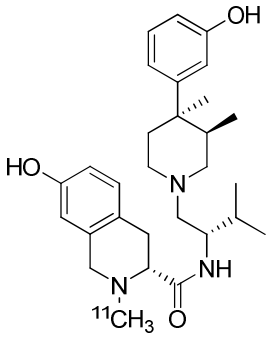


Figure 52: Radiosynthèse d'analogues du [^{11}C]-PIB.

Les récepteurs aux opiacés

Le système opioïde est composé de plusieurs récepteurs (μ, δ, κ) impliqués dans des phénomènes tels que l'anxiété, la mémoire ou la régulation de la douleur. En 2008, Perrio *et al.*[110] a mis au point la synthèse du [^{11}C]-MeJDTic, le deuxième radiotraceur des récepteurs k, par *N*-[^{11}C]-méthylation (Figure 53). Il vient s'ajouter au [^{11}C]-Naltrindole obtenu également par *N*-[^{11}C]-méthylation[111].

[108] Serdons K., Verduyckt T, Vanderghinste D., Borghgraef P., Cleynhens J., Van Leuven F., Kung H., Bormans G., Verbruggen A., Eur. J. Med. Chem. **2009**, 11, 1415.
[109] Solbach C., Uebele M., Reischl G., Machulla H.J., *Appl. radiat. Isot.*, **2005**, 62, 591.
[110] Poisnel G., Ouestali F., Dhilly M., Delamare J., Perrio C., Debruyne D., Barré L., *Nucl. Med. Biol.* **2008**, 35, 561.
[111] Lever J.R., Kinter C.M., Ravert H.T., Musachio J.L., Mathews W.B., Dannals R.F., *J. Labelled Compds. Radiopharm.* **2006**, 36, 2, 137.



RRC 75-98%

Figure 53: [^{11}C]-MeJDTic.

1.2.1.1.2 *O*-Alkylation

L'alkylation d'oxygène est le plus souvent réalisée sur des hydroxyles acides tels les phénols ou les acides carboxyliques. Les alcoolates sont générés par des bases minérales dans des solvants polaires (Figure 54).

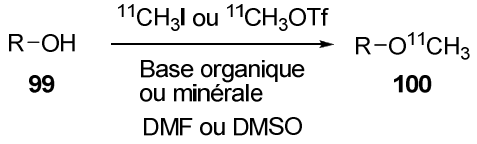
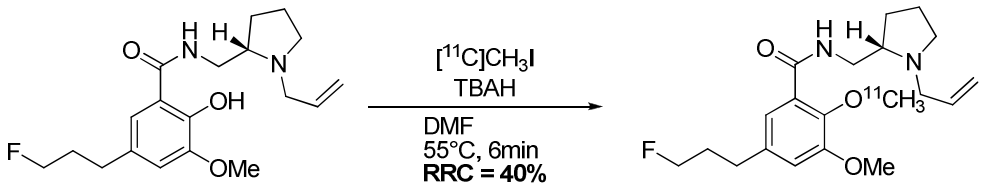


Figure 54: [^{11}C] méthylation d'alcool par *O*-alkylation.

Système dopaminergique

Bien que la [^{18}F]-FDOPA soit largement utilisée en tant que radiotraceur du système dopaminergique, d'autres radiotraceurs ont été élaborés visant différents récepteurs de la dopamine. En 2004, Mukerjee *et al.*[112] a marqué le fallypride, un antagoniste des récepteurs dopaminergique D2 et D3, au ^{11}C par *O*-alkylation du dérivé phénolique **101** en présence de $^{11}CH_3I$ avec un RRC de 40% afin de diagnostiquer des désordres psychiatriques. Les évaluations sur des cerveaux de primates ont montré une bonne spécificité sur les récepteurs extrastriataux.



101 **[^{11}C]-fallypride**

Figure 55: Synthèse de la [^{11}C]-fallypride.

[112] Mukherjee, J.; Shi, B.; Christian, B.T.; Chattopadhyay, S.; Narayanan, T.K.*Bioog. Med. Chem.*, **2004**, 12, 95.

Les transporteurs de la dopamine (DAT) ont également pu être étudiés avec efficacité par les dérivés du tropane tels que le [^{11}C]-altropane (appelé également [^{11}C]-PE2I) ou le [^{11}C]-LBT-999[113] synthétisés par *O*-[^{11}C]-méthylation des acides carboxyliques **102**[114] et **103**[115]. L'utilisation de $^{11}CH_3OTf$ donne de meilleurs résultats du fait de sa meilleure réactivité.

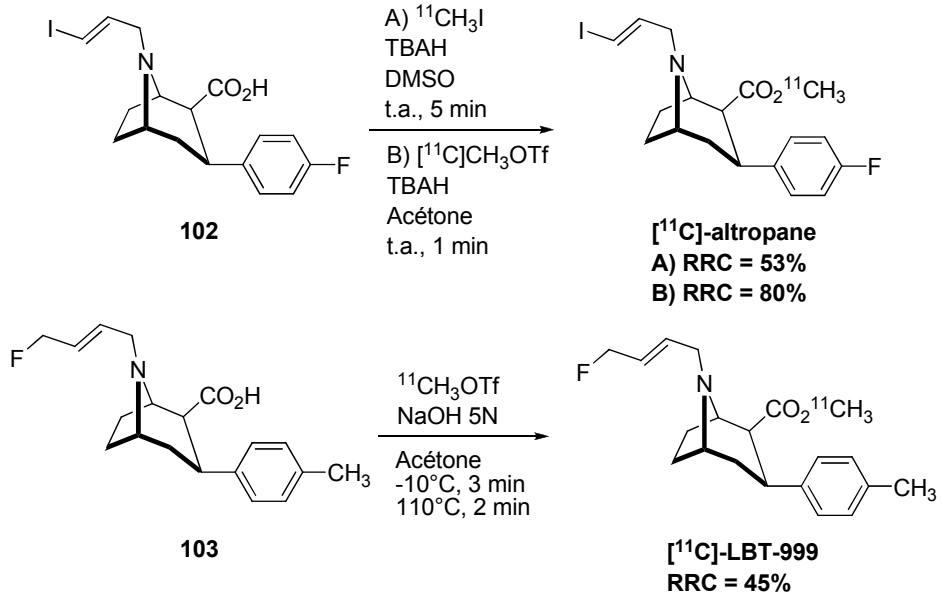


Figure 56: Synthèse de [^{11}C]-altropane et de [^{11}C]-LBT-999.

Dernièrement, un autre dérivé de la famille des altropanes, le PR04.MZ, a été marqué par Riss *et al.*[116] afin d'étudier les ligands du DAT à faibles concentrations sur le petit animal. Le [^{11}C]-PR04.MZ est obtenu par *O*-[^{11}C]-méthylation en présence de $^{11}CH_3I$. Les conditions optimisées de synthèse permettent un RRC de 95% (Figure 57).

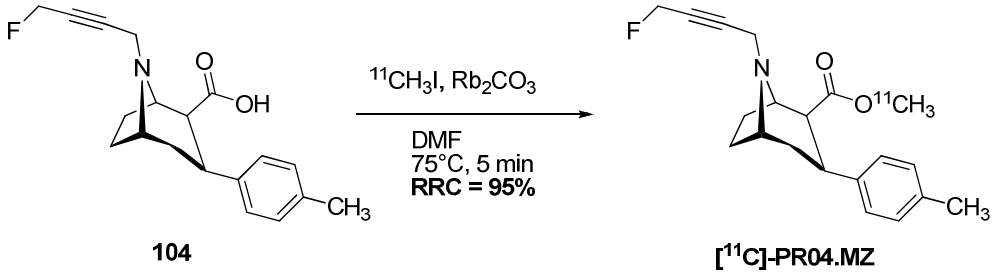


Figure 57: Radiosynthèse du [^{11}C]-PR04.MZ.

[113] Dollé F., Edmon P., Mavel S., Demphel S., Hinnen F., Mincheva Z., Saba W., Valette H., Chalon S., Halldin C., Helfenbein J., Legaillard J., Madelmont J.C., Deloye J.B., Bottlaender M., Guilloteau D., *Bioorg. Med. Chem* **2006**, 14, 1115.
[114] Fischman A.J., Bonab A.A., Babich J.W., Livni E., Alpert N.M., Meltzer P.C., Madras B.K., *Synapse* **2001**, 39, 332.
[115] Halldin C., Erixon-Lindroth N., Pauli S., Chou Y.H., Okubo Y., Karlsson, P., Lundkvist C., Olsson H., Guilloteau D., Edmond P., Farde L., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, 30, 1220.
[116] Riss P.J., Hooker J.M., Alexoff D., Kim S.W., Fowler J.S., Rösch, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, ASAP.

Système glutamatergique (NMDA)

En 2002, la radiosynthèse de l'acide carboxylique **[^{11}C]-106** (Figure 58) réalisée par *O*-[^{11}C]-méthylation avec un RRC maximum de 20%[117] a permis d'étudier spécifiquement le site de reconnaissance de la glycine.

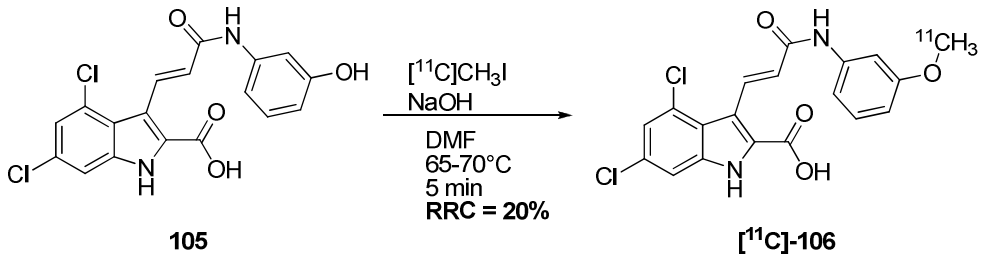


Figure 58: *N*-[^{11}C]-méthylation de l'acide 5,7-dichloroindole-2-carboxylique 106.

Les récepteurs métabotropiques au glutamate de type 5 (mGluR5) ont été étudiés grâce à plusieurs radiotraceurs synthétisé par *O*-alkylation. C'est le cas pour le [^{11}C]-M-PEP, le [^{11}C]-M-PEPy[118] et [^{11}C]-ABP688[119] préparés en présence de $^{11}CH_3I$ (Figure 59). [^{11}C]-ABP688 se montre très sélectif et se place comme le radiotraceur de choix des mGluR5.

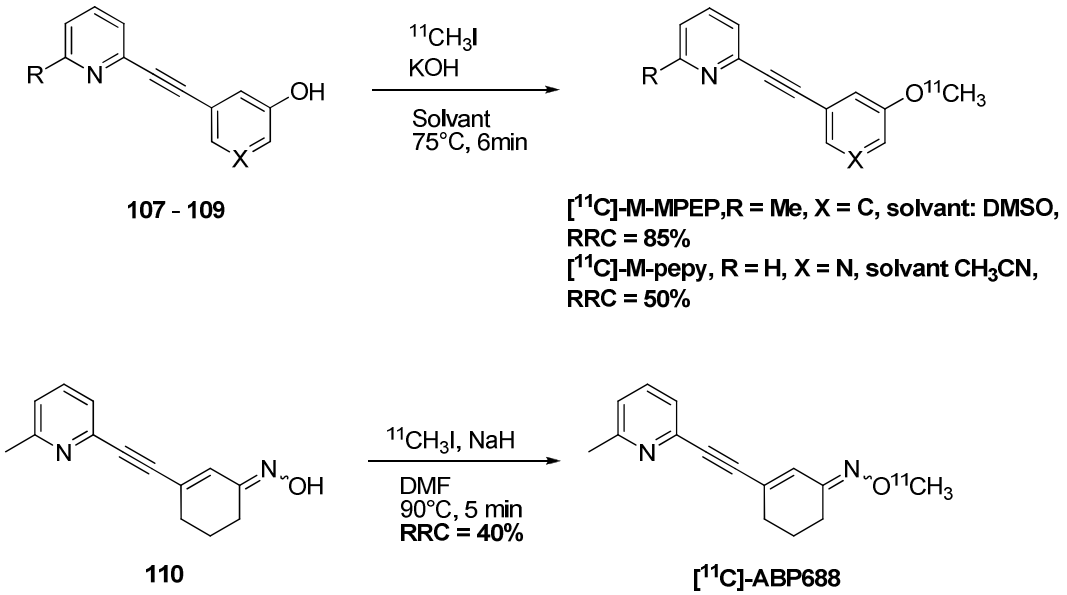


Figure 59: Radiosynthèse du [^{11}C]-M-MPEP, [^{11}C]-M-PEPy et du [^{11}C]-ABP688.

[117] Waterhouse R.N., Sultana A., Guo N., Lee B., Simpson N., Collier L. Laruelle M., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2002**, 45, 91.
[118] Yu M., Tueckmantel W., Wang X., Zhu A., Kozikowski A.P., Brownell A.L., *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32, 631.
[119] Ametamey S.M., Kessler L.J., Honer M., Wyss M.T., Buck A., Hintermann S., Auberson Y.P., Gasparini F., Schubiger P.A., *J. Nucl. Med.* **2006**, 47, 4698.

Enfin, en 2006, Thominiaux[120] a décrit la synthèse de la *(E)-N*-(2-[^{11}C]-méthoxybenzyl)-3-phényl-acrylamidine **[^{11}C]-162**, un antagoniste nanomolaire du récepteur NMDA de type NR2B, par *O*-[^{11}C]-methylation du phénol **161** en présence de $^{11}CH_3OTf$ (Figure 60).

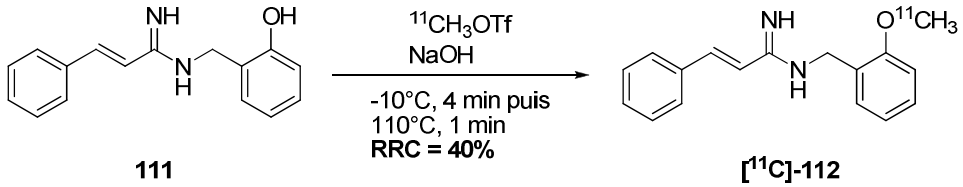


Figure 60: Radiosynthèse du composé [^{11}C]-112.

Récepteurs périphériques aux benzodiazépines (PBR)

En 2006, la radiosynthèse du [^{11}C]-MeDAA1097 (Figure 61) a été décrite par Zang *et al.*[121]. Ce radiotraceur, préparé par *O*-[^{11}C]-alkylation du phénol **[^{11}C]-113** en présence de $^{11}CH_3I$ avec un RRC de 39%, est présenté comme un radiotraceur efficace pour évaluer les récepteurs PBR et ainsi déceler des troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer ou la progression de tumeurs (neurofibromes) chez l'homme[122].

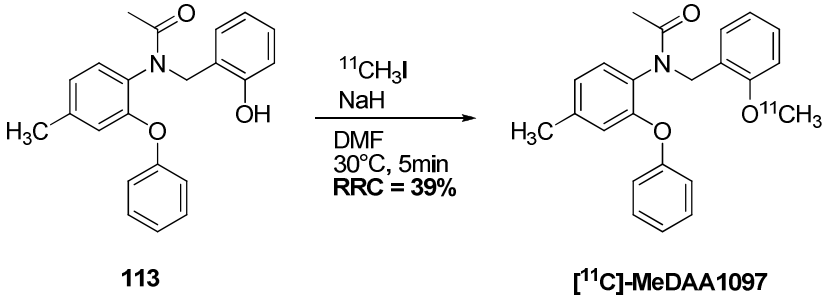
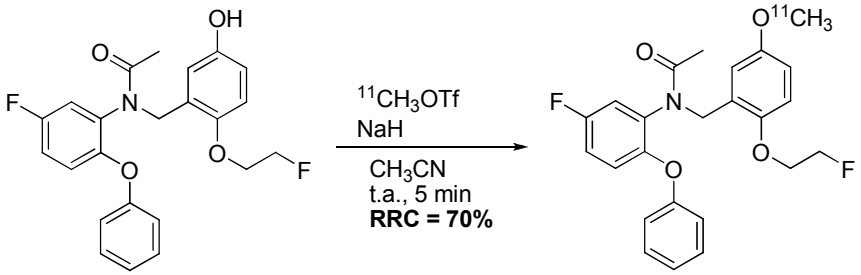


Figure 61: Radiosynthèse du [^{11}C]-MeDAA1097.

En 2009, Zheng *et al.*[123] a mis au point la synthèse du [^{11}C]-FEDAA1106 par *O*-alkylation en présence de triflate de [^{11}C]-méthyle (Figure 62). Les études *in-vivo* ont montré que le [^{11}C]-FEDAA1106 se fixe aux PBR avec une meilleure affinité et spécificité que le [^{11}C]-MeDAA1097.

[120] Thominiaux C., De Bruin B., Bramoullé Y., Hinnen F., Demphel S., Valette H., Bottlaender M., Besret, L., Kassiou M., Dollé F., *Appl. Radiat. Isot.* **2006**, 64, 348.
[121] Zhang M.R., Ogawa M., Maeda J., Takehito I., Noguchi J., Kumata K., Okauchi T., Suhara T., Suzuki K., *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2735.
[122] Yasuno F., Ota M., Kosaka J., Ito H., Higuchi M., Doronbekov T.K., Nozaki S., Fujimura Y., Koeda M., Asada T., Suhara T., *Biol. Psychiatry* **2008**, 64, 10, 835.
[123] Wang M., Gao M., Hutchins D., Zheng Q., *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 2748-2753.



114 **[^{11}C]-FEDAA1106**

Figure 62: Synthèse de [^{11}C]-FEDAA1106.

Substrats et inhibiteurs d'enzymes

Des études ont prouvés que les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs), familles d'endopeptidases zinc-dépendantes, étaient impliquées dans un nombre important de cancers. Elles sont donc des cibles intéressantes aussi bien sur le plan thérapeutique que diagnostique. De ce fait, plusieurs inhibiteurs de ces MMPs (MMPI) de la famille des acides sulfonylaminés, ont été suggérés comme radiotraceurs potentiels[124,125] (Figure 63). Ils sont radiosynthétisés par *O*-[^{11}C]-méthylation en présence de $^{11}CH_3OTf$ en condition basique (TBAH).



[^{11}C]-CGS 25966
RRC = 60%

[^{11}C]-MSMA
RRC = 55%

Figure 63: [^{11}C]-CGS 25966 et [^{11}C]-MSMA.

Les études *in-vitro* montrent que les énantiomères *R* et *S* possèdent bonne une activité inhibitrice des MMP-9 et 2 cependant les résultats *in-vivo* mettent en évidence un manque de spécificité et un mauvais ratio de contraste entre les tumeurs révélées et les cellules saines.

En 2008, Wuest[126] décrit la radiosynthèse d'un inhibiteur de la cyclooxygénase 2 (COX-2), enzyme impliquée dans les processus inflammatoires et surexprimée dans un certain nombre de cancers[127]. La synthèse du radiotraceur **[^{11}C]-116** est réalisée par *O*-[^{11}C]-méthylation du phénol **115** en présence de [^{11}C]-iodométhane avec un RRC de 19% (Figure 64). Les résultats *in-vivo* indique que **[^{11}C]-116** est un radiotraceur potentiel (bonnes affinité et spécificité, pharmacocinétique rapide) permettant la quantification de la COX-2 relative aux processus cancéreux comme, par exemple, dans le cas des cancers colo-rectaux.

[124] Kuhnast B., Bodenstein C., Wester H.J., Weber W., *J. Label. Compd.Radiopharm.* **2003**, 46, 539.
[125] Zheng Q.H., Fei X., Liu X., Wang J.Q., Stone K.L., Martinez T.D., Gay D.J., Baity W.L., Miller K.D., Sledge G.W., Hutchins G.D., *Nucl. Med. Biol.* **2004**, 31, 77.
[126] Wuest F., Kniess T., Bergmann R., Pietzsch J., *Bioorg. Med. Chem*. **2008**, 16, 7662-7670.
[127] Xu X.C., *Anticancer Drugs* **2002**, 13, 127-137.

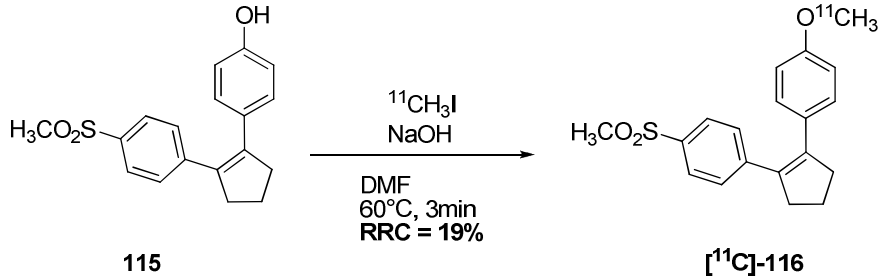


Figure 64: Radiosynthèse de l'inhibiteur de COX-2 [^{11}C]-116.

Des études ont mis en évidence une relation entre l'apoptose cellulaire, observée dans les cancers, et les caspases, des enzymes responsables du clivage protéolytique des protéines. En 2009, Mach *et al.*[128] a décrit le marquage par [^{11}C]-méthylation au $^{11}CH_3I$ d'un inhibiteur de la caspase 3, le [^{11}C]-WC-98. Il est produit suivant deux méthodes utilisant soit une base organique à partir du dérivé *O*-déméthylé **117** soit une source d'hydrure à partir du dérivé protégé **118** avec des RRC respectifs de 74% et 10% (Figure 65).

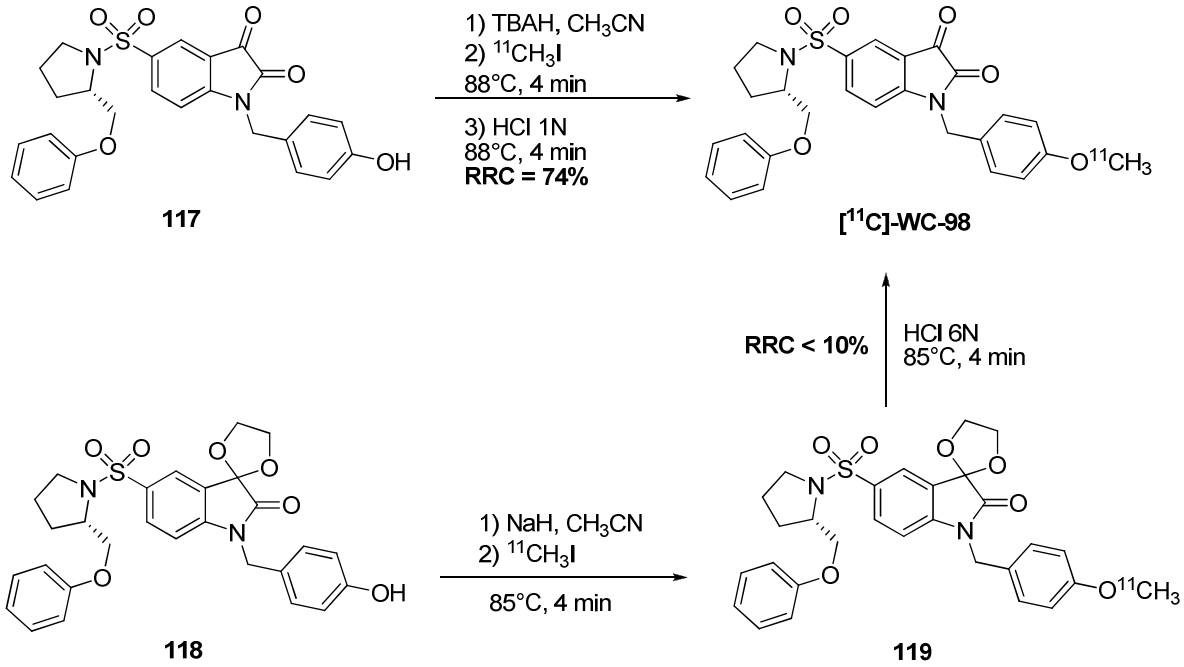


Figure 65: Synthèse de [^{11}C]-WC-98.

[^{11}C]-WC-98 montre une bonne activité et une haute spécificité chez des souris atteintes de cancer du foie. Il constitue un outil prometteur qui permettrait de visualiser l'apoptose et de diagnostiquer des cancers chez l'homme.

[128] Zhou D., Chu W., Chen D.L., Wang Q., Reichert D.E., Rothfuss J., D'Avignon A., Welch M.J., Mach R.H., *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 1337-1348.

Les récepteurs opiacés

En 2003, Studenov *et al.*[129] a décrit la synthèse du [^{11}C]-carfentanil par la méthode « in-loop ». Ce radiotraceur des récepteurs μ est obtenu par *O*-[^{11}C]-méthylation de la fonction acide carboxylique en présence de $^{11}CH_3I$ avec un RRC de 64% (Figure 66) et utilisé dans les régions cérébrales pour étudier les mécanismes de la douleur, du stress et du contrôle des émotions

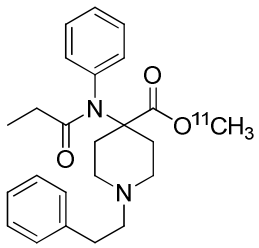


Figure 66: [^{11}C]-carfentanyl.

1.2.1.1.3 *S*-alkylation

La plupart des réactions de [^{11}C]-méthylation sont réalisées sur des amines ou hydroxyles libres. La présence de groupement méthylthioéther sur des molécules potentiellement intéressantes pour la TEP offre une nouvelle alternative de [^{11}C]-méthylation.

En 2005, Paulo *et al.*[130] a décrit la synthèse de deux radiotraceurs du système sérotoninergique **[^{11}C]-121** et **[^{11}C]-123** (Figure 67) par *S*-[^{11}C]-méthylation à partir des thiourées **120** et **122**. Les évaluations *in-vitro* montrent une haute affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A}avec une meilleure absorption de **[^{11}C]-121** dans le cerveau et une excellente affinité avec les récepteurs 5-HT_{2A}. Néanmoins les résultats *in-vivo* montrent que ces deux radiotraceurs sont trop rapidement évacués interdisant leur utilisation comme radiotraceur du système nerveux central. Etonnamment, **[^{11}C]-123** est absorbé remarquablement et de façon prolongée dans les glandes surrénales. Ce phénomène est en cours d'étude.

[129] Studenov A.R., Jivan S., Kenneth R., Buckley R., Adam M.J., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2003**, *46*, 837.
[130] Garcia R., Xavier C., Paulo A., Santos I., Kniess T., Bergmann R., Wüst F, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2005**, 48, 301.

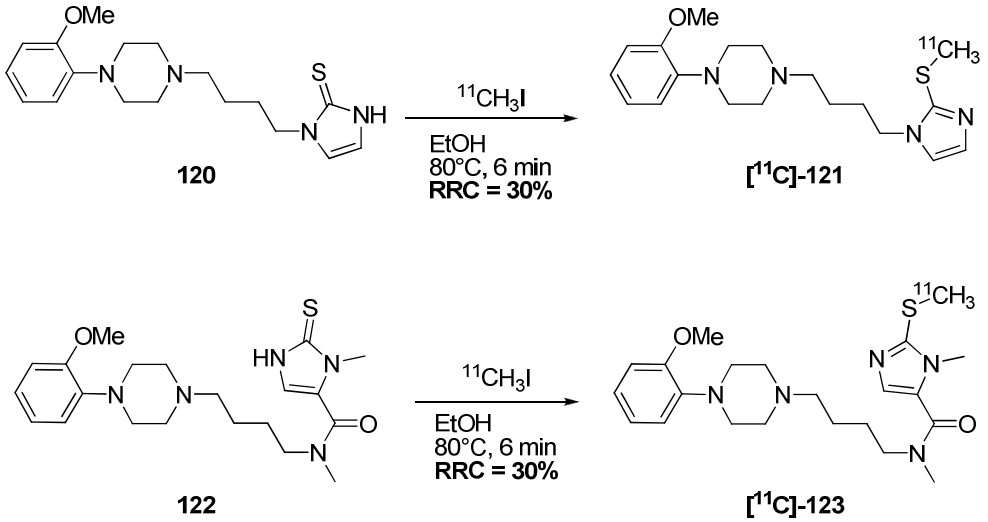


Figure 67: *S*-[^{11}C]- méthylation des dérivés pipérazinylmercaptoimidazole [^{11}C]-121 et [^{11}C]-123.

Les sulfures de biaryles ont été largement utilisés en tant que radiotraceurs des SERT. En 2006, Zessin *et al.*[131] synthétise le [^{11}C]-SMe-ADAM par *S*-[^{11}C]-méthylation du thiophénol **124** en présence de $^{11}CH_3I$.

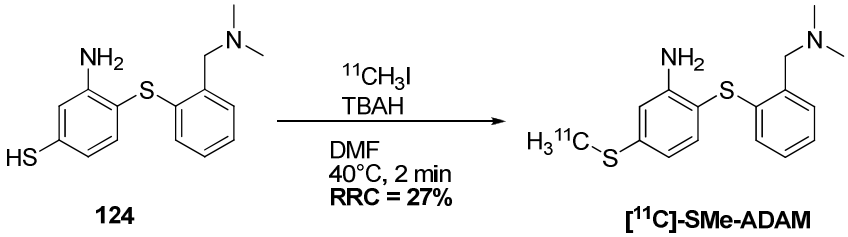


Figure 68: Synthèse du [^{11}C]-SMe-ADAM.

En 2006, la (R)-[^{11}C]-thionisoxetine marquée par *S*-[^{11}C]-méthylation[132], est venue compléter l'éventail des radiotraceurs des NET (Figure 69).

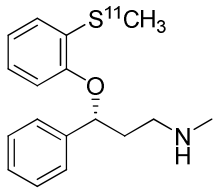


Figure 69: Structure de la [^{11}C]-tionisoxétine.

1.2.2 Les [^{11}C]-méthylations nucléophiles

La formation de liaison carbone-carbone ou carbone-hétéro-atome par réactions pallado-catalysées a suscité un grand intérêt pour le marquage de molécule au ^{11}C. Ceci est dû

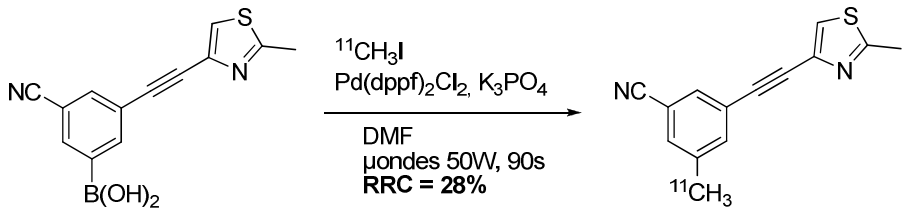
[131] Zessin J., Deuther-Conrad W., Kretzschmar M., Wüst F., Pawelke B., Brust P., Steinbach J., Bergmann R., *Nucl. Med. Biol.* **2006**, 33, 53.
[132] Schou M., Pike V.W., Varrone A., Gulas B., Farde L., Halldin C., *J. Labelled Cpd Radiopharm.* **2006**, 49, 1007-1019.

au large éventail de réactions, de catalyseurs et de ligands développés en chimie du ^{12}C et constitue une alternative plus tolérante à la méthylation nucléophile en présence de $^{11}CH_3Li$ ou de $^{11}CH_3MgBr$ trop agressifs et restrictifs en terme de substrat. Par ailleurs, le terme « pallado-assisté » a été préféré à « pallado-catalysé » car le complexe palladié est utilisé en large excès par rapport au $^{11}CH_3I$ généré lors des radiosynthèses.

1.2.2.1 Le couplage de Suzuki

La volonté de développer une méthodologie pallado-assistée utilisant des dérivés moins toxiques que ceux décrits précédemment a incité les chercheurs à développer des radiosynthèses faisant intervenir le couplage de Suzuki. Il consiste en un couplage pallado-catalysé entre un dérivé du bore (acides ou esters boroniques) et un dérivé halogéné en présence d'une base.

En 2005, Hamill *et al.*[133] a décrit la radiosynthèse du [^{11}C]M-MTEB par couplage de Suzuki assisté par les micro-ondes, en présence de $Pd(dppf)_2Cl_2$ et de K_3PO_4. K_3PO_4 joue le même rôle que la base dans le couplage de Stille : il génère un organoborate plus réactif permettant d'accélérer l'étape de transmétallation, restant l'étape limitante du cycle catalytique.



125 **[^{11}C]-M-MTEB**

Figure 70: Radiosynthèse du [^{11}C]-M-MTEB par couplage de Suzuki.

En 2009, une méthodologie basée sur l'utilisation du complexe Pd_2dba_3/P(*o*-Tolyl)$_3$ et d'un ester boronique a été mise au point sur des molécules modèles (Figure 71)[134], dans le but de synthétiser le [^{11}C]-celecoxib, un inhibiteur de la COX-2 permettant de visualiser des zones inflammées telles que des cellules tumorales.

[133] Hamill T.G., Krause S., Ryan C., Bonnefous C., Govek S., Seiders T.J., Cosford N.D.P., Roppe J., Kamenecka T., Patel S., Gibson R.E., Sanabria S., Riffel K., Eng W.S., King C., Yang X.Q., Green M.D., O'Malley S.S., Hargreaves R., Burns H.D. *Synapse* **2005**, 56, 205.

[134] Doi H., Ban I., Noyoama A., Sumi K., Kuang C., Hosoya T., Tsukada H., Suzuki M., *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 4165-4171.

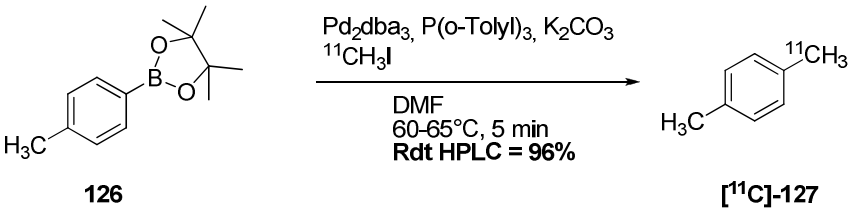


Figure 71: Synthèse de [^{11}C]-xylène [^{11}C]-223 par couplage de Suzuki.

Les inconvénients du couplage de Suzuki sont comparables à ceux du couplage de Stille. Les précurseurs boroniques doivent être synthétisés et bien que les sous-produits soient moins toxiques, l'étape de purification se révèle être aussi délicate.

1.2.2.2 Le couplage avec les organoétains

1.2.2.2.1 Le couplage de Stille « classique »

Les réactions de [^{11}C]-méthylation par couplage de Stille mettent en jeu le $^{11}CH_3I$ et un dérivé organostannane de la molécule cible. Dans la majeure partie des radiosynthèses, la marquage est assisté par le Pd_2dba_3 couplé à un ligand encombré dans les proportions 1/4. Bien que plusieurs ligands aient été testés, la tri-(*ortho*-tolyl)-phosphine P(*o*-Tolyl)$_3$ donne les meilleurs résultats[135]. Son encombrement stérique et son angle de cône très large (194°) augmente la réactivité du catalyseur actif Pd(P(*o*-Tolyl)$_3$)$_2$ ce qui accélère l'étape de transmétallation. Ainsi, ces conditions associées à l'utilisation du chlorure de cuivre I ont été utilisées pour la radiosynthèse du [^{11}C]-5MA, un nouveau ligand des nAChRs, à partir du précurseur stannylé **128** avec un RRC de 39%[136] (Figure 72).

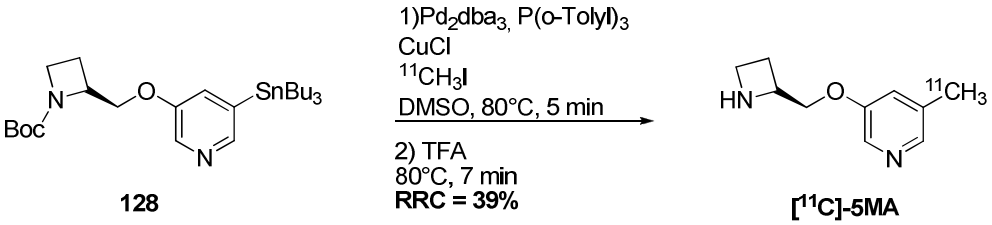
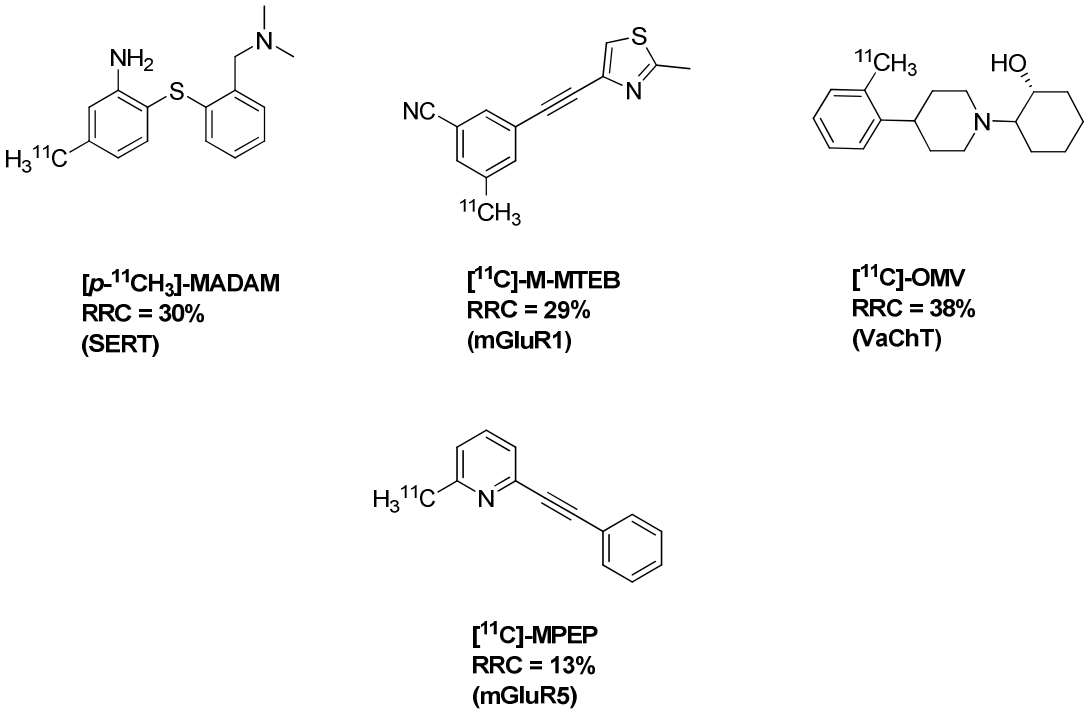


Figure 72: Radiosynthèse du [^{11}C]-5MA.

Le même système catalytique a également été utilisé pour la synthèse de radiotraceurs ayant pour cible les SERT[137], les récepteurs mGlu[138,139] ou les transporteurs vésiculaires de l'acétycholine (VAChT)[140] (Figure 73).

[135] Samuelsson L., Langström B., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **2003**, 46, 263.
[136] Langström B, Karimi F., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **2002**, 45, 423-434.
[137] Tarkiainen J., Vercouillie J., Emond P., Sandell J., Hiltunen J., Guilloteau D., Halldin C., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **2001**, 44, 1013-1023.
[138] Hamill T.G., Krause S., Ryan C., Bonnefous C., Govek S., Seiders T.J., Cosford N.D.P., Roppe J., Kamenecka T., Patel S., Gibson R.E., Sanabria S., Riffel K., Eng W.S., King C., Yang X.Q., Green M.D., O'Malley S.S., Hargreaves R., Burns H.D. *Synapse* **2005**, 56, 205.
[139] Yu M., Tueckmantel W., Wang X., Zhu A., Kozikowki A.P., Brownell A.P., *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32, 631.
[140] Kawanamura K., Shiba K., Tsukada H., Nishiyama .S., Mori H., Ishiwata H., *Ann. Nucl. Med.* **2006**, 20, 417.



[*p*-$^{11}CH_3$]-MADAM
RRC = 30%
(SERT)

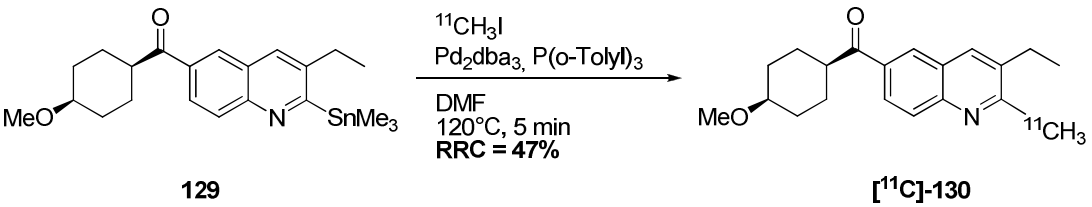
[^{11}C]-M-MTEB
RRC = 29%
(mGluR1)

[^{11}C]-OMV
RRC = 38%
(VaChT)

[^{11}C]-MPEP
RRC = 13%
(mGluR5)

Figure 73: [*p*-$^{11}CH_3$]MADAM, [^{11}C]-M-MTEB, [^{11}C]-MPEP et (-)-[^{11}C]-OMV obtenus par couplage de Stille.

En 2005, les récepteurs métabotropiques 1 du glutamate (mGluR1) ont été étudié *ex-vivo* pour la première fois par TEP grâce au dérivé quinolinyle **[^{11}C]-130** marqué au ^{11}C obtenu par couplage de Stille à partir du précurseur **129,** avec un rendement radiochimique corrigé de 47%[141] (Figure 74). Les résultats mettent en évidence la sélectivité et la haute affinité du dérivé **[^{11}C]-130** vis-à-vis des récepteurs mGluR1 du cérébellum.



129

[^{11}C]-130

Figure 74: Radiosynthèse du dérivé [^{11}C]-207.

Plus récemment l'équipe de Goodman[142] a décrit les radiosynthèses du [^{11}C]-MENET et du [^{11}C]-MESNET par couplage de Stille avec des RRC de 38% et un temps de synthèse total de 1h (Figure 75). Ces analogues de la reboxetine montrent une bonne sélectivité et une haute affinité vis-à-vis des NET chez le rat et le singe. Ils viennent donc s'ajouter au radiotraceurs potentiels des NET déjà disponible.

[141] Huang Y., Narendran R., Bischoff F., Guo N., Zhu Z., Bae S., Lesage S.A., Laruelle M., *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5096-5099.
[142] Zeng F., Mun J., Jarkas N., Stehouwer J., Voll R.J., Tamagnan G.D., Howell L., Votaw J.R., Kilts C.D., Nemeroff C.B., Doodman M.M., *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 62-73.

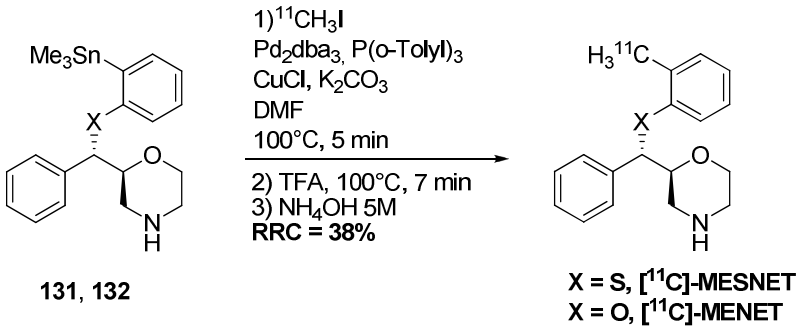


Figure 75: Synthèse de [^{11}C]-MESNET et [^{11}C]-MENET par couplage de Stille.

1.2.2.2.2 Le Couplage de Stille selon Vedejs

Le principal inconvénient du couplage de Stille « clasique » en radiosynthèse réside dans la préparation des précurseurs stannylés parfois obtenu avec de mauvais rendements et difficilement purifiables. Le couplage de Stille « classique » oblige également que le précurseur radiomarqué soit $^{11}CH_3I$ car les groupements alkyles ne sont pas transférables.
En 1992, Vedejs[143] a développé un couplage de Stille permettant de transférer des groupements alkyles tel que le groupement méthyle. Cette méthodologie est basée sur l'utilisation d'un nouveau précurseur stannylé **135** obtenu à partir du 5-halo-1-aza-5-stannabicyclo[3.3.3]undécane **134** et le méthyl lithium (Figure 76).

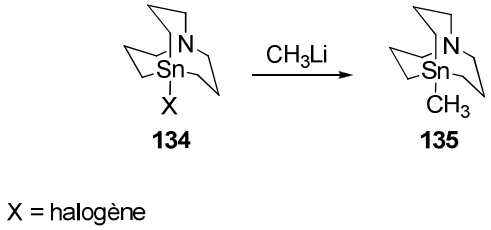


Figure 76: Synthèse du dérivé 135.

Cette méthode permet d'éviter la préparation des précurseurs stannylés, à l'exception du dérivé **135**, et l'utilisation directe d'iodure d'alkyle.

Le 5-[^{11}C]-méthyle-1-aza-5-stannabicyclo[3.3.3]undécane **[^{11}C]-135** a été utilisé en 2004 par Langström[144] pour marquer différentes molécules en série aromatique, hétéroaromatique et vinylique (Figure 77)

[143] Vedejs E., Haight R., Moss W.O., *J. Am. Chem. Soc*. **1992**, 114, 6556-6558.
[144] Forngren T., Samuelsson L., Langström B., *J. Label. Cpd. Radiopharm.* **2004**, 47, 71.

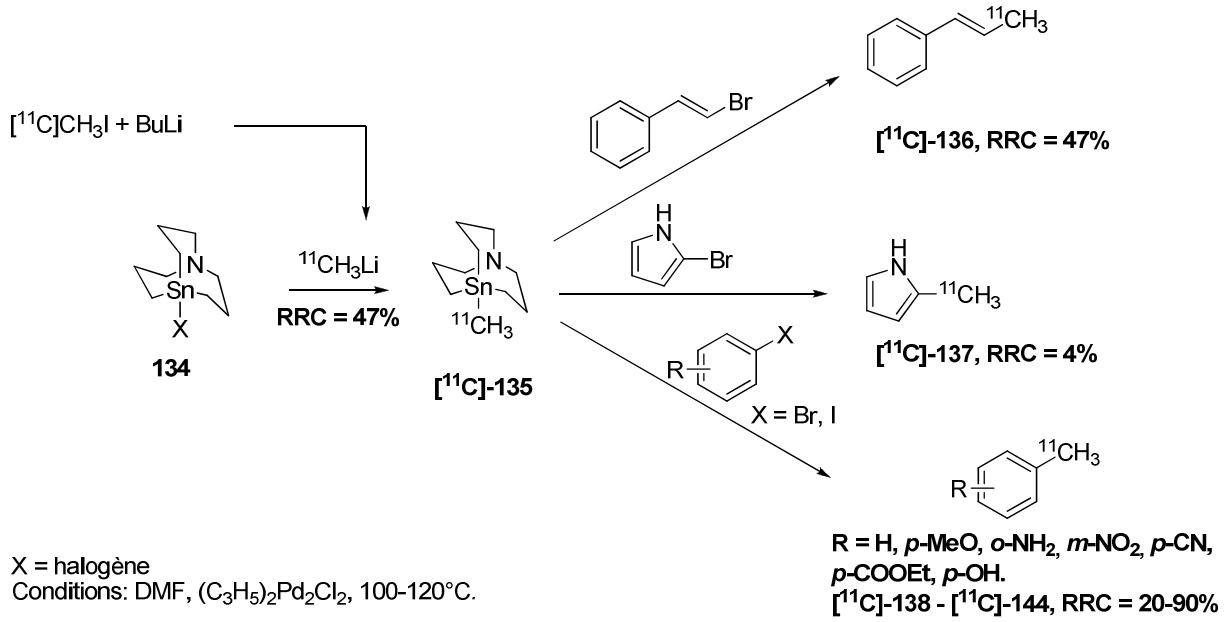


Figure 77: Utilisation du dérivé [^{11}C]-210 dans le couplage de Stille selon Vedejs.

1.2.2.2.3 Le couplage de Stille modifié

Le couplage de Stille modifié, développé par l'équipe de Fouquet[145], exploite la réactivité des monoorganostannates obtenus en deux étapes par addition oxydante d'un halogénure d'alkyle, d'aryle ou de vinyl sur le stannylène de Lappert **145** puis activation par une source de fluor. Cette méthode a permis de transférer des groupements alkyles dans des conditions rapides et de résoudre le problème de toxicité des dérivés stannylés.

Le couplage de Stille modifié a donc été appliquée à la [^{11}C]-méthylation des dérivés quinoliniques et naphtaléniques **[^{11}C]-153** - **[^{11}C]-158** à partir des précurseurs bromés **147** - **152** en présence de Pd_2dba_3 et du stannate **[^{11}C]-240** avec des RRC compris entre 40 et 80% (Figure 78)[145].

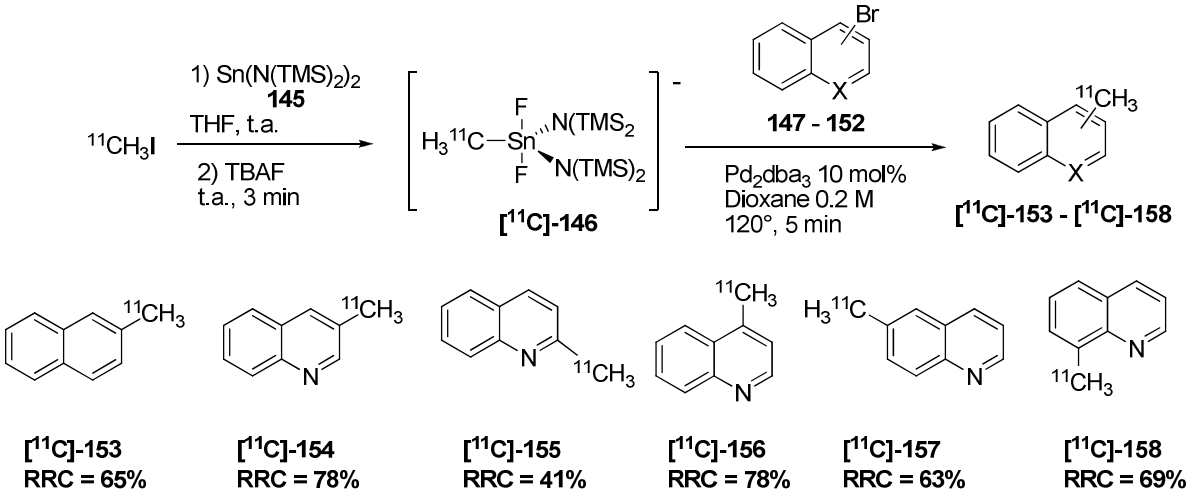


Figure 78: Radiosynthèse de [^{11}C]-méthylquinolines et du 2-[^{11}C]-méthylnaphtalène par couplage de Stille modifié.

[145] Huiban M., Huet H., Barré L., Sobrio F., Fouquet E., Perrio C., *Chem. Commun.* **2006**, 97

En 2008, à la suite de cette étude méthodologique, a été mise au point la radiosynthèse d'analogues du [^{11}C]-SB-222200, un antagoniste non-peptidique des récepteurs de la NeuroKinine 3 impliquée dans des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), comportementales (schizophrénie), l'anxiété ou la dépression. Le couplage de Stille modifié a ainsi permis d'obtenir les radiotraceurs **[^{11}C]-161** et **[^{11}C]-162** avec des RRC respectifs de 59 et 60% (Figure 79)[146].

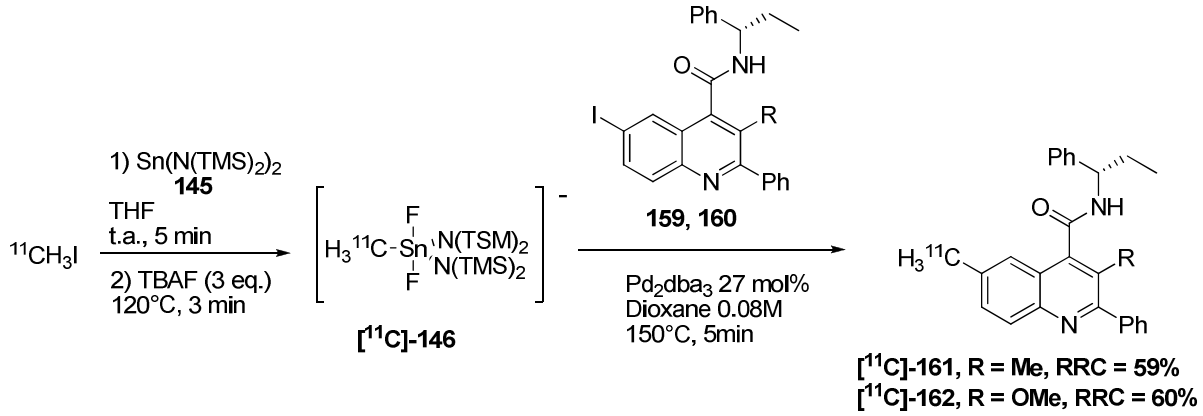


Figure 79: Radiosynthèse d'analogues du [^{11}C]-SB-222200 par couplage de Stille modifié.

Une étude comparative avec le couplage de Stille « classique » a permis de démontrer que le couplage de Stille modifié est une alternative efficace[146]. En effet, de meilleurs résultats sont obtenus sans l'ajout de ligands ni d'additif contrairement au couplage de Stille traditionnel ce qui est important pour l'application chez l'homme.

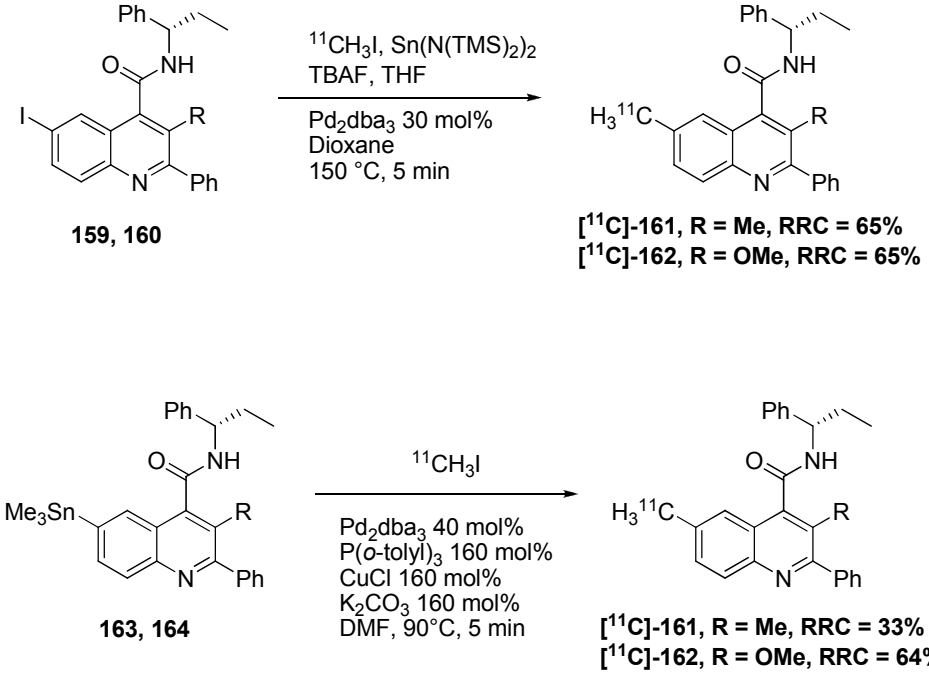


Figure 80: Comparaison entre la [^{11}C]-méthylation par couplage de Stille «classique» et par couplage de Stille modifié.

[146] Bourdier T., Huiban M., Huet A., Sobrio F., Fouquet E., Perrio C., Barré L., *Synthesis* **2008**, 978

Cependant les résultats ont montré qu'il est incompatible avec le motif 3-bromo-quinoline-4-carboxamide **165a**. En effet lors de l'addition oxydante, l'hydrogène de l'amide de l'intermédiaire **165b** vient se coordinner au palladium entraînant une réaction de d'hydrodéhalogénation conduisant au produit **165c** (Figure 81).

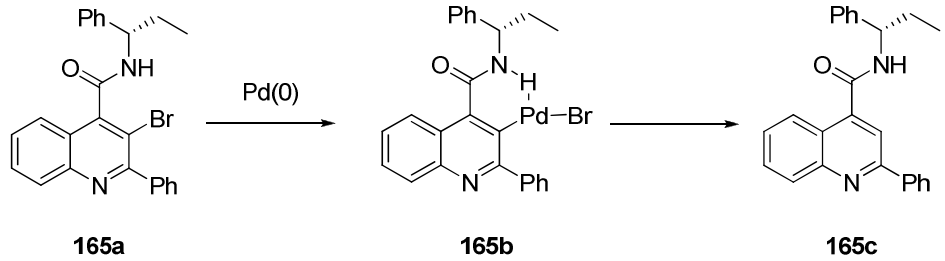


Figure 81: Déhalogénation du précurseur 165a

1.2.2.3 Hydrozirconation

Le groupement prényle est un élément présent dans beaucoup de composés naturels d'intérêts biologiques tels que les stéroïdes, les carotenoïdes ou les terpènes. Le marquage de cet élément par un radionucléide β^+ constituerait un accès original à un nombre important de molécules utilisable en TEP.

En 2006, Wuest et Berndt[147] ont mis au point la synthèse de motif [^{11}C]-prényle à partir du dérivé alc-2-yne **165** par hydrozirconation en présence du réactif de Schwartz. Le *syn*-alcénylzirconocène **166** obtenu subit ensuite une [^{11}C]-méthylation assistée par un métal de transition en présence de $^{11}CH_3I$ pour obtenir le dérivé **[^{11}C]-167** contenant le groupement [^{11}C]-prényle (Figure 82).

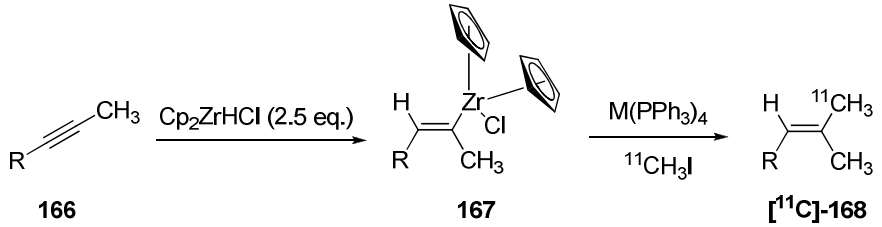


Figure 82: Synthèse de groupement [^{11}C]-prényle par hydrozyrconation/[^{11}C]-méthylation.

Cette méthodologie a été appliquée à la synthèse des α,α'-[^{11}C]-diméthylalcènes **[^{11}C]-169** - **[^{11}C]-175** différemment fonctionnalisés avec de bons rendements en utilisant le palladium comme métal de transition (Figure 83). Cependant les résultats ont mis en évidence une incompatibilité avec les fonctionnalités pouvant être réduites en présence d'hydrogène telles que les fonctions nitro ou ester des composés **[^{11}C]-174** et **[^{11}C]-175** (Figure 83)

[147] Wuest F.R., Berndt M., *L. Label. Cpd. Radiopharm.* **2006**, 49, 91-100.

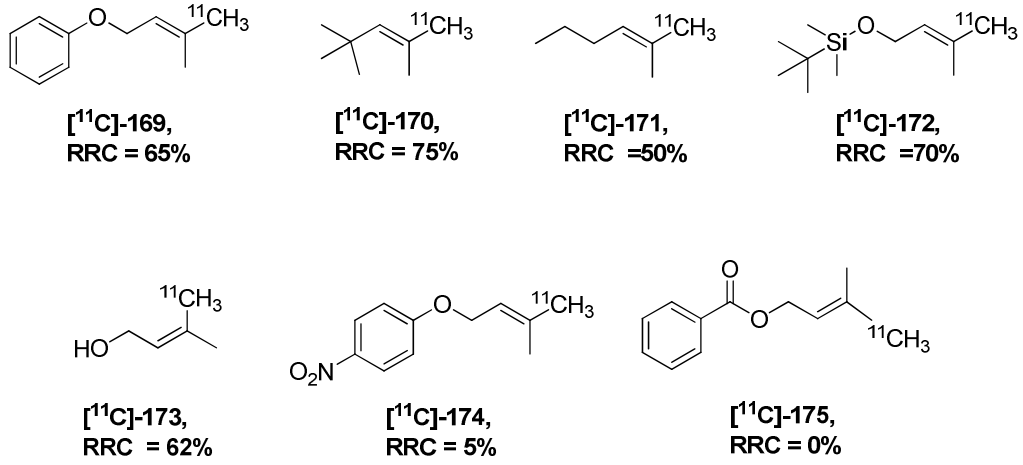


Figure 83: Synthèse de α,α'-[$^{11}CH_3$]diméthylalcènes par Hydrozirconation/[^{11}C]-méthylation.

1.3 Réactions de [^{11}C]-carbonylation

La présence de fonction carbonyle dans un très grand nombre de molécule d'intérêt pour la TEP a poussé les radiochimistes à développer des méthodologies basées sur l'utilisation directe du monoxyde de [^{11}C]-carbone. Ce précurseur est facilement obtenu par réduction du [^{11}C]-CO_2 en présence de zinc[148] ou de molybdène[149].

La [^{11}C]-carbonylation en présence de métal de transition (Pd, Rh, Se) est une méthode efficace pour accéder à différentes fonctions carbonylées comme les cétones, les acides carboxyliques, les amides ou encore les urées. Cependant le principal inconvénient de cette méthodologie est la faible solubilité du ^{11}CO dans les solvants organiques traditionnels ce qui a pour effet de ralentir l'étape d'insertion. Pour pallier ce problème, Audrain *et al.* a décrit une méthode permettant de piéger efficacement le ^{11}CO dans une solution de BH_3 dans le THF[150]. Le complexe [^{11}C]-BH_3.CO **176**, soluble dans les solvants organiques, est très réactif vis-à-vis des amines et des alcools pour former des amides et des esters.

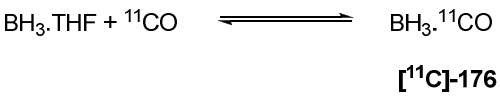


Figure 84: Utilisation du complexe [^{11}C]-CO.BH_3 dans les réactions de [^{11}C]-carbonylation en présence de palladium.

1.3.1 Synthèse de [^{11}C-carbonyle]-cétones

La réaction la plus utilisée est la [^{11}C]-carbonylation pallado-assistée développée récemment par l'équipe de Langström[151]. Le mécanisme est régi par un cycle catalytique comportant 4 étapes. L'étape clé est l'insertion du [^{11}C]-CO dans la liaison palladium halogène

[148] Clark J.C., Buckingham P.D., *Short-lived Radioactive Gases for Clinical Use*, *Butterworths*, *London*, **1975**, 231.
[149] Zeisler S.K., Nader M., Theobald A., Oberdorfer F., *Appl. Radiat. Isot.* **1997**, 48, 1091.
[150] Audrain H., Martarello L., Gee A., Bender D., *Chem. Commun.* **2004**, 558.
[151] Kihlberg T., Langström B., Ferm T., Eriksson J., PCT/IB2005/001939, **2005**.

du complexe de palladium II **178** issu de l'addition oxydante. L'attaque d'un nucléophile sur le complexe d'[^{11}C]-acétylpalladium II **[^{11}C]-179** suivie de l'élimination réductrice aboutit à la formation du composé carbonylé **[^{11}C]-182**(Figure 85).

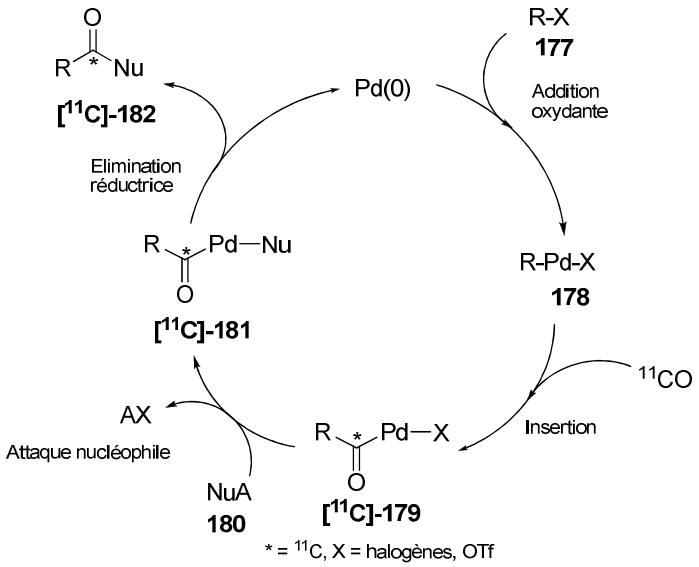


Figure 85: Cycle catalytique de la [^{11}C]-carbonylation en présence de ^{11}CO et de Pd(0).

Ainsi l'association du couplage de Stille et l'insertion de ^{11}CO a été appliquée à la synthèse d'une série de [^{11}C-carbonyle]-cétones aromatiques et hétéro-aromatiques (**[^{11}C]-183** - **[^{11}C]-186**) avec de bons RRC en utilisant un système catalytique composé de Pd_2dba_3 et de P(*o*-Tolyl)$_3$ (Figure 86) [152].

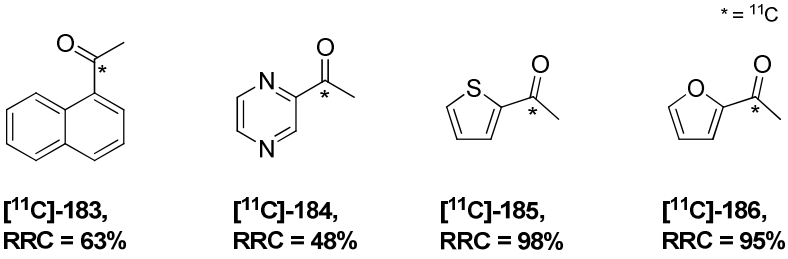


Figure 86: [^{11}C-carbonyl]-cétones obtenues par couplage de Stille avec insertion de ^{11}CO.

Dans une même approche, le couplage de Suzuki entre des acides boroniques (**188** - **191**) et le pyridin-2-yl triflate **187** en présence de ^{11}CO a permis la synthèse d'une série de [^{11}C-carbonyle]-acétophénones modèles (**[^{11}C]-192** - **[^{11}C]-195**) [153,154].

[152] Karimi F., Barletta J., Langström B., *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2374.
[153] Rahman O., Llop J., Langström B., *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2674.
[154] Rahman O., Kihlberg T., Langström B, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 474.

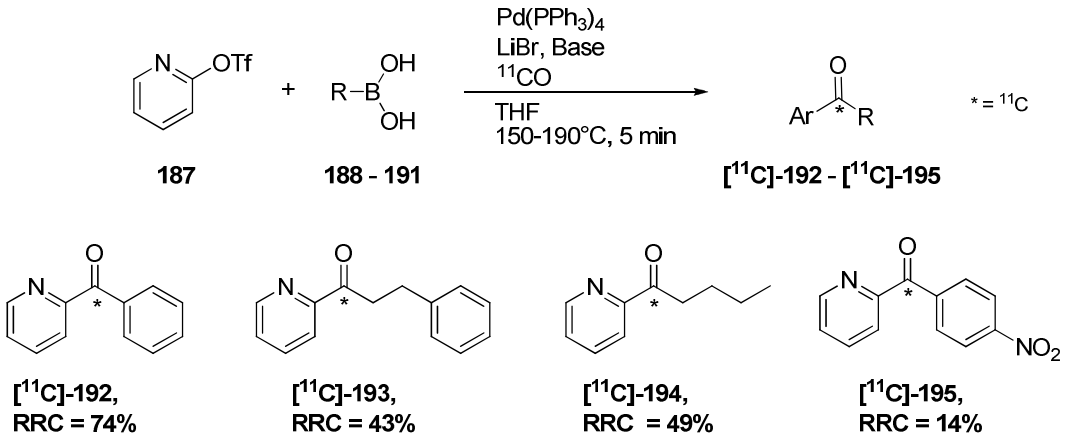


Figure 87: Synthèse de [^{11}C-carbonyle]-acétophénones par couplage de Suzuki en présence de ^{11}CO

Cette stratégie a été appliquée à la synthèse du [^{11}C-carbonyle]-2-(2-benzoylphénoxy)-*N*-phenylacétamide **54**, inhibiteur de la transcriptase de type 1 impliquée dans le VIH, par l'équipe de Nader en 2002[155] en comparant le couplage de Stille et le couplage de Suzuki (Figure 88). Les résultats montrent que le couplage de Stille permet d'accéder a un meilleur RRC.

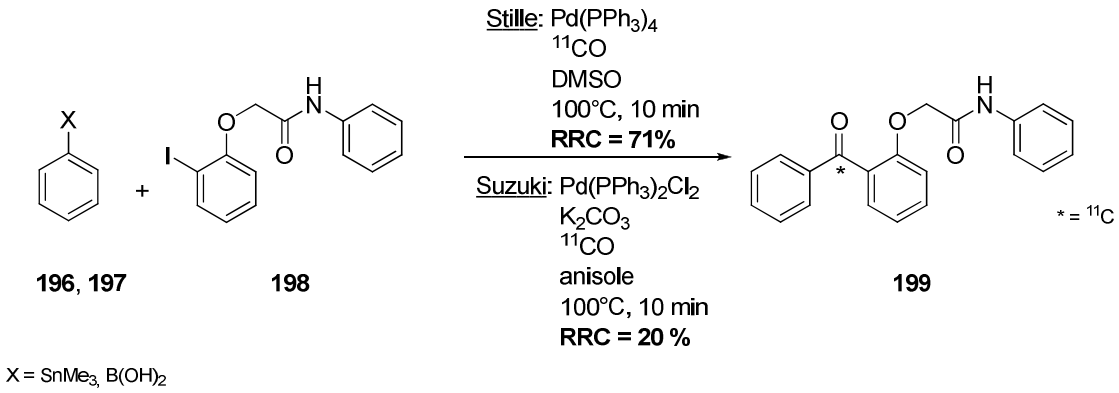


Figure 88: Synthèse de l'[^{11}C-carbonyl]-acétamide 199 par couplage de Stille ou par couplage de Suzuki en présence de ^{11}CO.

1.3.2 Synthèse d'amides

La carboxy-amination en présence de ^{11}CO est de loin la méthode de choix pour marquer la partie amide d'une molécule d'intérêt. En 2003, Langström et son équipe[156] ont développé la radiosynthèse d'une série de [^{11}C]-amides (**[^{11}C]-204** - **[^{11}C]-207**) par carboxyamination en présence de ^{11}CO et de $Pd(PPh_3)_4$ (Figure 89). Les résultats ont montré que les meilleurs RRC sont obtenus avec des amines basiques telles que la diméthylamine ou la pyrrolidine. En revanche, l'utilisation d'amines désactivées comme l'aniline entraîne une chute du RRC. L'activation *in-situ* de l'amine par une base telle que le bis(triméthylsilyl)amidure de

[155] Nader M.W., Oberdorfer F., *Appl. Radiat. Isot.* **2002**, 57, 681.
[156] Karimi F., Langström B., *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 541.

lithium[156] ou la 1,2,2,6,6-pentaméthylpipéridine[157] permet de résoudre ce problème. Cette optimisation a permis d'obtenir le [^{11}C-carbonyl]-phénylbenzamide **[^{11}C]-207** avec un RRC de 76%.

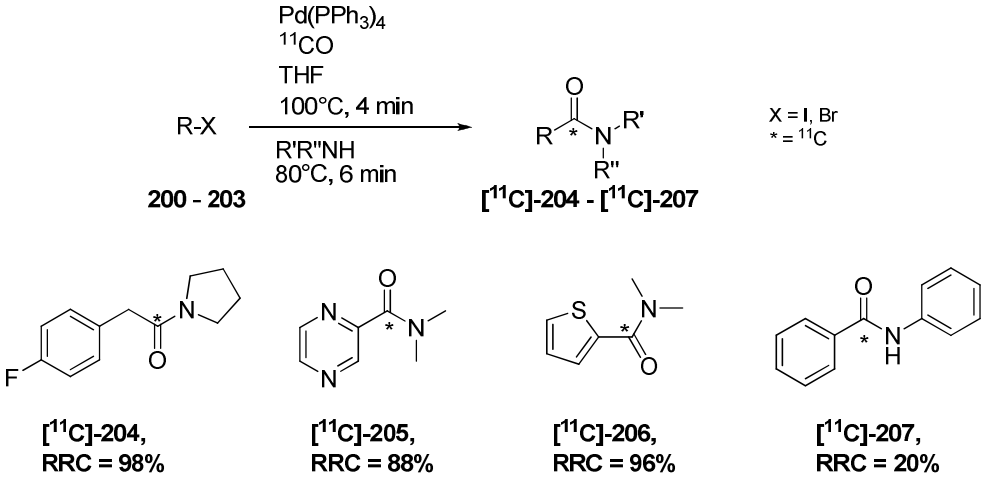


Figure 89: Exemples de [^{11}C-carbonyle]-amides formés par [^{11}C]-carboxyamination.

Puis en 2007, la même équipe[158] a mis au point la synthèse de [^{11}C-carbonyle]-acrylamides (**[^{11}C]-208** - **[^{11}C]-210**) par [^{11}C]-carboxyamination entre un halogénure de vinyle et une amine avec de bon RRC (Figure 90).

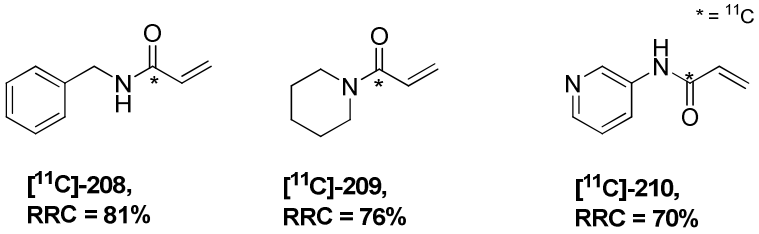


Figure 90: Exemple de [^{11}C-carbonyle]-acrylamides.

Les triflates d'aryles ont également pu être utilisés pour la radiosynthèse de [^{11}C-carbonyl]-amides[159] (Figure 91). Cependant ils requièrent l'utilisation de LiBr afin de générer le complexe actif **215** à partir du complexe inactif **214**.

[157] Karimi F., Langström B., *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2132.
[158] Eriksson J., Åberg O., Långström B., *Eur. J. Chem.Soc.* **2007**, 455–461.
[159] Rahman O., Kilhberg T., Langström B., *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 35558.

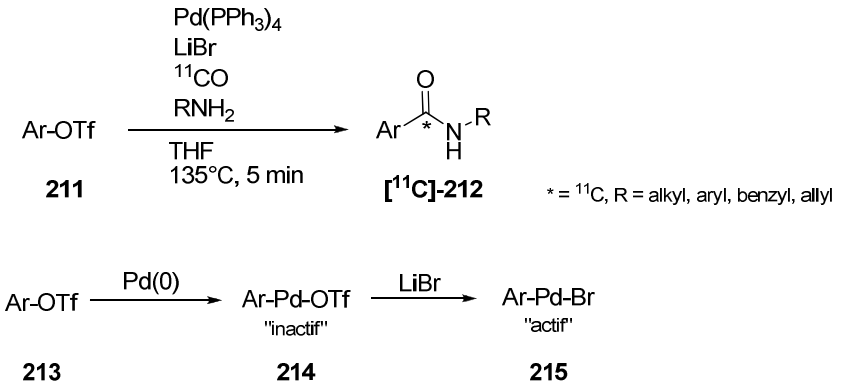


Figure 91: [^{11}C]-carboxyamination de triflate d'aryles

Cette méthodologie a été utilisée pour radiomarquer la partie imide d'analogues du [^{11}C]-PK11195 (**[^{11}C]-216** - **[^{11}C]-221**), radiotraceur potentiel des récepteurs périphériques aux benzodiazépines (PBR), avec un RRC maximum de 55% (Figure 92)[160].

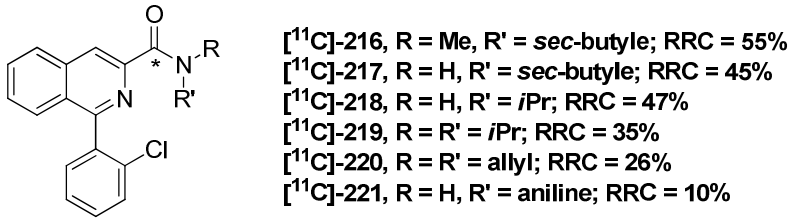


Figure 92: [^{11}C-carbonyl]-analogues du [^{11}C]-PK11195.

En 2008, Donohue *et al.*[161] a appliqué cette stratégie pour synthétiser le [^{11}C-carbonyle]-PipISB, antagoniste des récepteurs cannabinoïdes de type 1. La [^{11}C]-carboxyamination est conduite sous pression de ^{11}CO en présence de $Pd(PPh_3)_4$ avec un RRC de 12 % (Figure 93).

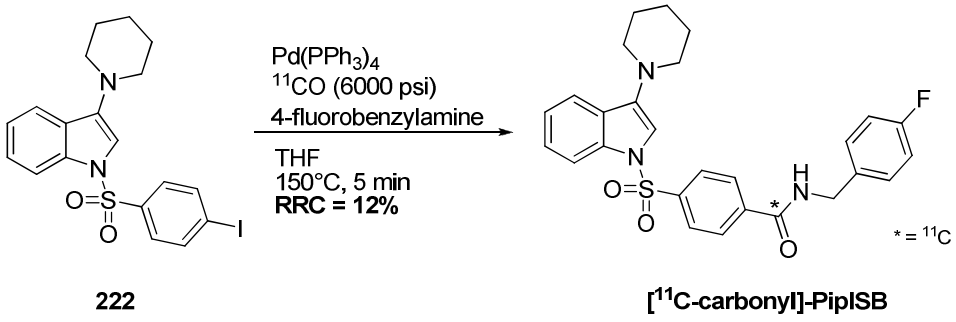


Figure 93: Radiosynthèse du [^{11}C-carbonyle]-PipISB.

[160] Rahman O., Kihlberg T., Langström B., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 2699.
[161] Donohue S., Halldin C., Schou M., Hong J., Phebus L., Chernet E., Hitchcock S.A., Gardinier K.M., Ruley K.M., Krushinski J.H., Schaus J., Pike V.W., *J. Label. Cpd. Radiopharm.* **2008**, 51, 146-152.

1.3.3 Synthèse d'urées et carbamates

La [^{11}C]-carbonylation assistée au rhodium donne accès à ces fonctionnalités. Ainsi Langström a mis au point la radiosynthèse de carbamates[162], de diphénylurées[162] et d'hydroxyurée[163] à partir de dérivés azotures, d'éthanolate de lithium, d'aniline et de *O*-TMS-hydroxylamine (Figure 94).

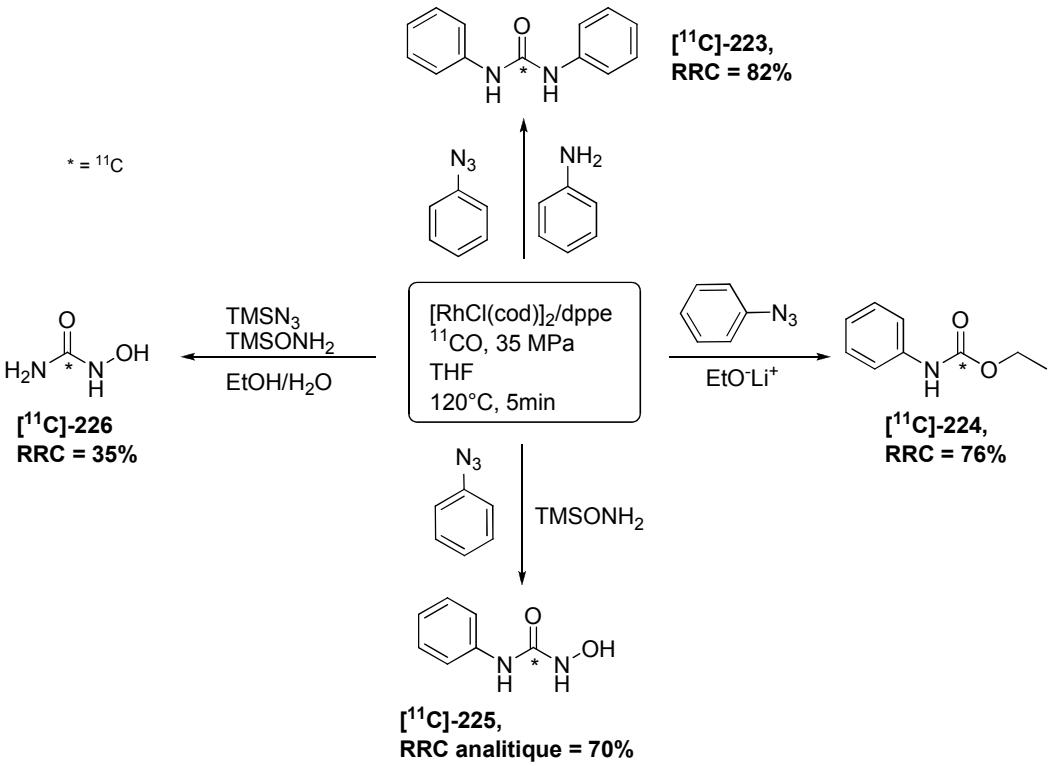


Figure 94: Formation de l'urée [^{11}C]-223, du carbamate [^{11}C]-224 et des hydroxyurées [^{11}C]-225 et [^{11}C]-226.

Les études mécanistiques[163] supposent la formation du nitrène **228** qui va réagir avec le [^{11}C]-CO en présence de rhodium pour former les isocyanates libres **[^{11}C]-229** et **[^{11}C]-230**. Ces deux entités, ayant la même réactivité vis-à-vis des amines et de l'hydroxylamine, permettent d'accéder à différentes hydroxyurées, urées ou carbamates (Figure 95).

[162] Barletta J., Karimi F., Langstrom B., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **2006**, 49, 429.
[163] Doi H., Barletta J., Suzuki M., Noyori R., Watanabe Y., Langstrom B., *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 3063.

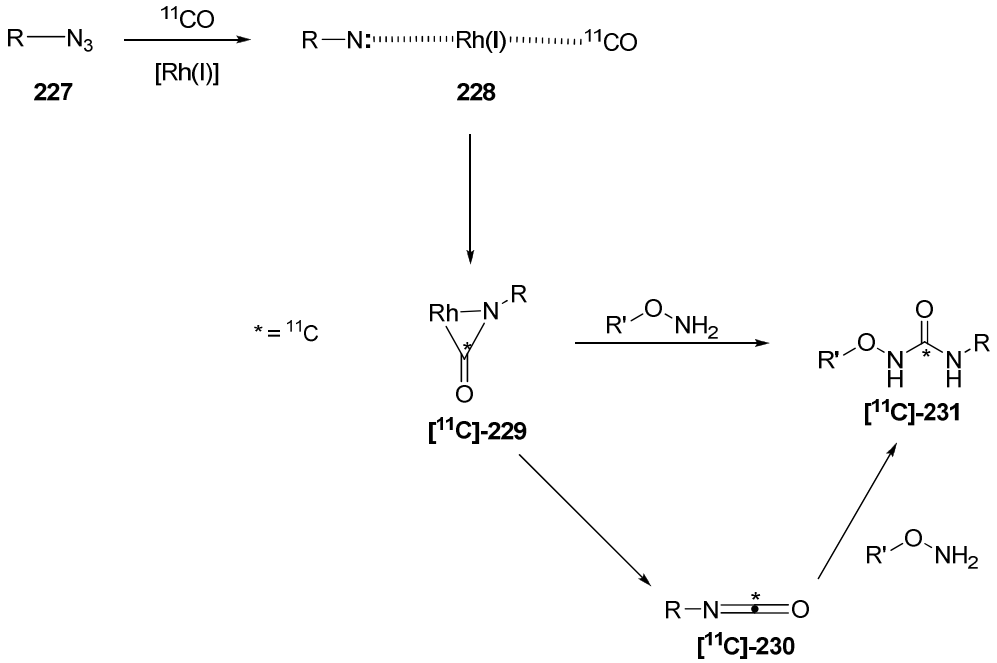


Figure 95: Mécanisme de la [^{11}C]-carbonylation en présence de palladium.

En 2009, une bibliothèque de dérivés de la *N*-phenyl-*N*-(4-(4-quinolyloxy)-phenyl)-[^{11}C-carbonyle]-urée (**[^{11}C]-238** - **[^{11}C]-242**) a été synthétisé par [^{11}C]-carbonylation assisté au rhodium avec des RRC compris entre 31 et 78% (Figure 96)[164]. Ces molécules sont actuellement étudiées en tant que radiotraceurs des récepteurs du facteur de croissance vasculaire endothéliale de type 2 (VGEFR-2), surexprimés dans les cellules tumorales.

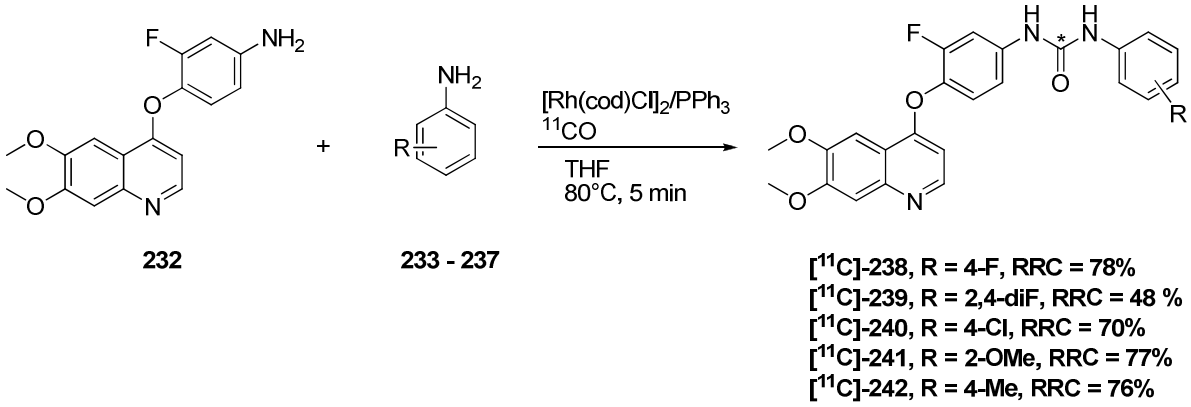


Figure 96: Radiosynthèse d'analogues des urées [^{11}C]-238 - [^{11}C]-242.

1.3.4 Synthèse d'acides carboxyliques

La [^{11}C]-carbonylation pallado-assistée permet également de marquer les acides carboxyliques lorsque le nucléophile est une source d'ion hydroxyde. Le [^{11}C-carboxyl]-

[164] Ilovich O., Aberg O., Langström B., Mishani E., *J. Label. Cpd. Radiopharm.* **2009**, 52, 151-157.

eprosartan, radiotraceur TEP potentiel ciblant les récepteurs des angiotensines AT1, a été synthétisé de cette manière par Langström *et al.*[165] avec un RRC de 50% (Figure 97).

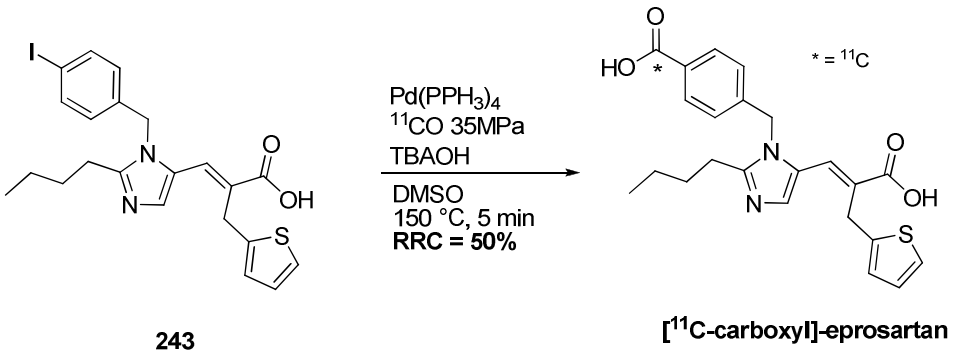


Figure 97: Radiosynthèse du [^{11}C-carboxyl]eprosartan.

1.3.5 Formation d'[^{11}C]-iodoalcanes

Les groupements alkyles sont souvent présents sur des molécules d'intérêt et constituent donc une alternative de marquage intéressante. Langström *et al.* a développé une méthode de production de iodure d'[^{11}C]-éthyle, de [^{11}C]-propyle et de [^{11}C]-butyle à partir du ^{11}CO. [^{11}C]-EtI est synthétisé par hydroxycarbonylation du CH_3I avec un RRC de 55%[166] tandis le [^{11}C]-nPrI et le [^{11}C]-nBuI sont produits par hydroformylation de l'éthylène et du propène avec un RRC de 58%[167] (Figure 98).

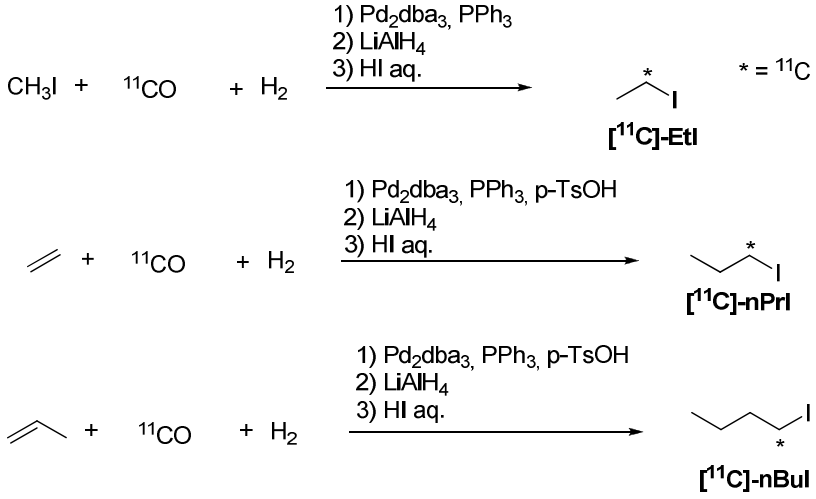


Figure 98: Production de [^{11}C]-EtI, du [^{11}C]-nPrI et du [^{11}C]-nBuI.

Ces précurseurs ont été utilisés pour le marquage du GR205171[168], antagonistes des récepteurs de la neurokinine de type 1 NK_1, par *O*-[^{11}C]-alkylation du précurseur phénolique **244** Toutefois les iodures d'[^{11}C]-alkyles étant moins réactifs que l'iodure de [^{11}C]-méthyle, les

[165] Aberg O., Lindhe O., Hall H., Hellman P., Kihlberg T., Langström B., *J. Label. Cpd. Radiopharm.* **ASAP**.
[166] Erikson J., Antoni G., Långström B., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2004**, 47, 723.
[167] Erikson J., Antoni G., Långström B., *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2006**, 49, 1105.
[168] Syvänen S., Eriksson J., Genchel T., Lindhe Ö., Antoni G., Langström B., *BMC Medical Imaging* **2007**, 7, 6, 1-6.

réactions sont réalisées à des températures supérieures (Figure 99). La comparaison avec l'analogue [^{11}C]-méthylé montre que le dérivé [^{11}C]-éthylé est aussi efficace tandis que le dérivé [^{11}C]-propylé n'affiche aucune affinité pour les récepteurs NK1.

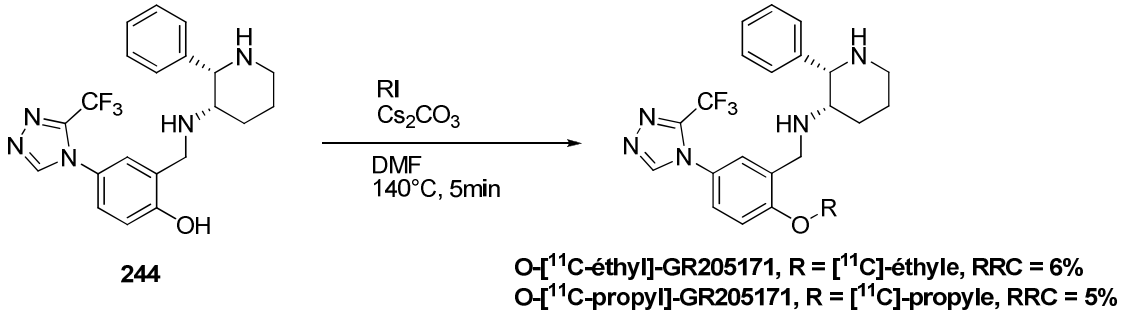


Figure 99: Synthèse du [*O*-^{11}C-éthyl] et [*O*-^{11}C-propyl]-GR205171 .

Le [^{11}C]-CPEB, antagoniste des récepteurs opioïdes, a été synthétisé par *N*-[^{11}C]-éthylation en présence de $CH_3{}^{11}CH_2I$[169] (Figure 100). Comme le [^{11}C]-méthyl-Ro64-6198[170], les essais ont montré que le [^{11}C]-CPEB était incompatible avec les récepteurs opioïdes *in-vivo*[171].

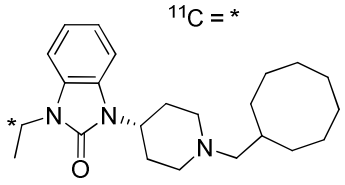


Figure 100: [^{11}C]-CPEB.

1.4 Conclusion

La [^{11}C]-méthylation nucléophile réalisée en présence de $^{11}CH_3I$ ou de $^{11}CH_3OTf$ constitue la méthode de marquage au ^{11}C la plus utilisée. Elle a permis le marquage de nombreuses molécules permettant de visualiser différents processus biologiques. La [^{11}C]-méthylation électrophile par des réactions pallado-assistées (Stille, Suzuki ou hydrozirconation) est une alternative efficace et plus douce à l'emploi de dérivés lithiés ou de Grignard très agressifs et intolérants vis-à-vis des substrats complexe présentant plusieurs sites réactifs. Le radio-marquage par ^{11}CO en présence d'un métal de transition (Pd, Rh) est une méthode en devenir. Elle est de plus en plus utilisée pour synthétiser différents dérivés carbonylés (cétones, amides, acides carboxyliques, urées …) avec de bons RRC.

2 Application au marquage de biomolécules au ^{11}C pour la TEP

[169] Ogawaa M., Hatano K , Kawasumi Y., Ishiwata K., Kawamura K., Ozaki S., Ito K., *Nucl. Med. Biol.*, **2003**, 30, 51.
[170] Ogawaa M., Hatano K., Kawasumi Y., Wichmann J., Ito K., *Nucl. Med. Biol.* **2001,** 28, 941-947.
[171] Ogawaa M., Hatano K., Kawasumi Y., Ishiwata K., Kawamura K., Ozaki S., Ito K.; *Nucl. med. biol.* **2003**, 30, 1, 51-59.

Après avoir développé les méthodes les plus décrites dans la littérature pour introduire un atome de ^{11}C sur une molécule organique, celles qui ont été appliquées au marquage de biomolécules vont être décrites dans ce paragraphe.

2.1 Définition d'une biomolécule organique

Les biomolécules sont définies comme des molécules organiques issues d'un organisme vivant. On distingue trois types de biomolécules :

- les **petites molécules** : lipides, vitamines, hormones ou neurotransmetteurs.
- les **monomères** : acides aminés, nucléotides ou monosaccharides.
- les **polymères** : peptides, protéines, acides nucléiques, polysaccharides.

Dans ce manuscrit, nous inclurons également les molécules synthétisées à partir de biomolécules. Ainsi le marquage de peptides et oligonucléotides synthétiques sera traité dans ce paragraphe.

2.2 Les monomères

2.2.1 Les acides aminés

Visualiser le transport des acides aminés et suivre la synthèse protéique, en utilisant des amino-acides marqués par un émetteur β^+, est la méthode la plus prometteuse pour détecter des tumeurs par TEP. Dans le cas de tumeurs cérébrales, les amino-acides marqués se révèlent supérieurs au [^{18}F]-FDG.

Le premier amino-acide marqué au ^{11}C, utilisé dans ce cadre, a été la [^{11}C]-méthionine, synthétisée, à l'origine, en 1976 par l'équipe de Langström[172] à partir de la *S*-benzylhomocystéine en présence de $^{11}CH_3I$ par réaction radicalaire (Figure 101).

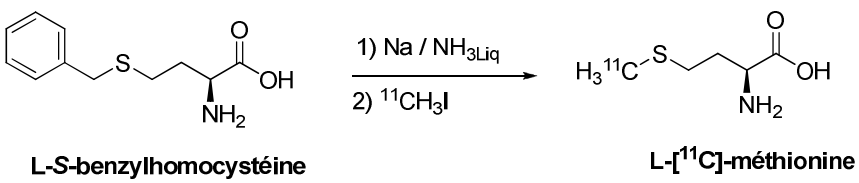


Figure 101: Première radiosynthèse de la [^{11}C]-méthionine.

[172] Langström B., Jundqvist H., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1976**, 27, 357.

Actuellement, elle est produite par *S*-[^{11}C]-méthylation de la L-homocystéine en présence de $^{11}CH_3I$ avec un RRC de 38% en utilisant la technique de la synthèse « in-loop »[173].

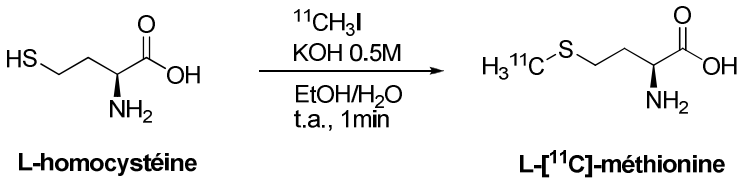


Figure 102: Radiosynthèse de la L-[^{11}C]-méthionine.

En 1987, l'équipe de Langström[174] a développé la première radiosynthèse multi-enzymatique du L-[β-^{11}C]-tryptophane ([β-^{11}C]-TRP]) et du 5-hydroxy-L-[β-^{11}C]-tryptophane ([β-^{11}C]-HTP) à partir de la [3-^{11}C]-alanine racémique. La radiosynthèse enzymatique a été réalisée en un seul pot en utilisant la D-amino acide oxydase (D-AAO)/catalase, la glutamique-pyruvique transaminase (GPT) et la tryptophanase (TPase) avec un RRC de 25 % (Figure 103).

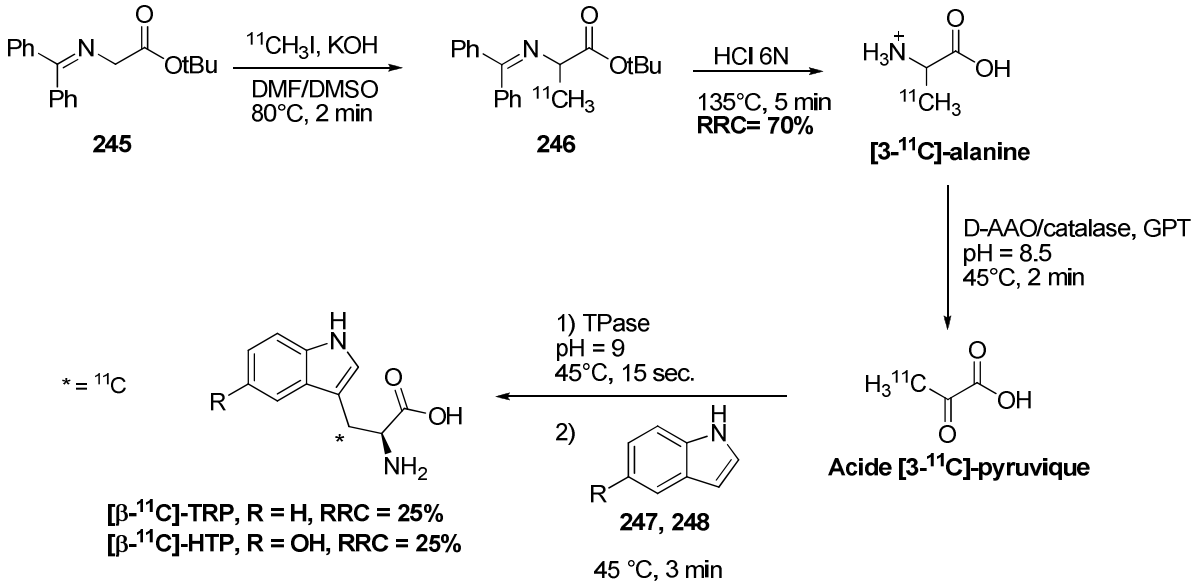


Figure 103: Radiosynthèse énantiosélective du [β-^{11}C]-TRP et [β-^{11}C]-HTP à partir de la [3-^{11}C]-alanine racémique.

Les deux radiotraceurs sont obtenus énantiomériquement purs et utilisés pour visualiser la biosynthèse de la sérotonine, neurotransmetteur impliqué dans les troubles tels que la dépression, les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson.

Par la suite, cette méthode a permis de réaliser le marquage au ^{11}C de la partie acide carboxylique des deux radiotraceurs précédents mais aussi de la L-tyrosine et de la L-DOPA en présence de β-tyrosinase à partir de la [1-^{11}C]-alanine racémique obtenue par la réaction de Bucherer-Strecker[175] avec des RRC compris entre 45 et 60% (Figure 104) [176].

[173] Gomez V., Gispert J.D., Amador V., Llop J., *J. Label. Cpd. Radiopharm.* **2008**, 51, 83.
[174] Bjurling P., Watanabe Y., Tokushige M., Oda T., Langström B., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1989**, 1331.
[175] Iwata R., Ido T., Takahashi T., Nakanishi H., Iida S., *Appl. Radiat. Isot.* **1987**, 38, 97.

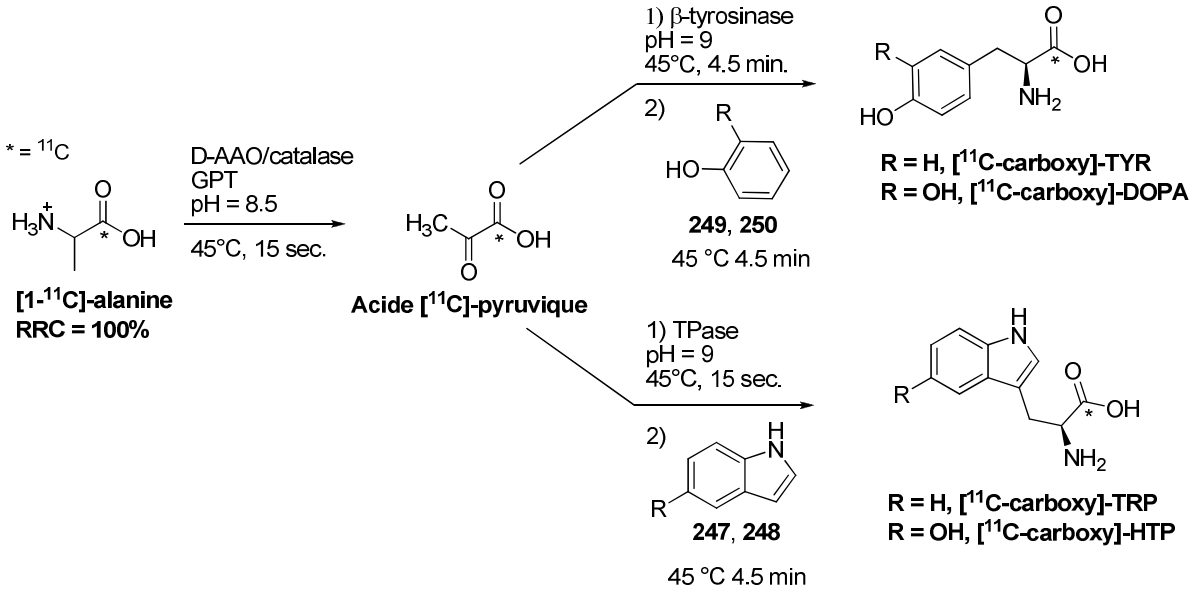
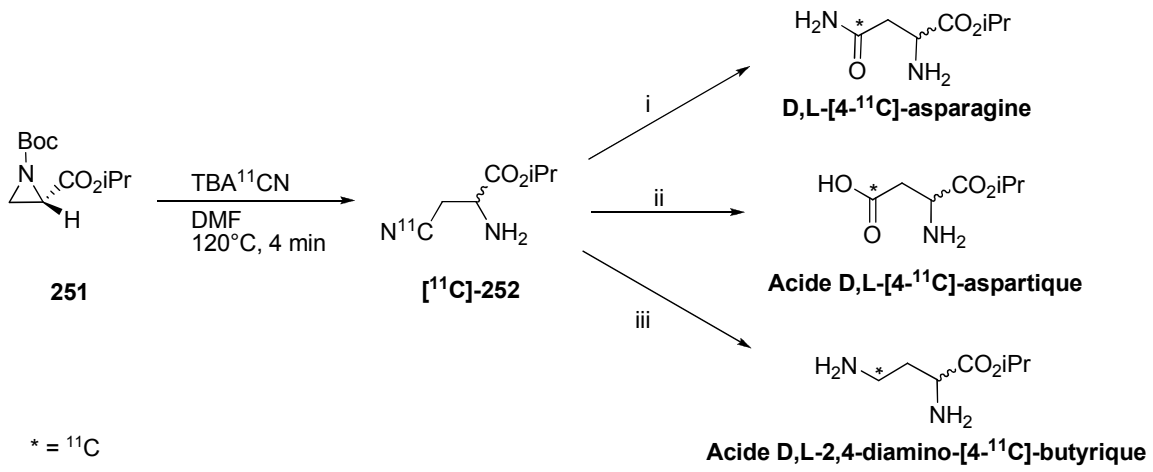


Figure 104: [^{11}C-carboxy]TYR, [^{11}C-carboxy]DOPA, [^{11}C-carboxy-]TRP et [^{11}C-carboxy]HTP.

Ces radiotraceurs sont des précurseurs biologiques de la dopamine et de la sérotonine, deux neurotransmetteurs. Ils sont employés pour étudier le transport d'amino-acides ou la synthèse protéique. Ils sont aussi utilisés en étude clinique pour visualiser les tumeurs cérébrales et les maladies neurologique. Ces synthèses énantiosélectives s'opposent aux radiosynthèses racémiques da la [carboxy-^{11}C]-TYR[177] et du [carboxy-^{11}C]-TRP[178]. Des études sur la [carboxy-^{11}C]-DOPA[179] en tant que radiotraceur tumoral des endocrines du pancréas ont mis en évidence la décarboxylation *in-vivo* de la [carboxy-^{11}C]-DOPA en dopamine par une décarboxylase rendant ce radiotraceur inutilisable, dans ces conditions.

En 2001, Gillings *et al.*[180] a radiosynthétisé une série de [4-^{11}C]-amino-acides racémiques par réaction de [^{11}C]-cyanation. Dans un premier temps, est réalisée l'ouverture du cycle aziridine-*N*-Boc **251** en présence de [^{11}C]-cyanure de tétrabutylammonium puis le groupement cyano est converti en amide, en acide carboxylique ou est réduit permettant d'accéder aux acides aminés correspondants avec des rendements compris entre 30 et 40 % (Figure 105).

[176] Bjurling P., Antoni G., Watanabe Y., Langström B., *Acta Chem. Scand.* **1990**, 44, 178.
[177] Halldin C, Schoeps K.O., Stone-ElanderS, Wiesel F.A., *Eur. J. Nucl. Med.* **1987**, 13, 288.
[178] Zalutsky M, Wu J., Harper P., Wickland T., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1981**, 32, 182.
[179] Bergström M., Eriksson B., Oberg K., Sundin A., Ahlström H., Lindner K.J., Bjurling P., Langström B., *J. Nucl. Med.* **1996**, 37, 1, 32.
[180] Gilling N.M., Gee A.D., *J. Label. Cpd. Radiopharm*. **2001**, 44, 909.



Conditions: i) HCl 0.1N, 110°C, 8 min, ii) HCl 4N, 110°C, 10 min, iii) $NaBH_4$, $CoCl_2$, MeOH, 90°C, 5 min

Figure 105: Radiosynthèse de 3 [4-^{11}C]-amino-acides.

Les [4-^{11}C]-amino-acides ont également été synthétisés de façon énantiospécifique par voix enzymatique[181,182] avec des RRC respectifs de 60, 70 et 40 %.

L'HPLC chirale est un moyen efficace pour obtenir séparément les deux énantiomères à partir d'un mélange racémique et évite l'utilisation d'enzymes ou de ligands chiraux parfois très coûteux. Ainsi, en 2003, Ding *et al.*[183] a réalisé la radiosynthèse de la [carboxy-^{11}C]-phénylalanine et de la [carboxy-^{11}C]-tyrosine à partir des dérivés du phénylacétaldéhyde par la réaction de Bucherer-Strecker[175] (Figure 106). Couplée à une HPLC chirale, les deux énantiomères de chaque acide aminé ont pu être obtenus avec un excès énantiomérique supérieur à 98% et des RRC compris entre 12 et 16%.

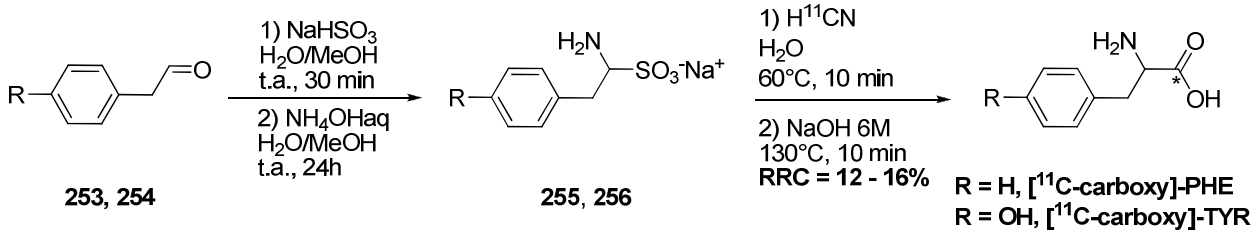


Figure 106: Radiosynthèse de la [carboxy-^{11}C]-PHE et [carboxy-^{11}C]-TYR en série racémique par la réaction de Bucherer-Strecker.

Dans le but d'améliorer les RRC et de simplifier les méthodes d'introduction du ^{11}C, l'équipe d'Iwata[184] a utilisé la *O*-[^{11}C]-méthylation en présence de $^{11}CH_3OTf$ pour radiomarquer

[181] Antoni G., Omura H., Ikemoto M., Moulder R., Watanabe Y., Langström B, *J. Label. Cpd. radiopharm*. **2001**, 44, 287.
[182] Antoni G., Omura H., Bergström M.,Langström B, *Nucl. Med. Biol.* **1997**, 24, 595.
[183] Ding Y.S., Szalda D.E., Studenov A.R., *Nucl. Med. Biol.* **2003**, 30, 39.
[184] Iwata R., Furumoto S., Pascali C., Bogni A., Ishiwata K., *J. Label. Cpd. Radiopharm.* **2003**, 46, 555.

la L-tyrosine avec un RRC de 57% (Figure 107). La *O*-[^{11}C]-méthyl-L-tyrosine obtenue est utilisée pour étudier le transport d'amino-acides et détecter la présence de tumeurs par TEP.

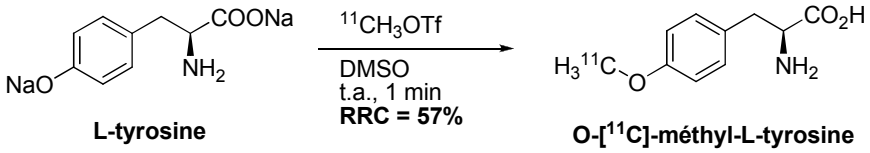


Figure 107: Radiosynthèse de la *O*-[^{11}C]-méthyltyrosine.

2.2.2 Les mono-saccharides

2.2.2.1 Traceur des transporteurs de glucose

Les transporteurs de glucose permettent au glucose et au fructose de pénétrer dans les cellules en passant à travers la double couche lipidique de la membrane cellulaire. Ces transporteurs sont scindés en deux familles de protéines appelées GLUT et SGLT. Leur dysfonctionnement est associé à des dérèglements rénaux, à l'hypoglycémie ou à l'épilepsie. Ils sont également surexprimés dans les cancers consommant du glucose en grande quantité. Des études ont montré que les alkylglucosides tels que le α-méthyl-D-glucoside (αMDG) et le β-méthyl-D-glucoside (βMDG) avaient une bonne affinité pour les SGLT1 contrairement aux analogues du glucose ne possédant pas d'hydroxyle en C_2[185]. Les analogues marqués du αMDG et βMDG seront donc d'une efficacité supérieure au [^{18}F]-FDG, radiotraceur le plus utilisé pour le diagnostique de cancers, pour visualiser l'action du transporteur SGLT1.

Ainsi, en 2003, Bormans *et al.*[186] a décrit la radiosynthèse du [^{11}C]-MDG par [^{11}C]-méthylation de l'hydroxyle en position anomérique en présence de $^{11}CH_3OTf$ avec un RRC de 30% et un temps total de synthèse de 30 min. Les deux anomères ont été isolés par HPLC chirale dans un ratio de 75/25 en faveur de l'anomère β (Figure 108).

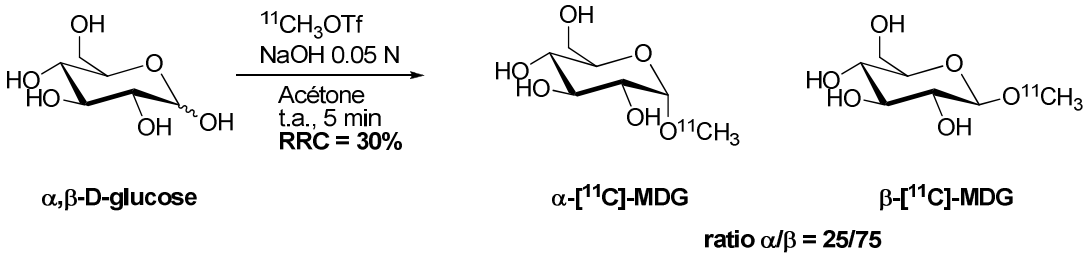


Figure 108: Radiosynthèse du α-[^{11}C]-MDG et du β-[^{11}C]-MDG.

Les tests sur le rat et la souris ont montré que les deux anomères s'accumulaient spécifiquement dans les tubules proximaux des reins avec une plus importante concentration

[185] Ramaswamy K., Bhattacharyya B.R., Crane R.K., *Biochim. Biophys.* **1976**, 433, 32.
[186] Bormans G.M., Oosterwyck G.V., de Groot T.J., Veyhl M., Mortelmans L., Verbruggen A.M., Koepsell H, *J. Nucl. Med.* **2003**, 44, 7, 1075.

de l'anomère β dans le cortex rénal. Cette étude a permis de conclure que le [^{11}C]-MDG est un radiotraceur prometteur des SGLT1 pour visualiser le transport de glucose dans les reins et ainsi détecter les dysfonctionnements rénaux. Des tests sont encore en cours pour mettre en évidence la surexpression des SGLT1 dans certains cancers et le rôle joué par ces transporteurs au niveau cérébral dans l'hypoglycémie ou l'épilepsie.

2.2.2.2 Visualisation de l'expression du gène LacZ

Localiser et visualiser l'expression de certains gènes est très important pour développer des traitements efficaces en thérapie génique pour lutter contre le cancer. Plusieurs méthodes ont été développées utilisant une combinaison entre un gène rapporteur (gène étranger introduit dans le génome d'un organisme génétiquement modifié) et une sonde rapporteuse (substrat de l'enzyme codée par le gène rapporteur)[187]. Si les métabolites issus de la sonde ou la sonde elle-même sont marqués, leur détection permet d'évaluer indirectement l'expression du gène rapporteur. Dans le cas où le gène est fixé à un transgène (gène pouvant altérer le comportement génétique de l'organisme en produisant une nouvelle protéine), cette méthode permet d'évaluer l'expression du transgène et de suivre l'efficacité d'une thérapie génique.

Le LacZ, gène codant pour la β-galactosidase (β-gal), est surement le gène rapporteur le plus prometteur. Il a déjà été employé *in-vitro* pour l'évaluation de l'expression de gènes en utilisant des substrats de la β-galactosidase permettant des détections par colorimétrie, fluorescence, chimioluminescence et bioluminescence. Ces méthodes n'étant pas applicables sur le petit animal car limitées par la profondeur de la pénétration de la lumière, l'utilisation de la TEP a été envisagée.

En s'appuyant sur les travaux des groupes de Mason[188] et Lee[189], Celen *et al.*[190] a développé la radiosynthèse du [^{11}C]-méthoxy-ONPG par *O*-[^{11}C]-méthylation du précurseur phénolique **257** en présence de $^{11}CH_3OTf$ avec un RRC de 94% (Figure 109).

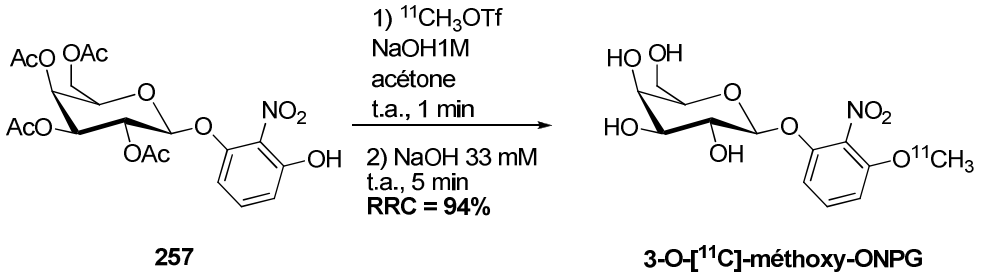
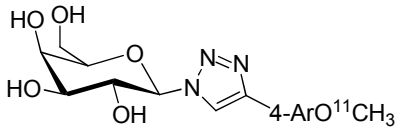


Figure 109: Radiosynthèse du 3-*O*-[^{11}C]-méthoxyONPG.

[187] Tjuvajev J.G., Stochhammer G., Desai R., Uehara H., Watanabe K., Gansbacher B., Blasberg R.G., *Cancer Res.* **1995**, 55, 6126.
[188] Yu J., Liu L., Kodibagkar C.D., Cui W., Mason R.P., *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 326.
[189] Lee K.H., Byun S.S., Choi J.H., Paik J.Y., Choe Y.S., Kim B.T., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2004**, 31, 433.
[190] Celen S., Deroose C., de Groot T., Chitneni S.K., Gijsbers R., Debyser Z., Mortelmans L., Verbruggen A., Bormans G., *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 2, 441.

Les études *in-vitro* montre que le 3-*O*-[^{11}C]-méthoxyONPG est un bon substrat pour la β-gal. Cependant, les expériences réalisées sur des souris transgéniques exprimant le LacZ n'ont montré qu'une faible accumulation du 2-nitro-3-[^{11}C]-méthoxyphénol, métabolite obtenu par action de la β-galactosidase sur le 3-*O*-[^{11}C]-méthoxyONMPG, dans les cellules transduites. Ces résultats ont permis de conclure quant à l'incompatibilité de ce radiotraceur pour visualiser l'expression de ce gène.

Afin d'améliorer cette accumulation, la même équipe a développé deux nouvelles sondes marquées, **[^{11}C]-258** et **[^{11}C]-259,** obtenues par *O*-[^{11}C]-méthylation de la partie 4-hydroxyaryltriazole en présence $^{11}CH_3I$[191] (Figure 110).



[^{11}C]-258, Ar = phényl, RRC = 51%
[^{11}C]-259, Ar = naphtyl, RRC = 48%

Figure 110: Radiosynthèse de [^{11}C]-258 et [^{11}C]-259.

Les études *in-vivo* ont montré une bonne stabilité des deux radiotraceurs. Le radiotraceur naphtilique est mieux absorbé que son analogue phénylique au sein de cellule exprimant le LacZ. Cependant le manque de différenciation entre les cellules exprimant le LacZ et les cellules non-transduites rend ces deux radiotraceurs inutilisables pour évaluer l'expression de ce gène par TEP.

2.2.3 Les nucléosides

2.2.3.1 Substrats et inhibiteurs d'enzymes

Depuis des années, le gène codant pour la thymidine kinase du virus de l'Herpès Simplex (HSV-tk) a suscité beaucoup d'intérêt en tant que gène suicide utilisé dans les thérapies géniques pour le cancer. Cependant il est nécessaire de visualiser l'activité de la HSV-tk afin de comprendre et d'améliorer le transfert de gène.

En 2000, le 2'-fluoro-5-[^{11}C]-méthyl-1-β-D-arabinofuranosyluracil ([^{11}C]-FMAU) a été évalué en tant que radiotraceur TEP de la HSV-tk et du cytomegalovirus humain (HCMV)[192]. La [^{11}C]-FMAU a été radiosynthétisée à partir du précurseur protégé **260** en utilisant le protocole décrit par Conti *et al.*[193] (Figure 111).

[191] Celen S., Deroose C., de Groot T., Chitneni S.K., Gijsbers R., Debyser Z., Mortelmans L., Verbruggen A., Bormans G., *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, **ASAP**.
[192] de Vries E.F.J., van Waarde A., Harmsen M.C., Mulder N.H., Vaalburg W., Hosper G.A.P, *Nucl. Med. Biol.* **2000**, 27, 113.
[193] Conti P.S., Alauddin M.M., Fissekis J.R., Schmall B., Watanabe K.A., *Nucl. Med. Biol.* **1995**, 22, 783.

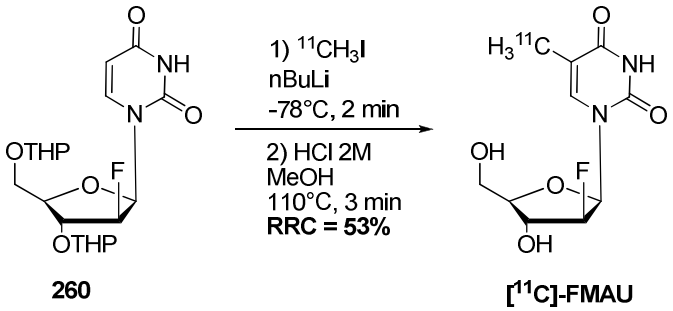


Figure 111: Synthèse de la [^{11}C]-FMAU.

En 2003, Langström et son équipe ont également appliqué la [^{11}C]-méthylation par couplage de Stille à la radiosynthèse de la [^{11}C]-FMAU. La tolérance du couplage de Stille vis-à-vis des groupements hydroxyles primaires et secondaires a permis de réaliser la [^{11}C]-méthylation, en dernière étape, sur le dérivé stannylé non protégé **261** avec un RRC de 33% (Figure 112).

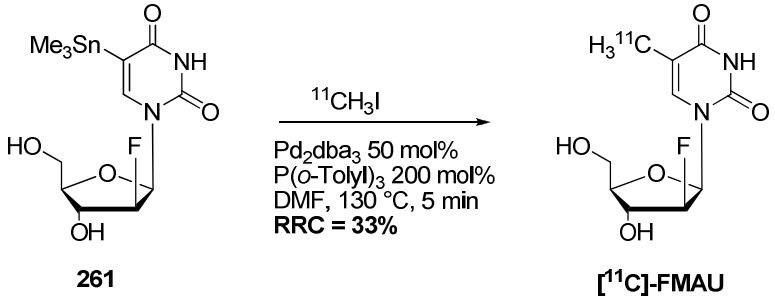


Figure 112: Radiosynthèse de la [^{11}C]-FMAU par couplage de Stille.

Les résultats *in-vitro* montrent que la [^{11}C]-FMAU s'accumule préférentiellement dans les cellules exprimant la HSV-tk et le HCMV mais elle est également présente dans les cellules de contrôle. Ce manque de sélectivité, résultant de l'activité de la tk naturelle, ne permet pas d'utiliser la [^{11}C]-FMAU comme radiotraceur de la HSV-tk et du HCMV.

Par ailleurs, des études ont montré que les infections du VIH pouvaient être traitées efficacement par la stavudine[194] (d4T). En effet, cet analogue de la thymidine empêche la réplication du virus en inhibant la HIV reverse transcriptase et la synthèse de l'ADN. Cette molécule est actuellement utilisée dans le cadre de la thérapie antirétrovirale (HAART). Afin de suivre cette thérapie par TEP, Livni *et al.* a décrit la synthèse de la d4T marquée au ^{11}C par réaction d'échange brome/lithium suivi d'une alkylation par [^{11}C]-CH_3I, à partir de l'analogue bromé et protégé **262** (Figure 113)[195].

[194] Clumeck N., *Antivir. Ther.* **1998**, (suppl. 4), 39.
[195] Livni E., Berker M., Hillier S., Waller S., Ogan M., Discordia R.P., Rienhart R.H., Fischman A.J., *Nucl. Med. Chem.* **2004**, 31, 613.

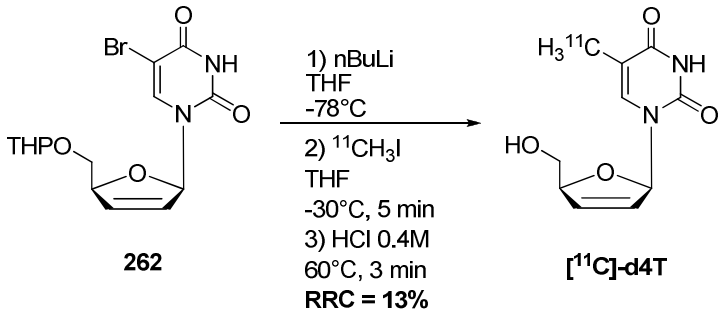


Figure 113: Synthèse de la [^{11}C]--stavudine.

Les études pharmocinétiques montrent que la [^{11}C]-d4T se comporte comme son homologue non marqué. Des essais *in-vivo* sont en cours de réalisation afin de confirmer le potentiel de la [^{11}C]-d4T en tant que radiotraceur de la transcriptase inverse du VIH.

2.2.3.2 Evaluation de l'expression de gènes

Le désir de suivre l'évolution d'une thérapie génique par TEP a poussé les biologistes et les radiochimistes à considérer d'autres couple gène / sonde. En 2007, des analogues bicycliques de nucléosides (BCNA) marqués au ^{11}C, obtenus par *O*-[^{11}C]-méthylation avec un RRC de 51% (Figure 114), ont été évalués en tant que radiotraceur de l'expression du gène de la thymidine kinase du Virus Varicella-Zoster (VZV-tk)[196].

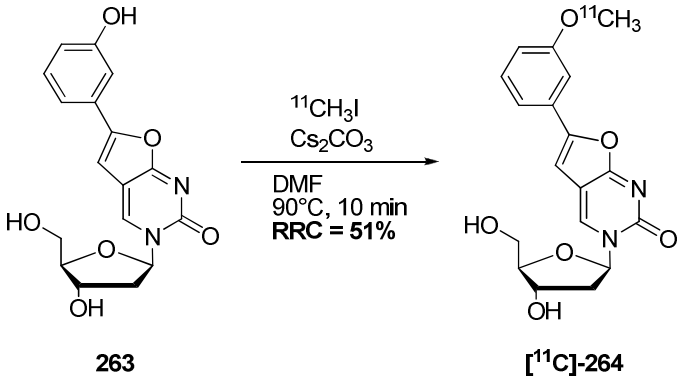


Figure 114: Exemple d'une radiosynthèse de [^{11}C]-BCNA.

Les tests *in-vitro* ont montré que le **[^{11}C]-264** est un bon substrat pour la VZV-tk. Ses métabolites s'accumulent douze fois plus dans les cellules exprimant le gène VSV-tk que dans les cellules de contrôle. Cependant les analyses ont mis en évidence l'impossibilité pour le

[196] Chitneni S.K., Deroose C.M., Balzarini J., Gijsberg R., Celen S.J.L., de Groot T.J., Debyser Z., Mortelmans L., Verbruggen A.M., Bormans G.M., *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1041.

radiotraceur de passer la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, ce [^{11}C]-BCNA peut être utilisé en tant que radiotraceur pour évaluer de l'expression de la VZV-tk excepté dans le cerveau.

2.2.3.3 Prolifération cellulaire

Les nucléotides sont les monomères constitutifs de l'ADN présent dans chaque cellule et permettant son développement. Les nucléosides dont sont issus ces nucléotides sont donc des candidats idéaux pour l'élaboration de radiomarqueurs dans le but d'imager la prolifération de tumeurs cancéreuses caractérisée par une multiplication cellulaire anarchique.

En 1997, la [^{11}C]-thymidine ([^{11}C]-T) et la 6-[^{11}C]-méthyle-2'-désoxyuridine (6-[^{11}C]-MDU]), obtenues par échange lithium/halogène en présence de $^{11}CH_3I$ à partir de la 5-bromo-2'-désoxy-uridine **265** (Figure 115), ont été évaluées comme radiotraceurs potentiels de la prolifération cellulaire[197] chez le rat.

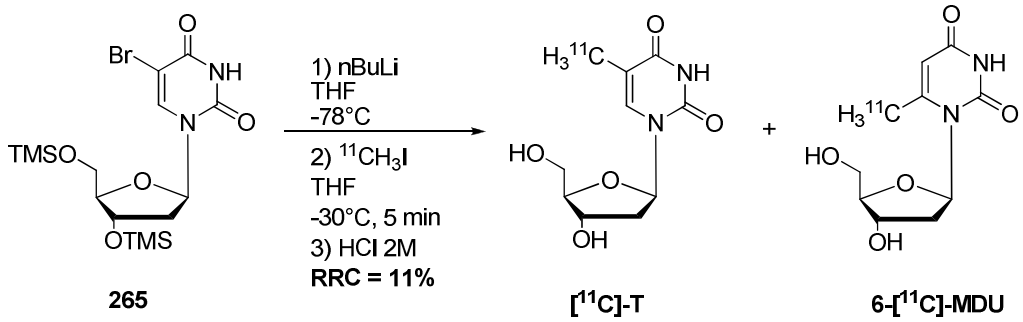


Figure 115: Radiosynthèse de la [^{11}C]-T et de la 6-[^{11}C]-MDU.

La [^{11}C]-T s'accumule spécifiquement dans la foie et les intestins et n'est pas éliminée par les urines. La 6-[^{11}C]-MDU se comporte différemment puisque qu'elle est accumuléE dans aucun organe. De plus elle est dégradée dans le foie et rapidement évacuer par les urines.

Par ailleurs, la [^{11}C]-FMAU, synthétisée selon le protocole de Conti[193] avec un RRC de 53% ou de Langström[198] avec un RRC de 33%, a été évaluée comme étant un radiotraceur de prolifération cellulaire *in-vivo* efficace pouvant être utilisé pour la détection de cancer par TEP. La présence du fluor en position 2' permet de résoudre le problème du métabolisme rapide de la [^{11}C]-T et de la 6-[^{11}C]-MDU.

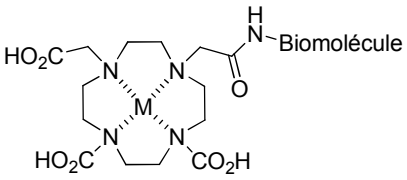
2.3 Les polymères biologiques

Les polymères ou macromolécules biologiques (oligonucléotides, peptides, protéines ou polysaccharides) ont suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine de la médecine nucléaire. Leur haute affinité et sensibilité pour une cible biologique considérée en font des candidats particulièrement attractifs en tant que vecteurs de radiotraceurs pour la TEP.

[197] Goethals P., Volders F., Van der Eyken J., van Eijkeren M., Lemahieu I., Dams R., *Nucl. Med. Biol.* **1997**, 24, 713.
[198] Samuelsson L., Langström B., *J. Label. Cpd. Radiopharm.* **2003**, 46, 263.

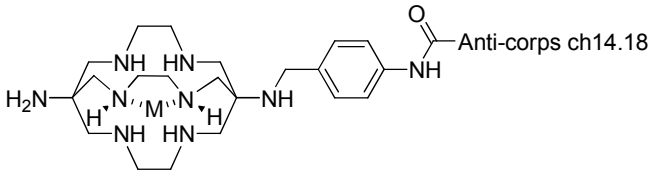
2.3.1 Marquage avec d'autres émetteurs β^+ que le ^{11}C

Du fait de leurs tailles, 95% des macromolécules ont été marquées pour la TEP par complexation avec des métaux émetteurs β^+. Récemment, le marquage de macromolécules par complexation au gallium 68[199,200] et au cuivre 64[201] a été décrit (Figure 116) avec des résultats d'imagerie très prometteurs pour la détection de tumeurs. Dans un premier temps, les biomolécules sont conjuguées à un agent complexant composé de polycycles azotés, comme le DOTA (acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-teiracarboxylique) ou le SarAr (1-*N*-(4-aminobenzyl)-3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo[6.6.6]eicosane-1,8-diamine), le plus souvent *via* la formation d'une liaison amide, pour permettre la chélation du métal.



266 a-c, 267 a-g

266 a-c, M = $^{64}Cu^{2+}$, Biomolécule = monoRGD (RGD = Arg-Gly-Asp), polyRGD, anticorps
267 a-g, M = $^{68}Ga^{3+}$, Biomolécule = octréotide, somatostatine, bombésine, albumine, anti-corps, glycoprotéines, oligonucléotides



268, M = $^{64}Cu^{2+}$, [^{64}Cu]SarAr-anticorps ch14-18

Figure 116: Exemple de radiomarquage de biomolécules au ^{68}Ga et ^{64}Cu.

Grâce à leurs durées de vie (68 min pour le gallium 68), ces métaux permettent de marquer des vecteurs dont la reconnaissance avec leurs cibles est relativement longue. De plus, ces radioéléments sont produits par des générateurs et non par un cyclotron ce qui est techniquement et économiquement beaucoup moins contraignant. L'utilisation de la chimie de coordination se heurte néanmoins au phénomène de décompléxation libérant le métal. De ce fait l'introduction d'émetteurs β^+ (^{76}Br, ^{125}I, ^{18}F ou ^{11}C) sur des macromolécules par liaison covalente permet de résoudre ce problème.

Bien que peu utilisées, des méthodes mettant en jeu des réactions simples ont été décrites, en particulier, avec le ^{18}F. En effet, sa durée de demi-vie permet d'élaborer des radiosynthèses compatibles avec l'utilisation de macromolécules (temps de réaction, utilisation de groupements prosthétiques sélectifs liés aux nombreux groupements fonctionnels présents). Ces dernières années plusieurs groupes ont développé le marquage de peptides, de protéines

[199] Tanaka K., Masuyama T., Hasegawa K., Tahara T., Mizuma H., Wda Y., Watanabe Y., Fukase K., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 102.
[200] Roivainen A., Tolvanen T., Salomaki S., Lendvai G., Velikyan I., Numminen P., Valila M., Sipila M., Bergstrom M., Harkonen P., H., Lonnberg B., Langstrom B., *J. Nucl. Med.*, **2004**, 45, 347.
[201] Voss S.D., Smith S.V., Dibartolo N., McIntosh L.J., Cyr E.M., Bonab A.A., Dearling J.L.J., Carter E.A., Fishman A.J., Treves S.T., Gillies S.D., Sargeson A.M., Huston J.S., Packard A.B., *PNAS*, **2007**, 104, 44, 17489.

par conjugaison avec la 2-(4-[^{18}F]-fluorobenzylideneaminooxy)acetamide ([^{18}F]-FBOA, **[^{18}F]-270**)[202] ainsi que des petits acides ribonucléiques interférents avec le *N*-(3-(2-[^{18}F]-fluoropyridin-3-yloxy)propyl)acetamide ([^{18}F]-FPyA, **[^{18}F]-276**)[203] en se basant sur la méthode développée par Dollé[204] (Figure 117).

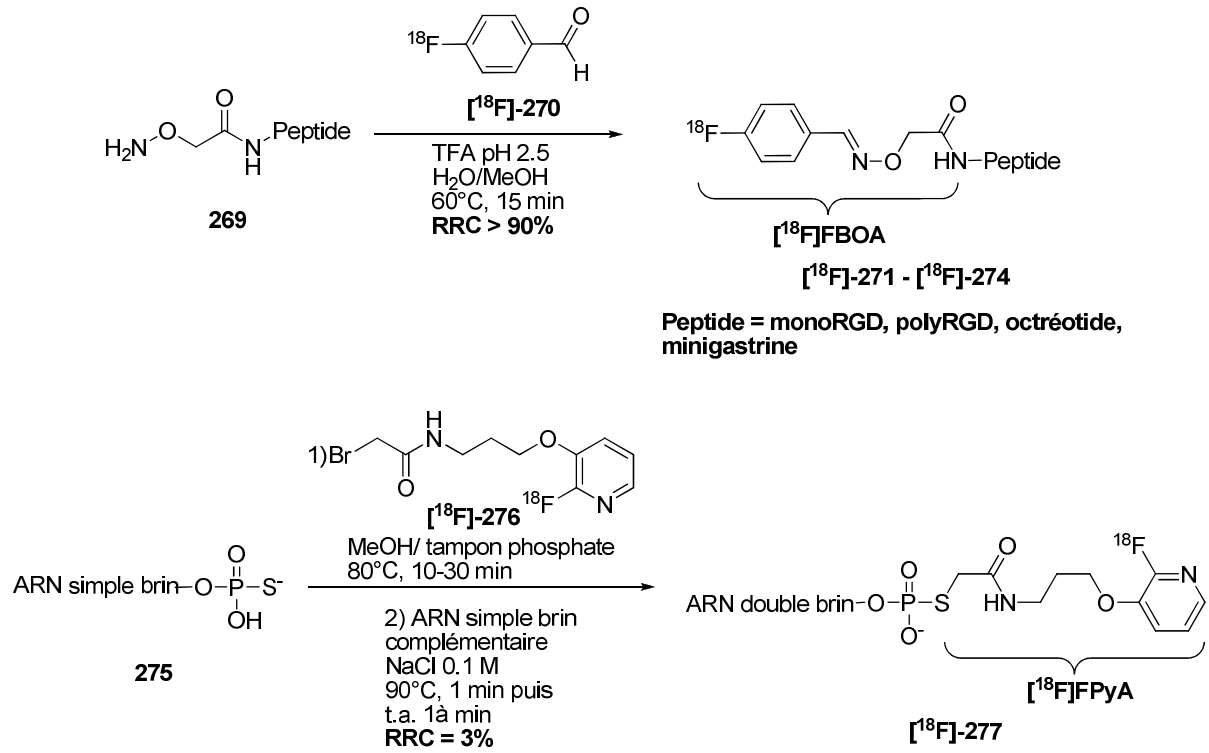


Figure 117: Utilisation du [^{18}F]-FPyA et du [^{18}F]-FBOA pour le marquage de peptides et d'ARN pour la TEP.

2.3.2 Introduction du ^{11}C

Largement employée pour le marquage de petites molécules, la chimie du carbone 12 est bien moins utilisée pour introduire un atome de carbone 11 au sein de macromolécules. Dans la plupart des cas, le marquage direct avec des [^{11}C]-précurseurs tels que $^{11}CH_3I$, ^{11}CO ou [^{11}C]-phosgène manque de sélectivité, ce qui est un vrai problème pour le marquage de macromolécules qui présentent de nombreuses fonctionnalités. Radiomarquer des macromolécules au ^{11}C reste donc un réel défi pour le radiochimiste.

2.3.2.1 Peptides et protéines

L'intérêt des peptides pour la TEP (biodistribution rapide, haute affinité) a encouragé les radiochimistes à développer des méthodes de marquage au ^{11}C. Initialement, en 1975,

[202] Poetko T., Schottelius M., Thumshien G., Hersel U., Herz M., Henriksen G., Kessler H., Schaiwger M., Wester J., *J. Nucl. Med.* **2004**, 45, 5, 892.
[203] Viel T., Kuhnast B., Hinnen F., Boisgard R., Tavitian B., Dollé F., *J. Label. Cpd. Radiopharm.* **2007**, 50, 1159.
[204] Dollé F., Hinnen F., Vaufrey F., Tavitian B., Crouzel C., *J. Label. Cpd. Radiopharm.* **1997**, 39, 319.

Straatman et Welch[205] ont mis au point une méthodologie générale permettant de marquer des composés comportant une amine libre par amination réductrice en présence de [^{11}C]-formaldéhyde. Cette méthodologie a été utilisée pour le marquage de l'albumine au ^{11}C (Figure 118).

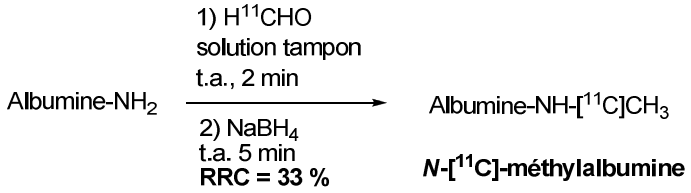


Figure 118: Radiosytnhèse de la *N*-[^{11}C]-méthylalbumine.

Puis en 1986, Langström[206,207] et son équipe ont décrit le marquage de sept neuropeptides dérivés de l'enképhaline et de l'enképhalamide par *S*-[^{11}C]-méthylation du résidu méthionine, en présence de $^{11}CH_3I$, avec un RRC de 80% (Figure 119).

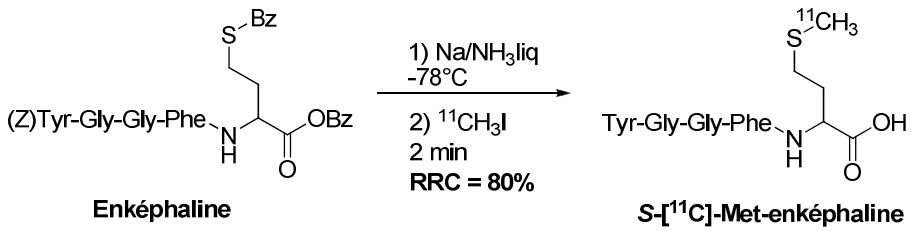


Figure 119: Radiosynthèse de la [^{11}C]-Met-enképhaline.

Ces [^{11}C]-peptides ont été évalués en tant que radiotraceurs de l'activité cérébrale. Les tests montrent que la [^{11}C]-Met-enképhaline et la DALA (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-[^{11}C]-Met-NH_2) ont la même affinité que la morphine et sont rapidement métabolisées en [^{11}C]-méthionine qui s'accumule dans différentes régions du cerveaux. La [^{11}C]-D-Met2,Pro5-enképhalinamide (Tyr-[^{11}C]-D-Met-Gly-Phe-Pro-NH_2) et la [^{11}C]-TAAFM (Tyr-D-Ala-D-Ala-phe-[^{11}C]-Met-NH_2) montrent une bonne stabilité *in-vivo* et la radioactivité détectée dans le cerveau est due en partie au [^{11}C]-peptide intact.

Néanmoins, la [^{11}C]-méthylation directe de protéines en présence de $^{11}CH_3I$ ainsi que la [^{11}C]-méthylation réductrice en présence de [^{11}C]-formaldéhyde ont pour point commun de nécessiter l'utilisation de conditions (pH fortement alkalin) et de réactifs ($NaBH_4$) entrainant généralement la détérioration de la protéine. Le développement de réactions de marquage compatibles avec les conditions physiologiques permettrait un champ d'applications plus large. Ainsi en 1994, Langström *et al.* a développé le marquage de l'albumine et de la transferrine en utilisant le bromure de [^{11}C]-cyanogène pour former les acides carbamiques **[^{11}C]-280** et **[^{11}C]-**

[205] Straatman L.G., Welch M.J., *J. Nucl. Med.* **1975**, 16, 5, 425.
[206] Hartvig P., Någren K., Lundberg P.O., Muhr C., Terenius L., Lundqvist H., Lärkfors L., Långström B., *Regulatory Peptide* **1986**, 16, 1, 1.
[207] Nagren K., Ragnarsson U., Langström B., *Appl. Radiat. Isot.* **1986**, 37, 6, 537.

281 à pH = 8 avec des RRC respectifs de 82 % et 60% pour un temps total de 30 min à partir de l'albumine et la transférine (Figure 120)[208].

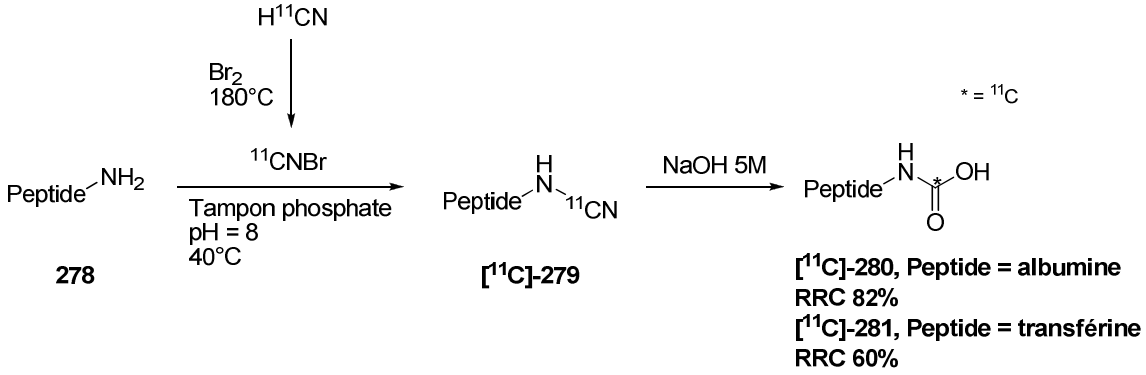


Figure 120: Radiosynthèse de la [^{11}C-carbamyl]-albumine et [^{11}C-carbamyl]-transferrine.

Ces [^{11}C]-protéines sont en cours d'étude dans le but de visualiser le traitement de tumeurs angiogéniques.

Par ailleurs, afin d'étudier les récepteurs de la somatostatine, surexprimés lors de la prolifération des cellules tumorales, l'équipe de Henriksen[209] a radiosynthétisé le Cel-*S*-Dpr-[^{11}C]-MBOA-TOCA, un glyco-peptide composé d'un motif octréotate (TOCA) et un disaccharide (Cel-*S*-). Pour cela, le [^{11}C]-méthoxy-benzaldéhyde ([^{11}C]-MB-CHO) est utilisé comme groupement prosthétique pour marquer la fonction acide aminooxyacétique introduit entre le Cel-*S*- et le TOCA (Figure 121). Le radiomarquage est réalisé avec le Cel-Dpr-TOCA non protégé avec un RRC de 26%.

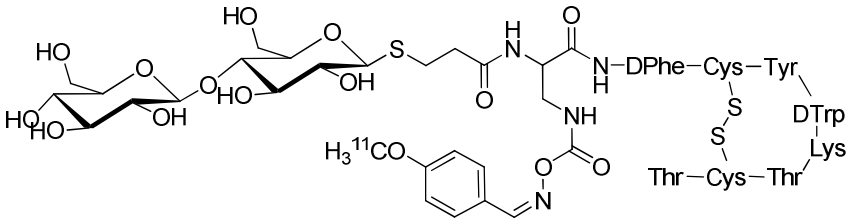


Figure 121: Le Cel-*S*-Dpr-[^{11}C]-MBOA-TOCA

Les images TEP obtenues après injection du radiotraceur à des rats portant une xénogreffe tumorale a permis de visualiser la présence de la tumeur grâce à un important contraste entre les cellules tumorales et les cellules saines. Le Cel-*S*-Dpr-[^{11}C]-MBOA-TOCA apparaît donc comme un radiotraceur potentiel des cancers sur-exprimant le récepteur de la somatostatine.

[208] Westerberg G., Langstrom B., *Appl. Radiat. Isot.* **1994**, 45, 7, 773.
[209] Henriksen G., Schottelius M., Poethko T., Hauser A., Wolf I., Schwaiger M., Wester H.J., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. imaging* **2004**, 31, 12.

Enfin, le TATE, un dérivé hydrosoluble de l'octréotate déjà utilisé efficacement en tant qu'agent d'imagerie des récepteurs de la somatostatine[210], a été marqué au ^{11}C en utilisant une méthodologie mettant en jeu la chimie « click »[211] et un nouveau précurseur secondaire, le $^{11}CH_3N_3$, avec un RRC de 55%. Pour cela, un bras espaceur acétylénique a été introduit sur le TATE afin de former le cycle 1,2,3-triazolyle en présence de sel de cuivre I et d'azoture de [^{11}C]-méthyle généré à partir de $^{11}CH_3I$ et d'azoture de sodium (Figure 122).

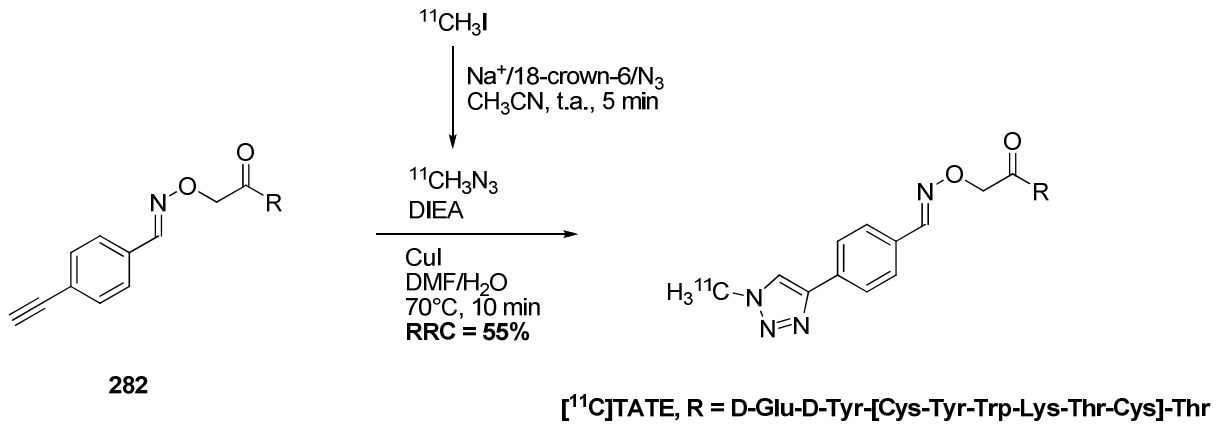


Figure 122: Radiomarquage du TATE au ^{11}C par chimie "click".

2.3.2.2 Oligonucléotides

Les avancées en génomique et biotechnologie ont permis d'identifier les gènes ou les protéines responsables de la prolifération de cancers. Ceci a facilité le développement de nouvelles méthodes de diagnostics précoces basées sur l'utilisation d'acides nucléiques possédant une haute affinité et une haute spécificité pour la protéine ou le gène considérés. Le seul exemple de marquage au ^{11}C d'oligonucléotides concerne des oligonucléotides anti-sens.

Les oligonucléotides anti-sens sont des petites séquences d'ADN ou d'ARN (simple brin ou double brin) capable de se fixer spécifiquement à un ARN messager avec une haute affinité. L'injection d'un oligonucléotide anti-sens marqué avec un émetteur β^+ permettrait donc de visualiser par TEP l'expression dans les organes ou les tissus d'un gène pathologique donné, responsable, par exemple, de la propagation de cellules cancéreuses ou virales.

En 1999, Nobuhide *et al.*[212] a décrit le seul exemple de marquage au ^{11}C d'oligonucléotides. Celui-ci utilise des oligonucléotides phosphorothioates antisens (ODNPS) permettant de visualiser l'expression de l'ARN messager de la protéine gliale fibrillaire (GFAP) sur-exprimée dans les gliomes (tumeurs cérébrales dont le diagnostic est extrêmement variable). La méthode de marquage comprend trois étapes :

[210] Sprague J.E., Peng Y., Sun X., Weisman G.R., Wong E.H., Achilefu S., Anderson C.J., *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 8674.
[211] Meldal M., Tornøe C, W, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952.
[212] Nobuhide K., Yoshio I., Katsuyoshi M., Satoshi U., Fujii R., *NeuroReport* **1999**, 10, 14, 2971.

1. l'ODNPS **283** est préhybridé avec son brin complémentaire **284** fixé sur support solide afin d'éviter les interactions des bases avec le réactif de marquage.

2. la réaction de marquage est une [^{11}C]-amidation de la partie hexylamine, introduit au préalable à l'extrémité 3' de l'ODNPS **283**, en présence de [^{11}C]-éthylcétène **[^{11}C]-286**[213] avec un RRC de 4%.

3. le double brin marqué **[^{11}C]-287** est ensuite dénaturé à 90°C afin d'obtenir l'ODNPS-[^{11}C-carboxy]-propionamide **[^{11}C]-288** (Figure 123).

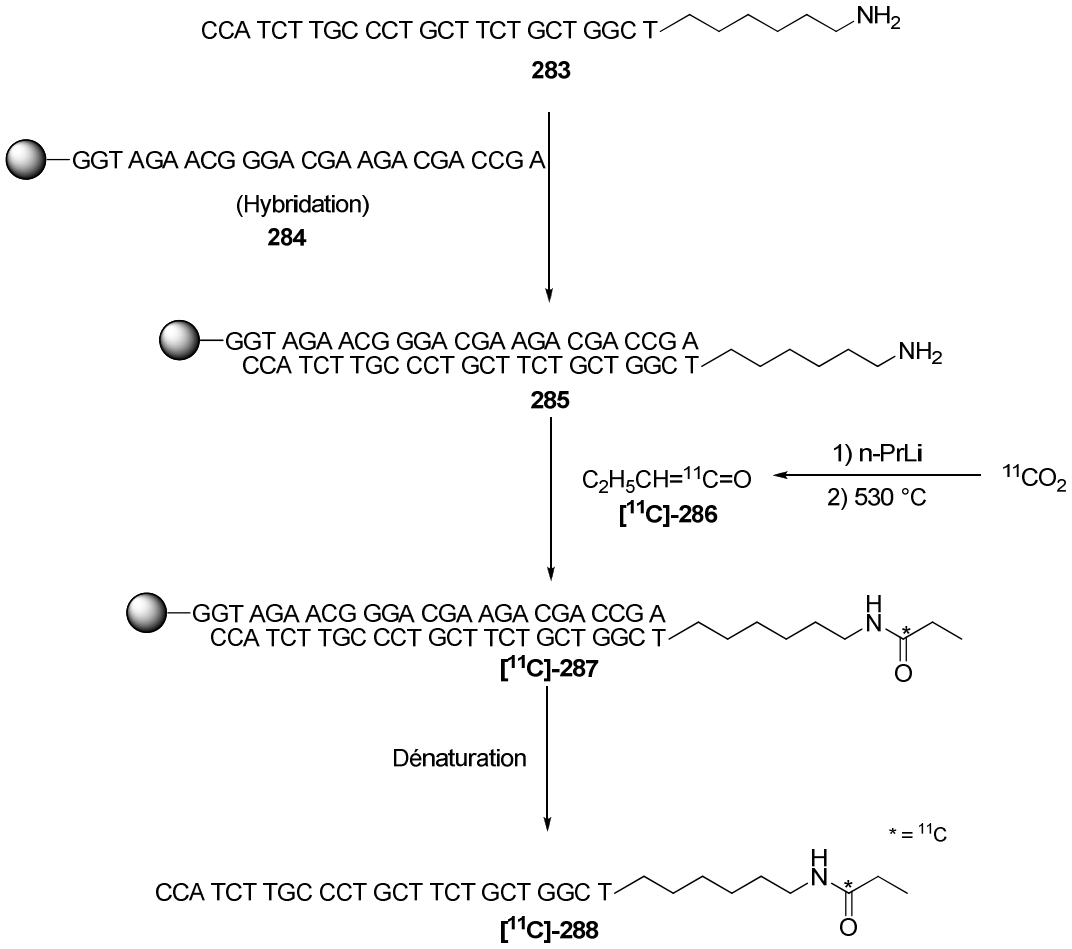


Figure 123: Structure de l'ODNPS -[^{11}C-carboxy]-propionamide.

Les études audioradiographiques sur des rats présentant un gliome exprimant la GFAP ont montré une absorption spécifique du radiotraceur dans les cellules tumorales permettant d'obtenir des images claires. Ce radiotraceur pourrait donc être envisagé pour visualiser l'expression de l'ARNm de la GFAP (et indirectement d'évaluer et de quantifier son activité)

[213] Imahori Y., Fujii R., Ueda S., Ido T., Nishino H., Moriyama Y., Yamamoto Y.L., Nakahashi H., *J. Nucl. Med.* **1991**, 32, 8, 1622.

dans le système nerveux central (SNC) humain par TEP afin de permettre un diagnostic précoce des gliomes.

3 Conclusion

Les méthodes de marquage applicables aux macromolécules biologiques (peptide, oligonucléotide) restent très limitées. En effet, 95% d'entre elles mettent en jeu la chimie de coordination avec des métaux tels que le ^{68}Ga ou le ^{64}Cu et le reste fait intervenir essentiellement l'utilisation de groupements prosthétiques marqués au fluor 18.

Ainsi la mise au point de méthodes permettant d'introduire directement sur des macromolécules déprotégées un atome de carbone 11 reste un véritable défi.

Dans ce contexte, le couplage de Stille modifié, utilisant un monorganoétain marqué, représente une alternative originale du fait de la tolérance de cette réaction pour les groupements fonctionnels et de l'absence de toxicité des sous-produits stanniques générés.

Ainsi, au cours de ce travail, nous nous proposons donc d'appliquer le couplage de Stille modifié au transfert de groupement méthyle sur des nucléosides et oligonucléotides modifiés dans des conditions compatibles avec le temps de demi-vie du carbone 11 et la nature particulière des substrats envisagés pour, à terme, développer une nouvelle approche de marquage de substrats oligonucléotidiques, appelés aptamères, au carbone 11 pour la TEP.

Dans un premier temps, les essais méthodologiques réalisés sur des nucléosides et dinucléotides modifiés seront décrits. Puis, dans un deuxième temps, les conditions mises au point seront appliquées à la méthylation d'oligonucléotides modèles obtenus en incorporant les nucléosides les plus prometteurs.

PARTIE C :

MODIFICATION DE NUCLEOSIDES

ET

TRANSFERT DE METHYLE

PARTIE C : MODIFICATION DE NUCLEOSIDES ET TRANSFERT DE METHYLE

1 Introduction

1.1 Les aptamères

Les acides nucléiques modifiés suscitent un grand intérêt dans le domaine de la chimie médicinale et de synthèse. En effet, apporter une modification à un nucléotide naturel permet de développer des mimes d'oligonucléotides (aptamères, anti-sens) avec des propriétés de fixation spécifiques à une cible (gène, ARN messager codé par ce gène, protéines) et une meilleure stabilité face aux enzymes telles que les endonucléases. Ces paramètres sont très importants à maîtriser dans le but de développer des agents puissants de thérapie ou de diagnostic.

Ainsi, le terme «aptamère» vient du grec «aptus» qui signifie aptitude. Les aptamères sont des oligonucléotides modifiés possédant des propriétés de reconnaissance moléculaire complexes qui permettent une fixation spécifique à une cible, en particulier des protéines ou de petites molécules (Figure 124). Ce sont des rivaux pour les anticorps en termes d'affinité pour leur cible avec les avantages d'êtres plus petits, moins chers et plus faciles à obtenir.

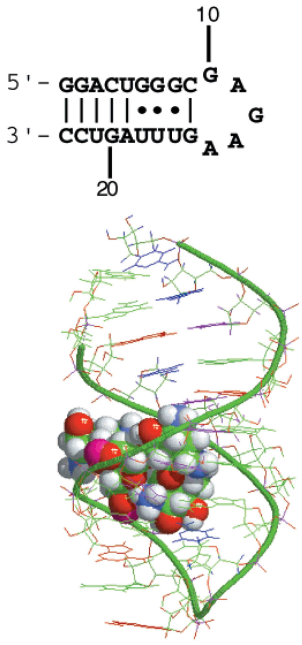


Figure 124: Structure secondaire et tertiaire d'un aptamère reconnaissant la néomycine B[214]

[214] Famulok M., Mayer G., Blind M., *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 591.

Les aptamères sont sélectionnés *in-vitro* à partir d'une librairie d'oligonucléotides selon la méthode SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment). Tout d'abord, les différents oligonucléotides sont mis en présence de la cible désirée, immobilisée sur une matrice. Les oligonucléotides ne reconnaissant pas la cible sont éliminés par simple lavage et ceux reconnaissant la cible sont libérés, amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) puis à nouveau mis en présence de la cible. Ce cycle est répété jusqu'à obtenir un oligonucléotide appelé aptamère qui est finalement cloné afin d'en disposer d'une plus grande quantité (Figure 125[215]).

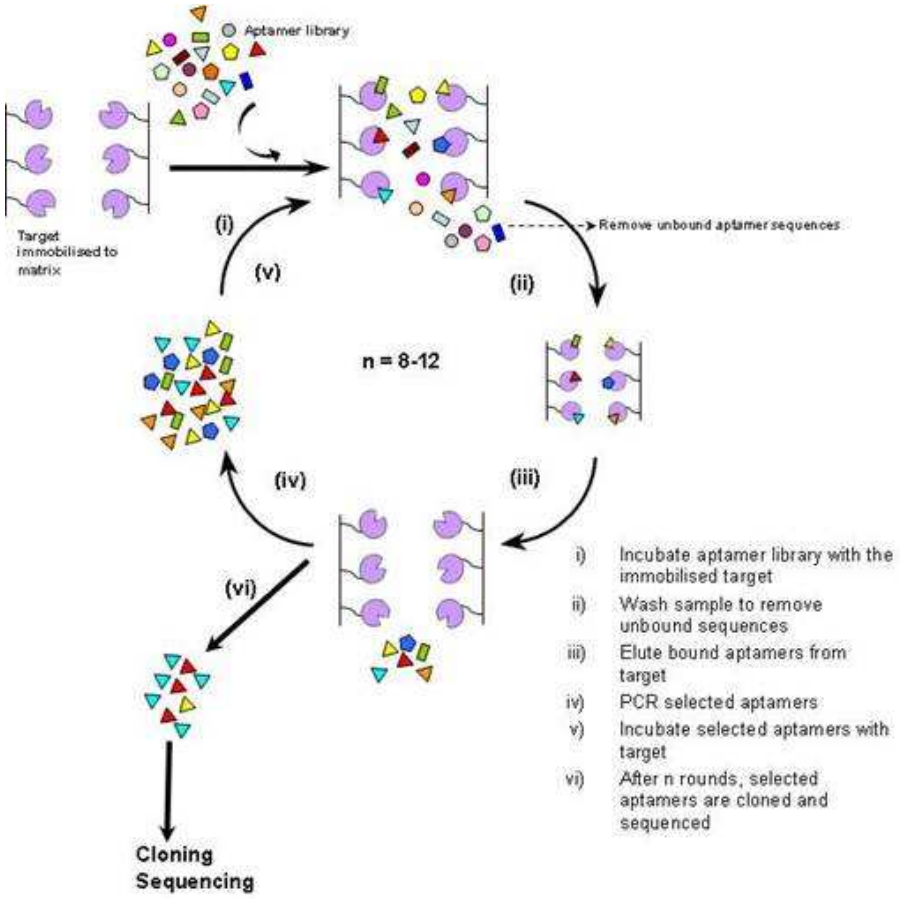


Figure 125: Sélection d'aptamères selon la méthode de SELEX.

Cette méthode a permis de développer plusieurs aptamères composés d'ADN simple brin, d'ARN ou d'ARN chimiquement modifiés augmentant ainsi la stabilité de l'aptamère et la diversité des groupements fonctionnels. Du fait de la présence des charges négatives présentes sur les liaisons phosphodiesters, les aptamères ne peuvent pas traverser les membranes cellulaires ce qui limite les applications *in-vivo* aux cibles extra-cellulaires[214] (Tableau 2).

[215] Khan H., Missailidis S., *Gene Ther. Mol. Biol*. **2008**, 12, 111.

Cible	Aptamère
Récepteur de l'acétylcholine	ARN
Facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF)	ARN
Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)	ADN simple brin
Facteur de croissance des kératinocytes (KGF)	ARN 2'-NH_2-2'-désoxypyrimidines ARN 2'-F-2'-désoxypyrimidines
Facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF)	ARN 2'-NH_2-2'- désoxypyrimidines
Interféron γ (IFN γ)	ARN 2'-NH_2-2'-désoxypyrimidines ARN 2'-F-2'-déoxypyrimidines
Protéine cellulaire du Prion (PrP)	ARN
Auto-anticorps de l'anti-acétylcholine	ARN 2'-NH_2-2'-désoxypyrimidines

Tableau 2: Correspondance des protéines cibles avec leurs aptamères.

Le marquage d'aptamères par un émetteur de positon β^+ permettrait donc de visualiser par TEP ces protéines et dans certains cas de diagnostiquer des cancers à des stades précoces de leur évolution. Actuellement, seuls deux exemples de marquage d'aptamères ont été décrits.En 2002, Taylor *et al.*[216] a marqué un aptamère se fixant sur la thrombine par photoconjugaison entre le [^{18}F]-fluorure de 3-azido-5-nitro-benzyle ([^{18}F]-ANBF) et la partie hexylamine situé à l'extrémité de l'aptamère avec un rendement radiochimique non corrigé de 20%. Le principal inconvénient de cette méthode vient de la photoactivation du [^{18}F]-ANBF qui conduit à la formation de deux heptoazocyclotetraènes. Ces deux isomères réagissent de la même façon vis-à-vis de la partie hexylamine pour former deux produits de conjugaison (Figure 126).

[216] Lange C.W., VanBrocklin, H.F., Taylor S.E., *J Label Compd Radiopharm* **2002**, 257.

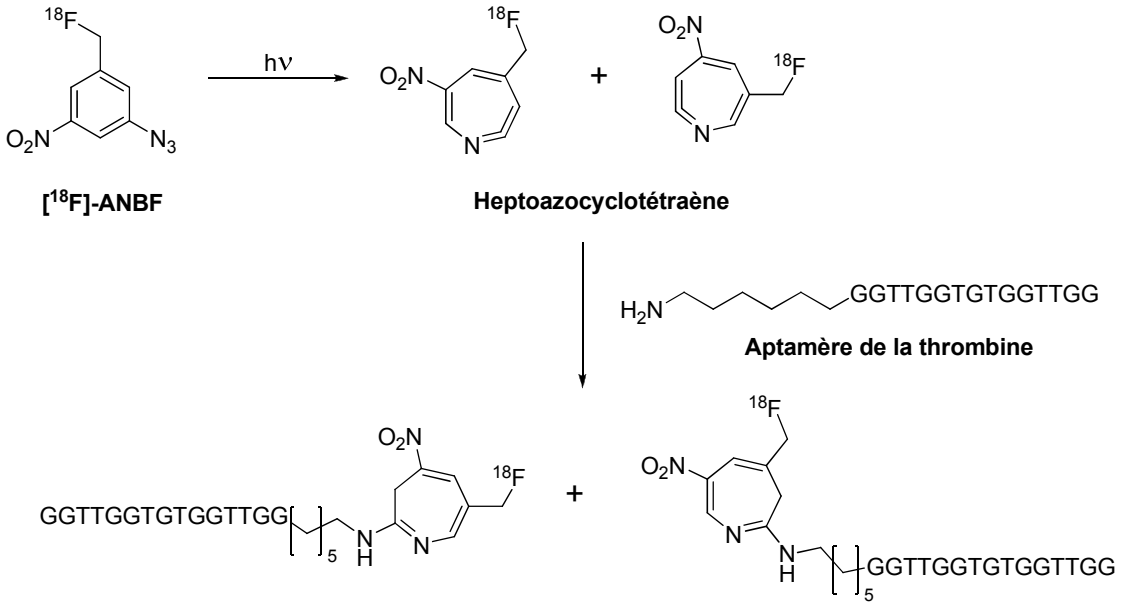


Figure 126: Marquage d'un aptamère de la thrombine au ^{18}F par photoconjugaison avec le [^{18}F]-ANBF

Le deuxième exemple est le marquage de l'aptamère TTA1 par le 99mTc[217] permettant de visualiser, par TEMP (tomographie par émission mono-photonique), la tenascine C située dans le matrice extracellulaire et surexprimée dans les glioblastomes et le cancer du sein. Le groupement chelatant utilisé pour le marquage est le mercapto-acétylglycine MAG_2 introduit sur l'aptamère par liaison amide (Figure 127).

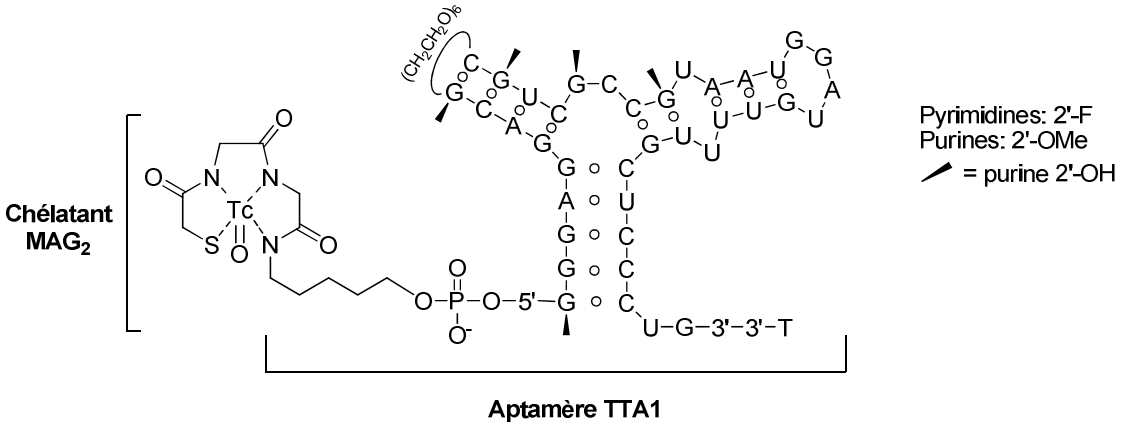


Figure 127: Marquage de l'aptamère TTA1 au 99mTc

Ainsi, développer une méthode de marquage d'aptamères au ^{11}C en utilisant le couplage de Stille modifié nous est apparu comme un réel défi.

[217] Hicke B.J *et al., J. Nucl. Med.* **2006**, 47, 4: 668.

1.2 Stratégie envisagée

Afin de mettre au point une méthodologie de transfert de méthyle par couplage de Stille modifié et de vérifier la compatibilité de cette réaction avec les différentes fonctionnalités présentes sur les nucléosides, la première étape a été d'introduire un groupement iodoaryle, groupement le plus réactif pour le couplage de Stille modifié, sur des nucléosides. Dans le cadre de ce travail, nous avons envisagé de modifier les nucléosides en position 5' en faisant varier la nature du nucléoside (série ADN ou ARN, base azotée) ainsi que le type de connexion entre le groupement iodoaryle et le nucléoside (phosphorothioesters, amide, liaison C-C). Nous avons également étudiée la réaction de méthylation au niveau de la base azotée en utilisant des 2'-déoxy-5-halo- uridines (Figure 128).

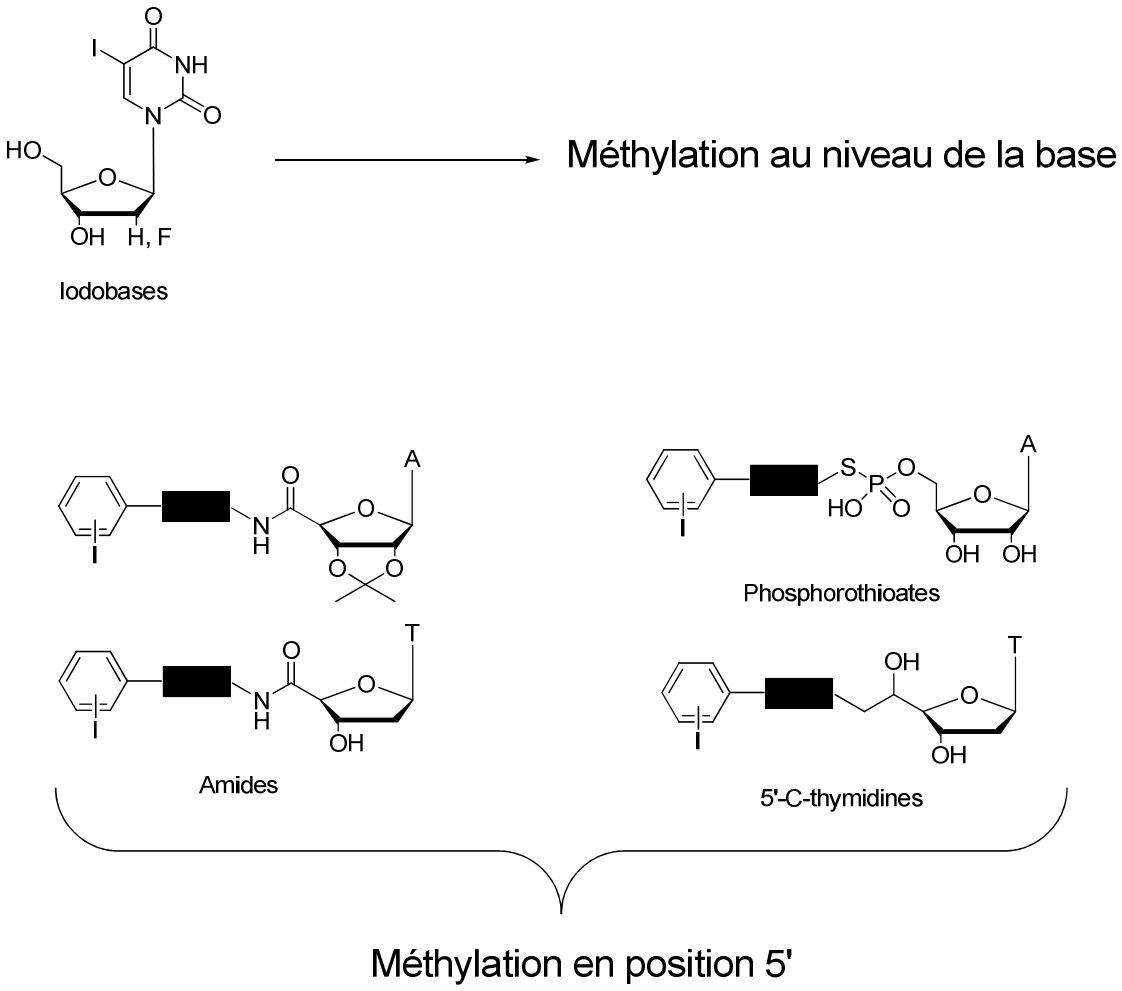


Figure 128: Précurseurs envisagés pour l'étude du transfert de méthyle par couplage de Stille modifié

La deuxième étape a consisté à étudier le transfert de méthyle sur les nucléosides obtenus précédemment dans le but de mettre au point des conditions compatibles avec la durée de demi-vie du carbone 11. Ces conditions ont été basées, dans un premier temps, sur

celles développées antérieurement dans le groupe pour la radiosynthèse d'analogues du [^{11}C]-SB-222200, radiotraceur du récepteur NK_3[146] (Figure 78) puis optimisées.

Les conditions de méthylation par couplage de Stille modifié ont été ensuite appliquées à des oligonucléotides modèles obtenus après incorporation des monomères les plus prometteurs.

2 Synthèse des nucléosides modifiés

2.1 Les phosphorothioesters

En 2003, de Vries[218] a mis au point une méthode de marquage d'adénosine au ^{18}F par conjugaison de dérivés fluorobromés (alkyles, benzyles) avec l'adénosine mono-phosphorothioate (AMPS). Ainsi, dans une première approche, cette méthode a été envisagée afin d'introduire un groupement iodoaryle et d'étudier le transfert de méthyle par couplage de Stille modifié.

L'AMPS a été synthétisée à partir de l'adénosine libre en présence de chlorure de thiophosphoryle dans le triéthylphosphate avec un rendement de 60% selon le protocole décrit par Murray et Atkinson[219] (Figure 129).

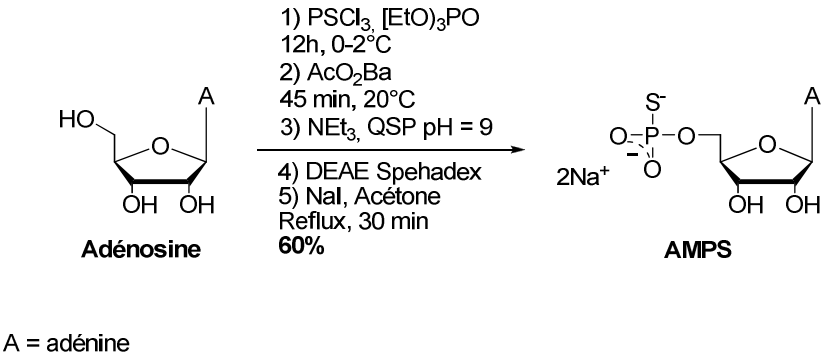


Figure 129: Synthèse de l'AMPS.

Dans ces conditions, l'adénosine phosphorodichloridothioate formée est hydrolysée par l'acétate de baryum puis le sel de baryum obtenu est purifié sur résine échangeuse de cations et converti en sel de sodium en présence d'iodure de sodium. Cette méthode permet d'obtenir le phosphorothioate à partir de nucléosides libres et sans l'utilisation de réactifs toxiques autre que le chlorure de thiophosphoryle contrairement aux protocoles décris par Sczepanik[220] (utilisation de NaCN) et Antonov[221] (utilisation de sels de tributylétain).

[218] de Vries E.F.J, Vroegh J., Elsinga P.H., Vaalburg W., *Appl. Radiat. Isot* **2003**, 58, 469.
[219] Murray A.W., Atkinson M.R., *Biochemistry* **1968**, 7, 11, 4023.
[220] Szczepanik M., Désaubry L., Johnson R.A., *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 7455.
[221] Antonov K.V., Esipov R.S., Gurevich A.L., Chuvikovsky D.V., Mikulinskaya G.V., Feofanov S.A., Miroshnikov A.L., *Rus. J. Bioorg. Chem.* **2003**, 29, 6, 560.

Parallèlement, trois précurseurs iodoaryles ont été synthétisés. Les précurseurs bromoacétamides **289** et **290** ont été préparés par couplage peptidique en présence de bromure de bromo-acétyle à partir soit, de la 3-iodobenzylamine[222] soit, de la 4-iodoaniline[223] permettant d'accéder aux acétamides correspondants avec des rendements respectifs de 74 et 60%. Le précurseur α-bromocétone **291**, a été obtenu par bromation de la 4-iodoacétophénone en présence de tribromure de tétrabutylammonium ($TBABr_3$)[224] avec un rendement de 68 % (Figure 130).

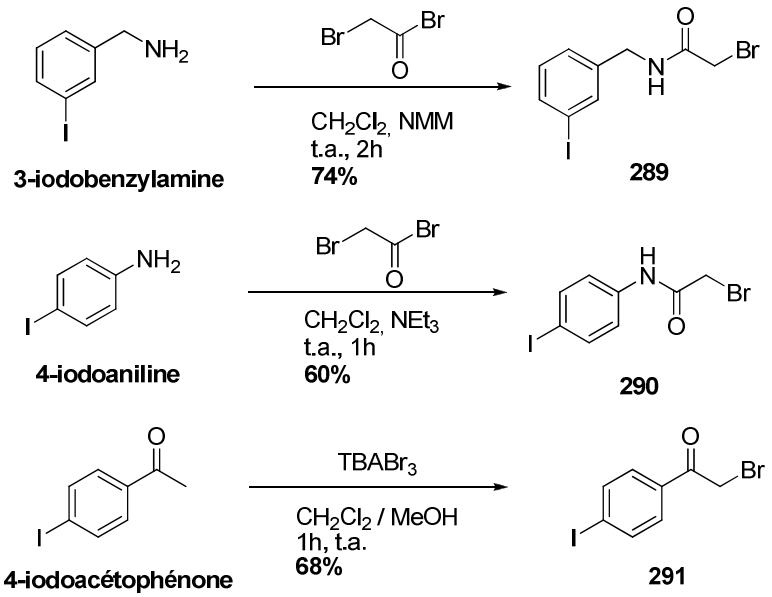


Figure 130: Formation des précurseurs iodoaryles 289 - 291.

Finalement, l'étape de conjugaison a été réalisée à 70°C en milieu tamponné à pH = 8 à l'aide d'une solution tampon PBS (soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate trisodique et du phosphate de potassium) permettant d'accéder aux composés désirés **292** - **294** avec des rendements compris entre 65 et 85% (Figure 131).

[222] Kühnast, B., Dollé F., Terrazzino S., Rouseau B., Loc'h C., Vaufrey F., Hinnen F., Doignon I., Pillon F., David C., Crouzel, Tavitian B., *Bioconjugate Chem* **2000**, 11, 627.
[223] Baraldi P.G., Tabrizi M.A., Preti D., Bovero A., Romagnoli R., Fruttarolo F, Zaid N.A., Moorman A.R., Varani K., Gessi S., Merighi S., Borea P.A., *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1434.
[224] Kajigaeshi S., Kakinami T., Okamoto T., Fujisaki S., Bull. *Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 1159.

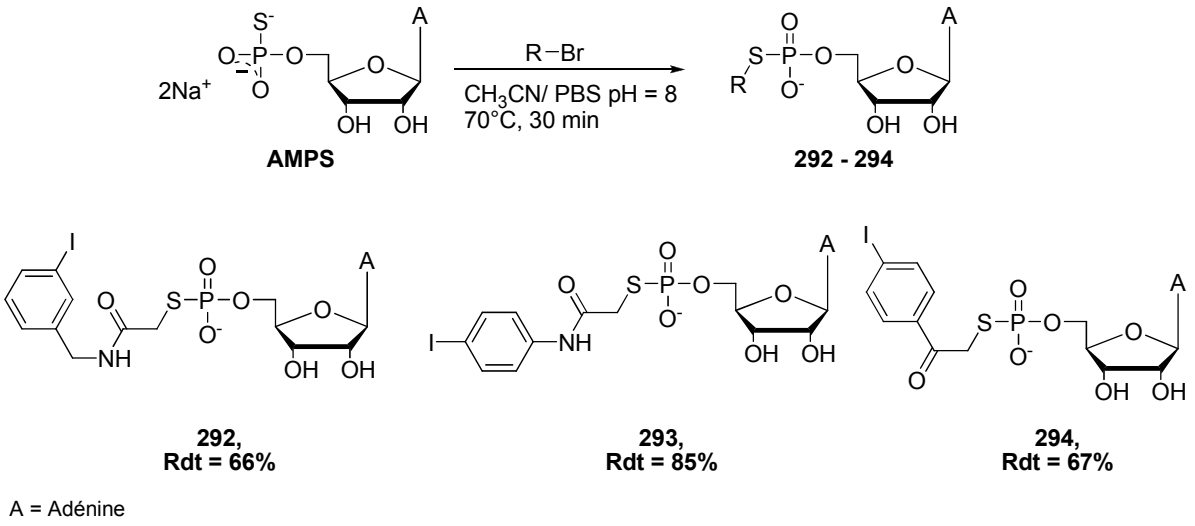


Figure 131: Synthèse des adénosines monophosphorothioesters 292 - 294.

2.2 Les 5'-(*N*-carboxamido)-adénosines

La formation de liaison amide entre des arylamines et la 5'-carboxyl-adénosine a été envisagée pour introduire un groupement iodoaryle sur la 5'-carboxy-adénosine **296**, obtenue en 3 étapes à partir de l'adénosine commerciale[225,226].

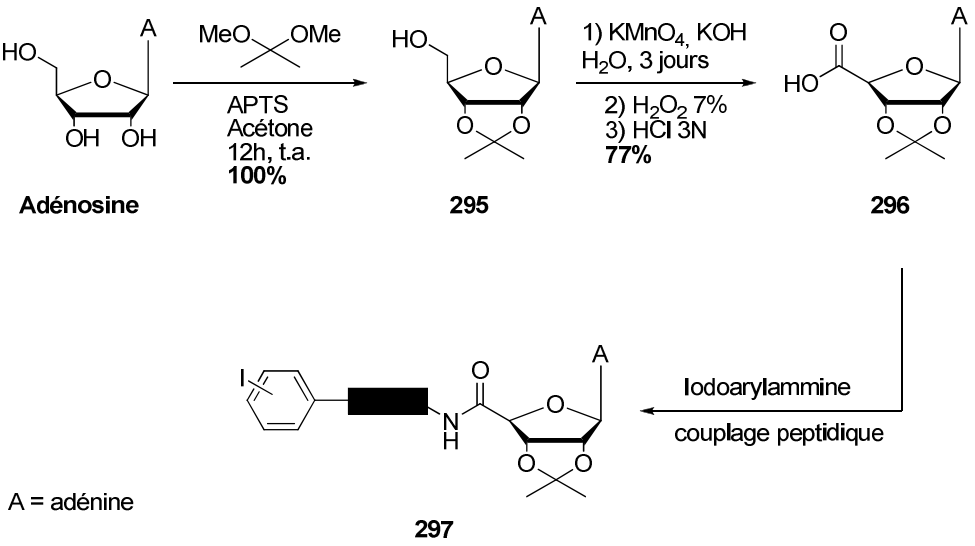


Figure 132: Synthèse de 5'-(*N*-carboxamido)-adénosines.

Le couplage peptidique a été largement décrit dans la littérature[227,228]. La liaison amide est omniprésente dans les molécules du vivant tel que les peptides, les protéines ou encore les

[225] Middleton R.J., Briddon S.J., Cordeaux Y., Yates A.S., Dale C.L., George M.W., Baker J.G., Hill S.J., Kellam B., *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 4, 782.
[226] Lehel S., Horváth G., Boros I., Mikecz P., Márián T., Szentmiklósi A.J., Trón L., *J. Label. Cpd. Radiopharm.* **2000**, 43, 807.
[227] Han S.Y., Kim Y.A., *Tetrahedron* **2004,** 60, 247
[228] Montalbetti C.A.G.N., Falque V., *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827.

5'-(*N*-carboxamido)-adénosines[226], agonistes/antagonistes des récepteurs de l'adénosine. Ces dernières sont obtenues par couplage peptidique avec de bons rendements en utilisant le couple carbodiimide/hydroxybenzotriazole (HOBt) comme agent d'activation en milieu basique selon un mécanisme en trois étapes (Figure 133). Le carbodiimide **299** réagit avec l'acide carboxylique **298** pour former la *O*-acylurée **300**. Cette espèce peut ensuite aboutir à la formation de *N*-acylurée **301** non-réactive par transfert d'acétyle. Cette réaction secondaire peut être évitée en utilisant des nucléophiles, comme le *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt), réagissant plus rapidement que le transfert d'acyle. L'ester **302** ainsi formé peut réagir avec l'amine pour former l'amide **303**.

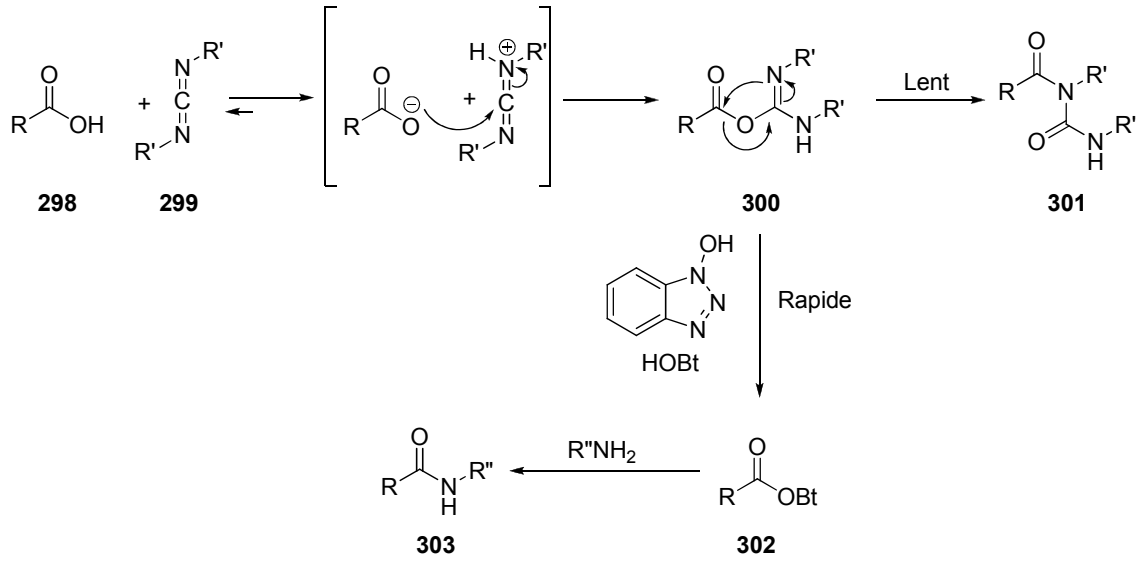
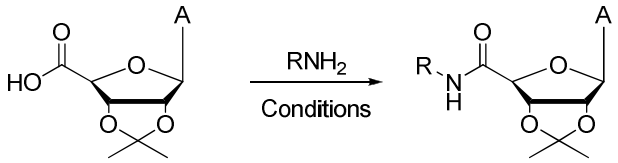


Figure 133: Mécanisme général du couplage peptidique avec agent d'activation.

Le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ainsi que le chlorhydrate d'éthyl-diméthylamino-carbodiimide (EDC.HCl) sont fréquemment utilisés comme agents d'activation. La différence de solubilité des urées respectivement formées au cours du couplage peut être avantageusement utilisée lors de l'étape de purification. Ainsi la dicyclohexylurée (DCU), partiellement insoluble dans les solvants organiques, comme le CH_2Cl_2, sera éliminée par filtration tandis que l'éthyldiméthylaminourée (EDU), soluble dans l'eau, sera éliminé par traitement aqueux.

L'étape de couplage peptidique a donc été réalisée en utilisant la DCC et l'EDC.HCl en présence de la 3-iodobenzylamine et la 4-iodoaniline avec des rendements modérés à satisfaisants permettant d'obtenir les amides **304** et **305** (Tableau 3).



296 304 - 305

A = Adénine

RNH_2	Conditions	Produit	Rdt (%)
4-iodoaniline	DCC, HOBt, DIEA CH_2Cl_2, 12h, t.a.	**304**	80
3-iodobenzylamine	DCC, HOBt, DIEA CH_2Cl_2, 12h, t.a	**305**	57
3-iodobenzylamine	EDC.HCl, HOBt, DIEA CH_2Cl_2, 12h, t.a.	**305**	34

Tableau 3: Synthèse des adénosines-5'-carboxamides 304 et 305 par couplage peptidique.

Cette réaction n'a pas fait l'objet d'optimisation car les quantités obtenues ont été suffisantes pour réaliser les études de transfert de méthyle.

2.3 La 5'-(*N*-(3-iodobenzyl)-carboxamido)-thymidine

La thymidine a ensuite été choisie comme nucléosides de départ car la partie thymine ne nécessite pas de protection au cours de la synthèse d'oligonucléotide contrairement aux autres déoxynucléosides ce qui est très appréciable car cela évite d'ajouter des étapes de protection et déprotection facilitant l'introduction d'autres modifications.

Ainsi, le couplage peptidique entre la 5'-carboxylthymidine et la 3-iodobenzylamine a été envisagé. A partir de la thymidine commerciale, l'alcool primaire **306** puis secondaire **307** ont été protégés respectivement par le *tert*-butyldiméthylsilyle et le *tert*-butyldiphénylsilyle avec d'excellents rendements. Le groupement tert-butyldiphénylsilyle a été choisi pour sa stabilité en milieu acide et basique ainsi que pour sa compatibilité avec les futures réactions utilisées. L'alcool **308** est enfin obtenu par déprotection sélective de l'acool primaire en présence d'acide *para*-toluène-sulfonique avec un rendement de 93% (Figure 134).

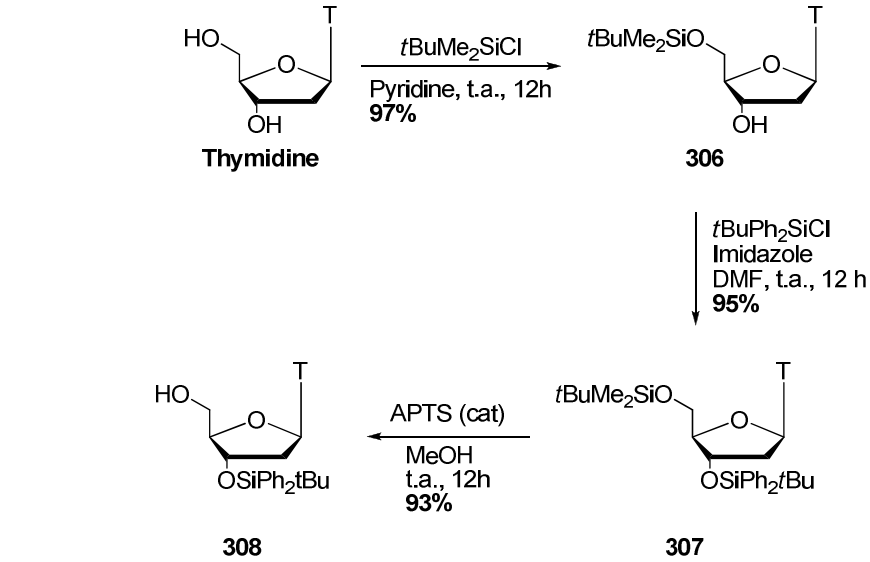


Figure 134: Synthèse de l'intermédiaire monoprotégé 308.

L'aldéhyde **309** a ensuite été obtenu par oxydation de l'alcool **308** selon le protocole de Pfitzner-Moffat[229] en présence du diméthylsulfoxide, activé par le DCC avec un rendement de 78% (Figure 135).

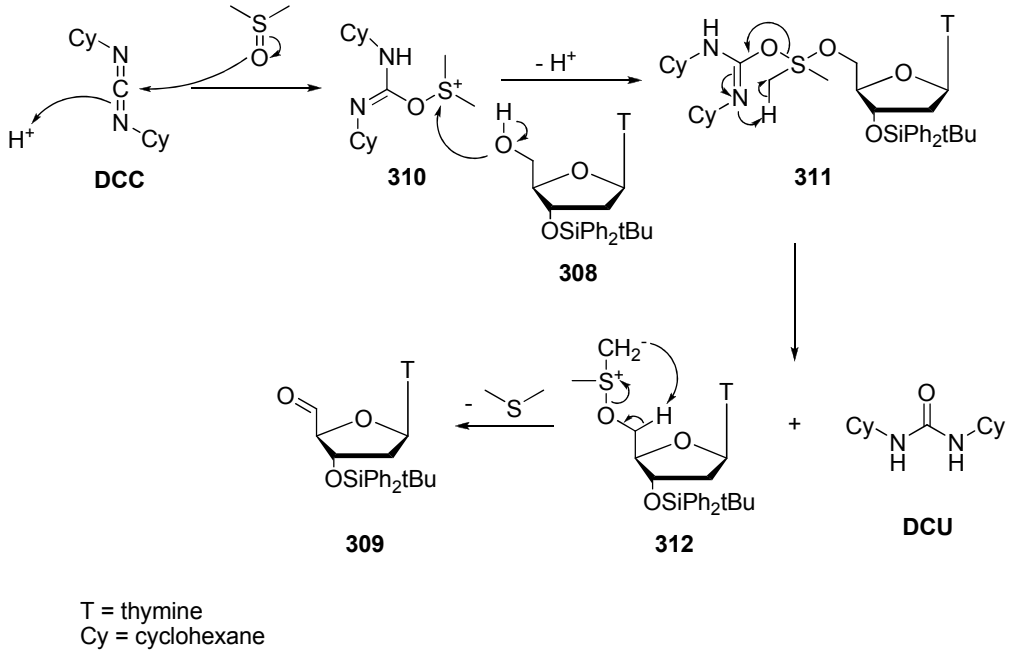


Figure 135: Synthèse de la thymidine aldéhyde 309.

La thymidine aldéhyde a été préparée à partir de 25g de thymidine sans purification intermédiaire. L'étape la plus délicate a consisté en l'élimination par précipitation de la DCU formée.

[229] Pfitzner K.E., Moffatt J.G., *J. Am. Chem. Soc* **1963**, 3027.

Puis la 3'-*O*-TBDPS-5'-carboxylthymidine **313** a été obtenue par oxydation de la thymidine aldéhyde **309** en présence de chlorite de sodium selon le protocole de Dalcanale[230] avec un rendement de 95% (Figure 136).

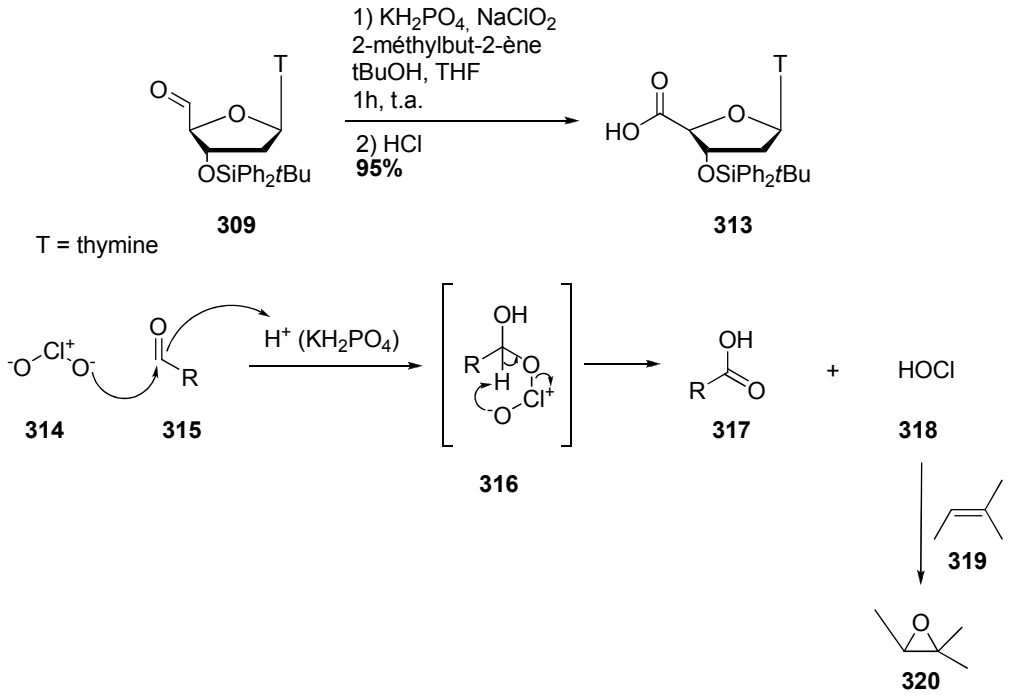


Figure 136: Synthèse de la 5'-carboxylthymidine 313 et mécanisme proposé.

Il est important de noter le rôle du 2-méthylbut-2-ène **319** qui piège l'acide hypochloreux **318** afin qu'il ne réagisse pas avec le chlorite de sodium (Figure 137).

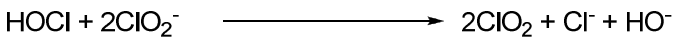
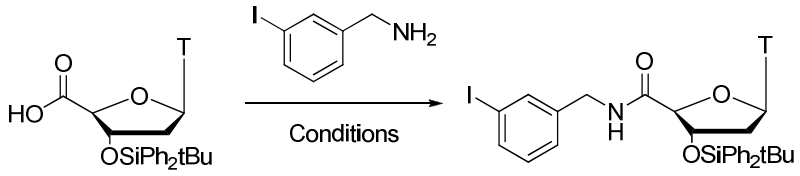


Figure 137: Réaction de l'acide hypochloreux avec les ions chlorites.

Enfin, l'amide **321** a été synthétisé par couplage peptidique en présence de 3-iodobenzylamine et de l'acide **313** selon différentes conditions (Tableau 4).

[230] Dalcanale E., Montanari F., *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 567.



313 **321**

T = thymine

Entrée	Conditions	Rendement (%)
1	DCC, HOBt, DIEA, CH_2Cl_2, 12h, t.a.	62
2	$(COCl)_2$, EtOH, 2h, t.a.	Dégradation
3	TBTU, DIEA, DMF, 40 min, 4°C	40
4	TOTU, DIEA, DMF, 5h, t.a.	55
5	DPPA, NEt_3, DMF, 6h, t.a.	77

Tableau 4: Formation de la 5'-(*N*-(3-iodobenzyl)-carboxamido)-thymidine 321.

Tout d'abord, les conditions mises au point pour la synthèse des 5'-(*N*-carboxamido)-adénosines ont été appliquées avec un rendement modeste de 62% faussé par la présence de DCU difficilement éliminable (Tableau 4, entrée **1**). La formation de l'amide par réaction de la 3-iodobenzylamine avec le chlorure d'acide de la 5'-carboxylthymidine protégé en 3'[231], obtenu en présence de chlorure d'oxalyle, n'a pas été observée car la réaction a mené à la dégradation du substrat (Tableau 4, entrée **2**). La carboxamido-thymidine **321** a pu être également obtenue en utilisant des sels d'uronium tels que le tetrafluoroborate de *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium (TBTU) avec un rendement de 40% (Tableau 4, entrée **3**). Ces agents d'activation ont été une alternative intéressante à l'utilisation couplée de la DCC et du HOBt. Le mécanisme est relativement proche puisqu'il s'agit de former l'ester azabenzotriazolyle **325** très réactif vis-à-vis des amines et la force motrice de la réaction reste la formation d'urée (Figure 138).

[231] Ravn J., Qvortrup K., Rosenbohm C., Koch T., *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 5440.

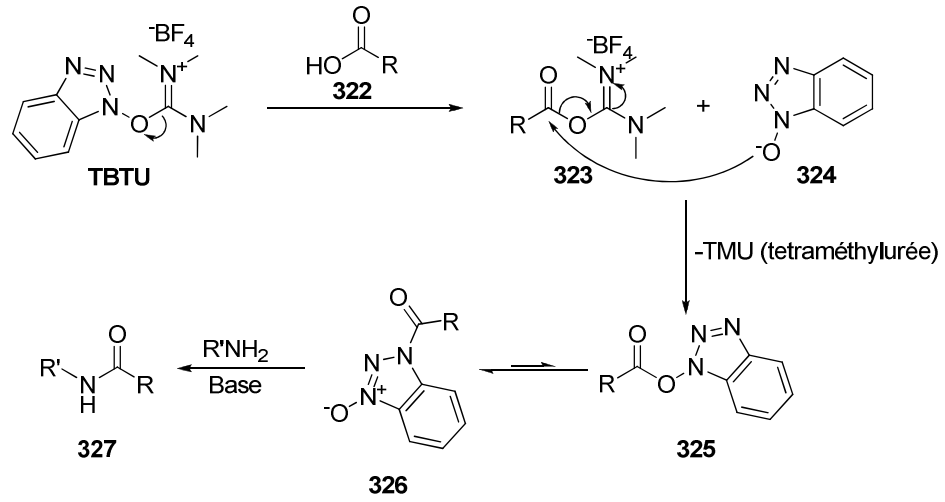


Figure 138: Mécanisme du couplage peptidique avec le TBTU.

Une des limitations des esters activés est l'encombrement stérique généré qui freine l'étape d'aminolyse. De nouveaux réactifs d'activation ont donc été développés afin d'offrir une meilleur réactivité. Par exemple, le *O*-(éthoxycarbonyl)cyanométhylèneamino)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tétraméthyluronium (TOTU) génère l'acyloxime activée **328**, très réactive qui réagit rapidement avec les amines même encombrées (Figure 139).

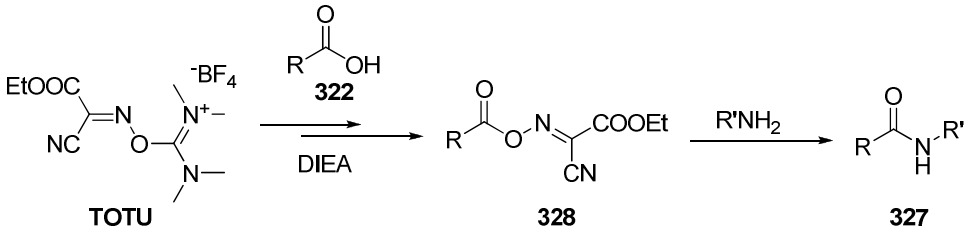


Figure 139: Couplage peptidique avec le TOTU.

Dans notre cas, l'utilisation du TOTU dans les conditions décrites par Leumann *et al.*[232] a permis d'obtenir l'amide **321** avec un rendement moyen de 55% (Tableau 4, entrée **4**).

En 1988, Elliott *et al.*[233] a décrit la synthèse des 5'-(*N*-carboxamido)-thymidine et 5'-(*N*-carboxamido)-uridine par couplage peptidique en présence d'azoture de diphénylphosphoryle (DPPA) en milieu basique. Cette réaction repose sur la formation, en deux étapes, de l'azoture d'acyle **330** qui réagit rapidement avec l'amine pour donner l'amide désiré **329** (Figure 140). Le sous produit de la réaction n'est plus une urée mais un hydrogénophosphate **331** facilement éliminé par purification sur colonne de gel de silice.

[232] Ahn D.R., Egger A., Lehmann C., Pitsch S., Leumann C.J., *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 23, 5312.
[233] Elliott R.D., Thomas H.J., Shaddix S.C., Adamson D.J., Brockman R.W., Riordan J.M., Montgomery J.A., *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 250.

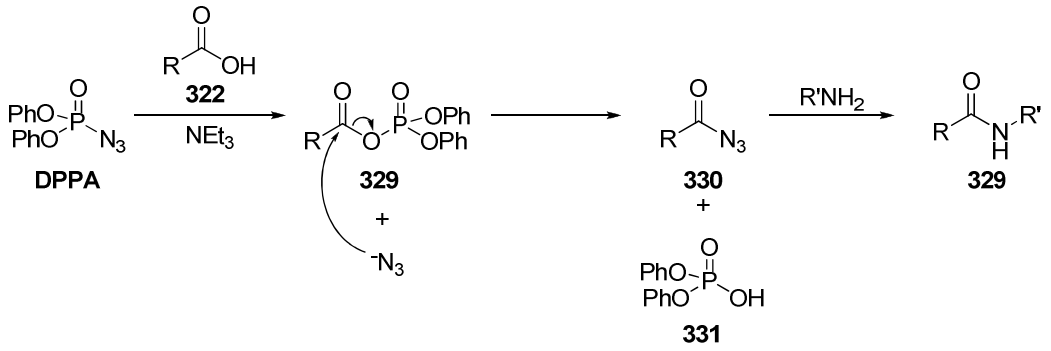


Figure 140: Couplage peptidique en présence de DPPA.

Cette méthode a donc été utilisée pour synthétiser l'amide **321** avec un rendement de 77% (Tableau 4, entrée **5**).

Par la suite, Il a été obligatoire de déprotéger l'hydroxyle en 3' afin de ne pas perturber la cinétique du transfert de méthyle. Le TBAF a été tout d'abord utilisé permettant d'obtenir l'amide **332** avec un rendement de 48%. Ce faible rendement peut être expliqué par les difficultés rencontrées pour purifier le nucléoside libre. En effet, une purification sur colonne de silice suivie d'une recristallisation délicate sont nécessaires pour éliminer le TBAF ce qui diminue sensiblement le rendement. Ce problème a pu être résolu en utilisant le protocole de Robbins *et al.*[234] Cette méthode, spécialement développée pour la déprotection de nucléosides, décrit le clivage d'éthers silylés en présence de fluorure d'ammonium dans le méthanol. L'ion ammonium joue un rôle très important puisqu'il se coordine à l'oxygène de l'éther silylé par liaison hydrogène durant l'attaque nucléophile sur le silicium par l'ion fluorure lui-même stabilisé par le méthanol par liaison hydrogène. Cette méthode facilite énormément la purification du nucléoside déprotégé et permet d'obtenir le nucléoside libre **332** avec un rendement de 76% (Figure 141).

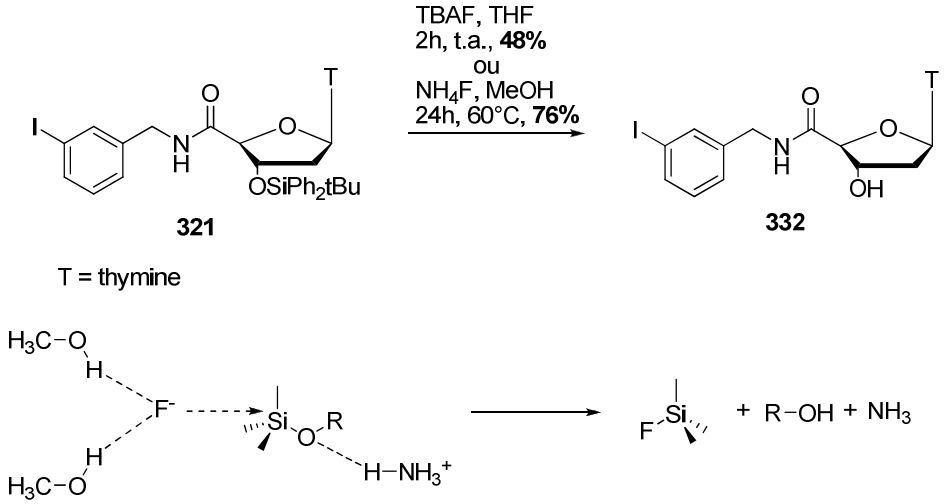
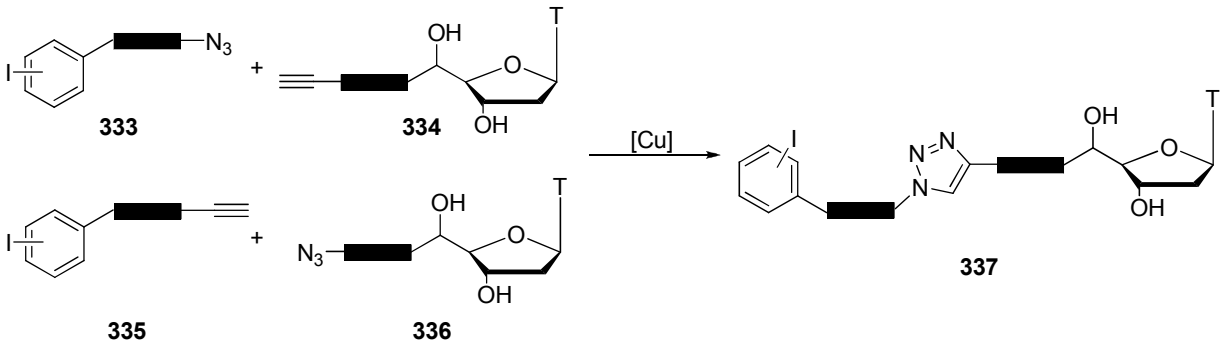


Figure 141: Formation de la 5'-(*N*-(3-iodobenzyl)-carboxamido)-thymidine 332 et mécanisme de déprotection avec NH_4F.

[234] Zhang W., Robins M.J., *Tetrahedron. Let.* **1992**, 33, 9, 1177.

2.4 Les thymidines 5'-C-substituées

La dernière stratégie adoptée vise à introduire le groupement iodoaryle, cette fois-ci *via* la réaction de chimie « click », sur différentes thymidines modifiés substituées sur le carbone en position 5'



T = thymine

Figure 142: Stratégie envisagée pour la synthèse de nouveaux nucléosides modifiés par chimie « click ».

Il est à souligner que contrairement aux trois exemples précédemment développés, les nucléosides obtenus par cette voie pourront donc être incorporés soit au milieu, soit aux extrémités (3' ou 5') d'une séquence oligonucléotidique. De plus, cette méthode constitue une solution simple et efficace pour augmenter la distance entre le cycle iodoaryle et le nucléoside. Ce point peut avoir de l'importance lors de l'incorporation du nucléoside modifié dans une séquence oligonucléotidique possédant une structure tridimensionnelle qui pourrait perturber l'étape de radiomarquage.

La chimie « click » a été largement décrite pour modifier des biomolécules telles que des peptides, des sucres, des nucléosides ou des oligonucléotides[235]. Elle a été utilisée récemment en radiosynthèse pour marquer des dérivés de l'acide folique et la neurotensine (8-13)[236] au fluor 18. Introduit par Sharpless en 2001, ce concept est basé sur la cycloaddition entre un azoture et un alcyne terminal catalysé au cuivre I selon un mécanisme probablement concerté[237]. La première étape serait la coordination de l'alcyne terminal **338** avec le cuivre pour former l'acétylure de cuivre **339** (A). Puis, l'azoture **340** rentrerait dans la sphère de coordination du cuivre *via* l'atome d'azote en alpha du groupement R' (B). Puis, l'azote situé en gamma du groupement R' attaquerait le carbone 2 de l'acétylure formant ainsi le métallacycle à six chaînons **342** (C). Cette étape est endothermique mais la barrière d'activation en est particulièrement basse, contrairement à celle de la réaction non-catalysée. Ceci explique l'accélération de la vitesse de réaction, 7 à 8 fois plus rapide que la simple réaction thermique non-catalysée. Enfin, la diminution de la pression intracyclique serait provoquée par la

[235] Sharpless K.B., Kolb HC, *DDT* **2003**, 8, 24, 1128.
[236] Marik J. et al., *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 6681.
[237] Himo F., Lovell T., Hilgraf R., Rostovtsev V.V., Louis Noodleman L., Sharpless K.B., Fokin V.V., *J. Am. Chem. Soc* **2005**, 127, 216.

conversion du métallacycle **342** en triazolylcuivre **343** (D) permettant la formation du dérivé triazole **344** après protolyse (E) (Figure 143).

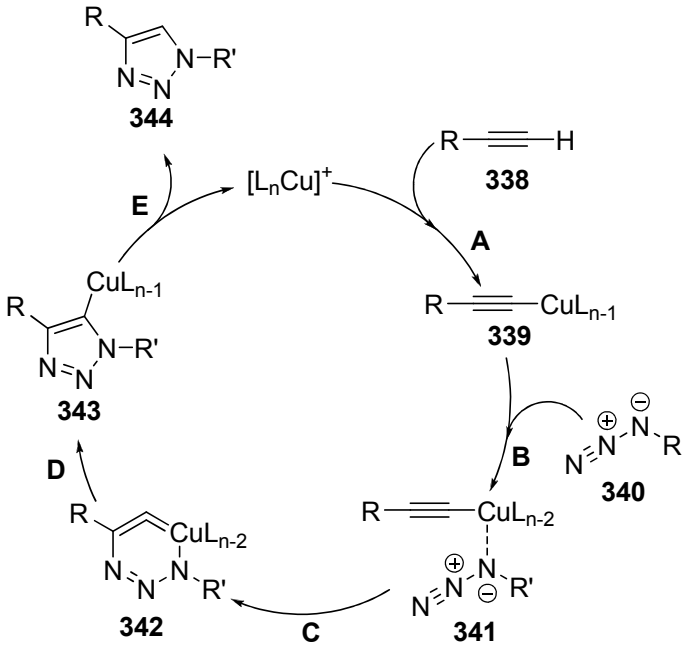


Figure 143: Mécanisme supposé de la réaction de chimie « click ».

Dans notre cas, deux voies de synthèse ont été envisagées, selon que:

- l'acétylénique est porté par la partie iodoaryle et l'azoture par le nucléoside (**355**).

- l'azoture est porté par la partie iodoaryle et l'acétylénique par le nucléoside (**371**, **372**).

2.4.1 La (5'S)-C-(1-(pent-3-ényl)-(4-(4-iodophénoxy)-méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine 355

Les thymidines substituées sur le carbone 5' ont été largement étudiées depuis 1996 où l'équipe de Wang[238] a décrit la synthèse de la (5*S*)'-allylthymidine par réaction de Sakuraï[239] de l'allyltriméthylsilane sur la 5'-thymidine aldéhyde.

En 1999, Escudier *et al.*[240] a décrit la synthèse de la (5*S*)'-C-(1-bromopent-3-ényl)-thymidine par réaction de Sakuraï du ω-bromo-allyltriméthysilane **348** sur l'aldéhyde **309** en présence d'éthérate de trifluorure de bore ($BF_3.Et_2O$). Le ω-bromo-allyltriméthysilane a été

[238] Wang G., Midleton P., *Tetrahedron Lett.* **1996***,* 37, 16, 2739.
[239] Hosomi, A.; Sakurai, H. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 1295.
[240] Banuls V., Escudier J.M., *Tetrahedron* **1999**, 55, 5831.

synthétisé en 3 étapes (Figure 144). Ainsi, l'alcool homoallylique **346** a d'abord été obtenu par ouverture de l'oxirane en présence du dérivé lithié de l'allyle triméthylsilane avec un rendement de 75%[241]. Le ω-bromo-allyltriméthysilane **348** a finalement été obtenu par tosylation de l'alcool **346** en présence de chlorure de tosyle suivi d'une substitution nucléophile du tosyle par du bromure de lithium avec un rendement de 82% sur les deux étapes[242].

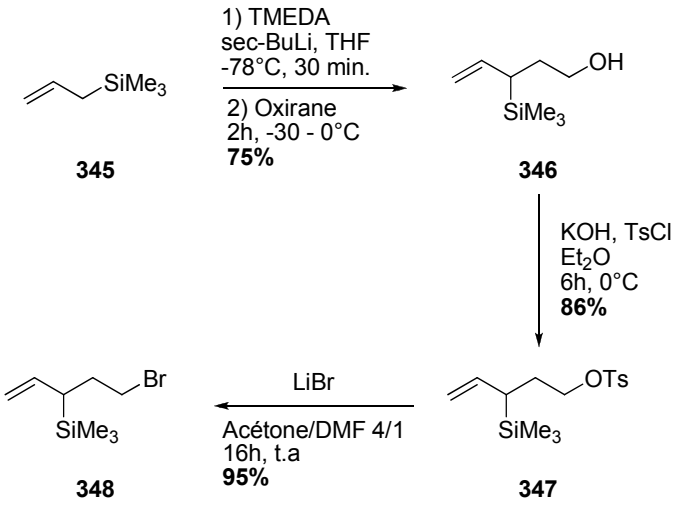


Figure 144: Synthèse du ω-bromoallyltriméthylsilane 348.

Au cours de la réaction de Sakuraï, le produit majoritaire n'est pas la (5*S*)'-C-(1-bromopent-3-ényl)-thymidine **(*S*)-349** mais le dérivé furanique **(*S*)-350** (Figure 145) obtenu par attaque de l'hydroxyle en 5' sur le cation silylé **(*S*)-351** formé intermédiairement[243] (Figure 146). Cependant, **(*S*)-350** a été instantanément converti en **(*S*)-349** en présence de $TiCl_4$ à 0°C[244] avec un rendement de 80% (Figure 145).

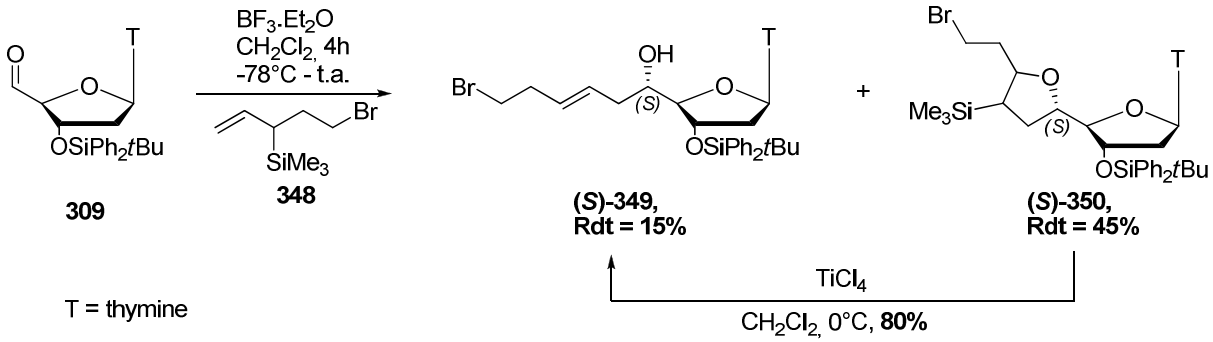


Figure 145: Formation des intermédiaires (*S*)-349 ET (*S*)-350 par réaction de Sakuraï sur l'aldéhyde 309.

Selon le modèle de Felkin-Anh, la double liaison attaque sur la face la moins encombrée expliquant l'obtention du seul isomère de configuration *S* (Figure 146). Ce diastéréocontrole est également accentué par la structure du sucre de type 3'-exo des nucléosides de la série ADN et

[241] Guyot B., Pornet J., Miginiac L., *J. Organomet. Chem.* **1989**, 373, 279.
[242] Thèse V. Banuls, Université Paul Sabatier, Toulouse, **1999**.
[243] Masse C.G., Panek J.S., *Chem. Rev.* **1995**, 95,1293
[244] Banuls V., Escudier J.M., Zedde C., Claparols C., Donnadieu B., Plaisancié H., *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4693.

la présence du groupement protecteur $SiPh_2tBu$. La double liaison est de configuration *E* ce qui est généralement observé lors des condensations avec les allyltriméthylsilanes.

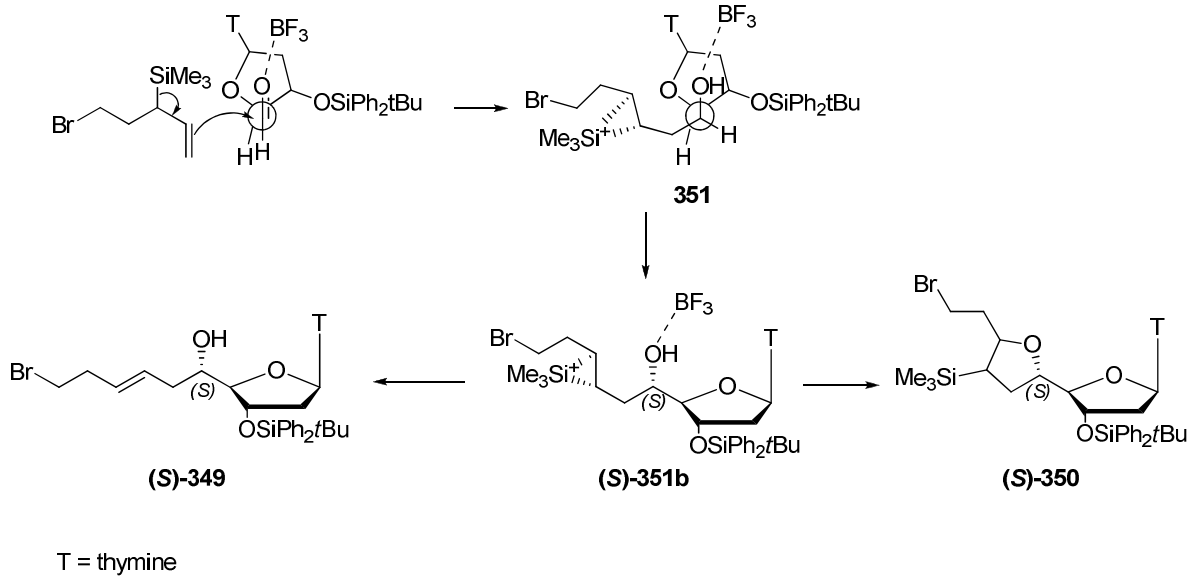


Figure 146: Modèle de Felkin-Anh de la condensation de 348 sur l'aldéhyde 309.

Le ω-bromoallyltriméthylsilane **348** a été préféré au dérivé tosylé **347** afin d'éviter la formation, minoritaire mais non négligeable (12%), du diastéréoisomère de configuration *R*[244]. L'oxygène peut attaquer le carbonyle sur la face *Si*, comme expliqué précédemment, pour former l'acétal **(*S*)-353**, puis le cation silylé **(*S*)-353** est formé par substitution nucléophile de la double liaison provoquant alors l'inversion de configuration du carbone en 5' (Figure 147).

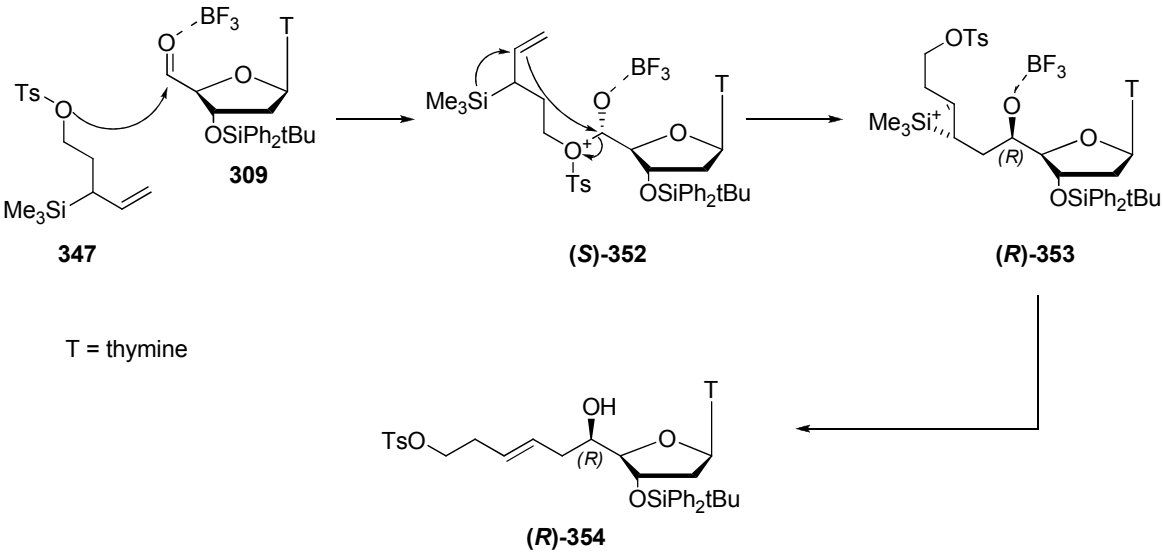


Figure 147: Formation du diastéréosimère de configuration *R* avec le dérivé tosylé 352.

Le dérivé bromé **(*S*)-349** a été ensuite converti en azoture **(*S*)-355** par substitution nucléophile du brome par l'azoture de sodium dans le DMF à 80°C avec un rendement de 95% (Figure 148).

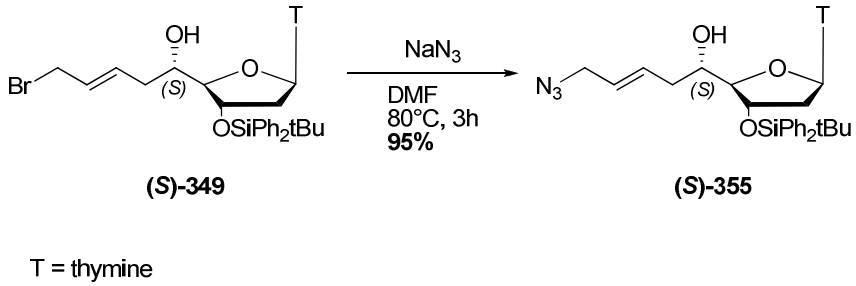


Figure 148: Synthèse de la 3'-*O*-TBPDS-(5'*S*)-C-(4-azidopent-2-ènyl)-thymidine (*S*)-355.

Parallèlement, la partie acétylénique a été obtenue par réaction du bromure de propargyle sur le 4-iodophénol en présence de carbonate de potassium dans les conditions de Williamson permettant d'accéder, sans purification, au synthon **356** avec un rendement de 97% (Figure 149)

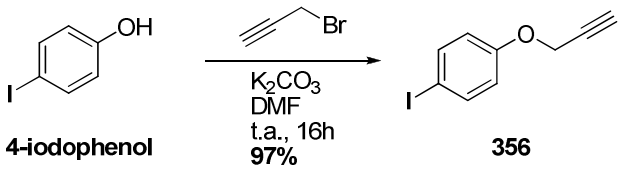


Figure 149: Synthèse du 1-iodo-4-(prop-2-ynyloxy)benzène 356.

Le triazole **(*S*)-357** a été ensuite préparé par réaction de chimie « click » entre **356** et **(*S*)-355** en utilisant le couple $CuSO_4$/ascorbate de sodium dans un mélange tBuOH/H_2O 3/1 avec un rendement de 89% (Figure 150).

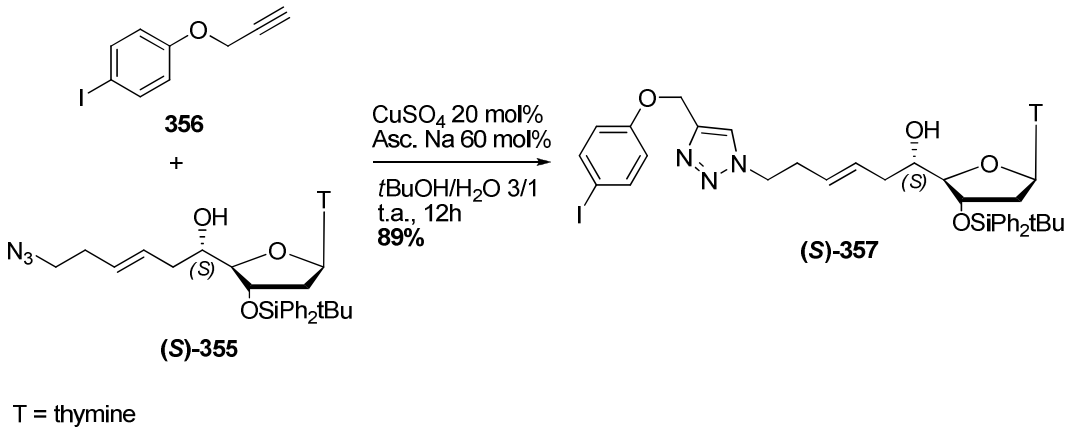


Figure 150: Synthèse du triazole (*S*)-357.

Enfin, la thymidine modifiée **(*S*)-358** a été obtenue par clivage de l'éther silylé en présence de NH_4F dans le méthanol avec un rendement de 86% (Figure 151).

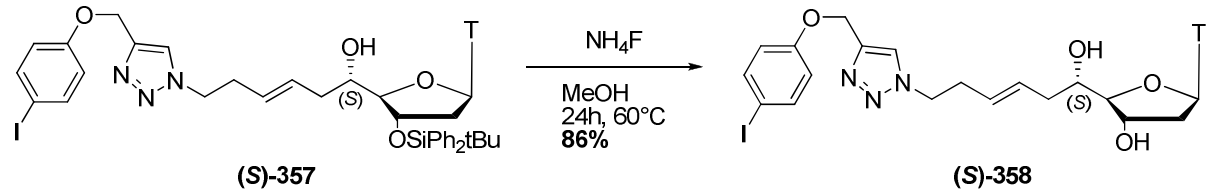


Figure 151: Déprotection du triazole (*S*)-357.

2.4.2 Les 5'-C-(1, 2, 3-triazol-4-yl)-thymidines

2.4.2.1 Introduction de la partie alcyne sur la thymidine :

Dans le but de diversifier les substrats pour la réaction de chimie « click », l'introduction de la triple liaison sur la thymidine a été envisagée. Pour cela, deux modes opératoires ont été envisagés. En effet, d'une part, en 2001, Sorensen *et al.*[245] a décrit la synthèse de la 5'-C-éthynyl-thymidine **359** par réaction du bromure d'éthynyl-magnésium sur l'aldéhyde **309** avec un rendement de 52% et un ratio de 1.6/1 en faveur de l'épimère de configuration *S*.

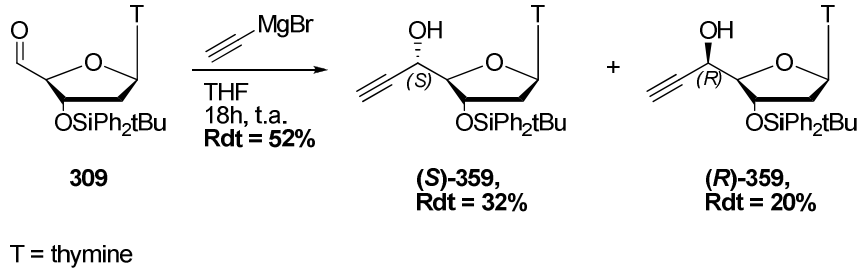


Figure 152: Synthèse de la 3'-*O*-TBDPS-5'-C-(éthynyl)-thymidine 359.

Par ailleurs, en 2008, Lolk *et al.*[246] a synthétisé la 5'-C-(propargyl)-thymydine **360** par réaction du bromure de propargyle sur la thymidine aldéhyde **309** en présence de poudre de zinc dans les conditions de Barbier[247], dans un mélange THF/NH_4Cl_{sat} 5/1, avec un rendement de 50% et un excès diastéréoisomérique de 16% en faveur de l'épimère de configuration *S* (Figure 153).

[245] Sorensen A.M., Nielsen K.E., Vogg B., Javobsen J.P., Nielsen P., *Tetrahedron* **2001**, 57, 10191.
[246] Lolk L., Pohlsgaard J., Jepsen A.S., Hansen L.H., Nielsen H., Steffansen S.I., Sparving L., Nielsen A.B., Vester B., Nielsen P., *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4957.
[247] Barbier P., *Compt. Rend.* **1899**, 128, 110.

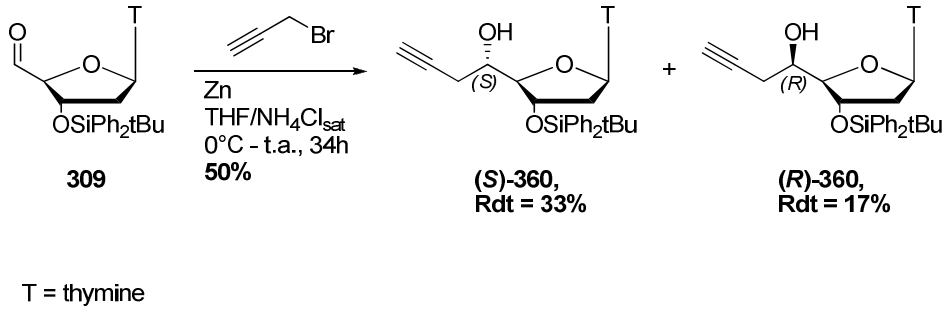
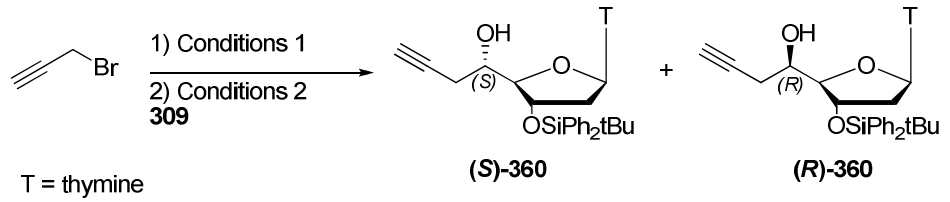


Figure 153: Synthèse de la 3'-*O*-TBDPS-5'-C-(propargyl)-thymidine 360

Le protocole expérimental décrit par les auteurs consiste à ajouter, à la solution contenant l'aldéhyde, la poudre de zinc et le bromure de propargyle en solution dans le toluène en deux séquences séparées de 12h et à agiter le milieu réactionnel 22h supplémentaires. La solution saturée de NH_4Cl est ajoutée lentement après la première addition.

La 5'-C-propragyl-thymidine **360** étant un intermédiaire clé de la stratégie envisagée, il a été nécessaire d'optimiser sa synthèse afin d'améliorer les rendements et diminuer le temps de réaction décrit précédemment. Pour cela, plusieurs conditions ont été testées (Tableau 5).



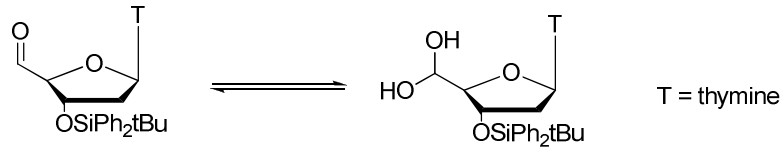
Entrée	Conditions 1	Conditions 2	Rdt (%)	Ratio *R/S*
1	Mg,I_2, THF, 45 min, t.a.	THF, 0°C, 12h	Pas de réaction	/
2	Mg, $HgCl_2$, THF, 3h, 0°C	THF, -78°C - 0°C, 12h	Pas de réaction	/
3	Mg, DIBAL-H, THF, 0°C	THF, 0°C, 12h	Pas de réaction	/
4	Mg, $ZnBr_2$, THF, 1h, 0°C	THF, 0°C, 12h	Pas de réaction	/
5	Couple Cu-Zn, 0°C, THF, 6h		Pas de réaction	/
6	Zn activé, THF/DMF 1/1, reflux 10 min puis t.a, 12h		60	30/70
7	Zn activé, THF/NH_4Cl 2/1, 10°C, 10h		67	30/70
8	Zn activé, THF, 10°C, 5 min		91	30/70

Tableau 5: Optimisation de la synthèse de la 5'-C-propargyl-thymidine 360.

L'addition du bromure de propargylmagnésium, préparé selon les conditions classiques[248], sur l'aldéhyde n'a pas permis la formation de l'alcool propargylique correspondant (Tableau 5, entrée **1**). Les résultats sont identiques lorsque le dérivé de Grignard est préparé en présence de magnésium activé par $HgCl_2$[249], le DIBAL-H[250] ou $ZnBr_2$[251] (Tableau 5, entrées **2** à **4**). De

[248] Viola A., MacMillan J.H., *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 6141.
[249] Commeiras L., Parrain J.L., *Tetrahedron : Asymmetry*, **2004**, 15, 509.
[250] Tilstam U., Weinmann H., Org. *Proc. Dev.* **2002**, 6, 906.

même, l'alcool propargylique n'a pu être obtenu en utilisant le couple Cu-Zn, préparé à partir de poudre de zinc et de chlorure de cuivre I en présence d'acide chlorhydrique, selon les conditions de Sezer[252] (Tableau 5, entrée **5**). Ces résultats peuvent être expliqués par l'équilibre qui existe entre la forme aldéhyde **309** et la forme hydrate **361** de la 5'-thymidine aldéhyde (Figure 154) qui hydrolyse le dérivé de Grignard.



309 **361**

Figure 154: Equilibre entre la forme aldéhyde 309 et la forme hydrate 361 de la 5'-thymidine aldéhyde.

Ces résultats ont donc confirmé la pertinence de la méthodologie mis au point par Lolk en formant l'alcool propargylique **360** par réaction « one pot » entre le bromure de propargyle et la thymidine aldéhyde en présence de poudre de zinc dans les conditions de Barbier. Contrairement à la réaction décrite par Grignard[253], l'utilisation de poudre de zinc permet de réaliser la réaction en présence d'eau.

Les conditions développées par Andrés *et al.*[254] (Tableau 5, entrée **6**) ont permis d'obtenir la propargylthymidine **360** avec un rendement de 60% et un excès diastéréoisomérique, déterminé par RMN du proton, de 40% en faveur de l'épimère de configuration *S*.

Le protocole de Lolk a été simplifié en utilisant les conditions expérimentales développées par Chattopadhyay[255] en 1996 (Tableau 5, entrée **7**). Le zinc et le bromure de propargyle sont ajoutés lentement en une fois à une solution contenant **309** puis la solution saturée de NH_4Cl est lentement additionnée ce qui permet de réduire le temps de réaction de 34h à 10h. De plus, la température de la réaction est maintenue à 10°C (au lieu de t.a.) diminuant la formation d'impuretés et permettant donc d'augmenter le rendement de 50 à 67% et l'excès diastéréoisomérique de 16 à 40%.

Le suivi réactionnel par CCM réalisé après l'ajout du bromure de propargyle montre la consommation immédiate de l'aldéhyde. Cette observation expérimentale a permis d'optimiser le protocole de Chattopadhyay en supprimant l'ajout de NH_4Cl et de diminuer considérablement le temps de réaction. L'alcool **360** a alors été obtenu sans purification avec un rendement de 91% (Tableau 5, entrée **8**). Ces conditions ont permis de réaliser la synthèse de l'alcool **360** à partir de 10 g de l'aldéhyde **309**.

[251] Acharya H., Miyoshi K., Kobayashi Y., *Org. Lett.* **2007**, 9, 18, 3535.
[252] Sezer S., Özdemirhan D., Sahin E., Tanyeli C., *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 2981.
[253] Grignard V., *Compt. Rend*. **1900***,* 130, 1322–1325
[254] Andrés J.M., Pedrosa R., Perez-Encabo A., Ramirez M., *Tetrahedron* **2006**, 62, 7783
[255] Chattopadhyay A., *J. Org. Chem*. **1996**, 61, 6104.

2.4.2.2 Synthèse des partenaires azotures

Afin de disposer de plusieurs thymidines modifiées comportant des bras espaceurs de longueur différentes, deux synthons azotures ont été synthétisés. D'une part, l'azoture **362** a été obtenu par réaction de l'azoture de diphénylphosphoryle (DPPA) sur l'alcool 4-iodobenzylique en présence de diazabicycloundécène (DBU) selon le protocole décrit par Thompson[256] avec un rendement de 90% (Figure 155).

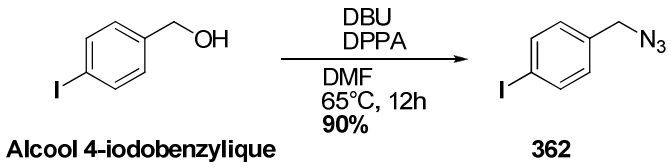


Figure 155: Synthèse de l'azoture 362

Ce protocole est une alternative très efficace à la réaction de Mitsunobu. L'étape finale est la substitution nucléophile du phosphate du 4-iodobenzyldiphényle **364**, obtenu *in-situ* par réaction du DPPA avec l'alcool 4-iodobenzylique en présence de DBU, par l'azoture d'iminium **365** conduisant à l'azoture **362** (Figure 156).

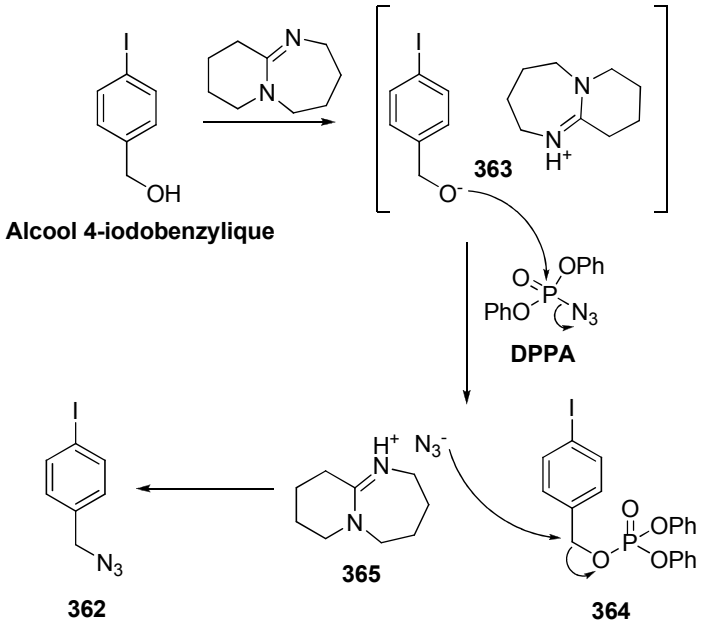


Figure 156: Mécanisme de la formation d'azoture en présence de DPPA et de DBU.

Par ailleurs, cette réaction a également été utilisée sur le 2-(2-(4-iodophénoxy)éthoxy)éthanol **367**, avec un rendement de 83%, préparé en deux étapes à partir du diéthylène glycol. Tout d'abord l'éthylène glycol a été monotosylé, en utilisant le protocole de Bouzide[257], en présence d'oxyde d'argent (I) et une quantité catalytique d'iodure de potassium avec un rendement de 70 %. Puis le groupement tosylate a été déplacé par

[256] Thompson A.S., Humphrey G.R., DeMarco A.M., Mathre D.J., Grabowski E.J.J., *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5886.
[257] Bouzide A., Sauvé G., *Org. Lett.* **2002**, 4, 14, 2329.

substitution nucléophile du 4-iodophénol en présence de carbonate de potassium avec un rendement de 63% (Figure 157).

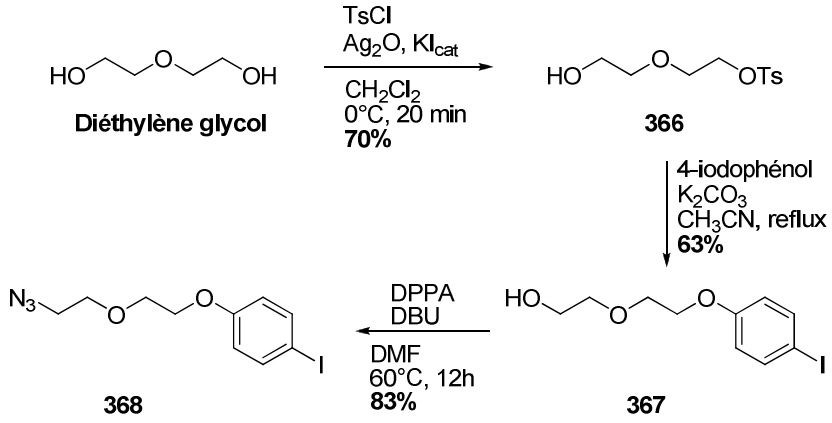


Figure 157: Synthèse de l'azoture de 1-(2-(2-éthoxy)éthoxy)-4-iodobenzyle 368.

2.4.2.3 Formation des 5'-C-(1, 2, 3-triazol-4-yl)-thymidines

Une fois les différents partenaires azotures synthétisés, la cyclisation par chimie « click » a été réalisée en présence de 20 mol% de $CuSO_4$, 60 mol% d'ascorbate de sodium dans un mélange tBuOH/H_2O 3/1 permettant d'accéder aux triazoles **369** et **370** avec des rendements respectifs de 84 et 80% (Figure 158).

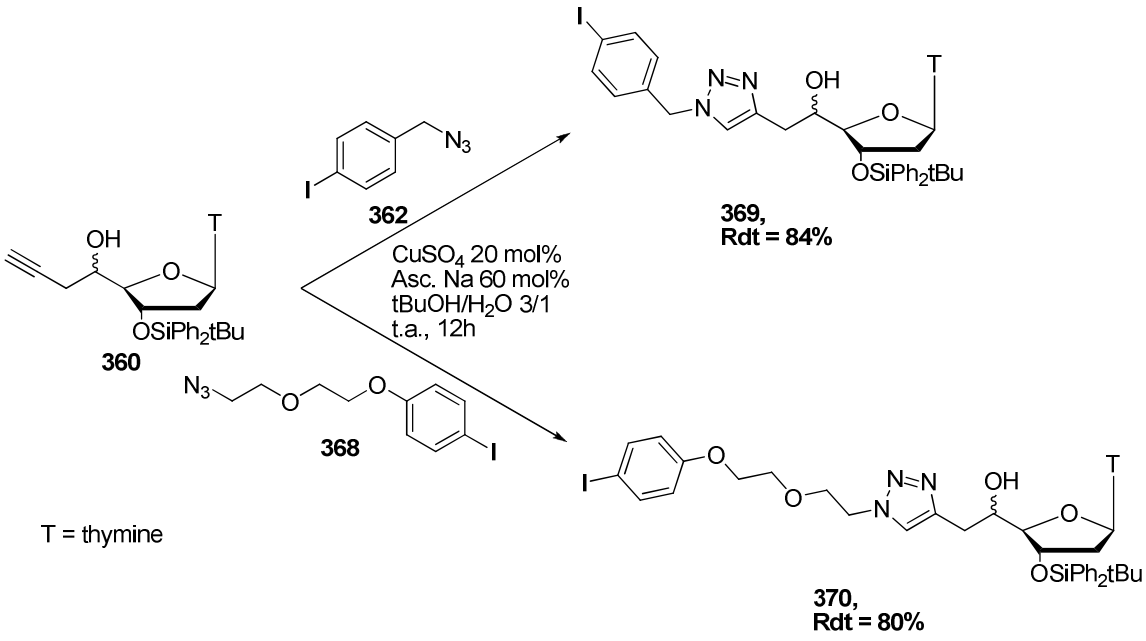


Figure 158: Synthèse des 5'-C-(1, 2, 3-triazol-4-yl)-thymidines 369 et 370 par chimie "click".

Les précurseurs pour la méthylation, **371** et **372**, ont finalement été obtenus par clivage de l'éther silylé en 3' en présence de NH_4F dans le méthanol avec des rendements respectifs de 85% et 79% (Figure 159).

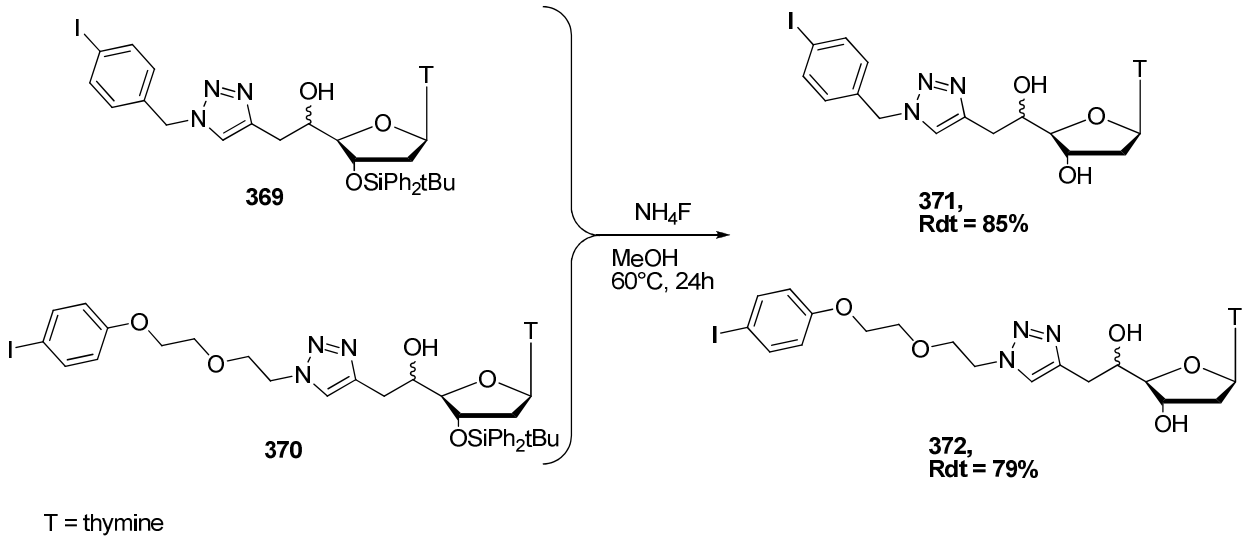


Figure 159: Déprotection des 5'-C-(1, 2, 3-triazol-4-yl)-thymidines 369 et 370.

2.5 Conclusion

Dans ce paragraphe, différentes méthodes ont été efficacement utilisées pour introduire un groupement iodoaryle permettant de diversifier la nature de la connexion entre le groupement iodoaryle et le nucléoside ainsi que la nature de la nature du nucléoside. Ainsi, ont pu être synthétisées :

- Les adénosines phosphorothioester (**292** -**294**)
- Les carboxamido-adénosines (**304** - **305**)
- Les carboxamido-thymidines (**355**)
- Les triazolyl-thymidines (**358**, **371**, **372**)

De plus, les thymidines modifiées ont pu être synthétisés à partir d'un intermédiaire commun, la thymidine aldéhyde, permettant d'accéder efficacement soit à la fonction acide nécessaire au couplage peptidique soit aux partenaires azotures et acétyléniques utilisés lors des réactions de chimie « click » (Figure 160). Ces partenaires ont pu être synthétisés de manière à garder disponibles les alcools en 3' et 5' afin d'incorporer les triazoles correspondants à n'importe quel endroit dans une séquence d'oligonucléotide.

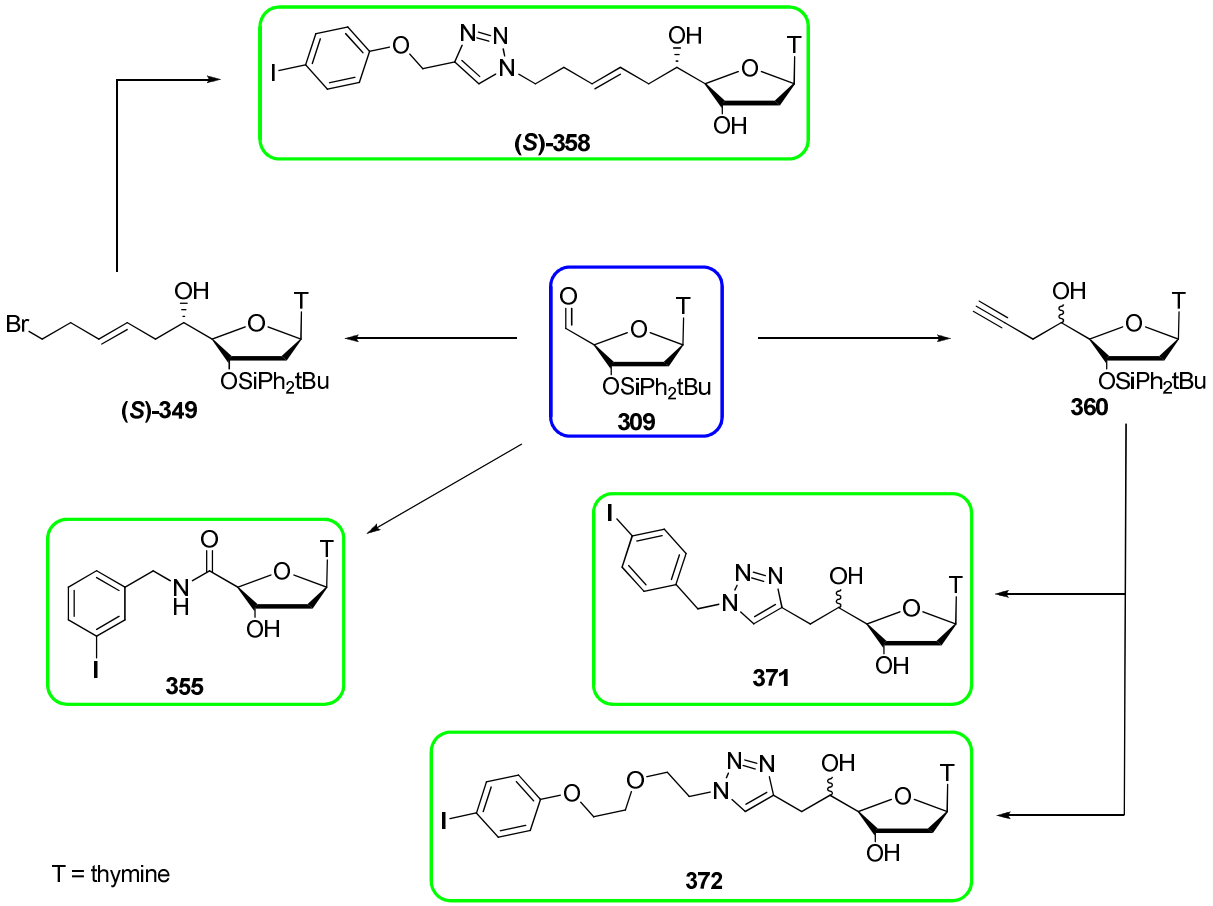


Figure 160: Schéma général de la synthèse des thymidines modifiées à partir de la thymidine aldéhyde 309.

3 Etude du transfert de méthyle sur les nucléosides modifiés

3.1 Généralités

3.1.1 Le couplage de Stille

Le couplage pallado-catalysé a été introduit pour la première fois par Stille en 1978[258]. Il met en jeu un halogénure d'alkyle, d'aryle ou de vinyle et un organotrialkylétain selon le cycle catalytique généralement décomposé en 4 étapes (Figure 161) :

1. L'addition oxydante de l'électrophile **373** sur le complexe de palladium(0). Le palladium est ainsi oxydé en palladium(II).

2. La transmétallation du groupement R' entre le complexe $RPdL_2X$ **374** et le dérivé organostannique R'SnR" **375**. C'est généralement l'étape limitante du cycle catalytique. Des études ont montré que les groupements aryles ou vinyles se

[258] Milstein D., Stille J. K., *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3636.

transmétallaient 200 à 1000 fois plus vite que les groupements alkyles[259]. Afin d'éviter la transmétallation du groupement R", les groupements méthyle, éthyle ou butyle sont utilisés.

3. En l'absence de ligands bidentates chélatants, les deux groupements R et R' sont en position *trans* dans le complexe de palladium. Une isomérisation *trans*/*cis* est donc nécessaire. Cette isomérisation va également permettre l'élimination réductrice du palladium.

4. Cette élimination peut être réalisée selon 3 mécanismes dissociatif[260] (formation intermédiaire d'un complexe en Y ou en T), non-dissociatif[261] (échanges de groupes organiques entre le palladium et l'organométallique) et associatif[262] (formation d'un intermédiaire palladié de degré d'oxydation +IV par addition oxydante d'un deuxième équivalent de l'électrophile R'X sur le diorganopalladium(II) PdL_2RR' **378**).

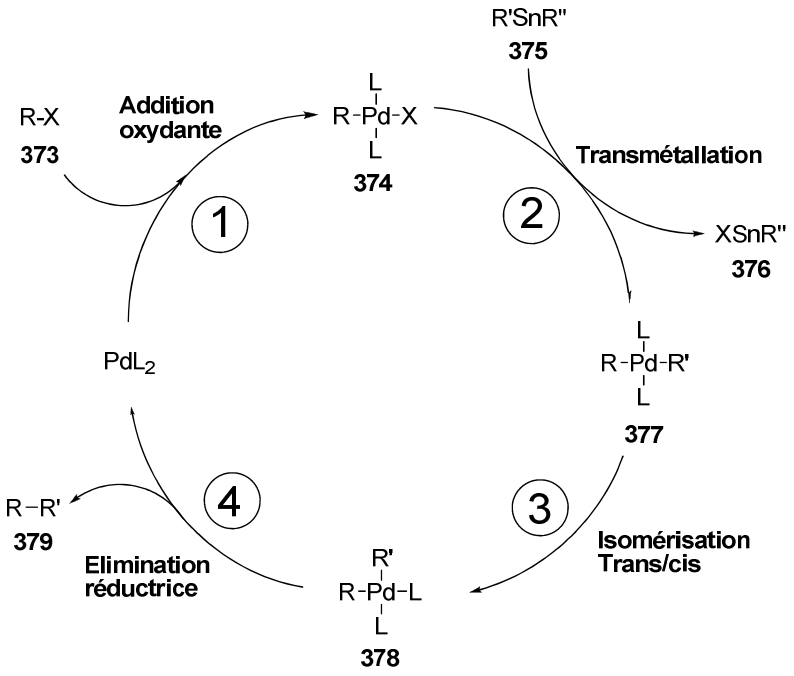
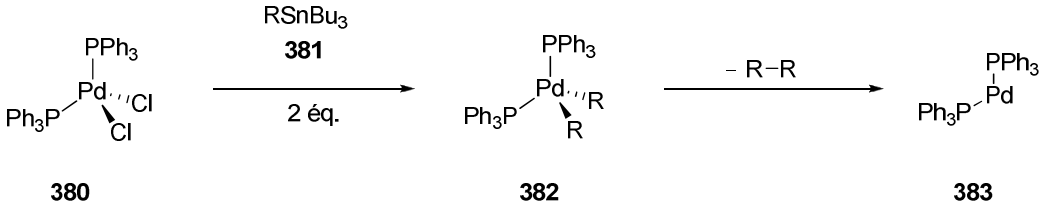


Figure 161: Mécanisme original du couplage de Stille.

L'espèce catalytique active, PdL_2, est obtenue par dissociation équilibrée d'un précatalyseur de type PdL_4[263] ou par réduction *in-situ* d'un complexe de type PdL_2X_2. En effet, les précatalyseurs comme le chlorure de (bis(triphénylphosphine)palladium (II) **380** permettent de générer le catalyseur actif **383** par homocouplage de deux organoétains **381** (Figure 162). Cependant la

[259] Cardin C.J., Cardin D.J., Lappert M.F., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1977**, 767.
[260] Stang P.J., Kowalski M.H., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 3356.
[261] Ozawa F., Kurihara K., Fujimori M., Hidaka T., Toyoshima T.,Yamamoto A., *Organometallics*, **1989**, 8, 180.
[262] Moravskiy A., Stille J.K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 4182.
[263] Fauvarque J.F., Pfluger F., Troupel M., *J. Organomet. Chem.* **1981**, 208, 419.

mise au point de conditions de méthylation par couplage de Stille compatibles avec la courte durée de vie du carbone 11 impose l'utilisation un précatalyseur composé de palladium (0) car l'approche où $^{11}CH_3$ est porté par l'organoétain est incompatible avec l'utilisation de catalyseurs de type PdL_2X_2



380 **382** **383**

Figure 162: formation du catalyseur actif à partir du précatalyseur $Pd(PPh_3)Cl_2$.

Le tris(dibenzylidène)acétonedipalladium(0) (Pd_2dba_3) est le préacatalyseur de choix en chimie du carbone 11. Il permet la formation du catalyseur actif, le bis-(dibenzylidène)-acétone-palladium(0) ($Pddba_2$).

Le principal avantage du couplage de Stille est sa tolérance vis-à-vis des fonctionnalités présentes sur le substrat (amines, amides, nitriles, alcools, carbonyles, acides carboxyliques …). Ceci permet un gain de temps considérable dans les synthèses en évitant les réactions de protections et déprotections. Bien qu'ils soient largement utilisés, la toxicité des organotrialkylétains pose un réel problème et limite son utilisation pour la radiosynthèse de molécules utilisables sur l'homme.

3.1.2 Couplage de Stille modifié

3.1.2.1 En chimie du ^{12}C

En 2006, l'équipe du Pr. Fouquet a montré que le difluoromonométhylstannate **146**, obtenu par activation du iodomonométhylstannane **384**, permet le transfert de groupement méthyle sur les halogénures d'aryles en présence de Pd_2dba_3 dans des conditions rapides compatibles avec la chimie du ^{11}C[264].

[264] Huiban M., Huet H., Barré L., Sobrio F., Fouquet E., Perrio C., *Chem. Commun.* **2006**, 97.

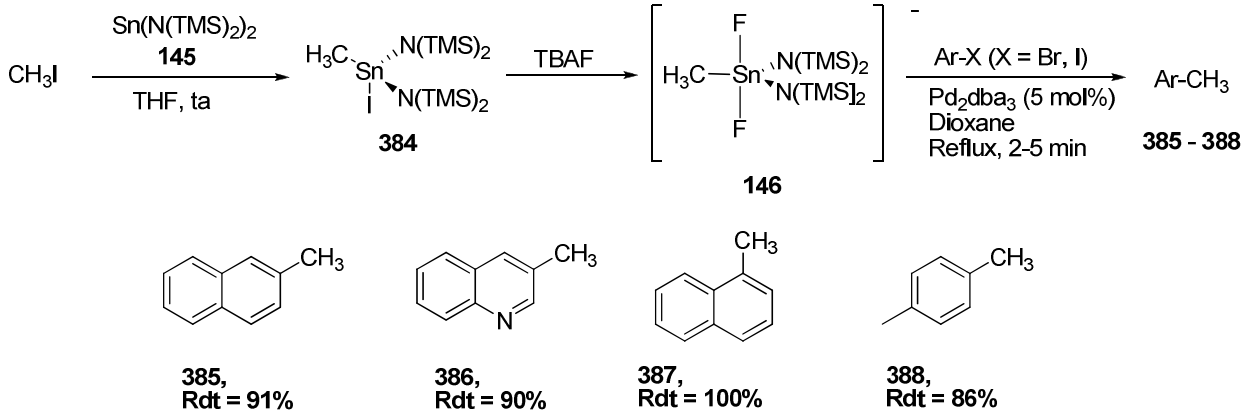


Figure 163: Exemples de couplage de Stille modifié entre CH_3I et des haloaryles.

Cette réaction se déroule selon un cycle catalytique pouvant être décomposé en 4 étapes (Figure 164). Tout d'abord le iodomonométhylstannane **384** est obtenu par addition oxydante d'iodure de méthyle sur le stannylène de Lappert **145** (1). Le iodomonométhylstannane est ensuite activé par deux équivalents de fluorure provenant du TBAF pour former le difluorostannate **146** (2) qui joue le rôle d'électrophile accélérant ainsi l'étape de transmétallation, étape limitante, du couplage de Stille classique (3). Le couplage de Stille modifié utilise un équivalent supplémentaire de fluorure afin de générer, en fin de réaction, le triflurostannate **392** facilement éliminé par purification (4).

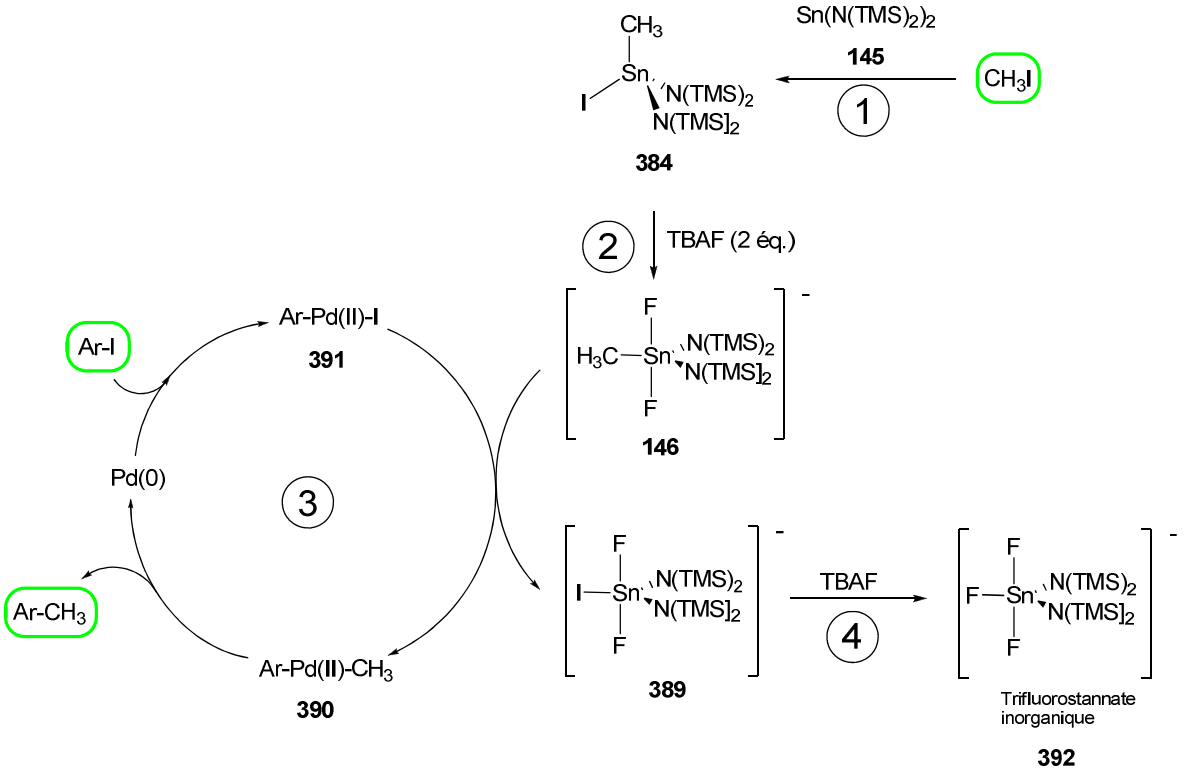


Figure 164: cycle catalytique du couplage de Stille modifié.

En vue d'une application en chimie du ^{11}C, le couplage de Stille modifié impose l'utilisation de précatalyseur composé de Palladium 0 afin de ne pas surconsommer le $^{11}CH_3I$ présent généralement en large défaut par rapport au catalyseur.

Le couplage de Stille modifié conserve la tolérance du couplage de Stille classique vis-à-vis des mêmes fonctionnalités mais rend possible le transfert d'alkyle, en particulier de méthyle, dans des conditions rapides transposables en chimie du ^{11}C. De plus, l'utilisation et la formation de dérivés stannylés non toxiques en fait une alternative attractive en vue de la synthèse de molécules utilisables chez l'homme. Enfin, la disponibilité commerciale de différents iodo-aryles permet d'accéder plus rapidement au précurseur désiré.

3.1.2.2 En chimie du ^{11}C

La méthylation par couplage de Stille modifié a été transposée en chimie du ^{11}C par l'équipe du Dr. Cécile Perrio au Centre Cyceron de l'Université de Normandie. Le [^{11}C]-monométhylstannate a été obtenu en trois minutes en ajoutant le TBAF à une solution de [^{11}C]-monométhylétain obtenu en piégeant le $^{11}CH_3I$ gazeux dans une solution contenant 10 à 20 mg de stannylène de Lappert. Après évaporation du THF, une solution de dioxane contenant 10 à 15 mg de précurseur et 5 mg de Pd_2dba_3 ont été ajoutés. La réaction de couplage a ensuite été réalisée à 120 °C en 5 min.

Ce protocole a été utilisé avec succès pour réaliser la radiosynthèse de différentes molécules modèles[145] et de deux ligands des récepteurs NK_3[146] avec de bons RRC (voir paragraphe 1.2.2.3).

Ces résultats prometteurs nous ont ainsi conduits à envisager d'appliquer cette méthodologie au transfert de méthyle sur d'autres substrats tels que les nucléosides et oligonucléotides.

3.2 Les phosphorothioesters

Les premiers essais ont été réalisés sur les phosphorothioesters **292** - **294** en suivant le protocole expérimental décrit initialement sur les ligands des récepteurs NK_3[146]. La réaction de couplage a été réalisée dans le dioxane à 110°C pendant 10 min en présence de 5 mol% de Pd_2dba_3 et de 1.3 équivalents de monoorganostannate **146**, généré séparément par addition de 3 équivalents de TBAF à une solution de monoorganostannane **384** dans le THF.

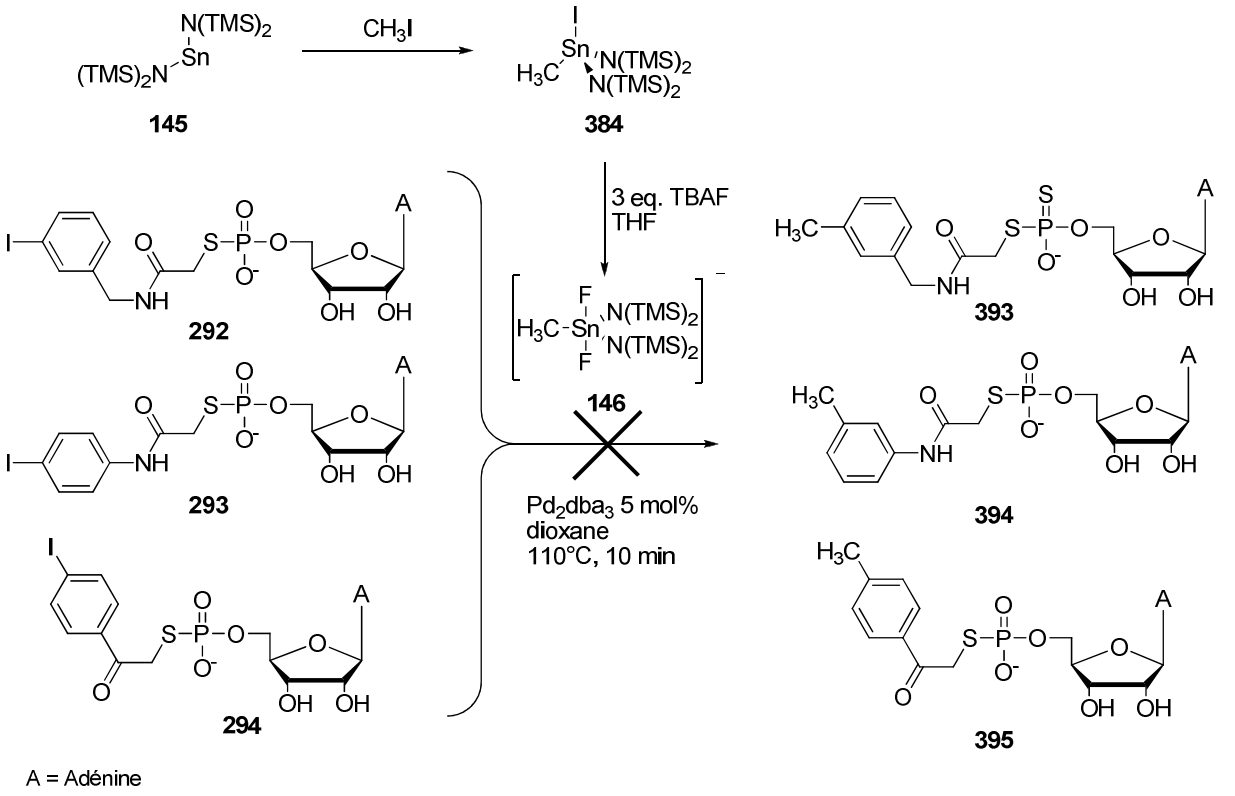


Figure 165: Méthylation des phosphorothioesters 292 - 294

Le suivi réactionnel par HPLC en phase inverse montre que les produits de départ ne sont pas convertis. La même expérience a été répétée en allongeant le temps de réaction à 1h et 2h, conduisant à des résultats identiques. Compte tenu de cela, nous avons cherché à adapter les conditions de couplage en étudiant l'influence de différents paramètres :

- La nature du solvant
- La température de réaction
- La présence de ligands

3.2.1 Choix du solvant de réaction

Les résultats négatifs obtenus en utilisant les conditions initiales peuvent s'expliquer en partie par la mauvaise solubilité des phosphorothioates dans le dioxane. Afin d'étudier l'influence du solvant sur la conversion du phosphorothioate de départ, la méthylation a été réalisée dans le DMF, la NMP et l'eau qui solubilisent entièrement le produit de départ. Cependant, là encore, aucune conversion n'a été observée et ceci quelque soit le solvant utilisé. Toutefois le DMF a été choisi pour la suite de l'étude car il a été largement décrit dans la plupart des réactions de [^{11}C]-méthylation par couplage de Stille. L'utilisation de ce solvant implique de considérer l'hypothèse selon laquelle une molécule de DMF pourrait s'échanger avec un ligand du complexe de palladium (II) **397**, issu de l'adition oxydante du dérivé halogéné

sur le complexe de palladium(0) selon un équilibre (Figure 166) et augmenter l'efficacité du cycle catalytique.

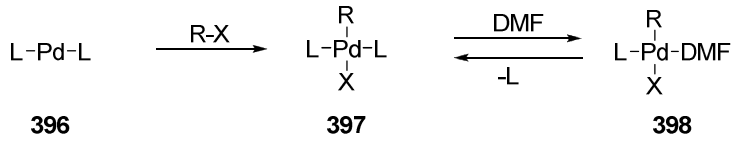
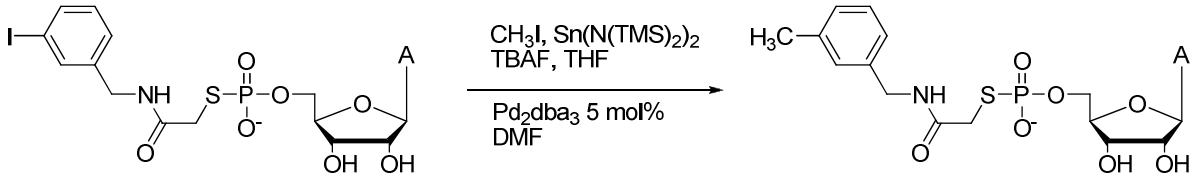


Figure 166: Entrée du DMF dans la sphère de coordination du palladium.

3.2.2 Influence de la température

Afin de déterminer la température optimale de réaction, le transfert de méthyle a été réalisé à 60, 80, 100 et 130°C sur le phosphorothioester **292** (Tableau 6).



A = adénine

Entrée	T (°C)	t (min)	Ratio HPLC 292 / 393 (%)
1	60	10	100/0
		60	100/0
2	80	10	100/0
		60	100/0
3	100	15	99.4/0.6
		90	Dégradation
4	130	10	Dégradation

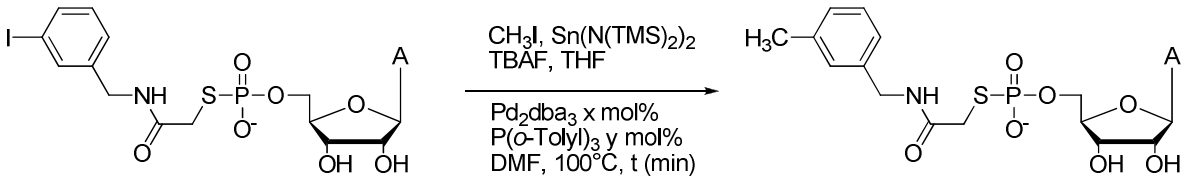
Tableau 6: Influence de la température

Les transferts de méthyle à 60°C et 80°C ne permettent pas la formation du produit souhaité même après une heure de réaction. Seule, une faible conversion a été obtenue lorsque la réaction est conduite à 100°C pendant 10 min mais le substrat de départ se dégrade rapidement quand la réaction est prolongée. Cette instabilité thermique est également présente et plus rapide à 130°C. Elle peut être expliquée par la rupture de liaison carbone soufre mais aussi par la présence du groupement hydroxyle en 2' qui diminue la stabilité thermique des nucléosides.

3.2.3 Influence du ligand

Le couple Pd_2dba_3/P(*o*-Tolyl)$_3$ est le système le plus utilisé dans les réactions de [^{11}C]-méthylation par couplage de Stille décrites dans la littérature et plus particulièrement dans la radiosynthèse de la [^{11}C]-FMAU[198]. Le catalyseur actif Pd(P(*o*-Tolyl)$_3$)$_2$ est formé *in-situ* à partir du Pd_2dba_3 et de 2 équivalents de P(*o*-Tolyl)$_3$ par atome de palladium. Ce ligand a la particularité de posséder un angle de cône de 194° et une basicité comparable à celle de la tripénylphosphine PPh_3 permettant une addition oxydante plus rapide ainsi qu'une diminution de la contrainte stérique lors de l'étape de transmétallation. Il est cependant nécessaire de respecter un ratio Pd/ligand de 1/2 car un excès de ligand défavorise la formation de l'espèce catalytique solvatée plus active dans l'étape de transmétallation[265].

Le système Pd_2dba_3/P(*o*-Tolyl)$_3$ dans un ratio 1/4 a donc été envisagé pour le couplage de Stille modifié sur le phosphorothioate *S*-iodobenzylacétamide **292**. Deux essais ont été réalisés à 100°C dans le DMF en présence de 5 mol% et un essai en utilisant 10 mol% de Pd_2dba_3 (Tableau 7).



292 **393**

A = adénine

x (mol%)	y (mol%)	t (min)	ratio HPLC 292/393 (%)
5	0	15	99.4/0.6
		90	Dégradation
5	20	15	98/2
		30	Dégradation
10	40	20	93/3
		120	95/5

Tableau 7: Etude de l'influence du ligand P(*o*-Tolyl)$_3$.

L'utilisation de 5 mol% de catalyseur et 20 mol% de P(o-Tolyl)$_3$ permet de former 2 % de produit en 15 min mais le substrat et le produit de couplage se dégradent rapidement au bout de 30 min. L'augmentation de la charge de catalyseur (10%) et de phosphine (40%) ralentit la dégradation du substrat puisque 5% du produit **393** sont obtenus en 2h à 100°C.

Au vue de ces résultats, démontrant la fragilité de ce type de substrat à la fois au niveau du sucre et du lien, l'étude de la méthylation sur les autres phosphorothioesters, **293** et **294**, n'a

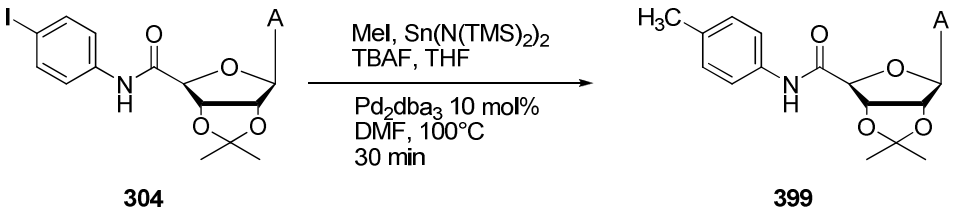
[265] Farina V., Kupadia S., Kishnan B., Wand C., Liebeskind L.S., *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 5905.

pas été entreprise. Nous avons donc envisagé le transfert de méthyle sur des nucléosides amides protégé en 2' ou de la série 2'-désoxy.

3.3 Les amides

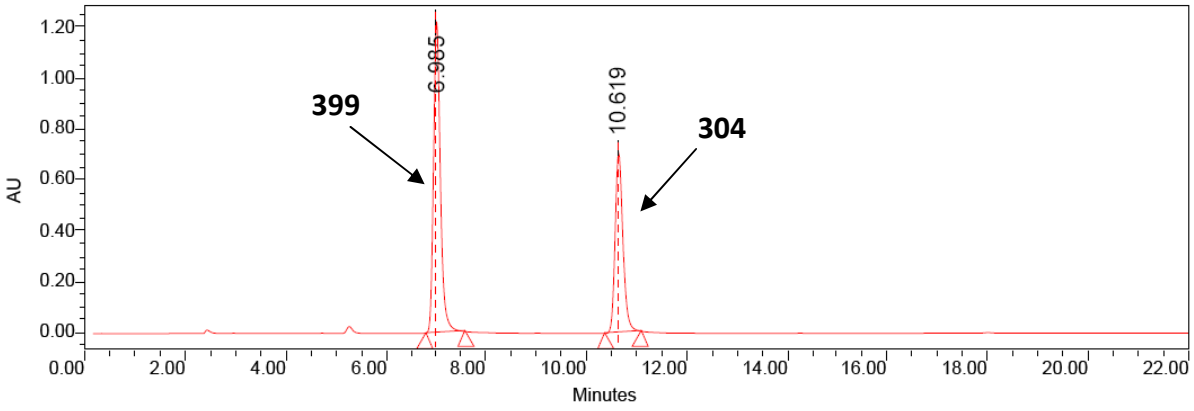
3.3.1 Les 5'-(N-carboxamido)-adénosines 304 et 305

Ainsi, l'utilisation des conditions décrites précédemment pour la méthylation des phosphorothioates (10 mol% de Pd_2dba_3, 40 mol% de $P(o\text{-}Toyl)_3$) ne permet qu'une faible conversion (2%). Cependant en absence de ligand, un seul produit a été observé après 30 min de réaction avec une conversion de 97%. Les chromatogrammes HPLC montrent que ce produit correspond bien au produit méthylé **399**, synthétisé par ailleurs à partir de la 4-méthylaniline en utilisant la même voie de synthèse avec un rendement de 84 % (Figure 167). L'absence de ligand est toujours appréciable en vue de l'application à la radiosynthèse, facilitant ainsi les étapes de purification.



304 **399**

A = adénine



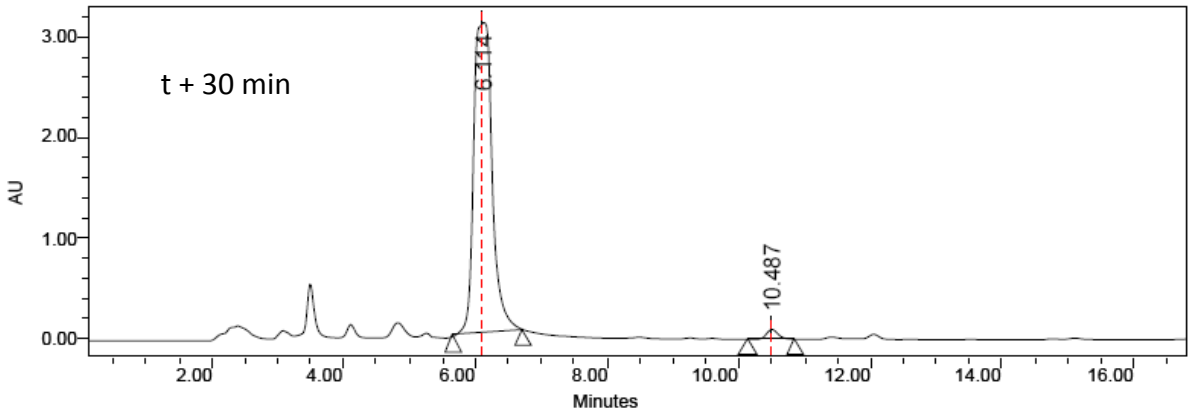
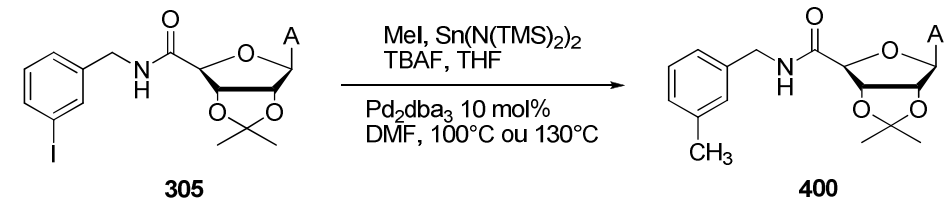


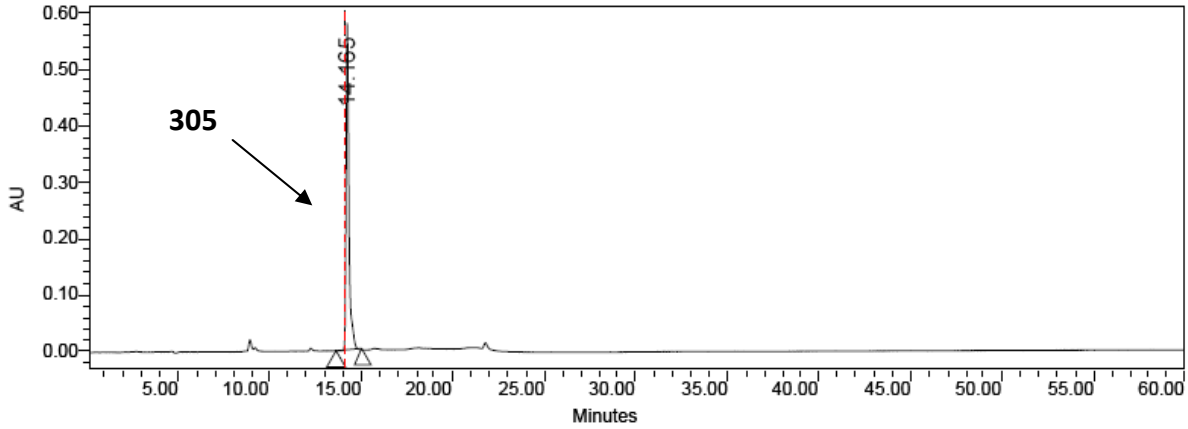
Figure 167: Chromatogramme obtenu lors de l'étude du transfert de méthyle sur 304

L'amide **305** étant l'homologue benzylique du composé **304**, la méthylation a été réalisée dans les mêmes conditions, permettant cette fois-ci une conversion totale en 15 minutes. Afin d'accélérer la cinétique réactionnelle, la réaction a été conduite à 130°C avec un taux de conversion de 100% en 2 minutes en obtenant un seul produit (Figure 168).



305 **400**

A = adénine



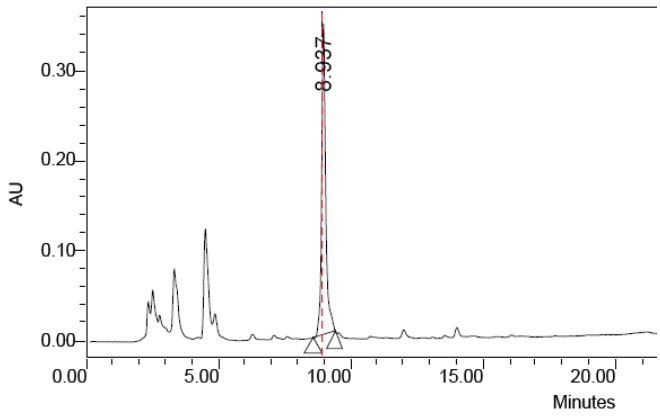


Figure 168: Chrommatogramme obtenu lors de la méthylation de 326 à 100°C.

Cependant, les études RMN du proton et du carbone de la fraction isolée par HPLC semi-préparative montrent que le produit formé n'est pas le produit désiré. Bien que le produit isolé n'ait pu être identifié avec certitude, il ne contient plus le groupement 2',3'-*O*-isopropilydène et la partie iodoaryle n'a pas subit de méthylation. Cette conclusion a été confirmée par l'analyse HPLC du témoin **400** synthétisé à partir de la 3-méthylbenzylamine avec un rendement de 52% selon la même voie de synthèse (Figure 169).

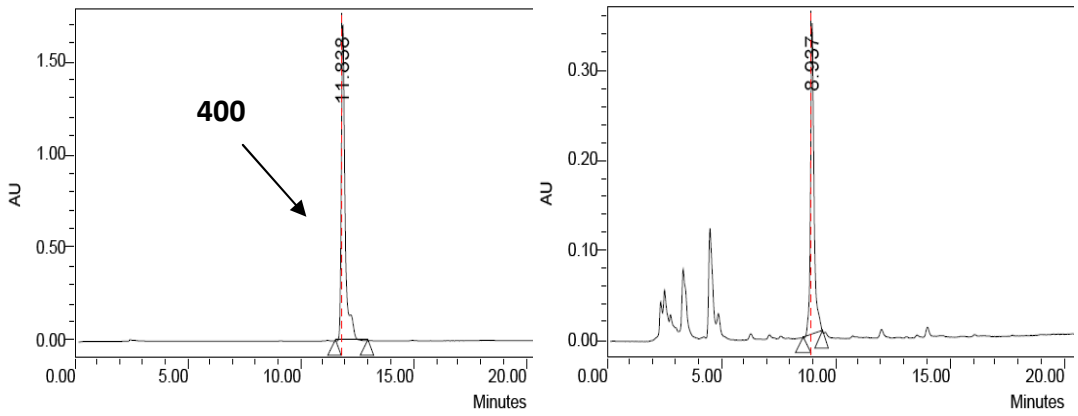


Figure 169: Chromatogramme du produit témoin 400 (à gauche) et lors de la méthylation de 326 (à droite).

3.3.2 La 5'-(*N*-(4-iodobenzyl)-carboxyamido)-thymidine 332

Afin de mettre au point une méthode de suivi réactionnel par HPLC, la 5'-(*N*-(3-méthyl-benzyl)-carboxamido)-thymidine **402** (Figure 170) a été synthétisée à partir de la 3-méthylbenzylamine avec en rendement de 69% sur deux étapes (Figure 171, Figure 172).

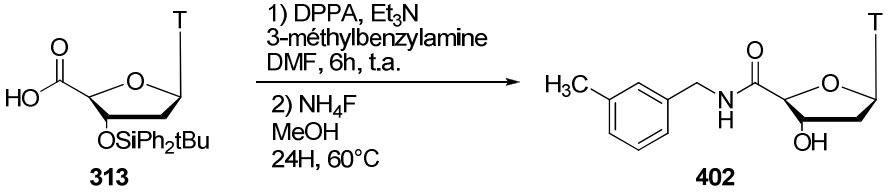


Figure 170: Synthèse du témoin 402

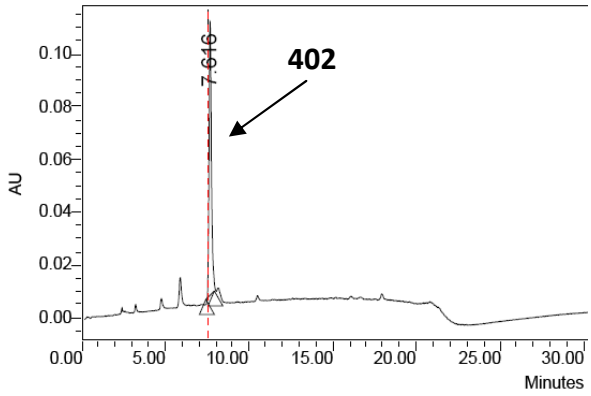


Figure 171: Chrommatogramme HPLC de la 5'-(*N*-(3-méthylbenzyl)carboxamido)-thymidine 402.

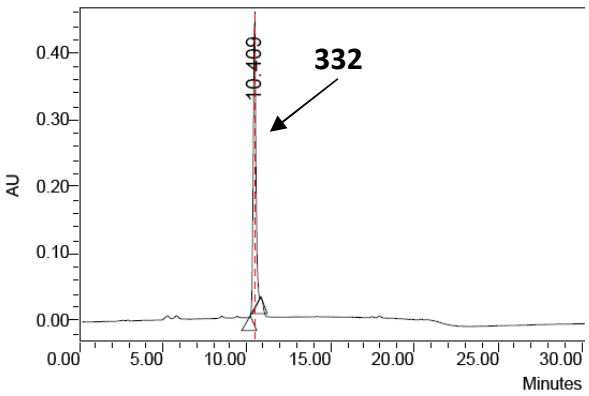


Figure 172: Chrommatogramme HPLC de la 5'-(*N*-(3-iodobenzyl)carboxamido)-thymidine 332.

L'étude de la méthylation par couplage de Stille modifié a ensuite été réalisée dans les conditions précédemment décrites pour la méthylation des analogues adénosines **304** et **305** (Tableau 8, entrées **1** à **3**). Dans ce cas, le produit méthylé **402** se forme mais le suivi réactionnel par HPLC a mis en évidence la formation d'un produit secondaire. L'analyse par spectroscopie de masse a révélé que le produit formé est la 5'-(*N*-benzyl-carboxamido)-thymidine **403** obtenue par hydrodéhalogénation de la 5'-(*N*-(3-iodobenzyl)-carboxamido)-thymidine **332**.

La réaction d'hydrodéhalogénation peut s'expliquer en se basant sur les travaux de Zawisza[266]. Le produit **405** formé par addition oxydante du palladium dans la liaison carbone halogène de l'haloaryle **404** pourrait réagir avec la diméthylamine **406**, obtenue par réaction d'une base comme le TBAF sur le DMF. L'élimination réductrice permettrait de former le complexe d'hydridopalladium **408** qui permettrait la formation du produit d'hydrodéhalogénation **409** (Figure 173). D'après Zawisa, la réaction d'hydrodéhalogénation est favorisée à haute température et en présence de ligand phosphine tel que P(*t*Bu)3.

[266] Zawisza A.M., Muzart J., *Tetrahedron. Lett.* **2007**, 48, 6738.

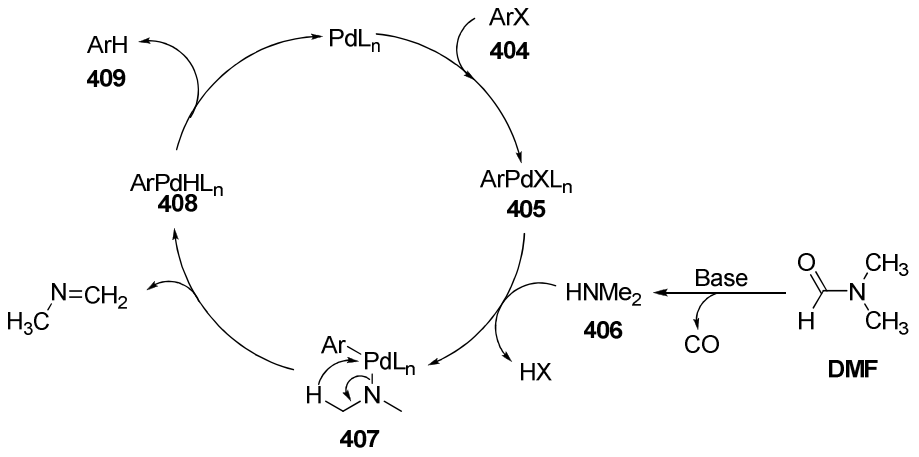
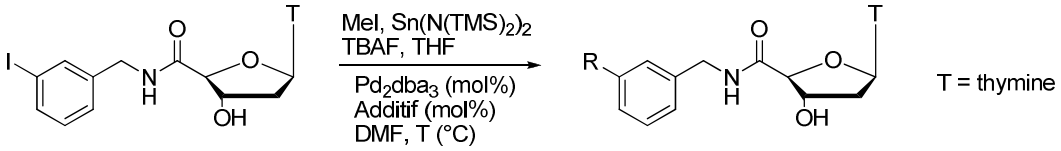


Figure 173: Cycle catalytique de la réaction d'hydrodéhalogénation.

Après 10 minutes de réaction, le taux de conversion n'a été que de 58% avec un ratio intéressant de 86/14, déterminé par HPLC, en faveur du produit méthylé (Tableau 8, entrée **1**). Un taux de conversion de 100 % nécessite un temps de réaction de 20 minutes ce qui reste compatible avec la chimie du ^{11}C mais favorise la formation du produit déhalogéné (Tableau 8, entrée **2**). Ces résultats montrent que la cinétique d'hydrodéhalogénation est plus rapide que la cinétique de méthylation par couplage de Stille modifié. L'augmentation de la température de réaction à 130°C (Tableau 8, entrée **3**) a permis de descendre le temps de réaction à 5 min pour une conversion totale mais accélère encore la formation du dérivé hydrodéhalogéné, un ratio HPLC de 13/87 en faveur de **403** a été observé. De plus, cette température accentue la formation des produits de dégradation.



332

402, R = Me
403, R = H

Entrée	Pd_2dba_3 (mol%)	$C_{substrat}$ (mol.L-1)	Additif (mol.L-1)	T (°C)	Conversion (%)	$t_{réaction}$ (min)	Ratio HPLC 402/403 (%)
1	10	0.1	/	100	58	10	86/14
2	10	0.1	/	100	100	20	68/32
3	10	0.1	/	130	100	5	13/87
4	10	1	/	100	100	10	79/21
5	10	1	/	90	100	40	100/0
6	10	1	/	80	100	50	100/0
7	20	0.1	/	100	100	10	58/42
8	20	1	/	100	100	5	79/21
9	20	1	CuI (80)	100	5	50	70/30

Tableau 8: Résultats de la méthylation de l'amide 332

Compte tenu de ces premiers résultats sur ce substrat, nous avons cherché des solutions pour mettre au point des conditions de méthylation restant compatibles avec la durée de demi vie du carbone 11 en favorisant la formation de **402** par rapport à **403**. Pour cela l'influence de la diminution de la température de réaction, la charge en palladium mais aussi de la concentration en substrat et de l'emploi d'additif ont été étudiée.

La cinétique des couplages palladocatalysés étant du premier ordre, une augmentation de la concentration en substrat a accéléré la cinétique de réaction. En effet, une concentration en substrat de 1M a permis une conversion totale en 10 min avec un ratio de 79/21 en faveur de **402** (Tableau 8, entrée **4**). La cinétique a été ainsi multipliée par deux par rapport aux résultats de l'entrée **2** et l'augmentation de la concentration a favorisé la méthylation.

La réaction d'hydrodéhalogénation a été inhibée en réalisant la méthylation à 80°C et à 90°C (Tableau 8, entrées **5** et **6**). Bien qu'une conversion totale ait été observée en 40 et 45 min, 20 min de réaction sont suffisantes pour obtenir un taux de conversion de 83%. Ces conditions se rapprochent donc de conditions compatibles avec la durée de vie du carbone 11. Elles pourraient être optimisées puis exploitées en radiosynthèse pour la [^{11}C]-méthylation de nucléosides.

En radiosynthèse, le catalyseur est souvent utilisé en large excès par rapport au précurseur marqué. De ce fait, l'augmentation de la charge en catalyseur est un paramètre à ne pas négliger et à étudier. Dans l'optique de diminuer le temps de réaction en gardant un taux de conversion le plus haut possible, la charge de palladium a été portée à 40% (soit 20 mol% de Pd_2dba_3). Une conversion totale en 10 min à 100°C avec un ratio de 58/42 en faveur du produit méthylé **402** a ainsi été obtenu (Tableau 8, entrée **7**). L'augmentation de la concentration à 1M permet de convertir entièrement l'amide **332** en 5 min avec un ratio de 79/21 en faveur du produit méthylé **402** (Tableau 8, entrée **8**).

Enfin, en 1994, les travaux de Farina[267] ont mis en évidence l'effet du CuI sur la cinétique du couplage de Stille classique. Les résultats ont montré que l'ajout d'une quantité catalytique d'iodure de cuivre I accélère la réaction de couplage et améliore le rendement de couplage. Le mécanisme proposé suggère la formation de l'organocuivre **414** par transmétallation entre l'organostannane **415** et le sel de cuivre. L'organocuivre **409**, plus réactif, peut ensuite réagir au sein du cycle catalytique *via* une deuxième transmétallation aboutissant à la formation du produit de couplage **413** (Figure 174).

[267] Farina V., Kapadia S., Krishnan B., Wang C., Liebeskind L.S., *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 5905.

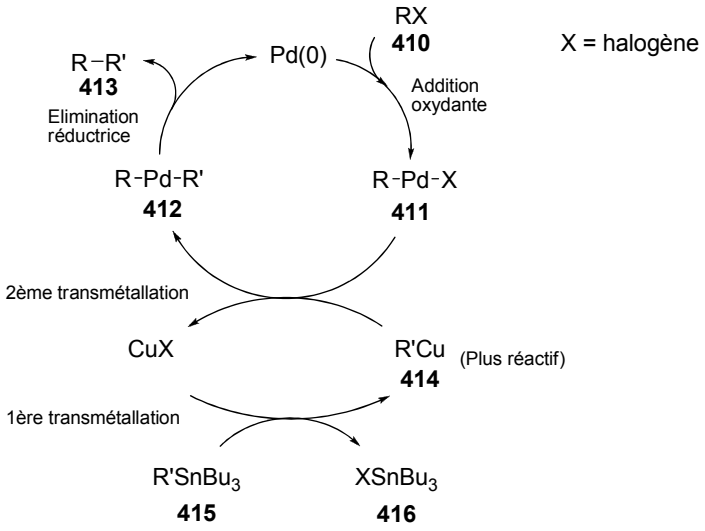


Figure 174: Couplage de Stille en présence de sels de cuivre I.

Ce protocole a été appliqué à la méthylation de l'amide **332**. La cinétique de la première transmétallation pourrait être plus importante grâce à l'utilisation d'organostannate déjà plus réactif que les organostannanes. Finalement, contrairement à ce qui a été décrit, l'ajout d'iodure de cuivre semble avoir un effet inhibiteur sur la réaction puisqu'un taux de conversion de 5% a été observé en 50 min avec un ratio de 70/30 en faveur de **403** (Tableau 8, entrée **9**).

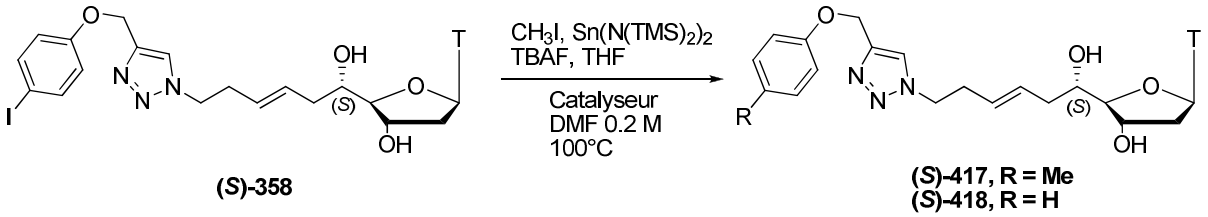
3.4 Les triazolyl-thymidines

3.4.1 Sur la (5'S)-C-(1-(pent-3-ényl)-(4-(4-iodophénoxy)-méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (*S*)-358

Compte tenu des résultats obtenus précédemment, il semble que la méthylation par couplage de Stille modifié soit substrat-dépendante obligeant à chaque fois à optimiser les conditions. Cependant, nous avons décidé pour la suite de cette étude de fixer deux paramètres à savoir la température et le solvant de manière à étudier l'influence du catalyseur, l'emploi d'additif et la concentration en substrat. Ainsi, l'étude du couplage de Stille modifié sur le triazole **(*S*)-358** a donc été réalisée dans le DMF à 100°C.

3.4.1.1 Influence de la nature du catalyseur

Tout d'abord l'influence de la nature du catalyseur a été étudiée en utilisant Pd_2dba_3 et $Pd(P(tBu)_3)_2$, commercial ou formé *in-situ* à partir de Pd_2dba_3 et $PtBu_3$.



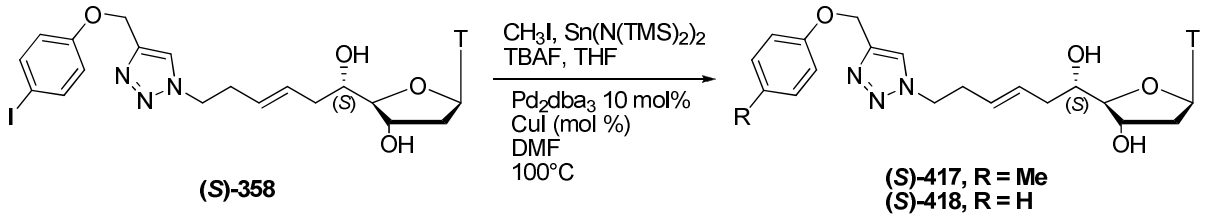
Catalyseur (mol%)	Conversion (%)	Temps de réaction (min)	Ratio HPLC (*S*)-417/(*S*)-418 (%)
Pd_2dba_3 (10)	100	5	58/22 + dégradation
$Pd(P(tBu)_3)_2$ (20)	100	50	27/73

Tableau 9: Influence de la nature du catalyseur sur le couplage de Stille modifié sur (*S*)-358.

L'utilisation de Pd_2dba_3 permet une conversion totale en 5 min avec un ratio de 2.6/1 en faveur du produit méthylé **(*S*)-417** tandis que $Pd(P(tBu)_3)_2$ favorise l'hydrodéhalogénation (Tableau 9). Les produits méthylé **(*S*)-417** et hydrodéhalogéné **(*S*)-418** ont été isolés par HPLC semi-préparative et l'analyse en spectrométrie de masse a permis de confirmer leurs structures.

3.4.1.2 Influence d'un additif

L'ajout de 20 mol% de CuI dans les conditions précédentes a permis de diminuer la formation des produits de dégradation mais a augmenté la formation du produit hydrogéné **(*S*)-418** et le temps de réaction pour une conversion totale (Tableau 10, entrée **2**). L'augmentation de la concentration à 0.5M favorise la formation du produit méthylé **(*S*)-417** et diminue significativement le temps de réaction. En effet un ratio de 32/1 en faveur du produit méthylé **(*S*)-417** a été obtenu mais en 20 min (Tableau 10, entrée **3**). Finalement, le temps de réaction, pour une conversion totale, a été encore réduit à 5 min en doublant la quantité de CuI. Néanmoins un ratio moins bon de 12/1, en faveur du produit méthylé, a été observé (Tableau 10, entrée **4**). Le meilleur résultat a donc été obtenu avec un ratio Pd/Cu de 1/2.



T = thymine

Entrée	CuI (mol%)	$C_{substrat}$ (mol.L-1)	Conversion (%)	$t_{réaction}$ (min)	Ratio HPLC (*S*)-417/(*S*)-418 (%)
1	0	0.2	100	5	58/22 + dégradation
2	20	0.2	100	50	63/37
3	20	0.5	100	20	97/3
4	40	0.5	100	5	92/8

Tableau 10: Résultats du couplage de Stille modifié de (*S*)-358 en présence de CuI.

Bien que le catalyseur soit utilisé, au final, en large excès par rapport au stannate lors des radiosynthèses, nous avons pu constater que la charge en palladium a pu être diminuée (Tableau 11).

Pd_2dba_3 (mol%)	CuI (mol%)	$C_{substrat}$ (mol.L-1)	Conversion (%)	$t_{réaction}$ (min)	Ratio HPLC (*S*)-417/(*S*)-418 (%)
10	40	0.5	100	5	92/8
5	20	0.5	100	5	94/6
1	4	0.5	54	180	60/40

Tableau 11: Influence de la quantité du couple catalytique utilisé lors de la méthylation de (*S*)-358.

Le couplage en présence de 5 mol% de Pd_2dba_3 et de 20 mol% de CuI permet d'obtenir une conversion totale en 5 min avec un ratio satisfaisant de 94/6 en faveur de **(*S*)-417**. La diminution de la charge en palladium à 1% ralentit significativement la conversion du substrat favorisant ainsi la réaction d'hydrodéhalogénation. Une conversion de seulement 54% a été obtenue en 3h avec un ratio de 60/40 en faveur de **(*S*)-417**.

3.4.2 Sur la 5'-C-(1-(4-iodobenzyl)-4-méthyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine 371

La mise au point de conditions HPLC a été facilitée en synthétisant les références méthylée **423** et hydrodéhalogénée **424** à partir des azotures **419** et **420** (Figure 175).

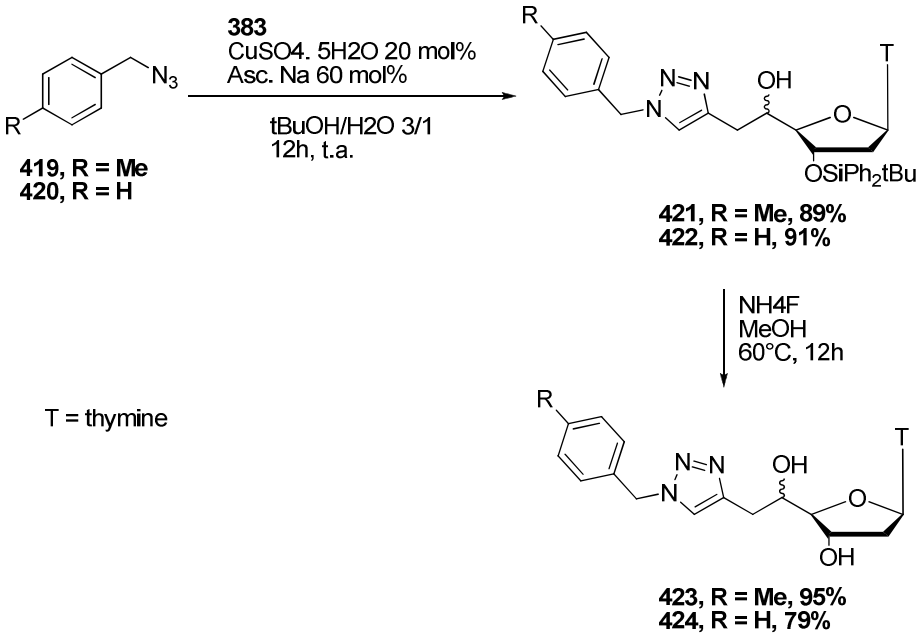
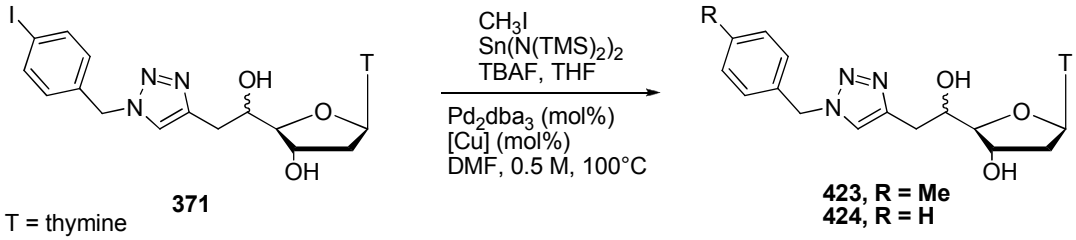


Figure 175: Synthèse des témoins méthylé 423 et hydrodéhalogéné 424.

La méthylation du triazole **371** a été étudiée en faisant varier la charge en palladium ainsi que la nature et la quantité du sel de cuivre I (Tableau 12)



Entrée	Pd_2dba_3 (mol%)	[Cu] (mol%)	Conversion (%)	$t_{réaction}$ (mi)	Ratio HPLC 423/424 (%)
1	5	CuI (20)	100	5	93/7
2	10	CuI (40)	100	5	80/20
3	10	CuI (100)	100	5	69/8 + dégradation
4	10	CuTC (40)	100	10	77/9 + dégradation
5	10	CuTC (100)	100	5	90/10
6	10	CuCl (40)	98	30	58/16 + dégradation

Tableau 12: Résultats des études sur la méthylation du triazole 371.

Afin de comparer ces résultats avec ceux obtenus lors de la méthylation du triazole **(*S*)-358**, les expériences utilisant 5 et 10 mol% de Pd_2dba_3 ont tout d'abord été répétées sur le triazole **371** (Tableau 12, entrées **1** et **2**) permettant de constater un comportement légèrement différent des deux substrats à 10 mol% et identique à 5 mol%. En effet, dans ce cas, un ratio de 93/7 en faveur du produit **423** a été obtenu en 5 min avec 5% de Pd_2dba_3 et de 20 mol% de CuI (Tableau 12, entrée **1**) comme avec **(*S*)-358** alors qu'un ratio de 80/20 a uniquement été observé en doublant les quantités du couple catalytique (Tableau 12, entrée **2**). Ce ratio n'a pu être optimisé en augmentant la proportion de CuI (Tableau 12, entrée **3**).

Afin d'utiliser le sel de cuivre I le plus efficace, la nature du contre-ion a également été étudiée utilisant **371** comme substrat. Les tests ont montré que l'iodure de cuivre semble plus approprié que le thiophénylcarboxylate de cuivre (CuTc) lorsqu'ils sont utilisés à 40 mol% avec 10 mol% de Pd_2dba_3 (Tableau 12, entrée **4** et **5**). En effet, dans ces proportions, le CuTC enraîne la formation significative de produits de dégradation. De façon surprenante, le CuTC couplé au Pd_2dba_3 dans un ratio 10/1 permet d'obtenir un ratio de 9/1 en faveur du produit **423**. Il est également important de noter que le chlorure de cuivre I ralentit la réaction (Tableau 12, entrée **6**) contrairement à l'iodure de cuivre I.

Enfin, la cinétique de la réaction a pu être augmentée en utilisant les micro-ondes[268]. Pour cela, la réaction a été réalisée dans un micro-onde Biotage Initiator en activant le mode « air cooling » afin d'augmenter la puissance d'irradiation. Le suivi réactionnel par HPLC a montré une conversion totale au bout de 2 min à 100°C avec un ratio HPLC de 96/4 en faveur du produit **416** en présence de 5 mol% de Pd_2dba_3 et 20 mol% de CuI.

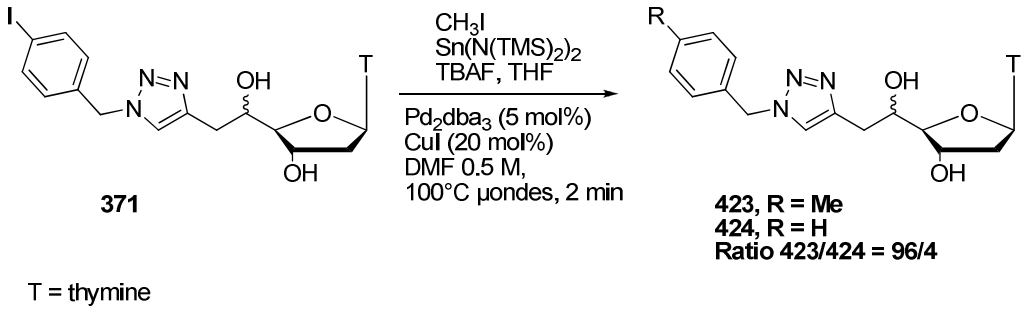


Figure 176: Méthylation de 371 assistée par les micro-ondes.

3.4.3 Sur la 5'-C-(1-(2-(2-(4-iodophénoxy)éthoxy)éthyl)-4-méthyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine 372

Les conditions décrites précédemment mettant en jeu 10 mol% de Pd_2dba_3 et 40 mol% de CuI ont tout d'abord été appliquées à la méthylation du triazole **372** (Figure 177).

[268] Larhed M., Hallberg A., *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 9582.

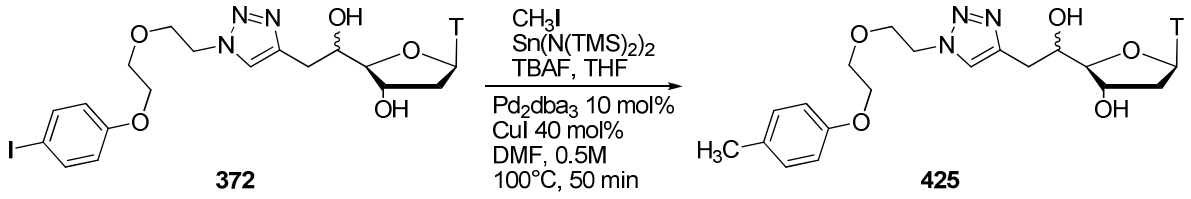


Figure 177: Méthylation du dérivé triazolyle 327.

Le suivi réactionnel par HPLC montre que seul le produit méthylé **327** est formé, cependant avec un temps de réaction de 50 min pour une conversion totale. On peut supposer que l'oxophilie du cuivre peut provoquer sa chélation avec les atomes d'oxygène du bras éthylène glycol et/ou avec un oxygène et l'azote en position 2 sur le triazole (Figure 178).

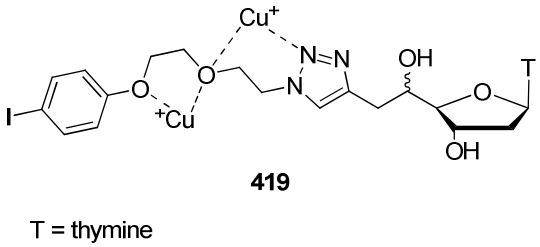


Figure 178: Chélation du cuivre par les oxygènes du bras éthylène glycol.

Ainsi, le cuivre ne pourra plus jouer son rôle dans le cycle catalytique du couplage de Stille modifié ce qui peut expliquer le ralentissement de la cinétique de réaction. Le CuI étant commercialement disponible et peu cher (130 €.kg^{-1}, Acros Organics), ce problème a été résolu en réalisant la méthylation en présence de 140 mol% de CuI. Une conversion totale en produit **425** a été observé en 5 min (Figure 179).

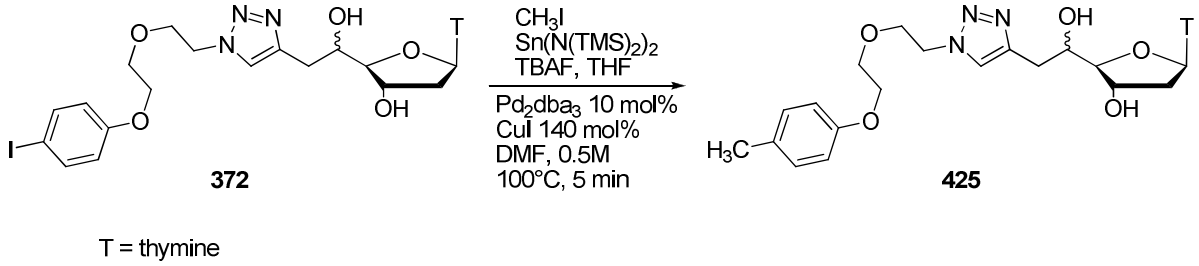


Figure 179: Méthylation du dérivé triazolyle 372 en présence de 140 mol% de CuI.

3.5 Conclusion :

L'étude du transfert de méthyle sur les phosphorothioesters a permis de montrer l'incompatibilité de la connexion phosphorothioate avec le couplage de Stille modifié, vraisemblablement lié à une interaction du palladium avec les atomes de phosphore et/ou de soufre

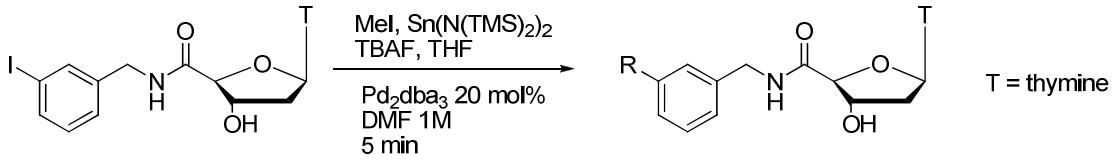
L'étude du transfert de méthyle sur les carboxamido-adénosines **304** et **305** n'a pas permis de mettre au point des conditions compatibles avec la chimie du carbone 11. La méthylation de l'amide **304** n'a pas été assez rapide (30 minutes) cependant elle représente le premier résultat de transfert de méthyle sur un nucléoside. Quant à l'amide **305**, l'instabilité thermique de la partie ribose a entrainé sa dégradation.

L'étude du transfert de méthyle sur l'amide **332** de type carboxamido-thymidine confirme que le motif N-iodobenzamide n'est pas la cause de la dégradation de l'amide **305**, et que la nature ribose du nucléoside est bien en cause, puisque des résultats satisfaisants de méthylation ont pu être obtenus. Cependant la réaction de méthylation est en compétition avec la réaction d'hydrodéhalogénation, qui possède une cinétique plus rapide, menant à la formation du produit hydrodéhalogéné **403**. Cette réaction est favorisée à des hautes températures alors qu'elle est inhibée en dessous de 100°C. Par ailleurs, l'accélération de la cinétique de méthylation semble dépendre de plusieurs paramètres:

- la température : l'élévation de la température accélère la réaction de méthylation mais accélère la formation de produit hydrodéhalogéné.

- la concentration et la charge de palladium: leur augmentation respective s'accompagne d'une réduction du temps de réaction.

Dans l'optique d'utiliser cette méthodologie en chimie du ^{11}C, un compromis entre un temps de réaction, compatible avec la durée de vie du carbone 11 (inférieur à 10 min) et un ratio satisfaisant en faveur du produit méthylé, devra être choisi. En effet, la réaction à 100°C, avec 20 mol% de Pd_2dba_3, à une concentration molaire en substrat conduit à une conversion totale en 5 min avec un ratio 79/21 en faveur de **402**. En revanche, la méthylation à 90°C en présence de 10 mol% de Pd_2dba_3 permet de former uniquement le produit méthylé **402** en 20 min mais seulement avec un taux de conversion de 83 % (Tableau 13: Conditions optimales pour la méthylation de 332 par couplage de Stille modifié).



332 **402, R = Me** **403, R = H**

Entrée	T (°C)	Conversion (%)	t (min)	Ratio HPLC 402/403 (%)
1	100	100	5	79/21
2	90	83	20	100/0

Tableau 13: Conditions optimales pour la méthylation de 332 par couplage de Stille modifié.

Cependant, la concentration trop élevée en substrat ne permet pas d'appliquer cette méthodologie à la méthylation de macromolécules telles des oligonucléotides, produits en très petites quantités. Elle est donc limitée à la méthylation d'unités monomériques. L'autre inconvénient concerne la structure du nucléoside modifié elle-même. L'hydroxyle positionné en 5' étant condamné par la liaison amide, ce nucléoside ne pourra être introduit qu'à l'extrémité 5' de la séquence oligonucléotidique.

L'étude de la méthylation des trois triazol-thymidines a pu mettre en évidence l'influence de plusieurs paramètres. Tout d'abord, les tests sur le composé **(*S*)-358** ont permis de confirmer que le Pd_2dba_3 est le catalyseur de choix pour le couplage de Stille. En effet, les réactions de méthylation et d'hydrodéhalogénation étant en compétition l'utilisation du Pd_2dba_3 favorise la formation du produit méthylé alors que les ligands phosphines comme le P*t*Bu_3 aident à la formation du produit hydrogéné. Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que l'ajout de cuivre a pour effet d'accélérer la cinétique de réaction supposant la formation du méthylcuivre, plus réactif, par transmétallation du groupement méthyle de l'espèce stannique vers le cuivre. Le meilleur résultat a été obtenu lorsque 20 mol% de CuI est couplé avec 5 mol% de Pd_2dba_3 soit un ratio Cu/Pd de 2/1 (Figure 180).

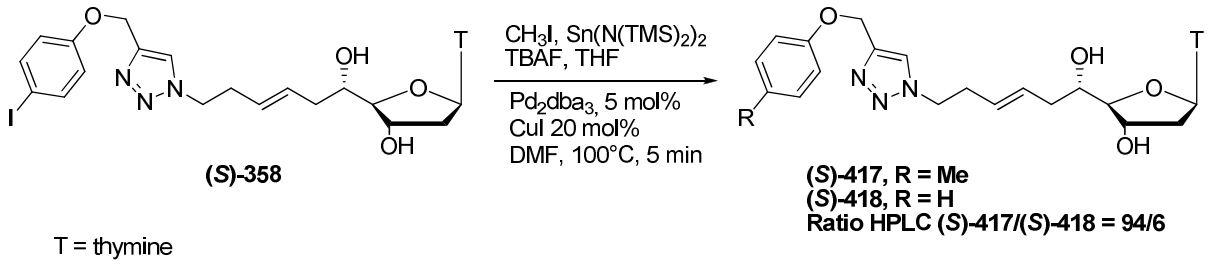


Figure 180: Conditions optimale pour la méthylation de la thymidine modifiée (*S*)-358.

Les tests de méthylation sur le dérivé **371** ont permis de souligner l'importance du contre-ion du sel de cuivre I. En effet, le chlorure de cuivre I ralentit la réaction de méthylation alors que l'utilisation du thiophénylcarboxylate de cuivre I et l'iodure de cuivre I permet une conversion totale en moins de dix minutes. De plus, le temps de réaction a été réduit à 2 min pour un ratio entre le produit méthylé **423** et le produit hydrodéhalogéné **424** de 24/1 en réalisant la réaction sous micro-ondes, technique parfaitement adaptée à ce type de réaction (Figure 181).

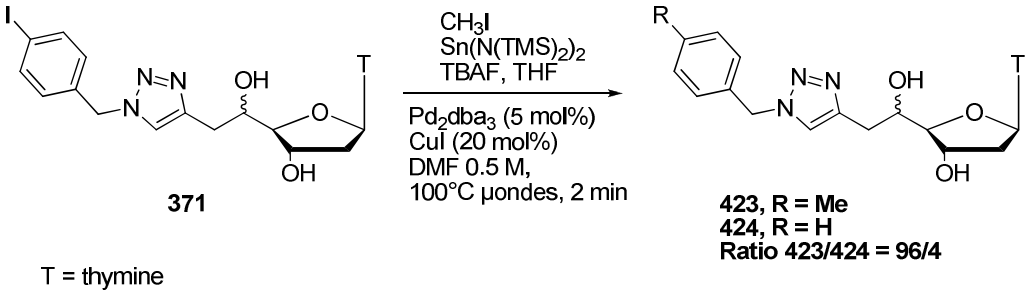


Figure 181: Méthylation de la thymidine modifiée 371assistée par les micro-ondes.

Quant à la méthylation du composé **372**, la chélation du cuivre par le pont di-éthylène glycol a pu être contournée en utilisant 1,4 équivalent de CuI. L'utilisation couplée de 140 mol% de CuI et 10 mol% de Pd_2dba_3 a permis une conversion totale en 5 min avec l'unique formation du produit méthylé **425** (Figure 182).

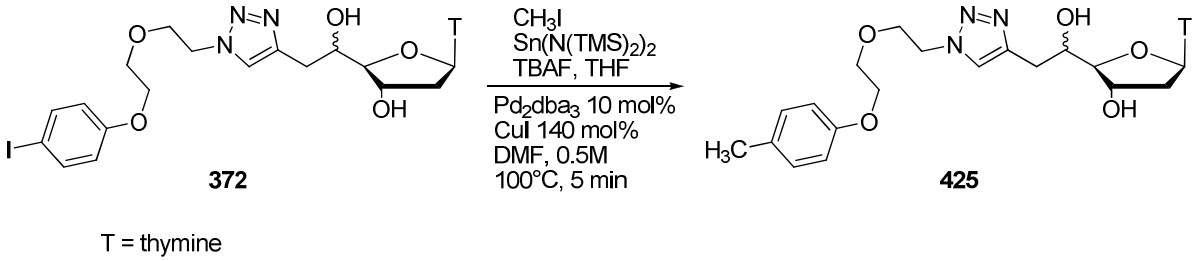


Figure 182: Méthylation de la thymidine modifiée 372.

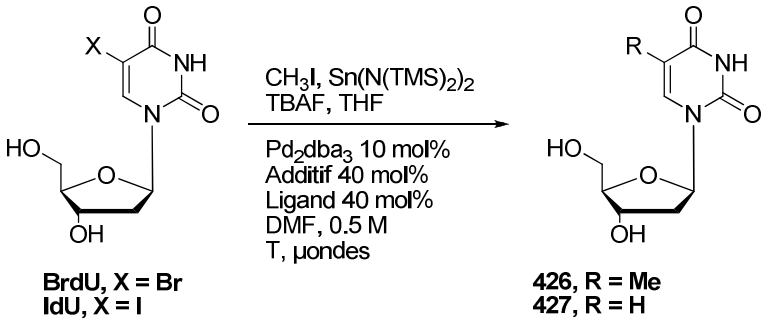
Ces trois nucléosides modifiés (**(*S*)-358**, **371**, **372**) sont de loin les précurseurs donnant les meilleurs résultats parmi les nucléosides modifiés qui ont été synthétisés. Ils ont donc été choisis pour être incorporés au sein d'oligonucléotides modèles afin d'étudier la transposition des conditions de transfert de méthyle, mises au point sur les monomères, à des oligonucléotides comportant 10 unités.

4 Application à la méthylation sur des nucléosides halogénés sur la base azotée

Parallèlement à l'étude du transfert de méthyle sur des nucléosides modifiés en 5', le couplage de Stille a été appliqué à la méthylation de nucléoside présentant un halogène sur la base azotée. Cette approche n'a pas été envisagée pour la méthylation d'oligonucléotides (les bases sont plus difficilement accessibles sur des systèmes possédant une structure ternaire) cependant elle pourrait constituer une alternative prometteuse pour la radiosynthèse de nucléotide utilisé en tant que radiotraceur comme la [^{11}C]-thymidine, la [^{11}C]-FLT ou la [^{11}C]-FMAU dont les radiosynthèses sont parfois longues et délicates.

Dans un premier temps, les essais ont été réalisés sur la 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU) et sur la 5-iodo-2'-désoxyuridine (IdU), commerciales, en utilisant les conditions qui

avaient donné les meilleurs résultats au moins en terme de catalyseurs (10 mol% de Pd_2dba_3), de concentrations de substrats (0.5 M) et de chauffage (micro-ondes) (Tableau 14).



BrdU, X = Br
IdU, X = I

426, R = Me
427, R = H

Entrée	Substrat	Additif	Ligand	T (°C)	conversion (%)	$t_{réaction}$ (min)	Ratio HPLC 426/427 (%)
1	IdU	/	/	100	100	5	44/56
2	IdU	/	P(*o*-Tolyl)$_3$	100	100	5	45/55
3	BrdU	/	P(*o*-Tolyl)$_3$	100	100	10	34/66
4	BrdU	CuI	/	100	40	25	60/40
5	IdU	CuI	/	100	100	5	63/37
6	IdU	CuI	/	130	100	5	75/25

Tableau 14: Méthylation de la 5-bromo/iodo-2'-déoxyuridine.

Dans ce cas également, les premiers essais sans CuI montrent que la réaction d'hydrodéhalogénation est favorisée que l'on utilise Pd_2dba_3 seul (Tableau 14, entrée **1**) ou en présence de ligand phosphine P(*o*-Tolyl)$_3$ (Tableau 14, entrée **2** et **3**).

Les résultats suivants montrent que l'IdU est plus réactive que la BrdU pour la réaction de méthylation par couplage de Stille modifié ce qui confirme une fois de plus le choix de dérivés iodoaryles. En effet, une conversion de 40 % a été observée en 25 min avec un ratio de 60/40 en faveur de la thymidine (**426**) en présence de 10 mol% de Pd_2dba_3 et de 40 mol% de CuI (Tableau 14, entrée **4**) alors que dans les mêmes conditions, la méthylation de l'IdU donne une conversion totale en 5 min avec un ratio comparable (Tableau 14, entrée **5**). Ce ratio peut être encore amélioré dans les mêmes conditions en augmentant la température. Ainsi, un ratio de 75/25 en faveur de la thymidine **426** a été observé à 130°C avec une conversion totale en 5 min (Tableau 14, entrée **6**).

Dans un deuxième temps, les conditions optimales ont été appliquées à la méthylation de la 5-iodo-2'-désoxy-2'-fluoro-uridine **429**, obtenue par iodation sous micro-ondes de la 2'-désoxy-2'fluoro-uridine **428** en présence de ICl avec un rendement de 67 %[269] (Figure 183).

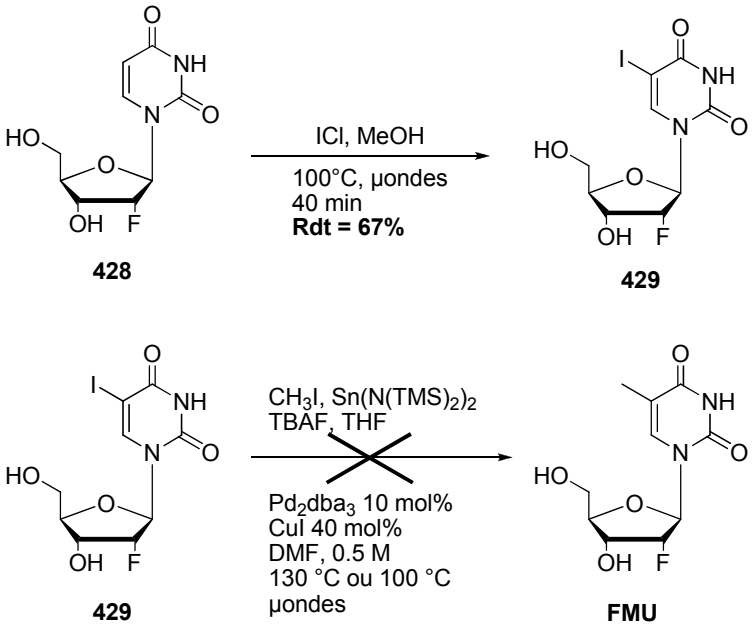


Figure 183: Synthèse et méthylation de la 5-iodo-2'déoxy-2'-fluoro-uridine 429.

Le suivi réactionnel par HPLC montre la formation d'un seul produit avec une conversion totale en 5 min. Les analyses par RMN du proton, du carbone et par spectrométrie de masse ne confirment pas la formation de la 5-méthyl-2'-désoxy-2'-fluoro-uridine (FMU). Le produit isolé a bien été méthylé en position 5 mais il ne présente plus l'atome de fluor en position 2'. Les analyses laissent supposer la formation de la 2',5'-anhydro-thymidine **430** (Figure 184).

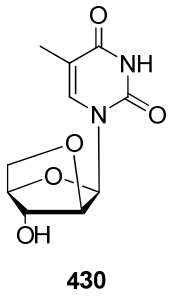


Figure 184: 2',5'-anhydro-thymidine 430

Ainsi, l'étude préliminaire du transfert de méthyle sur des nucléosides halogénés sur la base azotée a montré que la thymidine **426** peut être obtenue par méthylation de la 5- iodo-2'-désoxyuridine par couplage de Stille modifié dans des conditions compatibles avec la durée de vie du carbone 11. Cette méthodologie pourrait donc être envisagée pour la radiosynthèse de la [^{11}C]-thymidine. Par ailleurs, il semblerait intéressant d'étudier en détail la méthylation de la

[269] Van Aerschot A., Herdewijn P., Balazarini J., Pauwels R., De Clerq E., *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1743-1749.

5-iodo-2'déoxy-2'-fluoro-uridine **429** afin de comprendre la raison de la formation du produit secondaire **430**. La méthylation par couplage de Stille modifié constituerait alors une approche prometteuse pour la radiosynthèse de la [^{11}C]-FMAU mais également de la [^{11}C]-FLT.

PARTIE D :

TRANSFERT DE METHYLE

SUR DES OLIGONUCLEOTIDES

PARTIE D : TRANSFERT DE METHYLE SUR DES OLIGONUCLEOTIDES

La méthylation des 3 thymidines **(*S*)-358**, **371** et **372** a donné les meilleurs résultats. Ils ont donc été choisis pour être incorporés au sein de séquences oligonucléotidiques modèles. Afin d'introduire le groupement iodoaryle directement sur l'oligonucléotide, la thymidine modifiée **360** a été également choisie.

1 Incorporation des thymidines modifiées

1.1 Synthèse des phosphoramidites

L'incorporation des quatre thymidines **(*S*)-358**, **360**, **371** et **372** dans des oligonucléotides modèles a été réalisée par synthèse automatisée selon la méthode aux phosphoramidites. Il a donc été nécessaire de préparer les dérivés phosphoramidites en position 3' **439** - **442** correspondants (Figure 185). Pour cela, l'hydroxyle en 5' a tout d'abord été protégé par un groupement DMTr par réaction du chlorure de diméthoxytrityle (DMTrCl) en présence de nitrate d'argent et de collidine conduisant aux dérivés protégés **431** - **434** avec des rendements compris entre 74 et 82%. L'éther silylé a ensuite été clivé en présence de TBAF conduisant aux dérivés déprotégés **435** - **438** avec des rendements compris entre 53 et 81%. Enfin, les phosphoramidites désirés **439** - **442** sont obtenus par couplage des 5'-*O*-DMTr-thymidines modifiées avec le cyanoéthyl-diisopropylamino-chloro-phosphine ($ClP(CEO)(N(iPr)_2)$) en présence de DIEA.

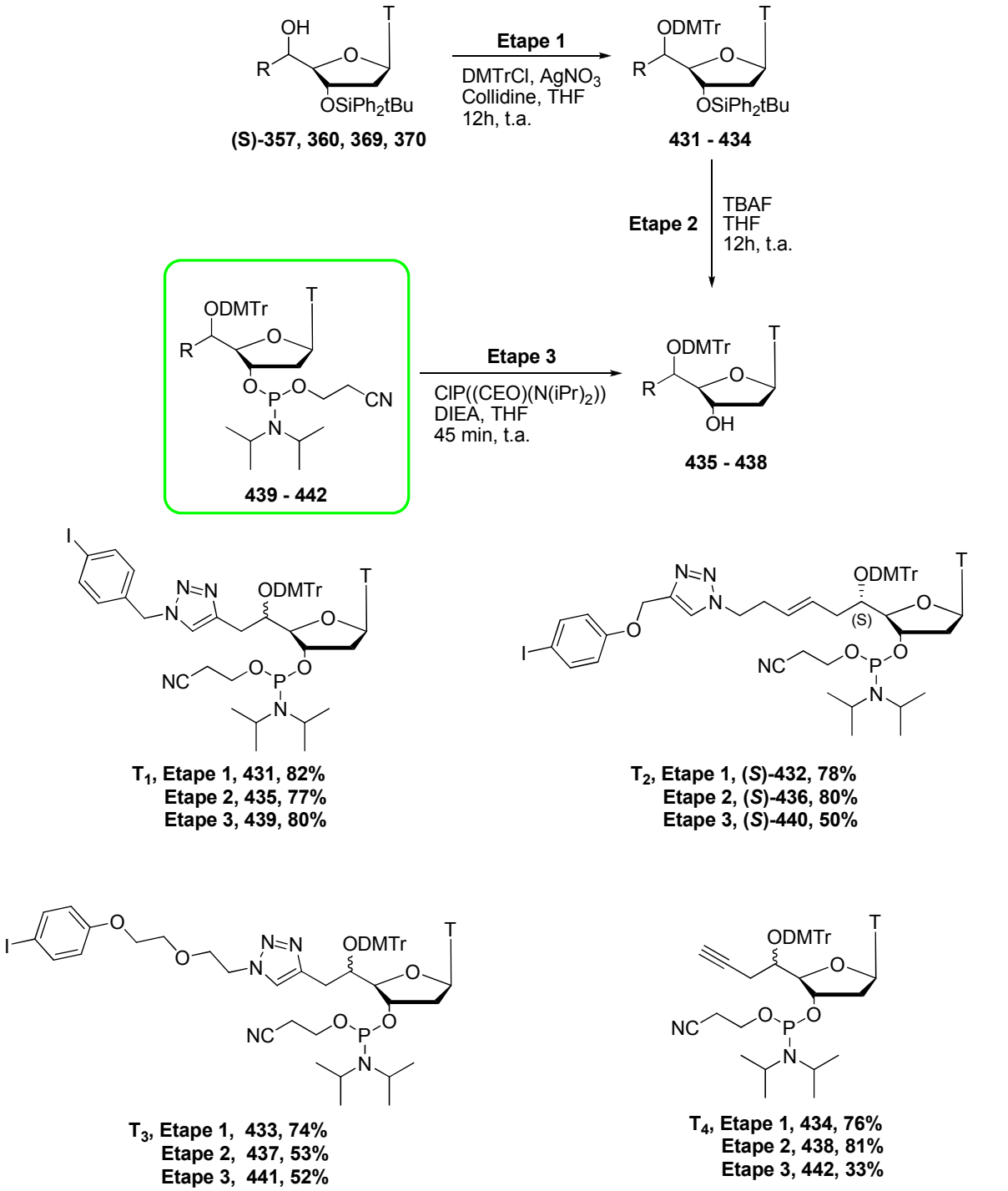


Figure 185: Synthèse des quatre phosphoramidites 439, (*S*)-440, 441 et 442

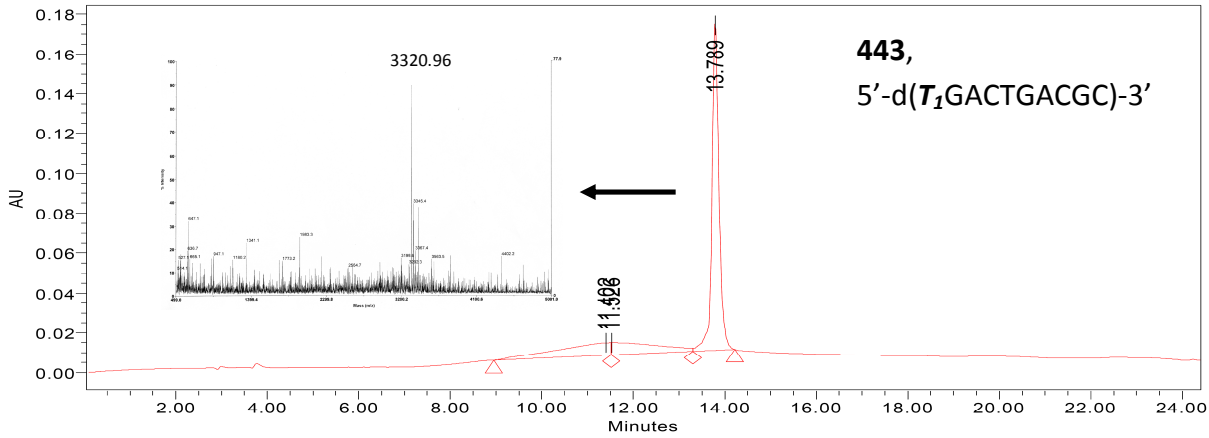
1.2 Synthèse et purification des oligonucléotides

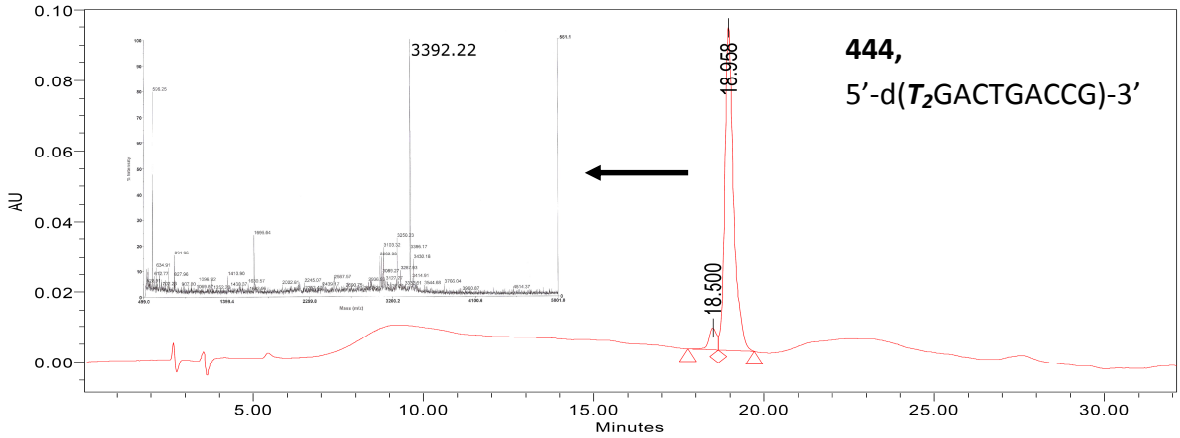
Les oligonucléotides comportant les thymidines modifiées ont été obtenus par synthèse automatisée en utilisant les mêmes conditions de concentration et de temps de couplage que lors des synthèses traditionnelles d'oligonucléotides. Les phosphoramidites **439**, **(S)-440** et **441** sont incorporées respectivement à l'extrémité 5' des séquences oligonucléotidiques **443**, **444** et

445 constituées des quatre nucléotides de la série ADN. De part leur structure, ces phosphoramidites peuvent également être incorporés à n'importe quel endroit d'une séquence d'ODN. Par exemple, **439** a été introduit au milieu de la séquence **446**. Ceci permettra d'étudier l'influence de la position de la thymidine modifiée au sein de l'ODN sur la réaction de méthylation.

Le dosage automatisé des cations diméthoxytrityle a montré que les différents phosphoramidites ont été introduits avec des rendements de couplage supérieurs à 95% ce qui est comparable à l'introduction de phosphoramidites commerciaux. En fin de synthèse, les colonnes sont traitées par une solution d'acide trichloroacétique pour cliver le dernier groupement diméthoxytrityle et les ODN sont décrochés du support par traitement avec une solution concentrée d'ammoniaque aqueux. Les groupements protecteurs présents sur les bases azotées sont également enlevés en laissant la solution ammoniacale à 50°C pendant 4h.

Le brut réactionnel a ensuite été analysé par HPLC sur colonne phase inverse en éluant avec un mélange constitué d'acétonitrile et d'une solution d'acétate de triéthylammonium à une concentration de 50 mM et à pH = 7. Le produit majoritaire a ensuite été isolé par HPLC semi-préparative sur colonne phase inverse et analysé par spectroscopie de masse en mode MALDI-TOF (Figure 186).





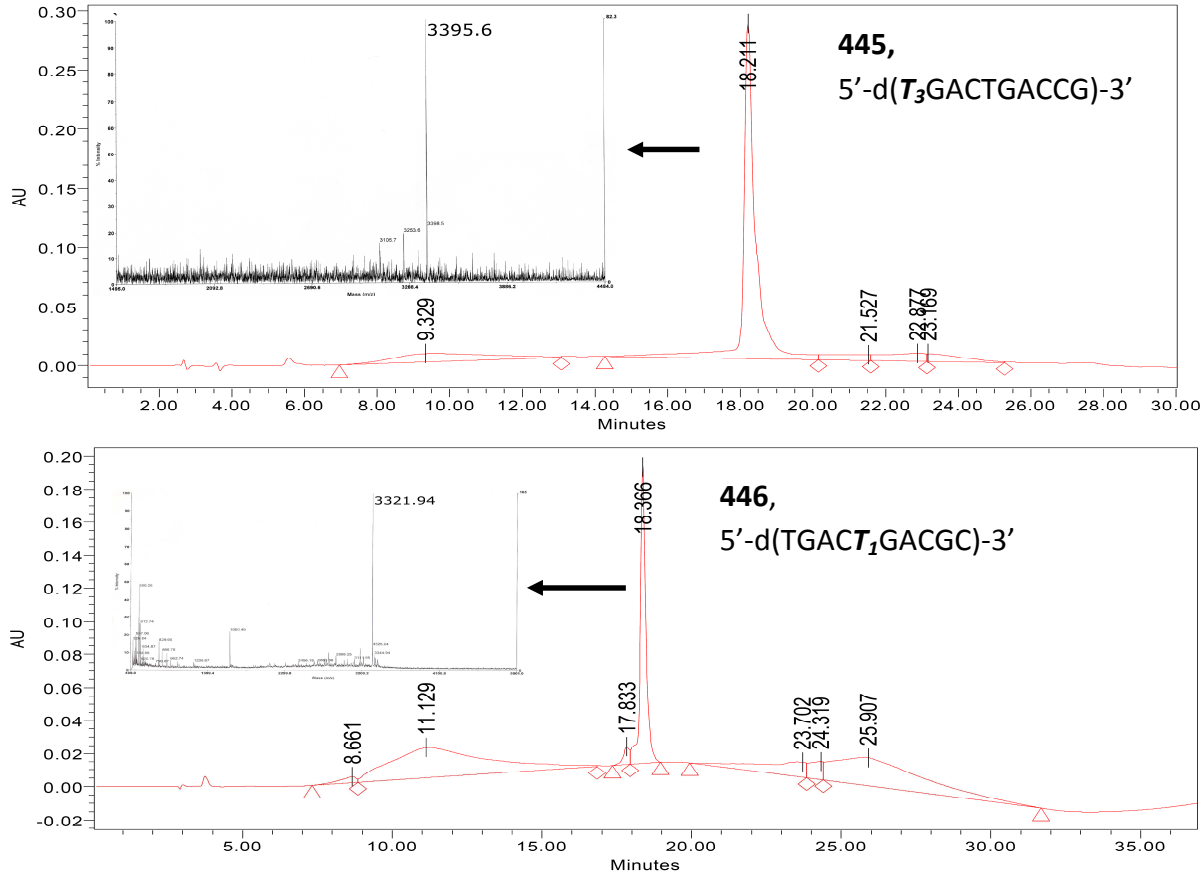


Figure 186: Chromatogrammes HPLC et spectres de masse des 4 ODNs après purification.

L'ODN **443** ainsi que son analogue méthylé **448** ont également pu être obtenus par chimie « click » à partir de l'ODN acétylénique **447** préalablement obtenu par l'incorporation du phosphoramidite **442** (Figure 187).

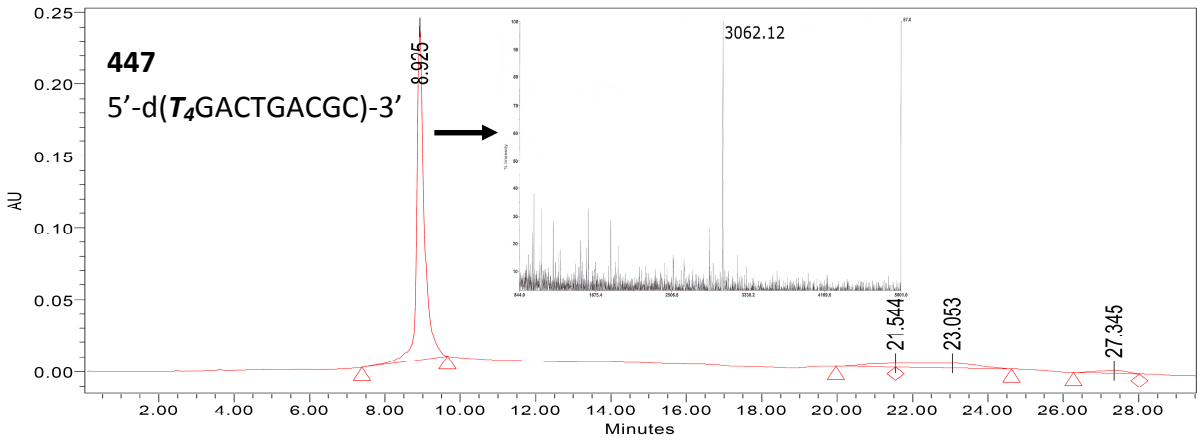


Figure 187: Chromatogramme HPLC et spectre de masse de l'ODN 447.

La réaction de chimie « click » a été réalisée sous micro-ondes en présence de 5 équivalents de $CuSO_4$ et 12,5 équivalents d'ascorbate de sodium dans un mélange binaire 1/1 composé d'eau et de méthanol (Figure 188).[270]

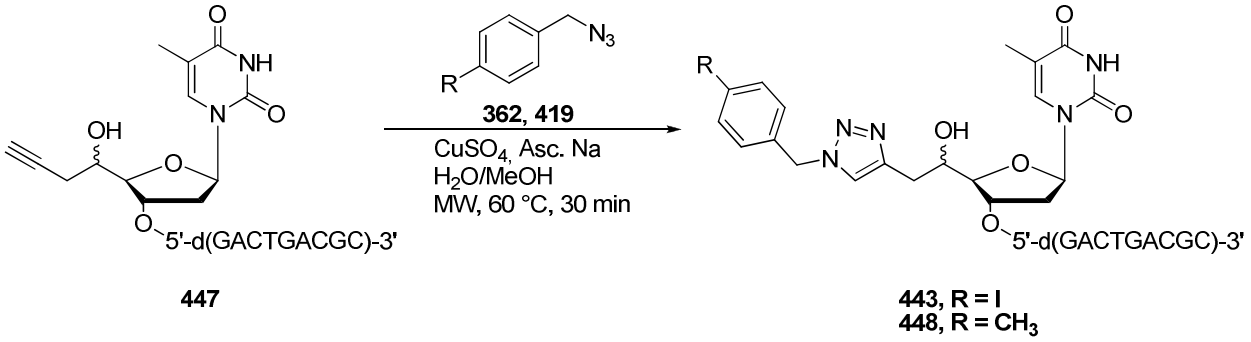


Figure 188: Synthèse des ODNs 443 et 448 par chimie "click".

Les suivis réactionnels par HPLC montrent une conversion totale de **447** en 30 min avec la formation d'un seul produit. L'analyse par spectrométrie de masse a confirmé la formation des triazoles **443** et **448**.

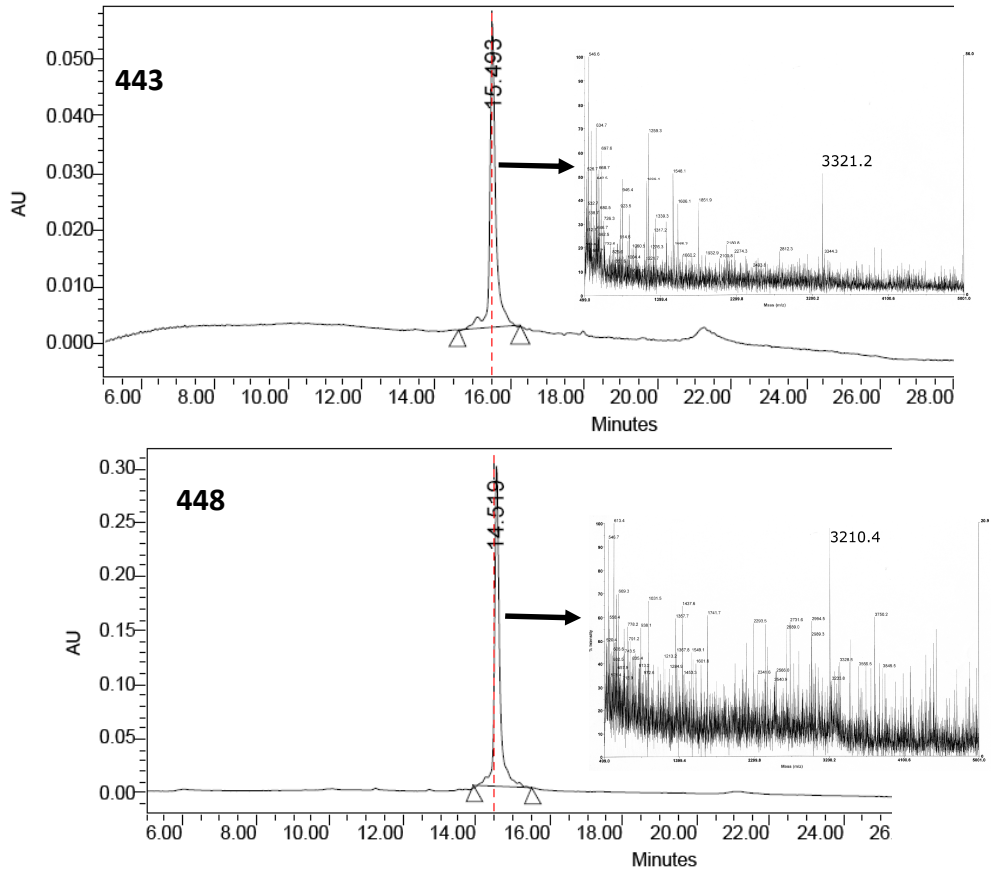


Figure 189: Chromatogramme HPLC et spectre de masse des 2 ODNs 443 et 448 obtenus par chimie "click".

[270] Pourceau G., Meyer A., Vasseur J.J., Morvan F., *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 1218.

Les séquences synthétisées ainsi que leurs masses moléculaires théoriques, observées (données pour des groupements phosphates sous la forme acide) ainsi que leurs rendements sont résumés dans le Tableau 15.

Séquence	Masse moléculaire calculée	Masse moléculaire observé ([M-H])	Rendement (%)
443	3323.52	3323.50	24
443 « click »	3323.52	3321.21	60
444	3393.57	3392.22	18
445	3397.56	3395.60	40
446	3323.52	3321.94	44
447	3064.56	3062.12	37
448	3211.64	3210.40	62

Tableau 15: Résultats des différents ODN synthétisés.

Les synthèses automatisées affichent des rendements, calculés en réalisant les dosages UV, compris entre 18 et 44 % ce qui reste conforme aux rendements obtenus lors de synthèses d'oligonucleotides modifiés. La chimie « click » permet d'obtenir l'ODN **443** selon une voie alternative. Le rendement des deux étapes (synthèse de l'ODN **447**+ réaction de « click ») est de 23 % ce qui est similaire au rendement de la synthèse automatisée de **443**. Cette approche est très prometteuse car elle permet de faire varier la modification à partir d'un oligonucléotide acétylénique.

Afin de voir si les amines situées sur les différentes bases azotées des oligonucléotides influençaient la méthylation, le phosphoramidite **439** a été introduit, par synthèse automatisée, à l'extrémité 5' d'un ODN contenant neuf thymidine afin d'obtenir le décathymidilate **449** (Figure 190).

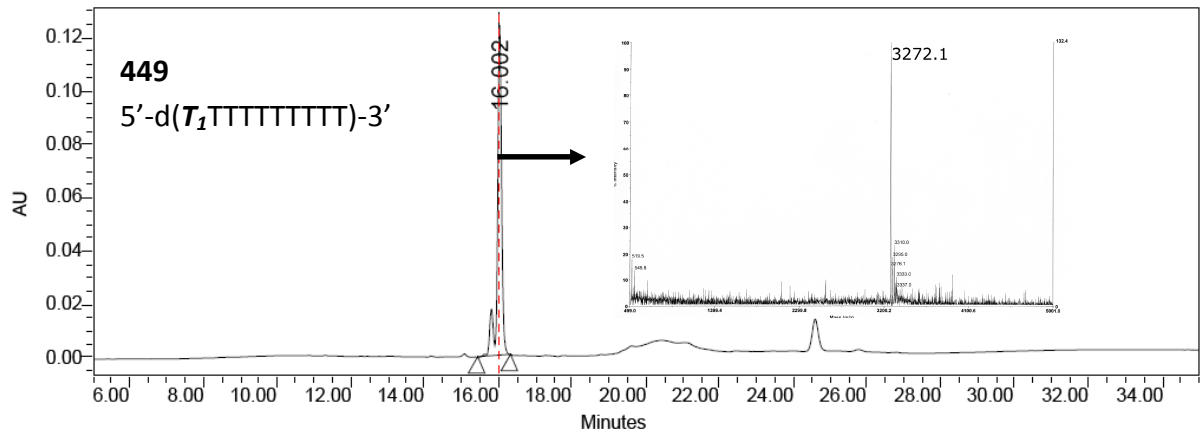
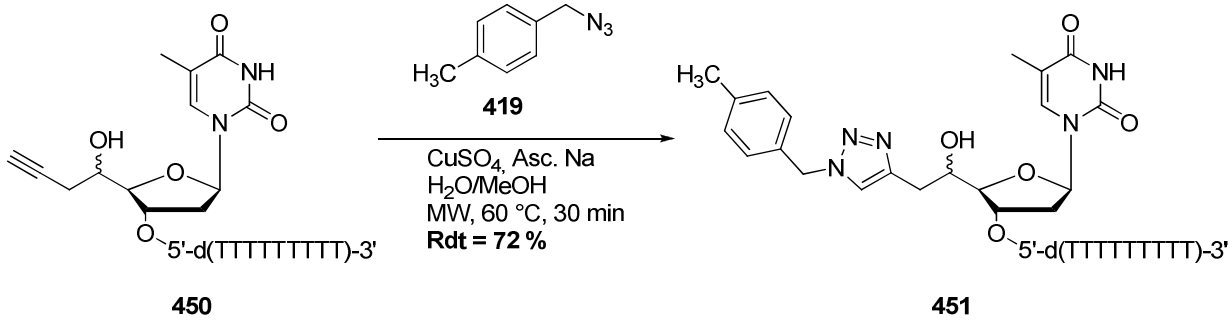
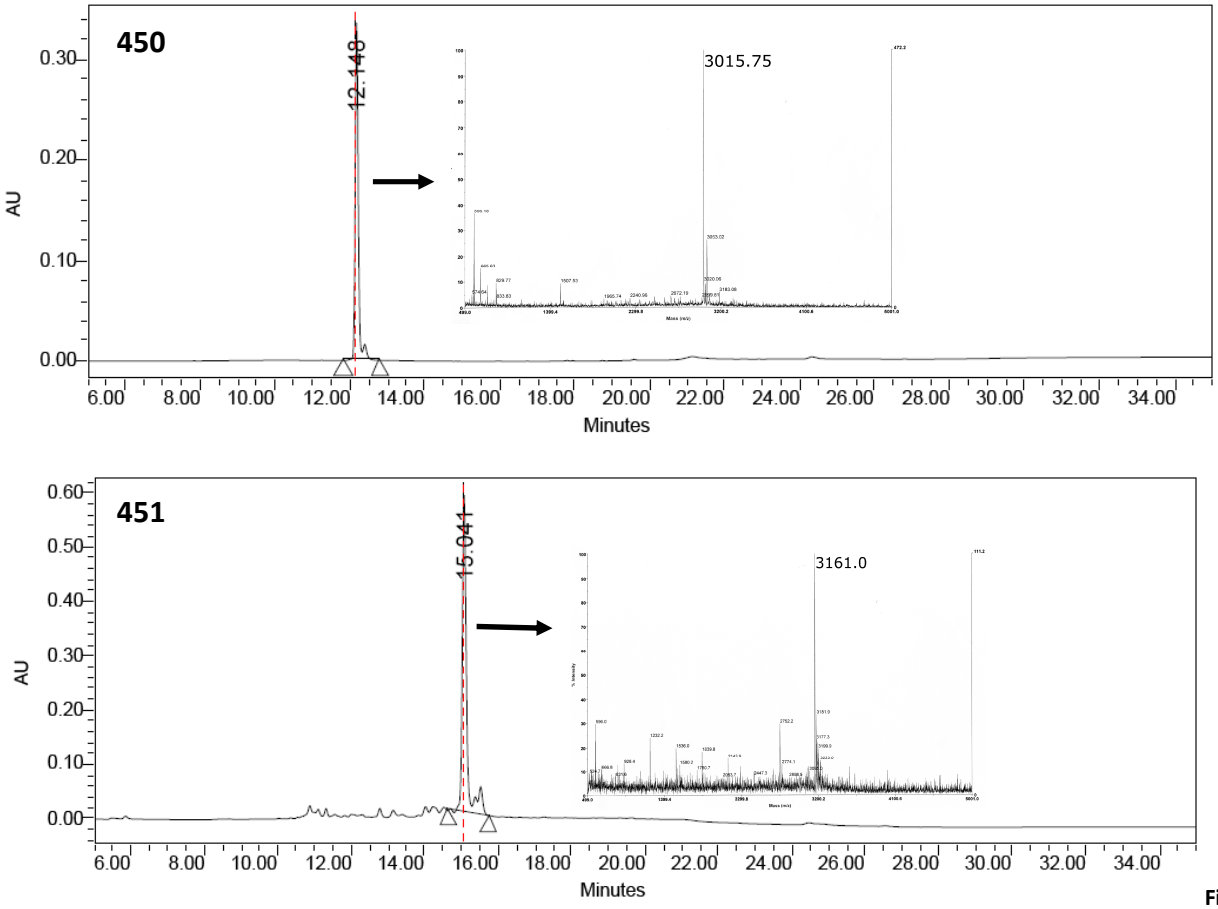


Figure 190: Chromatogramme HPLC et spectre de masse de 441.

Son homologue méthylé **451** a été synthétisé avec succès par chimie « click » à partir de l'ODN acétylénique **450** avec un rendement de 72 % (FigFigure 191).





Fig

Figure 191: Synthèse de l'ODN 451 par chimie « click » à partir de l'ODN 450.

Les séquences synthétisées ainsi que leurs masses moléculaires théoriques, observées et leurs rendements sont résumés dans le Tableau 16.

Séquences	Masses moléculaires théoriques	Masses moléculaires observées ([M-H])	Rendement (%)
449	3275.48	3272.10	50
450	3016.52	3015.75	15
451	3163.60	3161.00	72

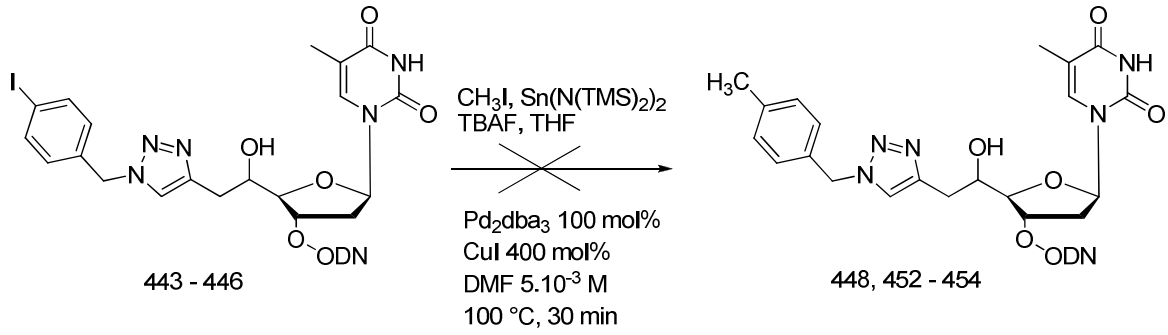
Tableau 16: Séquences et masses moléculaires calculées et observées des ODN 449, 450 et 451.

2 Etude de la méthylation des ODN

2.1 Première approche et limites de l'étude préliminaire

Les conditions mises au point dans la partie C ont permis de méthyler des thymidines modifiées dans des temps compatibles avec la chimie du carbone 11. Cependant les conditions, en terme de quantités utilisées, ne peuvent être appliquées à la méthylation d'oligonucléotides, synthétisés sur l'échelle de quelques micro-grammes. En effet, la méthylation d'1 µmol d'oligonucléotide nécessiterait 92 µg de Pd_2dba_3, 8 µg de CuI et 2 µL de DMF. Pour des raisons pratiques évidentes, il a donc été nécessaire d'augmenter la charge en palladium et de diminuer sensiblement la concentration en substrat afin de ne pas manipuler des quantités trop faibles de catalyseur et de solvant. Ainsi, la quantité de Pd_2dba_3 a été fixée arbitrairement à un équivalent (soit 0.92 mg), le CuI à quatre équivalents (soit 77 µg) et la concentration en substrat à 5.10^{-3} $mol.L^{-1}$ (soit 200 µL). Ces conditions sont tout à fait comparables à celles de la chimie du carbone 11 car la faible quantité de précurseur marqué impliquera que le catalyseur soit en large excès et que le milieu soit très dilué.

Ainsi la méthylation des 4 ODNs **443** - **446** a donc été réalisée dans les conditions décrites ci-dessous (Figure 192).



Séquence	Conversion (%)
448	Pas de conversion
452	Pas de conversion
453	Pas de conversion
454	Pas de conversion

Figure 192: Méthylation des ODNs 443 - 446 dans les conditions basées sur les conditions de la partie C.

Cependant, le suivi réactionnel par HPLC a montré l'absence à la fois de conversion et de dégradation du substrat de départ. Ceci signifie que l'étape d'addition oxydante du palladium

sur l'ODN n'a pas eu lieu. Ce manque de réactivité pourrait être dû à plusieurs facteurs et/ou l'association de plusieurs d'entre eux:

1. la haute dilution: la cinétique de réaction du couplage de Stille modifié étant d'ordre 1, une diminution de la concentration en substrat ralentit la réaction.

2. une mauvaise solubilité des ODNs dans le DMF,

3. la complexation du palladium catalytique par les phosphates constituants les liaisons phosphodiesters,

4. la complexation du Pd par les amines situées sur les bases azotées,

Face à ce constat, ces différents facteurs ont été étudiés sur le monomère car les quanités d'ODN disponibles n'ont pas permis de réaliser ces optimisations sur les substrats oligonucléotidiques.

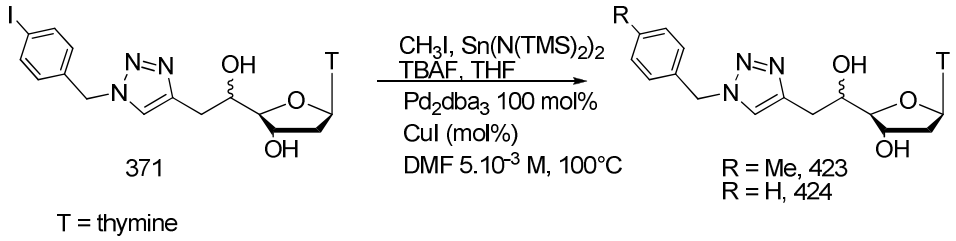
2.2 Adaptation des conditions à la spécificité du substrat

2.2.1 Adaptation du système aux conditions diluées

2.2.1.1 Sur un monomère

2.2.1.1.1 Influence de l'additif

Dans un premier temps, les conditions décrites précédemment sur les ODNs ont été appliquées à la méthylation de la thymidine **371**, thymidine modifiée la plus rapidement accessible (Tableau 17, entrée **1**). Une conversion totale a été observée en 60 min avec un ratio 81/19 en faveur du produit méthylé **423** à une concentration de 5.10^{-3} M confirmant l'importance de la concentration en substrat sur la cinétique de la réaction puisqu'à une concentration de 0.5 M, une conversion totale a été observée en 5 min. Ce paramètre étant fixé à 5.10^{-3} M, les autres paramètres ont été modifiés afin de retrouver une vitesse de réaction compatible avec la chimie du carbone 11. Ainsi, dans un premier temps, la quantité d'iodure de cuivre a été augmentée mais ceci provoque l'inhibition de la réaction en chauffage thermique (Tableau 17, entrées **2** et **3**). De manière surprenante, la conversion a été totale en 5 min avec un ratio 90/10 (chauffage classique) et 89/11 (sous micro-ondes) lorsque la réaction de méthylation a été réalisée en absence d'iodure de cuivre (Tableau 12, entrées **4** et **5**). Ces résultats montrent donc que les deux étapes successives de transmétallation (Sn → Cu puis Cu→ Pd) sont plus lentes que l'étape de transmétallation classique (Sn → Pd) à haute dilution.



Entrée	CuI (mol %)	Mode de chauffage		Conversion (%)	$t_{réaction}$ (min)	Ratio HPLC 423/424(%)
		Thermique	µondes			
1	400	X		100	60	81/19
2	1000	X		Pas de réaction	/	/
3	2000	X		Pas de réaction	/	/
4	/	X		100	5	90/10
5	/		X	100	5	89/11

Tableau 17: Méthylation de 371 à haute dilution

2.2.1.1.2 Détermination d'un système de solvants approprié

Dans un deuxième temps, le système de solvants a été modifié pour qu'il puisse à la fois solubiliser les oligonucléotides et que la réaction de méthylation se déroule dans de bonnes conditions. Ainsi, la méthylation a ensuite été étudiée dans des mélanges binaires DMF/DMSO (90/10) et DMF/H_2O (95/5). Les résultats montrent tout d'abord que dans le cas de réactions assistées par micro-ondes, la formation de produits secondaires est diminuée alors que la formation du produit méthylé est favorisée quelque soit le solvant utilisé (Tableau 18).

Entrée	Solvant	Mode de chauffage		Conv. (%)	t (min)	Ratio HPLC 423/424 (%)
		Thermique	µondes			
1	DMF/DMSO (9/1)	X		100	5	47/24 + impuretés
2	DMF/DMSO (9/1)		X	100	5	96/4
3	DMF/H_2O (95/5)	X		100	40	47/40 + impuretés
4	DMF/H_2O (95/5)		X	100	5	85/15
5	DMF/H_2O (95/5)		X	100	5	80/20 (130°C)

Tableau 18: Effet des micro-ondes sur la méthylation de 371 dans des systèmes de solvants binaires DMF/DMSO et DMF/H_2O.

On constate, en particulier, que dans le cas du système binaire DMF/H_2O (95/5), la réaction est huit fois plus rapide en utilisant les micro-ondes que le chauffage thermique (Tableau 18,

entrées **3** et **4**). Cependant un ratio modeste de 85/15 (Tableau 18, entrée **4**) a été obtenu en faveur du produit méthylé **423**. Ce ratio n'a pu être amélioré en augmentant la température. En effet, un ratio de 80/20 a été obtenu à 130°C (Tableau 18, entrée **5**). Compte tenu de ces observations, la suite de l'étude a donc été réalisée en totalité sous micro-ondes.

Par la suite, les quantités d'eau et de DMSO ont été augmentées afin de déterminer le système de solvants optimal permettant un compromis satisfaisant entre la solubilité des oligonucléotides, le temps de réaction, le taux de conversion et le ratio entre le produit méthylé **423** et le produit hydrodéhalogéné **424**.

Entrée	Solvant	Conversion (%)	tréaction (min)	Ratio HPLC 423/424 (%)
1	DMF/DMSO (9/1)	100	5	96/4
2	DMF/DMSO (3/1)	100	5	91/9
3	DMF/DMSO (1/1)	100	5	89/11
4	DMSO	89	10	65/9 + impuretés
5	DMF/H_2O (95/5)	100	5	85/15
6	DMF/H_2O (9/1)	100	5	60/40
7	DMF/H_2O (3/1)	100	5	31/36 + impuretés

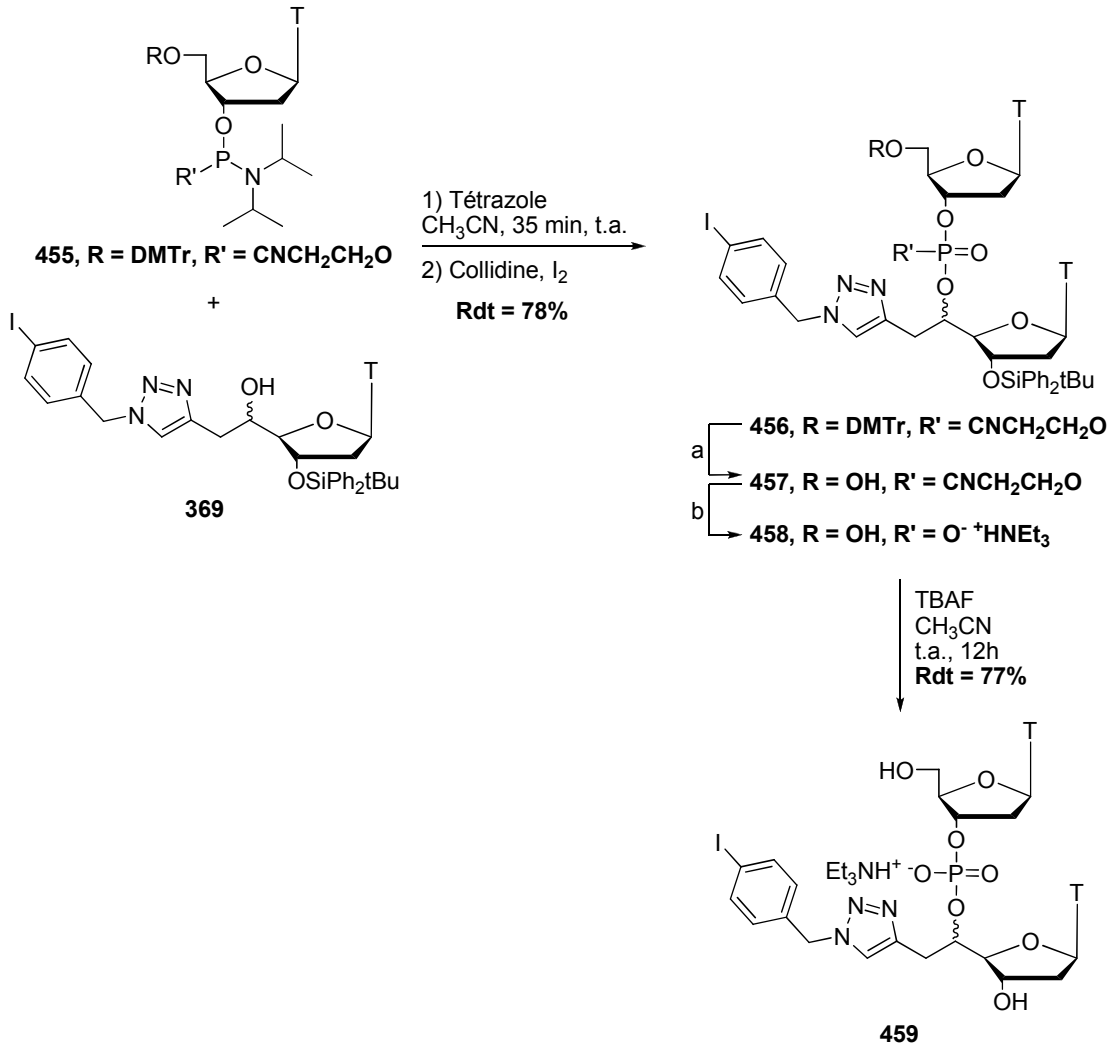
Tableau 19: Influence de la quantité d'eau et de DMSO dans le système de solvant au cours de la méthylation de 371.

Les résultats montrent que l'augmentation du DMSO ne perturbe pas la réaction de méthylation. En effet, la formation du produit méthylé **423** reste très majoritaire lorsque le couplage de Stille modifié est réalisé dans le mélange DMF/DMSO 3/1 (Tableau 19, entrée **2**) et 1/1 (Tableau 19, entrée **3**). En revanche, le DMSO utilisé seul entraîne la dégradation du substrat et ralentit la réaction (Tableau 19, entrée **4**).
En ce qui concerne le système DMF/H_2O, l'augmentation de la proportion d'eau favorise la formation du produit hydrodéhalogéné **424** (Tableau 19, entrée **6**) ainsi que la dégradation du milieu réactionnel (Tableau 19, entrée **7**).
De ce fait, le système binaire DMF/DMSO a été privilégié au système DMF/H_2O malgré une meilleure solubilité des oligonucléotides dans ce dernier.

2.2.1.2 Sur un dinucléotide

2.2.1.2.1 Synthèse d'un dinucléotide

Afin d'étudier l'influence d'une liaison phosphodiester sur la méthylation, la synthèse du dinucléotide **459**, composé de d'un thymidine modifiée et d'une thymidine a été envisagée. Pour cela, la méthode aux phosphoramidites a été utilisée (Figure 193). Le phosphoramidite commercial **455** réagit avec la thymidine modifiée **369** pour former le phosphite correspondant qui est oxydé en phosphate **457** par une solution d'iode en présence de collidine avec un rendement de 77%. Le dinucléotide déprotégé **451** sous forme de sel de triéthylammonium a ensuite été obtenu par précipitation dans Et_2O après coupures successives des différents groupements protecteurs.



T = thymine
Conditions: a. TFA 3%, CH_2Cl_2, 5 min, t.a., **98%**; b. NEt_3, CH_3CN, 1h, 60°C, **86%**

Figure 193: Synthèse du dinucléotide 459 selon la méthode aux phosphoramidites.

2.2.1.2.2 Etude du transfert de méthyle

La méthylation du dinucléotide **459** obtenu a ensuite été étudiée dans les conditions décrites dans le paragraphe précédent. Le suivi HPLC montre une conversion totale en 5 min avec la formation d'un seul produit lorsque la méthylation a été réalisée dans un mélange DMF/DMSO 9/1 (Figure 194). L'analyse en spectrométrie de masse de la fraction isolée en HPLC semi-préparative a révélé que le produit formé est bien le produit méthylé **460**.

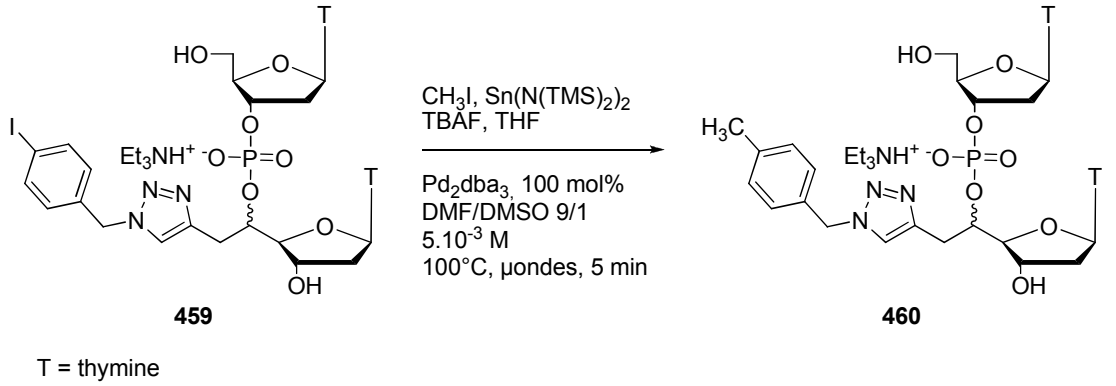


Figure 194: Méthylation de la dithymidine 459 modifiée dans le mélange binaire DMF/DMSO 9/1.

Un compromis intéressant a également été trouvé en augmentant la proportion de DMSO. En effet, une conversion totale a été observée en 5 min avec un ratio 87/13 en faveur du produit méthylé **460** en utilisant le système DMF/DMSO en proportions égales, plus favorable pour solubiliser l'ODN (Figure 195).

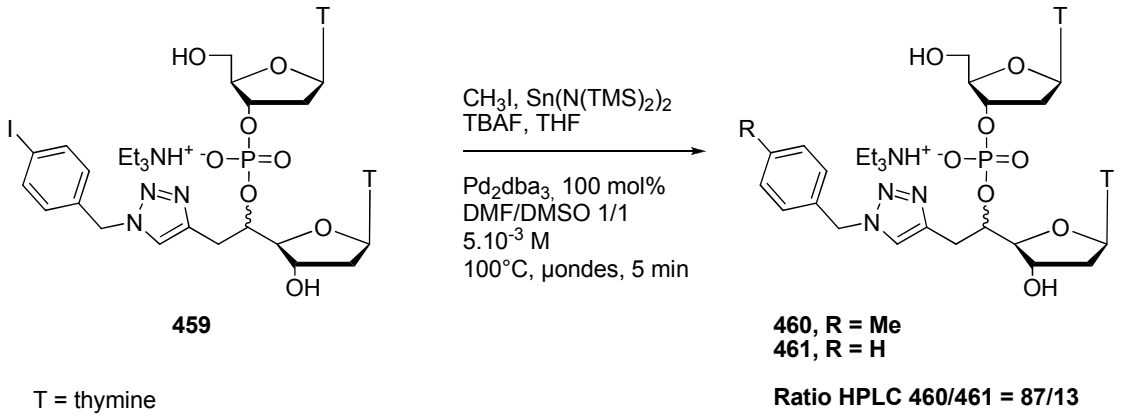
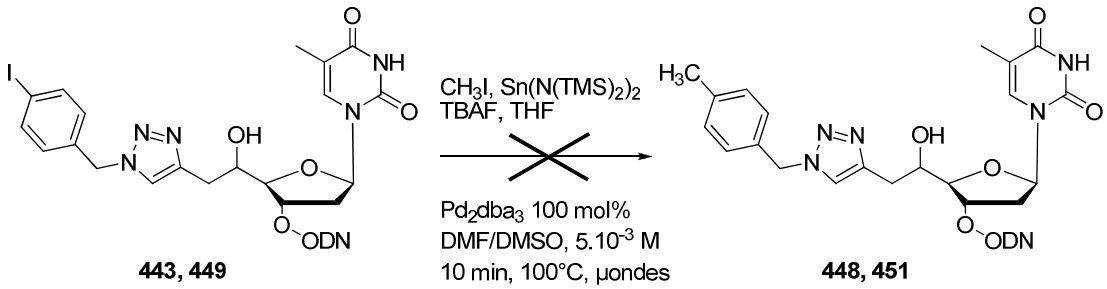


Figure 195: Méthylation de la dithymidine modifié 459 dans le mélange binaire DMF/DMSO 1/1.

Ces résultats montrent donc que la présence d'une seule liaison phosphodiester ne perturbe pas la réaction de méthylation.

2.2.1.3 Applications de conditions à la méthylation des ODN

Les conditions qui ont donné les meilleurs résultats de méthylation sur le dinucléotide **459** ont été appliquées à la méthylation des ODN **443** et **449**(Tableau 20).



Substrats	DMF/DMSO	Produit	Conversion
443	9/1	448	Pas de conversion
	1/1	448	Pas de conversion
449	9/1	451	Pas de conversion
	1/1	451	Pas de conversion

Tableau 20: Résultats des essais de méthylation des ODN 448 et 451.

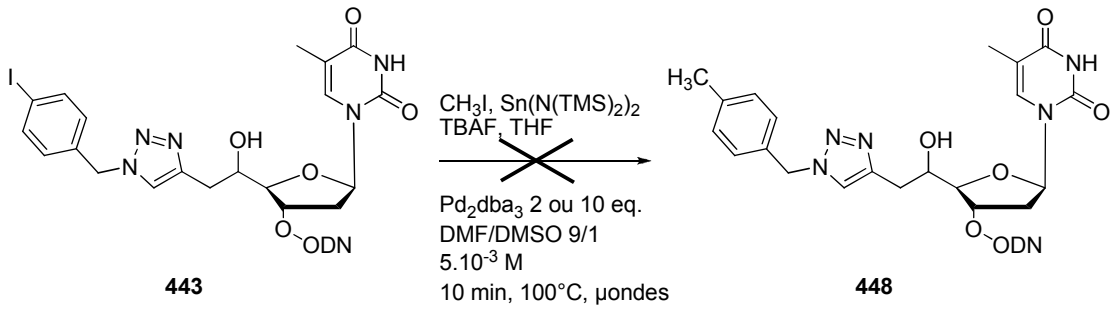
Quelque soit les conditions de solvant ou l'ODN utilisés, le suivi réactionnel par HPLC ne montre aucune conversion. Les produits de départ **443** et **449** n'ont pas été consommée et ont subit une légère dégradation quand le temps de réaction s'est prolongé. Dans la mesure où les résultats sont identiques pour les deux ODN, ceci prouve qu'un autre paramètre que la nature des bases empêche le transfert de méthyle. La complexation du palladium avec les liaisons phosphodiesters pourrait expliquer l'absence de conversion. C'est un problème spécifique à la nature oligonucléotidique du substrat nécessitant une étude supplémentaire. Pour cela deux possibilités ont été envisagées :

- augmenter la charge en palladium afin de mettre à disposition une quantité suffisante pour le transfert de méthyle
- modifier le système catalytique afin de diminuer la complexation par les liaisons phosphodiesters

2.2.2 Adaptation du système à la complexation du palladium

2.2.2.1 Augmentation de la charge en palladium

La méthylation de l'ODN **443** a été réalisé en présence de 2 et 10 équivalent de Pd_2dba_3 a 100 °C sous micro-ondes dans un mélange DMF/DMSO (9/1) (Figure 196). La réaction a été arrêtée après 10 min et le milieu réactionnel a été injecté en HPLC pour déterminer le taux de conversion.



ODN = 5'-d(GACTGACGC)-3'

Figure 196: Méthylation de 443 en présence de 2 et 10 équivalents de Pd_2dba_3.

Le suivi réactionnel par HPLC de la méthylation en présence de 2 équivalents de Pd_2dba_3 montre la formation d'un produit qui ne correspond pas à l'ODN **448** (Figure 197).

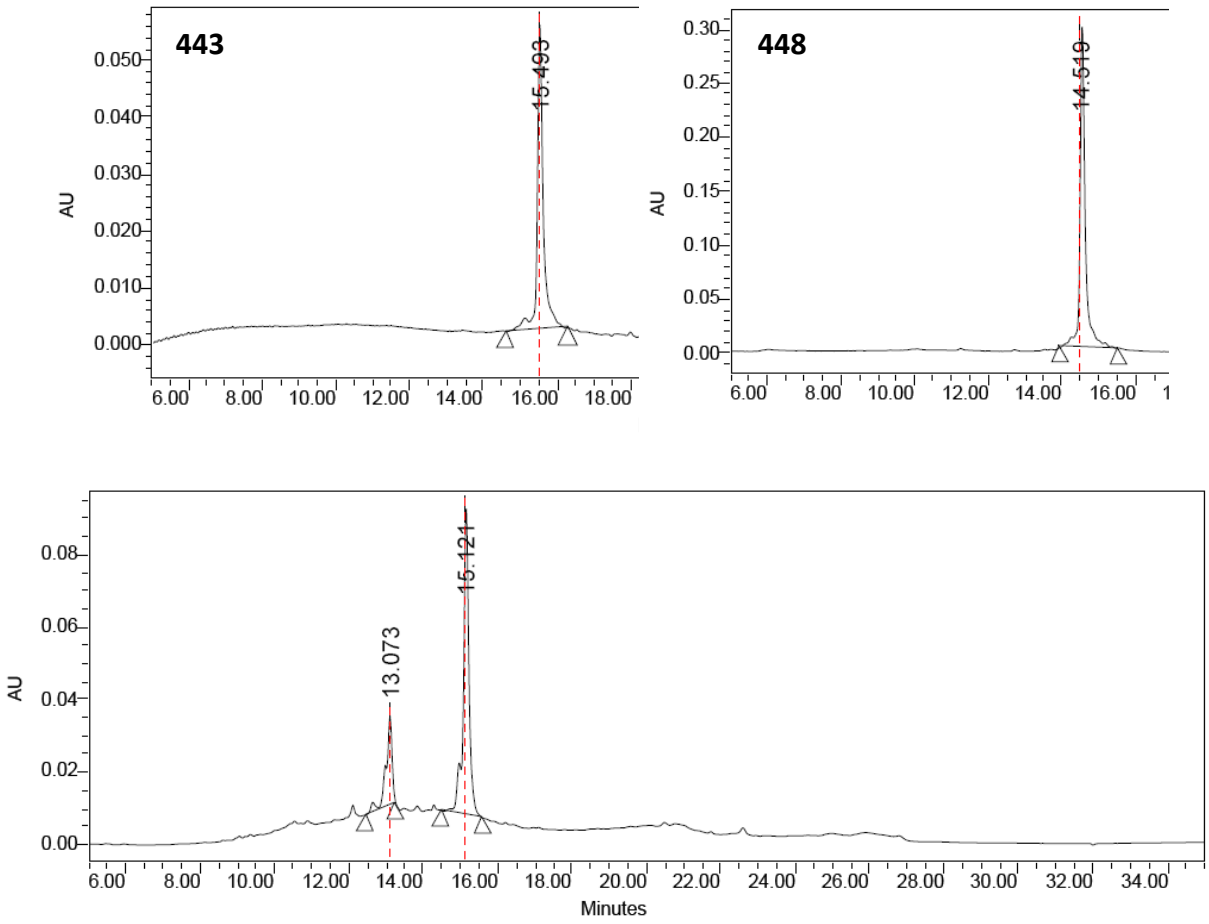


Figure 197: Suivi réactionnel par HPLC de la méthylation de 443 en présence de 2 eq. de Pd_2dba_3 dans un mélange DMF/DMSO 9/1.

L'utilisation de 10 équivalents de Pd_2dba_3 ne permet pas la formation du produit méthylé. Au contraire, le suivi par HPLC présente un profil «patatoïde» (Figure 198) qui pourrait être attribué aux possibles complexations par ces neuf liaisons phosphodiesters du palladium. Après purification par HPLC semi-préparative, le produit possédant un temps de rétention

proche de celui du produit méthylé **448** (tr = 14.7 min) s'est révélé être le produit de départ **443**.

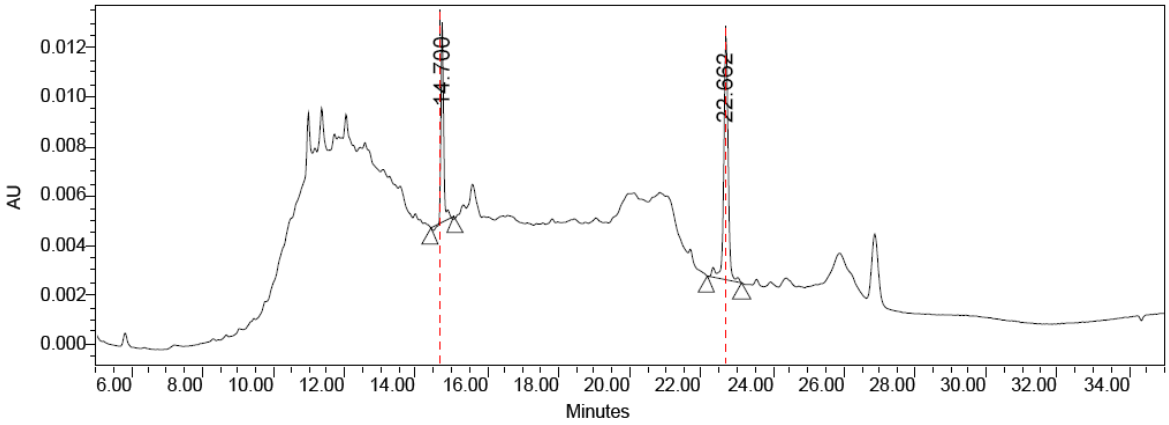


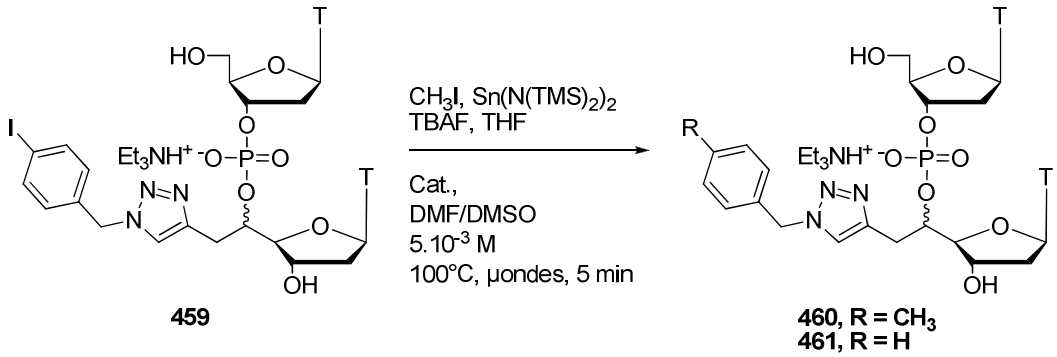
Figure 198: Suivi réactionnel par HPLC de la méthylation de 435 en présence de 10 équivalents de Pd_2dba_3 dans un mélange DMF/DMSO 9/1.

Ces essais n'ont pas été concluant quant à la formation du produit méthylé cependant ils ont permis de mettre en évidence une limite au dessus de laquelle le palladium se complexerait aux liaisons phosphodiesters. Il semblerait donc nécessaire de modifier le cycle catalytique afin de minimiser les effets de chélation et donc de favoriser le transfert de méthyle.

2.2.2.2 Utilisation de phosphines

2.2.2.2.1 Sur le dinucléotide **459**

$Pd(PPh_3)_4$ ainsi que l'utilisation du couple Pd_2dba_3/phosphine ont été envisagés pour remplacer Pd_2dba_3 dans le système catalytique. Possédant des groupements phosphines, les catalyseurs actifs seraient moins susceptibles d'être complexés par les liaisons phosphodiester présentes sur les ODNs. Avant de tester ces catalyseurs sur un ODN, des tests préliminaires ont été réalisés sur le dinucléotide **459** pour confirmer la faisabilité de la réaction (Tableau 21).



T = thymine

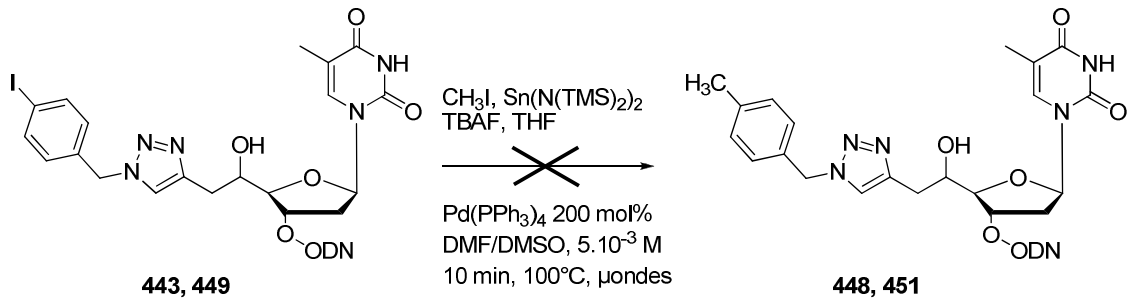
Entrée	Système catalytique (Eq.)	DMF/DMSO	Conversion (%)	$t_{réaction}$ (min)	Ratio HPLC 460/461
1	$Pd(PPh_3)_4$ (2)	9/1	100	5	90/10
2	$Pd(PPh_3)_4$ (2)	1/1	93	5	85/15
3	Pd_2dba_3 (1)/$P(Ph)_2Bu$ (4)	9/1	100	5	14/86
4	Pd_2dba_3 (1)/BINAP (2)	9/1	76	15	34/66

Tableau 21 : méthylation du dinucléotide 459 en présence de différents systèmes catalytiques.

En présence de 2 équivalents de $Pd(PPh_3)_4$, une conversion totale a été obtenu en 5 min à 100 °C sous micro-ondes avec un ratio de 90/10 en faveur du produit méthylé **460** dans le mélange DMF/DMSO 9/1 (Tableau 21, entrée **1**) et de 85/15 (Tableau 21, entrée **2**) dans un mélange DMF/DMSO 1/1. L'utilisation de l'association Pd_2dba_3 et de ligands phosphines monodentate (Tableau 21, entrée **3**) et bidentate (Tableau 21, entrée **4**) favorisent la formation du produit hydrodéhalogéné **461** ce qui confirme les observations réalisées dans la partie C.

2.2.2.2.2 Sur les ODNs **443** et **449**

Ces conditions ont finalement été appliquées à la méthylation des ODN **443** et **449** sans résultat puisque la formation des ODN **448** et de **451** n'est pas observée (Tableau 20). Le système catalytique n'est donc pas une des causes responsables de l'absence de conversion.



ODN	DMF/DMSO	Conversion
443	9/1	Pas de conversion
	1/1	Pas de conversion
449	9/1	Pas de conversion
	1/1	Pas de conversion

Tableau 22: Méthylation des ODN 443 et 449 en présence de $Pd(PPh_3)_4$.

3 Conclusion

Au cours de ce chapitre, le transfert de méthyle sur des oligonucléotides de la série ADN, par couplage de Stille modifié, a été étudié. Pour cela, deux types de séquences modèles d'oligonucléotides ont été synthétisées : différentes séquences comportant les quatre nucléosides et une autre séquence composée uniquement de thymidines.
Ces oligonucléotides ont pu être synthétisés suivant deux méthodes :

- Par introduction directe des thymidines modifiées au sein de la séquence par synthèse automatisée,

- Par chimie « click » à partir des oligonucléotides acétyléniques **447** et **450** obtenus en incorporant la 5'C-propargylthymidine au sein de la séquence par synthèse automatisée.

Les optimisations successives sur la thymidine modifiée **371** et le dinucléotide correspondant **459** ont permis de montrer que :

- la présence d'iodure de cuivre inhibe la réaction dans des conditions de hautes dilutions,
- le DMF peut être remplacé par un mélange composé de DMF et de DMSO dans les proportions 9/1, 3/1 ou 1/1 afin augmenter la solubilité des ODNs,
- la présence d'une seule liaison phosphodiester ne perturbe pas la réaction de méthylation.

Malgré ces optimisations, aucune conversion n'a été observée lorsque les conditions ont été transposées à la méthylation des ODNs. On peut donc envisager que la présence de groupements phosphates empêcherait la réaction de méthylation. Il semblerait donc judicieux d'étudier la méthylation sur des petits oligonucléotides composés de 3 ou 4 bases. De plus, la réaction de *N*-arylation d'oligonucléotides développée par l'équipe de Takamura-Enya[271] montre que le catalyseur Pd_2dba_3 est compatible avec les oligonucléotides. Bien que la réaction soit différente, cette publication nous encourage à penser que le méthylation d'oligonucléotide par couplage de Stille reste envisageable.

Les optimisations de transfert de méthyle ont été réalisé sur des ODN possédant le bras espaceur le plus petit ce qui pourrait avoir un impact sur le bon déroulement de la méthylation. Il serait donc judicieux d'appliquer les conditions optimisées sur les oligonucléotides **444** et **445**. En effet, un bras espaceur plus long pourrait permettre au groupement iodoaryle de s'écarter de l'ODN et d'être plus accessible pour la réaction de méthylation.

[271] Takamura-Enya T., Enomoto S., Wakabayashi K., *J. Org. Chem*. **2006**, 71, 5599.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'objectif principal de ces travaux était le développement de conditions du couplage de Stille modifié pour la méthylation de nucléosides et d'oligonucléotides dans le but de marquer des oligonucléotides spécifiques, appelés aptamères, au carbone 11.

Tout d'abord des conditions de synthèse ont été mises au point afin d'introduire le groupement iodoaryle, groupement le plus réactif pour le couplage de Stille modifié, sur l'adénosine dans la série ARN et la thymidine dans la série ADN, idéalement fonctionnalisées. Plusieurs nucléosides modifiés *via* divers groupements fonctionnels (phosphorothioate, liaison peptidique, triazole) ont donc été obtenues. Plus particulièrement, la réaction de chimie « click » a permis l'introduction du groupement iodoaryle sur des thymidines substituées sur le carbone en 5', obtenues par réaction de Sakuraï et par propargylation en présence du bromure de propargylzinc de la thymidine aldéhyde **335** (Figure 199).

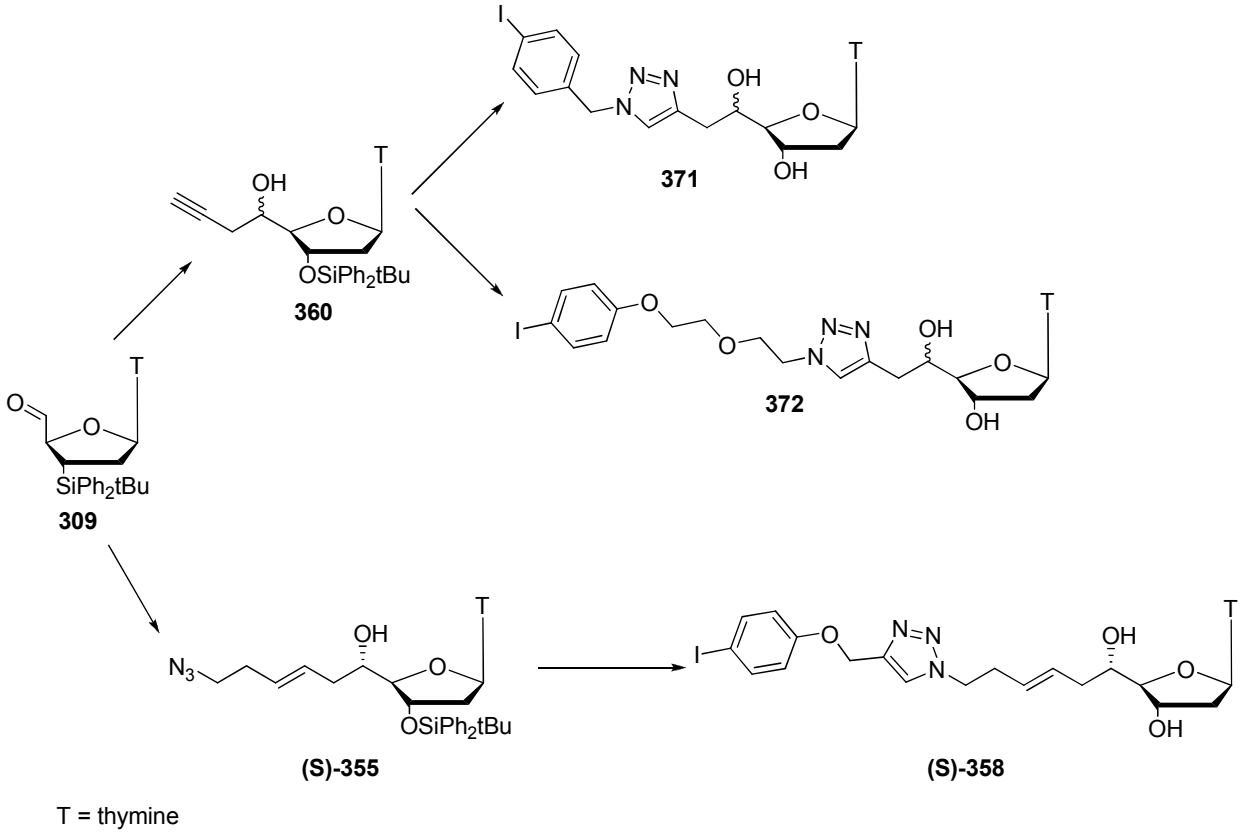


Figure 199:Voies de synthèse des thymidines modifiées par chimie "click".

Les 3 triazolyl-thymidines ont ensuite été converties en phosphoramidite avant d'être incorporées dans deux types de séquences modèles d'oligonucléotides. La chimie « click » constitue une alternative efficace puisqu'un des oligonucléotides et son homologue méthylé ont été obtenus à partir de l'oligonucléotide comportant la propargyl-thymidine **360** avec de bons rendements.

L'étude préliminaire de transfert de méthyle sur l'ensemble des nucléosides modifiés a montré que la réaction de méthylation est en concurrence directe avec la réaction d'hydrodéhalogénation favorisée par l'ajout de ligands phosphine. Cette étude a également mis en évidence que la réaction de méthylation peut être favorisée et accélérée par l'ajout catalytique d'iodure de cuivre et l'utilisation de micro-ondes. Les conditions optimales permettent une conversion totale en 5 à 10 min avec plus de 90% de produit méthylé. Ces résultats prometteurs confirment que la méthylation par couplage de Stille peut être considérée comme une alternative pour la [^{11}C]-méthylation de nucléosides utilisés en tant que tel comme radiotraceurs.

Dans un deuxième temps, les conditions de méthylation ont été transposées aux oligonucléotides. L'absence de conversion a nécessité différentes optimisations supplémentaires, réalisées sur la thymidine modifiée **371**, afin de respecter les contraintes liées à l'utilisation d'oligonucléotides (faible concentration, solubilité). La réaction de méthylation est ralentie en présence de CuI à haute dilution et peut être réalisée dans un système de solvant composé de DMF et de DMSO sans réduire l'efficacité du couplage. La méthylation sur un dimère obtenu à partir de la thymidine **371** montre que la présence d'une liaison phosphodiester est compatible avec le couplage de Stille modifié.

Malgré ces optimisations, le transfert de méthyle sur les oligonucléotides n'a pu être observé. La structure tridimensionnelle des oligonucléotides couplée à la présence de plusieurs liaisons phosphodiester pourraient complexer le palladium et expliquer le manque de réactivité.

La méthylation du dimère **459** donnant de bons résultats, il serait intéressant d'étudier la méthylation de tri, tetra ou pentamère afin de déterminer le nombre de liaisons phosphodiester au dessus duquel la méthylation n'est plus observée (Figure 200).

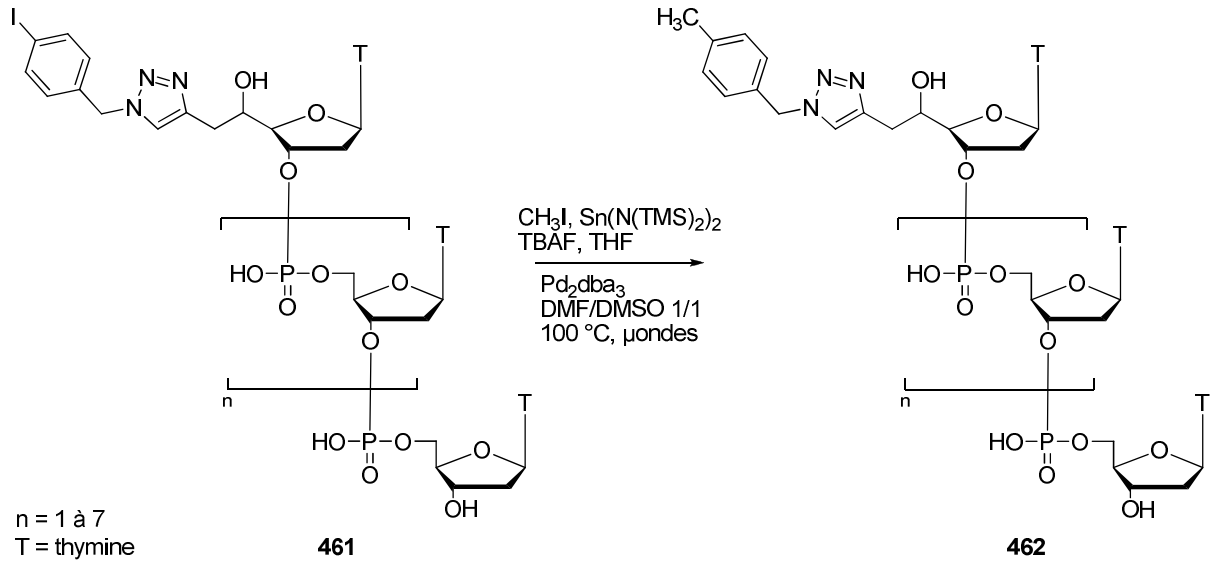


Figure 200: Méthylation de tri à nonamère par couplage de Stille modifié.

Par ailleurs, le problème de complexation pourrait être contourné en utilisant un catalyseur au palladium (0) supporté tel que le MCM-41-Pd(0) déjà utilisé efficacement dans le couplage de Stille[272].

Au sein du groupe du Pr. Fouquet, nous nous intéressons également au marquage d'oligonucléotides au ^{18}F par formation de liaison Si/F à partir de précurseur silane, synthétisé puis incorporé dans la séquence oligonucléotidique.

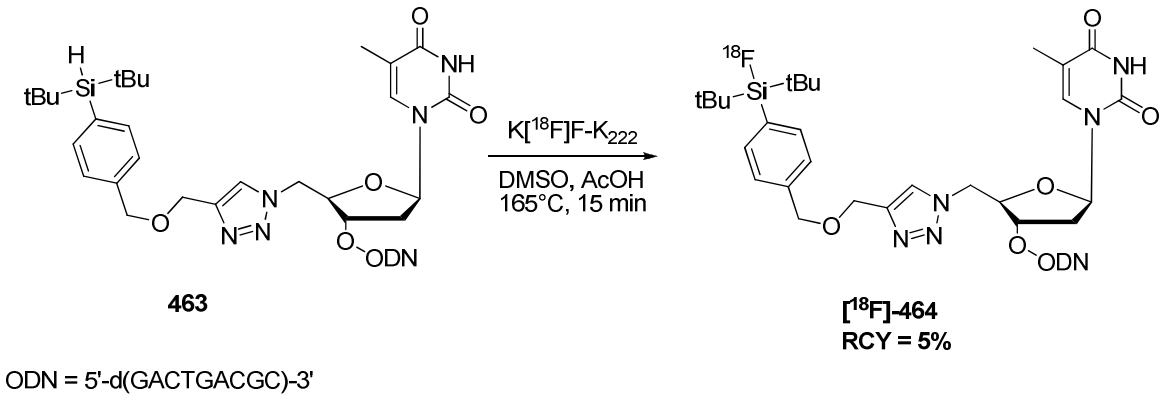
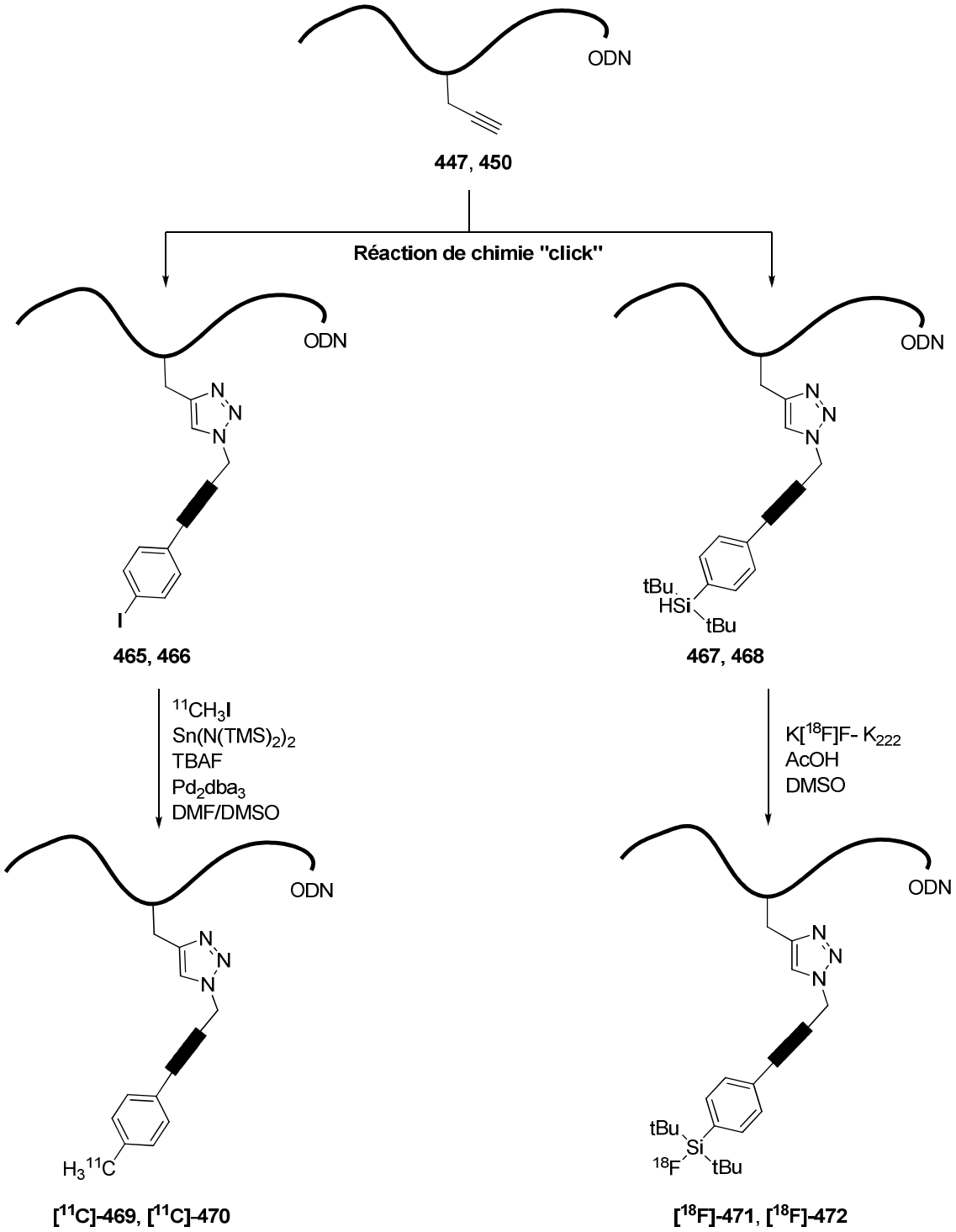


Figure 201: [^{18}F]-fluorations par formation de liaison Si-[^{18}F]F.

Les ODN acétyléniques **447** et **450** représentent donc un synthon clé pour incorporer soit la partie silane par chimie click permettant la [^{18}F]-fluoration soit la partie iodoaryle nécessaire au couplage de Stille modifié.

[272] Jana S., Haldar S., Koner S., *Tetrahedron. Lett.* **2009**, 50, 4820.


ODN
447, 450
Réaction de chimie "click"
ODN
N
N
N
I
465, 466
ODN
N
N
N
tBu
HSi
tBu
467, 468
$^{11}CH_3I$
$Sn(N(TMS)_2)_2$
TBAF
Pd_2dba_3
DMF/DMSO
K[^{18}F]F- K_{222}
AcOH
DMSO
ODN
N
N
N
$H_3{}^{11}C$
[^{11}C]-469, [^{11}C]-470
ODN
N
N
N
tBu
Si
^{18}F
tBu
[^{18}F]-471, [^{18}F]-472

EXPERIMENTAL PART

NOTATIONS

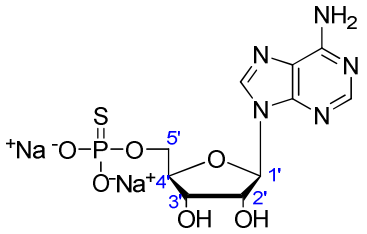
δ:	Chemical shift in ppm
AB:	AB system
°C:	Celcius degree
CEO:	2-cyanoethoxy
d:	Doublet
DCC:	*N,N*-dicyclohexylcarbodiimide
DCU:	*N,N*-dicyclohexylurea
DIEA:	*N,N*-diisopropylethylamine
DMF:	*N,N*-dimethylformamide
DMTrCl:	4,4'-Dimethoxytrityl chloride
DPPA:	Diphenylphosphorylazide
EA:	Ethyle acetate
eq:	Equivalent
ESI:	ElectroSpray Ionisation
Et_2O:	Diethyl ether
g:	Grammes
GC-MS:	Gaz Chromatography coupled with Mass Spectroscopy
HRMS:	High resolution mass spectroscopy
Hz:	Hertz
*i*Pr:	*Iso*-propyl
J:	Coupling constant in Hz
m:	Multiplet
M:	Concentration in $mol.L^{-1}$
MHz:	MegaHertz
mL:	Millilitre
mmol:	Millimole
mol:	Mole
m.p.:	Melting point in °C
NMR:	Nuclear Magnetic Resonance
PE:	Petroleum Ether
ppm:	Parts per million
PTSA:	*Para*-toluenetulfonic Acid
q:	Quintet
s:	Singlet
sex:	Sextuplet
t:	Triplet
TBDMS:	*Tert*-butyl-dimethyl-silyle
TFA:	Trifluoroacetic acid
TMEDA:	Tetramethylethylenediamine

Generalities

All water-sensitive reactions were carried out under a nitrogen atmosphere with dry solvents under anhydrous conditions. Yields refer to chromatographically and spectroscopically (^{1}H NMR) homogeneous materials. Commercial reagents were used without purification, unless otherwise stated. Macherey Nagel silica gel 60M (230-400 mesh ASTM) was used for flash chromatography. In some cases, silica gel was preliminary deactivated by mixing with 5% (v/v) of Et_3N. CH_2Cl_2 and $(i\text{-}Pr)_2NH$ were distilled over CaH_2. THF and Et_2O were distilled from sodium and benzophenone. Toluene was distilled from sodium. Acetone was distilled over calcium sulfate. Ethanol and methanol were dried over magnesium turnings activated by iodine. In some cases, THF, Et_2O, CH_2Cl_2, MeOH, and toluene were dried on a MB SPS-800. Micro-wave assisted reaction was carried out on a Biotage Initiator. HPLC was performed on a Waters 600 system equipped with a Waters 996 photodiode array detector. Analytical and semi-preparative HPLC were performed with a reversed-phase column (Phenomenex Luna C18, 5 µm, 250 x 4.6 mm and Kromasil C18, 5 µm, 250 x 20 mm) using the following solvent systems at 1 mL/min and 4 mL/min: Acetontrile (solvent A) and H_2O MilliQ (solvent C) for reactions on modified thymidines, Acétonitrile (solvent A) and $TEAA_{aq}$ (triethylammonium acetate) 50 mM at pH = 7 (solvent B) for reactions on modified dinucleotides and oligonucleotides. ^{1}H NMR and ^{13}C NMR were recorded on Brüker DPX-200 FT (^{1}H: 200 MHz, ^{13}C: 50.2 MHz), Brüker AC-250 FT (^{1}H: 250 MHz, ^{13}C: 62.9 MHz), Brüker Avance-300 FT (^{1}H: 300 MHz, ^{13}C: 75.5 MHz, 31P: 81.2 MHz) and Brüker DPX-400 FT (^{1}H: 400 MHz, ^{13}C: 100.2 MHz, 121.6 MHz) apparatus using indicated internal reference. The chemical shifts (δ) and coupling constants (*J*) are expressed in ppm and Hz respectively. Mass spectra were recorded on a Nermag R10-10C. High resolution mass spectra were performed by the CESAMO (Talence, France) and were recorded on a FT-IRC mass spectrometer Brüker 4.7T BioApex II. MALDI-MS spectra were performed by the CESAMO (Talence, France) on a Voyager mass spectrometer (Applied Biosystems). The instrument is equipped with a pulsed N_2 laser (337 nm) and a time-delayed extracted ion source. InfraRed (IR) spectra were recorded on a Perkin-Elmer Paragon 1000 FT-IR spectrophotometer. Melting points were uncorrected and determined using a Büchi-Totolli apparatus and Stuart Scientific apparatus (SMP3).

SYNTHESIS OF MODIFIED NUCLEOSIDES

AMPS: Adenosine 5'-*O*-monophosphorothioate

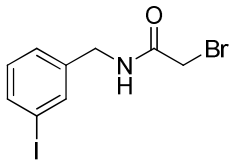


$C_{10}H_{12}N_5Na_2O_6PS$
407,25 g.mol^{-1}

Adenosine (500 mg, 1.89 mmoles) was suspended in 5 mL of triethyl phosphate. The suspension was stirred 10 min at 100°C. The solution was cooled rapidly to 0°C and the thiophosphoryl chloride (570 µL, 5.49 mmoles, 2.9 eq.) was slowly added. After 12 hr at 0-2°C, the resultant suspension was mixed with 20 mL of 10% aqueous barium acetate and kept at 20°C for 45 min. The solution was brought from pH 1.1 to 9 with triethylamine and the precipitate obtained on addition of 60 mL of 95 % ethanol was washed with 70% ethanol (three 40-ml portions) and extracted with H_2O (3 x 50 mL). The aqueous extract was passed through a column (25 x 200 mm) of DEAE-cellulose (HCO_3^- form) and a linear gradient of NH_4HCO_3 solution was passed through the column. Expected product eluting between 0.08 and 0.16 M NH_4HCO_3 was recovered and the fractions were evaporated to dryness. A solution of the residue in 7 mL of dry methanol was mixed with 6 mL of NaI 1M in dry acetone and the sodium salt was precipitated with 75 mL of acetone. The residue was washed with acetone (4 x 30 mL) and dried at 55°C/25 mm. 461 mg of AMPS as a white powder was recovered (yield = 60%, litt. 65%)

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O), δ_{ppm}: 4.15 - 4.27 (m, 2H, $H_{4'}$ and $H_{5'}$), 4.49 (d, 1H, *J = 2.9 Hz*, $H_{5'}$), 4.61 (t, 2H, *J = 4.1 Hz*, $H_{2'}$ and $H_{3'}$), 6.16 (d, *J = 5.6 Hz*, $H_{1'}$), 8.21 (s, 1H, CH adenine), 8.65 (CH adenine).
^{13}C NMR (75.5 MHz, D_2O), δ_{ppm}: 64.2 ($C_{5'}$), 70.7 ($C_{3'}$), 74.6 ($C_{2'}$), 84.3-84.4 ($C_{4'}$), 87.2 ($C_{1'}$), 118.5 (C adenine), 140.5 (CH adenine), 148.9 (C adenine), 152.1 (CH adenine), 156.3 (C adenine).
^{31}P NMR (81.2 MHz, D_2O), δ_{ppm}: 45.6.

289: 2-bromo-*N*-(3-iodobenzyl)acetamide

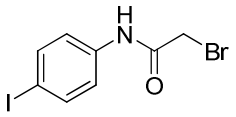


C_9H_9BrINO
353,98

To a solution of 3-iodobenzylamine (1 g, 4 mmol, 1 eq.) in CH_2Cl_2 (5 mL) were added *N*-methylmorpholine (384 µL, 4 mmol, 1 eq.) and bromoacetylbromide dropwise (373 µL, 4 mmol, 1eq.) at 0°C. The reaction mixture was then stirred 2h at room temperature. The precipitate formed was filtrated and the resulting filtrate was concentrated to dryness. The crude mixture was purified by flash chromatography (EA/PE 2/8) to afford 1.05 g of **289** as a white solid (74 % yield).

m.p. (°C): 103.1 - 103.8
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 3.93 (s, 1H, CH_2Br), 4.41 (d, 2H, *J = 6.9 Hz*, CH_2NH), 6.69 (s, 1H, NH), 7.03 – 7.12 (m, 1H, H phenyl), 7.25 (1H, d, *J = 6.9 Hz*, H phenyl), 7.63 (d, 2H, *J = 2.9 Hz*, H phenyl).
^{13}C NMR (81.2 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 29.4 (CH_2Br), 43.8 (CH_2NH), 95.0 (C-I), 127.3 (CH phenyl), 130.9 (CH phenyl), 137 (CHCl), 137.25 (CHCl), 140.1 (C-CH_2), 165.9 (C=O).
IR (film CH_2Cl_2), ν (cm^{-1}): 3275, 3051, 1639, 1545, 1456, 1420, 1204, 1061.
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_9H_{10}BrINO$ ($[M + H]^+$) 353.8990, found 353.8987.

290: 2-bromo-*N*-(4-iodophenyl)acetamide



C_8H_7BrINO
339,96 g.mol^{-1}

To a solution of 4-iodoaniline (2.24 g, 10 mmol, 1 eq.), Et_3N (1.4 mL, 10 mmol, 1eq) in CH_2Cl_2 (25 mL) were slowly added 10 mL of a solution of bromoactetylbromide (2.5 mL, 228 mmol, 2.8 eq.) at 0°C. The reaction mixture was stirred 1h at room temperature. The solvent was removed; the residue was solubilised in 20 mL of CH_2Cl_2, washed with 3 x 20 mL of H_2O, dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography (EA/PE: 1/9 → 3/7). 2.04 g of **290** as a white solid were recovered (60 % yield).

m.p. (°C): 173.3 - 173.6

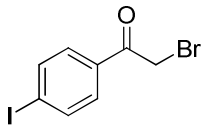
^{1}**H NMR** (250 MHz, acetone d_6), δ_{ppm}: 4.01 (s, 2H, C$\underline{H}_2$Br), 7.45 - 7.52 (m, 2H, C$\underline{H}$CNH), 7.62 - 7.68 (m, 2H, C$\underline{H}$Cl), 9.61 (s, 1H, N$\underline{H}$).

^{13}**C NMR** (63 MHz, acetone d_6), δ_{ppm}: 28.3 ($\underline{C}H_2$Br), 86.1 ($\underline{C}$I), 121.0 ($\underline{C}$HCNH), 137.4 (CH$\underline{C}$NH), 137.8 ($\underline{C}$HCl), 168.2 ($\underline{C}$=O).

IR (CH_2Cl_2), ν (cm^{-1}): 3257, 3186, 3114, 3069, 1673, 1610, 1542, 1483, 1391, 1331, 1242, 1183, 1003, 963, 823.

HRMS (ESI), m/z calculated for C_8H_8BrINO ($[M + H]^+$) 339.8834, found 339.8831.

291: 2-bromo-1-(4-iodophenyl)ethanone



C_8H_6BrIO
323,86 g.mol^{-1}

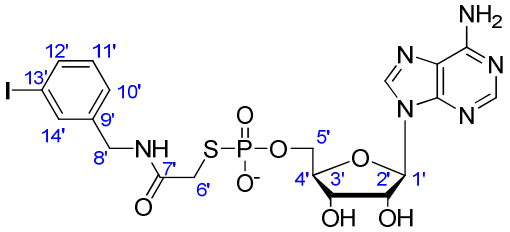
A solution of $TBABr_3$ (1.44g, 2.84 mmol, 1.5 eq.) and 4-iodoacetophenone (436 mg, 1.89 mmol, 1 eq.) in 60 mL of CH_2Cl_2/MeOH 2/1 v/v were stirred 1h at room temperature. Solvents were removed under vacuum and the residue was solubilized into 150 mL of Et_2O. The organic solution was washed with H_2O (4 x 50 mL), brine (50 mL). The organic layer was dried over MgSO4 and concentrated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography (EA/PE 2/98 → 5/95) affording 421 mg of **291** as a white solid (68 % yield).

m.p. (°C): 118.2 - 118.6
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 4.39 (s, 2H, CH_2Br), 7.68 (d, 2H, *J = 8.3 Hz*, CHCC=O), 7.87 (d, 2H, *J = 7.9 Hz*, CHCI).
^{13}C NMR (81.2 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 30.8 (CH_2Br), 102.7 (CI), 130.6 (CHCC=O), 132.6 (CC=O), 138.6 (CHCI), 191.1 (C=O).
IR (KBr disc), ν (cm^{-1}): 3419, 3129, 3075, 1694, 1581, 1396, 806.
GC-MS (electronic impact), m/z: 325.9 ($[M + H]^+$), 230.1 ($[M-CH_2Br]^+$).

General procedure for the conjugaison with AMPS

Adenosine 5'-monophosphorothioate salt **AMPS** (1 eq.) and brominated compounds **289** - **291** (1.1 eq.) were solubilized into acetonitrile (0.04 M) and phosphate buffer (PBS pH = 8, 0.04 M). The mixture was stirred 30 min at 70°C. Solvents were removed under vacuum and the crude residue was purified by flash chromatography (*i*PrOH/H_2O/NH_4OH: 90/5/5) affording the expected product as a white solid.

292*: O*-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-methyl-*S*-2-(3-iodobenzylamino)-2-oxoethyl *O*-hydrogen phosphorothioate

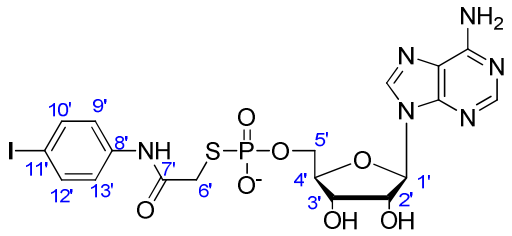


$C_{19}H_{22}IN_6O_7PS$
636,36 g.mol^{-1}

The product was synthesized according the general procedure using 235 mg of APMS and 221 mg of **289**. 238 mg of **292** as a white solid was recovered (66% yield).

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 3.41 (d, 2H, *J = 2.1 Hz*, $H_{6'}$), 4.05 - 4.09 (m, 2H, $H_{8'}$), 4.27 (s, 3H, $H_{4'}$ and $H_{5'}$), 4.38 - 4.3 (t, 1H, J = 4.8 Hz, $H_{3'}$), 4.57 (t, 1H, J = 5.1 Hz, $H_{2'}$), 6.06 (d, 1H, *J = 5.3 Hz*, $H_{1'}$), 7.01 (t, 1H, *J = 6.0 Hz*, $H_{11'}$), 7.22 (d, 1H, *J = 6.1 Hz*, $H_{10'}$), 7.51 - 7.62 (m, 2H, $H_{12'}$ and $H_{14'}$), 8.20 (s, 1H, CH adenine), 8.51 (s, 1H, CH adenine).
^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 34.7 ($C_{6'}$) 43.8 ($C_{8'}$), 66.7 ($C_{5'}$), 72.3 ($C_{3'}$), 76.1 ($C_{1'}$), 85.5 ($C_{4'}$), 89.4 ($C_{1'}$), 95.1 ($C_{13'}$), 120.4 (C adenine), 129.0 ($C_{10'}$), 131.5 ($C_{11'}$), 137.6 ($C_{12'}$ and $C_{14'}$), 141.3 (CH adenine), 142.4 ($C_{9'}$), 150.9 (C adenine), 153.5 (CH adenine), 157.1 (C adenine), 172.7 ($C_{7'}$).
^{31}P NMR (81.2 MHz, MeOD), δppm: 17.9.
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{19}H_{22}IN_6NaO_7PS$ ($[M + Na]^+$) 658.9950,found 658.9949.
HPLC: rt = 16.24 min (A/B: from 20/80 to 40/60 in 20 min then to 40/60 during 5 min then to 20/80 in 5 min)

293: *O*-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl S-2-(4-iodophenylamino)-2-oxoethyl *O*-hydrogen phosphorothioate

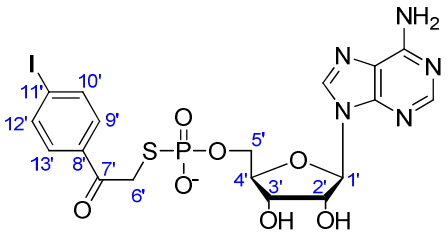


$C_{18}H_{19}IN_6O_7PS^-$
621,32

The product was synthesized according the general procedure using 100 mg APMS and 90 mg of **290**. 127 mg of **293** as a white solid was recovered (85% yield).

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 3.44 (d, 2H, *J = 15.4 Hz*, $H_{6'}$), 4.13 - 4.18 (m, 2H, $H_{5'}$), 4.23 (m, 1H, $H_{4'}$), 4.35 (t, 1H, *J = 4.8 Hz*, $H_{3'}$), 4.59 (t, 1H, *J = 5.3 Hz*, $H_{2'}$), 6.03 (d, 1H, *J = 5.3 Hz*, $H_{1'}$), 7.30 (d, 2H, *J = 9.0 Hz*, $H_{9'}$ and $H_{13'}$), 7.49 (d, 2H, *J = 9.1 Hz*), 8.20 (s, 1H, CH adenine), 8.47 (s, 1H, CH adenine).
^{13}C NMR (81.2 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 35.2 ($C_{6'}$), 66.5 ($C_{5'}$), 70.4 ($C_{3'}$), 73.6($C_{2'}$), 79.1 ($C_{4'}$), 82.3 ($C_{1'}$), 91.2 ($C_{11'}$), 118.8 (C adenine), 121.4 ($C_{9'}$ and $C_{13'}$), 138.5 ($C_{10'}$ and $C_{12'}$), 139.8 ($C_{8'}$), 143.3 (CH adenine), 148.7 (C adenine), 153.9 (CH adenine), 158.3 (C adenine), 171.2 ($C_{7'}$).
^{31}P NMR (121.6 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 17.9.
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{18}H_{20}IN_6NaO_7PS$ ($[M + Na]^+$) 644.9794, found 644.9791.
HPLC: rt = 13.66 min (A/B: from 20/80 to 40/60 in 20 min then to 40/60 during 5 min then to 20/80 in 5 min)

294: *O*-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl S-2-(4-iodophenyl)-2-oxoethyl *O*-hydrogen phosphorothioate

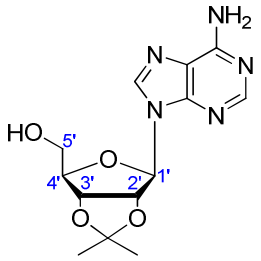


$C_{18}H_{18}IN_5O_7PS^-$
606,31

The product was synthesized according the general procedure using 100 mg of AMPS and 86 mg of **291**. 98 mg of **294** as a white solid was recovered (67% yield).

^{1}H NMR (250 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 4.13 - 4.25 (m, 7H, $H_{4'}$, $H_{5'}$, $H_{6'}$ and OH), 4.37 (t, 1H, *J = 4.2 Hz*, $H_{3'}$), 4.63 (t, 1H, *J = 4.8 Hz*, $H_{2'}$), 6.06 (d, 1H, *J = 5.2 Hz*,$H_{1'}$), 7.58 (d, 2H, *J = 8.5 Hz*, $H_{8'}$ and $H_{12'}$), 7.72 (d, 2H, *J = 8.5 Hz*, $H_{9'}$ and $H_{11'}$), 8.20 (s, 1H, CH adenine), 8.49 (s, 1H, CH adenine).
^{13}C NMR (63 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 41.3 ($C_{6'}$), 66.4 ($C_{5'}$), 71.7 ($C_{3'}$), 75.2 ($C_{2'}$), 83.5 ($C_{4'}$), 89.9 ($C_{1'}$), 97.1 ($C_{10'}$), 120.4 (C adenine), 133.5 ($C_{8'}$ and $C_{12'}$), 139.7.5 ($C_{9'}$ and $C_{11'}$), 141.3 (CH adenine), 142.4 ($C_{9'}$), 150.9 (C adenine), 153.5 (CH adenine), 157.1 (C adenine), 189.7 ($C_{7'}$).
^{31}P NMR (81.2 MHz, MeOD), δppm: 18.3.
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{18}H_{19}IN_5NaO_7PS$ ($[M + Na]^+$) 629.9685, found 629.9696.
HPLC: rt = 13.27 min (A/B: from 20/80 to 40/60 in 20 min then to 40/60 during 5 min then to 20/80 in 5 min)

295: 2', 3'-*O*-isopropylideneadenosine



$C_{13}H_{17}N_5O_4$
307,31 g.mol^{-1}

A suspension of adenosine (4 g, 15 mmol, 1 eq.), PTSA.H_2O (2.84 g, 15 mmol, 1 eq.) and dimethoxypropane (38 mL, 15 mmol, 1 eq.) in 150 mL of dry acetone was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with a solution of $NaHCO_3$ (1.260 g, 1.5 mmol, 1 eq.) in 38 mL H_2O. The mixture was concentrated to dryness and the white residue was purified by flash chromatography (MeOH/CH_2Cl_2 2/98 → 5/95). 4.6 g of **295** as a white solid was recovered (100% yield).

m.p. (°C): 220.7 - 221.2.

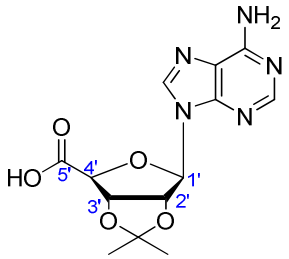
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO d_6), δ_{ppm}: 1.32 (s, 3H, CH_3 isopropylidene), 1.54 (s, 3H, CH_3 isopropylidene), 3.52 - 3.57 (m, 2H, $H_{5'}$), 4.22 (sext, 1H, *J = 2.3 Hz*, $H_{4'}$), 4.97 (dd, 1H, *J = 6.0* and *2.3 Hz*, $H_{3'}$), 5.26 (t, 1H, *J = 5.3 Hz*, OH), 5.34 (dd, 1H, *J = 6.0* and *3.0 Hz*, $H_{2'}$), 6.12 (d, 1H, *J = 6 Hz*, $H_{1'}$), 7.37 (s, 2H, NH adenine), 8.16 (s, 1H, CH adenine), 8.35 (s, 1H, CH adenine).

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO d_6), δ_{ppm}: 25.1 (CH_3 isopropylidene), 27.0 (CH_3 isopropylidene), 61.5 ($C_{5'}$), 81.3 ($C_{3'}$), 83.2 ($C_{2'}$), 86.3 ($C_{4'}$), 89.6 ($C_{1'}$), 113.0 (C isopropylidene), 119.1 (C adenine), 139.7 (CH adenine), 148.8 (C adenine), 152.6 (CH adenine), 156.1 (C adenine).

IR (CH_2Cl_2 film), ν (cm^{-1}): 3333, 3188, 2985, 2917, 1693, 1650, 1602, 1474, 1423, 1383, 1213, 1157, 1110, 1080, 1033, 1010, 850, 753.

HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{13}H_{17}N_5NaO_4$ ($[M + Na]^+$) 330.1178, found 330.1176.

296: 2',3'-*O*-isopropylidene-5'-uronic acid



$C_{13}H_{15}N_5O_5$
321,29 g.mol^{-1}

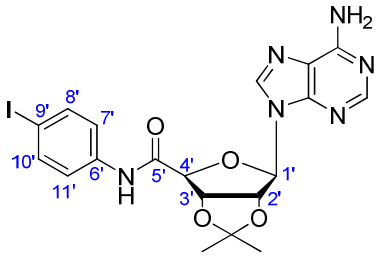
2',3'-*O*-isopropylideneadenosine **295** (350 mg, 1.14 mmol, 1 eq.) and KOH (190 mg, 3.42 mmol, 3 eq.) were dissolved into 75 mL of H_2O. A solution of $KMnO_4$ (544 mg, 3.42 mmol, 3 eq.) in 15 mL of H_2O was added dropwise and the purple mixture was stirred 3 days at room temperature in the dark. 4 mL of H_2O_2 7% v/v were then carefully added and the MnO_2 precipitate was filtered out. Half o the solvent was removed under vacuum and the residue was acidified to pH = 4 with HCL 1N. The carboxylic acid **296** was obtained by filtration as a white powder (281 mg, 77% yield).

m.p. (°C): 273.3 - 275.7 (litt. 273 - 276).
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO d_6), δ_{ppm}: 1.35 (s, 3H, CH_3 isopropylidene), 1.52 (s, 3H, CH_3 isopropylidene), 4.69 (s, 1H, $H_{4'}$), 5.51 (dd, 2H, *J = 20.7 Hz* and *5.6 Hz*, $H_{2'}$ and $H_{3'}$), 6.34 (s, 1H, $H_{1'}$), 8.1 (s, 1H, CH adenine), 8.26 (s, 1H, CH adenine).
^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO *d*6), δ_{ppm}: 24.9 (CH_3 isopropylidene), 26.4 (CH_3 isopropylidene), 83.4 ($C_{2'}$), 83.7 ($C_{3'}$), 85.3 ($C_{4'}$), 89.4 ($C_{1'}$), 112.6 (C isopropylidene), 118.7 (C adenine), 140.4 (CH adenine), 149.1 (C adenine), 152.1 (CH adenine), 155.8 (C adenine), 170.6 ($C_{5'}$).
IR (ATR), ν (cm^{-1}): 3387, 3260, 2980, 1706, 1615, 1500, 1407, 1379, 1205, 1105, 1054, 857, 769.
HRMS (ESI) submitted

General procedure for the synthesis of 2',3'-*O*-isopropylidene-5'-(*N*-carboxamido)-adenosine

A solution of uronic acid **296** (1 eq.), DIEA (3 eq.), DCC (2 eq.) and HOBt (2 eq.) in CH_2Cl_2 (0.08 M) was stirred 30 min at 0°C. Then a solution of amine (2 eq., 0.05 M in CH_2Cl_2) was added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Solvent was removed under vacuum and the residue was purified by flash chromatography ($MeOH/CH_2Cl_2$) affording the expected product as a white powder.

304: 2',3'-*O*-isopropylidene -5'-(*N*-(4-iodophenyl)-carboxamido)-adenosine



$C_{19}H_{19}IN_6O_4$
522,30 g.mol^{-1}

The product was synthesized according the general procedure using 67 mg of **296**, 145 µL of DIEA, 86 mg of DCC, 57 mg of HOBt and 92 mg of 4-iodoaniline. The crude was purified by flash chromatography ($MeOH/CH_2Cl_2$, 1/0 → 98/2) affording 88 mg of **304** as a white powder (80 % yield).

m.p. (°C): 71.8 - 72.6

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO *d_6*), δ_{ppm}: 1.37 (s, 3H, CH_3 isopropylidene), 1.57 (s, 3H, CH_3 isopropylidene), 4.78 (d, 1H, *J = 1.8 Hz*, $H_{4'}$), 5.49 (AB system, 2H, J_{AB} *= 1.8 Hz*, $H_{2'}$ and $H_{3'}$), 6.44 (s, 1H, $H_{1'}$), 7.09 (d, 2H, J = 8.7 Hz, $H_{7'}$ and $H_{11'}$), 7.24 (s, 2H, NH_2 adenine), 7.52 (d, 2H, *J = 8.7 Hz*, $H_{8'}$ and $H_{10'}$), 7.98 (s, 1H, CH adenine), 8.30 (s, 1H, CH adenine), 9.53 (s, 1H, NH amide).

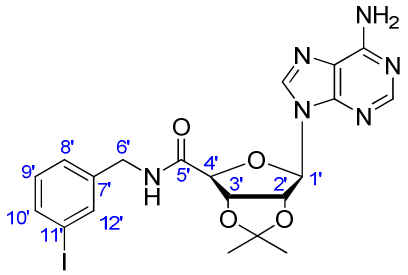
^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO *d_6*), δ_{ppm}: 25.0 (CH_3 isopropylidene), 26.6 (CH_3 isopropylidene), 83.3 ($C_{2'}$), 83.5 ($C_{3'}$), 86.3 ($C_{4'}$), 87.6 ($C_{9'}$), 89.8 ($C_{1'}$), 110.0 (C isopropylidene), 112.9 (C adenine), 122.2 ($C_{11'}$ and $C_{7'}$), 136.9 ($C_{8'}$ and $C_{10'}$), 137.5 ($C_{6'}$), 140.3 (CH adenine), 152.3 (C adenine), 155.9 (CH adenine), 156.6 (C adenine), 167.7 (C=O amide).

IR (ATR), n (cm^{-1}): 3385, 2972, 2924, 1648, 1603, 1537, 1470, 1426, 1382, 1336, 1299, 1212, 1091, 872, 851.

HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{19}H_{20}IN_6O_4$ ($[M + H]^+$) 523.0591, found 523.0589.

HPLC: rt = 10.62 min (A/C: from 50/50 to 70/30 in 11 min then to 80/20 in 1 min then to 80/20 during 2 min then to 50/50 in 5 min).

305: 2',3'-*O*-isopropylidene-5'-(*N*-(3-iodobenzyl)carboxamido)-adenosine



$C_{15}H_{17}INO_4$
402,20 g.mol^{-1}

The product was synthesized according the general procedure using 500 mg of **296**, 1.4 mL of DIEA, 643 mg of DCC, 412 mg of HOBt and 413 µL of 3-iodobenzylamine. The crude mixture was purified by flash chromatography (MeOH/CH_2Cl_2 1/99) affording 476 mg of **305** as a white powder (57 % yield).

m.p. (°C): 71.8 - 72.6.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO *d_6*), δ_{ppm}: 1.34 (s, 3H, CH_3 isopropylidene), 1.56 (s, 3H, CH_3 isopropylidene), 4.01 (ABd, 2H, J_{AB} *= 3.9 Hz* and *J = 6.4 Hz*, $H_{6'}$), 4.64 (s, 1H, $H_{4'}$), 5.36 (s, 2H, $H_{2'}$ and $H_{3'}$), 6.33 (s, 1H, $H_{1'}$), 7.01 - 7.05 (m, 1H, $H_{9'}$), 7.35 - 7.42 (m, 1H, $H_{10'}$), 7.54 - 7.56 (m, 2H, $H_{10'}$ and $H_{12'}$), 8.02 (s, 1H, CH adenine), 8.30 (s, 1H, CH adenine), 8.41 (t, 1H, J = 6Hz, NH amide).

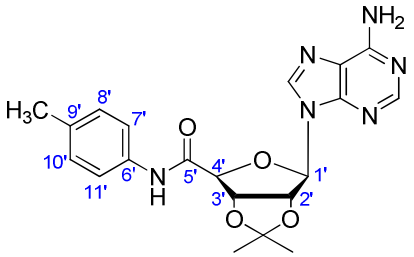
^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO *d_6*), δ_{ppm}: 25.1 (CH_3 isopropylidene), 26.8 (CH_3 isopropylidene), 41.2 ($C_{6'}$), 83.0 ($C_{2'}$ and $C_{3'}$), 85.3 ($C_{4'}$), 89.4 ($C_{1'}$), 94.6 ($C_{11'}$), 113.2 (C isopropylidene), 118.9 (C adenine), 126.5 ($C_{8'}$), 130.4 ($C_{9'}$), 135.4 ($C_{12'}$), 135.8 ($C_{10'}$), 140.1 ($C_{7'}$), 141.5 (CH adenine), 148.8 (C adenine), 152.5 (CH adenine), 156.0 (C adenine), 168.8 ($C_{5'}$).

IR (ATR), ν (cm^{-1}): 3380, 2979, 2925, 1650, 1596, 1533, 1474, 1421, 1376, 1331, 1295, 1210, 1091, 868, 850.

HRMS submitted

HPLC: rt = 14.17 min (A/C: from 50/50 to 70/30 in 11 min then to 80/20 in 1 min then to 80/20 during 2 min then to 50/50 in 5 min).

399: 2',3'-*O*-isopropylidene -5'-(*N*-(4-methylphenyl)-carboxamido)-thymidine

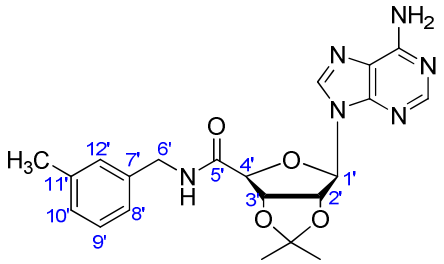


$C_{20}H_{22}N_6O_4$
410.17 g.mol^{-1}

The product was synthesized according the general procedure using 100 mg of **296**, 216 µL of DIEA, 128 mg of DCC, 84 mg of HOBt and 70 mg of *p*-toluidine. The crude was purified by flash chromatography (MeOH/CH_2Cl_2 1/0 → 98/2) affording 118 mg of **399** as a white powder (84 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO d_6), δ_{ppm}: 1.35 (s, 3H, CH_3 isopropylidene), 1.55 (s, 3H, CH_3 isopropylidene), 2.20 (s, 3H, CH_3), 4.75 (s, 1H, $H_{4'}$), 5.50 (ABd, 2H, J_{AB} = *1.2 Hz* and *J = 1.5 Hz*, $H_{2'}$ and $H_{3'}$), 6.39 (s, 1H, $H_{1'}$), 6.98 (d, 2H, *J = 8.4 Hz*, $H_{7'}$ and $H_{11'}$), 7.12 (d, 2H, *J = 8.5 Hz*, $H_{8'}$ and $H_{10'}$), 7.26 (s, 2H, NH_2 adenine), 8.00 (s, 1H, CH adenine), 8.30 (s, 1H, CH adenine), 9.41 (s, 1H, NH amide).
^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO d_6), δ_{ppm}: 22.8 (CH_3), 26.9 (CH_3 isopropylidene), 27.5 (CH_3 isopropylidene), 85.8 ($C_{2'}$ and $C_{3'}$), 88.5 ($C_{4'}$), 89.8 ($C_{1'}$), 108.4 (C isopropylidene), 115.4 (C adenine), 122.6 ($C_{11'}$ and $C_{7'}$), 131.2 ($C_{8'}$ and $C_{10'}$), 135.2 ($C_{9'}$), 137.6 ($C_{6'}$), 142.7 (CH adenine), 152.3 (C adenine), 155.0 (CH adenine), 156.6 (C adenine), 169.6 (C=O amide).
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{20}H_{22}IN_6O_4Na$ ($[M + Na]^+$) 433.1594, found 433.1596.
HPLC: rt = 6.99 min (A/C: from 50/50 to 70/30 in 11 min then to 80/20 in 1 min then to 80/20 during 2 min then to 50/50 in 5 min).

400: 2',3'-*O*-isopropylidene-5'-(*N*-(3-methylbenzyl)-carboxamido)-adenosine



$C_{21}H_{24}N_6O_4$
424,45 g.mol^{-1}

The product was synthesized according the general procedure using 100 mg of **296**, 272 µL of DIEA, 128 mg of DCC, 84 mg of HOBt and 78 µL of 3-methylbenzylamine. The crude was purified by flash chromatography ($MeOH/CH_2Cl_2$ 1/99 → 98/2) affording 69 mg of **400** as a white powder (52 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.38 (s, 3H, CH_3 isopropylidene), 1.63 (s, 3H, CH_3 isopropylidene), 2.28 (s, 3H, CH_3), 4,24 (ABd, 1H, J_{AB} = *2.5 Hz* and *5.3 Hz*, $H_{6'}$), 4.78 (s, 1H, $H_{4'}$), 5.27 - 5.36 (m, 2H, $H_{2'}$ and $H_{3'}$),6.01 (s, 3H, H1' and NH_2 adenine), 6.90 (d, *J = 7.5 Hz*, 2H, $H_{10'}$ and $H_{12'}$), 7.06 (d, 1H, *J = 7.5 Hz*, 1H, $H_{8'}$), 7.15 (t, *J = 7.5 Hz*, 1H, $H_{9'}$), 7.73 (s, 1H, CH adenine), 7.79 (s, 1H, CH adenine).

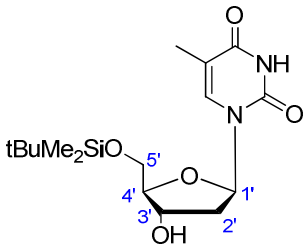
^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 21.3 (CH_3), 252 (CH_3 isopropylidene), 27.2 (CH_3 isopropylidene), 43.4 ($C_{6'}$), 82.5 ($C_{2'}$ and $C_{3'}$), 83.6 ($C_{4'}$), 85.5 ($C_{1'}$), 92.1 ($C_{11'}$), 114.7 (C isopropylidene), 120.3 (C adenine), 124.9 ($C_{10'}$), 128.3 ($C_{9'}$), 128.6 ($C_{10'}$), 127.7 ($C_{12'}$), 137.2 ($C_{7'}$), 138.4 (CH adenine), 139.9 (C adenine), 153.1 (CH adenine), 155.7 (C adenine), 168.8 ($C_{5'}$).

IR (ATR), ν (cm^{-1}): 3325, 1652, 1597, 1473, 1423, 1375, 1330, 1265, 1209, 1155, 1091, 867, 782.

HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{21}H_{25}N_6O_4$ ($[M + H]^+$) 425.1931, found 425.1928.

HPLC: rt = 11.84 min (A/C: from 50/50 to 70/30 in 11 min then to 80/20 in 1 min then to 80/20 during 2 min then to 50/50 in 5 min).

306: 5'-*O*-TBDMS-thymidine

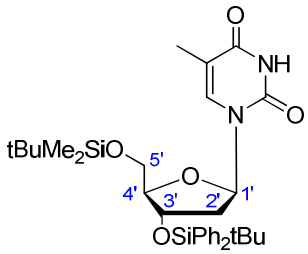


$C_{16}H_{28}N_2O_5Si$
356,49 g.mol^{-1}

Thymidine (25 g, 0.1 mol, 1 eq.) was suspended in 500 mL of pyridine and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (18.6 g, 0.12 mol, 1.2 eq.) was added. The reaction mixture was stirred 24 h at room temperature. Pyridine was removed and the residue was solubilized in 500 mL of EA. The organique layer was washed with 300 mL of NH_4Cl, 300 mL of water, 200 mL of brine, dried over MgSO4 and concentrated to dryness. 34,6 of **306** as a white foam (97% yield).

m.p. (°C): 182.0 - 182.4
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO d_6), δ_{ppm}: 0.09 (s, 6H, Si-CH_3), 0.91 (s, 9H, CH_3 *t*-Bu), 1.77 (d, 3H, *J = 0.6 Hz*, CH_3 thymine), 2.05 (m, 1H, $H_{2'}$), 2.07 (m, 1H, $H_{2'}$), 3.76 (dd, 1H, *J = 2.8* and *11.0 Hz*, $H_{5'}$), 3.80 (s, 1H, $H_{4'}$), 3.85 (dd, 1H, *J = 3.0 Hz* and *11.4 Hz*, $H_{5'}$), 4.20 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.26 (s, 1H, OH), 6.18 (m, 1H, $H_{1'}$), 7.49 (s, 1H, CH thymine), 11.30 (s, 1H, NH thymine).
^{13}C NMR (63 MHz, DMSO d_6), δ_{ppm}: -5.2 (Si-CH_3), 12.2 (CH_3 thymine), 19 (C t-Bu), 25.3 (CH_3 t-Bu), 39.8 ($C_{2'}$), 63.3 ($C_{5'}$), 70.0 ($C_{3'}$), 84.7 ($C_{1'}$), 87.1 ($C_{4'}$), 109.6 (Cq thymine), 137.9 (CH thymine), 148.5 (C=O thymine), 163.7 (C=O thymine).
IR (CH_2Cl_2 film), ν (cm^{-1}): 3611, 3398, 2955, 2931, 2864, 1689, 1463, 1276, 1135, 1079, 1050 and 881.
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{16}H_{29}N_2O_5Si$ ($[M + H]^+$) 357.1846, found 357.1847.

307: 3'-*O*-TBDPS-5'-*O*-TBDMS-thymidine

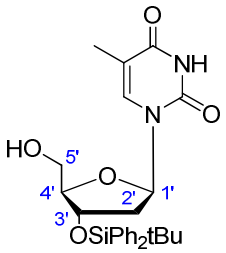


$C_{32}H_{46}N_2O_5Si_2$
594,89 g.mol^{-1}

Imidazole (43 g, 0.6 mol, 0.6 eq.) was added to a stirred solution of **306** (34.6 g, 0.097 mol, 1 eq.) in anhydrous DMF (300 mL) and *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (28.1 mL, 0.101 mol, 1.05 eq.). The solution was stirred overnight at room temperature. 500 mL of Et_2O and 200 mL of H_2O were added and the separated aqueous phase was extracted with ether (2 x 100 mL). The combined organic extracts were washed with H_2O (300 mL), brine (200 mL) and dried over $MgSO_4$. Removal of the solvent under vacuum afforded 54.8g of **307** as a white foam (95 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 0.21 (s, 6H, Si-CH_3), 0.83(s, 9H, CH_3 *t*-Bu), 1.09 (s, 9H, CH_3 *t*-Bu), 1.72 - 1.79 (m, 1H, $H_{2'}$), 1.85 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.19 - 2.25 (m, 2H, $H_{2'}$), 3.22 (1H, dd, *J = 10.8* and *2.0 Hz*, $H_{5'}$), 3.57 (dd, 1H, *J = 11.2* and *1.7 Hz*, $H_{5'}$), 3.87 (s, 1H, $H_{4'}$), 4.31 - 4.38 (m, 1H, $H_{3'}$), 6.49 - 6.52 (m, 1H, $H_{1'}$), 7.37 - 7.44 (m, 6H, CH phenyl), 7.60 - 7.64 (m, 5H, CH phenyl and CH thymine).
^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 5.1 (Si-CH_3), 5.4 (Si-CH_3), 12.3 (CH_3 thymine), 18.3 (C *t*-Bu), 19.2 (C *t*-Bu), 27.1 (CH_3 *t*-Bu), 40.5 ($C_{2'}$), 64.3 ($C_{5'}$), 76.1 ($C_{3'}$), 83.0 ($C_{1'}$), 95.3 ($C_{4'}$), 111.2 (C thymine), 128.5 (CH phenyl), 131.3 (CH phenyl), 134.1 (CH phenyl), 135.8 (C phenyl), 138.6 (CH thymine), 150.6 (C=O thymine), 164.1 (C=O thymine).
IR (CH_2Cl_2 film), ν (cm^{-1}): 3397, 3952, 2937, 2860, 1694, 1468, 1393, 1325, 1293, 1277, 1104, 1062, 1004, 969.
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{32}H_{47}N_2O_5Si_2$ ($[M + H]^+$) 595.3056, found 595.3052.

308: 3'-*O*-TBDPS-thymidine

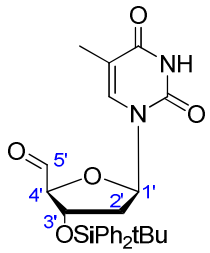


$C_{26}H_{32}N_2O_5Si$
480,63 g.mol^{-1}

PTSA.H_2O (1.9 g, 10 mmol, 0.1 eq.) was added to a solution of **307** (58.6 g, 98 mmol, 1 eq.) in 300 mL of MeOH (HPLC grade). The purple solution was stirred overnight at room temperature. Solvent was removed under vacuum. The residue was solubilized in 300 mL of EA and 150 mL of saturated $NaHCO_3$ was added. The organic layer was washed with 150 mL of H_2O, 150 mL of brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. 43.6 g of **308** was obtained by precipitation in PE as a white foam (93% yield).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 0.88 (s, 9H, CH_3 *t*-Bu), 1.87 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.07 - 2.24 (m, 2H, $H_{2'}$), 3.62 - 3.69 (m, 1H, $H_{5'}$), 4.01 (s, 1H, $H_{4'}$), 4.05 - 4.13 (m, 1H, $H_{5'}$), 4.54 (dd, *J = 6.0* and *3.2 Hz*, $H_{3'}$), 6.22 - 6.25 (m, 1H, $H_{1'}$), 7.39 - 7.42 (m, 7H, CH phenyl and CH thymine), 7.62 - 7.64 (m, 4H, CH phenyl).
^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.3 (CH_3 thymine), 19.1 (C *t*-Bu), 26.1 (CH_3 *t*-Bu), 40.3 ($C_{2'}$), 64.3 ($C_{5'}$), 73.4 ($C_{3'}$), 86.1 ($C_{1'}$), 88.3 ($C_{4'}$), 109.8 (C thymine), 127.9 (CH phenyl), 129.9 (CH phenyl), 133.2 (C phenyl), 134.5 (CH phenyl), 137.4 (CH thymine), 150.2 (C=O thymine), 163.2 (C=O thymine).
IR (CH_2Cl_2 film), ν (cm^{-1}): 3605, 3403, 2967, 2942, 2859, 1695, 1444, 1274, 1128, 1069, 1037, 872.
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{26}H_{33}N_2O_5Si$ ($[M + H]^+$) 481.2113, found 481.2111.

309: 3'-*O*-TBDPS-5'-thymidine aldehyde

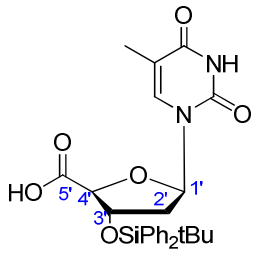


$C_{26}H_{30}N_2O_5Si$
478,61 g.mo^{l-1}

To a solution of **308** (38 g, 79 mmol) and DCC (65 g, 317 mmol, 4 eq.) in 250 mL of DMSO was dropwise added a solution of dichloroacetic acid (3.3 mL, 40 mmol, 0.5 eq.) in 10 mL of DMSO. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and oxalic acid (30 g, 237 mmol, 3 eq.) was slowly added at 0°C. The mixture was stirred 1h at 0°C and DCU was filtered out. The filtrate was diluted with 500 mL of EA and neutralized with $NaHCO_3$. The organic layer was washed with H_2O (3 x 200 mL) and brine (200 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. 29.5 g of **309** were recovered by crystallization in PE (78% yield).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 0.88 (s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.89 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.01 - 2.19 (m, 2H, $H_{2'}$), 3.85 (s, 1H, $H_{4'}$), 4.64 (m, 1H, $H_{3'}$), 6.54 (dd, 1H, *J = 8.7* and *5.8 Hz*, $H_{1'}$), 7.43 - 7.48 (m, 7H, CH phenyl and CH thymine), 7.62 - 7.67 (m, 4H, CH phenyl), 8.89 (s, 1H, NH thymine), 9.05 (s, 1H, $H_{5'}$).
^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}:12.3 (CH_3 thymine), 19.3 (C *t*Bu), 26.1 (CH_3 *t*Bu), 39.5 ($C_{2'}$), 73.7 ($C_{3'}$), 83.0 ($C_{1'}$), 94.8 ($C_{4'}$), 109.6 (C thymine), 127.8 (CH phenyl), 129.8 (CH phenyl), 134.5 (CH phenyl), 135.5 (C phenyl), 137.9 (CH thymine), 148.5 (C=O thymine), 163.7 (C=O thymine), 198.6 ($C_{5'}$).
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{26}H_{29}O_5Si$ ($[M - H]^-$) 477.1885, found 477.1832.

313: 3'-*O*-TBDPS-5'-thymidinic acid



$C_{26}H_{30}N_2O_6Si$
494,61 g.mol^{-1}

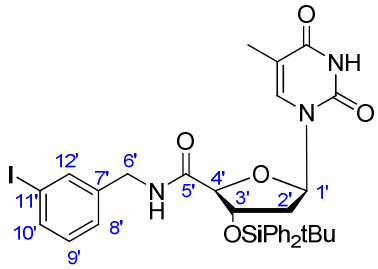
309 (1.0 g, 2.09 mmol, 1 eq.) and 2-methylpent-2-ene (1.48 mL, 14.7 mmol) were solubilized in *t*BuOH (13 mL), THF (7.5 mL) and a solution of KH_2PO_4 (0.3 g, 2.2 mmol, 1.05 eq.) in H_2O (6 mL). Then a solution of $NaClO_2$ (570 mg, 6.27 mmol, 3 eq.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred 1h at room temperature. The reaction was quenched by the addition of 12 mL of HCl 1N and 200 mL of EA were added. The organic layer was washed with 50 mL of H_2O and 50 mL of brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. 1.0 g of **313** was obtained without purification as a white solid (95 % yield).

m.p. (°C): 239.5 - 240.1.
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO d_6), d_{ppm}: 1.05 (s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.74 (s, 3H, CH_3 thymine), 1.94 - 2.13 (m, 2H, $H_{2'}$), 4.48 (s, 1H, $H_{4'}$), 4.63 (d, 1H, *J = 3.6 Hz*, $H_{3'}$), 6.46 (q, 1H, *J = 5.1 Hz*, $H_{1'}$), 7.42 - 7.49 (m, 6H, CH phenyl)e, 7.62 (d, 4H, J = 6.9 Hz, CH phenyl), 7.96 (s, 1H, CH, thymine), 11.34 (s, 1H, OH acid).
^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO d_6), d_{ppm}: 10.5 (CH_3 *t*Bu), 16.6 (CH_3 thymine), 24.5 ($C_{2'}$), 74.35 ($C_{3'}$), 82.2 ($C_{4'}$), 83.3 ($C_{1'}$), 107.3 (C thymine), 125.9 (CH phenyl), 128.1 (C phenyl), 130.3 (C phenyl), 133.2 (CH phenyl), 134.1 (CH thymine), 148.4 (C=O thymine), 161.5 (C=O thymine), 169.6 ($C_{5'}$).
IR (ATR), n (cm^{-1}): 3330, 2931, 2844, 1721, 1465, 1443, 1425, 1331, 1295, 1277, 1104, 1079, 819, 702.
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{26}H_{29}N_2O_6Si$ ($[M-H]^-$) 493.1800, found 493.1819.

General procedure for the synthesis of 5'-(*N*-carboxamido)-thymidine

To a solution of **313** (1 eq.), amine (2.1 eq.) and Et_3N (2.1 eq.) in dry DMF (0.1 M) was added the diphenylphosphoryl azide (DPPA) (2.1 eq.) at -10°C. The reaction mixture turned to yellow and was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was diluted with EA and washed with H_2O then brine. The organic layer was dry over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography affording the expected product as a foam.

321: 3'-*O*-TBDPS-5'-(*N*-(3-iodobenzyl)-carboxamido)-thymidine

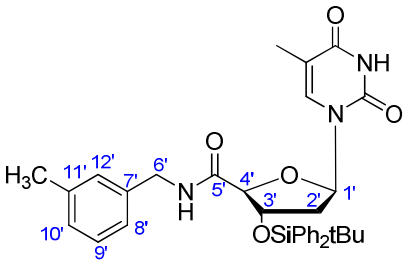


$C_{33}H_{36}IN_3O_5Si$
709,65 g.mol^{-1}

The product was synthesized according the general procedure using 250 mg of **313**, 245 mg of 3-iodobenzylamine, 85 µL Et_3N and 135 µL of DPPA. The crude product was purified by flash chromatography (EA/CH_2Cl_2 5/95 → 25/75) affording 220 mg of **321** as a light brown foam (77 % yield).

m.p. (°C): 76.2 - 77.8.
^{1}H NMR (300MHz, DMSO d_6), δ_{ppm}: 1.10 (s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.87 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.23 - 2.26 (m, 2H, $H_{2'}$), 4.10 (ABd, 2H, J_{AB} = 2.8 Hz, *J = 6.0 Hz*, $H_{6'}$), 4.25 (s, 1H, $H_{4'}$), 4.57 - 4.58 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.61 (t, 1H, *J = 4.2 Hz*, NH amide), 6.44 - 6.49 (m, 1H, $H_{1'}$), 7.02 - 7.07 (m, 2H, $H_{8'}$ and $H_{9'}$), 7.25 - 7.44 (m, 8H, $H_{10'}$, $H_{12'}$ and CH phenyl), 7.62 - 7.71 (m, 4H, CH phenyl), 7.81 (s, 1H, CH thymine), 8.76 (s, 1H, NH amide).
^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO d_6), δ_{ppm}: 12.6 (CH_3 thymine), 18.9 (C *t*Bu), 26.9 (CH_3 *t*Bu), 38.8 ($C_{2'}$), 42.1 ($C_{6'}$), 76.3 ($C_{3'}$), 85.5 ($C_{1'}$), 85.7 ($C_{4'}$), 92.9 ($C_{11'}$), 109.9 (C thymine), 128.2 ($C_{8'}$ and $C_{9'}$), 129.7 (CH phenyl), 130.4 (C phenyl), 135.6 ($C_{10'}$ and $C_{12'}$), 136.8 (CH thymine), 139.1 ($C_{7'}$), 150.1 (C=O thymine), 163.9 (C=O thymine), 169.8 (C=O amide).
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3300, 3072, 2964, 2854, 1678, 1544, 1472, 1425, 1275, 1233, 1100, 1067, 707.
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{33}H_{37}IN_3O_5Si$ ($[M + H]^+$) 710.1541, found 710.1540.

401: 3'-*O*-TBDPS-5'-(*N*-(3-methylbenzyl)-carboxamido)-thymidine

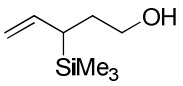


$C_{33}H_{36}IN_3O_5Si$
597.8 g.mol^{-1}

The product was synthesized according the general procedure using 376 mg of **310**, 200 µL of 3-methylbenzylamine, 223 µL Et_3N and 343 µL of DPPA. The crude product was purified by flash chromatography (EA/CH_2Cl_2 5/95 → 25/75) affording 386 mg of **401** as a light brown foam (85 % yield).

^{1}H NMR (300MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.10 (s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.85 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.10 - 2.19 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.31 (s, 3H, CH_3), 4.02 - 4.29 (m, 3H,$H_{4'}$ and $H_{6'}$), 4.59 (d, 1H, *J = 4.2 Hz*, $H_{3'}$), 5.36 (t, 1H, *J = 5.6 Hz*, NH amide), 6.52 - 6.57 (m, 1H, $H_{1'}$), 6.85 - 6.92 (m, 2H, $H_{8'}$ and $H_{9'}$), 7.05 - 7.11 (m, 5H, CH phenyl), 7.21 - 7.23 (m, 2H, $H_{10'}$, $H_{12'}$), 7.61 - 7.70 (m, 4H, CH phenyl), 7.87 (s, 1H, CH thymine), 8.26 (s, 1H, NH amide).
^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.4 (CH_3 thymine), 19.0 (C *t*Bu), 21.3 (CH_3), 26.8 (CH_3 *t*Bu), 38.6 ($C_{2'}$), 42.2 ($C_{6'}$), 76.5 ($C_{3'}$), 86.5 ($C_{1'}$), 87.4 ($C_{4'}$), 111.4 (C thymine), 124.7 ($C_{8'}$ and $C_{9'}$), 128.0-128.7 (CH phenyl), 130.3 (C phenyl), 135.6 and 135.8 ($C_{11'}$ and $C_{12'}$), 137.0 ($C_{7'}$), 137.4 (CH thymine), 150.4 (C=O thymine), 163.9 (C=O thymine), 169.4 (C=O amide).
HRMS submitted

346: ω-hydroxy-allyltriméthysilane

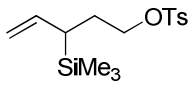


$C_8H_{18}OSi$
158,31 g.mol^{-1}

At -78°C, a solution of *sec*-BuLi (1.4 M in hexane, 77 mL, 0.1 mol, 1 eq.) was added to a solution of TMEDA (15 mL, 0.1 mol, 1 eq.) in 60 mL of anhydrous THF. The yellow solution was stirred at -78°C during 15 min and allyltrimethylsilane (16 mL, 0.1 mol, 1 eq.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred 30 min at -30 °C then cooled to -78°C and a solution of oxirane (10 mL, 0.2 mol, 2 eq.) was added. The reaction mixture was warmed up to 0°C in 1h and further stirred 1h at 0°C. The reaction was quenched adding a solution of saturated NH_4Cl. The reaction mixture was diluted with Et_2O (250 mL), washed with H_2O (2 x 100 mL), brine (100 mL), dry over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. 12g of **346** was obtained as a colorless oil without any purification (75 % yield).

The product has been already described in the litterature (Guyot B., Pornet J., Miginiac L., *J. Organomet. Chem.* **1989**, 373, 279.

347: ω-tosyloxy-allyltrimethysilane

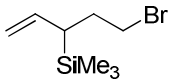


$C_8H_{18}OSi$
312,5 g.mol^{-1}

KOH (11 g, 200 mmol, 5 eq.) and tosyl chloride (15.3 g, 80 mmol, 2 eq.) was added to a solution of ω-hydroxy-allyltrimethysilane (6.2 g, 40 mmol, 1 eq.) in 50 mL of Et_2O cooled at 0°C. The reaction mixture was stirred at 0°C during 6h and was diluted with 200 mL of Et_2O. The ethereal solution was washed with ice H_2O (2 x 100 mL), brine (100 mL), dried over MgSO4 and concentrated to dryness. The crude was purified by flash chromatography (PE/Et_2O: 9/1) affording 18.8g of **347** as a colorless oil (86% yield).

^{1}H NMR ($_2$50 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: -0.06 (s, 9H, CH_3), 1.57 - 1.80 (m, 3H, CH_2 and CH-Si), 2.44 (s, 3H, CH_3 tosyl), 3.88 - 4.13 (m, 2H, CH_2O), 4.67 - 4.85 (m, 2H, CH_2=), 5.38 - 5.53 (m, 1H, =CH), 7.33 (d, 2H, *J = 9.7 Hz*, CH tosyle), 7.77 (d, 2H, *J = 9.6 Hz*, CH tosyl)

348: ω-bromo-allyltriméthysilane



$C_8H_{17}BrSi$
221,21 g.mol^{-1}

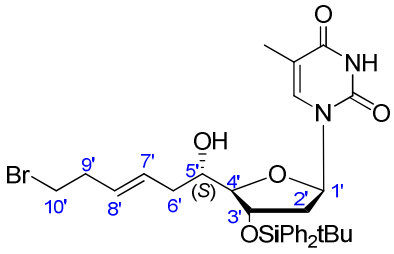
A solution of ω-tosyl-allyltriméthysilane (4.98 g, 15.9 mmol, 1 eq.) and LiBr (2.07 g, 24 mmol, 1.5 eq.) in 160 mL of dry a mixture of DMF/Acetone 1/4 was stirred overnight at room temperature The solvents were removed and the residue was solubilized into 200 mL of Et_2O. The organic layer was washed with $NaHCO_3$ (2 X 100 mL), brine (100 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. The expected product **347** was obtained without any purification as colorless oil (95% yield).

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: - 0.01 (s, 9H, CH_3), 1.61 - 1.98 (m, 3H, CH_2 and CH-Si), 3.43 - 3.56 (m, 2H, CH_2Br), 4.89 (t, 2H, *J = 12.0 Hz*, CH_2=), 5.48 - 5.62 (m, 1H, =CH)

Procedure for the Sakuraï reaction between 348 and 309

To a solution of **309** (1.41 g, 2.95 mmol, 1 eq.) in 15 mL of dry CH_2Cl_2 were added **348** (3.26 g, 14.7 mmol, 5 eq.) and $BF_3.Et_2O$ (2 mL, 14.7 mmol, 5 eq.) dropwise at -78°C.The reaction mixture was warm to room temperature within 4h. The reaction was quenched with 30 mL of saturated $NaHCO_3$ (30 mL) and extracted with EA (2 x 100 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. **(*S*)-349** (270 mg, 15 %) and **(*S*)-350** (940 mg, 45 %) were isolated after purification by flash chromatography (PE/CH_2Cl_2/EA 2/6.4/1.6).

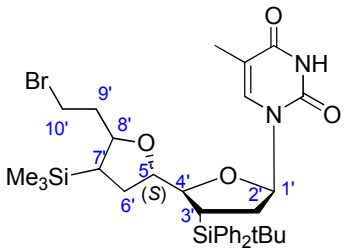
(*S*)-349: 3'-O-*tert*-butyldiphénylsilyl-(5S)'-C-(bromo-1-pent-3-ène)-thymidine



$C_{31}H_{39}BrN_2O_5Si$
627,64 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.09 (s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.86 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.11 - 2.3((m, 6H, $H_{2'}$, $H_{6'}$ and $H_{9'}$), 3.07 - 3.09 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.19 (t, 2H, *J = 6.7 Hz*, $H_{10'}$), 3.78 (s, 1H, $H_{4'}$), 4.44 - 4.47 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.36 - 5.44 (m, 2H, $H_{7'}$ and $H_{8'}$), 6.31 (t, 1H, *J = 6.1 Hz*, $H_{1'}$), 7.39 - 7.47 (m, 6H, CH phenyl), 7.62 - 7.67 (m, 5H, CH phenyl and CH thymine), 8.91 (s, 1H, NH thymine).
^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.8 (CH_3 thymine), 18.6 (C *t*Bu), 27.9 (CH_3 *t*-Bu), 32.2 ($C_{9'}$), 34.4 ($C_{10'}$), 35.9 ($C_{2'}$), 40.5 ($C_{6'}$), 69.4 ($C_{3'}$), 74.9 ($C_{5'}$), 86.7 ($C_{1'}$), 87.9 ($C_{4'}$), 111.8 (C thymine), 128.3 ($C_{7'}$ and $C_{8'}$), 129.5 (CH phenyl), 128.9 (CH phenyl), 130.6 (CH phenyl), 133.7 (CH phenyl), 133.4 (CH phenyl), 135.7 (CH thymine), 137.4 (C phenyl), 151.2 (C=O thymine), 164.4 (C=O thymine).

(*S*)-350: 5-[3'-(2''-bromoethyl)-4'-trimethylsilyl-2'-oxacyclopentyl]-4-*tert*-butyldiphenylsilyl-oxy-2-thyminyl-1-oxacyclopentane



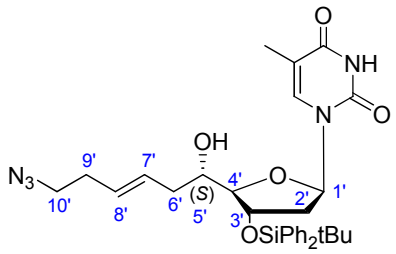
$C_{34}H_{47}BrN_2O_4Si_2$
683,82 g.mol-1

^{1}H RMN (250 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: -0.01 (s, 9H, $SiMe_3$), 1.08 (s, 9H, tBu), 1.94-1.76 (m, 8H, $H_{6'}$, $H_{7'}$,$H_{9'}$ and Me thymine), 2.04 - 2.35 (m, 2H, $H_{2'}$), 3.31 - 3.43 (m, 3H, $H_{10'}$ and $H_{5'}$), 3.64 (td, 1H, *J= 2,5 and 9,5 Hz*, $H_{8'}$), 3.82 (t, 1H, J= 3,2 Hz,$H_{4'}$), 4.37 (m, 1H, $H_{3'}$), 6.39 (dd, 1H, *J= 6.0 and 7.4 Hz*, $H_{1'}$), 7.46-7.35 (m,5H, phenyl et H thymine), 7.68-7.62 (m, 4H, phenyl), 8,92 (s, 1H, NH thymine).

Preparation of (*S*)-350 from (*S*)-349:

$TiCl_4$ 1M in CH_2Cl_2 (2.68 mL, 2.68 mmol, 2 eq.) was added at 0°C to a solution of **(*S*)-350** (940 mg, 1.34 mmol, 1 eq.). After 5 min, the reaction was quenched with 15 mL of saturated $NaHCO_3$. The reaction mixture was extracted with EA (2 x 100 mL). The organic layers were washed with HCl 1N (4 x 100 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. 670 mg of **(*S*)-349** were obtained without purification (80 % yield).

(*S*)-355: 3'-*O*-TBDPS-(5S)'-C-(1-azidopent-3-enyl)-thymidine

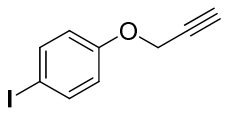


$C_{31}H_{39}N_5O_5Si$
589,76 g.mol-1

(*S*)-349 (1.7 g, 2.7 mmol, 1 eq.) was solubilized in 13 mL of anhydrous DMF and NaN_3 (352 mg, 5.4 mmol, 2 eq.) was added. The reaction mixture was stirred 3h at 80°C and diluted with 200 mL of Et_2O. The organic layer was washed twice with 100 mL of H_2O and 100 mL of brine, dry over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. 1.55 g of **(*S*)-355** were obtained without purification as a white foam (95% yield).

m.p. (°C): 53.8 - 55.0.
^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.08 (s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.85 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.09 - 2.33 (m, 6H, $H_{2'}$, $H_{6'}$ and $H_{9'}$), 3.07 - 3.09 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.26 (t, 2H, *J = 6.7 Hz*, $H_{10'}$), 3.81 (s, 1H, $H_{4'}$), 4.46 - 4.48 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.35 - 5.42 (m, 2H, $H_{7'}$ and $H_{8'}$), 6.29 (t, 1H, *J = 6.1 Hz*, $H_{1'}$), 7.37 - 7.49 (m, 6H, CH phenyl), 7.61 - 7.67 (m, 5H, CH phenyl and CH thymine), 8.89 (s, 1H, NH thymine).
^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.5 (CH_3 thymine), 19.1 (C *t*Bu), 27.0 (CH_3 *t*-Bu), 32.2 ($C_{9'}$), 37.6 ($C_{2'}$), 40.1 ($C_{6'}$), 50.9 ($C_{10'}$), 70.4 ($C_{3'}$), 74.9 ($C_{5'}$), 86.6 ($C_{1'}$), 88.9 ($C_{4'}$), (110.8 (C thymine), 127.9 ($C_{7'}$ and $C_{8'}$), 129.0 (CH phenyl), 129.6 (CH phenyl), 130.1 (CH phenyl)133.2 (CH phenyl), 133.4 (CH phenyl), 135.9 (CH thymine), 137.4 (C phenyl), 150.8 (C=O thymine), 164.5 (C=O thymine).
IR (film CH_2Cl_2), ν (cm^{-1}): 3444, 3069, 2930, 2857, 2097, 1685, 1472, 1428, 1363, 1276, 1199, 1112, 1042, 997, 969, 935, 822, 740, 703, 612.
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{31}H_{39}N_5NaO_5$ ($[M + Na]^+$)Si 612.2618, found 612.2628.

356: 1-iodo-4-(prop-2-ynyloxy)benzene



C_9H_7IO
258,06 g.mol^{-1}

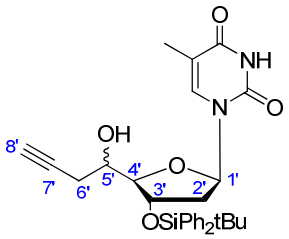
To a solution of 4-iodophenol (1g, 4.52 mmol, 1 eq.) in 10 mL of anhydrous DMF were added K_2CO_3 (750 mg, 5.42 mmol, 1.2 eq.) and propargyl bromide 80 % in toluene (732 µL, 6.79 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture is diluted with 100 mL of Et_2O were added and washed twice with 50 mL of H_2O and 50 mL of brine. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. 1.14g of **356** were obtained without purification as a light brown solid (97% yield).

m.p. = 45.7 - 46.5 °C

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 2.54 (t, 1H, *J = 2.3 Hz*, CC<u>H</u>), 4.65 - 4.66 (d, 2H, *J = 2.3 Hz*, C<u>H</u>$_2$CCH), 6.74 - 6.77 (d, 2H, *J = 8.9 Hz*, C<u>H</u>COCH2), 7.56 - 7.59 (d, 2H, *J = 8.9 Hz*, C<u>H</u>Cl).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 55.9 (<u>C</u>H$_2$CCH), 74.4 (C<u>C</u>H), 78.2 (<u>C</u>CH), 84.0 (<u>C</u>l), 117.4 (<u>C</u>HCOCH$_2$), 138.3 (<u>C</u>HCl), 157.4 (CH<u>C</u>OCH$_2$).

360: 3'-*O*-TBDPS-5'-propargyl-thymidine



$C_{29}H_{34}N_2O_5Si$
518,68 g. mol^{-1}

To a solution of **309** (478 mg, 1 mmol, 1 eq.) in THF (1 mL) was added Zn dust (230 mg, 3.5 mmol, 3.5 eq.) and propargyl bromide 80% wt solution in toluene (323µL, 3 mmol, 3 eq.) at 10°C. After 5 min at 10 °C, the reaction mixture was then diluted with 100 mL of EA and the precipitate was filtered out. The organic phase was washed with 2x50 mL of saturated NH_4Cl, 50 mL of H_2O, 50 mL of brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. The crude product was purified (EA/CH_2Cl_2 20/80 → 50/50) to afford 346 mg of **360** as a colorless foam (67 %).

m.p. (°C): 84.1 - 84.7

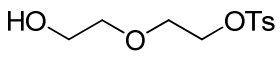
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.10 (s, 9H, *t*Bu), 1.77 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.01 (s, 1H, $H_{8'}$), 2.12-2.41 (m, 4H, $H_{2'}$ and $H_{6'}$) , 2.94 - 2.98 (m, 1H, OH), 3.30 (q, 0.6H, *J = 8.0 Hz*, $H_{5'}$), 3.78 - 3.84 (m, 0.4H, $H_{5'}$), 4.03 (s, 0.6H, $H_{4'}$), 4.06 (d, 0.4H, *J = 4.0 Hz*, $H_{4'}$), 4.47 (m, 0.6H, $H_{3'}$), 4.52 (m, 0.4H, $H_{3'}$) , 6.19 - 6.31 (m, 1H, $H_{1'}$) , 7.34-7.48 (m, 7H, CH phenyl), 7.62 (m, 4H, CH phenyl and CH thymine).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.7 (CH_3 thymine), 19.2 (*C t*-Bu), 23.6 and 25.8 ($C_{6'}$), 27.1 (CH3, *t*-Bu), 39.9 and 40.1 ($C_{2'}$), 69.8 and 70.5 ($C_{5'}$), 70.9 and 71.6 ($C_{8'}$), 72.9 and 74.8 ($C_{3'}$), 80 ($C_{7'}$), 80.1 and 80.7 ($C_{7'}$), 87.2 and 88.0 ($C_{1'}$), 88.4 and 89.6 ($C_{4'}$), 111.2 (C thymine), 128.2 and 130.33 (C phenyl), 133.4 (CH thymine), 136.0 and 137.8 (CH phenyl), 150.6 (C=O thymine), 164.3 (C=O thymine).

IR (film CH_2Cl_2), ν_{cm-1}: 3400, 3307, 3070, 2932, 2858, 2250, 2120, 1960, 1692, 1589, 1472, 1428, 1277, 1112, 1060, 758, 739.

HRMS (ESI, Na), m/z calculated for $C_{29}H_{34}N_2NaO_5Si$ ($[M + Na]^+$) 541.2129, found 541.2134.

366: Diethyleneglycol monotosylated

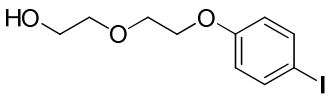


$C_{11}H_{16}O_5S$
260,31 g.mol-1

Ag_2O (1.63 g, 7.0 mmol, 1.5 eq), KI (157 mg, 0.94 mmol, 0.2 eq.) and tosyl chloride (0.99 g, 5 mmol, 1.1 eq.) were added at 0°C to a solution of diethylene glycol (500 mg, 4.7 mmol, 1 eq.) in 100 mL of CH_2Cl_2. The reaction mixture was allowed to reach room temperature and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The silver precipitate was filtered out and the filtrate was washed with H_2O (2 x 50 mL), brine (50 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography (EA/CH_2Cl_2 10/90) affording 855 mg of **366** as a colorless oil (70% yield).

The product has been already described in the litterature (Bouzide A., Sauvé G., *Org. Lett.* **2002**, 4, 14, 2329).

367: 2-(2-(4-iodophenoxy)ethoxy)ethanol



$C_{11}H_{16}O_5S$
307.99 g.mol-1

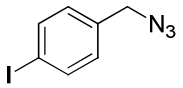
To a solution of **366** (855 mg, 3.28 mmol, 1 eq.) in 8 mL of acetonitrile were added 4-iodophenol (763 mg, 3.44 mol, 1.05 eq.) and K_2CO_3 (543 mg, 3.94 mmol, 1.2 eq.). The reaction mixture was stirred 6h at reflux. The mixture was then diluted with 50 mL of EA and washed with H_2O (2 x 25 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (EA/CH_2Cl_2 2/8) affording 635 mg of **367** as colorless oil (63 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 3.13 (s, 1H, OH), 3.55 (t, 2H, *J = 4.3 Hz*, $HOCH_2CH_2OC\underline{H}_2CH_2O$), 3.64 (t, 2H, *J = 3.3 Hz*, $HOCH_2C\underline{H}_2OCH_2CH_2O$), 3.72 (t, 2H, *J = 3.5 Hz*, $HOC\underline{H}_2CH_2O$), 3.98 (t, 2H, *J = 4.5 Hz*, $HOCH_2CH_2OCH_2C\underline{H}_2O$), 6.61 (d, 2H, *J = 9.1 Hz*, CHC aromatic), 7.46 (d, 2H, *J = 9.0 Hz*, CHC-I aromatic).
^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 61.1 ($HO\underline{C}H_2CH_2O$), 67.1 ($O\underline{C}H_2CH_2OCH_2$), 69.0 ($OCH_2\underline{C}H_2OCH_2$), 72.4 ($HOCH_2\underline{C}H_2O$), 82.8 (C-I), 116.7 ($\underline{C}$HC aromatic), 137.8 ($\underline{C}$HC-I aromatic), 158.1 (CH$\underline{C}$-O aromatic).

General procedure for the azidation of alcohol with DPPA

Alcohol (1eq.) was solubilized in anhydrous DMF (0.5 M) under inert atmosphere. DBU (2 eq.) and DPPA (2 eq.) were then added. The reaction mixture was stirred at 65°C overnight. The mixture was cooled at room temperature and diluted with Et_2O. The organic phase was washed twice with H_2O, brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. The crude product was purified by chromatography.

362: 1-(azidomethyl)-4-iodobenzene :

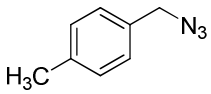


$C_7H_6IN_3$
259,05 g.mol^{-1}

The azidation of 4-iodobenzyl alcohol was achieved according to the general procedure using 2g of 4-iodobenzyl alcohol, 2.54 mL of DBU and 3.6 mL of DPPA. After purification by flash chromatography (EA/PE 5/95 → 10/90), 1.99 g of **362** as white solid was recovered (90 % yield).

m.p. (°C): 37.6 - 38.1
^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 4.29 (s, 2H, C$\underline{H}_2N_3$), 7.06 (d, 2H, *J = 8.5 Hz*, C$\underline{H}$CCH$_2$), 7.72 (d, 2H, *J = 8.3 Hz*, C$\underline{H}$C-I).
^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 59.1 (CH_2N_3), 99.2 (C-I), 128.7 (CH phenyl), 129.5 (CH phenyl), 130.0 (CH phenyl), 138.2 ($\underline{C}$-CH_2)
IR (CH_2Cl_2 film), ν (cm^{-1}): 2924, 2099, 1588, 1484, 1400, 1279, 1007, 788.

419: 1-(azidomethyl)-4-methyl-benzene

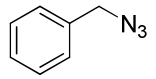


$C_8H_9N_3$
147.18 g.mol^{-1}

The azidation of 4-methyl-benzyl alcohol was achieved according to the general procedure using 2.5 g of 4-methylbenzyl alcohol, 3.4 mL of DBU and 4.9 mL of DPPA. After purification by flash chromatography (EA/PE 0/1 → 5/95), 2.57 g of **419** as a white solid was recovered (90 % yield).

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 2.27 (CH_3), 4.23 (s, 2H, C$\underline{H}_2N_3$), 6.95 (d, 2H, *J = 5.0 Hz*, H phenyl), 7.25 (d, 2H, *J = 5.2 Hz*, H phenyl).
^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 22.5 (CH_3), 55.7 (CH_2N_3), 125.8 (CH phenyl), 133.2 ($\underline{C}$-CH_3), 134.2 ($\underline{C}$-CH_3)

420: 1-(azidomethyl)-benzene

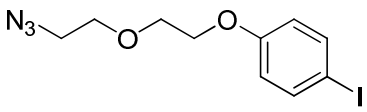


$C_7H_7N_3$
133.15 g.mol^{-1}

The azidation of benzyl alcohol was achieved according to the general procedure using 500 mg of benzyl alcohol, 1.4 mL of DBU and 2.1 mL of DPPA. After purification by flash chromatography (EA/PE 0/100 → 5/95), 420 mg of **420** as a white solid was recovered (67 % yield).

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 4.24 (s, 2H, $C\underline{H}_2N_3$), 7.14 – 7.28 (m, 5H, H phenyl).
^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 56.5 (CH_2N_3), 126.2 (CH phenyl), 127.8 (CH phenyl), 129.2 (CH phenyl), 135.3 (C phenyl)

368: 1-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)-4-iodobenzene



$C_{10}H_{12}IN_3O_2$
333,13 g.mol^{-1}

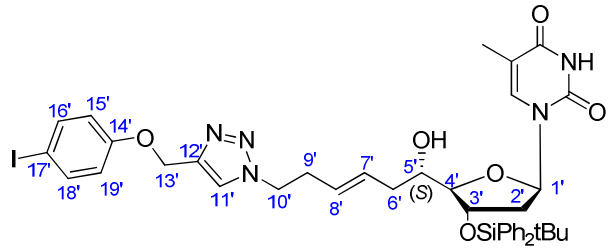
The azidation of **367** was achieved according to the general procedure using 760 mg of 2-(2-(4-iodophenoxy)ethoxy)ethanol, 1.11 mL of DPPA and 775 µL of DBU. 566 mg of **368** as a colorless oil (83% yield) were recovered after purification by flash chromatography (EA/CH_2Cl_2 10/90)

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 3.41 (t, 2H, *J = 5.2 Hz*, CH_2N_3), 3.74 (t, 2H, *J = 4.9 Hz*, $OC\underline{H}_2CH_2N_3$), 3.84 (t, 2H, *J = 4.5 Hz*, $N_3CH_2CH_2OC\underline{H}_2CH_2O$), 4.10 (t, 2H, *J = 4.5 Hz*, $N_3CH_2CH_2OCH_2C\underline{H}_2O$), 6.72 (d, 2H, J = 9 Hz, CHCCO), 7.57 (d, 2H, J = 9 Hz, CHCI).
^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 50.7 (CH_2N_3), 67.5 ($N_3CH_2CH_2OCH_2\underline{C}H_2O$), 69.6 ($N_3CH_2\underline{C}H_2OCH_2CH_2O$), 70.3 ($N_3CH_2CH_2O\underline{C}H_2CH_2O$), 83.1 (C-I), 117.1 ($\underline{C}$HC-O), 138.2 ($\underline{C}$HC-I), 158.6 (CH$\underline{C}$-O).

General procedure for the "click" reaction:

A solution of azide (1 or 1.2 eq.), acetylenic compound (1.2 or 1 eq.), $CuSO_4.5H_2O$ (0.2 eq.) and sodium ascorbate (0.6 eq.) in a mixture of *t*BuOH/H_2O 3/1 (0.1 M) was stirred a room temperature overnight. The reaction mixture was diluted with EA, washed twice with a semi-saturated NH_4Cl and brine. The organic layer was dry over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. The triazol compound was obtained after purification by flash chromatography.

(*S*)-357: 3'-*O*-TBDPS-(5'S)-C-(1-(pent-3-enyl)-(4-(4-iodophenoxy)-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine



$C_{40}H_{46}IN_5O_6Si$
847,81 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 811 mg of **(*S*)-355**, 425 mg of **356**, 69 mg of $CuSO_4.5H_2O$ and 161 mg of sodium ascorbate. The residue was purified by flash chromatography (EA/CH_2Cl_2: 20:80 → 50/50). 1.035 g of **(*S*)-380** as a white foam was obtained (89 % yield).

m.p. (°C): 75.6 - 76.1.

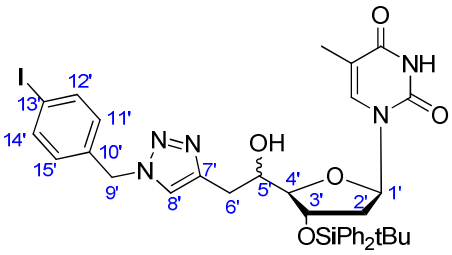
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.07 (s, 9H, CH_3 *t*-Bu), 1.85 (s, 3H, CH_3 thymine), 1.90 - 2.07 (m, 2H, $H_{6'}$), 2.19 - 2.22 (m, 2H $H_{2'}$), 2.54 (m, 2H, $H_{9'}$), 3.02 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.76 (s, 1H, $H_{4'}$), 4.35 (t, 2H, *J = 6.0 Hz*, $H_{10'}$), 4.46 (s, 1H, $H_{3'}$), 5.13 - 5.24 (m, 3H, $H_{7'}$ and $H_{13'}$), 5.32 - 5.39 (m, 1H, $H_{8'}$), 6.29 (t, 1H, *J = 6.0 Hz*, $H_{1'}$), 6.73 (d, 2H, *J = 9.0 Hz*, $H_{15'}$ and $H_{19'}$), 7.37 - 7.44 (m, 6H, CH phenyl), 7.52 (d, 3H, *J = 9.0 Hz*, $H_{11'}$, $H_{16'}$and $H_{18'}$), 7.60 - 7.64 (m, 5H, CH phenyl and CH thymine), 9.16 (s, 1H, NH thymine).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.7 (CH_3 thymine), 19.2 (C *t*-Bu), 27.06 (CH_3 *t*-Bu), 33.6 ($C_{9'}$), 37.7 ($C_{6'}$), 39.9 ($C_{2'}$), 50.3 ($C_{10'}$), 62.1 ($C_{13'}$), 70.3 ($C_{5'}$), 75.1 ($C_{3'}$), 83.7 ($C_{17'}$), 87.2 ($C_{1'}$), 89.4 ($C_{4'}$), 110.9 (C thymine), 117.3 ($C_{15'}$, $C_{19'}$ and $C_{11'}$), 128.1 (C phenyl), 128.6 (C phenyl), 130.2 ($C_{7'}$ and $C_{8'}$), 133.2 (C phenyl), 135.9 (C phenyl), 138.9 ($C_{16'}$ and $C_{18'}$), 150.6 ($C_{12'}$ and C=O thymine), 158.1 ($C_{14'}$), 164.1 (C=O thymine).

IR (CH_2Cl_2), ν (cm^{-1}): 3397, 3059, 2928, 2843, 1686, 1585, 1485, 1426, 1365, 1280, 1240, 1177, 1112, 1043, 998, 820, 755, 703.

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{40}H_{46}IN_5NaO_6Si$ ($[M + Na]^+$) 870.2154, found 870.2149.

369: 3'-*O*-TBDPS-5'-C-(1-(4-iodobenzyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine



$C_{36}H_{40}IN_5O_5Si$
777,72 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 1.65 g of **360**, 1.0 g of **362**, 160 mg of $CuSO_4.5H_2O$ and 375 mg of sodium ascorbate. The residue was purified by flash chromatography (EA/CH_2Cl_2 20/80 → 50/50). 2.1 g of **369** were obtained as a white foam (84 % yield).

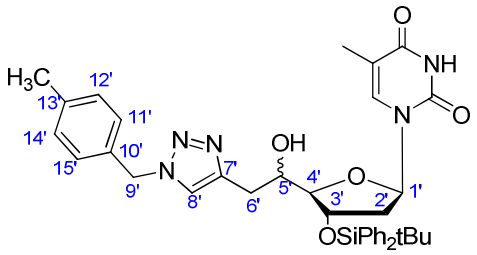
m.p (°C): 119.7 - 120.4.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.05 (s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.82 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.17 - 2.21 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.75 (ABd, 2H, J_{AB} = *3.5 Hz* and *J = 4.3 Hz*, $H_{6'}$), 3.50 - 3.52 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.86 - 4.12 (m, 2H, $H_{4'}$ and OH), 4.56 and 4.62 (2s, 1H, $H_{3'}$), 5.40 (s, 2H, $H_{9'}$), 6.44 (t, 1H, *J = 7.3 Hz*, $H_{1'}$), 6.99 (d, 2H, *J = 8.28 Hz*, $H_{11'}$ and $H_{15'}$), 7.32 - 7.38 (m, 6H, CH phenyl), 7.57 - 7.61 (m, 4H, CH phenyl), 7.65 - 7.69 (m, 3H, CH thymine, $H_{8'}$, $H_{12'}$and $H_{14'}$), 9.39 (NH thymine).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.5 (CH_3 thymidine), 18.9 (C *t*Bu), 26.9 (CH_3 *t*Bu), 40.0 ($C_{2'}$), 53.5 ($C_{9'}$), 70.3 and 71.3 ($C_{5'}$), 73.2 and 74.9 ($C_{3'}$), 86.0 and 86.54 ($C_{1'}$), 94.6 and 95.3 ($C_{4'}$), 94.6 (C_{13}'), 110.9 (C thymine), 121.8 ($C_{8'}$), 127.9 (CH phenyl), 129.8 ($C_{11'}$ and $C_{15'}$), 133.0 and 133.3 (C phenyl), 134.3 ($C_{10'}$), 135.7 and 135.9 (CH phenyl), 137.3 (CH thymine), 138.2 ($C_{12'}$ and $C_{14'}$), 145.4 ($C_{7'}$ and C=O thymine), 150.6 (C=O thymine).

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{36}H_{40}IN_5NaO_5Si$ ($[M + Na]^+$) 778.1916 , found 778.1916.

421: 3'-*O*-TBDPS-5'-C-(1-(4-methylbenzyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine

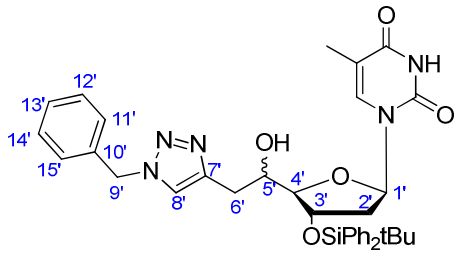


$C_{37}H_{43}N_5O_5Si$
665,85 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 200 mg of **360**, 68 mg of **419**, 19 mg of $CuSO_4.5H_2O$ and 46 mg of sodium ascorbate. The residue was purified by flash chromatography (EA/CH_2Cl_2 20/80 → 50/50). 229 mg of **421** were obtained as a white foam (89 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.02 (s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.80 and 1.82 (2s, 3H, CH_3 thymine), 2.10 - 2.17 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.31 (s, 3H, CH_3), 2.69 (ABd, 2H, J_{AB} *= 3.7* and *J = 4.1 Hz*), 3.44 - 3.47 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.81 and 3.91 (2s, 1H, $H_{4'}$), 4.47 - 4.58 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.39 (s, 2H, $H_{9'}$), 6.36 - 6.40 (m, 1H, $H_{1'}$), 7.07 - 7.16 (m, 5H, $H_{8'}$ and CH phenyl), 7.28 - 7.37 (m, 6H, CH phenyl), 7.54 - 7.58 (m, 3H, CH phenyl), 7.62 - 7.64 (m, 1H, CH phenyl), 7.66 (s, 1H, CH thymine), 8.77 (NH thymine).
^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.5 (CH_3 thymidine), 18.9 (C *t*Bu), 21.1 (CH_3), 26.8 (CH_3 *t*Bu), 29.9 ($C_{6'}$), 40.0 and 40.3 ($C_{2'}$), 53.9 ($C_{9'}$), 70.3 - 71.3 ($C_{5'}$), 73.2 - 74.9 ($C_{3'}$), 85.8 - 86.2 ($C_{1'}$), 89.4 - 90.2 ($C_{4'}$), 110.9 (C thymine), 121.4 ($C_{8'}$), 127.9 (CH phenyl), 129.7 (CH phenyl), 131.3 (C13'), 133.0 and 133.3 (C phenyl), 135.6 (CH phenyl and CH thymine), 136.7 and 137.0 (C phenyl), 138.8 ($C_{10'}$), 144.9 ($C_{7'}$) and 145.4 (C=O thymine), 163.7 (C=O thymine).
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{37}H_{44}N_5O_5Si$ ($[M + H]^+$) 666.3106, found 666.3108.

422: 3'-*O*-TBDPS-5'-C-(1-benzyl-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine

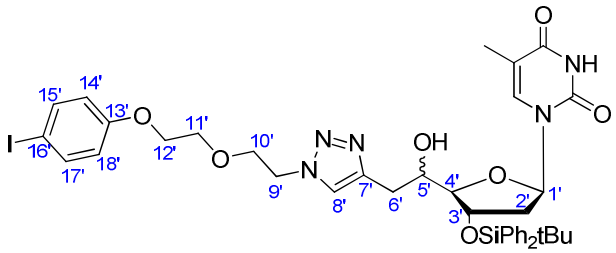


$C_{36}H_{41}N_5O_5Si$
651.83 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 500 mg of **360**, 107 mg of **420**, 40 mg of $CuSO_4.5H_2O$ and 96 mg of sodium ascorbate. The residue was purified by flash chromatography (EA/CH_2Cl_2 20:80 → 50/50). 481 mg of **422** were obtained as a white foam (91 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.06 (CH_3 *t*-Bu), 1.82 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.16 - 2.25 (m, 3H, $H_{2'}$ and $H_{6'}$), 2.76 (ABd, 1H, J_{AB} *= 3.8* and *J = 4.1 Hz*, $H_{6'}$), 3.50 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.86 (s, 1H, OH), 3.96 (s, 1H, $H_{4'}$), 4.51 and 4.64 (2s, 1H, $H_{3'}$), 5.46 (s, 2H, $H_{9'}$), 6.40 - 6.47 (m, 1H, $H_{1'}$), 7.15 (s, 1H, H8'), 7.22 - 7.70 (m, 16H, H phenyl and CH thymine).
^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.5 (CH_3 thymidine), 18.9 (C *t*Bu), 26.8 (CH_3 *t*Bu), 40.3 ($C_{2'}$), 54.0 ($C_{9'}$), 70.2 and 71.2 ($C_{5'}$), 73.1 and 74.9 ($C_{3'}$), 86.0 and 86.1 ($C_{1'}$), 89.2 and 90.1 ($C_{4'}$), 110.9 (C thymine), 121.6 ($C_{8'}$), 127.7 and 129.9 (CH phenyl), 133.0 and 135.6(C phenyl), 136.7 (CH thymine), 145.1 (C7'), 150.6 (C=O thymine), 164,0 (C=O thymine).
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{36}H_{42}N_5O_5Si$ ($[M + H]^+$) 652.2949, found 652.2954.

370: 3'-*O*-TBDPS-5'-C-(1-(2-(2-(4-iodophenoxy)ethoxy)ethyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine



$C_{39}H_{46}IN_5O_7Si$
851.8 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 1.28 g of **360**, 690 mg of **368**, 103 mg of $CuSO_4.5H_2O$ and 242 mg of sodium ascorbate. The residue was purified by flash chromatography (EA). 1.4 g of **370** were obtained as a white foam (80 % yield).

m.p. (°C): 84.9 - 86.7

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.07 (s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.84 (d, J = 5.9 Hz, 3H, CH_3 thymine), 2.08 - 2.27 (m, 3H, $H_{2'}$ and $H_{6'}$), 2.74 (ABd, 1H, J_{AB} *= 4.2 Hz* and *J = 3.6 Hz*, $H_{6'}$), 3.46 - 3.58 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.78 (t, *J = 3.8 Hz*, 2H, $H_{11'}$), 3.90 (s, 2H, $H_{10'}$), 3.96 (s, 1H, $H_{4'}$), 4.04 (t, 2H, *J = 4 Hz*, $H_{12'}$), 4.52 (t, 2.5 H, *J = 4.0 Hz*, $H_{9'}$ and $H_{3'}$), 4.62 (d, 0.5 Hz, *J = 4.5 Hz*, $H_{3'}$), 6.42 - 6.50 (m, 1H, $H_{1'}$), 6.65 (d, 2H, *J = 8.8 Hz*, $H_{14'}$ and $H_{18'}$), 7.33 - 7.42 (m, 6H, CH phenyl), 7.45 (s, 1H, $H_{8'}$), 7.53 (d, 2H, *J = 8.5 Hz*, $H_{15'}$ and $H_{17'}$), 7.61 (d, 2H, *J = 7.8 Hz*, CH phenyl), 7.65 - 7.69 (m, 2H, CH phenyl), 7.72 (s, 1H, CH thymine), 8.89 (d, *J = 8.3 Hz*, 1H, NH thymine).

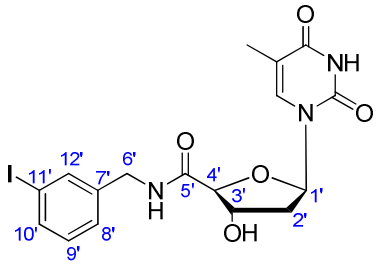
^{13}C NMR (100.2 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.1 (CH_3 thymine), 18.6 (C *t*-Bu), 26.5 (CH_3 *t*-Bu), 28.0 and 29.4 ($C_{6'}$), 39.7 and 40.0 ($C_{2'}$), 49.8 ($C_{9'}$), 66.8 ($C_{12'}$), 69.2 ($C_{10'}$ and $C_{11'}$), 69.9 and 71.0 ($C_{5'}$), 72.8 and 74.5 ($C_{3'}$), 82.8 ($C_{16'}$), 85.3 and 85.7 ($C_{1'}$), 89.1 and 89.9 ($C_{4'}$)110.5 (C thymine), 116.4 ($C_{14'}$ and $C_{18'}$), 122.3 ($C_{8'}$), 127.4 (CH phenyl), 129.5 (CH phenyl), 132.6 and 132.8 (C phenyl), 135.2 and 135.5 (CH phenyl), 136.4 and 136.6 (CH thymine), 137.8 ($C_{15'}$ and $C_{17'}$), 144.2 and 144.3 ($C_{7'}$), 150.0 (C=O thymine), 157.9 ($C_{13'}$), 163.4 (C=O thymine).

HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{39}H_{46}IN_5NaO_7Si$ ($[M+Na]^+$) 874.2103, found 874.2080.

General procedure for the cleavage of the silylated ether:

A solution of the protected compound (1 eq.) and NH_4F (14 eq.) in MeOH (0.05M) was stirred 24h at 60 °C. The unprotected compound was recovered by purification by chromatography or by filtration.

332: 5'-(*N*-(3-iodobenzyl)-carboxamido)-thymidine

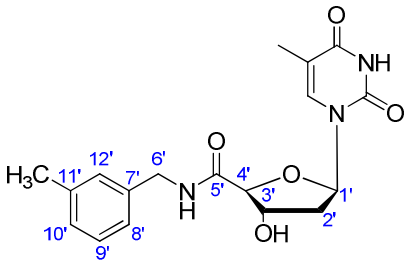


$C_{17}H_{18}IN_3O_5$
471,25 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 276 mg of **321** and 201 mg of NH_4F. 131 mg of **332** was recovered by filtration as a white powder (76 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO d_6), δ_{ppm} : 1.70 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.10 – 2.18 (m, 2H, $H_{2'}$), 4.26 (s, 3H, $H_{7'}$ and OH), 4.32 (d, 1H, *J = 4.2 Hz*, $H_{3'}$), 5.61 (d, 1H, *J = 4.2 Hz*, $H_{4'}$), 6.30 (t, 1H, J = 5.7 Hz, $H_{1'}$), 7.12 (t, 1H, *J = 7.5 Hz*, $H_{9'}$), 7.26 (t, 1H, *J = 7.3 Hz*, $H_{8'}$), 7.60 (d, 2H, *J = 7.6 Hz*, $H_{10'}$ and $H_{12'}$), 7.99 (s, 1H, CH thymine), 8.79 (s, 1H, NH amide), 11,25 (s, 1H, NH thymine).
^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO d_6), δ_{ppm}: 12.0 (CH_3 thymine), 38.1 ($C_{2'}$), 40.98 ($C_{6'}$), 73.1 ($C_{3'}$), 84.9 ($C_{1'}$ and $C_{4'}$), 94.4 ($C_{11'}$), 109.1 (C thymine), 126.3 ($C_{9'}$), 130.2 ($C_{8'}$), 135.2 ($C_{12'}$), 135.4 ($C_{10'}$), 136.4 (CH thymine), 141.3 ($C_{7'}$), 150.2 (C=O thymine), 163.3 (C=O thymine), 170.0 ($C_{5'}$).
HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{17}H_{18}IN_3NaO_5$ ($[M + Na]^+$) 494.0183, found 494.0172.
HPLC: rt = 10.41 min (A/C: from 40/60 to 70/30 in 15 min then to 90/10 in 1 min then to 40/60 in 1 min)

402: 5'-(*N*-(3-methylbenzyl)-carboxamido)-thymidine

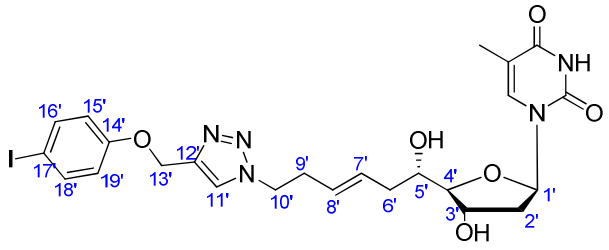


$C_{18}H_{21}N_3O_5$
359,38 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 362 mg of **401** and 316 mg of NH_4F. 175 mg of **402** was recovered by filtration as a white powder (81 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO *d_6*), δ_{ppm}: 1.73 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.09 - 2.22 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.28 (s, CH_3), 4.29 (s, 3H, $H_{4'}$ and $H_{6'}$), 4.36 (s, 1H, $H_{3'}$), 5.63 (s, 1H, OH), 6.31 - 6.36 (m, 1H, $H_{1'}$), 7.03 - 7.07 (m, 3H, $H_{8'}$, $H_{10'}$ and $H_{12'}$), 7.17 - 7.24 (m, 1H, $H_{9'}$), 8.08 (s, 1H, NH thymine), 8.77 (t, 1H, *J = 15 Hz*, NH amide).
^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO *d_6*), δ_{ppm}: 12.3 (CH_3 thymine), 20.9 (CH_3), 39.3 ($C_{2'}$), 41.9 ($C_{6'}$), 73.5 ($C_{3'}$), 85.3 ($C_{1'}$ and $C_{4'}$), 109.4 (C thymine), 124.3 ($C_{8'}$), 127.4 and 128.2 ($C_{9'}$, $C_{10'}$ and $C_{12'}$), 136.8 ($C_{11'}$), 137.3 ($C_{7'}$), 138.0 (CH thymine), 150.6 (C=O thymine), 163.6 (C=O thymine), 170.2 (C=O amide).
HRMS (ESI) submitted
HPLC: rt = 7.62 min (A/C: from 40/60 to 70/30 in 15 min then to 90/10 in 1 min then to 40/60 in 1 min)

(*S*)-358: (5'S)-C-(1-(pent-3-enyl)-(4-(4-iodophenoxy)-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine

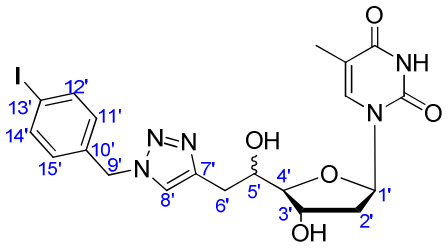


$C_{24}H_{28}IN_5O_6$
609.41 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 420 mg of **(*S*)-357** and 257 mg of NH_4F. 260 mg of **(*S*)-358** were recovered after purification by flash chromatography (MeOH/EA 0/100 → 10/90) as a white powder (86 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 1.86 (CH_3 thymine), 2.18 - 2.27 (m, 4H, $H_{2'}$ and $H_{6'}$), 2.58 - 2.62 (m, 2H, $H_{9'}$), 3.35 (s, 1H, OH), 3.65 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.71 (s, 1H, $H_{4'}$), 4.37 - 4.41 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.46 (t, 2H, *J = 6.49 Hz*, $H_{10'}$), 5.15 (s, 2H, $H_{13'}$), 5.46 - 5.49 (m, 2H, $H_{7'}$ and $H_{8'}$), 6.30 (t, 1H, *J = 6.8 Hz*, $H_{1'}$), 6.83 (d, 2H, *J = 6.8 Hz*, $H_{15'}$ and $H_{19'}$), 7.57 (d, 2H, *J = 6.8 Hz*, $H_{16'}$ and $H_{18'}$), 7.96 (s, 1H, $H_{11'}$), 8.03 (s, 1H, CH thymine).
^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 11.2 (CH_3 thymine), 33.0 ($C_{9'}$), 37.1 ($C_{6'}$), 39.7 ($C_{2'}$), 49.7 ($C_{10'}$), 61.0 ($C_{13'}$), 70.3 ($C_{3'}$), 71.8 ($C_{5'}$), 82.6 ($C_{17'}$), 84.7 ($C_{1'}$), 88.0 ($C_{4'}$), 110.2 (C thymine), 117.0 ($C_{15'}$ and $C_{19'}$), 124.1 ($C_{11'}$), 127.6 ($C_{7'}$), 129.6 ($C_{8'}$), 137.1 (CH thymine), 138.0 ($C_{16'}$ and $C_{18'}$), 143.0 ($C_{12'}$), 150.9 (C=O thymine), 158.1 ($C_{14'}$), 164.9 (C=O thymine).
IR (ATR), ν (cm^{-1}): 3372, 2928, 1681, 1508, 1484, 1278, 1239, 1176, 1091, 1035, 820.
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{24}H_{29}IN_5O_6$ ($[M + H]^+$) 610.1157, found 610.1162.
HPLC: rt = 12.18 min (A/C: from 30/70 to 70/30 in 15 min then to 90/10 in 1 min then to 40/60 in 1 min).

371: 5'-C-(1-(4-iodobenzyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine



$C_{20}H_{22}IN_5O_5$
539,32 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 2.04 g of **369** and 1.4 g of NH_4F. 1.2 g of **371** were recovered after purification by flash chromatography (MeOH/EA 5/95 → 10/90) as a white powder (85 % yield).

m.p. (°C): 115.8 - 118.1.

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 1.87 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.17 – 2.32 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.84 - 3.07 (m, 2H, $H_{6'}$), 3.36 (s, 2H, OH), 3.78 (t, 0.7H, *J = 3.5 Hz*, $H_{4'}$), 3.82 (dd, 0.3H, *J = 2.6* and *4.5 Hz*, $H_{4'}$), 4.01 – 4.1 (m, 1H, $H_{5'}$), 4.42 – 4.46 (m, 0.7H, $H_{3'}$), 4.55 – 4.59 (m, 0.3H, *J = 4.1 Hz*, $H_{3'}$), 5.53 (s, 2H, $H_{9'}$), 6.27 – 6.35 (m, 1H, $H_{1'}$), 7.09 (d, 2H, *J = 8.3 Hz*, $H_{11'}$ and $H_{15'}$), 7.71 (d, 2H, *J = 8.3 Hz*, $H_{12'}$ and $H_{14'}$), 7.83 (s, 1H, $H_{8'}$), 7.99 (d, 1H, J = 1 Hz, CH thymine).

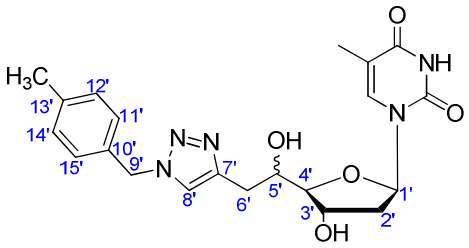
^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 12.3 (CH_3 thymine), 30.8 ($C_{6'}$), 31.2 ($C_{6'}$), 40.7 ($C_{2'}$), 53.9 ($C_{9'}$), 71.2 ($C_{3'}$), 71.7 ($C_{3'}$), 72.9 ($C_{5'}$), 85.9 ($C_{1'}$), 89.3 ($C_{4'}$), 90.1 ($C_{4'}$), 94.5 ($C_{13'}$), 111.3 (C thymine), 124.3 ($C_{8'}$), 130.8 ($C_{11'}$ and $C_{15'}$), 136.3 ($C_{10'}$), 138.2 (CH thymine), 138.9 ($C_{12'}$ and $C_{14'}$), 145.9 ($C_{7'}$), 152,0 (C=O thymine), 166,0 (C=O thymine).

IR (ATR), ν (cm^{-1}): 3352, 2327, 1679, 1473, 1270, 1272, 1097, 1056, 1008, 787.

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{20}H_{23}IN_5O_5$ ($[M + H]^+$) 540.0738, found 540.0734.

HPLC: rt = 5.75 min (A/C: from 30/70 to 70/30 in 15 min then to 90/10 in 1 min then to 40/60 in 1 min).

416: 5'-C-(1-(4-methyl-benzyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine

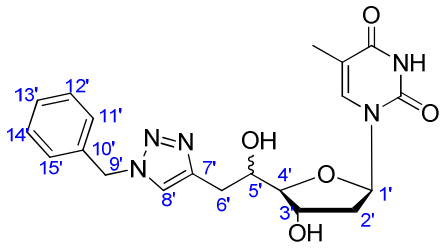


$C_{21}H_{25}N_5O_5$
427.45 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 121 mg of **414** and 94 mg of NH_4F. 74 mg of **416** were recovered after purification by flash chromatography (MeOH/EA 0/100 → 5/95) as a white powder (95 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 1.85 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.19 - 2.22 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.29 (s, 3H, CH_3), 2.81 - 3.04 (m,2H, $H_{6'}$), 3.76 - 3.81 (m, 1H, $H_{4'}$), 4.00 - 4.10 (m, 1H, $H_{5'}$), 4.40 - 4.56 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.48 (s, 2H, $H_{9'}$), 6.22 - 6.32 (m, 1H, $H_{1'}$), 7.13 - 7.21 (m, 4H, $H_{11'}$, $H_{12'}$, $H_{14'}$ and $H_{15'}$), 7.67 (s, 0.3H, CH thymine), 7.75 - 7.76 (m, 1H, $H_{8'}$), 7.96 (s, 0.7H, CH thymine).
^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 12.5 (CH_3 thymine), 21.2 (CH_3), 31.5 ($C_{6'}$), 41.0 ($C_{2'}$), 54.7 ($C_{9'}$), 71.5 ($C_{5'}$), 73.2 ($C_{3'}$), 86.2 ($C_{1'}$), 89.6 - 90.5 ($C_{4'}$), 111.6 (C thymine), 124.4 ($C_{8'}$), 129.1 ($C_{11'}$ and $C_{15'}$), 130.6 ($C_{12'}$ and $C_{14'}$), 133.8 ($C_{13'}$), 138.5 (CH thymine), 139.5 ($C_{10'}$), 146.0 ($C_{7'}$), 152.4 (C=O thymine), 166.4 (C=O thymine).
HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{21}H_{26}N_5O_5$ 428.1928, found 428.1934.
HPLC: rt = 5.75 min (A/C: from 30/70 to 70/30 in 15 min then to 90/10 in 1 min then to 40/60 in 1 min).

417: 5'-C-(1-benzyl-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine

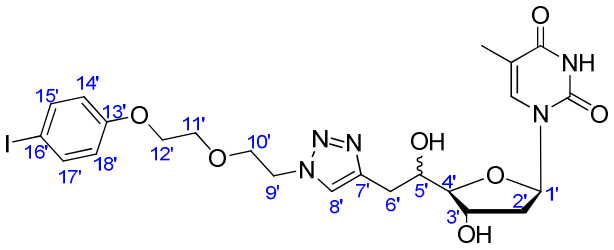


$C_{20}H_{23}N_5O_5$
413.43 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 200 mg of **415** and 160 mg of NH_4F. 102 mg of **417** were recovered after purification by flash chromatography (MeOH/EA 5/95 → 10/90) as a white powder (79 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO *d_6*), δ_{ppm}: 1.77 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.05 – 2.10 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.68 - 2.92 (m, 2H, $H_{6'}$), 3.36 (s, 2H, OH), 3.66 - 3.69 (m, 1H, $H_{4'}$), 3.82 - 3.95 (m, 1H, $H_{5'}$), 4.28 and 4.41 (2s, 1H, *J = 3.0 Hz*, $H_{3'}$),5.19 - 5.30 (m, 2H, OH), 5.55 (s, 2H, $H_{9'}$), 6.19 – 6.22 (m, 1H, $H_{1'}$), 7.29 – 7.38 (m, 5H, H phenyl), 7.64 (s, 1H, $H_{8'}$), 7.93 (s, 1H, *J = 1.0 Hz*, CH thymine), 11.28 (s, 1H, NH thymine).
^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO *d_6*), δ_{ppm}: 12.4 (CH_3 thymine), 30.3 ($C_{6'}$), 40.6 ($C_{2'}$), 52.6 ($C_{9'}$), 69.7 ($C_{5'}$), 71.3 ($C_{3'}$) 83.7 ($C_{1'}$), 87.9 ($C_{4'}$), 89.0 ($C_{4'}$), 109.3 (C thymine), 123.1 (C8'), 127.8 and 128.7 (CH phenyl), 136.3 (C phenyl and C thymine), 144.2 ($C_{7'}$), 150.4 (C=O thymine), 163.7 (C=O thymine).
HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{20}H_{24}N_5O_5$ ($[M + H]^+$) 414.1771, found 414.1777.
HPLC: rt = 4.01 min (A/C: from 30/70 to 70/30 in 15 min then to 90/10 in 1 min then to 40/60 in 1 min).

372: 5'-C-(1-(2-(2-(4-iodophenoxy)ethoxy)ethyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine



$C_{23}H_{28}IN_5O_7$
613,40 g.mol-1

The product was synthesized according to the general procedure using 650 mg of **370** and 396 mg of NH_4F. 370 mg of **372** were recovered after purification by flash chromatography (MeOH/EA 10/90) as a white powder (79 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 1.83 and 1.85 (2s, 3H, CH_3 thymine), 2.13 - 2.28 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.78 - 2.99 (m, 2H, $H_{6'}$), 3.33 (s, 2H, OH), 3.73 - 3.80 (m, 3H, $H_{4'}$ and $H_{11'}$), 3.88 - 3.93 (m, 2H, $H_{10'}$), 3.98 - 4.06 (m, 3H, $H_{5'}$ and $H_{12'}$), 4.40 - 4.42 (m, 0.6H, $H_{3'}$), 4.53 - 4.56 (m, 2.4H, $H_{3'}$ and $H_{9'}$), 6.29 (q, 1H, *J = 6.4 Hz*, $H_{1'}$), 6.69 (d, 2H, *J = 9.0 Hz*, $H_{14'}$ and $H_{18'}$), 7.50 (dd, 2H, *J = 2.6* and *9 Hz*, $H_{15'}$ and $H_{17'}$), 7.70 (d, 0.4H, *J = 1.1 Hz*, CH thymine), 7.82 (d, 1H, *J = 2.3 Hz*, $H_{8'}$), 7.99 (d, 0.6H, *1.1 Hz*, CH thymine).

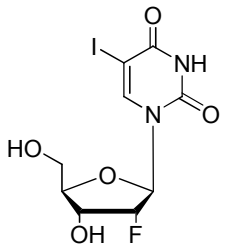
^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 12.9 (CH_3 thymine), 31.1 and 31.5 ($C_{6'}$), 41.1 ($C_{2'}$), 51.3 ($C_{9'}$), 68.5 ($C_{12'}$), 70.5 (C_{10}' and $C_{11'}$), 71.5 ($C_{5'}$), 72.1 and 73.2 ($C_{3'}$), 83.7 ($C_{16'}$), 86.2 ($_{C1'}$), 89.4 and 90.3 ($C_{4'}$), 111.6 (C thymine), 118.1 ($C_{14'}$ and C_{18}'), 125.3 (C_8'), 138.2 and 138.5 (CH thymine), 139.3 ($C_{15'}$ and $C_{17'}$), 145.4 ($C_{7'}$), 152.3 (C=O thymine), 159.9 ($C_{13'}$), 166.2 (C=O thymine).

IR (ATR), ν (cm-1): 3371, 2927, 1683, 1585, 1485, 1277, 1243, 1099, 1052, 819.

HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{23}H_{29}IN_5O_7$ ($[M + H]^+$) 614.1106, found 614.1110.

HPLC: rt = 10.73 min (A/C: from 40/60 to 70/30 in 10 min then to 90/10 in 3 min then to 40/60 in 1 min).

429: 5-iodo-2'-deoxy-2'-fluoro-uridine



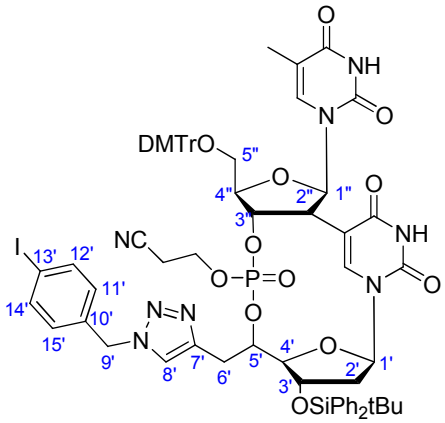
$C_9H_{10}FIN_2O_5$
372,09 g.mol^{-1}

To a solution of commercial 2'-deoxy-2'-fluoro-uridine **428** (116 mg, 0.47 mmol, 1 eq.) in 15 mL of dried MeOH was added ICl (36 µL, 0.71 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred 40 min at 100 °C under micro-wave. MeOH was then removed under vacuum and the residue was co-evaporated until the decoloration of the residue. 115 mg of **420** were obtained as a white solid after cristallisation in Et_2O (65 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO *d_6*), δ_{ppm}: 3.82 (AB system, 2H, *J_{AB} = 3.6 Hz*, $H_{5'}$), 4.01 (d, 1H, *J = 6.1 Hz*, $H_{4'}$), 4.15 - 4.32 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.15 (dd, *J = 40* and *11Hz,* $H_{2'}$), 5.51 (s, 1H, OH), 5.66 (d, 1H, *J = 4.3 Hz*, OH), 5.97 (d, 1H, *J = 12.0 Hz*, $H_{1'}$), 8.65 (s, 1H, CH thymine), 11.84 (s, 1H, NH thymine).
^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO *d_6*), δ_{ppm}: 59.1 ($C_{5'}$), 67.3 ($C_{3'}$), 69.8 (C-I), 83.7 ($C_{4'}$), 87.9 and 88.3 ($C_{1'}$), 94.4 (d, J_{C-F} = 530 Hz, $C_{2'}$), 145.4 (CH thymine), 150.6 (C=O), 161.3 (C=0).
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_9H_{10}FIN_2O_5NaI$ ($[M + Na]^+$) 394.9510, found 394.9518.
HPLC: rt = 10.69 min (A/C: from 1/99 to 10/90 in 10 min then to 20/80 in 1 min then to 20/80 during 1 min then to 1/99 in 2 min).

SYNTHESIS OF MODIFIED DINUCLEOTIDE

456: Dinucleotide (5'-*O*-DMTr-thymidine)-(3'-*O*-TBDPS-5'-C-(1-(4-iodobenzyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine)



$C_{70}H_{74}IN_8O_{14}PSi$
1437,35 g.mol^{-1}

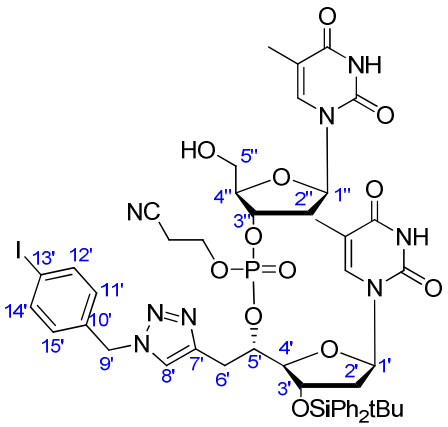
A solution of **369** and commercial 3'-*O*-(2-cyanoethyl diisopropylphosphoramidite)-5'-*O*-DMTr-thymidine (4 g, 5.33 mmol, 3.3 eq.) in tetrazole (0.45 M in CH_3CN, 47 mL, 210 mmol, 13 eq.) were stirred 30 min at room temperature. Then collidine (13 eq.) and an excess of a solution of I_2 0.1 M in THF/H_2O 2/1 were added. Then a solution of Na_2S_2O3 was added until the reaction mixture remained colorless. The mixture was diluted with 200 mL of EA, washed with H_2O (2 x 100 mL) and brine (100 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. 1.78 g of **456** was recovered as a white foam by flash purification (EA/CH_2Cl_2 1/1 → 8/2 → 1/0) (78% yield).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.03 (s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.35 - 1.39 (m, 3H, CH_3 thymine), 1.82 - 1.93 (m, 4H, $H_{2'}$ and CH_3 thymine), 2.31 - 2.42 (m, 5H, $H_{2'}$, $H_{2''}$ and $C\underline{H}_2CN$), 2.51 - 2.54 (m, 1H, $C\underline{H}_2CN$ CEO), 2.72 - 2.98 (m, 2H, $H_{6'}$), 3.28 - 3.49 (m, 2H, CH_2-O), 3.76 - 3.89 (m, 7H, $H_{5''}$ and CH_3 DMTr), 3.93 - 4.06 (m, 3H, $H_{5''}$, $H_{4'}$ and $H_{4''}$), 4.21 - 4.32 (m, 1H, $H_{3''}$), 4.40 (s, 1H, $H_{5'}$), 5.01 - 5.04 (m, 1H, $_{3'}$), 5.41 (s, 2H, $H_{9'}$), 6.23 - 6.30 (m, 1H, $H_{1''}$), 6.45 - 6.55 (m, 1H, $H_{1'}$), 6.83 (d, 4H, *J = 5.9 Hz*, CH DMTr), 6.98 and 7.03 (2d, 2H, *J = 10.0 Hz*, $H_{11'}$ and $H_{15'}$), 7.21 - 7.36 (m, 16H, H8', CH phenyl and CH DMTr), 7.53 - 7.69 (m, 8H, $H_{12'}$, $H_{14'}$, CH thymine and CH phenyl), 8.81 (s, 2H, NH thymine).

^{13}C NMR (100.2 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 11.8 and 12.8 (CH_3 thymine), 19.3 (C *t*Bu), 19.53 and 19.81 ($C\underline{H}_2CN$), 27.1 (CH_3 *t*Bu), 29.0 ($C_{6'}$), 38.9 and 39.0 ($C_{2''}$), 40.1 and 40.1 ($C_{2'}$), 53.6 and 53.7 ($C_{9'}$), 55.5 (CH_3 DMTr), 62.4 and 62.7 ($C_{5''}$), 63.4 and 63.6 (CH_2O), 74.6 ($C_{5'}$), 79.2 and 80.1 ($C_{3'}$ and $C_{3''}$), 84.2 and 85.2 ($C_{1'}$, $C_{1''}$ and $C_{4''}$), 87.5 ($C_{4'}$), 94.7 and 94.8 ($C_{13'}$), 111.6 and 112.2 (C thymine), 113.6 (CH DMTr), 116.4 and 116.9 (CN), 122.3 and 123.0 (CH DMTr), 127.5 (CH phenyl), 128.3 and 128.4 (CH DMTr), 129.4 ($C_{8'}$), 130.1 and 130.2 ($C_{11'}$ and $C_{15'}$), 130.4 (CH phenyl), 132.7 and 133.1 (C phenyl and $C_{10'}$), 134.6 and 135.5 (C DMTr), 135.9 (CH thymine and CH phenyl), 138.4 and 138.5 ($C_{12'}$ and $C_{14'}$), 142.6 (C DMTr), 144.2 ($C_{7'}$), 150.8 and 151.1 (C DMTr and C=O thymine), 159.1 (C-OMe DMTr), 164.1 (C=O thymine).

^{31}P NMR (121.6 MHz, CDCl3), δ_{ppm}: -3.63 and -3.06.
MALDI-TOF, m/z: 1459.3 ($[M+Na]^+$), 1475.2 ($[M + K]^+$).

457: Dinucleotide thymidine-(3'-*O*-TBDPS-5'-C-(1-(4-iodobenzyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine) :

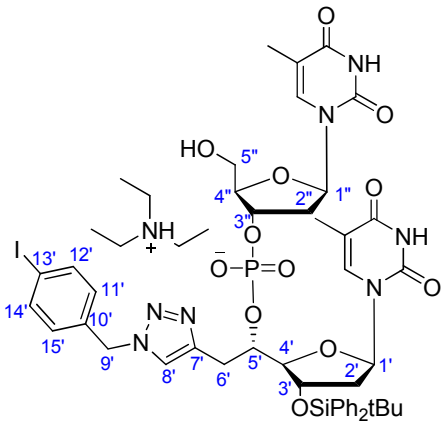


$C_{49}H_{56}IN_8O_{12}PSi$
1134,98 g.mol^{-1}

The dinucleotide **456** (450 mg, 0.31 mmol, 1 eq.) is solubilised into 3 mL of CH_2Cl_2 and 90 µL of TFA were added. The clearly red solution was stirred 30 min at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography (EA/MeOH 100/0 → 95/5) affording 350 mg of **457** as a white foam (98 % yield).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.03 (s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.24 (m, 1H, $H_{6'}$), 1.83 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.27 - 2.75 (m, 7H, $H_{6'}$, $H_{2'}$, $H_{2''}$ and CH_2CN), 3.74 - 4.01 (m, 7H, $H_{5'}$, $H_{5''}$,$H_{4'}$, OH and CH_2O), 4.40 (s, 2H, $H_{4''}$ and $H_{3''}$), 4.97 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.42 (s, 2H, $H_{9'}$), 6.01- 6.39 (m, 2H, $H_{1'}$ and $H_{1''}$), 7.01 (2d, 2H, *J = 8.0 Hz*, $H_{11'}$ and $H_{15'}$), 7.35 - 7.42 (m, 9H, $H_{8'}$ and CH phenyl), 7.58 - 7.62 (m, 4H, CH phenyl and CH thymine), 7.68 (2d, 2H, *J = 8.0 Hz*, $H_{12'}$ and $H_{14'}$), 9.73 (s, 2H, NH thymine).
^{13}C NMR (100.2 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.4 (CH_3 thymine), 19.00 ($\underline{C}H_2CN$ and C *t*Bu), 26.9 (CH_3 *t*Bu), 29.8 ($C_{6'}$), 38.3 ($C_{2'}$ and $C_{2''}$), 53.4 ($C_{9'}$), 60.5 ($C_{5'}$ and $C_{5''}$), 62.7 (CH_2O), 74.5 ($C_{4''}$), 79.4 and 79.6 ($C_{3'}$), 85.7 ($C_{1'}$ and $C_{1''}$), 87.7 ($C_{4'}$), 94.8 ($C_{13'}$), 111.8 (CN), 115.1 and 117.9 (C thymine), 123.3 ($C_{8'}$), 128.3 (CH phenyl), 130.1 and 130.3 ($C_{11'}$ and $C_{15'}$), 132.8 - 133.1 (C phenyl), 134.6 - 134.7 ($C_{10'}$), 135.9 (CH thymine), 138.4 ($C_{12'}$ and $C_{14'}$), 142.6 ($C_{7'}$), 151.0 (C=O thymine), 164.5 - 164.7 (C=O thymine).
^{31}P NMR (121. MHz, $CDCl_3$), δppm: - 3.26.
MALDI-TOF, m/z: 1157.4 ($[M+Na]^+$).

458: Cleavage of the cyanoethyle group



$C_{52}H_{68}IN_8O_{12}PSi$
1183,11 g.mol^{-1}

A solution of dinucleotide **457** (190 mg, 0.17 mmol, 1 eq.) and NEt_3 (350 µL, 2.49 mmol, 15 eq.) in 3.4 mL of CH_3CN were stirred 1h at 60°C. The solvents were removed under vacuum and 170 mg of **458** were obtained without purification as a white foam (86 % yield).

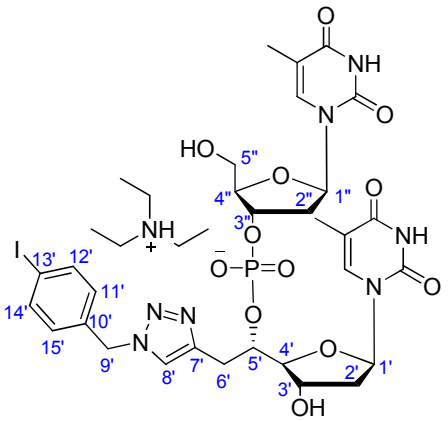
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 1.01 (CH_3 *t*Bu), 1.28 (t, 9H, *J = 8.0 Hz*, CH_3 $HNEt_3^+$), 1.88 and 1.89 (2s, 6H, CH_3 thymidine), 2.07 - 2.23 (m, 4H, H2′ and $H_{2''}$), 3.05 (t, 1H, *J = 8.0 Hz*, $H_{6'}$), 3.17 (q, 7H, *J = 8.0 Hz* , $H_{6'}$ and CH_2 $HNEt_3^+$), 3.70 (s, 2H, $H_{5'}$), 3.85 (s, 2H, $H_{4'}$ and $H_{4''}$), 4.01 - 4.09 (m, 1H, $H_{5'}$), 4.61 (s, 1H, $H_{3'}$), 4.77 (s, 1H, $H_{3''}$), 5.51 (s, 2H, $H_{9'}$), 6.11 (t, 1H, *J = 4.0 Hz*, $H_{1''}$), 6.58 (t, 1H, *J = 8.0 Hz*, $H_{1'}$), 7.08 (2d, 2H, *J = 12.0 Hz*, $H_{11'}$ and $H_{15'}$), 7.24 - 7.42 (m, 8H, CH phenyl), 7.56 (d, 2H, *J = 8.0 Hz*, CH phenyl), 7.64 (d, 2H, *J = 8Hz*, $H_{12'}$ and $H_{14'}$), 7.77 (2s, 2H, $H_{8'}$ and CH thymine), 7.89 (s, 1H, CH thymine).

^{13}C NMR (100.2 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 9.35 (CH_3 $HNEt_3^+$), 12.7 and 12.9 (CH_3 thymine), 27.6 (CH_3 tBu), 29.7 ($C_{6'}$), 40.1 ($C_{2'}$) 41.1 ($C_{2''}$), 46.9 (CH_2 $HNEt_3^+$), 54.4 ($C_{9'}$), 62.6 ($C_{5''}$), 76.5 ($C_{3''}$), 76.6 ($C_{5'}$), 77.3 ($C_{3'}$), 86.0 ($C_{1'}$ and $C_{1''}$), 86.8 ($C_{4'}$), 87.5 ($C_{4''}$), 95.1 ($C_{13'}$), 111.6 and 112.3 (C thymine), 124.9 ($C_{8'}$), 129.2 ($C_{11'}$, $C_{15'}$ and CH phenyl), 131.3 ($C_{10'}$ and C phenyl), 136.8 (CH phenyl), 137.1 (CH phenyl), 138.3 (CH thymine), 139.4 ($C_{12'}$ and $C_{14'}$), 144.7 ($C_{7'}$), 152.3 and 152.7 (C=O thymine), 166.4 (C=O thymine).

^{31}P NMR (121.6 MHz, MeOD), δ_{ppm}: -2.14

MALDI-TOF, m/z: 1078.8 ($[M\text{-}HNEt_3^+]^-$).

459: Dinucleotide thymidine-(5'-C-(1-(4-iodobenzyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine)



$C_{36}H_{50}IN_8O_{12}P$
944,71 g.mol^{-1}

A solution of **458** (170 mg, 0.14 mmol, 1 eq.) and TBAF 1M in THF (170 µL, 0.17 mmol, 1.2 eq.) in 2 mL of CH_3CN (HPLC grade) was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the crude product was purified by precipitation in Et_2O. 105 mg of **459** were recovered under the triethylammonium salt form as white foam (77% yield).

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 1.30 (t, 9H, J = 7.1 Hz, CH_3 $HNEt_3^+$), 1.59 - 1.72 (m, 2H, $H_{6'}$), 1.86 (s, 3H, CH_3 thymine), 1.93 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.20 - 2.51 (m, 4H, $H_{2'}$ and $H_{2''}$), 3.15 - 3.27 (m, 7H, $H_{5'}$ and CH_2 $HNEt_3^+$), 3.79 - 3.83 (m, 3H, $H_{4'}$ and $H_{5''}$), 4.11 - 4.16 (m, 1H, $_{4''}$), 4.57 - 4.72 (m, 2H, $H_{3'}$ and $H_{3''}$), 5.54 (s, 2H, $H_{9'}$), 6.19 - 6.43 (m, 2H, $H_{1'}$ and $H_{1''}$), 7.07 (d, 2H, *J = 8.3 Hz*, $H_{11'}$ and $H_{15'}$), 7.67 (d, 2H, *J = 7.9 Hz*, $H_{12'}$ and $H_{14'}$), 7.85 (d, 1H, *J = 5.6 Hz*, CH thymine), 7.93 - 7.96 (m, 2H, $H_{8'}$ and CH thymine).

^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD), δ_{ppm}: 9.2 (CH_3 $HNEt_3^+$), 12.6 and 12.9 (CH_3 thymine), 24.7 ($C_{6'}$), 40.0 and 40.6 ($C_{2'}$ and $C_{2''}$), 47.6 (CH_2 $HNEt_3^+$), 54.1 ($C_{9'}$), 59.4 ($C_{5'}$), 62.8 ($C_{5''}$), 72.1 and 77.1 ($C_{3'}$ and $C_{3''}$), 85.5 and 86.0 ($C_{1'}$ and $C_{1''}$), 87.6 and 88.0 ($C_{4'}$ and $C_{4''}$), 94.8 ($C_{13'}$), 111.5 and 112.1 (C thymine), 125.7 ($C_{8'}$), 131.1 ($C_{11'}$ and $C_{15'}$), 136.7 and 138 ($C_{7'}$, $C_{10'}$ and CH thymine), 139.1 ($C_{12'}$ and $C_{14'}$), 152.17 and 152.3 (C=O thymine), 166.2 (C=O thymine).

^{31}P NMR (81.2 MHz, MeOD), δ_{ppm}: -0.63

MALDI-TOF, m/z: 843.9 ([M+2H$^+$- $HNEt_3^+$]$^+$), 865.9 ([M+H$^+$+Na$^+$- $HNEt_3^+$]$^+$).

HPLC: rt = 17.15 and 17.81 min (A/B: from 20/80 to 30/70 in 15 min then to 50/50 in 2 min then to 50/50 during 2 min then to 20/80 in 1 min)

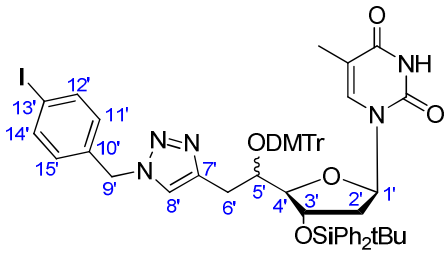
SYNTHESIS
OF
MODIFIED OLIGODEOXYNUCLEOTIDES

SYNTHESIS OF PHOSPHORAMIDITES

General procedure the 5'-O protection with DMTr group:

A solution of 3'-*O*-TBDPS-modified thymidine (1 eq.), 2,4,6-collidine (10 eq.),DMTrCl (2.5 eq.) and $AgNO_3$ (2.5 eq.) in freshly distilled THF (0.04 M) was stirred 8h at room temperature. CH_2Cl_2 was added and the salts were filtered out. The filtrate was diluted with EA and washed with H_2O and brine. The organic layer was dry over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography affording the desired product as a white foam.

431: 3'-*O*-TBDPS-5'-*O*-DMTr-5'-C-(1-(4-iodobenzyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine



$C_{57}H_{58}IN_5O_7Si$
1080,09 g.mol^{-1}

The general procedure was used with 920 mg of **369**, 1.01 g of DMTrCl, 501 mg of $AgNO_3$ and 1.6 mL of 2,4,6-collidine. The crude product was purified by flash chromatography (EA/PE 20/80 → 80/20 + 1 % Et_3N). 1.042 g of **431** were recovered as a white foam (82 % yield).

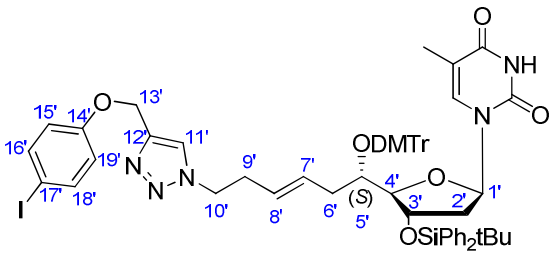
m.p. (°C): 131.2 - 131.7.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 0.89 and 1.03 (2s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.24 (m, 0.2H, $H_{2'}$), 1.68 (s, 3H, CH_3 thymine), 1.89 - 1.93 (m, 0.2H, $H_{2'}$), 2.08 - 2.26 (m, 1.6H, $H_{2'}$), 2.62 - 2.95 (m, 2H, $H_{6'}$), 3.46 - 3.55 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.52 (d, 1.7H, *J = 6.0 Hz*, CH_3 DMTr), 3.69 (d, 4.3H, *J = 1.5 Hz*, CH_3 DMTr), 3.84 - 4.16 (m, 1H, $H_{4'}$), 4.30 (d, 1H, *J = 6.0 Hz*, $H_{3'}$), 5.25 (q, 2H, *J = 15.0 Hz*, $H_{9'}$), 6.37 and 6.50 (2q, 1H, *J = 3.0 Hz*, $H_{1'}$), 6.56 - 6.61 (m, 1H, C<u>H</u>COMe), 6.67 (t, 3H, *J = 6.0 Hz*, C<u>H</u>COMe), 6.85 - 6.88 (m, 3H, $H_{11'}$, $H_{15'}$ and $H_{8'}$), 6.97 - 7.54 (m, 19H, CH phenyl), 7.60 (d, 2H, *J = 6.0 Hz*, $H_{12'}$ and $H_{14'}$), 7.84 (s, 1H, CH thymine).

^{13}C NMR (81.2 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.3 (CH_3 thymine), 19.1 (C *t*-Bu), 26.9 (CH3 *t*-Bu), 28.1 - 28.6 ($C_{6'}$), 39.6 and 41.6 ($C_{2'}$), 53.3 ($C_{9'}$), 55.4 (O-CH_3 DMTr), 73.2 and 73.8 ($C_{5'}$), 74.5 and 74.8 ($C_{3'}$), 83.5 and 83.8 ($C_{1'}$), 87.2 (C DMTr), 87.8 and 88.5 ($C_{4'}$), 94.6 ($C_{13'}$), 111.5 (C thymine), 113.2 (<u>C</u>HCOCH3), 121.7 ($C_{8'}$), 127.0 - 130.6 (C phenyl, $C_{11'}$ and $C_{15'}$), 133.0 and 133.3 ($C_{7'}$), 134.7 ($C_{10'}$), 135.4 (CH thymine), 138.3 ($C_{12'}$ and $C_{14'}$), 144.4 (C DMTr), 150.6 (C=O thymine), 158.8 (CH<u>C</u>OMe), 164.0 (C=O thymine).

HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{57}H_{58}IN_5NaO_7Si$ ($[M + Na]^+$) 1102.3042, found 1102.3022.

(*S*)-432: 3'-*O*-TBDPS-5'-*O*-DMTr-(5'S)-C-(1-(pent-3-enyl)-(4-(4-iodophenoxy)-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine

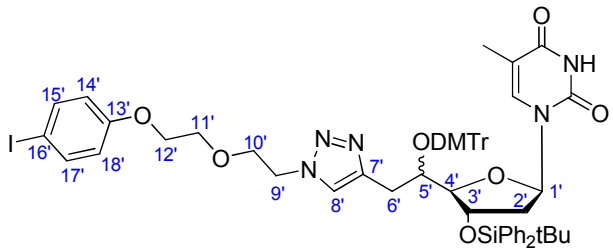


$C_{61}H_{64}IN_5O_8Si$
1150,18 g.mol^{-1}

The general procedure was used with 700 mg of **(*S*)-357**, 705 mg of DMTrCl, 350 mg of $AgNO_3$ and 1.13 mL of 2,4,6-collidine. The crude product was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2/PE 90/10 → 100/0 + 1 % NEt_3). 740 mg of **(*S*)-432** were recovered as a white foam (78 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 0.90 (s, 9H, CH_3 *t*Bu), 1.68 (s, 3H, CH_3 thymine), 1.80 - 1.85 (m, 1H, $H_{2'}$), 2.09 - 2.22 (m, 2H, $H_{2'}$ and $H_{6'}$), 2.28 - 2.35 (m, 3H, $H_{6'}$ and $H_{9'}$), 2.87 (d, 1H, *J = 9.8 Hz*, $H_{5'}$), 3.83 (s, 1H, $H_{4'}$), 4.06 - 4.12 (m, 2H, $H_{10'}$), 4.32 (d, 1H, J = 5.3 Hz, $H_{3'}$), 4.54 - 4.64 (m, 1H, $H_{7'}$), 4.99 - 5.08 (m, 3H, $H_{8'}$ and $H_{13'}$), 6.51 (t, 1H, *J = 5.6 Hz*, $H_{1'}$), 6.61 (t, 4H, *J = 7.1 Hz*, CH DMTr), 6.69 (d, 2H, *J = 9.0 Hz*, $H_{15'}$ and $H_{19'}$), 6.98 - 7.41 (m, 20H, CH phenyl and CH thymine), 7.45 (d, 2H, *J = 9.0 Hz*, $H_{16'}$ and $H_{18'}$), 7.82 (s, 1H, $H_{11'}$).
^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.2 (CH_3 thymine), 18.7 (C *t*Bu), 26.7 (CH_3 *t*Bu), 33.2 ($C_{6'}$), 41.5 ($C_{2'}$), 45.8 ($C_{10'}$), 55.1 (CH_3 DMTr), 61.9 ($C_{13'}$), 74.4 ($C_{3'}$), 75.0 ($C_{5'}$), 83.3 (C DMTr), 84.4 ($C_{17'}$), 87.1 ($C_{1'}$), 87.5 ($C_{4'}$), 111.2 (C DMTr), 112.9 (CH DMTr), 117.1 ($C_{15'}$ and $C1_{9'}$), 122.5 ($C_{11'}$), 127.7 - 133.4 (CH phenyl), 135.5 ($C_{16'}$), 135.7 ($C_{18'}$), 138.3 (CH DMTr), 143.5 (C DMTr), 145.7 ($C_{12'}$), 150.6 (C=O thymine), 158.1 ($C_{14'}$), 158.6 (C DMTr), 158.7 (C DMTr), 164.2 (C=O thymine).
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{61}H_{64}IN_5O_8SiAg$ ($[M + Ag]^+$) 1256.2614; found 1256.2634.

433: 3'-*O*-TBDPS-5'-*O*-DMTr-(5S)'-C-(1-(2-(2-(4-iodophenoxy)ethoxy)ethyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine:

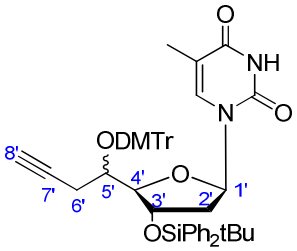


$C_{60}H_{64}I_2N_5O_9Si$
1154.35 g.mol^{-1}

The general procedure was used with 700 mg of **370**, 703 mg of DMTrCl, 350 mg of $AgNO_3$ and 1.13 mL of 2,4,6-collidine. The crude product was purified by flash chromatography (EA/PE 80/20 → 100/0 + 1 % NEt_3). 703 mg of **433** were recovered as a white foam (74 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.05 (s, 9H, CH_3 tBu), 1.69 (s, 3H, CH_3 thymine), 1.85-1.92 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.59 - 2.76 (m, 2H, $H_{6'}$), 3.47-3.55 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.66 - 3.86 (m, 11H, $H_{4'}$, $H_{10'}$, $H_{11'}$ and CH_3 DMTr), 3.99 (t, 2H, *J = 4.3 Hz*, $H_{9'}$), 4.20 - 4.40 (m, 4H, $H_{3'}$ and $H_{12'}$), 6.36 (2d, 1H, *J = 5.4 Hz*, $H_{1'}$), 6.59 - 6.66 (m, 6H, $CH_{14'}$, $CH_{18'}$ and CH DMTr), 6.79 (s, 1H, $H_{8'}$), 7.09 - 7.67 (m, 22H, $H_{15'}$, $H_{17'}$, CH thymine, CH phenyl and CH DMTr), 7.8 (s, 1H, NH).
^{13}C NMR (81.2 MHz, CDCl3), δ_{ppm}: 11.9 (CH_3 thymine), 18.9 (C tBu), 26.8 (CH_3 tBu), 27.9 ($C_{6'}$), 39.3 ($C_{2'}$), 49.8 ($C_{9'}$), 55.1 (CH_3 DMTr), 67.3 ($C_{12'}$), 69.5 ($C_{3'}$), 72.9 ($C_{5'}$), 73.7 ($C_{4'}$), 83.1 ($C_{16'}$), 83.7 ($C_{1'}$), 87.0 ($C_{10'}$ and $C_{11'}$), 88.4 ($C_{16'}$), 111.2 (C thymine), 112.9 and 116.8 (CH DMTr), 122.6 ($C_{8'}$), 126.7 - 130.4 ($C_{14'}$, $C_{18'}$ and CH phenyl), 133.3 and 138.2 ($C_{15'}$, $C_{17'}$ and CH phenyl), 143.9 (C phenyl), 145.8 (C7'), 150.3 (C=O thymine), 158.7 ($C_{13'}$ and C-OMe DMTr), 163.7 (C=O thymine).
HRMS (ESI) submitted.

434: 3'-*O*-TBDPS-5'-*O*-DMTr-(5*S*)'-C-propargylthymidine



$C_{50}H_{52}N_2O_7Si$
821,04 g.mol^{-1}

The general procedure was used with 1 g of **360**, 1.64 g of DMTrCl, 823 mg of $AgNO_3$ and 2.6 mL of 2,4,6-collidine. The crude product was purified by flash chromatography (EA/PE 20/80 → 50/50 + 1 % NEt_3). 1.21 g of **434** were recovered as a white foam (76 % yield).

m.p. (C°): 113.8 - 115.3

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.02 (s, 9H, *t*-Bu), 1.69 (s, 3H, CH_3 thymine), 1.84 (s, 1H, $H_{8'}$), 2.12 - 2.17 (m, 2H, $H_{2'}$ and $H_{6'}$), 2.34 - 2.41 (m, 2H, $H_{2'}$ and $H_{6'}$), 3.33 (d, 1H, *J = 9.0 Hz*, $H_{5'}$), 3.77 (d, 6H, *J = 3.0 Hz*, CH_3 DMTr), 4.38 - 4.41 (m, 2H, $H_{3'}$ and $H_{4'}$), 6.54 - 6.59 (m, 1H, $H_{1'}$), 6.71 (t, 4H, *J = 9.0 Hz*, CH phenyl), 7.06 - 7.61 (m, 21H, CH phenyl), 7.81 (s, 1H, CH thymine).

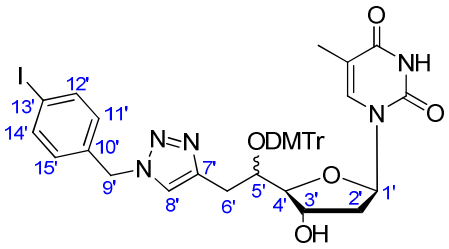
^{13}C NMR (81.2 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.1 (CH_3 thymine), 18.8 (C *t*-Bu), 21.9 ($C_{6'}$), 26.8 (CH_3 *t*Bu), 41.5 ($C_{2'}$), 55.1 (OCH_3), 70.6 ($C_{8'}$), 73.2 ($C_{5'}$), 74.6 ($C_{3'}$), 80.0 ($C_{7'}$), 84.6 ($C_{1'}$), 87.4 ($C_{4'}$), 88.1 (C DMTr), 111.1 (C thymine), 113.1 (CH phenyl), 127.1 and 128.1 (CH phenyl), 129.7 and 130.3 (CH phenyl), 132.3 and 133.2 (C phenyl), 135.2 and 135.7 (CH phenyl and CH thymine), 145.1 (C phenyl), 150.4 (C=O thymine), 158.8 (C-OCH_3), 163.7 (C=O thymine).

HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{50}H_{52}N_2NaO_7Si$ ($[M + Na]^+$) 843.3436, found 843.3432.

General procedure for the cleavage of the 3' silylated ether

3'-*O*-TBDPS-5'-*O*-DMTr modified thymidine (1 eq.) was solubilized in THF (0.1 M) and TBAF 1M in THF (2 eq.) was added. The reaction mixture was stirred overnight. The solvent was evaporated and the residue was purified by chromatography.

435: 5'-*O*-DMTr-5'-C-(1-(4-iodobenzyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine



$C_{41}H_{40}IN_5O_7$
841,69 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using **431** (950 mg) and 1.75 mL of TBAF 1M in THF.The residue was purified by chromatography (EA/CH_2Cl_2 80/20 → 100/0 + 1% Et_3N). 580 mg of **435** as a white foam were recovered (77 % yield).

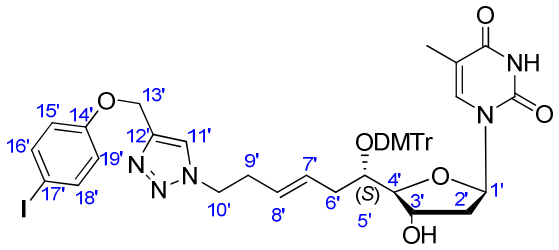
m.p. (°C): 153.3 - 154.6

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm} : 1.83 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.25 - 2.33 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.67 - 2.84 (m, 2H, $H_{6'}$), 3.77 (s, 6H, CH3 DMTr), 3.83 - 3.91 (m, 3H, $H_{4'}$, $H_{5'}$, OH), 4.30 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.35 (m, 2H, $H_{10'}$), 6.29 - 6.33 (m, 1H, $H_{1'}$), 6.78 (d, 4H, *J = 8.7 Hz*, CHCOMe DMTr), 6.93 (d, 2H, *J = 7.5 Hz*, $H_{11'}$ and $H_{15'}$), 7.02 (s, 1H, $H_{8'}$), 7.22 - 7.24 (m, 3H, CH phenyl DMTr), 7.37 (d, 4H, *J = 8.7 Hz*, CHCHCOMe DMTr), 7.45 - 7.47 (m, 2H, CH phenyl DMTr), 7.70 (d, 2H, *J = 7.6 Hz*, $H_{12'}$ and $H_{14'}$), 7.73 (s, 1H, CH thymine).

^{13}C NMR (81.2 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm} :11.8 and - 12.4 (CH_3 thymine), 27.8 ($C_{6'}$), 40.0 - 40.6 ($C_{2'}$), 53.4 ($C_{9'}$), 55.3 (CH_3 DMTr), 71.4 ($C_{3'}$), 76.7 (CH DMTr), 83.5 and 84.1 ($C_{1'}$), 87.1 and 87.3 ($C_{4'}$ and C DMTr), 94.5 ($C_{13'}$), 111.2 (C thymine), 113.2 (CH DMTr), 122.5 ($C_{8'}$), 127.1 and 128.4 (CH DMTr), 129.8 ($C_{11'}$ and $C_{15'}$), 130.3 ($C_{7'}$), 130.5 (CH DMTr), 134.4 ($C_{10'}$), 136.1 (CH thymine), 138.2 ($C_{12'}$ and $C_{14'}$), 143.9 (C DMTr), 150.5 (C=O thymine), 158.9 (COMe DMTr), 164.0 (C=O thymine).

HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{41}H_{40}IN_5NaO_7$ ($[M + Na]^+$) 864.1866, found 864.1864.

(*S*)-436: 5'-*O*-DMTr-(5'S)-C-(1-(pent-3-enyl)-(4-(4-iodophenoxy)-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine

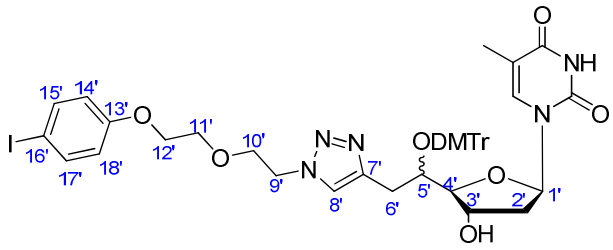


$C_{45}H_{46}IN_5O_8$
911,78 g.mol^{-1}

The product was synthesized according the general procedure using **(*S*)-432** (690 mg) and 1.2 mL of TBAF 1M in THF.The residue was purified by chromatography (EA/CH_2Cl_2 0/100 → 50/50 + 1% Et_3N). 430 mg of **(*S*)-436** were recovered as a white foam (80 % yield).

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$), δppm: 1.76 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.07 (m, 2H, $C_{2'}$), 2.20 - 2.42 (m, 4H, $H_{6'}$ and $H_{9'}$), 3.06 - 3.11 (m, 1H, $C_{4'}$), 3.78 (s, 6H, CH_3 DMTr), 4.20 - 4.35 (m, 3H, $H_{3'}$ and $H_{10'}$), 4.78 - 4.90 (m, 1H, $H_{7'}$), 5.07 - 5.16 (m, 3H, $H_{8'}$ and $H_{13'}$), 6.42 (t, 1H J = 6.5 Hz, $H_{1'}$), 6.73 (d, 2H, J = 8.1 Hz, $H_{15'}$ and $H_{19'}$), 6.81 (dd, 4H, J = 8.7 and 2.0 Hz, CH DMTr), 7.19 - 7.42 (m, 9H, CH DMTr), 7.48 (s, 1H, $H_{11'}$), 7.53 (d, 2H, J = 7.9 Hz, $H_{16'}$ and $H_{18'}$), 7.94 (s, 1H, CH thymine), 9.27 (s, 1H, NH thymine).
^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$), δppm: 12.3 (CH_3 thymine), 26.5 ($C_{9'}$), 33.4 and 34.7 ($C_{6'}$), 40.9 ($C_{2'}$), 49.9 ($C_{10'}$), 55.2 (CH_3 DMTr), 61.8 ($C_{13'}$), 72.2 ($C_{3'}$), 74.6 ($C_{5'}$), 83.5 (C DMTr), 84.3 ($C_{17'}$), 86.9 ($C_{1'}$), 87.1 ($C_{4'}$), 111.2 (C thymine), 113.0 (CH DMTr), 117.3 ($C_{15'}$ and $C_{19'}$), 122.8 ($C_{11'}$), 127.1 ($C_{7'}$ and $C_{8'}$), 127.7 (CH DMTr), 127.8 (CH DMTr), 130.3 ($C_{16'}$ and $C_{18'}$), 136.1 (CH thymine), 138.3 (CH DMTr), 143.6 (C DMTr), 145.8 ($C_{12'}$), 150.4 (C=O thymine), 157.9 ($C_{14'}$), 158.6 (C DMTr), 164.2 (C=O thymine).
IR (ATR), ν (cm^{-1}): 2960, 1684, 1607, 1507, 1484, 1264, 1244, 1176, 1030, 823.
HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{45}H_{46}IN_5O_8Na$ ($[M + Na]^+$) 934.2283, found 934.2293.

437: 5'-*O*-DMTr-5'-C-(1-(2-(2-(4-iodophenoxy)ethoxy)ethyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine

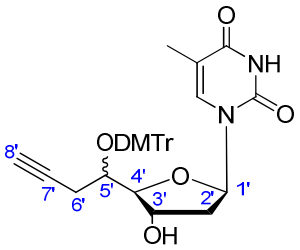


$C_{44}H_{46}IN_5O_9$
915,77 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using **433** (643 mg) and 843 µL of TBAF 1M in THF. The residue was purified by chromatography (EA/CH_3CN 90/10 + 1% Et_3N). 270 mg of **437** were recovered as a white foam (53 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, CDCl3), δ_{ppm}: 1.81 (s, 3H, CH_3 thymine), 2.16 - 2.34 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.65 - 2.82 (m, 2H, $H_{6'}$), 3.70 - 3.85 (m, 12H, $H_{4'}$, $H_{5'}$, $H_{10'}$, $H_{11'}$ and CH_3 DMTr), 3.97 (t, 2H, *J = 3.9 Hz*, $H_{9'}$), 4.26 - 4.29 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.41 - 4.44 (m, 2H, $H_{12'}$), 6.28 (t, 1H, *J = 7.2 Hz*, $H_{14'}$ and $H_{18'}$), 6.78 and 6.82 (2d, 4H, *J = 3.9 Hz*, CH DMTr), 7.16 - 7.26 (m, 4H, CH DMTr), 7.36 - 7.41 (m, 4H, $H_{15'}$, $H_{17'}$, CH DMTr), 7.46 - 7.50 (m, 4H, CH thymine and CH DMTr), 7.75 (s, 1H, NH thymine).
^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl3), δ_{ppm}: 12.3 (CH_3 thymine), 27.7 ($C_{6'}$), 40.6 ($C_{2'}$), 46.1 ($C_{9'}$), 55.1 (CH_3 DMTr), 67.2 ($C_{12'}$), 69.5 ($C_{10'}$), 71.3 ($C_{3'}$), 73.4 ($C_{11'}$), 83.05 ($C_{16'}$), 83.9 ($C_{5'}$), 87.0 ($C_{1'}$), 87.1 (C DMTr), 97.6 ($C_{4'}$), 111.01 (C thymine), 113.02 ($C_{8'}$, $C_{14'}$ and $C_{18'}$), 116.8 (CH DMTr), 123.5 - 135.8 (CH DMTr), 136.1 (C DMTr), 138.01 ($C_{15'}$, $C_{17'}$, CH thymine and CH DMTr), 143.2 (C DMTr), 145.6 ($C_{7'}$), 150.3 (C=O), 152.8 ($C_{13'}$), 158.6 (C DMTr), 164.0 (C=O).
HRMS (ESI) submitted.

438: 5'-*O*-DMTr-(5S)'-C-propargyl-thymidine



$C_{34}H_{34}N_2O_7$
582,64 g.mol^{-1}

The product was synthesized according the general procedure using **434** (1.1 g) and 2.66 mL of TBAF 1M in THF.The residue was purified by chromatography (EA/PE 50/50 → 80/20 + 1% Et_3N). 640 mg of **438** were recovered as a white foam (81 % yield).

m.p. (°C): 108.3 - 109.2

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 1.71 (s, 3H, CH_3 thymine), 1.85 (s, 1H, $H_{8'}$), 2.15 - 2.34 (m, 4H, $H_{2'}$ and $H_{6'}$), 3.57 - 3.60 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.69 (s, 6H, CH_3 DMTr), 3.98 - 4.00 (m, 1H, $H_{4'}$), 4.44 - 4.46 (m, 1H, $H_{3'}$), 6.27 (t, 1H, J = 6.8 Hz, $H_{1'}$), 6.75 (dd, 4H, J = 0.9 Hz and 3 Hz, CH DMTr), 7.05 - 7.09 (m, 3H, CH phenyl), 7.14 (t, 4H, J = 9 Hz, CH phenyl), 7.23 (d, 2H, J = 9 Hz, CH phenyl), 7.63 (s, 1H, CH thymine).

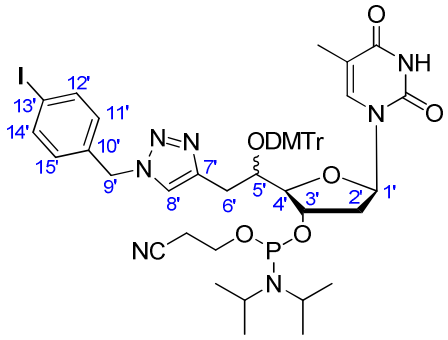
^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 12.3 (CH_3 thymine), 21.5 ($C_{6'}$), 40.6 ($C_{2'}$), 55.2 (CH_3 DMTr), 70.9 ($C_{3'}$), 71.2 ($C_{8'}$), 71.8 ($C_{5'}$), 80.6 ($C_{8'}$), 84.0 ($C_{1'}$), 86.7 ($C_{7'}$), 87.5 ($C_{4'}$), 111.2 (C thymine), 113.2 (CHCOMe), 127.2 (C phenyl), 127.9 (C phenyl), 128.0 (C phenyl), 130.2 (CH phenyl), 135.5 (C phenyl), 135.8 (C phenyl), 142.6 (C phenyl), 150.4 (C=O thymine), 158.8 (COMe), 164.0 (C=O thymine).

HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{34}H_{34}N_2NaO_7$ ($[M + Na]^+$) 605.2258, found 605.2251.

General procedure for the 3'-*O*-phosphoramidite thymidine synthesis

Under inert atmosphere, a solution of 5'-*O*-DMTr modified thymidine, DIEA (4 eq.) and PCl(CEO)(N*i*Pr$_2$) (2eq.) in freshly distilled THF (0.2 M) was stirred 45 min at room temperature. The white precipitate was flitered and the filtrate was diluted with degazed EA. The reaction mixture was washed with ice solution of $NaCO_3$ 10%, dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography affording the expected product.

439: 3'-*O*-(2-cyanoethyldiisopropylphosphoramidite)-5'-*O*-DMTr-5'-C-(1-(4-iodobenzyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine

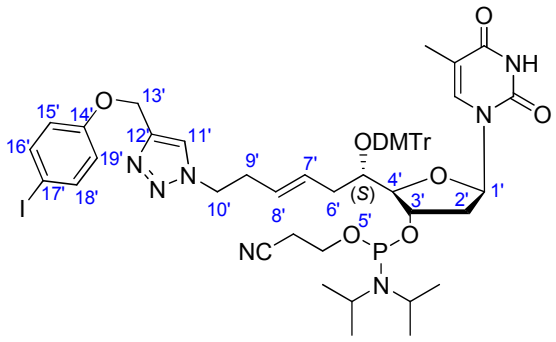


$C_{50}H_{57}IN_7O_8P$
1041,91 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 580 mg of **435**, 242 µl of PCl(CEO)(N*i*Pr$_2$) and 475 µL of DIEA. 493 mg of **439** was recovered after purification by flash chromatography (EA + 1% Et_3N) as a white foam (80 % yield).

^{31}P NMR (81.2 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 149.9, 148.5.

(*S*)-440: 3'-*O*-(2-cyanoethyldiisopropylphosphoramidite)-5'-*O*-DMTr-(5'S)-C-(1-(pent-3-enyl)-(4-(4-iodophenoxy)-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine

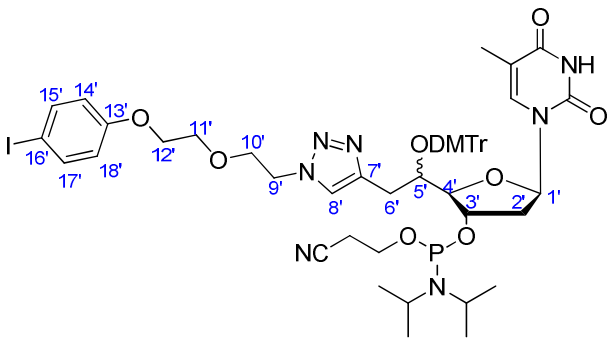


$C_{54}H_{63}IN_7O_9P$
1112,00 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 400 mg of **(*S*)-436**, 152 µl of PCl(CEO)(N*i*Pr$_2$) and 300 µL of DIEA. 242 mg of **(*S*)-440** was recovered after purification by flash chromatography (EA/Et$_2$O 50/50 + 1% Et$_3$N) as a white foam (80 % yield).

^{31}P NMR (81.2MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 149.5, 148.9.

441: 3'-*O*-(2-cyanoethyldiisopropylphosphoramidite)-5'-*O*-DMTr-(5'*S*)-C-(1-(2-(2-(4-iodophenoxy)ethoxy)ethyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine:

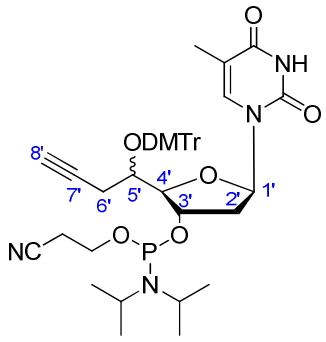


$C_{53}H_{63}IN_7O_{10}P$
1115,99 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 270 mg of **437**, 105 µl of PCl(CEO)(N*i*Pr$_2$) and 200 µL of DIEA. 170 mg of **441** was recovered after purification by flash chromatography (EA + 1% Et$_3$N) as a white foam (52 % yield).

^{31}P NMR (81.2 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 149.7, 149.0.

442: 3'-*O*-(2-cyanoethyldiisopropylphosphoramidite)-5'-*O*-DMTr-(5*S*)'-C-propargyl-thymidine



$C_{43}H_{51}N_4O_8P$
782,89 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 500 mg of **438**, 302 µl of PCl(CEO)(N*i*Pr$_2$) and 600 µL of DIEA. 224 mg of **442** was recovered after purification by flash chromatography (Et$_2$O + 1% Et$_3$N) as a white foam (33 % yield).

^{31}P NMR (81.2 MHz, $CDCl_3$), δ_{ppm}: 149.9, 148.9

SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES

Automatised synthesis

Oligonucleotides were synthesized according to the phosphoramidite methods on an Applied model 394 synthesizer from Applieds Biosystems. The synthesis scale was 1 µmol on cytidine and guanosine supported cartridge.
The deprotection of nitrogen bases were carried in presence of 33% ammoniac solution at 80°C during 4h. After removing solvent, the crude product was purified by semi preparative HPLC using CH_3CN and TEAA 50 mM at pH = 7 as eluant system.

Synthesis by "click" chemistry reaction

To a solution ODN **447** or **442** (1 eq.) in 200 µl of H_2O were added a solution of azide **362** or **419** (3eq) in MeOH (0.03 M), a solution of $CuSO_4.{}_5H_2O$ (5 eq.) in H_2O (0.05 M) and a sodium of sodium ascorbate (12.5 eq.) in H_2O (0.125 M). The reaction mixture was stirred 30 min at 60 °C and 50 W. The solvent were removed and the crude product was purified by steric exclusion on a illustra NAP-10 Column from GEhealthcare.

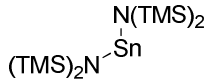
UV spectrophotometry assay

The oligonucleotide assays was carried out on a Varian Cary 300 Bio spectrophometer with Peltier effect driven by CaryWin UV software. The measurements were done with a 1 cm optical path quartz tank at 90°C and 260 nm. Concentrations were determinated using the molar extinction coefficient (ε) of the unmodified oligonucleotide calculated with www.idtna.com

Séquence	ε ($cm^{-1}.mol^{-1}.L$)
443	92800
446	
447	
448	
444	93900
445	
449	81600
450	
451	

Transfer of methyl group by modified Stille cross coupling

145: Lappert stannylene



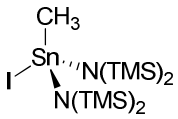
$C_{12}H_{36}N_2Si_4Sn$
439,48 g.mol^{-1}

To a solution of hexamethyldisilazane (6.58 mL, 31 mmol, 1 eq.) in 25 mL of THF/Et_2O 1/1 was added a solution of *n*-butyllithium (2.5 M in hexane, 12.4 mL, 31 mmol, 1 eq.) at -78°C under nitrogen. The mixture was stirred 1h at -78°C and allowed to reach room temperature within 1h30. The solution of LiHMDS was transferred into a suspension of dried $SnCl_2$ (2.98 g, 15.5 mmol, 0.5 eq.) in 15 mL of Et_2O at -78°C under nitrogen. The brown suspension was warmed at room temperature and stirred 3h. The supernatant was transferred and the solvents were removed under vacuum. The crude product was purified by distillation under reduced pression (170 °C, 0.1 mmHg) affording 3.6 g of **233** as an orange oil (53 % yield).

^{1}H NMR (300 MHz, THF *d_4*), δ_{ppm}: 0.31 (s, 36H, CH_3Si)

The product has been already described (Herve A., Rodriguez A.L., Fouquet E., *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1953).

384: Iodo-bis(*N,N*-bistrimethylsilylamino)methyltin



$C_{13}H_{39}IN_2Si_4Sn$
581,42 g.mol^{-1}

To a solution of **145** (1.1 g, 2.5 mmol) in 20 mL of freshly distilled THF was added iodomethane (140 µL, 2.63 mL) under nitrogen at room temperature. The yellow light solution was stirred 5 min at room temperature and the solvent was remover under vacuum. 1.4 g of **384** was obtained without any purification as a white powder (100 % yield).

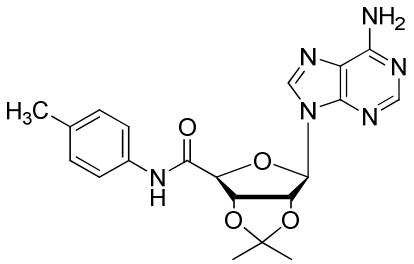
^{1}H NMR (300 MHz, THF d_4), δ_{ppm}: 0.31 (s, 36H, CH_3Si), 1.28 (t, 3H, J = 35.8 Hz, CH_3Sn).

The product has been already described (Herve A., Rodriguez A.L., Fouquet E., *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1953).

General procedure for the modified cross coupling méthylation on modified nucleosides:

To a solution of **384** (2 eq.) in THF (0.5 M) was added a solution of TBAF 1 M in THF (6 eq.). The colorless solution was stirred 5 min and the solvent was removed. The residue was solubilized into solvent (0.2 to 1 M). The catalyst, the additive (if necessary), the ligand (if necessary) and the electrophile (1 eq.) were added. The reaction mixture was stirred at the desired temperature in an oil bath or under micro-waves. After the quantitative consumption of the starting product confirmed by HPLC, the reaction mixture was diluted with methanol and the precipitate was filtrate. Solvents were then removed under vacuum and the crude product was purified by semi-preparative HPLC.

399: 2',3'-*O*-isopropylidene-5'-(*N*-(4-methylphenyl)-carboxamido)-adenosine



$C_{20}H_{22}N_6O_4$
410,43 g.mol^{-1}

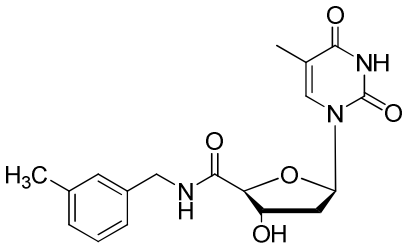
The product was synthesized according to the general procedure using 20 mg of **304**, 45 mg of **384**, 4 mg of Pd_2dba_3, 780 µL of TBAF and 500 µL of DMF. The reaction mixture was stirred 30 min at 100 °C in a oil bath. Then the solvent was removed under vacuum and the residue was purified by semi-preparative HPLC (A/C: from 50/50 to 70/30 in 11 min then to 80/20 in 1 min then to 80/20 during 2 min then to 50/50 in 1 min).

The retention time was consistent with **399** synthesized from 4-methyl-aniline.

Methylation of 332:

The reaction was carried out according to the general procedure using 300 mg of **332**, 740 mg of **384**, 120 mg of Pd_2dba_3, 3.8 mL of TBAF and 500 µL of DMF. The reaction mixture was stirred 5 min at 100 °C in a oil bath. A ratio of 79/21 between **402** and **403** was observed by HPLC. The solvent was then removed under vacuum and the desired products were obtained by semi-preparative HPLC (A/C: from 40/60 to 70/30 in 15 min then 90/10 in 1 min then 40/60 in 1 min).

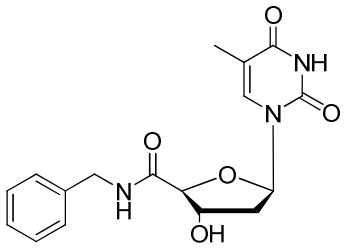
402: 5'-(*N*-(3-methylbenzyl)-carboxamido)-thymidine



$C_{18}H_{21}N_3O_5$
359,38 g.mol^{-1}

HRMS (ESI); m/z calculated for $C_{18}H_{21}N_3O_5Na$ ($[M + Na]^+$) 382.1273, found 382.1373.
HPLC: rt = 7.61 min (A/C: from 40/60 to 70/30 in 15 min then to 90/10 in 1 min then to 40/60 in 1 min).

403: 5'-(*N*-benzyl-carboxamido)-thymidine



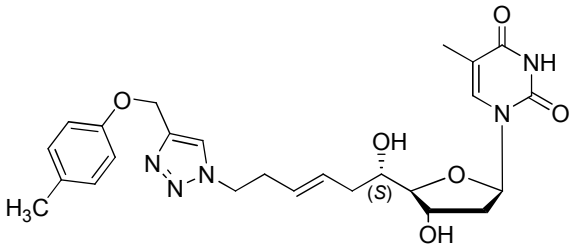
$C_{17}H_{19}N_3O_5$
345,35 g.mol^{-1}

MS (ESI): 346.14 ($[M + H]^+$), 368.52 ($[M + Na]^+$)
HPLC: rt = 4.90 min (A/C: from 40/60 to 70/30 in 15 min then to 90/10 in 1 min then to 40/60 in 1 min).

Methylation of (*S*)-358

The reaction was carried out according to the general procedure using with 110 mg of **(*S*)-358**, 210 mg of **384**, 8 mg of Pd_2dba_3, 7 mg of CuI , 1.1 mL of TBAF and 360 µL of DMF. The reaction mixture was stirred 5 min at 100 °C in a oil bath. A ratio of 94/6 between **(*S*)-417** and **(*S*)-418** was observed by HPLC. The solvent was then removed under vacuum and the desired products were obtained by semi-preparative HPLC (A/C: from 30/70 to 70/30 in 15 min then to 90/10 in 1 min then to 40/60 in 1 min).

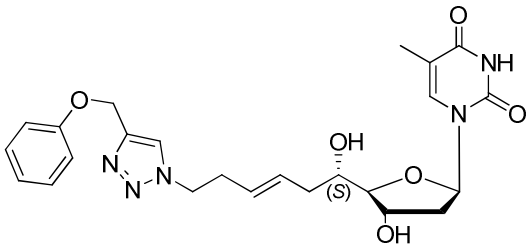
(*S*)-417: (5'S)-C-(1-(pent-3-enyl)-(4-(4-methylphenoxy)-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine



$C_{25}H_{31}N_5O_6$
497.54 g.mol^{-1}

HRMS (ESI), m/z calculated for $C_{25}H_{31}N_5O_6Na$ ($[M + Na]^+$) 520.2166, found 520.2174.
HPLC: rt = 9.94 (A/C: from 30/70 to 70/30 in 15 min then to 90/10 in 1 min then to 40/60 in 1 min).

(*S*)-418: (5'S)-C-(1-(pent-3-ényl)-(4-phenoxy-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine:



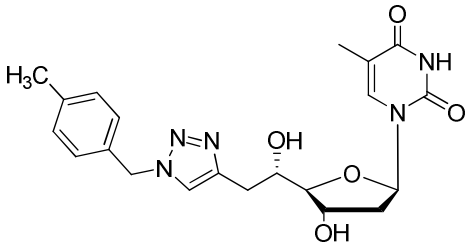
$C_{24}H_{29}N_5O_6$
483,21 g.mol^{-1}

MS (ESI): 483.24 ($[M + H]^+$), 506.20 ($[M + Na]^+$).
HPLC: rt = 7.04 min (A/C: from 30/70 to 70/30 in 15 min then to 90/10 in 1 min then to 40/60 in 1 min).

Methylation of 371:

The reaction was carried out according to the general procedure using 40 mg of **371**, 87 mg of **384**, 3.4 mg of Pd_2dba_3, 2.9 mg of CuI 460 µL of TBAF and 150 µL of DMF. The reaction mixture was stirred 2 min at 100 °C under micro-waves. A ratio of 96/4 between **423** and **424** was observed by HPLC. The solvent was then removed under vacuum and the desired products were obtained by semi-preparative HPLC (A/C: from 30/70 to 70/30 in 15 min then to 90/10 in 1 min then to 40/60 in 1 min).

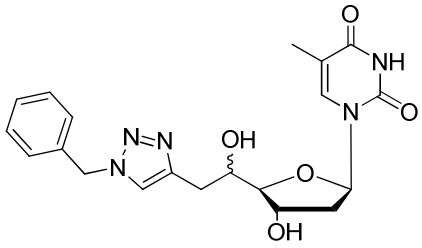
423: 5'-C-(1-(4-methylbenzyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine:



$C_{21}H_{25}N_5O_5$
427.19 g.mol^{-1}

The retention time was consistent with **423** synthesized by click chemistry from 4-methyl-azido benzene.

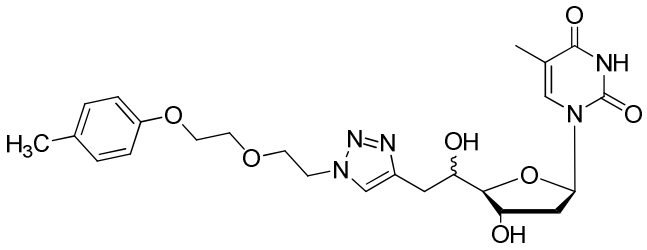
424: 5'-C-(1-benzyl-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine :



$C_{20}H_{23}N_5O_5$
413.43 g.mol^{-1}

The retention time was consistent with **424** synthesized by click chemistry from azido-benzene.

425: 5'-C-(1-(2-(2-(4-methylphenoxy)ethoxy)ethyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine



$C_{24}H_{31}IN_5O_7$
501.53 g.mol-1

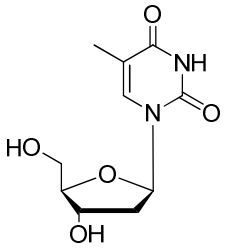
The product was synthesized according to the general procedure using 100 mg of **372**, 190 mg of **384**, 15 mg of Pd_2dba_3, 44 mg of CuI, 981 µL of TBAF and 350 µL of DMF. The reaction mixture was stirred 5 min at 100 °C. The solvent was then removed under vacuum and 418 was obtained after purification by semi-preparative HPLC (A/C: from 40/60 to 70/30 in 10 min then to 90/10 in 3 min then to 40/60 in 1 min).

MS: 502.23 ($[M + H]^+$), 524.22 ($[M + Na]^+$).
HPLC: rt = 8.09 min (A/C: from 40/60 to 70/30 in 10 min then to 90/10 in 3 min then to 40/60 in 1 min).

Methylation of 2'-deoxy-5-iodouridine:

The reaction was carried out according to the general protocol with 53 mg of 2'-deoxy-5-iodouridine, 175 mg of **384**, 14 mg of Pd_2dba_3, 12 mg of CuI, 930 µL of TBAF and 300 µL of DMF. The reaction mixture was stirred 5 min at 100 or 130 °C under micro-waves. A ratio of 75/25 between **419** and **420** was observed by HPLC. The solvent was then removed under vacuum and the desired products were obtained by semi-preparative HPLC (A/C: from 1/99 to 10/90 in 5 min then to 20/80 in 1 min then to 20/80 during 1 min then to 1/99 in 2 min).

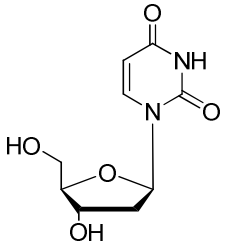
426: Thymidine



$C_{10}H_{14}N_2O_5$
242,23 g.mol^{-1}

HPLC: rt = 12.27 min (A/C: from 1/99 to 10/90 in 5 min then to 20/80 in 1 min then to 20/80 during 1 min then to 1/99 in 2 min).
The retention time was consistent with the retention time of the commercial thymidine.

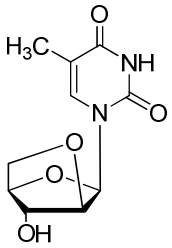
427: 2'-deoxyuridine



$C_9H_{12}N_2O_5$
228,20 g.mol^{-1}

HPLC: rt = 10.6 min (A/C: from 1/99 to 10/90 in 5 min then to 20/80 in 1 min then to 20/80 during 1 min then to 1/99 in 2 min).
The retention time was consistent with the retention time of the commercial 2'-deoxyuridine.

430: 2',3'-anhydro-thymidine:

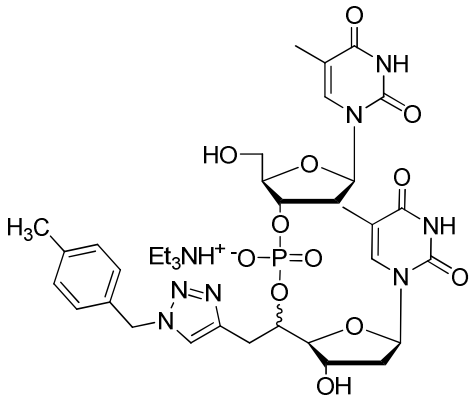


$C_{10}H_{12}N_2O_5$
240,21 g.mol^{-1}

The product was synthesized according to the general procedure using 45 mg of **429**, 140 mg of **384**, 11 mg of Pd_2dba_3, 10 mg of CuI, 723 µL of TBAF and 242 µL of DMF. The reaction mixture was stirred 5 min at 100 °C under micro-waves. The desired product was obtained by semi-preparative HPLC purification (A/C: from 1/99 to 10/90 in 10 min then to 20/80 in 1 min then to 20/80 during 1 min then to 1/99 in 2 min)

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O), δ_{ppm}: 1.83 (s, 3H, CH_3 thymine), 3.38 - 3.47 (m, 2H, $H_{5'}$), 4.27 (s, $H_{4'}$), 4.53 (s, $H_{3'}$), 5.32 (d, 1H, J = 4.4 Hz, $H_{2'}$), 6.40 (d, 1H, J = 4.4 Hz, $H_{1'}$), 7.66 (s, 1H, CH thymine).
^{13}C NMR (300 MHz, D_2O), δ_{ppm}: 12.9 (CH_3 thymine), 61.0 ($C_{5'}$), 75.6 ($C_{3'}$), 89.4 ($C_{2'}$), 89.9 ($C_{4'}$), 91.3 ($C_{1'}$), 118.5 (C thymine), 134.2 (CH thymine), 152.4 (C=O thymine), 160.7 (C=O thymine).
MS (ESI): 263.06 ($[M + Na]^+$), 503.13 ($[2M + Na]^+$).
HPLC: rt = 8.78 min (A/C: from 1/99 to 10/90 in 10 min then to 20/80 in 1 min then to 20/80 during 1 min then to 1/99 in 2 min).

460: Dinucleotide thymidine-(5'-C-(1-(4-methylbenzyl)-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine)

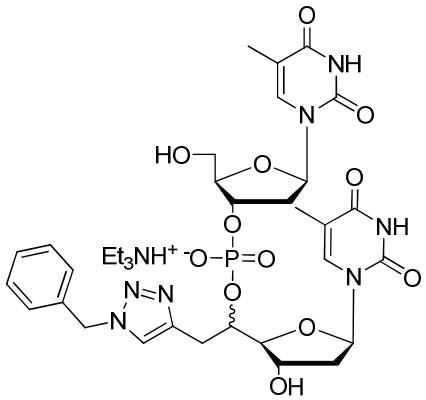


$C_{37}H_{53}N_8O_{12}P$
832,84 g.mol^{-1}

To a solution of **384** (18 mg, 0.032 mmol, 2 eq.) in 300 µL of THF were added 95 µL of a solution of TBAF 1 M in THF (0.096 mmol, 3 eq.). The colorless solution was stirred 5 min and the solvent was removed under reduce vacuum. The residue was solubilized into 3.2 mL of DMF/DMSO 9/1. 15 mg of Pd_2dba_3 and 15 mg of **459** (0.016 mmol, 1 eq.) were then added. The reaction mixture was stirred 5 min at 100 °C under micro-waves. **460** was obtained after purification by semi preparative HPLC (A/B: from 20/80 to 30/70 in 15 min then to 50/50 in 2 min then to 50/50 during 2 min then to 20/80 in 2 min).

MALDI-TOF: 732.1 ([M-HNEt$_3$+2H]$^+$), 754.1 ([M-NEt$_3$+H+Na]$^+$).
HPLC: rt = 12.52 and 12.98 min (A/B: from 20/80 to 30/70 in 15 min then to 50/50 in 2 min then to 50/50 during 2 min then to 20/80 in 2 min).

461: Dinucleotide thymidine-(5'-C-(1-benzyl-4-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-thymidine)



$C_{36}H_{51}N_8O_{12}P$
818,34 g.mol^{-1}

MALDI-TOF: 718.2 ([M-HNEt$_3$+2H]$^+$), 740.1 ([M-NEt$_3$+H+Na]$^+$).
HPLC: rt = 9.37 and 9.83 min (A/B: from 20/80 to 30/70 in 15 min then to 50/50 in 2 min then to 50/50 during 2 min then to 20/80 in 2 min).

General procedure for the méthylation of oligonucleotides:

To a solution of **384** (1.2 mg, 2 µmol, 2 eq.) in 200 µL of THF were added 6 µL of a solution of TBAF 1 M in THF (6 µmol, 3 eq.). The colorless solution was stirred 5 min and the solvent was removed under reduce pressure. The residue was solubilized into solvent 200 µL of DMF/DMSO 1/1. 920 µg of Pd_2dba_3 (1 µmol, 1 eq.) and the iodinated oligonucléotides (1µmol, 1 eq.) were then added. The reaction mixture was stirred at 100°C under micro-waves. Solvents were removed under vacuum and the crude product was purified by semi-preparative HPLC.