Collège Doctoral du Languedoc-Roussillon

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par **ENSCM**

Préparée au sein de l'école doctorale Science Chimique Balard

Et de l'unité de recherche Glycochimie et Reconnaissance Moléculaire

Spécialité : **INGENIERIE BIOMOLECULAIRE**

Présentée par **SABRINA HOUAIDJI**

SYNTHESE ET EVALUATION DE DERIVES OSIDIQUES A POTENTIEL ANGIOGENIQUE

Soutenue le 17/12/2014 devant le jury composé de

M Jean-Louis KRAUS, Professeur Université Aix - Marseille	Rapporteur
M Pascal DE SANTA BARBARA, Docteur Université Montpellier 1	Rapporteur
M Jean-Pierre MOLES, Docteur Université Montpellier 1	Examinateur
Mme Véronique BARRAGAN-MONTERO, Maitre de Conférences Université Montpellier II	Directeur de thèse
M Jean-Louis MONTERO, Professeur Université Montpellier II	Examinateur

ENSCM CHIMIE Montpellier

A tous les gens que j'aime,
Ceux qui ont contribué de près comme de loin à ce travail

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l' « Equipe de Glycochimie et Reconnaissance Moléculaire », de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron IBMM, UMR 5247 de l'Université Montpellier II.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean-Louis Montero, pour m'avoir intégré dans son équipe ses conseils, ses encouragements et sa compréhension tout au long de ma thèse, m'ont été précieux et m'ont permis de la faire aboutir. Ces échanges m'ont beaucoup apporté d'un point de vue scientifique et j'ai également beaucoup apprécié ses qualités humaines.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame le Docteur Véronique Barragan-Montero, pour la confiance qu'elle m'a montrée en me confiant ce sujet de thèse et pour m'avoir dirigée dans mes travaux. Je la remercie également pour sa gentillesse, ses conseils, pour l'intérêt constant qu'elle a montré à mon travail, mais aussi pour son optimisme et sa bonne humeur.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Louis KRAUS, pour l'honneur qu'il me fait d'être rapporteur de ce mémoire.

Je souhaite remercier vivement, Monsieur le Docteur Pascal DE SANTA BARBARA pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens également à remercier le Docteur Jean-Pierre Moles pour sa collaboration et son aide pour les tests biologiques.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les permanents du laboratoire sans oublier Karine qui ont contribué à créer une bonne atmosphère de travail.

Je tiens à remercier aussi tous mes collègues et mes amis (es) du laboratoire, Léa, Nabil, Simona, Joana, Irène, April et Nanda et mon amie Lylia pour leurs conseils, et leur amitié. Que ceux ou celles que j'ai pu momentanément oublier aujourd'hui, veuillent bien me pardonner.

Et puis, mes remerciements les plus chaleureux vont à tous les membres de ma famille et tout particulièrement mes parents sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, qui ont été un soutien permanent et de grands conseils tout au long de cette thèse. Je remercie également ma sœur AMEL et mon frère ZINE EL ABIDINE qui ont toujours un petit mot gentil et que j'adore.

Je ne terminerai pas sans adresser mes remerciements particuliers à Monsieur Khaled Mouaki Benani, Consul d'Algérie à Montpellier pour ses encouragements durant tout le long de ma thèse.

Et enfin merci à tous ceux qui ont croisé mon chemin, et dont la liste serait ici beaucoup trop longue, mais qui ont contribué à faire passer ces trois années finalement tellement vite, et dans les meilleures conditions qui soient.

MERCI À TOUS !!!

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Introduction générale……...……1

Chapitre I :

Angiogenèse physiologique et pathologique

I. 1. Généralités 6

I-1-1-Caractéristique des cellules cancéreuses 6

1-1-2-Structure des vaisseaux sanguins……...…...7

I-1-3-Fonctions de l'endothélium vasculaire 8

I-2-Angiogenèse physiologique……..8

I-2-1-Définition……...8

I-2-2-Les principaux facteurs de l'angiogenèse……..8

I-2-2-1-Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)……...9

I-2-2-2- Fonction du VEGF……..11

I-2-2-3-Le FGF (Fibroblast Growth Factor)……12

I-2-3-Mécanisme de déroulement……13

I-2-3-1-Angiogenèse par bourgeonnement……...14

I-2-3-2-Angiogenèse par intussusception……17

I-2-3-3-Angiogenèse par élongation des vaisseaux……..17

I-2-3-4-Angiogenèse par incorporation de précurseurs cellulaires endothéliaux circulants…17

I-3-Vascularisation tumorale……18

I-3-1-Historique sur l'angiogenèse tumorale……18

I-3-2-Angiogenèse pathologique tumorale……...20

I-4-Les traitements……22

I-4-1-Les traitements actuels……22

I-4-2-Les thérapies anti-angiogéniques dans le traitement du cancer……...23
I-4-2-1-Le concept des –INIB et des –UMAB……..24
I-4-2-2-Cibler le VEGF pour inhiber la fixation sur son récepteur…….....25
1. Un anticorps ciblant le VEGF : le bévacizumab……...25
2. Le rapport bénéfice/risque du BVZ……..27
3. Un hybride VEGFR-1/VEGFR-2 : L'aflibercept…….29
I-4-2-3-Inhiber l'activité tyrosine kinase des récepteurs aux facteurs angiogéniques……..29
1- Le sunitinib……...30
2- Le sorafenib…….30
3- Les autres molécules……31
4- Le rapport bénéfice/risque des TKI…….32
I-4-2-4-Inhiber les effecteurs en aval dans la voie de signalisation…….33
I-4-2-5-Vers une thérapie personnalisée……...35
I-4-2-6-Traitements combinés……...36
I-5- Conclusion…….37

Chapitre II:

Synthèse d'analogues du mannose-6- phosphate

II-1-Stratégie de synthèse…….40
II-2-Le recepteur du mannose-6-phosphate (RM6P)……41
II-2-1-Structure du RM6P…….42
II-2-2-Le RM6P et l'angiogenèse…….43
II-3-La bioisostérie……44
II-3-1-Caractéristique de la bioisostérie ……..45
II-3-2-Classification des groupes isostères……46
a- La bioisostérie classique……..46
b- La bioisostérie non-classique……..47
II-3-3-Conclusion sur la bioisostérie……47
II-4-Préparation de la partie saccharidique……...47

II-4-1-La glycosylation…….47

II-4-2-O-glycosylation à partir d'un sucre libre……48

II-4-3-O-glycosylation à partir de sucres protégés et activés……48

II-5-Stratégie de synthèse…….50

II-6- Synthèse des analogues mannopyranosides……..52

II-6-1-Synthèse du mannoside pentylé…….52

II-6-2-Synthèse du sulfate cyclique……..52

II-6-2-1-Généralités sur les sulfates cycliques……..52

II-6-2-2-Synthèse à partir de dérivés de sulfates……...……52

II-6-2-3-Synthèse du sulfate cyclique par action du chlorosulfate de phényle…….54

1- Oxydation avec le permanganate de potassium……55

2- Oxydation avec le tétraoxyde de ruthénium…….55

II-6-2-4-Méthode de préparation utilisant le sulfate cyclique……...55

II-6-3-Préparation des dérivés du mannose modifiés en position 6…….....56

II-6-3-1-Synthèse du sulfate cyclique……...56

II-6-3-2-Préparation du dérivé phosphate…….58

II-6-3-3-Préparation du dérivé azido……60

II-6-3-4-Autre méthode pour la préparation du dérivé azido……...61

a-Mise au point de la Mécanochimie…….....61

II-6-3-5-Préparation du dérivé phosphonate……62

II-6-3-6-Synthèse de l'analogue du M6P fonctionnalisé en position 6 par un acide boronique

……...63

II-6-3-6-1-Synthèse des acides boroniques……...64

II-6-3-6-2- Stratégie de synthèse……..65

a- Jeu de protections / déprotections……..….66

b- Oxydation de la position 6 et homologation……...67

II-6-3-6-3-Inconvénients des acides boroniques……..68

II-7-Conclusion……69

Chapitre III:

Evaluation biologique

III-Evaluation de l'activité biologique……..71

III-1-Activité anti-angiogenèse……71

III-2-Test *in vivo* sur CAM……...71

III-3-Description de la méthode……72

III-3-1-Première intervention……72

III-3-2-Deuxième intervention……..73

III-3-3-Troisième intervention……..73

III-3-4-Quatrième intervention……74

III-4-Résultats et discussion……..75

III-4-1-Discussion des résultats……76

III-5-Conclusion……78

Chapitre IV:

Partie expérimentale

- Préparation du α-D-mannopyranoside de méthyle ……...80

- Préparation du α-D-mannopyranoside de pentyle……..81

- Préparation du α-D-mannopyranoside d'isopropyle……...82
- Préparation du 6-phosphate-α-D-mannopyranoside de méthyle……83

-Préparation du 6-phosphate-α-D-mannopyranoside de pentyle…….....85

-Préparation du 6-phosphate-α-D-mannopyranoside d'isopropyle …….87

-Préparation du 6-phosphate-α-D-mannopyranoside du para nitro phényle…….…89

Autre méthode de préparation du 6-phosphate-α-D-mannopyranoside de méthyle ……90

-Préparation du 6-trityl- α –D-mannopyranoside de méthyle…….…..90

-Préparation du 2, 3, 4- tri-O-benzyl-6-trityl- α –D-mannopyranoside de méthyle …….……91

-Préparation du 2, 3, 4- tri-O-benzyl- α –D-mannopyranoside de méthyle …….93

-Préparation du diphenyl -6-phosphate-2, 3, 4- tri-O-benzyl-α –D-mannopyranoside de méthyle …….94

- Préparation du diphenyl -6-phosphate-α –D-mannopyranoside de méthyle ...……..96

- Préparation du 6-phosphate-α –D-mannopyranoside de méthyle ……..97

- Préparation du 6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de méthyle……...……..99

- Préparation du 6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de méthyle …….100

- Préparation du 6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de pentyle ……...……101

- Préparation du 6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de pentyle ……..102

- Préparation du 6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de para nitro phényle ……..103

- Préparation du 6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de para nitro phényle …….104

- Préparation du 6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside d'isopropyle ……105

- Préparation du 6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside d'isopropyle ……..106

- Autres méthode de préparation du dérivé azido……...107

- Préparation du 6-trityl- α –D-mannopyranoside de pentyle ……116

- Préparation du 2, 3, 4- tri-O-benzyl-6-trityl- α –D-mannopyranoside de pentyle ……..118

- Préparation du 2, 3, 4- tri-O-benzyl- α –D-mannopyranoside de pentyle ……...119

- Préparation du 2,3,4-tri-O-benzyl-6-déoxy-6-oxy-α–D-mannopyranoside de pentyle …...121

- Préparation du 2,3,4-tri-O-benzyl-6-déoxy-6-allyl-α–D-mannopyranoside de pentyle …..122

- Préparation de l'acide (2,3,4-tri-O-benzyl-6,7-didéoxy-α–D-mannopyranoside de pentyle) boronique ……...124

- Préparation de l'acide (6,7-didéoxy-α–D-mannopyranoside de pentyle) boronique ……...125

- Préparation du 2,3-O-isopropylidène α–D-mannopyranoside de méthyle ……..127

-Préparation du 2,3-O-Isopropylidène-4,6-O-(sulfate cyclique)-α-D-mannopyranoside de méthyle ……...129

-Préparationdu6-Désoxy-6-diméthoxyphosphinylméthylène-4-lithiumsulfate-2,3-O-isopropylidène-α-D-mannopyranoside de méthyle…….…132

- Préparation du 6-Désoxy-6-diméthoxyphosphinylméthylène-α-D-mannopyranoside de méthyle ……...133

- Préparation du 6,7-didéoxy-phosphinyl- α-D-mannopyranoside de méthyle ……..134

- Préparation du 2,3-O-isopropylidène α–D-mannopyranoside de pentyle ……...…135

- Préparation du 2,3-O-Isopropylidène-4,6-O-(sulfate cyclique)-α-D-mannopyranoside de pentyle ……137

- Préparation du 6-Désoxy-6-diméthoxyphosphinylméthylène-4-lithiumsulfate-2,3-O-isopropylidène-α-D-mannopyranoside de pentyle ……139

- Préparation du 6-Désoxy-6-diméthoxyphosphinylméthylène-α-D-mannopyranoside de pentyle ……141

- Préparation du 6,7-didéoxy-phosphinyl- α-D-mannopyranoside de pentyle ……...142

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES……...145

BIBLIOGRAPHIE……..149

ABREVIATIONS

ATP : Adénosine TriPhosphate

Ang : Angiopoïetine

ADAM : A Disintegrin And Metalloprotease

AcOEt : Acétate d'éthyle

BVZ : Bévacizumab®

BuLi : Butyllithium

CH_2Cl_2 : Dichlorométhane

CAN : Ceric ammonium nitrate

$CuSO_4$: Sulfate de cuivre

CCM : Chromatographie sur couche mince

CAM : Chick Chorioallantoic Membrane

CH_3CN : Acétonitrile

$(COCl)_2$: Chlorure d'oxalyle

DMAP : Diméthyl amino pyridine

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DIEA : N,N diisopropyléthylamine

EP : Ether de pétrole

Et_2O : Ether diéthylique

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

FGF : Fibroblast Growth Factor

FDA : Food Drug Administration

FAEs : Fatal Adverse Events

GIST : Gastro-Intestinal Stromal Tumors

HRE : HIF-responsive element

HSPG : Sulfate d'héparane protéoglycanes

HMPT : Hexaméthylphosphoramide

HCl : Acide chlorhydrique

IGF-II : Insuline-like Growth Factor II

iPrOH : Isopropanol

LMC: Leucémies myéloïdes chroniques

Log P : Coefficient de Hansch

MEC : Matrice extracellulaire

MMPs : Metalloprotéinases matricielles

mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin

M6P: Mannose 6 phosphate

MeOH: Methanol

NH_4Cl : Chlorure d'ammonium

$NaIO_4$: Métapériodate de sodium

Na_2SO_4 : Sulfate de sodium

NH_4OH : Ammoniaque

$NaHCO_3$: Bicarbonate de sodium

NICD : Notch IntraCellular Domain

NaOH : Hydroxyde de sodium

NIS : N-iodosuccinimide

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PlGF : Placenta growth factor

$POCl_3$: Trichlorure de phosphoryle

PBS : Phosphate Buffer Sodium

PtO_2 : Oxyde de platinium

PPh_3 :Triphényl phosphine

RM6P/IGF-II : Récepteur du Mannose-6-Phosphate ou Insuline-like Growth Factor II

RM6P-CD : Récepteur du mannose-6-phosphate cation dépendant

RM6P-CI : Récepteur du mannose-6-phosphate cation indépendant

RM6P : Récepteur du mannose-6-phosphate

RuO_4 : Tétraoxyde de ruthénium

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SO_2Cl_2 : Chlorure de sulfuryle

$SOCl_2$: Chlorure de thionyle

TGF : Transforming growth factor

TAF : Facteur angiogénique

TGF-β : Transforming growth factor-β

THF : Tétrahydrofurane

TMSBr : Bromure de triméthylsilane

UV : Ultra- violets

uPA : Urokinase Plasminogen Activator

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Récepteurs du VEGF

VASP **:** Vasodilatator Stimulated Phosphoprotein

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le corps humain est constitué d'une multitude de cellules hiérarchisées, issues de la première cellule embryonnaire. De multiples divisions cellulaires et différentiations spécifiques ont permis la constitution des divers organes aux fonctions variées, mais bien définies. Continuellement, un certain nombre de cellules disparaissent et sont remplacées par de nouvelles cellules. Ainsi, chaque année, un homme synthétise 200 à 300 kg de cellules sanguines nécessaires pour maintenir l'homéostasie. Un déséquilibre de la régulation peut être alors à l'origine d'une prolifération ou d'un développement anarchique de cellules anormales qui vont se développer librement conduisant à une tumeur.

Le cancer est la deuxième cause de mortalité après les affections cardiovasculaires mais pourrait dans un futur proche occuper la première place de ce triste palmarès. De par l'importance du nombre de personnes qu'elle atteint. Il existe de nombreux types de cancers dont les plus répandus en France sont les cancers du poumon, du colon et du sein qui entraînent respectivement 27000, 16000 et 11600 décès par an [1].

Le cancer est dû au dérèglement de la division de quelques unes des milliards de cellules qui constituent les êtres vivants, ce qui correspond à une multiplication anarchique des cellules. L'apparition du cancer s'effectue selon un processus en plusieurs étapes au cours desquelles l'accumulation d'anomalies sur différents gènes au fil des divisions cellulaires confère un avantage sélectif au clone malin. Les cellules toutes issues d'une première cellule mutée (clone) forment alors une tumeur.

La croissance des tumeurs et le développement de métastases sont dépendants de l'approvisionnement sanguin. Il est admis que dès un volume de 1 mm^3, une tumeur solide a besoin que se développe autour d'elle un réseau sanguin pour lui apporter les nutriments nécessaires et éliminer les déchets [2]. C'est grâce à ce réseau que se répandent les cellules métastatiques. A la fois l'angiogenèse et la vasculogenèse sont impliqués dans la vascularisation tumorale.

Le concept de ciblage des zones tumorales a été énoncé par P. Ehrlich au 19ème siècle. En 1971, J. Folkman [3] est à l'origine du concept d'angiogenèse tumorale qui a suscité l'intérêt de nombreuses équipes durant les 30 dernières années. Les thérapies anti-angiogéniques et anti-vasculaires sont proposées comme des adjuvants aux thérapies traditionnelles anti-cancéreuses [4].

Précédemment, au laboratoire, une série de molécules, analogues isostères et non isostères du mannose 6-phosphate (M6-P) de type méthyle-mannoside ont été synthétisés et leur activité angiogénique a été évaluée. Ces molécules présentaient en position 6, différentes autres fonctions : malonate, carboxylate, nitrile, azido, amino, sulphonate, phosphonate.

Deux types de tests ont été effectués, l'un sur la vascularisation de la membrane chorioallantoïde (CAM) [5], l'autre sur des explants d'aorte de rat [6]. Les résultats sur la CAM ont montré que ces composés sont des effecteurs d'angiogenèse. Cependant, des études pharmacocinétiques effectuées sur le dérivé phosphonate (plus particulièrement) ont montré que ce dérivé est facilement éliminé au cours de son administration chez la souris. Cependant, l'augmentation de la biodisponibilité d'un principe actif se fait généralement en augmentant sa lipophilie.

Cependant, la substitution sur la position anomère d'un sucre ne modifie pas sa reconnaissance vis-à-vis du récepteur. Nous envisageons alors de remplacer le méthyle de nos dérivés par d'autres groupements ayant une chaine plus longue (pentyle, isopropyle, para nitro phényle).

Le but de notre travail, est donc de synthétiser des dérivés du mannose -6-phosphate ayant une chaine plus longue en position anomère, et cela afin d'augmenter la lipophilie de nos produits, pour qu'ils aient une durée de vie plus longue et donc augmenter leur biodisponibilité.

Dans le premier chapitre, nous présenterons tout d'abord des généralités sur le cancer. Puis nous proposerons une étude bibliographique sur l'angiogenèse et plus particulièrement les différents mécanismes et facteurs impliqués dans le processus de néo-vascularisation.

Nous parlerons des différentes thérapies anti-cancéreuses actuellement utilisées ainsi que les inhibiteurs anti-angiogéniques développés ces dernières années.

Dans le deuxième chapitre, une description du récepteur IGF-II/M6P et son implication sur l'angiogenèse seront présentées.

Ce chapitre sera consacré à une étude bibliographique sur les différentes réactions déjà synthétisées dans notre laboratoire. Nous détaillerons les mécanismes de réaction pour l'obtention des composés : azido, phosphate, phosphonate et boronate.

Le troisième chapitre sera consacré à l'activité biologique des produits synthétisés. Et plus particulièrement à la réalisation des tests sur l'angiogenèse à l'aide d'un test in *vivo* sur la membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet (CAM).

Le quatrième chapitre sera consacré à la synthèse des composés : méthyle-mannoside-6-phosphate, pentyle-mannoside-6-phosphate, isopropyle-mannoside-6-phosphate, para nitro phenyle-6-phosphate et ses analogues bioisostères.

CHAPITRE I

I-1-Généralités

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anarchique de certaines cellules de l'organisme au sein d'un tissu normal (tumeur primaire) et par une dissémination de ces cellules vers des sites secondaires (métastases). Plusieurs altérations génétiques sont nécessaires afin qu'une cellule normale se transforme en cellule cancéreuse et leurs conséquences sont d'autant plus importantes qu'elles consistent en l'activation d'oncogènes ou à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur.

I-1-1-Caractéristique des cellules cancéreuses

En 2000, Hanahan et Weinberg ont décrit les six caractéristiques majeures des cellules cancéreuses, communes à tous types de tumeurs malignes [7].

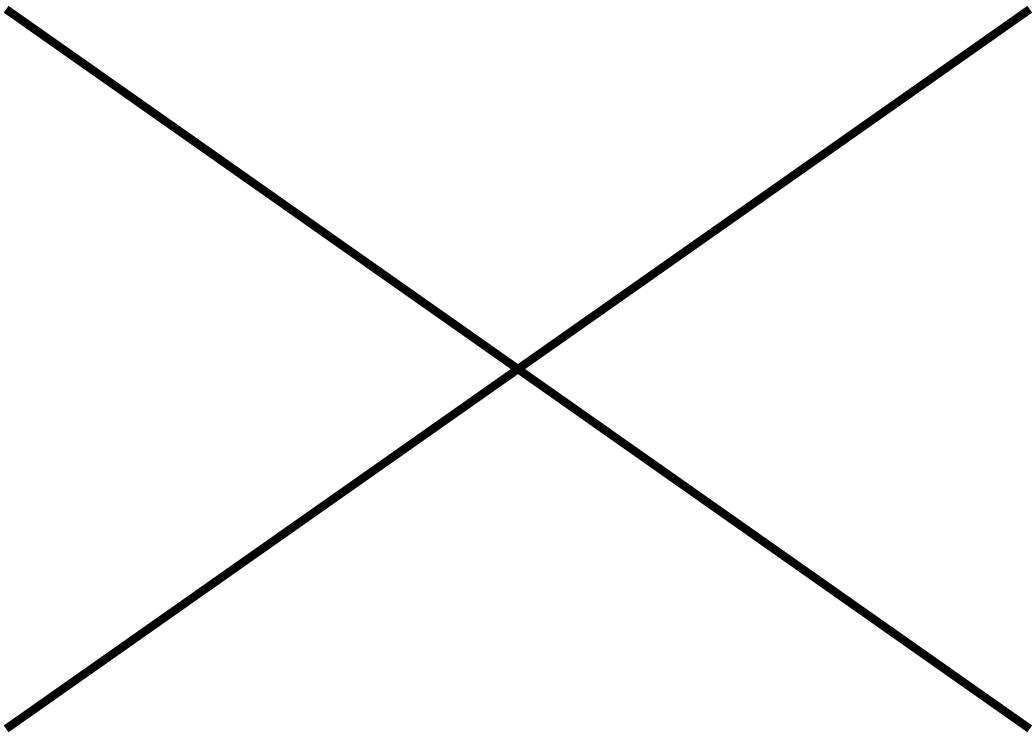


Figure 1. Caractéristique des cellules cancéreuses

Ces caractéristiques sont la conséquence des altérations génétiques acquises par les cellules tumorales au cours du processus de tumorigenèse d'une part et de l'interaction entre ces cellules et les cellules endothéliales ou immunitaires.

1-1-2-Structure des vaisseaux sanguins

L'endothélium tapisse l'ensemble du réseau vasculaire et il est composé d'une monocouche de cellules endothéliales à la face interne des vaisseaux, directement au contact du sang. Les vaisseaux sanguins non matures sont composés d'une monocouche de cellules endothéliales (Figure 2a.), tandis que les cellules endothéliales des vaisseaux matures sont entourées par des cellules murales (ou péri-vasculaires). Ce sont des péricytes pour les capillaires (Figure 2b.) et des cellules musculaires lisses pour les artérioles, veinules, artères et veines (Figure 2c, d). Les cellules endothéliales et les cellules murales reposent sur une membrane basale composée de protéines de la matrice extracellulaire (collagène IV, laminine…). Les plus gros vaisseaux, artères ou veines, sont composés de trois couches cellulaires superposées: l'intima qui correspond aux cellules endothéliales, la média composée de cellules musculaires lisses et enfin l'adventice constituée de matrice extracellulaire et de fibroblastes. Les artères possèdent de nombreuses fibres élastiques qui permettent, avec les cellules musculaires lisses, la régulation du flux sanguin (Figure 2d.).

Figure 2. Structure des différents types de vaisseaux

I-1-3- Fonctions de l'endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire possède de nombreuses fonctions. Il permet l'apport de l'oxygène et des éléments nutritifs aux organes et l'élimination des déchets. Il régule le tonus vasculaire et le flux sanguin. Il participe également à l'hémostase, qui est le processus physiologique permettant l'arrêt des saignements [8]. L'endothélium est aussi un acteur clé de l'inflammation. Lors d'une réaction inflammatoire, les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhérence qui permettent aux cellules immunitaires d'adhérer sur l'endothélium et migrer dans les tissus enflammés [9]. Le processus peut être dérégulé dans les cancers, ce qui participe au phénomène d'échappement de la tumeur au système immunitaire [10]. L'endothélium participe également à la formation des vaisseaux par angiogenèse.

I-2-Angiogenèse physiologique

I-2-1-Définition

L'angiogenèse ou néovascularisation est un terme qui résume les étapes par lesquelles des nouveaux vaisseaux sanguins vont se développer à partir d'une structure endothéliale préexistant [11]. Dans un organisme adulte, l'angiogenèse physiologique est un événement peu fréquent. Elle survient dans l'appareil reproducteur femelle durant les cycles menstruels et durant la grossesse. En revanche, une angiogenèse survient dans certaines conditions pathologiques comme l'inflammation, la cicatrisation, la croissance de tumeur, la rétinopathie diabétique, les arthrites rhumatoïdes et le psoriasis [12].

I-2-2-Les principaux facteurs de l'angiogenèse

L'investigation sur les mécanismes régulateurs du développement de l'angiogenèse est primordiale pour comprendre la biologie des tumeurs. Les facteurs de croissance sont les médiateurs les plus spécifiques et les plus puissants. Historiquement, ils ont souvent été décrits comme des mitogènes d'où leur nom de facteurs de croissance. L'angiogenèse tumorale implique des interactions cellulaires et moléculaires complexes entre les cellules cancéreuses, les cellules endothéliales, les cellules du stroma tumoral et péritumoral, et les constituants de la matrice extracellulaire.

La régulation des différentes phases du processus angiogénique est soumise à l'influence de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. La recherche de molécules impliquées dans la régulation de l'angiogenèse a conduit à l'identification de plusieurs familles de protéines, en particulier des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion, des enzymes protéolytiques ou des fragments cryptiques de molécules endogènes.

I-2-2-1-Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Le VEGF est le premier facteur spécifique de la cellule endothéliale parmi de nombreux médiateurs intervenant dans l'angiogenèse, il a été identifié en 1989 [13]. Les études réalisées depuis, ont montré l'importance du VEGF dans les processus angiogéniques normaux et pathologiques

C'est une cytokine glycoprotéine homodimérique dont la forme native a un poids moléculaire de 34 à 46 kDa dont la séquence est faiblement homologue à des chaînes A et B du Platelet Derived Growth Factor (PDGF) [14]. Elle est synthétisée par de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les kératinocytes, les lymphocytes, les polynucléaires neutrophiles, et les macrophages. Le VEGF est sécrété en réponse au stress hypoxique ou ischémique, mais également suite à la stimulation par certains facteurs de croissance (PDGF, Epidermal Growth Factor, TNFα, TGFβ1, IL-1β) [15]. Le VEGF est un facteur de survie et de prolifération des cellules endothéliales microvasculaires humaines. Il existe en fait, à ce jour, 6 glycoprotéines appartenant à la famille VEGF : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, et PlGF (*placenta growth factor 1 et 2*) [16].

Le VEGF-A a été le premier identifié comme facteur d'induction de la perméabilité vasculaire sécrété par les cellules tumorales. Il en existe différentes isoformes que l'on nomme par leur nombre d'acides aminés (121, 165, 189 et 206 respectivement) : $VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$ et $VEGF_{206}$. Certaines isoformes sont sécrétées librement alors que la majeure partie est séquestrée dans la matrice extracellulaire (MEC) [17]; d'autres enfin sont présentes à la fois sous forme soluble et sous forme liée à la MEC. Cet aspect est important car ces isoformes de VEGF séquestrées dans la MEC peuvent en être libéré par des protéinases pour leur activation. En particulier on retiendra que VEGF peut être libéré de la MEC par des metalloprotéinases pour initier son Switch angiogénique [18].

Le VEGF-A est également essentiel à l'angiogenèse physiologique : cicatrisation, ovulation, menstruation, maintien de la tension artérielle et grossesse [19]. Il l'est aussi à l'égard de l'angiogenèse pathologique non tumorale : arthrite, psoriasis, dégénérescence maculaire et rétinopathie diabétique [20]. Chez la souris, une absence de gène VEGF est léthale.

VEGF-B et PlGF ont probablement des rôles redondants [21]. Ils joueraient un rôle dans l'inflammation et les processus de cicatrisation. VEGF-C et VEGF-D jouent un rôle essentiel dans la lymphangiogenèse. Leur rôle dans l'angiogenèse tumorale reste indéterminé et controversé [22]. Enfin, VEGF-E est en fait une protéine virale codée par un parapoxvirus.

.

Les VEGF agissent par interaction sur les récepteurs membranaires des cellules cibles (Figure 3). En fonction des récepteurs, les VEGF-A, VEGF-B et VEGF-E interviennent dans la vasculogenèse et angiogenèse, alors que le VEGF-C et VEGF-D, interviennent dans la lymphangiogenèse [23].

Les récepteurs du VEGF et de ses peptides apparents sont caractérisés par un domaine extracellulaire comptant 7 domaines de type immunoglobuline et un domaine intrinsèque à activité tyrosine kinase [24]. Les 2 premiers domaines extracellulaires interviennent dans la reconnaissance du VEGF, le troisième à la liaison de haute affinité et le quatrième à la dimérisation du récepteur. La liaison du ligand provoque la dimérisation du récepteur en déclenchant l'activité catalytique conduisant à la phosphorylation des récepteurs et du substrat cytoplasmique [25].

VEGFR-1 (appelés aussi FLT-1) se lie au $VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, VEGF-B et PlGF conduisant à une auto phosphorylation suivie d'une phosphorylation de GAP et de la phospholipase-γC, ce qui aboutit à la migration des cellules endothéliales [26].

VEGFR-2 (appelés aussi KDR), présente une affinité avec tous les membres de la famille exceptés les PlGF et VEGF-B, et conduit à l'activation de la protéine kinase C (PKC), de la phosphoinositol-3 kinase, la MAP kinase, et la JAK-STAT kinase [27].

VEGFR-3 ou Flt4 se lie au VEGF-C et D présents au niveau des angioblastes et des vaisseaux lymphatiques [28].

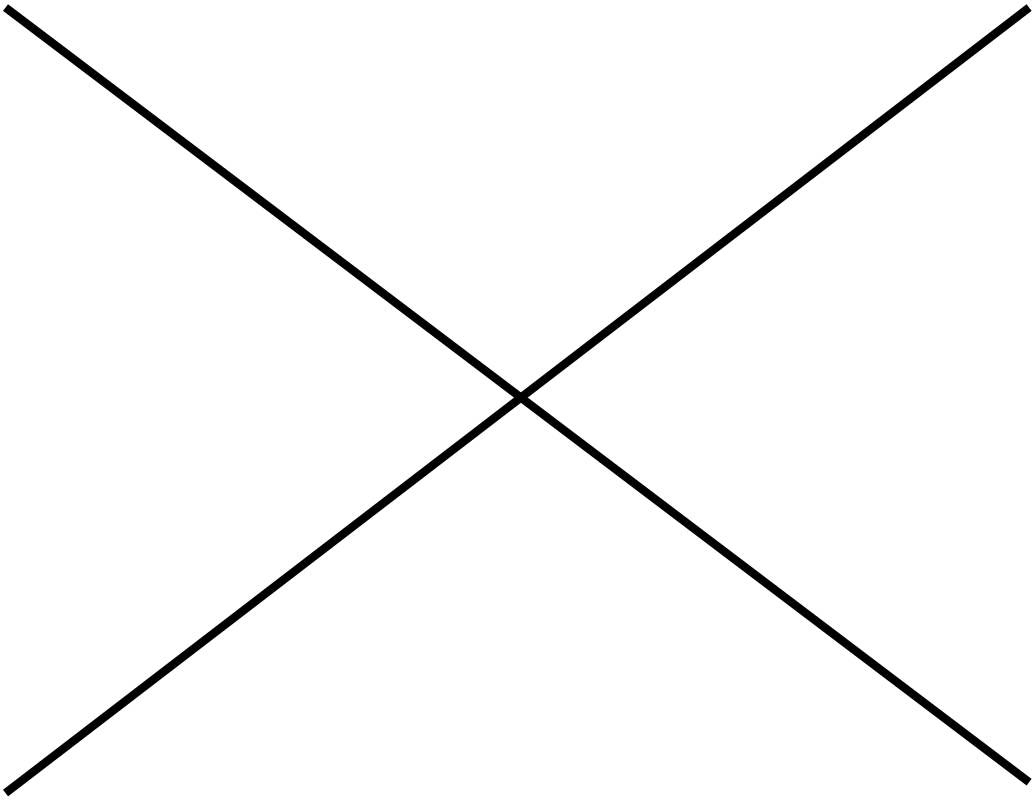


Figure 3. Récepteurs des VEGF (VEGFR) et liaison avec la famille VEGF (VEGFA se lie avec VEGFR1 et VEGFR2 NRP=Neuropilin).

I-2-2-2-Fonction du VEGF

Après activation du HRE (*HIF-responsive element*), VEGF est sécrété dans le milieu extracellulaire. Il peut agir par voie paracrine (signalisation cellulaire par laquelle un facteur sécrété par une cellule affecte d'autres cellules dans son voisinage) ou autocrine :

- Par son action paracrine, VEGF va se lier à ses récepteurs situés sur les cellules endothéliales ou stromales entraînant prolifération du stroma et angiogenèse ;
- par son action autocrine, VEGF va se lier à ses récepteurs situés sur les cellules tumorales entraînant prolifération tumorale, survie et progression métastatique [29].

Les différentes fonctions du VEGF sont innombrables mais on peut retenir les principales :

- augmentation de la perméabilité par disjonction des cellules endothéliales [30], fenestration endothéliale et fuite de liquide.
- prolifération par activation des protéines kinases et expansion de la surface vasculaire.
- invasion par induction de métalloprotéinases.

- migration des cellules endothéliales par mobilisation et expansion d'un réseau de cellules endothéliales.
- survie et inhibition de l'apoptose par induction de différentes protéines et inhibition de caspases [31].
- activation par hyper expression d'intégrines et altération du cytosquelette cellulaire.

I-2-2-3-Le FGF (Fibroblast Growth Factor)

Le FGF représente une grande famille de facteurs de croissance et de différenciation ayant au moins 18 membres. Chez les Vertébrés, la masse moléculaire des FGFs varie de 17 à 34 kDa [32]. Il est constitué d'une chaîne polypeptidique simple d'environ 140 acides aminés.

Durant le développement embryonnaire, les FGFs ont des rôles variés comme la régulation de la prolifération, de la migration, de la différenciation cellulaire et le maintien de l'intégrité vasculaire [33]. Dans les organismes adultes, les FGFs sont des facteurs homéostatiques qui interviennent lors de la cicatrisation. Lors d'une expression anormale, certains des FGFs peuvent contribuer à des maladies telles que le cancer [34].

Les 2 facteurs les plus importants sont FGF-1 (acidic FGF) et FGF-2 (basic FGF) avec plus de 50% d'homologie. Historiquement, le FGF-2 ou encore FGF basique fut le premier FGF isolé en 1975 et séquencé en 1985 [35]. Le second membre de la famille, FGF-1 ou FGF acide, fut isolé peu de temps après. On peut noter que ni le aFGF, ni le bFGF ne possèdent de peptide-signal permettant leur exportation et le mécanisme impliqué dans le transfert vers l'extérieur de la cellule n'est pas élucidé [36].

Les deux FGF stimulent la prolifération et modulent les fonctions des cellules endothéliales, inhibent l'apoptose et sont chimiotactique. Il ya des récepteurs à la fois à haute et basse affinité pour le FGF. La famille des récepteurs à haute affinité est représentée par FGFR-1-4, qui sont des récepteurs de la tyrosine kinase et sont responsables des fonctions de signalisation [37]. Les récepteurs de faible affinité sont impliqués dans la séquestration et la stabilisation du ligand et la plupart d'entre eux sont le sulfate d'héparane protéoglycanes (HSPG). Ils sont aussi présents sous forme soluble dans les fluides biologiques et la matrice extracellulaire (MEC) [38].

I-2-3-Mécanisme de déroulement

Très tôt au cours du développement embryonnaire, le réseau vasculaire se met en place par deux processus: la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vasculogenèse correspond à la formation de vaisseaux sanguins à partir de progéniteurs des cellules endothéliales (les angioblastes) et permet la formation du réseau vasculaire primitif. Puis, l'angiogenèse permet la formation de néo-vaisseaux à partir de ce plexus capillaire primaire, aboutissant à la formation d'un réseau vasculaire plus complexe et hiérarchisé.

La lymphangiogenèse [39] permet la mise en place des vaisseaux lymphatiques, également constitués de cellules endothéliales (Figure 4).

Quatre différents mécanismes angiogéniques ont été détectés qui conduisent à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins: le bourgeonnement, intussusception, élongation/élargissement, et incorporation de précurseurs cellulaires endothéliaux circulants dans les parois des vaisseaux [40].

Figure 4. Hiérarchisation d'un réseau vasculaire et lymphatique chez l'embryon.

I-2-3-1-Angiogenèse par bourgeonnement

Pendant longtemps, ce fut le seul mécanisme connu. Il se produit lors de la néovascularisation des tissus avasculaires, tels que la croissance rapide du corps jaune, ou l'invasion vasculaire des tumeurs en croissance [41]. Il comprend l'activation des cellules endothéliales, la dégradation de la membrane basale, la migration des cellules endothéliales, leur prolifération, la formation du tube, la stabilisation par la participation des péricytes et la réforme de la matrice extracellulaire (figure 5).

Figure 5. Mécanismes du bourgeonnement et d'intussusception.

Le bourgeonnement met en jeux plusieurs facteurs de régulation tels que le VASP (Vasodilatator Stimulated Phosphoprotein) qui participe à ce mécanisme pendant la vasculogenèse. L'expression de cette protéine peut être induite par les facteurs de croissance (Growth factors) et l'interleukine-8 (IL-8) de manière paracrine au cours de l'angiogenèse [42].

D'autre part, il a été suggéré que le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux à partir de sections d'aorte de rats cultivés en collagène dépend de la production des cytokines pro-angiogéniques comme le VEGF et IL-8 [43]. En outre, des résultats récents suggèrent que l'apoptose est susceptible d'être impliquée dans les mécanismes physiologiques de la vasculogenèse et de l'angiogenèse placentaire, telles que la formation et ramification de la lumière angiogénique [44].

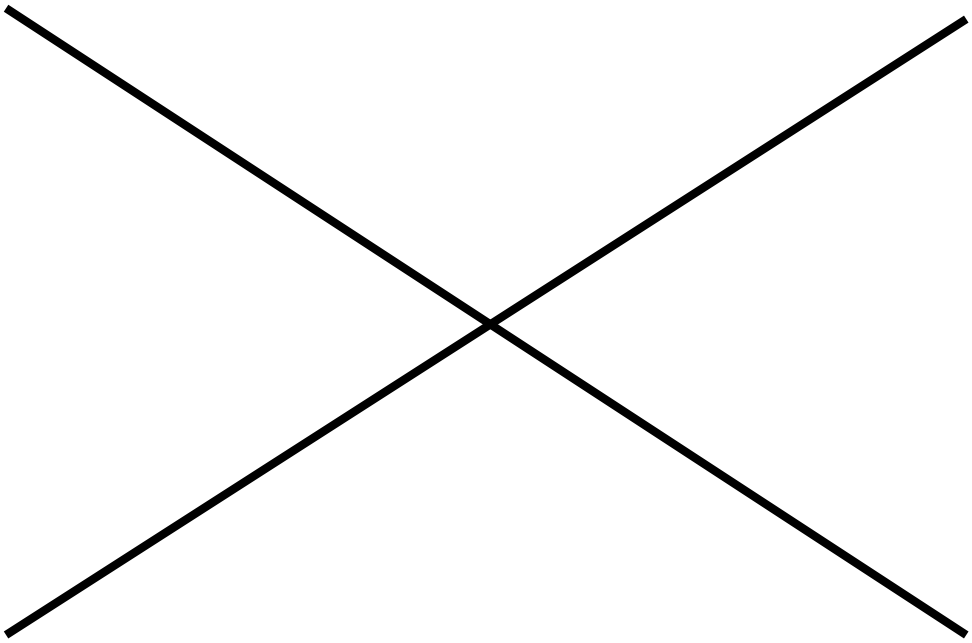


Figure 6. Différentes étapes de l'angiogenèse et molécules intervenant dans ce processus

Lorsque l'endothélium est quiescent, il est stabilisé par l'action de l'angiopoïetine-1 (Ang1) sur le récepteur endothélial Tie-2. Mais pendant l'angiogenèse, l'angiopoïetine-2 (Ang2) exerce une activité antagoniste sur ce récepteur. Le vaisseau préexistant est déstabilisé par le détachement des cellules murales des cellules endothéliales. De plus, la dégradation de la matrice extracellulaire par des protéases, telles que l'activateur du plasminogène uPA (urokinase Plasminogen Activator), les MMP et les héparinases, permet de créer l'espace nécessaire à la migration des cellules endothéliales. Leur activité protéolytique libère également des facteurs pro-angiogéniques séquestrés dans cette matrice extracellulaire [45] (Figure 6a, b).

De manière concomitante, les cellules endothéliales se spécialisent en deux populations. La cellule située à la tête du bourgeon est nommée la tip cell. Elle ne prolifère pas et possède de longs filopodes impliqués dans la migration de ces cellules en direction du gradient de VEGF. Les cellules sous-jacentes à la tip cell sont les stalk cells qui prolifèrent rapidement et permettent l'élongation du bourgeon [46]. Cette spécialisation endothéliale est sous le contrôle de la voie Notch. La liaison des récepteurs Notch (1 à 4) avec leurs ligands transmembranaires Delta-like (Dll1, 3 et 4) et Jagged (Jag- 1 et -2) déclenche le clivage du récepteur par une protéase ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) [47] et par la

sécrétase γ. Le domaine intracellulaire généré, appelé le NICD (Notch IntraCellular Domain), est transloqué dans le noyau et permet l'expression des gènes cibles de Notch [48].

La tip cell exprime fortement Dll4, alors que la voie Notch est fortement activée dans les stalk cells. En effet, la stimulation par le VEGF au niveau de la tip cell induit l'expression de Dll4, qui va activer la voie Notch des cellules adjacentes. Cette activation réprime l'expression de VEGFR-2 et du récepteur au VEGF-C (VEGFR-3, Flt4) par ces cellules et inhibe ainsi la formation d'autres tip cells. Ces cellules deviennent alors des stalk cells [49]. L'inactivation de la voie Dll4-Notch1 ou l'interaction de Notch1 avec Jag1 augmente le nombre de tip cells et augmente l'angiogenèse [50].

La tip cell guide les vaisseaux en direction du gradient de VEGF et la prolifération des stalk cells permet l'élongation du bourgeon et la formation d'un tube de cellules endothéliales [51].

La dernière étape est la stabilisation du vaisseau immature, qui permet l'entrée du vaisseau dans un état de quiescence (Figure 6c.). Plusieurs molécules vont induire la production de matrice extracellulaire, le recrutement de cellules murales et la mise en place des jonctions intercellulaires. La perfusion du néo-vaisseau est également nécessaire à sa maturation car en absence de flux sanguin, le vaisseau régresse.

Les cellules murales participent à la stabilisation du vaisseau en régulant la prolifération des cellules endothéliales. Le PDGFB, produit par les tip cells, induit leur recrutement par interaction avec le récepteur PDGFRβ présent au niveau des cellules périvasculaires. Le TGFβ produit par les cellules endothéliales induit le recrutement de cellules mésenchymateuses et la différenciation en cellules murales [52]. De plus, le PDGFB et TGFβ stimulent également la production de matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses [53]. Ang-1 exprimée par les cellules murales participe également à la stabilisation du vaisseau en activant le récepteur endothélial Tie2.

L'angiogenèse est donc un processus physiologique qui permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Cependant, elle peut être dérégulée dans certaines pathologies. Par exemple, elle est insuffisante au cours de la cicatrisation chez les personnes diabétiques ou dans certains cas d'infertilité, mais elle est anormale ou excessive dans l'inflammation chronique, ou encore dans les cancers [54].

I-2-3-2-Angiogenèse par intussusception

Le second mécanisme de l'angiogenèse, l'intussusception, est la division ou séparation interne d'un vaisseau en deux par le dépôt d'un matériau au centre de la lumière du vaisseau [55]. Il s'agit d'un mécanisme alternatif pour le mode de bourgeonnement de l'angiogenèse. La croissance microvasculaire intussusceptive divise la lumière du vaisseau existant par la formation et l'insertion des plis des tissus et des colonnes de tissu interstitiel dans la lumière du vaisseau. Les tissus en développement au cours de l'intussusception sont aussi appelés structures tissulaires interstitielles ou intervasculaires et piliers des tissus ou des poteaux. L'intussusception comprend également la création de nouveaux vaisseaux par la formation de boucle *in situ* dans la paroi des grosses veines [56].

Il a été suggéré que les intussusceptions ont été impliquées dans trois processus de croissance vasculaire et de remodelage**:** une expansion rapide du plexus capillaire, fournissant une grande surface endothéliale pour l'échange métabolique ; une arborisation due aux changements dans la taille, la position et la forme des segments capillaires, créant une arborescence hiérarchique et le remodelage qui conduit à une modification de la géométrie de branchement des vaisseaux, et à l'optimisation des propriétés d'écoulements pré et post-capillaires [57].

I-2-3-3-Angiogenèse par élongation des vaisseaux

L'allongement/élargissement du vaisseau sanguin est un mécanisme qui ressemble à l'intussusception, sauf que la paroi du vaisseau n'est pas rompue au cours de ce processus [58].

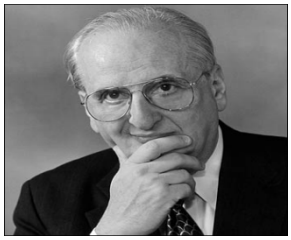
I-2-3-4-Angiogenèse par incorporation de précurseurs cellulaires endothéliaux circulants

Le quatrième mécanisme proposé d'angiogenèse est l'incorporation de précurseurs cellulaires endothéliaux circulants de la moelle osseuse dans les vaisseaux sanguins. Ce mécanisme de l'angiogenèse est aussi appelé «Vasculogenèse post natale» [59]. Ce mécanisme semble jouer un rôle très important dans la grossesse. Il est observé chez les

femmes enceintes souffrantes de pré-éclampsie une diminution du nombre des cellules progénitrices de cellules endothéliales [60].

I-3-Vascularisation tumorale

En dessous de 1 à 2 mm, une tumeur est avasculaire. Les nutriments et les déchets circulent par diffusion passive, la tumeur est en phase de dormance, dans la mesure où sa croissance est limitée par cette diffusion. Cependant, afin de croitre au-delà de ce volume, la formation de vaisseaux sanguins est indispensable. Dans les années 1970, J. Folkman a formulé l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la formation des vaisseaux déclencherait l'arrêt de la croissance tumorale [3]. Depuis, de nombreux travaux ont montré que les vaisseaux sanguins sont nécessaires à la croissance tumorale, mais également qu'ils sont une voie de dissémination métastatique avec les vaisseaux lymphatiques.



I-3-1-Historique sur l'angiogenèse tumorale

Le mérite d'avoir forgé le concept de l'angiogenèse tumorale et l'intuition de ses applications futures reviennent à Judah Folkman, dès le début des années 1970. Chirurgien américain et travaillant à Boston, il a été le premier à explorer et défricher ce domaine de connaissances. La première publication majeure apparaît en 1971 dans le New England Journal of Medicine [3]. Dans les années 70, les travaux séminaux de Judah Folkman ont montré que les tumeurs, au-delà d'un volume de quelques millimètres cubes, souffrent d'hypoxie et qu'elles ne peuvent survivre sans former de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires à leur alimentation en oxygène et en nutriments [61]. Les cellules tumorales font alors appel au même processus que les cellules embryonnaires : l'angiogenèse.
L'inhibition du développement tumoral par le blocage de la néoangiogenèse est logiquement devenue une stratégie majeure dans la recherche de traitements des cancers.

L'hypothèse que l'angiogenèse, élément du stroma des tumeurs, soit importante à la croissance tumorale avait déjà été évoquée au siècle dernier, mais c'est Folkman qui a prouvé par différentes études expérimentales que la croissance tumorale était sous la dépendance directe de l'angiogenèse. Selon le modèle qu'il proposa dans les années 1960, les cellules tumorales secrètent un facteur angiogénique ou TAF qui induit l'angiogenèse et permet la croissance tumorale puis sa dissémination métastatique. Les néovaisseaux apportent aux cellules tumorales les nutriments nécessaires à leur survie et leur multiplication. Tout blocage de l'angiogenèse s'accompagne d'un arrêt de la croissance. Son apparition s'effectue tardivement, au stade infiltrant, encore appelé « switch angiogénique » [62].

Le passage de l'état de repos à l'état activé des vaisseaux (induction de l'angiogenèse, «angiogenic switch») est déclenché par la rupture de l'équilibre relatif entre les facteurs activateurs et les facteurs inhibiteurs [3]. Le statut vasculaire de repos est maintenu dans les tissus grâce à la prédominance des facteurs anti-angiogéniques sur les facteurs pro-angiogéniques. La diminution des inhibiteurs et/ou l'augmentation des activateurs entraînent un déplacement de l'équilibre en faveur des activateurs et induisent par conséquent une néovascularisation (Figue 7).

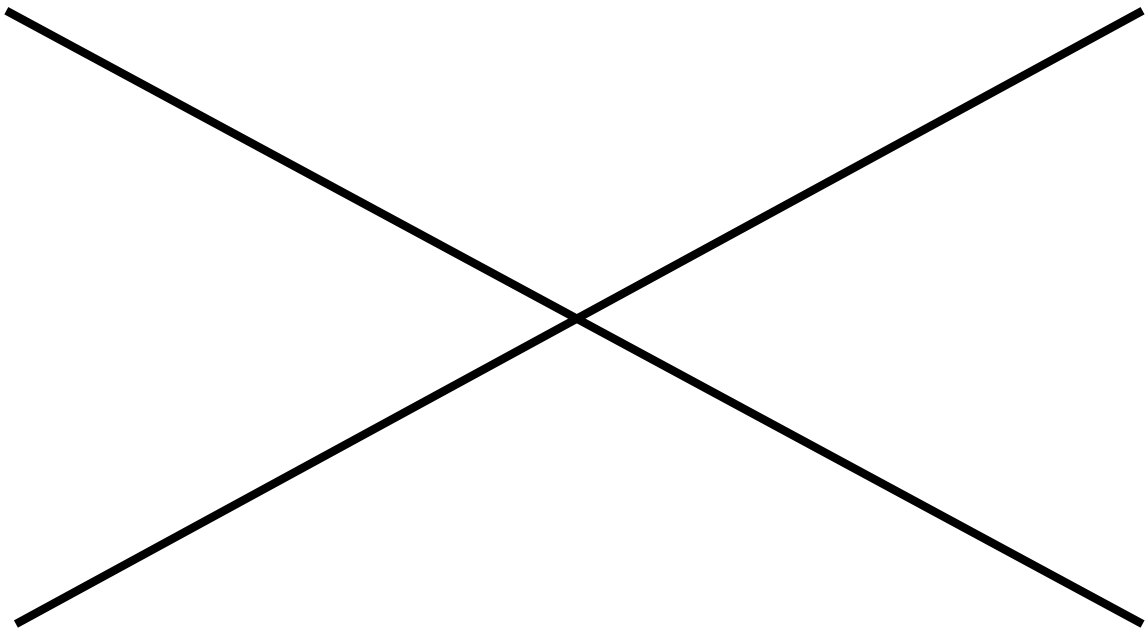


Figure 7. Interactions entre les activateurs et les inhibiteurs de l'angiogenèse.

I-3-2-Angiogenèse pathologique tumorale

Au début de la prolifération tumorale, la tumeur, d'une taille inferieure à 1-2mm^3, est indépendante de l'angiogenèse et l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules tumorales est assuré par diffusion simple. Un état d'hypoxie intra tumorale est généré lorsque cette taille est atteinte, c'est-à-dire au delà des limites de diffusion simple de l'oxygène et des nutriments [63].

A ce stade, la tumeur ne peut plus se développer par manque de nutriments et d'oxygène : les cellules cancéreuses sont en hypoxie [64]. Comme des cellules normales placées dans les mêmes conditions, les cellules tumorales libèrent des messagers vers les cellules de l'endothélium vasculaire le plus proche (figure 8). Ces messagers, principalement les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) tout comme leurs récepteurs, constituent une cible privilégiée dans le traitement des cancers.

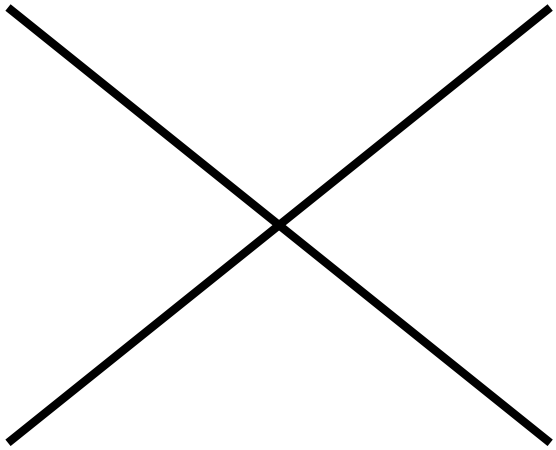


Figure 8. Tumeur en hypoxie libérant du VEGF

Sous l'effet de la stimulation de leurs récepteurs, les cellules endothéliales se mettent à proliférer et à sécréter des messagers, qui vont activer les métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui dégradent les protéines de la matrice extracellulaire [65].

Après leur migration, les cellules endothéliales fabriquent les éléments constitutifs de la membrane basale (collagène, protéoglycanes, etc...) puis les molécules d'adhésion : intégrines, V-CAM et sélectines, nécessaires au développement harmonieux des nouveaux capillaires (figure 9).

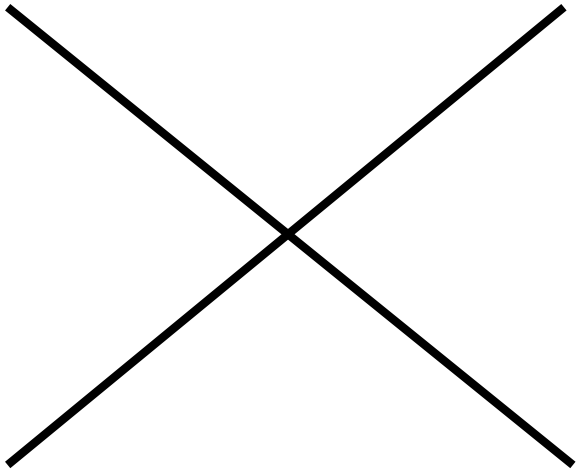


Figure 9. Bourgeonnement de vaisseaux toujours sous l'influence des VEGF

De nouveau alimentées, les cellules cancéreuses vont pouvoir se multiplier et la tumeur se développer. Au cours de sa croissance, la tumeur va pouvoir développer un réseau vasculaire complexe [66] (figure 10).

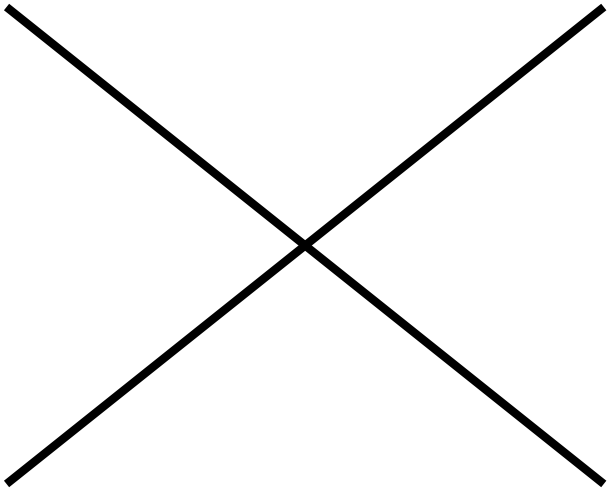


Figure 10. Tumeur mature.

Outre le fait de permettre la croissance des tumeurs, l'angiogenèse permet également la dissémination des cellules cancéreuses depuis une tumeur primitive par intravasation (figure11). Ces cellules vont pouvoir sortir de la circulation générale pour créer des tumeurs

cancéreuses secondaires ou métastases en un autre endroit de l'organisme.

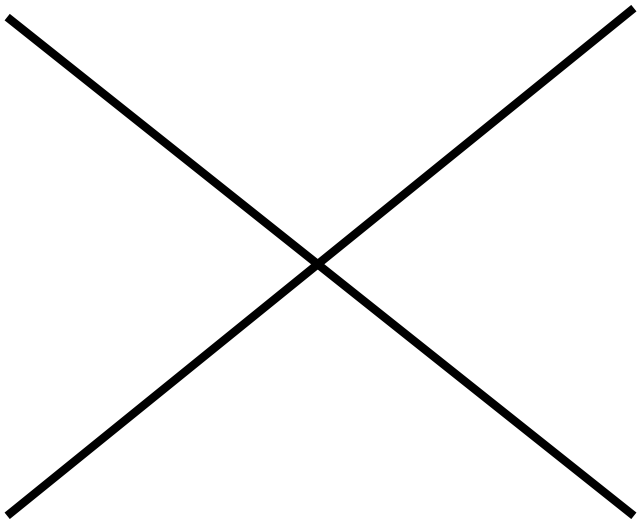


Figure 11. Tumeur libérant des cellules cancéreuses.

I-4-Les traitements

I-4-1-Les traitements actuels

Les traitements actuels reposent sur différentes approches thérapeutiques qui sont généralement associées :

- ✓ **la chirurgie :** ablation d'une tumeur primaire ou de métastases.
- ✓ **la chimiothérapie :** utilisation de médicaments cytotoxiques. Cependant, le manque de spécificité envers les cellules tumorales par rapport aux tissus sains est à l'origine de nombreux effets secondaires. Il existe des effets secondaires communs à la chimiothérapie : problèmes digestifs (nausées, ulcérations digestives) [67], problèmes hématologiques (neutro ou thrombopénie) [68], stérilité ou ménopause précoces, alopécie. D'autres effets secondaires sont spécifiques aux types de médicaments qui présentent souvent une grande toxicité [69]. Par exemple, le Cisplatine provoque une toxicité rénale et auditive élevée, accompagnée de neuropathies périphériques.
- ✓ **la radiothérapie :** traitement local avec des rayons pour détruire les zones tumorales. Cependant, la radiothérapie provoque également des lésions sur les tissus sains. Les effets secondaires dépendent de la zone traitée, de l'importance de l'irradiation et de la sensibilité du patient [70].

- ✓ **l'immunothérapie :** stimulation du système immunitaire en vue d'une réponse immune contre les cellules tumorales. Il existe cinq types d'immunothérapie dont la plupart sont encore au stade de recherche [71].

1. Immunothérapie passive : l'injection d'anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules tumorales ou la vascularisation tumorale.
2. Immunothérapie adoptive : injection de lymphocytes étrangers (par exemple dans le cas de leucémies aigues).
3. Immunothérapie active : injection de cellules tumorales inactivées en vue de stimuler les défenses immunitaires de l'hôte.
4. Immunothérapie active non spécifique : utilisation de médicaments à action immunostimulante.

- ✓ **l'hormonothérapie :** dans le cas des tumeurs hormono-dépendantes, comme le cancer du sein ou de la prostate, cette thérapie a pour objectif de réduire la croissance tumorale en jouant sur l'environnement hormonal.

I-4-2-Les thérapies anti-angiogéniques dans le traitement du cancer

Depuis la découverte de l'angiogenèse et de son rôle crucial dans le développement tumoral, un grand nombre de thérapies anti-angiogéniques ont vu le jour. Le VEGF et ses récepteurs ont un rôle central dans la régulation de l'angiogenèse tumorale [72]. Cela en fait une cible de choix pour le traitement d'un grand nombre de tumeurs solides. Le bénéfice clinique des traitements anti-angiogéniques est du à différents mécanismes. Ces molécules inhibent l'expansion des vaisseaux tumoraux. Elles bloquent la formation de nouvelles ramifications et inhibent l'arrivée au sein de la tumeur des cellules dérivées de la moëlle osseuse. Elles permettent également la régression des vaisseaux préexistants [73]. Le traitement inhibe les signaux de survie adressés aux cellules endothéliales. Ainsi, ces cellules deviennent plus sensibles à la chimiothérapie et la radiothérapie. Les anti-angiogéniques augmentent également cette sensibilité en entrainant une normalisation du réseau vasculaire. Sous traitement, les vaisseaux deviennent matures et fonctionnels [74]. Ces observations expliquent pourquoi un traitement anti-angiogénique associé à une chimiothérapie est plus efficace que la chimiothérapie utilisée seule [75].

I-4-2-1-Le concept des –INIB et des –UMAB

Deux grands types d'inhibiteurs ont vu le jour ces dernières années; les INIB et les UMAB. Les INIB sont de petits inhibiteurs pharmacologiques qui passent la membrane plasmique très facilement. Les UMAB sont des anticorps monoclonaux, humanisés, qui ciblent le développement tumoral.

Les INIB sont des inhibiteurs mimétiques de l'ATP qui bloquent des enzymes à activité kinase. Ces dernières sont de deux types; soit des récepteurs à activité kinase soit des kinases intracellulaires. Les kinases comportent onze domaines hautement conservés. Les deux premiers sont responsables de la fixation de l'ATP [76]. Les acides aminés entre les domaines 1 et 2 sont très variables d'une kinase à une autre. Ces différents acides aminés ont permis d'amener une spécificité de « design » d'inhibiteurs pour l'ensemble des kinases.

C'est sur ce concept que sont nés récemment des inhibiteurs comme le glivec, dont la cible est la chimère BCR/ABL, un gène de fusion issu d'une translocation chromosomique et responsable de la leucémie myéloïde chronique. Le glivec fonctionne chez tous les patients mais ce n'est pas le cas de tous les inhibiteurs. Par exemple, le gefitinib présente, quant à lui, un certain paradoxe. Malgré des essais cliniques sur la souris montrant sa très haute activité anti-tumorale par ciblage du récepteur de l'EGF (EGFR), il ne fonctionne que sur une certaine catégorie de patients. Deux articles parus simultanément dans le New England Journal of Medicine et Science en 2004 expliquent que l'inefficacité relative de cet inhibiteur est liée à certaines mutations de l'EGFR [77]. Les deux études ont identifié des mutations de l'EGFR qui induisent une inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur à faibles doses de la drogue. En absence de ces mutations, les doses induisant la même inhibition sont beaucoup plus importantes. Ces doses élevées ne peuvent en aucun cas être utilisées chez le patient à cause d'effets secondaires graves. La présence de ces mutations est maintenant analysée chez les patients avant traitement.

Les UMAB vont avoir un impact sur l'activité de certains récepteurs. Dans le cas du récepteur HER2, il est sur-amplifié chez certaines patientes atteintes d'un cancer du sein. Avant l'avènement des thérapies ciblées, les patientes qui présentaient un cancer HER2 positif avaient un très mauvais pronostic vital. La thérapie ciblée a révolutionné le pronostic de ces patientes et entraîne un effet thérapeutique évident. Le ciblage de ce récepteur diminue

notamment la prolifération cellulaire par inhibition des voies de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK et PI3K/AKT/mTOR, empêche le clivage de la portion extra cellulaire du récepteur, induit l'apoptose des cellules tumorales et bloque l'angiogenèse tumorale. Les deux approches thérapeutiques INIB et UMAB ciblent toutes deux la cellule tumorale.

Ces dernières années, une nouvelle stratégie thérapeutique est apparue. Elle vise une inhibition de l'angiogenèse tumorale, stratégie consistant à «asphyxier» les cellules tumorales en les privant d'oxygène et de nutriments par ciblage des cellules endothéliales constituant les vaisseaux sanguins. Cette stratégie visant des cellules normales devait empêcher d'augmenter la plasticité génétique des cellules tumorales et donc être particulièrement efficace. Déjà, dans les années 70, l'observation avait été faite qu'une tumeur ne pouvait pas se développer au-delà d'un certain volume si elle n'était pas correctement vascularisée. Une tumeur peut rester à l'état dormant pendant des années. Pour des raisons encore inexpliquées, une tumeur pourra être irriguée par un nouveau réseau vasculaire. Du fait de l'absence de cellules musculaires lisses, les vaisseaux tumoraux sont très perméables et permettent le passage dans la circulation de cellules tumorales et donc le développement d'un processus métastatique. Un des acteurs majeurs de ce phénomène est le VEGF. Ce dernier va agir par l'intermédiaire de récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR par exemple).

Afin de bloquer l'angiogenèse tumorale, certaines stratégies sont utilisées, comme les pièges à VEGF ou des inhibiteurs pharmacologiques du récepteur du VEGF (INIB). D'autres, enfin, sont des anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre le VEGF (le bévacizumab par exemple). L'efficacité de ces différentes stratégies thérapeutiques a été constatée dans plusieurs essais cliniques.

I-4-2-2-Cibler le VEGF pour inhiber la fixation sur son récepteur

1. **Un anticorps ciblant le VEGF : le bévacizumab**

Le premier traitement anti-angiogénique à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché par la FDA « Food Drug Administration », en 2004, a été le bévacizumab (BVZ). Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF. Le BVZ inhibe la liaison du VEGF à son récepteur et bloque l'activation des voies de signalisation en aval [78]. Il a été initialement approuvé pour le traitement du cancer colorectal métastatique en association avec la chimiothérapie de référence (une association Irinotecan, Fluorouracil, Leucovorin : IFL).

Avec l'arrivée du BVZ, c'est la première fois depuis plus de 20 ans qu'un traitement permet d'augmenter de quelques mois la survie des patients atteints d'un cancer colorectal. Ainsi, les données cliniques indiquent que l'association BVZ+IFL augmente la survie sans progression de 4 mois et la survie globale de 5 mois par rapport au traitement IFL seul [79]. Son utilisation a rapidement été étendue à d'autres types cancers métastatiques.

Aujourd'hui, le BVZ est toujours utilisé dans le traitement du cancer colorectal métastatique en première et seconde ligne. Il est indiqué dans le traitement du cancer du rein à cellules claires métastatique en association avec l'IFNα [80]. Il est également utilisé, en deuxième ligne, dans le traitement du glioblastome multiforme en association avec l'irinotecan [81] et en première ligne dans le cancer du poumon de type NSCLC [82]. Son utilisation est d'avantage controversée dans le traitement du cancer du sein en association avec des dérivés du taxol.

En général, le BVZ n'est pas efficace en monothérapie. En association avec une chimiothérapie, il augmente de façon significative la survie sans progression. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une normalisation vasculaire par les anti-VEGFs. L'inhibition de la voie de signalisation du VEGF normalise les vaisseaux sanguins ce qui facilite l'administration de la chimiothérapie au sein de la tumeur et augmente son efficacité. Dans le traitement des glioblastomes, le BVZ est toutefois utilisé en monothérapie avec des résultats satisfaisants. Deux études cliniques de phase III montrent que le BVZ en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel augmente la survie sans progression et la survie globale dans le traitement du cancer ovarien [83].

Ces résultats ont aboutis à l'approbation du BVZ en Europe dès 2012 et suggèrent une autorisation prochaine du BVZ pour le traitement du cancer ovarien dans le reste du monde [84]. Malgré des résultats satisfaisants, l'efficacité du BVZ est limitée. Dans la plupart des cas, la survie sans progression est augmentée de quelques mois mais aucune augmentation de la survie globale n'est observée. Ces mauvais résultats peuvent être expliqués par un suivi trop précoce, une puissance statistique insuffisante et une confusion apportée par les effets des traitements utilisés après la progression [85].

2. Le rapport bénéfice/risque du BVZ

L'utilisation du BVZ peut causer des effets secondaires très importants. Les plus fréquents sont des problèmes de cicatrisation, des saignements, l'apparition d'évènements thromboemboliques, des perforations de l'intestin ou encore une neutropénie [86].

Un exemple marquant de la balance entre efficacité et effets secondaires est l'utilisation du BVZ dans le traitement du cancer du sein. Une étude très prometteuse a rapporté que l'utilisation du BVZ en association avec le paclitaxel en première ligne pour le traitement de patientes atteintes un cancer du sein métastatique augmente les taux de réponse et double la survie sans progression. Cette étude a été très critiquée pour deux raisons :

a) le paclitaxel utilisé seul est très peu efficace.
b) les patientes traitées par le paclitaxel seul ont reçu en cours d'étude le BVZ.

Pourtant, cette étude a accéléré l'autorisation de mise sur le marché, avec une approbation par la FDA dès 2007. Cette autorisation est très controversée et en 2011, seulement trois ans après son approbation [87], le BVZ est retiré du traitement du cancer du sein métastatique par la FDA aux Etats Unis. Ce retrait se base sur les résultats de deux études cliniques montrant une augmentation de la survie sans progression de seulement 1 à 2 mois (études cliniques AVADO et RIBBON1) et suggérant une augmentation importante des effets secondaires par rapport à la chimiothérapie seule pouvant entrainer jusqu'à la mort de certains patients [88]. Ces deux études soulignent un rapport bénéfice/risque très faible et donc un intérêt très limité en santé publique du BVZ dans cette application, surtout que ces traitements ont des coûts très élevés.

En Europe, l'EMEA maintient actuellement, l'utilisation du BVZ en association avec le paclitaxel et la capecitabine dans le traitement du cancer du sein métastatique. Une méta-analyse réalisée en 2011 [89] et s'appuyant sur les résultats de 16 études cliniques, démontre que le traitement au BVZ est associé avec un nombre plus important de FAEs pour «Fatal Adverse Events» par rapport à la chimiothérapie utilisée seule. Les auteurs reportent qu'environ 2,5% des patients traités avec le BVZ présentent des FAEs ce qui représente une augmentation de 1,5 fois par rapport aux patients traités par la chimiothérapie seule. Les FAEs les plus communs sont des hémorragies (23,5%), des neutropénies entrainant des infections létales (12,2%), les perforations du tractus gastro-intestinal (7,1%) les embolies pulmonaires (5,1%) et des accidents cérébraux (5,1%). L'incidence des FAEs varie de façon

significative en fonction du type de tumeur, de la chimiothérapie associée et augmente avec l'augmentation de la dose de BVZ administrée aux patients [90]. Un effort doit être réalisé dans la détection et le traitement rapide des effets secondaires afin de limiter les risques par rapport aux bénéfices déjà limités du BVZ.

Malgré ces problèmes de FAEs, l'efficacité du BVZ dans le traitement des cancers métastatiques a poussé les médecins à tester son efficacité dans d'autres tumeurs. Mais encore une fois les résultats sont très variables. L'utilisation du BVZ dans le traitement des cancers gynécologiques, augmente la survie sans progression mais n'a aucun effet sur la survie globale des patients, a l'exception du cancer ovarien pour lequel l'association BVZ + chimiothérapie augmente la survie sans progression et la survie globale et devient le traitement standard aux Etats-Unis [91].

Des résultats négatifs ont été obtenus pour le traitement du cancer colorectal à des stades avancés [92]. Ces résultats inconsistants donnent naissance à de nombreuses questions. L'efficacité du BVZ est-elle spécifique d'un type de tumeur ou d'un type de chimiothérapie ? Pourquoi, malgré des résultats précliniques solides et des résultats cliniques précoces prometteurs, l'utilisation du BVZ n'augmente pas la survie globale des patients ? Les réponses à ces questions sont difficiles. L'angiogenèse est un processus complexe nécessitant des boucles de régulation positives et négatives. Il est donc possible que supprimer la signalisation VEGF augmente l'expression du VEGF, entrainant un effet rebond de la croissance tumorale quand la suppression n'est pas continue [93]. Des études *in vivo* chez la souris ont montré que seulement 7 jours après l'arrêt du traitement anti-VEGF, la vascularisation tumorale est restaurée alors que si le traitement est poursuivi l'effet est maintenu et les vaisseaux tumoraux restent sensibles [94]. Différentes données cliniques suggèrent que l'augmentation de la survie sans progression observée est atténuée après l'arrêt du traitement.

Cette hypothèse suggère qu'une thérapie à long terme serait plus avantageuse. Les bénéfices du BVZ, sur la survie sans progression, sont perdus après l'arrêt du traitement [95]. L'important est donc de trouver le bon compromis entre un traitement à long terme et des effets secondaires trop importants qui supprimerait tout bénéfice sur la survie des patients. Enfin, l'absence d'effet positif sur la survie globale pourrait être expliquée par le fait que le BVZ n'est efficace que chez certains patients alors que les études englobent l'ensemble des

patients traités, diminuant la significativité des résultats. Cette sélection est difficile car le nombre de patients deviendrait trop limité pour faire émerger le bénéfice clinique faible. Il est donc indispensable de mettre en évidence des facteurs prédictifs d'efficacité du BVZ afin de sélectionner les patients potentiellement les plus répondeurs. Cela permettrait d'augmenter les bénéfices tout en limitant les effets secondaires.

3. Un hybride VEGFR-1/VEGFR-2 : L'aflibercept

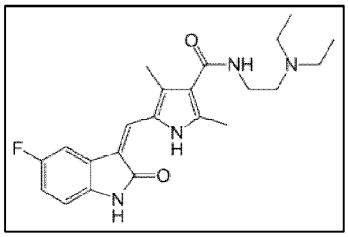
Il s'agit d'une protéine de fusion contenant les domaines extracellulaires du VEGFR-1 et du VEGFR-2, capable de reconnaître le VEGF-A, le VEGF-B et le PlGF. Il a été récemment approuvé par la FDA en association avec une chimiothérapie, en 2ème ligne dans le traitement du cancer colorectal. Cette approbation se base sur une étude clinique de phase III qui a montré une augmentation de la survie sans progression et de la survie globale des patients traités avec l'aflibercept en combinaison avec la chimiothérapie de référence [96]. L'aflibercept a été testé dans d'autres études de phase III. Il n'a pas démontré d'avantage clinique dans le traitement du cancer du poumon de type NSCLC [97] et de la prostate. Ainsi, les efforts actuels pour améliorer l'utilisation de cette molécule se concentrent sur le traitement du cancer colorectal.

I-4-2-3-Inhiber l'activité tyrosine kinase des récepteurs aux facteurs angiogéniques

Un autre moyen de bloquer l'angiogenèse tumorale est de cibler directement le domaine kinase des récepteurs impliqués dans la régulation de ce processus. Ces inhibiteurs sont de petites molécules mimétiques de l'ATP. Elles diffusent librement à l'intérieur des cellules et entrent en compétition avec l'ATP pour la fixation au domaine intracellulaire des récepteurs. Cette compétition inhibe l'activation des voies de signalisation en aval des récepteurs cibles. Un grand nombre d'anti-angiogéniques de ce type sont actuellement utilisés en clinique ou en cours de caractérisation dans des études précliniques et cliniques. Tous ces inhibiteurs utilisent le même mécanisme d'action mais les récepteurs cibles, les caractéristiques pharmacocinétiques et les effets secondaires sont très différents d'un inhibiteur à l'autre.

Actuellement, les plus utilisés en clinique sont le sunitinib et le sorafenib. Ces deux inhibiteurs ciblent les récepteurs du VEGF, les récepteurs du PDGF et les récepteurs c-KIT, CSF-1R, FLT-3 et RET. En plus de ces récepteurs tyrosine kinase, le sorafenib inhibe les kinases B-Raf et c-Raf.

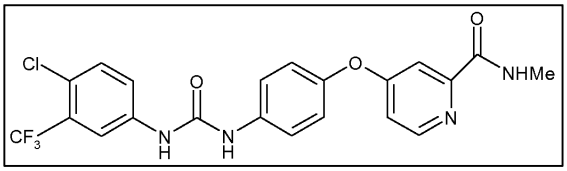
1- Le sunitinib: Sutent®



Le sunitinib est utilisé en deuxième ligne dans le traitement des GIST pour «Gastro-Intestinal Stromal Tumors» résistants au traitement de référence, le Glivec. Dans une étude de phase III, le sunitinib augmente la survie sans progression à 6,8 mois par rapport à 1,6 mois pour les patients non traités mais n'augmente pas la survie globale des patients [98]. Le sunitinib est également utilisé en première ligne dans le traitement des RCC métastatiques.

Dans plusieurs études cliniques, le traitement sunitinib augmente de façon significative le taux de réponse, la survie sans progression et la survie globale des patients par rapport au traitement de référence, l'IFNα [99]. Enfin, le sunitinib est utilisé dans le traitement des tumeurs métastatiques neuroendocrines du pancréas qui ne peuvent pas être éliminées par chirurgie [100]. D'autres études cliniques sont en cours pour valider l'efficacité du sunitinib dans le traitement d'autres tumeurs solides.

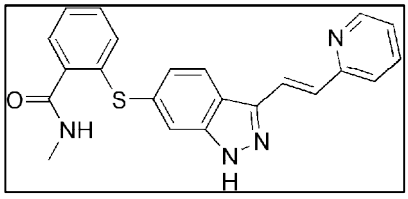
2- Le sorafenib: Nexavar®



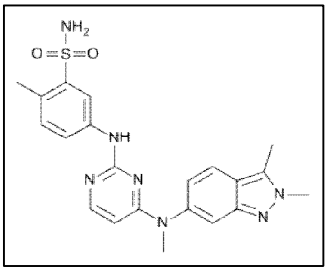
L'utilisation du sorafenib est indiquée dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires avancés [101] et en deuxième ligne dans le traitement des RCC métastatiques. Dans le traitement des RCC, le bénéfice est plus limité et sans réel avantage en

terme de survie globale malgré une augmentation de la survie sans progression (5,5 mois versus 2,8 mois). Il est progressivement éliminé au profit de nouvelles molécules plus spécifiques comme l'axitinib.

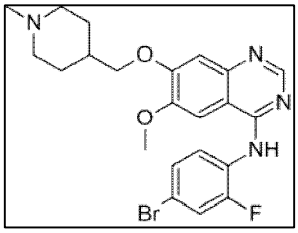
3- Les autres molécules



Axitinib



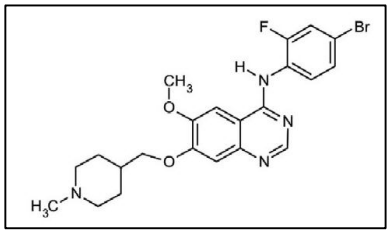
Pazopanib



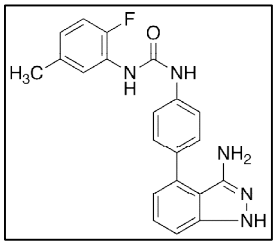
Vandetanib

Deux autres inhibiteurs sont également utilisés, en deuxième ligne, dans le traitement des RCC métastatiques, le pazopanib et l'axitinib. Ces inhibiteurs sont un peu plus spécifiques car ils ne ciblent que les récepteurs du VEGF, du PDGF et le récepteur c-Kit. Le pazopanib permet une augmentation significative de la survie sans progression par rapport à des patients non traités. Ces résultats sont indépendants d'un traitement ou non en première ligne par l'IFNα. L'utilisation de l'axitinib augmente de façon significative la survie sans progression des patients atteints de RCC par rapport au sorafenib. Il représente une option intéressante pour une deuxième ligne de traitement dans les RCC métastatiques. Deux autres inhibiteurs, le vandetanib et le cabozantinib [102] sont utilisés dans le traitement du cancer avancé ou métastatique de la thyroïde et de la prostate. Le vandetanib cible les récepteurs de VEGF, de l'EGF et le récepteur RET et le cabozantinib plus spécifique ne cible que les récepteurs VEGFR-2 et c-MET. Enfin, deux derniers inhibiteurs spécifiques sont actuellement en cours d'essais cliniques, le linifanib et le tivozanib. Le linifanib est un inhibiteur spécifique des récepteurs du VEGF et du PDGF. Son efficacité est validée en préclinique et dans plusieurs études cliniques de phase II. Cette molécule est efficace dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires métastatiques [103], en 2ème ou 3ème ligne dans le traitement du cancer du poumon avancé et dans le traitement des RCC après l'échec du sunitinib [104]. Le tivozanib est un inhibiteur spécifique des récepteurs du VEGF (VEGFR-1, 2 et 3) avec une demi-vie longue et des effets secondaires limités. Son efficacité a déjà été démontrée dans une étude de

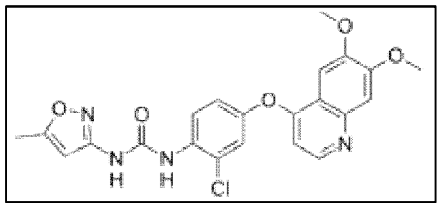
phase II [105]. Il est actuellement en cours d'étude de phase III dans le traitement des RCC métastatiques en comparaison avec le sorafenib. Cette étude en cours montre une efficacité supérieure au sorafenib. Le traitement est très bien toléré par les patients. Cette étude démontre que l'utilisation d'un inhibiteur des VEGFRs plus spécifique permet d'augmenter l'efficacité en diminuant les effets secondaires.



Vandetanib



Linifanib



Tivozanib

Le tivozanib pourrait être considéré dans le futur, comme la première ligne dans le traitement des RCC métastatiques.

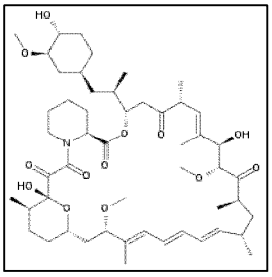
4- Le rapport bénéfice/risque des TKI

L'efficacité de ces inhibiteurs résulte certainement dans leur large champ d'action. Ils interfèrent avec plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse et le développement tumoral. La multiplication du nombre de cibles entraine également une augmentation de la quantité d'effets secondaires associés au traitement. Ces inhibiteurs même s'ils sont dans l'ensemble bien tolérés, entrainent des effets secondaires importants dont certains peuvent entrainer jusqu'à la mort des patients. Les plus fréquents sont des problèmes d'insuffisance cardiaque, de thrombose artérielle, de cicatrisation, d'hémorragie, d'hypertension [106] et de dysfonctionnement rénal. Une méta-analyse récente, regroupant les résultats de 10 études cliniques sur le sunitinib, le sorafenib et le pazopanib, démontre une augmentation significative du risque de mortalité sous traitement. Les résultats démontrent une augmentation de plus de 3 fois du nombre de FAEs chez les patients traités par ces inhibiteurs par rapports aux patients des groupes contrôles. Dans cette analyse 79% des décès résultent d'une hémorragie ou de problèmes cardiaques. Cette étude ne remet pas en cause

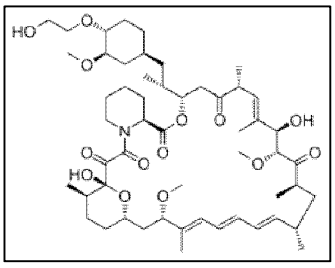
l'utilisation de ces inhibiteurs en clinique mais démontre la nécessité d'un suivi régulier des patients pour anticiper l'apparition de ces FAEs.

I-4-2-4-Inhiber les effecteurs en aval dans la voie de signalisation

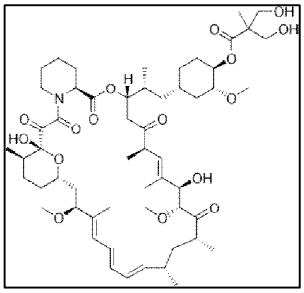
La protéine mTOR pour « mammalian Target Of Rapamycin » contrôle la croissance cellulaire en modulant le métabolisme, la synthèse protéique et l'autophagie [107]. La protéine mTOR, joue un rôle important dans l'angiogenèse tumorale en régulant l'expression du VEGF dans les cellules endothéliales et les cellules tumorales. Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire de la régulation de la traduction du facteur de transcription HIF-1α qui induit l'expression du VEGF et l'angiogenèse tumorale. L'activité clinique anti-tumorale des inhibiteurs de mTOR est donc expliquée par une inhibition de l'angiogenèse [108]. Cette voie de signalisation est souvent dérégulée dans les cancers faisant de mTOR une cible thérapeutique intéressante.



Rapamycine



Everolimus



Temsirolimus

Des analogues de la rapamycine, le temsirolimus et l'everolimus sont des inhibiteurs allostériques de mTORC-1, un des deux complexes de mTOR. Ces inhibiteurs sont utilisés dans le traitement des RCC métastatiques, des lymphomes du manteau [109] et des tumeurs pancréatiques neuroendocrine [110]. L'efficacité de ces inhibiteurs est limitée. Cela est expliqué par l'inhibition sélective de mTORC-1 mais pas de mTORC-2. Inhiber mTORC-1 et mTORC-2 de façon simultanée pourrait être plus efficace.

Ces nouveaux inhibiteurs de la voie mTOR sont actuellement en phase préclinique de développement [111].

En conclusion, depuis la découverte de l'angiogenèse tumorale, un enthousiasme important existe autour du développement des molécules anti-angiogéniques. Pourtant, seulement une fraction des patients montre réellement un bénéfice. Dans des modèles précliniques un bénéfice à long terme des anti-angiogéniques existe. En clinique, l'augmentation de la survie globale des patients est souvent limitée. Certains patients deviennent résistants au traitement. D'autres sont réfractaires dès le départ. Des résultats contradictoires existent au sujet du bénéfice des traitements anti-angiogéniques. Dans certains cas, ces traitements favorisent l'invasion et la formation de métastases [112].

Cependant, une normalisation vasculaire soutenue est un moyen efficace de combattre l'échappement tumoral et la formation de métastases. Une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant l'angiogenèse tumorale est indispensable afin d'améliorer l'efficacité des thérapies anti-angiogéniques. Des marqueurs d'efficacité des traitements sont indispensables. Pourtant aucun n'est validé et utilisé en routine pour sélectionner les patients potentiellement répondeurs au traitement [113]. Face à cette efficacité modérée des anti-angiogéniques certains proposent des modèles précliniques plus adaptés et d'autres étudient les modes de résistances aux traitements [114].

En résumé, Dix molécules à visée anti- angiogénique ont été étudiées. D'une manière schématique, elles peuvent être classées en deux grandes « familles » : les molécules ciblant le VEGF et les agents perturbant la vascularisation tumorale. Dans la première, on recense deux types d'agents.

Tout d'abord, les récepteurs solubles ayant une grande affinité pour le VEGF empêchent la fixation du VEGF sur le VEGFR des cellules endothéliales (Tableau1).

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; GIST: Gastro- Intestinal Stromal Tumours; LMC: Leucémies myeloïdes chroniques; PA: Personnes âgées; VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor; PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor.

Tableau 1. Cible et indication des différents traitements antiangiogéniques.

I-4-2-5-Vers une thérapie personnalisée

L'activation des oncogènes et la dérégulation de l'angiogenèse sont des mécanismes fortement reliés. Des mutations dans les cellules tumorales peuvent moduler la balance entre les facteurs pro et anti-angiogéniques et entrainer une angiogenèse exacerbée. Une étude récente propose que la normalisation du réseau vasculaire, en ciblant les oncogènes, pourrait être plus efficace que des traitements ciblant directement les vaisseaux sanguins. Cibler ces oncogènes permettrait de restaurer une angiogenèse normale et une vascularisation fonctionnelle. Les altérations génétiques sont spécifiques d'une tumeur. Une thérapie ciblée bloquant le programme génétique activé par un oncogène spécifique pourrait aboutir à une thérapie personnalisée des patients [115].

Dans certains cas, des mutations de la cible de la thérapie entraine une sensibilité à des quantités faibles non toxiques de la drogue, situation rencontrée pour les inhibiteurs de l'EGFR [116]. Dans d'autres cas une mutation d'un régulateur négatif entraine une «

addiction » à une voie de signalisation particulière. Cette situation a été décrite dans le cas de mutation du gène *tsc1*, un régulateur de mTOR. Ces mutations entrainent une hypersensibilité aux «rapalogues» dans les ccRCC [117].
Ainsi, la recherche de ces mutations permet d'éviter l'administration inutile des inhibiteurs et de personnaliser les traitements.

I-4-2-6-Traitements combinés

Différents essais de phase II ont été réalisés associant plusieurs thérapies ciblées, afin d'élargir leur spectre d'activité et de tenter de limiter les résistances primaires ou secondaires à ces agents.

Dans le carcinome rénal à cellules claires, des résultats intéressants ont été obtenus chez 14 patients qui recevaient une association d'évérolimus et d'imatinib mesylate (12 de ces patients avaient progressé sous un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase ; sur dix patients évaluables, sept avaient une stabilité tumorale) [118]. Ces traitements ont également été associés pour le traitement de GIST réfractaires à l'imatinib seul et ont permis d'obtenir quelques réponses tumorales [119].

Dans le cancer bronchique non à petites cellules métastatique, l'association de géfitinib et d'évérolimus a permis d'obtenir quatre réponses partielles sur les 23 patients inclus dans un essai de phase II [120]. Dans cette même indication, une autre étude proposait à des patients de recevoir soit une chimiothérapie par docétaxel ou pemetrexed avec un placebo (premier bras), soit cette même chimiothérapie avec du bévacizumab (deuxième bras), soit du bévacizumab associé à de l'erlotinib sans chimiothérapie associée (troisième bras). Les médianes de survie globale dans les trois bras étaient respectivement de 8,6 mois, 12,6 mois et 13,7 mois, et la survie à un an était de 55,5% dans le deuxième bras (chimiothérapie plus bévacizumab) contre 33,1% dans le premier bras (chimiothérapie seule) (tableau2) [121].

Tableau 2. Tableau acquis thérapeutiques obtenus par les thérapies ciblées dans les tumeurs solides (Résultats des principaux essais de phase III)

I-5- Conclusion

Le cancer, première cause de mortalité prématurée, seconde cause de décès tous âges confondus, reste un enjeu de santé publique fort, enjeu humain, social, et même sociétal et économique. Les travaux économiques ont en effet montré le coût important de cette maladie pour le pays, et les associations de malades en ont souligné l'impact humain et social, pour eux-mêmes comme pour leurs proches. En outre, en 2007, pratiquement tous les cancers sont susceptibles de bénéficier d'un traitement. Si l'on ne guérit encore guère plus d'un cancer sur deux chez l'adulte, les avancées médicales issues de la recherche sur le cancer ont été importantes depuis une dizaine d'années.

Des progrès dans la compréhension des mécanismes qui interviennent dans les cancers devraient permettre d'améliorer la lutte contre cette maladie. Le but ultime dans le traitement des cancers est de développer des médicaments présentant une grande efficacité contre les cellules cancéreuses.

La recherche de nouveaux activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse est un domaine en pleine exploration due aux perspectives thérapeutiques qu'il ouvre. Après des résultats encourageants *in vivo* et *in vitro* et après des tests précliniques, une première génération d'agents angiogéniques et angiostatiques a conduit a des résultats satisfaisants, mais pas excellents en phase clinique III. Dans la thérapie anticancéreuse, les anti-angiogéniques ne peuvent pas guérir le cancer, mais ils peuvent améliorer la durée et la qualité de vie des patients. Ainsi, le Bevacizumav, (Avastin®) prolonge de cinq mois la survie des patients souffrant d'un cancer colorectal. Le Nexavar® (Bayer) permet une prolongation de 44% de la survie globale de patients souffrant d'un cancer du foie avancé.

La découverte et le développement de nouveaux inhibiteurs et activateurs angiogéniques ainsi que la compréhension des mécanismes encore non élucidés mis en jeu lors de l'angiogenèse humaine sont toujours d'actualité et pourraient permettre l'élaboration de médicaments de plus en plus efficaces. En effet les deux grandes familles d'anti-angiogéniques actuellement utilisées en cancérologie (inhibiteurs protéiques et non protéiques) présentent des toxicités importantes qui limitent leur utilisation.
Le sujet de cette thèse s'inscrit dans cet axe de recherche et consiste à élaborer de nouveaux effecteurs de l'angiogenèse, à base de monosaccharides, moins toxiques et plus facilement accessibles.

Des études antérieures, effectuées dans notre laboratoire ont permis la mise au point de nouveaux dérivés de mannopyranoside ayant une activité pro ou anti angiogénique.
Dans ce sens, la préparation de molécules dérivées du mannose -6- phosphate est présentée dans ce travail. Des tests biologiques ont enfin été effectués afin de déterminer l'activité de ces nouvelles molécules sur l'angiogenèse.

CHAPITRE II

II-1-Objectifs de synthèse

L'objectif de ce travail est de moduler la structure du mannose-6-phosphate en, d'une part, modifiant la position anomère pour augmenter la biodisponibilité et, d'autre part, en introduisant de nouvelles fonctionnalités en position 6 pour une meilleure reconnaissance vis-à-vis du récepteur.

Lors de travaux précédents effectués dans notre laboratoire, des dérivés du mannose-6-phosphate ayant en position anomère un groupement méthyle avaient été préparés. Ces composés se sont avérés être des effecteurs de l'angiogenèse.

Une étude *in vivo* sur la métabolisation de ces composés a montré qu'ils sont très rapidement éliminés. Un calcul théorique des méthyl-mannosides a mis en évidence leur caractère hydrophile. En effet, ces produits présentent un coefficient de Hansch voisin de -2. Afin d'améliorer leur biodisponibilité, il serait préférable que leur coefficient de Hansch soit positif. Pour une bonne absorption orale, le logP doit être aux environs de +2. Pour cela, nous avons souhaité modifier la position anomère de ces dérivés pour qu'ils présentent une plus grande lipophilie. Les composés testés précédemment étaient des méthyl-glycosides. Donc, une modification de ce radical, en allongeant la chaîne hydrocarbonée, devrait permettre d'augmenter significativement le logP. Des études in silico ont montré que les valeurs optimales des coefficients de Hansch (logP) pour l'absorption d'une molécule (un médicament) sont:

• Absorption orale: 1.8
• Passage de la barrière céphalo-méningée: 2.0
• Absorption percutanée: 2.6
• Absorption sublinguale: 5.5

Ainsi pour un pentyl ou octyl mannoside, les coefficients de Hansch sont compris entre 1.8 et 2.7. Une augmentation de leur durée de vie devrait augmenter leur efficacité.

Par ailleurs, il a été largement démontré que la substitution sur la position anomère d'un sucre ne modifie pas sa reconnaissance vis-à-vis d'un récepteur [122]. Une modification en position anomère ne devrait donc pas influer sur leur propriété vis-à-vis de l'angiogenèse.

Il sera donc question de remplacer le méthyle en position anomère par une chaine plus grande, c'est à dire par des groupements : pentyle, isopropyle et para-nitrophényle.

II-2-Le recepteur du mannose-6-phosphate (RM6P)

Les dérivés du mannose-6-phosphate de type méthyl mannoside sont substrat du RM6P.

C'est un récepteur qui appartient à la classe des lectines de type P [123] qui ont la particularitée de reconnaitre les mannoses phosphorylés.

La famille des lectines de type P contient deux membres (figure12) :

- Le récepteur du mannose-6-phosphate cation dépendant (RM6P-CD), qui a besoin de cations bivalents pour lier le mannose-6-phosphate (M6P), son poids moléculaire étant 46 kDa.
- Le récepteur du mannose-6-phosphate cation indépendant (RM6P-CI), qui ne nécessite pas de cations bivalents pour lier le ligand, son poids moléculaire (300kDa) étant plus grand que celui du RM6P-CD. Le RM6P-CI lie aussi l'IGF-II (l'insulin like growth factor II) sur un site de liaison différent de celui du M6P [124].

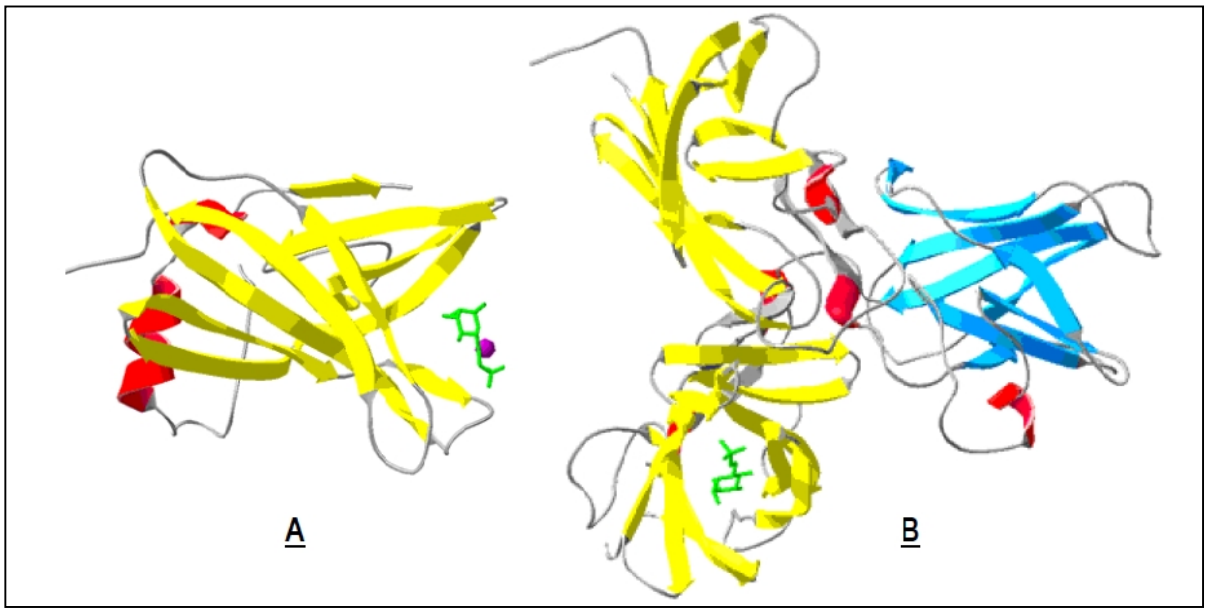


Figure 12. Le récepteur bovin du M6P.

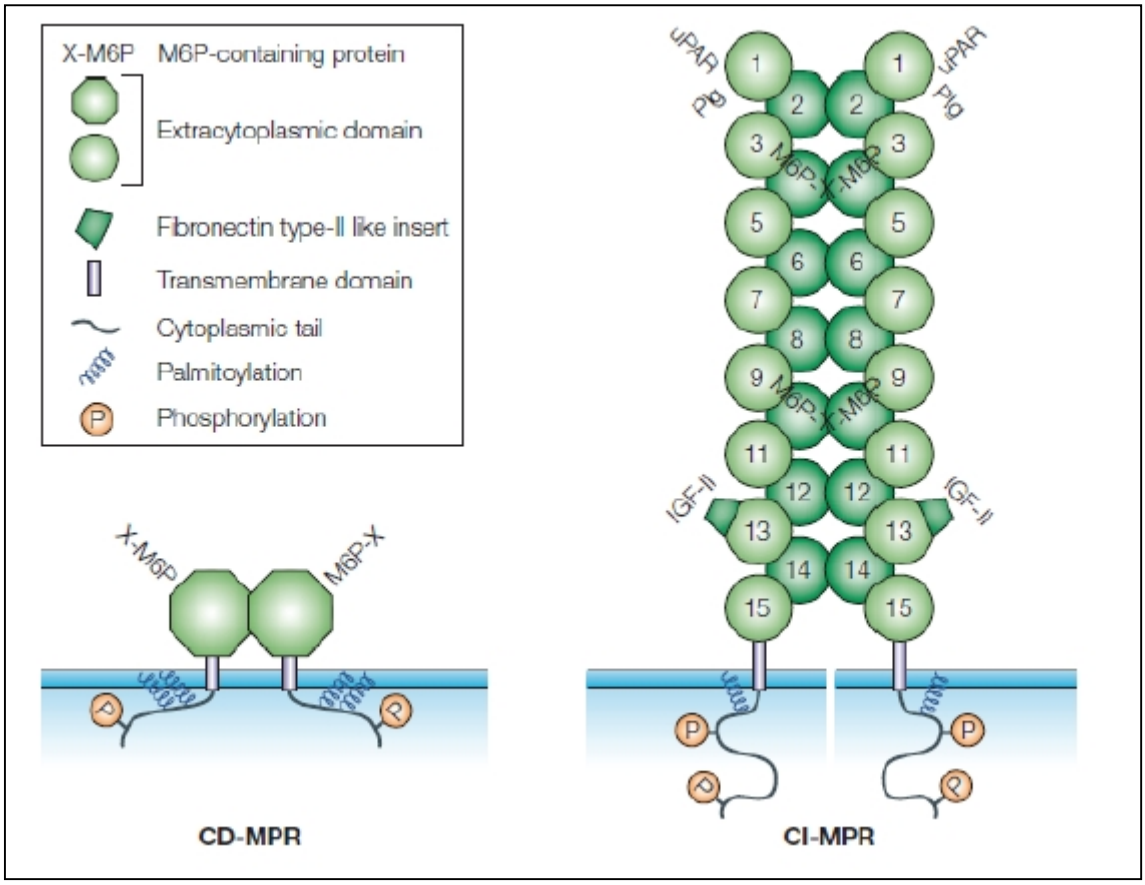


Figure 13. Structure des deux récepteurs du Mannose -6-Phosphate (RM6P-CD et RM6P-Cl)

II-2-1-Structure du RM6P

Le récepteur de l'IGF-II/M6P est une glycoprotéine monocaténaire de type 1 [125] dont la partie protéique a un poids moléculaire de 270 kDa et la partie osidique a un poids moléculaire de 20 a 30 kDa. Le récepteur est formé de trois parties distinctes : une partie extracellulaire N-terminale qui représente 90% de sa structure et qui contient les sites de liaison de différents ligands, une partie transmembranaire et une partie intra cytoplasmique C-terminale.

II-2-2-Le RM6P et l'angiogenèse

Les mécanismes par lesquels le RM6P intervient dans l'angiogenèse sont peu connus de nos jours.

Trois types de mécanismes qui impliquent le mannose 6-phosphate dans le phénomène d'angiogenèse sont décrits dans la littérature :

1- Le récepteur de l'IGF-II/M6P lie la proliférine [126], deux activités biologiques ont été identifiées pour la proliférine :

- la stimulation de la synthèse d'ADN dans l'utérus a mi-gestation.
- la migration des cellules endothéliales en culture et la néo vascularisation in vivo [127].

2- Une étude a montré l'implication possible du récepteur de l'IGFII/M6P dans l'angiogenèse [128]. L'héparanase, une enzyme exprimée à la surface des leucocytes, des cellules tumorales métastatiques ou des cellules endothéliales prolifératives, est une β endoglucoronidase qui lie le sulfate d'héparine. Ainsi, elle facilite la dégradation de la matrice extracellulaire et de la membrane basale, entrainant l'invasion cellulaire associée à l'inflammation, les métastases tumorales et l'angiogenèse.

3- Un autre facteur modulant l'angiogenèse par interaction avec le récepteur du M6-P/IGF-II est le TGF-β (transforming growth factor-β). A des faibles concentrations, il est activateur de l'angiogenèse, alors qu'a des concentrations élevées, il inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales et stimule l'activation des cellules musculaires lisses.

V. Leska et son équipe [129] ont montré que le phénomène par lequel le TGF-β induit l'apoptose des cellules endothéliales implique le RM6-P/IGF-II.

II-3-La bioisostérie

Précédemment, des séries de molécules dérivées du mannose modifié en position 6 ont été synthétisées au laboratoire. Le choix de ces molécules a été fait en tenant compte du M6P. Afin de mieux comprendre le choix des groupements qui fonctionnalisent la position 6, la présentation des notions d'isostérie et bioisostérie doit être faite.

La bioisostérie a été introduite par Langmuir en 1919 [130], à partir de l'observation suivante : certains atomes, groupes, radicaux et molécules organiques et inorganiques ont des similitudes quant à certaines propriétés physico-chimiques.

A partir de l'analyse de leur structure électronique, Langmuir a déduit que ces molécules ou ions avaient le même nombre et arrangement d'électrons. Il les a appelés « isostères ».

Groupes	Isostères
1	H^-, He, Li
2	O^{2-}, F^-, Ne, Na^+, Mg^{2+}, Al^{3+}
3	S^{2-}, Cl^-, Ar, K^+, Ca^{2+}
---	---
10	CO_2, N_2O, N^{3-}, CNO^-
---	---
21	SeO_4^{2-}, AsO_4^{3-}

Tableau 3. Groupes d'isostères identifiés par Langmuir

Par la suite Grimm [131], a introduit la « loi du déplacement d'hydrure ». D'après cette loi, par ajout d'un à quatre ions hydrure à un atome, celui-ci devient un pseudo atome iso électronique des éléments qui le suivent dans la classification périodique.

C	N	O	F	Ne	Na
	CH	NH	OH	FH	-
		CH_2	NH_2	OH_2	FH_2^+
			CH_3	NH_3	OH_3^+
					NH_4^+

Tableau 4. La loi « du déplacement d'hydrure » de Grimm

En 1932, Erlenmeyer ajoute à la notion d'isostérie les molécules ou ions qui présentent le même nombre d'électrons dans leur couche de valence, comme les éléments de la même colonne de la classification périodique des éléments (ex. C - Si - Ge).

En 1951 Friedman, introduit la notion de bioisostérie [132], pour décrire des relations plus complexes entre des composés qui possèdent des propriétés biologiques similaires. Il a utilisé le terme « bioisostères » pour désigner des groupes d'atomes ou de molécules qui avaient des propriétés chimiques et physiques proches, produisant des effets biologiques généralement similaires.

II-3-1-Caractéristique de la bioisostérie

Dans un remplacement bioisostère, l'analyse de plusieurs paramètres qui caractérisent les groupements échangés doit être rigoureusement réalisée [133]:

1- Taille, volume, distribution électronique des atomes, considérations du degré d'hybridation, polarisabilité, angles de liaison et effets inductifs et mésomères.

2- Degré de solubilité en phase aqueuse et lipidique, afin de pouvoir prédire des modifications de propriétés physicochimiques telles que le logP et le pKa.

3- Réactivité chimique, car le nouveau groupement bioisostère ne doit pas générer, par biotransformation, des métabolites toxiques.

4- La capacité de former des liaisons hydrogène inter ou intramoléculaires.

II-3-2-. Classification des groupes isostères

En 1970, Alfred Burger a classé les groupes bioisostères dans deux grandes catégories : de type classique et non-classique [134] (figure 14).

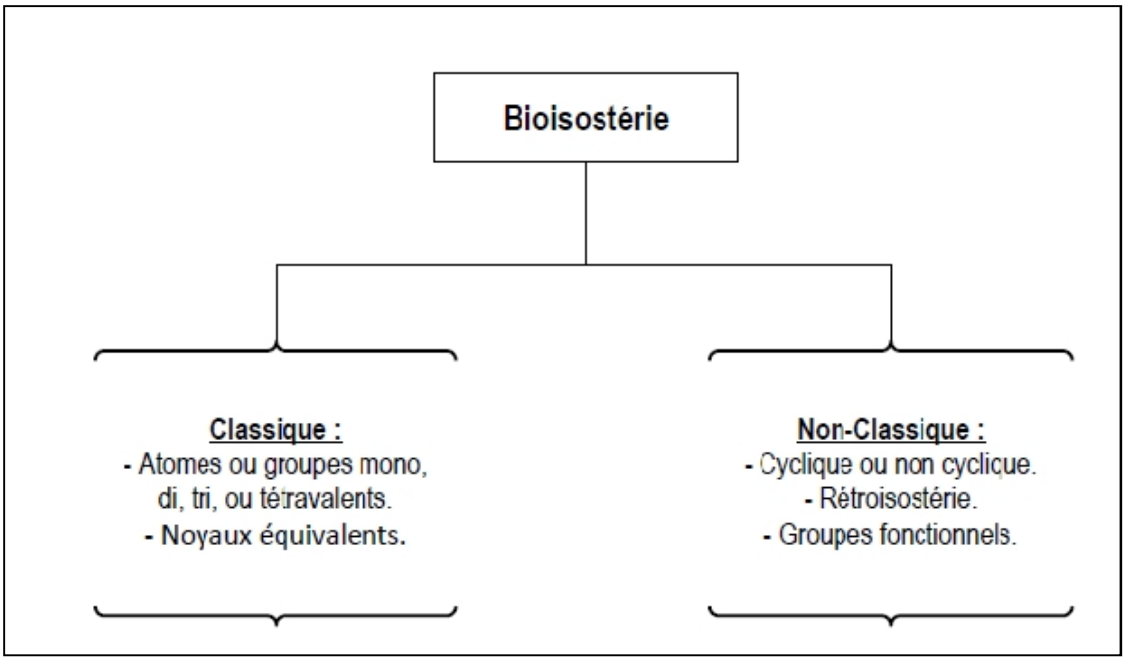


Figure 14. Classification de la bioisostérie selon Burger

a- La bioisostérie classique

Ce type de bioisostérie est défini par les remplacements effectués selon la règle d'Erlenmeyer et la « loi du déplacement d'hydrure » de Grimm.

Les bioisostères classiques ont été divisés en plusieurs catégories distinctes :

- Des atomes ou groupe d'atomes monovalents,
- Des atomes ou groupe d'atomes divalents,
- Des atomes ou groupe d'atomes trivalents,
- Des atomes ou groupes d'atomes tétravalents.

b- La bioisostérie non-classique

Elle ne correspond pas aux définitions stériques et électroniques des bioisostères classiques. Souvent, les groupements échangés n'ont pas le même nombre d'atomes.

Il peut s'agir :

- Des remplacements non-classiques pour lesquels un groupement fonctionnel non-cyclique mime, d'un point de vue stérique ou électronique, un groupement cyclique, avec conservation de l'activité biologique.
- De la rétroisostérie : inversion de l'ordre de liaison d'atomes dans un groupe fonctionnel.
- Des remplacements non-classiques spécifiques de certains groupes fonctionnels (hydroxyle, carbonyle, carboxylate, amide, thiourée, halogène, etc...).

II-3-3-Conclusion sur la bioisostérie

Le concept de bioisostérie est beaucoup utilisé en chimie thérapeutique pour le développement de nouveaux médicaments, à partir d'un « lead compound ». Ce composé possède des propriétés pharmacologiques qui le recommandent comme point de départ pour le développement de nouvelles molécules plus performantes, par des modifications structurales. Ces modifications peuvent être faites pour améliorer son activité pharmacologique, augmenter sa sélectivité vis-à-vis d'un récepteur, optimiser sa pharmacocinétique, réduire certains effets secondaires, etc.

II-4-Préparation de la partie saccharidique

II-4-1-La glycosylation

La glycosylation est la méthode utilisée pour introduire un groupement sur la partie anomère d'un sucre. Les méthodes de glycosylation se différencient selon la nature du sucre de départ [135].

II-4-2-O-glycosylation à partir d'un sucre libre

La glycosylation à partir de sucres libres en position anomère peut être effectuée selon :

La méthode de Fischer [136] qui consiste à protoner l'hydroxyle porté par le C_1 d'un glucide non protégé, suivi de l'attaque nucléophile de l'alcool que l'on veut greffer.

La méthode de Schmidt en présence d'un triflate fonctionnalisé avec la fonction à introduire.

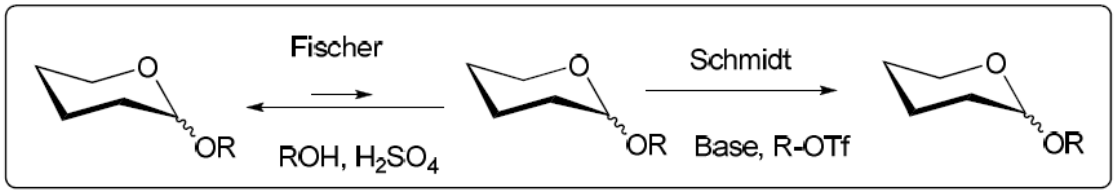


Schéma 1. Méthodes de O-glycosylation sur un sucre libre

II-4-3-O-glycosylation à partir de sucres protégés et activés

Elle correspond à la formation de la liaison glycosidique par déplacement d'un groupe partant en C_1 par un alcool ROH (ou par le groupement hydroxyle de la molécule à accrocher).

L'activation du groupement partant est réalisée en présence d'un « promoteur » à caractère électrophile selon le schéma suivant :

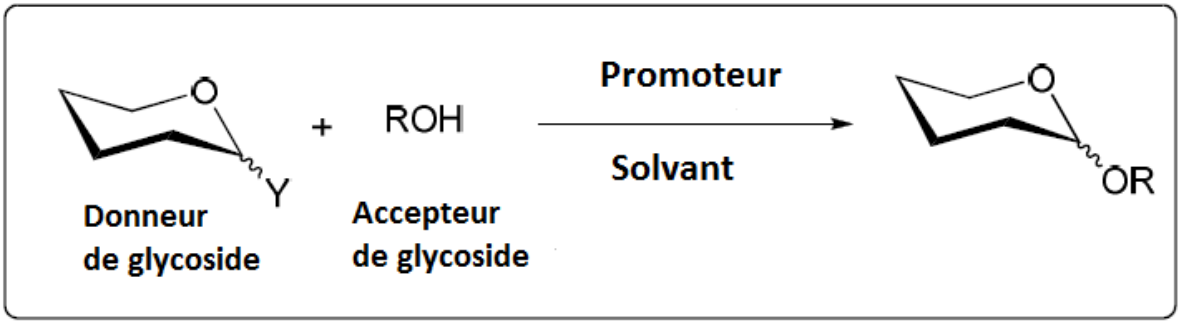


Schéma 2. Méthodes de O-glycosylation sur un sucre activé

Un des problèmes les plus importants de la glycosylation est la stéréosélectivité, c'est-à-dire la sélectivité α/β de la réaction. La glycosylation peut être orientée vers l'anomère α ou

l'anomère β, principalement en jouant sur le type de protection de l'hydroxyde en C_2 du sucre, sur le solvant ou sur le catalyseur.

Dans le tableau suivant est exposée une série des donneurs couramment utilisés associés à leurs promoteurs propres, comme l'acide de Lewis $BF_3.Et_2O$ ou le TMSOTf (Triflate de triméthylsilyle) utilisé pour activer un imidate ou le NIS (N-iodosuccinimide) et/ou le TfOH (Acide trifluorométhanesulfonique) dans le cas d'un thioglycoside. Actuellement le trichloracétimidate et le thioglycoside sont les donneurs les plus utilisés au dépend des halogénures qui étaient largement employés dans le passé (tableau 5) [137].

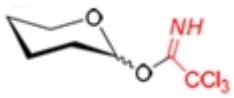
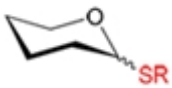
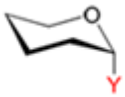
Donneur	Promoteur	Glycosylation
 Trichloroacétimidates	TMSOTf, BF3.ET_2O	Schmidt [137]
 Thioglycosides	Tf-OH, TMSOTf NIS	Lonn, Garegg, Van Boom ou Fraser-Reid [137]
 Halogénures	AgOTf, Ag2O, AgNO3 ou acide de Lewis	Koenings-Knorr ou Mukayama [137]

Tableau 5: Les types de donneurs avec les promoteurs correspondants

II-5-Stratégie de synthèse

Comme nous l'avons vu précédemment, le but de notre travail, est de synthétiser des analogues du M-6-P ayant une chaine plus longue en position anomère, modifiés en position 6 et d'évaluer leur activité *in ovo* vis-à-vis de l'angiogenèse.

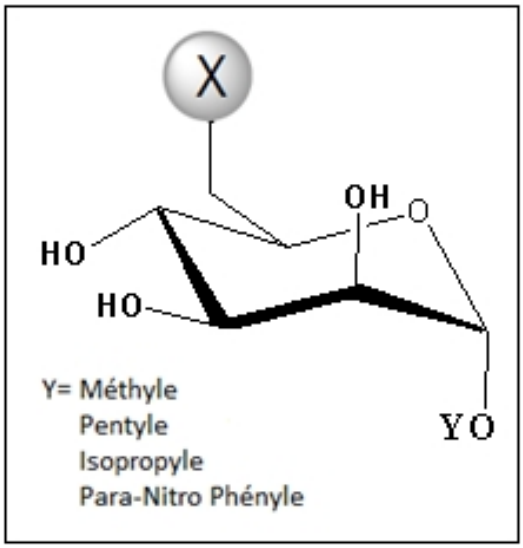


Figure 15. Modification de la position 6 du sucre.

L'un des objectifs était de trouver des méthodes générales permettant l'accès à des dérivés du mannose porteurs de groupes fonctionnels très variés en position terminale.
Il existe deux types de stratégies pour fonctionnaliser la position 6 d'un sucre convenablement protégé (Figure16). La première consiste à oxyder la position 6 et à effectuer ensuite des réactions d'addition ou de carbonyl-oléfination [138] (voie a), cette voie a été précédemment utilisée au laboratoire pour la synthèse du phosphonate isostère et des analogues carboxylate par des réactions de Wittig-Horner effectuées sur l'aldéhyde obtenu à partir de l'alcool par une oxydation de Swern [139]. La seconde stratégie consiste à effectuer une substitution nucléophile sur l'hydroxyle 6 préalablement activé (voie b).

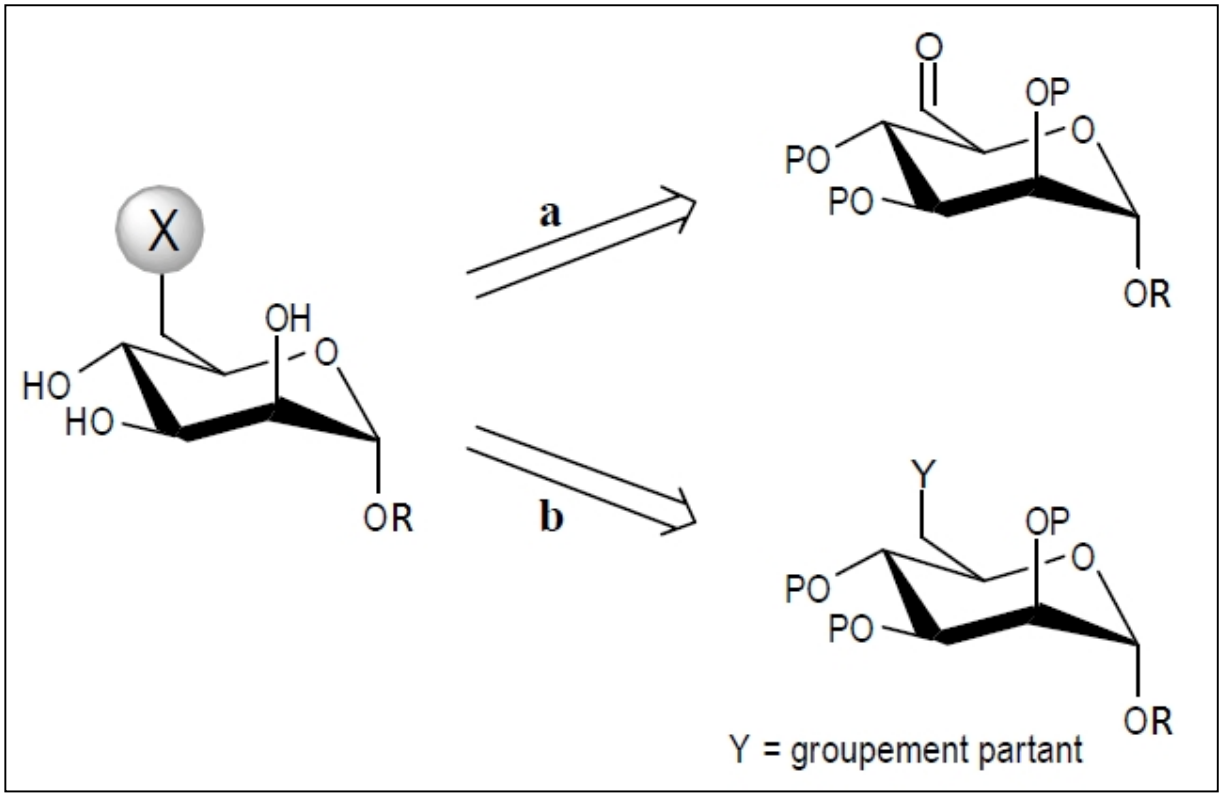


Figure 16. Voies de fonctionnalisation de la position 6 d'un sucre.

Nous avons choisi de privilégier la voie **b** qui est généralement la plus directe et qui offre le plus grand potentiel synthétique. Les réactions de substitution nucléophile bimoléculaires sont très utiles, et parmi les plus employées en chimie des glucides. En effet, elles permettent d'introduire divers hétéroatomes (X, N, O, S) contrairement à la voie **a**, ou bien d'effectuer des réactions d'élongation de chaînes carbonées si le nucléophile est un dérivé organométallique. Le mécanisme SN_2 induit une inversion de configuration, cependant comme dans notre cas il s'agit d'une fonction alcool primaire, ce paramètre n'est pas à prendre en compte puisque le carbone n'est pas asymétrique. L'efficacité de ces réactions dépend essentiellement de trois paramètres : la nature du nucléophile, la polarité du solvant, mais surtout la nature du groupement partant.

II-6- Synthèse des analogues mannopyranosides

II-6-1-Synthèse du mannoside pentylé

La synthèse débute par l'introduction en position anomère d'un groupement pentyle grâce à une réaction de glycosylation [140].

De la même manière seront introduits en position anomère d'autres groupements ayant une chaine longue tels que l'isopropyle et le para-nitro phényle.

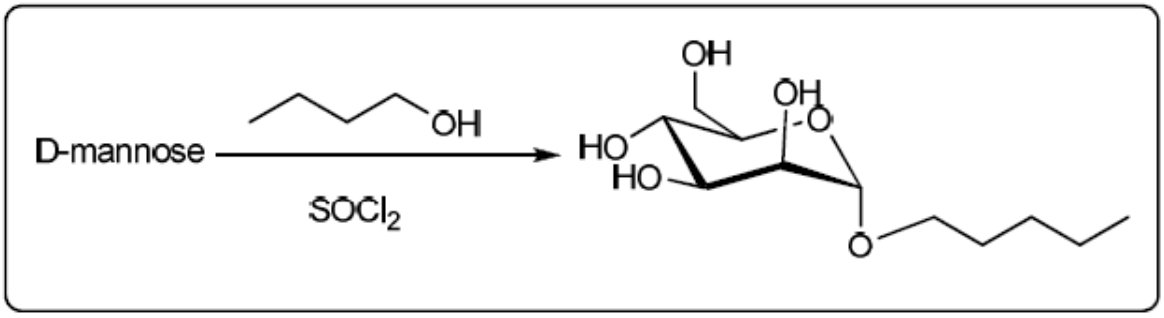


Schéma 3. Synthèse du mannose pentylé.

II-6-2-Synthèse du sulfate cyclique

II-6-2-1-Généralités sur les sulfates cycliques

La synthèse des sulfates cycliques peut être effectuée de deux manières : soit à partir de dérivés sulfatés, soit par oxydation du sulfite cyclique correspondant [141].

II-6-2-2-Synthèse à partir de dérivés de sulfates

La méthode originelle est celle de Baker, qui décrivait la réaction entre le 1,2-dibromoéthane et le sulfate d'argent [142]. Depuis, diverses méthodes ont été mises au point.

1- L'action d'un équivalent d'acide sulfurique sur un époxyde conduit au sulfate cyclique. Dans le cas de la 2,4,6-tri-tertiobutyl-4,5-époxy-6-hydroxy-2-cyclohexénone, le rendement est de 100% (Schéma 4) [143].

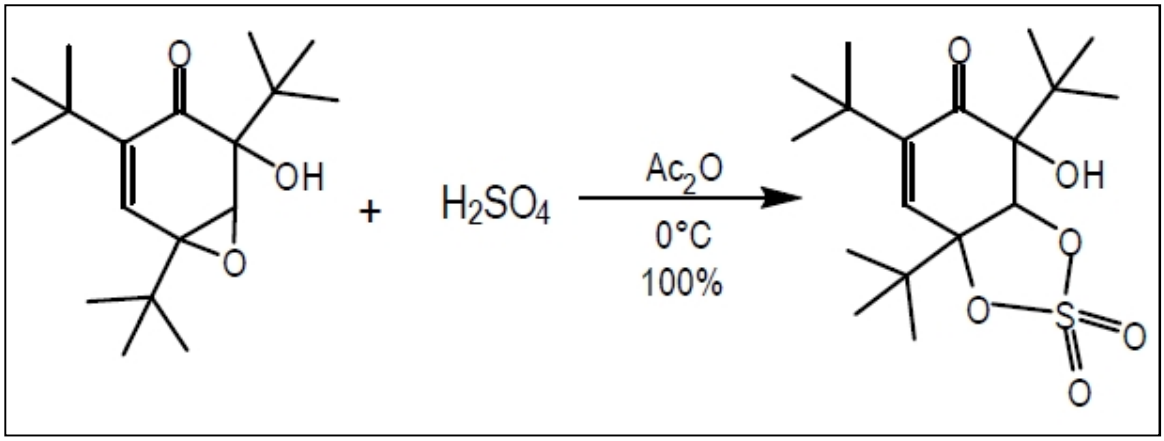


Schéma 4. Synthèse du sulfate cyclique par action de l'acide sulfurique sur un époxyde

2- L'action du chlorure de sulfuryle (SO_2Cl_2) sur un diol à très basse température permet aussi de préparer les sulfates cycliques. Les rendements obtenus sont généralement moyens car ce réactif est en même temps un agent chlorant assez puissant. Sur des diols acycliques, à -90°C et en présence de triéthylamine, des rendements satisfaisants ont pu être obtenus [144]. En revanche, sur des structures rigides comme les sucres, les résultats restent modérés [145].
L'introduction d'un groupement électroattracteur sur un carbone adjacent à l'hydroxyle, fournit néanmoins un moyen d'améliorer les rendements (Schéma 5) [146].

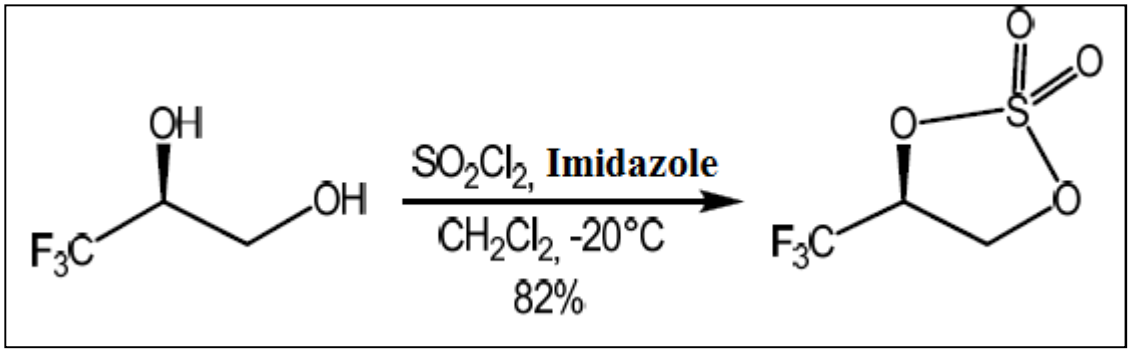


Schéma 5. Synthèse du sulfate cyclique par action du chlorure de sulfuryle.

3- Un autre réactif utilisé pour synthétiser les sulfates cycliques est le chlorosulfate dephényle. Ce dernier permet par exemple, d'obtenir le sulfate cyclique du 4,6-*O*-benzylidène-α-D-glucopyranoside de méthyle avec un rendement de 77% [147] à température

ambiante. En revanche, si la réaction est effectuée à - 25°C, le 2-phényle sulfate intermédiaire est isolé, et l'ajout d'hydrure de sodium est alors nécessaire pour poursuivre la réaction (Schéma 6) [148].

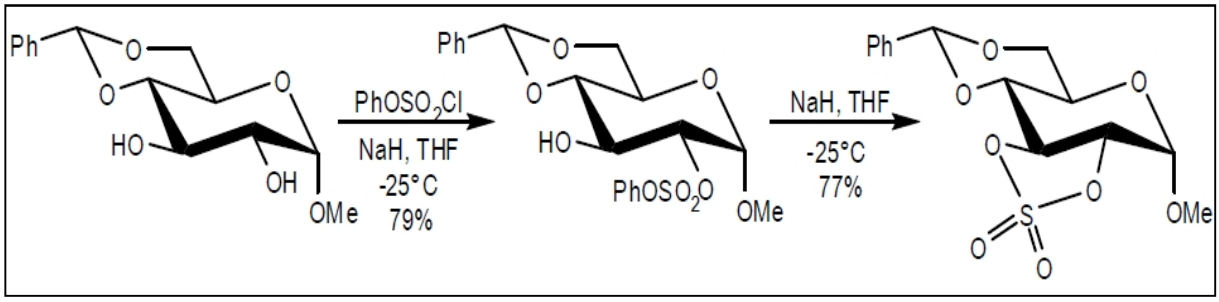


Schéma 6. Synthèse du sulfate cyclique par action du chlorosulfate de phényle.

II-6-2-3-Synthèse du sulfate cyclique par action du chlorosulfate de phényle

Cette méthode est de loin la plus répandue dans la littérature et la plus utilisée pour la synthèse de sulfates cycliques sur des glucides. Le sulfite est généralement synthétisé par action du chlorure de thionyle ($SOCl_2$) sur un diol [149]. Lorsque les substrats présentent une ou des fonction(s) acido-labile(s), une base telle que la triéthylamine, l'imidazole ou la pyridine est utilisée pour activer l'électrophile, puis pour neutraliser l'acide libéré durant la réaction (Schéma 7).

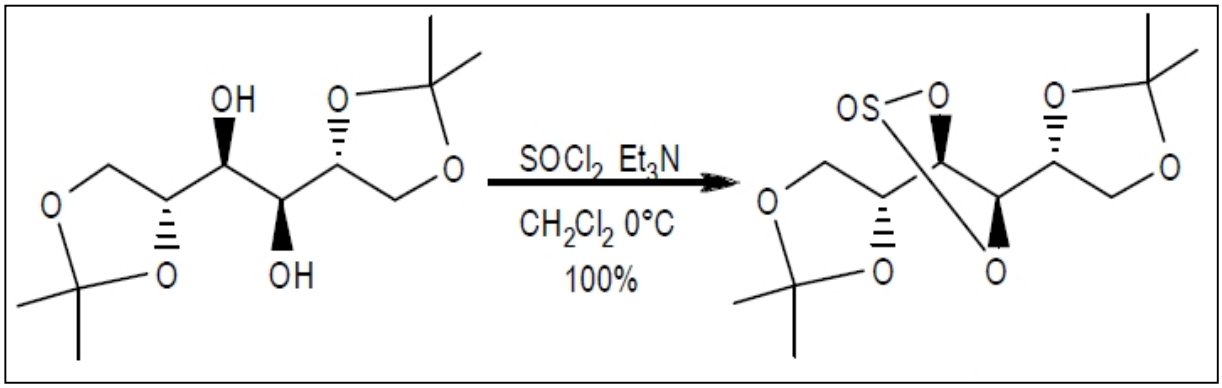


Schéma 7. Synthèse d'un sulfite cyclique

Le sulfite peut ensuite être oxydé de diverses manières :

1- Oxydation avec le permanganate de potassium

Cette réaction est généralement effectuée dans un système biphasique, tel que CH_2Cl_2 / H_2O, pour éviter des réactions secondaires et la décomposition du produit sulfaté [150].

2- Oxydation avec le tétraoxyde de ruthénium

L'oxydation des sulfites cycliques avec le tétraoxyde de ruthénium conduit au sulfate avec de bons rendements [151]. Cependant cette procédure est très onéreuse, et par conséquent, limitée aux petites quantités. Toutefois, la découverte qu'une quantité catalytique de RuO_4 est produite *in situ* par la réaction du trichlorure de ruthénium ou du dioxyde de ruthénium avec le périodate de sodium, a fourni un procédé intéressant pour cette réaction d'oxydation (Schéma 8) [152].

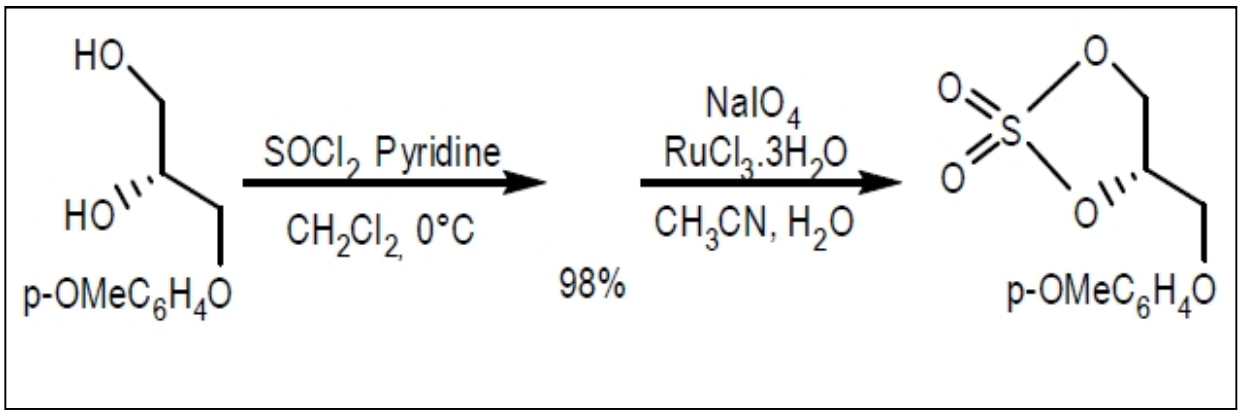


Schéma 8. Préparation d'un sulfate cyclique par oxydation du sulfite correspondant.

La préparation des sulfates cycliques venant d'être décrite, une étude des réactions que peuvent subir ces composés par attaque nucléophile va maintenant être effectuée.

II-6-2-4-Méthode de préparation utilisant le sulfate cyclique

Au cours de travaux antérieurs, la synthèse du mannose-6-phosphonate a été réalisée au laboratoire en utilisant la méthode aux sulfates cycliques (schéma 9) [153].

Le mannopyranoside de méthyle est protégé par un 2,3-*O*-isopropylidène. Cette protection présente deux avantages. D'une part, elle permet d'obtenir en deux étapes « one

pot » le mannose libre en position 4 et 6. D'autre part, elle est clivable en milieu acide, et sera donc éliminée en même temps que le sulfate issu de l'ouverture nucléophile du sulfate cyclique.

L'étape clé de cette réaction est le déplacement nucléophile du sulfate par l'anion lithié du méthyle phosphonate. Finalement, le composé désiré est obtenu en seulement cinq étapes à partir du sucre de départ. En outre, cette série de réactions ne nécessite que des purifications simples et rapides (extractions ou filtrations).

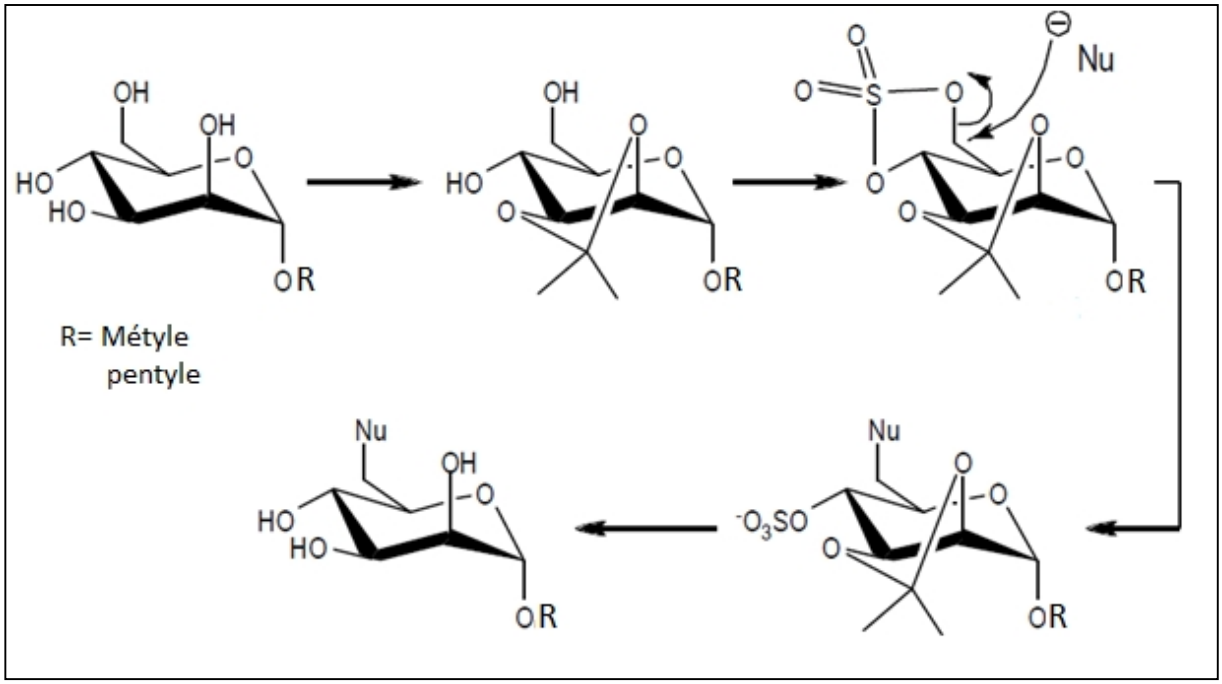


Schéma 9. Voie de préparation par le sulfate cyclique.

II-6-3-Préparation des dérivés du mannose modifiés en position 6

II-6-3-1-Synthèse du sulfate cyclique

Le sulfate cyclique est synthétisé en 4 étapes (Schéma 10). Cependant, les deux premières étapes sont réalisées « one pot », et la préparation du sulfite cyclique, suivie de son oxydation, sont effectuées sans purification intermédiaire.

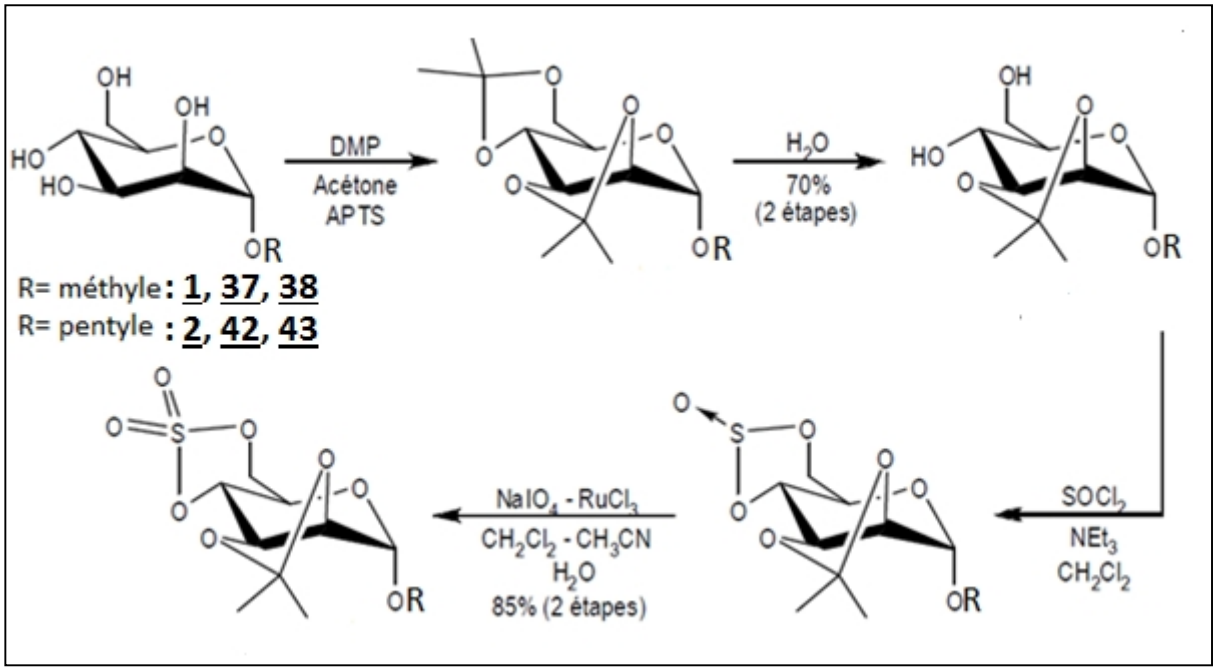


Schéma 10. Synthèse du sulfate cyclique

L'α-D-mannopyranoside de méthyle est préalablement protégé avec deux *O*-isopropylidènes par le 2,2-diméthoxypropane dans l'acétone, en présence d'acide *para*-toluène sulfonique. Puis l'isopropylidène primaire est ouvert sélectivement par ajout d'eau au milieu réactionnel. La procédure utilisée est celle décrite par Evans et Parrish [154], en diminuant toutefois la quantité de chaque réactif.

L'utilisation de 2,2-diméthoxypropane permet d'augmenter la solubilité dans l'acétone du sucre de départ non protégé. Ceci permet à la fois de diminuer le temps de réaction de manière remarquable, et d'améliorer le rendement de la réaction. Notre composé est ainsi obtenu en 2h30 avec un rendement de 70%.

La purification du 2,3-*O*-isopropylidène est effectuée de façon élégante, par simple extraction. En effet, à la fin de la réaction le milieu est neutralisé par ajout d'une solution de $NaHCO_3$, puis concentré. Les composés organiques se trouvent alors tous dans la phase aqueuse. Une première extraction à l'éther de pétrole permet d'éliminer le 2,3:4,6-di-*O*-isopropylidène qui n'a pas réagi. Puis le 2,3-*O*-isopropylidène désiré est extrait avec du CH_2Cl_2.

Dans le cas où il ne reste plus de 2,3:4,6-di-*O*-isopropylidène, la purification peut être effectuée de manière encore plus simple. Le milieu réactionnel est dans ce cas neutralisé avec $NaHCO_3$ solide puis concentré. Une poudre, dans laquelle le produit désiré est en mélange avec du *para*-toluène sulfonate de sodium et de l'α-D-mannopyranoside de méthyle, est obtenue. En reprenant ce mélange par du CH_2Cl_2 en présence de sulfate de sodium les deux impuretés (insolubles dans ce solvant) peuvent être éliminées par simple filtration.

La synthèse du sulfate cyclique *via* le sulfite correspondant a déjà été décrite par Klein et Boom [155]. Le sulfite doit être préparé par addition de pyridine à une solution de 2,3-*O*-isopropylidène et de chlorure de thionyle dans l'acétate d'éthyle. Cependant, le rendement annoncé de 89% n'a pas pu être reproduit. Le 2,3-*O*-isopropylidène a été partiellement clivé pour conduire à la formation du 2,3;4,6- disulfite. Ce disulfite est ensuite oxydé à l'étape suivante, le disulfate est donc obtenu comme produit secondaire.

En revanche, la procédure originale de Kim et Sharpless permet d'obtenir le sulfate cyclique avec un rendement reproductible de 85% [156]. La formation du sulfite est, dans ce cas, effectuée en présence d'un excès de triéthylamine pour éviter la déprotection de l'isopropylidène (acidolabile). La réaction d'oxydation est réalisée sans purification intermédiaire. Après les deux étapes, le sulfate est simplement purifié par filtration sur silice.
Ces réactions sont faciles à mettre en oeuvre et les rendements obtenus sont satisfaisants. Le sulfate cyclique peut être préparé en grande quantité, il est stable et se conserve plusieurs mois à température ambiante.

II-6-3-2-Préparation du dérivé phosphate

Pour limiter le nombre d'étapes de cette synthèse, nous avons fait un essai qui a bien marché. Cet essai consiste à faire réagir le mannopyranoside de méthyle directement sur le $POCl_3$ sans aucune protection des alcools secondaires [157] (Schéma 11).

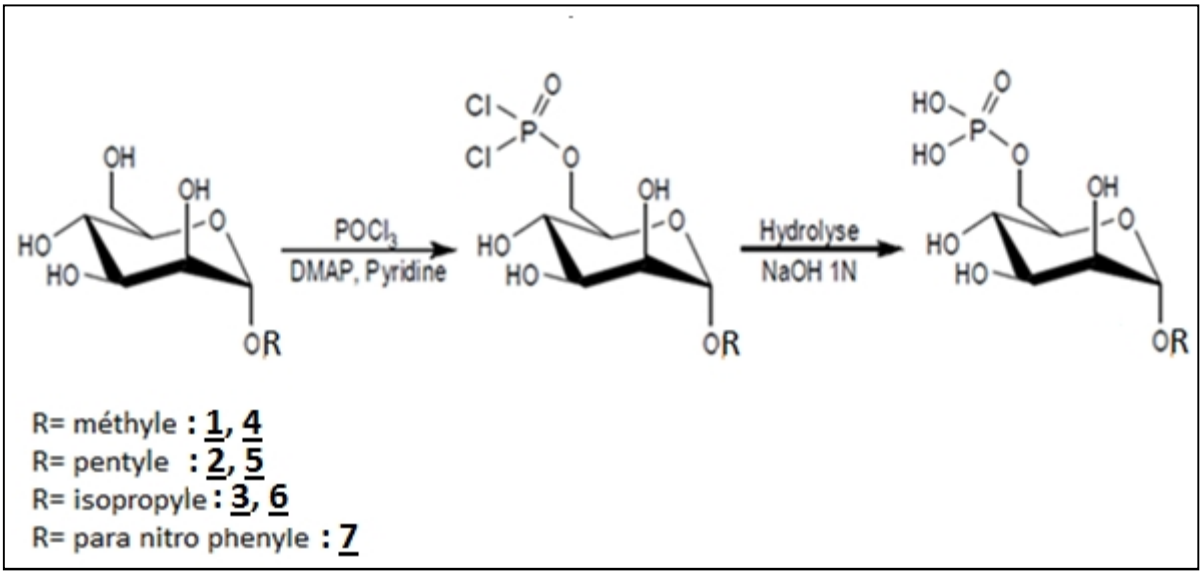


Schéma 11 (voie a). Fonctionnalisation par le groupement phosphate.

Le produit α-D-mannopyranoside de méthyle est mis en solution avec de la DMAP dans de la pyridine fraîchement distillée, puis le $POCl_3$ est ajouté goutte à goutte à 0°C. Le traitement a été très difficile à faire. Après une heure de réaction, le milieu réactionnel est concentré et redissout dans de l'eau pour être extrait 3 fois à l'acétate d'éthyle. Les traces de pyridine et de DMAP passent dans la phase organique. Ensuite, l'ion pyridinium est déprotonné en ajoutant de la soude, cette pyridine récupérée est à son tour éliminée à nouveau par plusieurs extractions à l'acétate d'éthyle.

L'hydrolyse de la liaison P–Cl libère des ions Cl- dans le milieu, ce qui va donner du NaCl après addition de soude. Le NaCl formé reste toujours dans la phase aqueuse avec notre produit désiré. Il était impossible de purifier le phosphate par chromatographie sur gel de silice à cause de sa grande polarité. Le seul moyen de purification était de concentrer la phase aqueuse et de resolubiliser le solide blanc obtenu dans le méthanol. Seul notre phosphate va être soluble avec une très petite quantité du sel, la partie insoluble du sel sera éliminée par simple filtration. Cette opération est répétée plusieurs fois avant d'obtenir le 6-phosphate-α-D-mannopyranoside de méthyle.

Devant la difficulté de purification du produit final nous avons envisagé une autre voie de synthèse qui consiste à utiliser comme agent de phosphorylation le chlorure de diphényl phosphoryle.

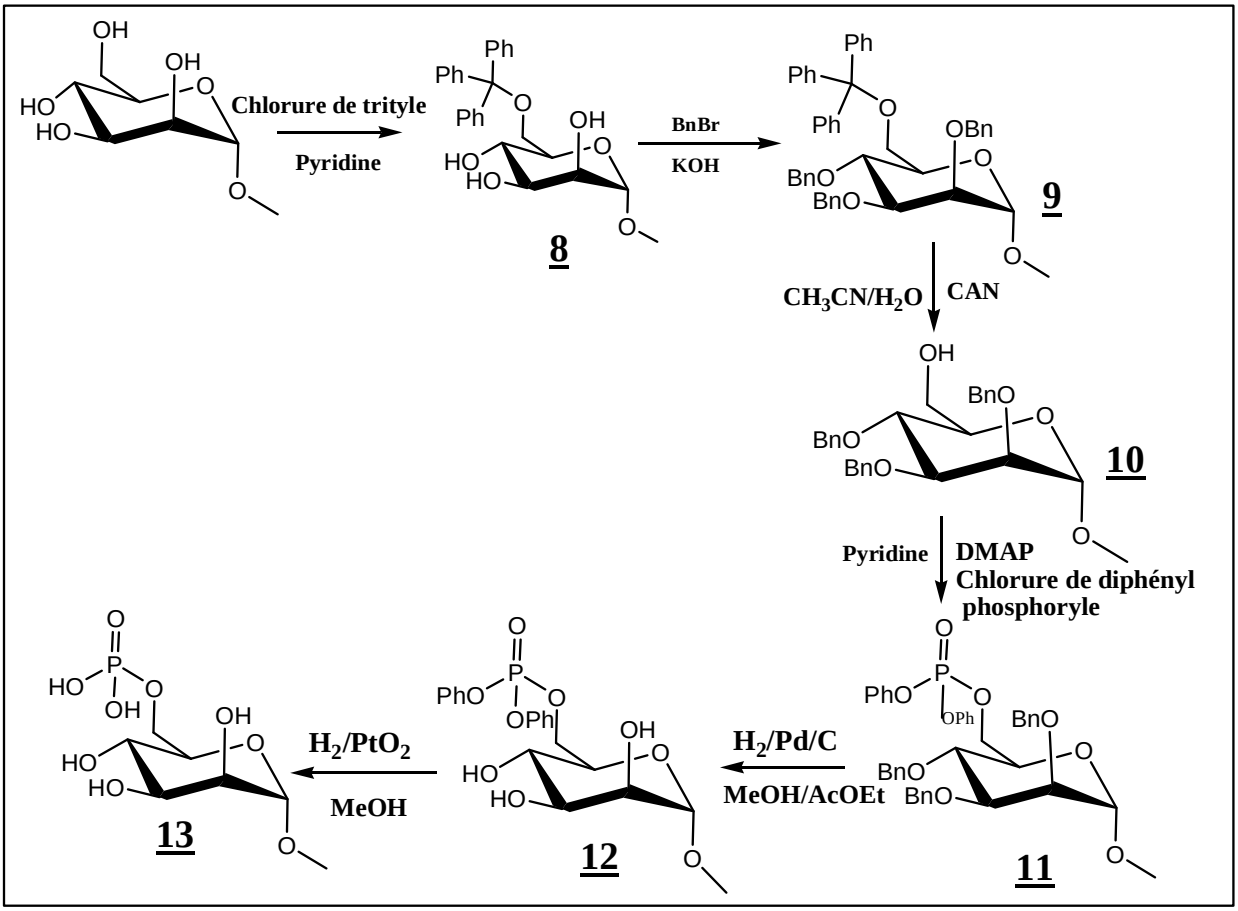


Schéma 11 (voie b). Fonctionnalisation par le groupement phosphate.

II-6-3-3- Préparation du dérivé azido

Comme type de groupement activateur, nous avons choisi les dérivés iodés, puisqu'ils sont de bons groupements partants et qu'ils peuvent être obtenus directement à partir de l'α-D-mannopyranoside de méthyle par une réaction d'iodation sélective réalisée habituellement avec la triphénylphosphine en présence d'une source d'halogène [158]. Nous avons choisi comme système d'halogénation I_2, PPh_3, imidazole. Le dérivé iodé est obtenu comme produit unique de réaction, et après élimination de l'oxyde de triphénylphosphine par chromatographie sur colonne de silice, il peut être recristallisé dans l'éther.

Le mécanisme de cette réaction implique l'attaque de l'anion iodure, nucléophile, formé au cours de la réaction, sur l'alcool activé comme sel d'oxyphosphonium.

À partir de l'intermédiaire commun, nous avons synthétisé le dérivé azido avec un très bon rendement en utilisant l'azoture de sodium et le DMF comme solvant (schéma 12). L'avantage apporté par cette voie de synthèse est sa rapidité, l'azido étant synthétisé en seulement deux étapes à partir de l'α-D mannopyranoside de méthyle et est obtenu avec un bon rendement.

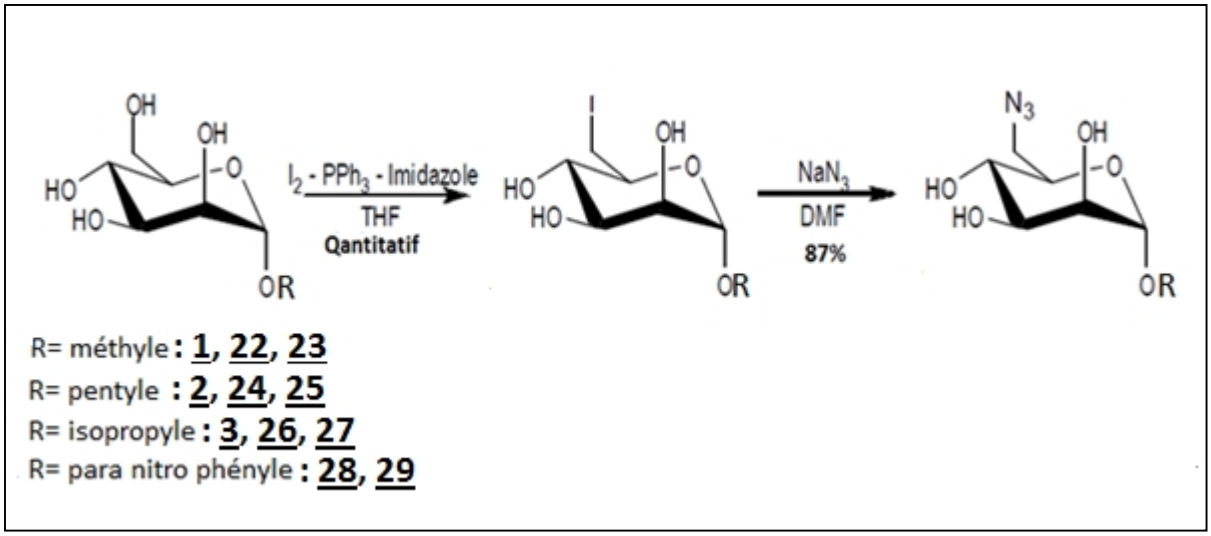


Schéma 12. Synthèse du dérivé azido.

II-6-3-4- Autre méthode pour la préparation du dérivé azido

a- Mise au point de la Mécanochimie

L' α-D-mannopyranoside de méthyle est introduit dans un broyeur à billes avec du diode, de la triphényl phosphine et de l'imidazole [159].

L'ensemble est ensuite mis sous agitation. Une fois le composé iodé formé, la même stratégie sera appliquée pour la fonctionnalisation en $-N_3$.

Les premiers essais réalisés à température ambiante ont montré que la réaction sans solvant était possible mais les rendements restaient faibles par rapport à la même synthèse effectuée dans le THF. Mais une augmentation de la température de réaction jusqu'à 80°C a

conduit à une nette augmentation des rendements. De plus, seulement 20 minutes sont nécessaires à la réaction.

D'autres manipulations à des températures plus ou moins hautes ainsi que des modifications dans les équivalents des réactifs ont été testées mais sans aucune amélioration. Ce procédé original a l'avantage de ne pas utiliser beaucoup de solvants puisque les rendements toujours élevés permettent d'éviter ou d'accélérer la purification par chromatographie.

L'étape suivante qui consistait à introduire la fonction $–N_3$ sur le sucre a été réalisée de la même manière. Les meilleurs résultats ont été également obtenus pour un chauffage à 80°C en une durée de 20 minutes d'agitation.

II-6-3-5- Préparation du dérivé phosphonate

Une méthode de synthèse a déjà été mise au point au laboratoire pour former un dérivé du M6P en remplaçant le groupement phosphate en C_6 par un phosphonate (Khanjin 2002) [160] à partir d'un sulfate cyclique. Nous avons donc procédé de la même manière, le sulfate cyclique pentyle en position anomère réagit sur l'anion lithié du diisopropyle méthyle phosphate en présence de HMPT dans le THF (Schéma 13).
Afin de faciliter la déprotection du phosphonate, deux clivages successifs sont nécessaires : l'isopropylidène et le sulfate avec des résines acides dans un mélange THF/MeOH et les esters isopropyliques en présence de TMSBr et de pyridine.

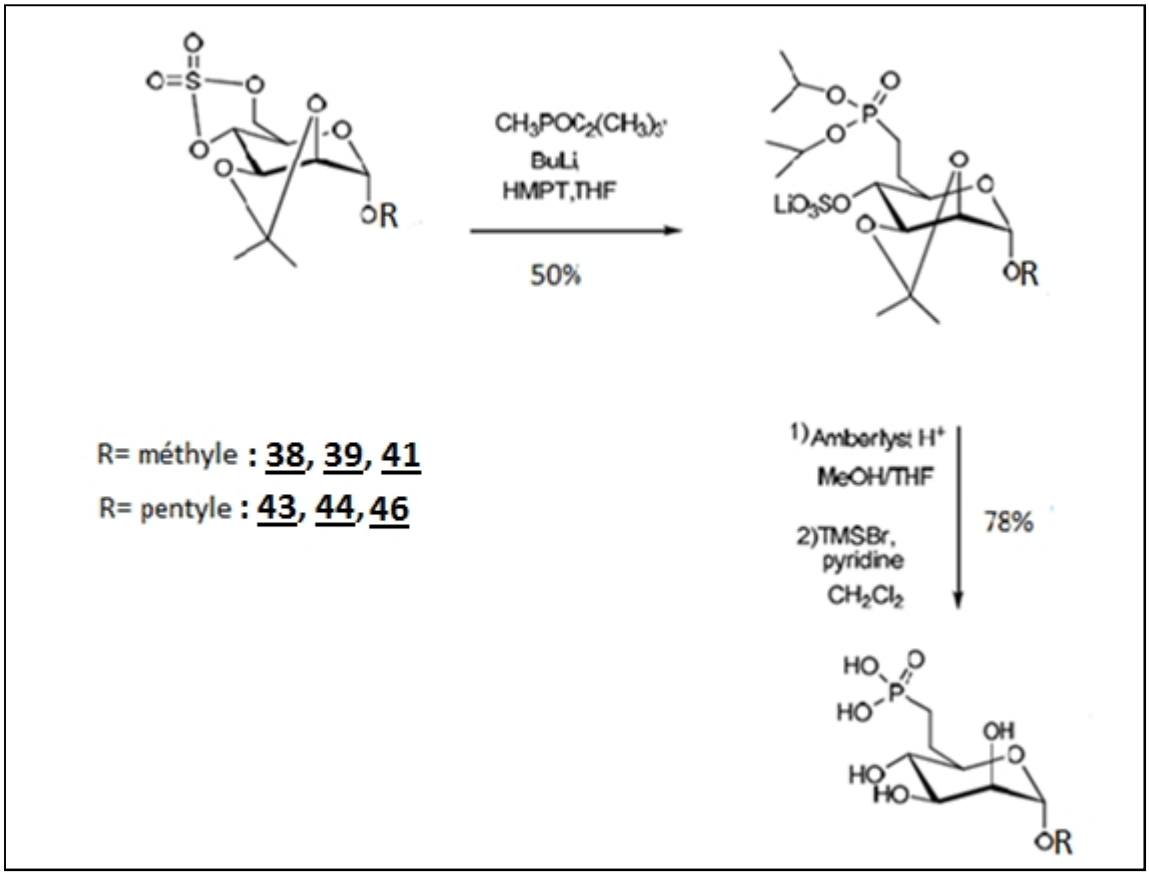


Schéma 13. Préparation du dérivé du M6P phosphonate.

II-6-3-6- Synthèse de l'analogue du M6P fonctionnalisé en position 6 par un acide boronique

Le premier acide boronique a été isolé et caractérisé par Frankland en 1860 [161]. Ces dérivés ont, depuis, fait l'objet de nombreuses études et publications [162].

Par définition, les acides boroniques sont composés d'un atome de bore possédant deux groupements hydroxyles et un fragment organique, qui peut être de toute nature : aryle, hétéroaryle, vinyle, alkyle…Cet atome de bore n'étant entouré que de six électrons, il est hybridé SP_2 et possède une orbitale vacante P. Cette orbitale est perpendiculaire au plan formé par les trois substituants de l'atome de bore, qui adoptent une géométrie plane trigonale. Les acides boroniques sont donc plutôt des acides au sens de Lewis, bien que cette acidité soit

affaiblie par l'interaction entre l'orbitale vacante du bore et les paires d'électrons libres des atomes d'oxygène adjacents [163].

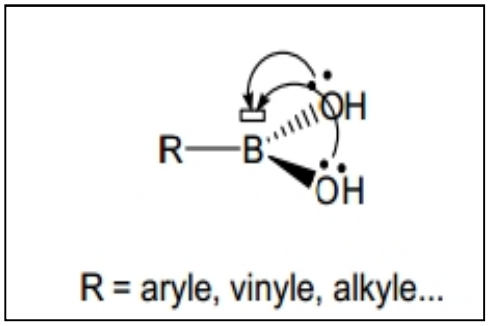


Figure 17. Structure électronique d'un acide boronique.

La plupart des acides boroniques sont des solides cristallins plus ou moins hygroscopiques et peu toxiques. Ils peuvent cependant se déshydrater assez facilement pour former des anhydrides cycliques à six chaînons, appelés boroxines. Ces derniers sont particulièrement stables de par leur caractère partiellement aromatique.

II-6-3-6-1-Synthèse des acides boroniques

L'importance croissante des acides boroniques a permis le développement de nouvelles méthodes de synthèse efficaces donnant accès à une large gamme de composés pour la plupart disponibles commercialement. Toutes ces méthodes sont valables également pour la synthèse des dérivés d'acides boroniques. Les principales voies sont les suivantes :

- Piégeage électrophile de dérivés organométalliques

Cette méthode est probablement la plus utilisée, car elle est plutôt bon marché et permet de synthétiser aussi bien des dérivés aryles que hétéroaryles, vinyles, alcynes ou alkyles. Généralement, un dérivé organomagnésien ou organolithien est piégé par un borate à basse température, puis le milieu est hydrolysé. L'espèce organométallique peut être obtenue par échange métal-halogène, [164] ou par métallation en présence d'un groupement ortho-directeur (amines, éthers, esters, amides…) dans le cas des dérivés aryles [165,166].

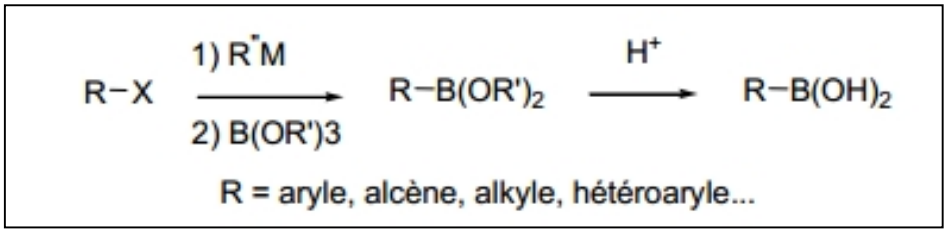


Schéma 14. Synthèse d'acides boroniques par piégeage électrophile d'un intermédiaire organométallique obtenu par échange métal-halogène.

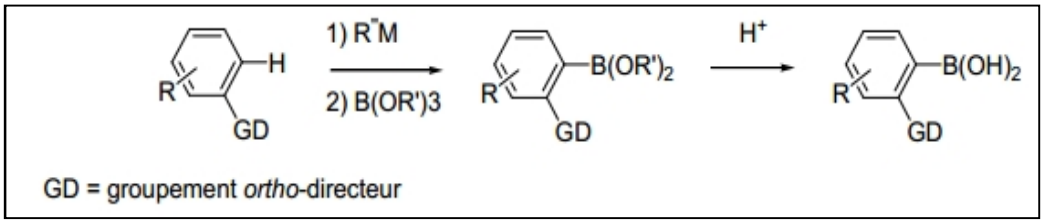


Schéma 15. Synthèse d'acides boroniques par piégeage électrophile d'un intermédiaire organométallique obtenu par ortho-lithiation.

Quant au borate, le triisopropyle borate sera préféré au triméthyle borate, car il est moins coûteux, évite la formation de sous produits comme les acides boriniques ou les boranes [167], et permet dans certains cas de faire une réaction « one-pot » où le triisopropyle borate est présent avant l'addition de butyle lithium [168]. La présence d'un groupement avec des hydrogènes acides est possible, mais nécessite soit leur protection, soit l'utilisation d'un excès de réactif organométallique [169].

II-6-3-6-2- Stratégie de synthèse

Une analyse rétrosynthétique nous a permis d'établir une voie de synthèse possible à partir du mannose pentylé. Après un jeu de protections/déprotections, l'hydrolyse en position 6 libre pourra être oxydée en dérivé aldéhydique afin de subir une réaction d'homologation.

Enfin une réaction d'hydroboration devrait conduire au dérivé acide boronique désiré.

a- Jeu de protections / déprotections

Parmi les méthodes de protection de l'hydroxyle en position 6 d'un sucre, nous avons opté pour un groupement volumineux, un chlorure de trityle, protection sélective des hydroxyles primaires avec de bon rendement (figure16).

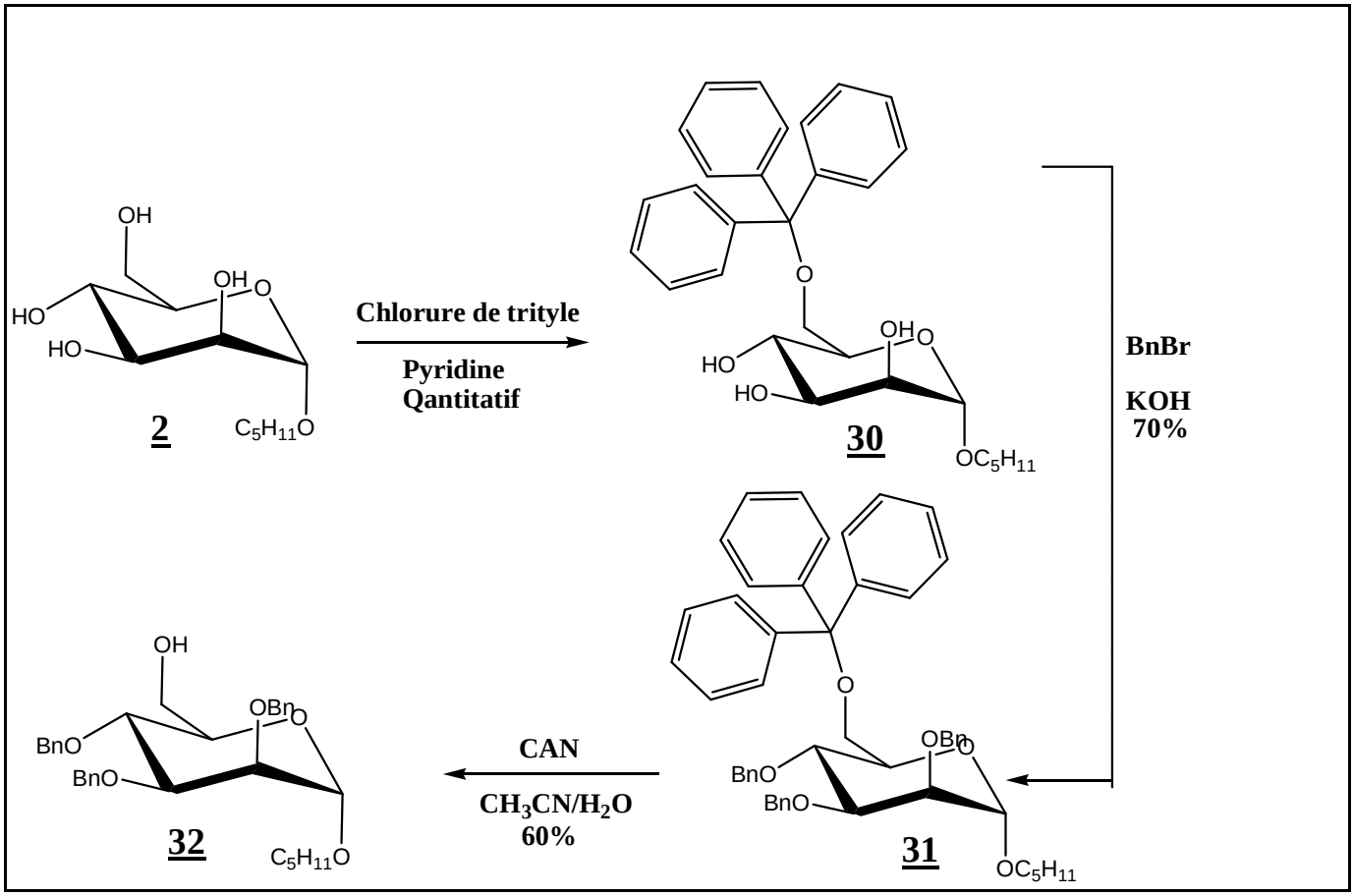


Schéma16. Jeu de protections et déprotections pour obtenir l'hydroxyle en C_6 libre.

Le choix de protection des hydroxyles 2,3 et 4 par des groupements benzyles a permis d'éviter toute formation de produit secondaire [170]. En effet lors de l'utilisation de groupements acétates ou benzyloxycarbonyles [171], un second produit issu de la migration de la protection en C_4 sur l'hydroxyle libre en C_6 a été observé après une longue purification sur gel de silice.

De plus, la protection par des benzyles est compatible avec chacune des synthèses qui suivent.

La troisième étape de la stratégie a consisté en la déprotection sélective de la position 6 par l'action du nitrate d'ammonium cérique dans un mélange acétonitrile/eau avec un très bon rendement.

b- Oxydation de la position 6 et homologation

Nous avons oxydé l'alcool selon la méthode de Swern [172], seul l'aldéhyde attendu a été obtenu avec un rendement quantitatif (Schéma17).

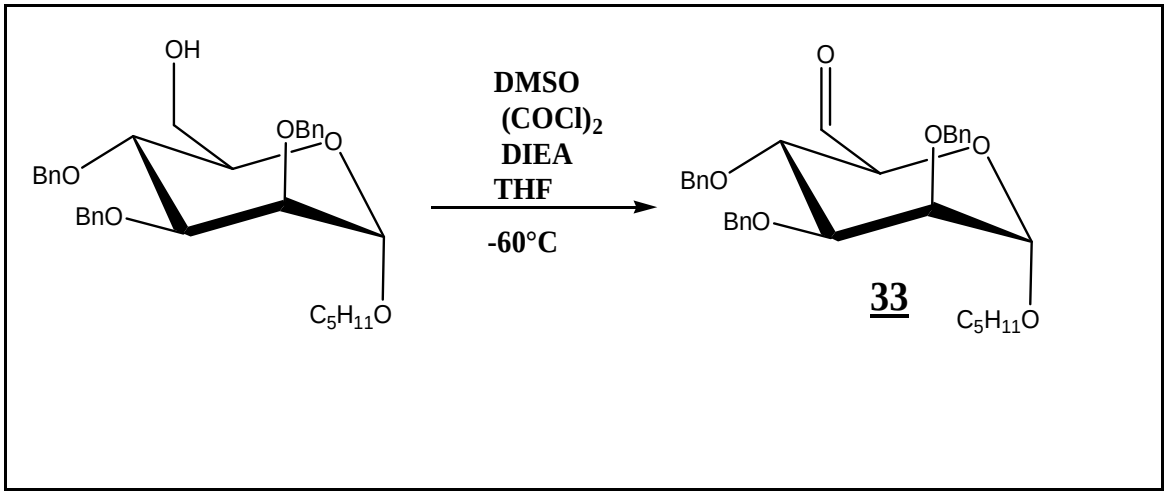


Schéma 17. Oxydation de la position 6.

Le passage d'un aldéhyde à un alcène repose sur l'utilisation d'une réaction de Wittig [173] en présence de bromure de triméthyle phosphonium et de de butyllithium dans le THF (Schéma18).

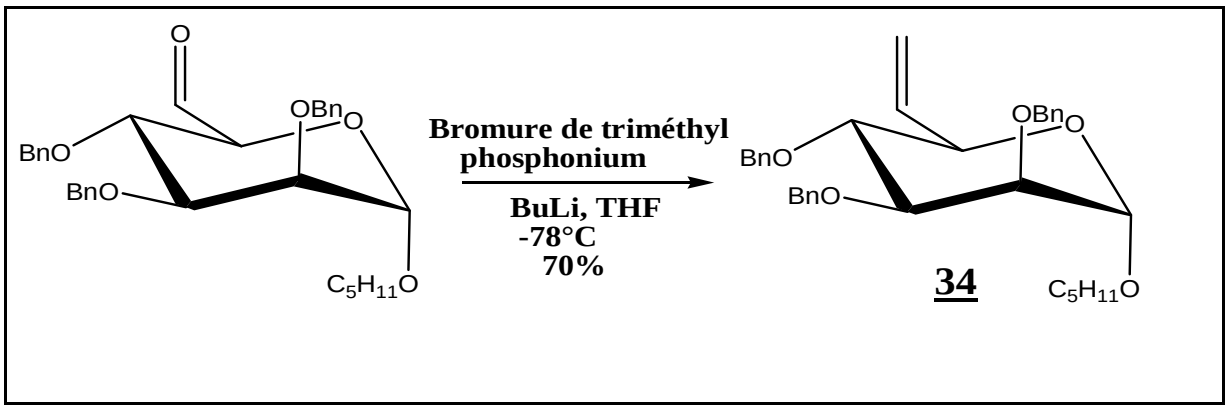


Schéma 18. Réaction de Wittig sur le composé aldéhydique.

Ce dernier composé est donc mis en réaction avec du tribromure de bore et du tri éthylsilane dans du pentane puis hydrolysé en milieu basique.

Les groupements benzyles sont ensuite déprotégés par hydrogénolyse dans un mélange THF/MeOH.

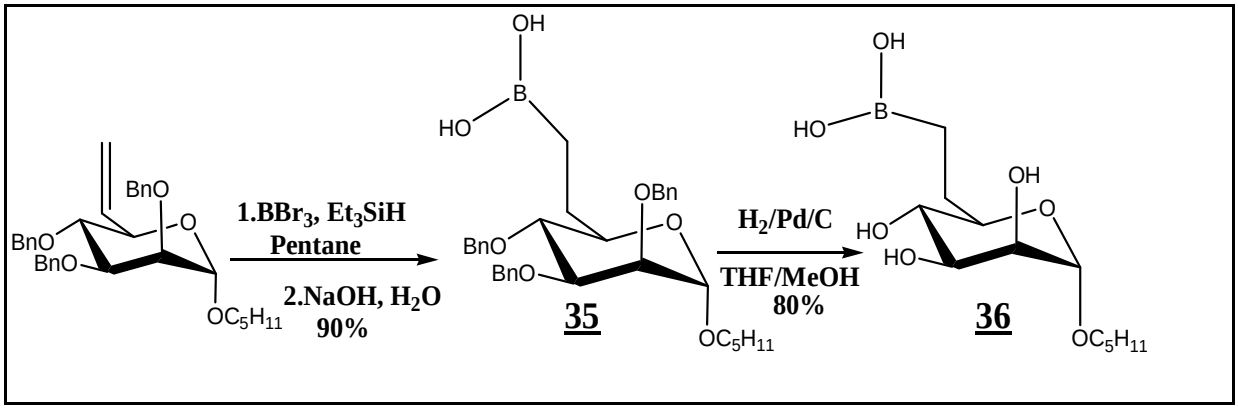


Schéma 19. Introduction de l'acide boronique.

II-6-3-6-3- Inconvénients des acides boroniques

Bien que les acides boroniques soient très utilisés, d'autres dérivés ont été développés afin de pallier certains inconvénients de ces composés. En effet, ces acides se déshydratent facilement en présence d'un desséchant ou sous vide pour donner les boroxines. Dans ce cas, il est très difficile d'obtenir des produits purs, et de les caractériser. De plus, la présence de boroxines modifie la stœchiométrie des réactifs, ce qui peut être gênant.

Certains acides boroniques sont très instables à cause de l'orbitale vacante du bore qui peut être attaquée par l'eau ou l'oxygène, provoquant alors la décomposition du composé. Divers composés, dont certains pyridyles [174], n'ont pu être isolés sous leur forme acide boronique, car ils se décomposent très rapidement.

Enfin, les acides boroniques, et notamment les plus petits, sont très solubles dans l'eau, ce qui peut grandement diminuer le rendement de réaction. Les esters boroniques, les dioxazaborocanes et plus récemment les trifluoroborates de potassium, entre autres, ont donc été mis au point et ont fait l'objet de très nombreuses études.

II-7- Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les différentes méthodes de préparation de différents alkylmannosides-6-phosphate et d'analogues bioisostères, en remplaçant le phosphate par des groupements bioisostères et en modifiant la position anomère avec divers groupements alkyles. L'ensemble de ces modifications devrait induire un gain d'efficacité et une meilleure biodisponibilité. En effet, ces analogues du M6P ne sont pas sensibles aux phosphatases contrairement au M6P naturel. De même, la modulation de la position anomère par des groupements alkyles devrait améliorer le temps de demi-vie de nos composés.

Des tests sur CAM permettront de vérifier l'effet sur l'angiogenèse de nos composés et ces travaux font l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE III

EVALUATION

BIOLOGIQUE

III-Evaluation de l'activité biologique

L'effet des différentes molécules sur l'angiogenèse peut être déterminé :

- *in vitro* : par observation de la prolifération et de la migration de cellules endothéliales en culture.
- *ex vivo* : sur des microcultures des fragments de vaisseaux sanguins dans des gels de fibrine ou sur des explants d'aorte de rat.
- *in vivo* :
  - ✓ Par implantation d'une solution contenant la molécule à tester dans le stroma de la cornée de différents animaux, suivie par la quantification de la réponse angiogénique après néovascularisation de cette cornée, physiologiquement avasculaire.
  - ✓ Évaluation de l'angiogenèse tumorale.
  - ✓ Évaluation de la croissance des vaisseaux sanguins dans la membrane chorioallantoidienne de l'embryon de poulet selon le «CAM assay», etc...

III-1-Activité anti-angiogenèse

Pour déterminer l'effet pro ou anti angiogénique de nos dérivés, un test a été utilisé:

Test ex ovo, qui consiste à évaluer la croissance des vaisseaux sanguins dans la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet selon le «Test de CAM ».

III-2-Test *ex ovo* sur CAM

Ce test est basé sur l'évaluation des mécanismes d'action des molécules naturelles et synthétiques en observant leur aptitude à inhiber la vascularisation sur la membrane chorioallantoidienne des œufs fécondés. Schlatter et al. (1997) [175] ont montré que l'angiogenèse de la CAM des œufs fécondés passe par trois phases différentes: Une phase initiale qui correspond à la période allant du 5ème au 7ème jour embryonnaire, où le mécanisme principal de l'angiogenèse est le bourgeonnement. Une phase intermédiaire qui correspond à la période allant du 8ème au 12ème jour embryonnaire où le bourgeonnement est progressivement remplacé par l'intussusception qui culmine au onzième jour embryonnaire.

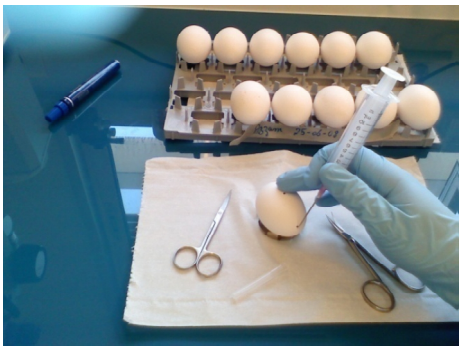
Dans la dernière phase, l'expansion des vaisseaux de la CAM est très faible. La croissance des colonnes «pillars» à l'intérieur des vaisseaux est seulement remplacée par la formation des connexions entre différents capillaires.

III-3-Description de la méthode

L'étude biologique a été réalisée dans le laboratoire de la faculté de pharmacie, en collaboration avec Le professeur JEAN-PIERRE MOLES. Les tests de la CAM ont été effectués selon la procédure, légèrement modifiée, décrite par Ribatti et al. [176]. La chronologie des essais sur CAM se déroule de la manière suivante.

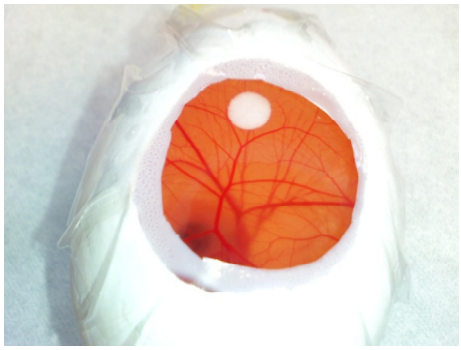
III-3-1-<u>Première intervention</u> *:*

Au premier jour, tous les instruments sont stérilisés avec de l'éthanol à 70% avant utilisation. Ensuite, tous les œufs blancs fécondés de race Leghorn blanc sont également stérilisés avec de l'éthanol à 70% suivi d'une incubation à 37°C avec 60% d'humidité dans un incubateur d'œufs.



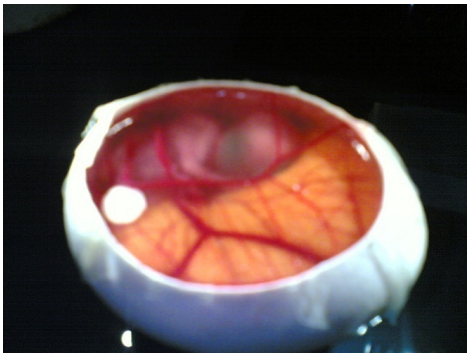
III-3-2-<u>Deuxième intervention</u> :

Au 3ème jour embryonnaire, les coquilles des œufs ont été percées aux pôles les plus pointus à l'aide d'une aiguille et 5ml d'albumine ont été prélevés délicatement pour ne pas toucher le jaune. Le prélèvement provoque la formation d'un sac d'air artificiel qui provoque le décrochage de la CAM de la coquille de l'œuf. Une fenêtre d'environ 1cm de diamètre a été ensuite découpée dans la coquille et recouverte de cellophane stérile. Les œufs sont ensuite replacés dans l'incubateur et laisser incuber pendant 5 jours.



III-3-3-<u>Troisième intervention</u> *:*

Au 8ème jour embryonnaire, les fenêtres ont été réouvertes sous conditions stériles et des disques de papier Whatman imbibés de produit à tester (20 µl d solution à 60mg/mL dans le PBS), ont été déposés directement sur la CAM. Les fenêtres ont été refermées avec de cellophane et les œufs ont été reincubés.



III-3-4-<u>Quatrième intervention</u> :

Après 4 jours d'incubation à 37°C et 60% d'humidité, une grande ouverture a été réalisée sur la coque des œufs (12ème jour embryonnaire) traités ou non par nos produits. Le disque et la CAM associés ont été excisés avec une grande précision, récupérés et immédiatement fixés par le paraformaldéhyde 4%. Une observation au microscope a été alors effectuée pour évaluer la vascularisation par rapport à un contrôle de vascularisation normale (PBS). La surface des vaisseaux a été évaluée par le traitement et l'analyse d'images par le logiciel de quantification Fiji (logiciel de traitement et analyse d'images scientifique utilisé en imagerie biomédicale).

III-4-Résultats et discussion

Certains composés synthétisés au cours cette étude ont été évalués sur la CAM selon la méthode de Ribatti [176].

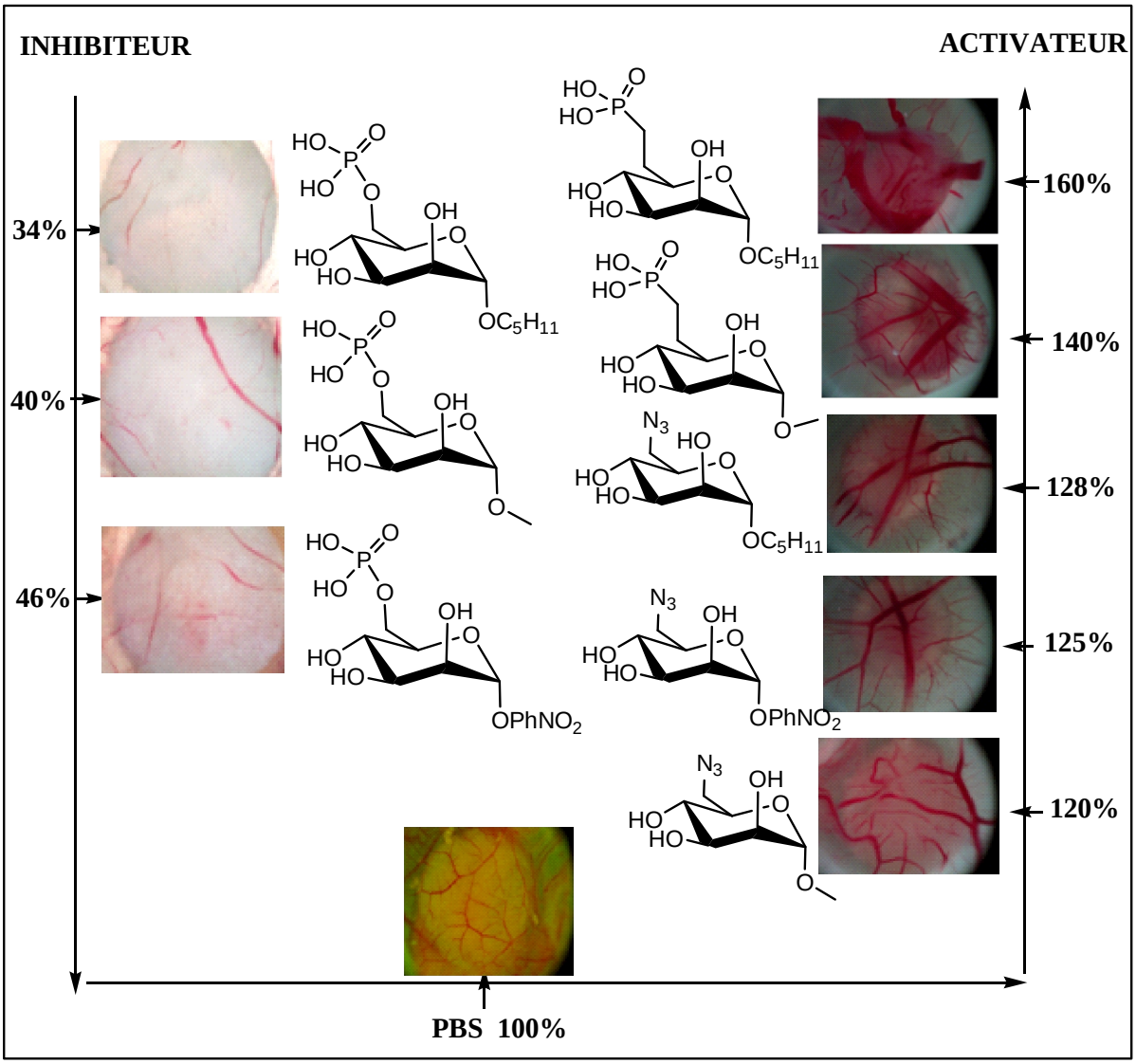
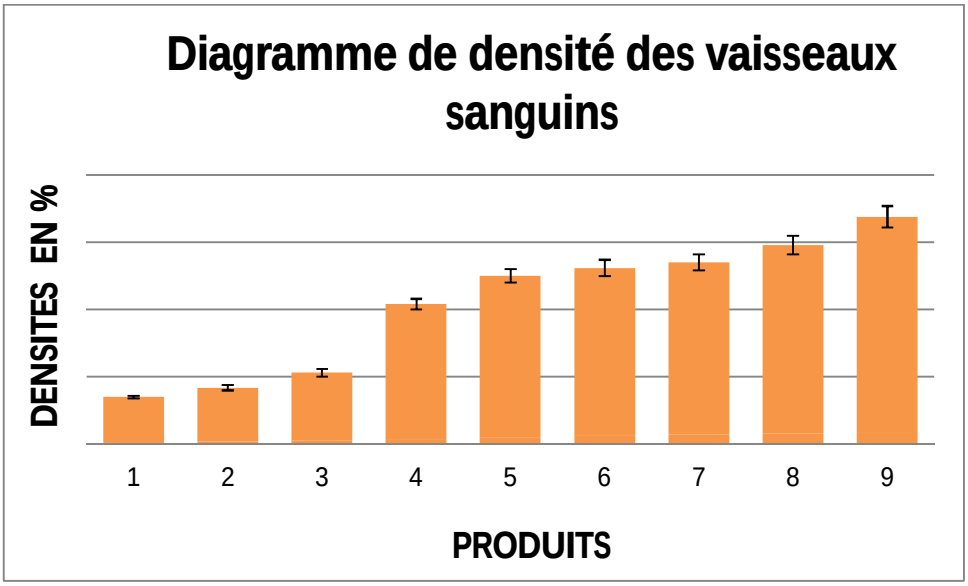


Figure 18. Résultats des tests sur la CAM.



1- Phosphate pentyle, 2- phosphate méthyle, 3- phosphate para-nitro phényle
4- PBS, 5- azido méthyle, 6- azido para-nitro phényle, 7- azido pentyle
8- phosphonate méthyle, 9- phosphonate pentyle.

Figure 19. Diagramme de densité des vaisseaux sanguins des produits

III-4-1-Discussion des résultats

La densité de vaisseaux représente le pourcentage de la zone en cours d'analyse recouvert de nouveaux vaisseaux sanguins. Les petites valeurs de densité indiquent un plus grand degré d'inhibition de l'angiogenèse.

D'après les résultats obtenus à partir du test de CAM, le mannose -6-phosphate et l'ensemble de ses dérivés sont des effecteurs de l'angiogenèse.

Le mannose-6- phophate, ayant en position anomère un groupement pentyle, méthyle et para nitro phényle ont une activité inhibitrice de l'ordre de 34% ; 40% et 46% respectivement. Ce qui confirme nos suppositions ; les modifications au niveau de la position anomère ne change pas l'interaction entre le récepteur RM6-P/IGFII et son substrat, donc ne modifie pas l'activité biologique.

Les dérivés phosphonates ont montré une forte activation avec des pourcentages de 140% pour le phosphonate méthylé et 160% pour le phosphonate pentylé.

Les dérivés azido ayant de différentes chaines en position anomère ont montré un effet activateur mais plus faible que les dérivés phosphonates.

Les pourcentages d'activation sont de l'ordre de 120% pour l'azido méthyle, 125% pour l'azido para nitro phényle et 128% pour l'azido pentyle.

Cela s'explique probablement par la structure trop éloignée de celle du M-6-P et l'absence de charges négatives sur la position 6 qui font qu'elle n'est pas reconnue par le récepteur du M-6-P ou par une autre protéine.

III-5-Conclusion

Les résultats obtenus par le test sur la CAM montrent que tous les composés testés sont bien des effecteurs de l'angiogenèse. L'activité angiogéniques de nos composés a été confirmée.

L'introduction en position anomère de chaines plus longues n'a pas modifié la fonction biologique de nos composés. Les valeurs d'inhibition sont comparable à celles du méthyle phosphate.

A partir de là, on peut conclure que la modification au niveau de la position anomère ne change pas l'interaction entre le récepteur RM6-P/IGFII et son substrat, donc ne modifie pas l'activité biologique.

D'autres dérivés sont aussi effecteurs d'angiogenèse, on retrouve les composés phosphonates et les composés azido qui sont activateurs et à différents pourcentages d'activation.

Cela s'explique probablement par la structure trop éloignée de celle du M-6-P et l'absence de charges négatives sur la position 6 qui font qu'elle n'est pas reconnue par le récepteur du M-6-P ou par une autre protéine.

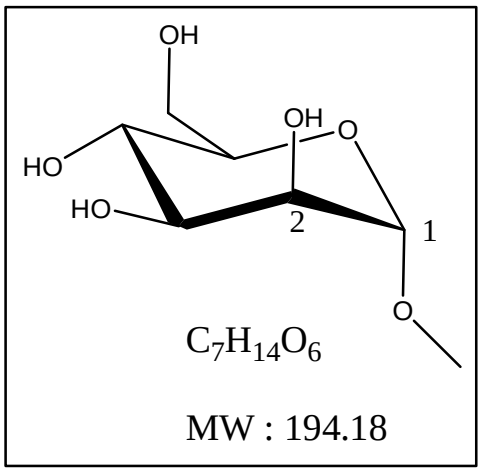
Ces résultats préliminaires suggèrent que le M-6-P a un effet anti-angiogénique alors que la modification de la fonction en position 6 du mannose aboutit à une modulation de cette activité.

Tous ces résultats, nous ont permis de rajouter aux dérivés déjà étudiés une nouvelle liste de composés effecteurs de l'angiogenèse.

CHAPITRE IV

PARTIE EXPERIMENTALE

α-D-mannopyranoside de méthyle (1)



Mode opératoire

10g de D-mannose (55,6mmol, 1éq) sont introduits dans un bicol de 250ml puis dissous par 15,9ml de MeOH anhydre (392,5mmol, 7,06éq). Le milieu réactionnel est porté à 0°C puis 4,06ml de $SOCl_2$ (55,6mmol, 1éq) sont ajoutés via une ampoule de coulée.

Le lendemain le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite sur rotavapeur.

La réaction est suivie par CCM (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v).

R_F = 0,60

Rendement quantitatif

Aspect physique : cristaux blancs

Analyse chimique

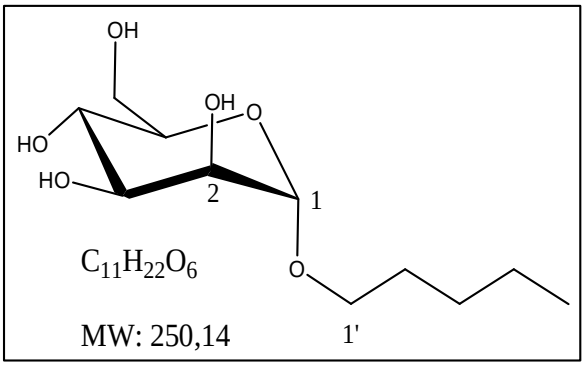
SM (ESI^+/MeOH) m/z : 217,27 $[M+Na]^+$; 411,53 $[2M+Na]^+$; 605,53 $[3M+Na]^+$

SM (ESI^-/MeOH) m/z : 229,21$[M+Cl]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm) : 0,88 (s, 1H,OH); 2,50(m,1H,H_3); 3,32-3,39 (m, 2H,H_4,H_5); 3,45 (s,3H,OCH3); 3,65(m,1H,H_{6b}); 3,68-3,76(m, 3H,H_2,H_{6a}); 4,80 (s, 1H,H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm) : 55,8(C,OCH3); 62,3(C,C6); 70,47(C,C4); 72,7(C,C2); 74,80(C,C3); 76,6 (C,C5); 103, 3(C,C1).

α-D-mannopyranoside de pentyle (2)



Mode opératoire

10g de D-mannose (1éq ; 55,51mmol) sont dissous dans 30mL de pentanol (5éq ; 277,55mmol) avant d'ajouter 4.45mL de chlorure d'acétyle (1,1éq, 61,06 mmol). La réaction est exothermique. Un suivi par CCM (CH_2Cl_2 /MeOH, 8/2, v/v) indique qu'il ne reste plus de produit de départ.

Le brut réactionnel est concentré sous pression réduite (en chauffant à 60°C) et purifié par chromatographie sur gel de silice pour donner une huile légèrement claire.

Rf= 0,56

Rendement : quantitatif

Aspect : huile jaune claire transparente

Analyse chimique

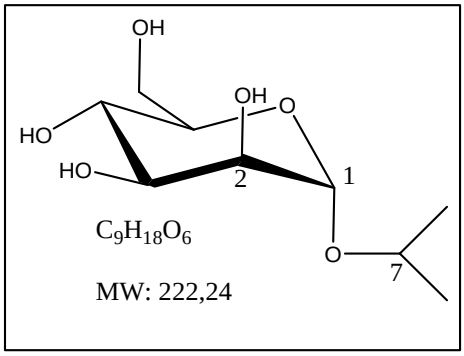
SM (ESI^+/MeOH) m/z: 273,03 $[M+Na]^+$; 523,23 $[2M+Na]^+$

SM (ESI^-/MeOH) m/z: 285,23 $[M+Cl]^-$; 249,23 $[M-H]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ(ppm) : 0,93 (m, $3H_{5'}$); 1,38 (m, $H_{4'}$, $H_{3'}$); 1,60(m, 2H, $H_{2'}$); 3,45 - 3,37 (m, 1H, $H_{1'b}$); 3,57, 3,51 (m, 1H, H_3); 3,63 (m, 1H, H_{6b}); 3,76 - 3,68 (m, 3H, H_5, H_{6a} et $H_{1'a}$); 3,86 - 3,79 (m, 2H, H_2 et H_4); 4,75 (s, 1H, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 14,52 (C, C5'); 23,68 (C, C4'); 29,71 (C, C3'); 30,43(C, C2'); 63,00 (C, C6); 69,04 - 68,49 (2C, C4 et C1'); 72,41 (C, C2); 73,22-72,83 (C, C3); 74,97 - 74,71 (C, C5); 101,64 (C, C1).

α-D-mannopyranoside d'isopropyle (3)



Mode opératoire

10g de D-mannose (55,6mmol, 1éq) sont introduits dans un bicol de 250ml puis dissous par 30ml de 2-propanol (391,90mmol, 7,06éq). Le milieu réactionnel est porté à 0°C puis 4,45ml de $SOCl_2$ (61,061mmol, 1,1éq) sont ajoutés via une ampoule de coulée.

Le lendemain le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite sur rotavapeur.

La réaction est suivie par CCM (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v).

La purification se fait par chromatographie sur gel se silice avec un éluant (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v) puis (CH_2Cl_2/MeOH 8/2 v/v).

Rf= 0,45

Rendement : 75%

Aspect : huile incolore

Analyse chimique

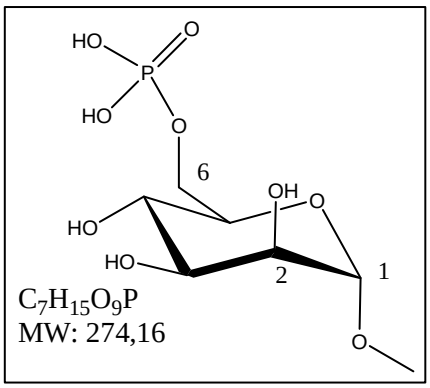
SM (ESI$^+$/MeOH) m/z: 245,38 $[M+Na]^+$; 467,31 $[2M+Na]^+$

SM (ESI$^-$/MeOH) m/z: 257,25 $[M+Cl]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ (ppm) : 0,95 (s,1H, OH); 1,21 (m,3H_8, 3H_9); 3,48 (m,3H,H_3,H_5, H_6); 3,61(m, 2H, H_2 et H_4); 3,71(s, 1H, H_7); 4,90 (s, 1H, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 23,78 (C, C9,C8); 62,26 (C, C6); 70,47 (C, C3); 70,94(C, C7); 73,84 (C, C2); 74,80(C, C3); 76,66 (C, C5); 99,22 (C,C1).

<u>6-phosphate-α-D-mannopyranoside de méthyle (4)</u>



Mode opératoire

À une solution contenant 1g de α-D-mannopyranoside de méthyle (1) (5,15mmol, 1éq) dans 7ml de pyridine, on rajoute 12ml de CH_2Cl_2 anhydre et 0,189g de DMAP (1.55mmol, 0,3éq).

Le mélange est introduit dans un bain de glace à 0°C puis on rajoute 0,518ml de $POCl_3$ (5,66mmol, 1,1éq) et le mélange réactionnel est remis à température ambiante.

Après 1h 30 d'agitation, le mélange est évaporé sous pression réduite au rotavapeur pour éliminer la pyridine.

Le brut réactionnel est dissout dans l'AcOEt, puis la phase aqueuse est lavée avec une solution de HCl 2N pour éliminer toute trace de pyridine et neutralisée par une solution de NaOH 1N jusqu'à pH = 7. Elle est lavée à nouveau par l'acétate d'éthyle.

Le mélange contenant notre phosphate et le NaCl ne peut pas être purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, donc il est concentré puis dilué dans du méthanol. Notre produit sera soluble et séparé du NaCl (Précipité blanc insoluble dans le méthanol) par simple filtration sur papier wathmann.

Cette opération est répétée plusieurs fois, puis le produit est lyophilisé pour donner le 6-phosphate-α-D-mannopyranoside de méthyle.

Eluant : *i*PrOH/NH_4OH 7/3 v/v

Rf= 0,20

Aspect physique : solide blanc

Rendement : 80%

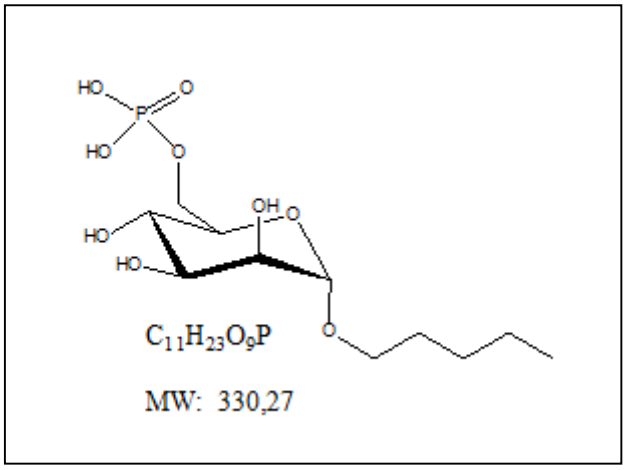
SM (ESI^+/MeOH) m/z: 297,5 $[M+Na]^+$; 275,4 $[2M+H^+]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 3,32 (s, 3H, -OCH3); 3,32-3,36 (m, 1H, H_5); 3,45 (t; 1H; $3J_{H4-H3}=3_{JH4-H5}$=9,4 Hz, H_4); 3,65 (dd, 1H, 3_{JH3-H2}=3,4 Hz, 3_{JH3-H4}=9,5 Hz, H_3); 3,82 (dd, 1H, 3_{JH1-H2}=1,7 Hz, $3J_{H2-H3}$=3,4 Hz, H_2); 4,14-4,36 (m, 2H, H_6); 6,10 (d, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,5Hz, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 55,0 (1C, -O*C*H3); 66,9 (1C, C6); 69,8 (1C, C2); 70,1 (1C, C3); 70,6 (1C, C4); 71,5 (1C, C5); 101,1 (1C, C1).

RMN ^{31}P (162 MHz, CD_3OD) δ (ppm): -3,78.

6-phosphate-α-D-mannopyranoside de pentyle (5)



Mode opératoire

1g de α-D-mannopyranoside de pentyle (2) (1éq ; 4mmol) et 0,147g de DMAP (0,3éq ; 1,2m mol) sont dissous dans un mélange, pyridine/dichlorométhane, 1/2. Le mélange est plongé dans un bain de glace avant d'ajouter 0.402ml de $POCl_3$ (1,1éq ; 4,4mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique pendant 2 heures.

La réaction est suivie par CCM (*i*PrOH/NH_4OH 7/3 v/v) et dure 1h30. A la fin de la réaction, le brut réactionnel est concentré, dissout dans de l'acétate d'éthyle et le produit est extrait à l'eau. La phase aqueuse est traitée avec une solution de HCl 2N et neutralisée par une solution de NaOH 1N jusqu'à pH = 7. Elle est lavée à nouveau par l'acétate d'éthyle.

Le mélange contenant notre phosphate et le NaCl ne peut pas être purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, donc il est concentré puis dilué dans du méthanol. Notre produit sera soluble et séparé du NaCl (Précipité blanc insoluble dans le méthanol) par simple filtration sur papier wathmann.

Cette opération est répétée plusieurs fois, puis le produit est lyophilisé pour donner le 6-phosphate-α-D-mannopyranoside de pentyle. Le produit est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

Rf = 0,16 (*i*PrOH/NH_4OH 7/3 v/v)

Aspect physique solide blanc

Rendement 76%

Analyse chimique

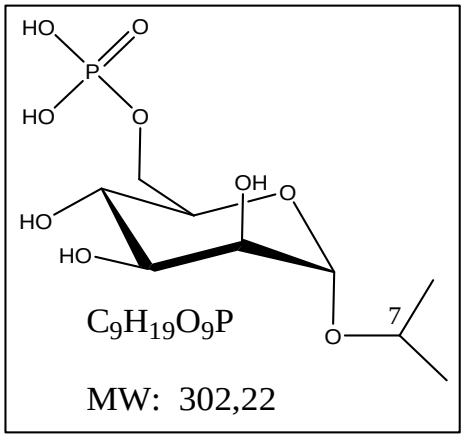
SM (ESI$^+$/MeOH) m/z : 353,24 $[M+Na]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ(ppm) : 0,83 (m, 3H; $H_{5'}$); 1,31-1,23 (m, 4H; $H_{3'}$ et $H_{4'}$); 1,50 (m, 2H; $H_{2'}$) ; 3,33 (dt, $J_{1'a-1'b}$ = 9,6Hz ; $J_{1'a-2'}$ = 6,3Hz, 1H; $H_{1'a}$); 3,59 (dt, $J_{1'b-1'a}$ = 9,6Hz, $J_{1'b-2'}$ = 6,6Hz, 1H, $H_{1'b}$); 3,96 -3,84 (m, 3H, H_5 et H_6); 3,97 (m, 1H, H_2); 4,12-4,06 (m, 1H, H_4); 4,24-4,17 (m, 1H, H_3); 4,87(d, J_{1-2} = 0,6Hz, 1H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ (ppm) : 13,42 (C, C5'); 21,84 (C, C4'); 27,48 (C, C3'); 28,26 (C, C2'); 64,49 (C, C1'); 66,65 (C, C6); 68,36 (C, C4); 68,70 (C, C2); 70,14 (C, C3); 75,96 (C, C5); 100,66 (C, C1).

RMN ^{31}P (162 MHz, D_2O) δ (ppm): -2,63.

6-phosphate-α-D-mannopyranoside d'isopropyle (6)



Mode opératoire

À une solution contenant 1g de α-D-mannopyranoside d'isopropyle (3) (1,80mmol, 1éq) dans 5ml de pyridine, on rajoute 10ml de CH_2Cl_2 anhydre et 0,07g de DMAP (0,54mmol, 0,3éq).

Le mélange est introduit dans un bain de glace à 0°C puis on rajoute 0,181ml de $POCl_3$ (1,98mmol, 1,1éq) et le mélange réactionnel est remis à température ambiante.

Après 2h d'agitation, le mélange est évaporé sous pression réduite au rotavapeur pour éliminer la pyridine.

Le même protocole que ceux préparés précédemment est utilisé pour le traitement de notre produit brut.

Rf= 0,12 (*i*PrOH/NH_4OH 8/2 v/v)
Aspect solide blanc jaunâtre
Rendement 70%

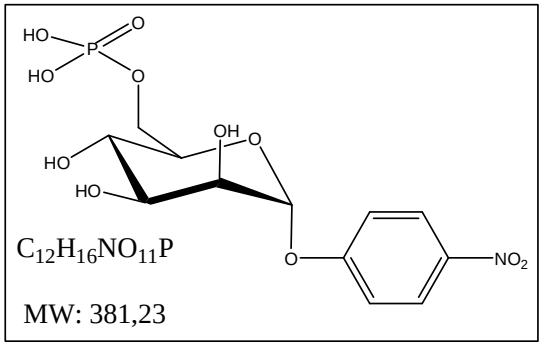
Analyse chimique
SM (ESI$^+$/MeOH) m/z : 325,11 $[M+Na]^+$
(ESI$^-$/MeOH) m/z : 301,23 $[M-H]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ (ppm) : 1,21 (m, 6H, H_8,H_9); 340(m,1H,H_5) ;3,45 (t; 1H; $3J_{H4-H3}$=$3J_{H4-H5}$=9,4 Hz, H_4); 3,65 (dd, 1H, $3J_{H3-H2}$=3,4 Hz, $3J_{H3-H4}$=9,5 Hz, H_3); 3,73 (m, 1H, H_7) 3,82 (dd, 1H, 3JH1-H2=1,7 Hz, $3J_{H2-H3}$=3,4 Hz, H_2); 4,10-4,33 (m, 2H, H_6); 5,40 (d, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,5Hz, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ (ppm) : 23,75 (2C, C8,C9); 66,94 (1C, C6); 70,6 (1C, C4); 70,94(1C,C7); 73,8 (1C, C2); 74,80(1C, C3); 75,20(C,C5); 99,2 (1C, C1).

RMN ^{31}P (162 MHz, D_2O) δ (ppm): -3,09.

6-phosphate-α-D-mannopyranoside du para nitro phényle (7)



Mode opératoire

Le même protocole utilisé que précédemment, après 1 heure d'agitation le brut réactionnel est traité pour obtenir le produit désiré.

Rf= 0,16 (*i*PrOH/NH_4OH 7/3 v/v).

Aspect physique: solide blanc

Rendement 76%

Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 404,20 $[M+Na]^+$

(ESI^-/MeOH) m/z : 380,33 $[M-H]^-$

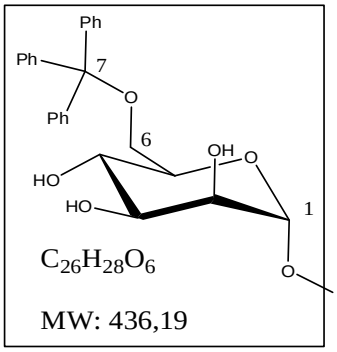
RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ (ppm) : 3,60 (m, 1H, H_5); 3,68(t; 1H; $3J_{H4-H3}$=3JH4-H5=9,4 Hz, H_4); 3,70-3,80 (dd, 1H, $3J_{H3-H2}$=3,4 Hz, $3J_{H3-H4}$=9,5 Hz, H_3); 3,82 (dd, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,7 Hz, $3J_{H2-H3}$=3,4 Hz, H_2); 4,05-4,38(m, 2H, H_6); 5,80 (d, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,5Hz, H_1); 7,22-8,10(m,4H,$H_{b,c,e,f}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ (ppm) : 66,98 (1C, C6); 70,93(1C, C4); 73,26 (1C, C2);74,80(1C, C3); 75,25(C,C5); 101,0 (1C, C1); 118,70 (2C, Cb,Cf); 127,15 (2C, Cc,Ce).

RMN ^{31}P (162 MHz, D_2O) δ (ppm) : -2,19.

Autre méthode de préparation du 6-phosphate-α-D-mannopyranoside de méthyle

6-trityl- α –D-mannopyranoside de méthyle (8)



Mode opératoire

6g de α-D-mannopyranoside de méthyle (1) (30,90 mmol, 1éq) et 1,13g de DMAP (9.27mmol, 0,3éq) sont dissous dans 48ml de pyridine. 13g de chlorure de trityle (46.35mmol, 1,5éq) sont ajoutés au mélange par fractions. La réaction est terminée après 2h30.

Le milieu réactionnel est ensuite dilué dans de l'AcOEt et lavé successivement avec une solution HCl (2N), une solution de $NaHCO_3$ 5% et de l'eau glacé.

La phase organique est séchée avec Na_2SO_4, filtrée et concentrée.

Le produit est ensuite purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec un gradient d'éluant (CH_2Cl_2/MeOH 9,5/0,5 V/V).

Rf =0,43

Rendement 89%

Aspect physique mousse blanche

Analyse chimique

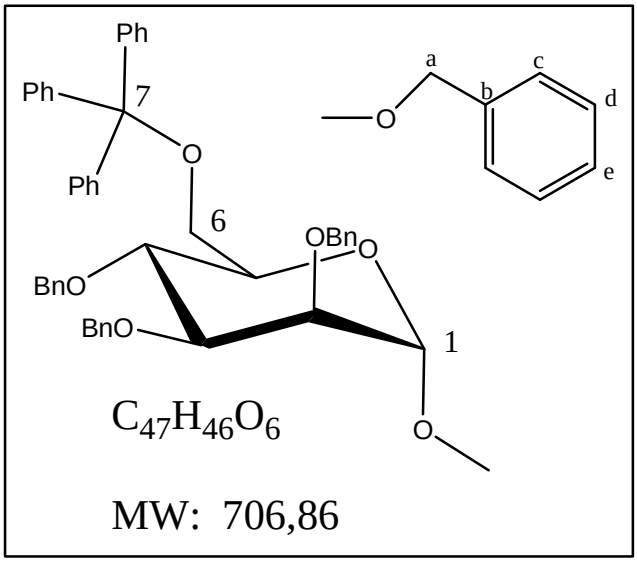
SM (ESI^+/MeOH) m/z : 459,10 $[M+Na]^+$; 895,20 $[2M+Na]^+$

(ESI^-/MeOH) m/z : 435,13 $[M-H]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 1,63-3,00 (3m,3H, -OH); 3,31(s,3H,-OCH3); 3,32(m,1H,H_{6a}); 3,37(m,1H,H_{6b}); 3,56-3,82(m,4H,H_2,H_3,H_4et H_5); 4,66(d,1H,J_{1-2}=1,4Hz,H_1) ; 6,70-7,42(m,14H ,H_9 ,H_{10} ,H_{11}).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCL_3$) δ (ppm) : 54,81(-OCH3); 64,80(C,C6); 69,93(C,C2); 69,98(C,C3); 70,25(C,C4); 71,7(C,C5); 87,20(C,C7); 100,70(C,C1) ;113,40, 127,20, 128,50, 130,50 (14C, C9 ,C10 ,C11); 136,40, 144,30, 144,26(3C8) ; 158,80(C12).

2, 3, 4- tri-O-benzyl-6-trityl- α –D-mannopyranoside de méthyle (9)



Mode opératoire

11,90g de 6-trityl-α-D-mannopyranoside de méthyle (8) (27,26mmol, 1éq) sont dissous dans 48.91ml de bromure de benzyle (408,93 mmol, 15éq). 30.590g de KOH broyés sont ajoutés (545.2mmol 20éq) et la température du mélange est portée à 80°C.

Après 2h le milieu réactionnel est dilué avec CH_2Cl_2 puis la phase organique est lavée à l'eau distillée, séchée sur Na_2SO_4, filtrée et concentrée.

Remarque

L'excès du bromure de benzyle est évaporé à l'aide d'une pompe à 60°C.

Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice avec un gradient d'éluant (EP/Et_2O 8/2 V/V).

Rf=0,64

Rendement 89%

Aspect physique cristaux blancs

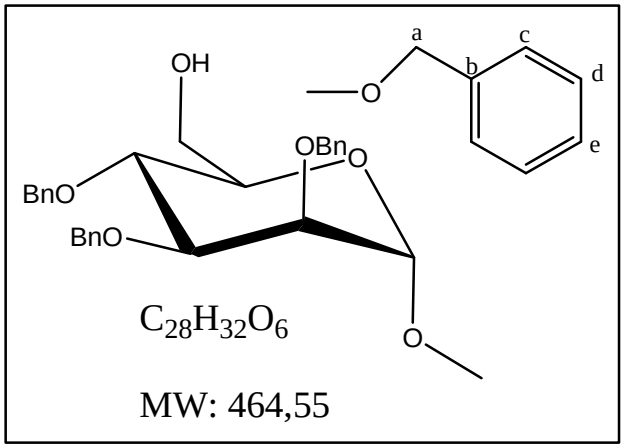
Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 729,12 $[M+Na]^+$; 707,10 $[M+H^+]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 3,20(dd,1H,J_{6a-5}=5,2Hz,J_{6b-6a}=9,8Hz,H_{6a}); 3,30(s,3H,-OCH3) ; 3,48(dd,1H,J_{6b-5}=1,7Hz,J_{6b-6a}=9,8Hz,H_{6b}); 3,68(m,1H,H_5) ; 3,75(dd,1H,J_{2-1}=1,8Hz,J_{2-3}=3,1Hz,H_2);3,80(dd,1H,J_{3-2}=3,2Hz,J_{3-4}=9,3Hz,H_3) ;3,97(t,1H,J_{4-3}=J_{4-5}=9,6Hz,H_4); 4,45-4,70(m,4H,H_a) ; 4,75(s,1H, H_1) ; 6,69-7,80(m,29H,$H_{9,10,11,c,d,e}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 55,20(-OCH3); 63,80(C,C6); 72,25(C,C5); 75,40(C,C4); 75,63(C,C2); 80,7(C,C3); 72,50, 72,80, 75,20(3Ca); 86,10(C, C7); 98,88(C1); 113,20, 129,62, 127,56, 127,95, 128,30-128,75, 130,84 (29C ,C9,C10,C11,Cc,Cd,Ce); 135,98, 138,40, 138,79, 138,85, 145,75, 145,95 (3Cb,3C8); 159,60(C,C12).

2, 3, 4- tri-O-benzyl- α –D-mannopyranoside de méthyle (10)



Mode opératoire

5,64g de 2, 3, 4- tri-O-benzyl-6-trityl- α –D-mannopyranoside de méthyle (9) sont dissous dans 100ml d'un mélange (95/5 CH_3CN/H_2O V/V). 0,44g de CAN sont ajoutés et la température est portée à 60°C. La réaction est suivie par CCM puis le mélange réactionnel est dilué avec CH_2Cl_2. La phase aqueuse est séchée avec Na_2SO_4 puis concentrée.

Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice avec un gradient d'éluant (CH_2Cl_2/MeOH 9,5/0,5 V/V).

Rf = 0,63

Rendement 66%

Aspect physique : huile beige claire

Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 487,10 $[M+Na]^+$; 465,40 $[M+H^+]^+$

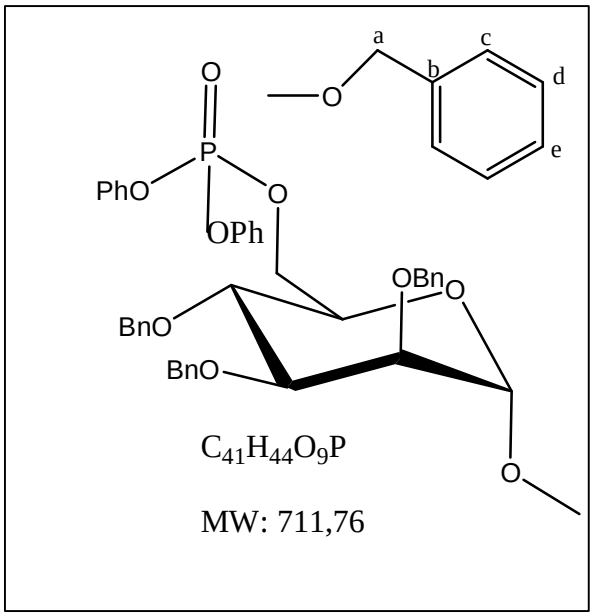
(ESI^-/MeOH) m/z : 463,12 $[M-H]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 1,86(s,1H, -OH) ; 3,30(s,3H,-OCH3) ; 3,53(m, 1H , H_5) ; 3,76(m,3H, H_{6a} et H_2) ;3,81(dd,1H,J6a-5=3,0 Hz, J6a-6b=11,8Hz, H_{6b}) ; 3,86 (dd,1H,J_{3-2}=3,0Hz, J_{3-4}=9,4Hz, H_3) ; 3,94(t,1H,J_{4-3}=3,0Hz, J4-5=9,6Hz, H_4) ; 4,60(m,2H, Ha) ;

4,67(m,3H ,H_1 et H_a) ;4,75(d,2H,J=12,6Hz, H_a); 4,75(s,1H, H1); 4,90 (d,2H, J=10,6Hz, Ha); 7,20-7,32(m,15H, $H_{9c,d,e}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 54,20(-OCH3); 62,80(C,C6); 71,25(C,C5); 74,40(C,C4); 74,63(C,C2); 72,50, 72,80, 75,20(3Ca); 80,20(C ,C3); 98,79(C,C1); 127,95-128,75 (Cc,Cd,Ce); 138,40, 138,79, 138,85 (3Cb) .

diphenyl -6-phosphate-2, 3, 4- tri-O-benzyl-α –D-mannopyranoside de méthyle (11)



Mode opératoire

3,30 g de 2, 3, 4- tri-O-benzyl- α –D-mannopyranoside de méthyle (10) (7,10 mmol, 1éq) sont dissous dans 24ml de pyridine et 3g de DMAP (2,13mmol, 0.3éq). Le milieu réactionnel est mis sous argon puis à 0°C avant d'ajouter 8,83 ml de diphényle phosphoryle chloride (42,6mmol, 6éq).

La réaction est laissée sous agitation pendant la nuit, le lendemain on met notre solution dans de la glace puis on rajoute 100 ml de CH_2Cl_2. La phase organique est récupérée puis lavée 3 fois avec 50ml d'HCl, puis avec 50ml de $NaHCO_3$ et 50ml d'H_2O.

La phase organique est séchée avec Na_2SO_4 puis filtrée et concentrée.

Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice avec un gradient d'éluant (CH_2Cl_2/MeOH 9,8/0,2 V/V).

Rf= 0,70 (CH_2Cl_2/MeOH 9,8/0,2 v/v)

Rendement quantitative

Aspect physique : huile beige

Analyse chimique

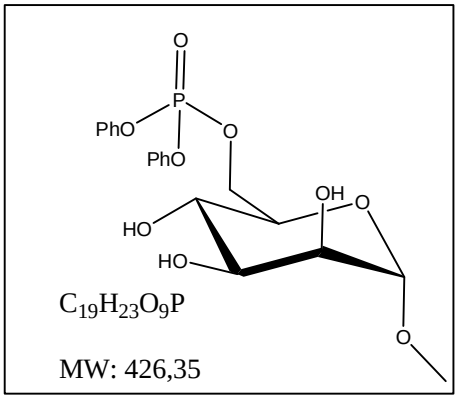
SM (ESI^+/MeOH) m/z : 734,11 $[M+Na]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 3,40 (s,3H,-OCH3); 3,57(t,1H,J_{4-3}=J_{4-5}=9,6Hz, H_4); 3,70(dd, 1H,J_{2-1}=1,8Hz, J_{2-3}=3,1Hz, H_2); 3,76(dd, 1H,J_{3-2}=3,2Hz, J_{3-4}=9,3Hz, H_3); 3,79 (m,1H,H_5); 4,08(dd, 1H ,J_{6a-5}=5,2Hz, J_{6b-6a}=9,8Hz, H_{6a}); 4,35(dd, 1H, J6b-5=1,7Hz, J_{6b-6a}=9,8Hz, H_{6b}) ; 4 ,40-4,70(m,4H,H_a) ; 4,90(s,1H, H_1); 7,10-7,60(m, 30H, $H_{9,10,11,c,d,e}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 55,81(-OCH3) ; 66,40(C,C6); 72,04(C,C5); 72,50, 72,80, 75,20 (3Ca); 77,20(C,C4); 79,28(C,C3);79,90(C,C2); 86,10(C, C7); 101,37(C,C1); 120,50, 127,62, 127,56, 127,93, 128,50-128,78, 130,87 (29C , C9,C10,C11,Cc,Cd,Ce); 135,98, 138,43, 138,80, 138,85, 145,76, 145,93 (3Cb,3C8); 151,60(C,C12).

RMN ^{31}P (162 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : -12,40.

diphenyl -6-phosphate-α –D-mannopyranoside de méthyle (12)



Mode opératoire

4,47g de diphenyl -6-phosphate-2, 3, 4- tri-O-benzyl-α –D-mannopyranoside de méthyle (11) sont dissous dans 100ml de (MeOH/AcOEt 1/1) puis le mélange est mis sous vide puis sous argon. On rajoute deux gouttes d'acide trifluoroacétique CF_3COOH et 2,04g de Pd/C 10% (1,92mmol, 0,3éq). Le mélange est mis par la suite, trois fois sous vide et sous argon, puis on laisse le mélange sous H_2.

Au bout de 24h de réaction le produit désiré est obtenu CH_2Cl_2/MeOH 9/1 V/V).

Rf= 0,62 (CH_2Cl_2/MeOH V/V).

Le mélange est filtré sur célite puis concentré au rotavapeur.

Aspect physique : huile claire

Rendement 68%

Analyse chimique

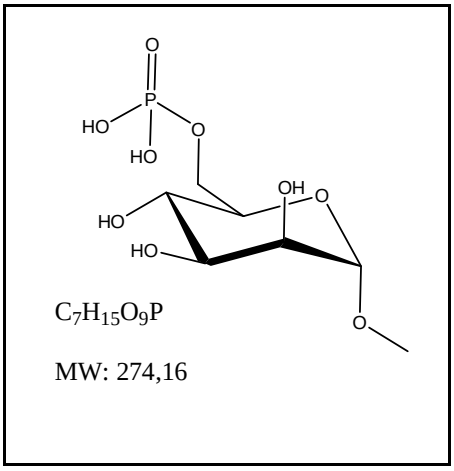
SM (ESI^+/MeOH) m/z : 449,23 $[M+Na]^+$

RMN ^{1}H (400,13MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 1,63-3,00 (3m,3H, -OH); 3,47(s,3H,-OCH3); 3,56-3,90 (m,4H,H_2,H_3,H_4et H_5) 4,32(m,1H,H_{6a}); 4,37(m,1H,H_{6b});4,40(d,1H,J1-2=1,4Hz, H_1); 7,10-7,72(m,14H ,H_9 ,H_{10} ,H_{11}).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 55,81(C,-OCH3) ; 67,10(C,C6) ; 70,95(C,C4); 72,73(C,C2) ;74,88(C,C3); 75,25(C,C5); 87,20(C,C7); 103,20(C,C1); 118,45, 127,30, 128,70, 130,09 (10C, C9 ,C10 ,C11); 151,80(C12).

RMN ^{31}P (162 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): -11,26.

6-phosphate-α –D-mannopyranoside de méthyle (13)



Mode opératoire

2,70g de diphenyl -6-phosphate-α –D-mannopyranoside de méthyle (12) sont dissous dans 50ml de MeOH, le mélange est mis sous argon avant d'ajouter 0.29g de PtO_2 (1,26mmol, 0,2éq). Le mélange est mis sous vide puis sous argon avant d'ajouter un ballon d'H_2. La réaction est fini après 48h, la réaction est suivi par CCM avec un éluant (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 V/V).

Le produit est filtré sur célite pour obtenir notre produit déprotégé.

Rf= 0,60

Aspect physique : huile claire

Rendement 85%

Analyse chimique

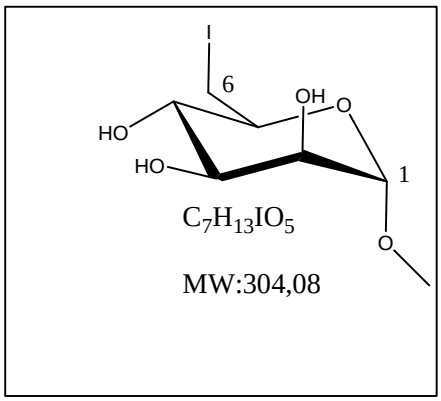
SM (ESI^+/MeOH) m/z : 297,11 $[M+Na]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 3,32 (s, 3H, -OC*H3*); 3,32-3,36 (m, 1H, H_5); 3,45 (t; 1H; $3J_{H4-H3}$=$3J_{H4-H5}$=9,4 Hz, H_4); 3,65 (dd, 1H, $3J_{H3-H2}$=3,4 Hz, $3J_{H3-H4}$=9,5 Hz, H_3); 3,82 (dd, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,7 Hz, $3J_{H2-H3}$=3,4 Hz, H_2); 4,14-4,36 (m, 2H, H_6); 6,10 (d, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,5Hz, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 55,0 (1C, -O*C*H3); 66,9 (1C, C6); 69,8 (1C, C2); 70,1 (1C,C3); 70,6 (1C, C4); 71,5 (1C, C5); 101,1 (1C, C1).

RMN ^{31}P (162 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : -3,78.

6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de méthyle (14)



Mode opératoire

400 mg de α-D-mannopyranoside de méthyle (1) (2,06 mmol, 1éq), 078g de diode (3,09 mmol, 1,5éq), 0,81g de triphényl phosphine (3,09mmol, 1,5éq) et 0,28g d'imidazole (4,12 mmol, 2éq) sont mélangés et broyés au mortier pendant 5 minutes, le mélange est ensuite plongé dans un bain d'huile à 80°C.

Après 20 min d'agitation manuelle, le mélange réactionnel est dissous dans du méthanol pour arrêter la réaction et puis concentré.

Le produit peut être remis directement en réaction ou bien purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v) pour donner une huile jaune.

Rf= 0,45 (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v).

Rendement quantitatif

Analyse chimique

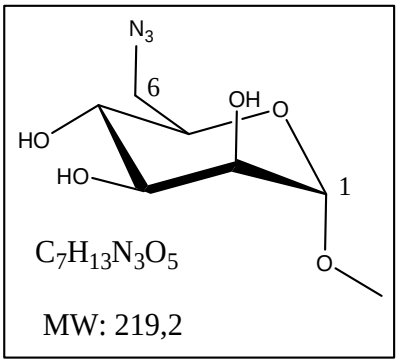
SM (ESI^+/MeOH) m/z : 327,30 $[M+Na]^+$; 305,11 $[M+H^+]^+$

(ESI^-/MeOH) m/z : 339,2 $[M+Cl]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 3,26 (dd, 1H, $3JH_{6a-H5}$=7,0 Hz, $2J_{H6a-H6b}$= -10,9 Hz, H_{6a}); 3,32 (s, 3H, -OCH3); 3,32-3,36 (m, 1H, H_5); 3,45 (t; 1H; $3J_{H4-H3}$=$3J_{H4-H5}$=9,4 Hz, H_4); 3,5 (dd, 1H, $3J_{H6b-H5}$=2,2 Hz, $2J_{H6b-H6a}$= -10,9 Hz, H_{6b}); 3,65 (dd, 1H, $3J_{H3-H2}$=3,4 Hz, $3J_{H3-H4}$=9,5 Hz, H_3); 3,82 (dd, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,7 Hz, 3_{JH2-H3}=3,4 Hz, H_2); 6,10 (d, 1H, $3J_{H1-H2=}$1,5 Hz, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 6,3 (1C, C6); 55,0 (1C, -O*C*H3); 69,8 (1C, C2); 70,1 (1C, C3); 70,6 (1C, C4); 71,5 (1C, C5); 101,1 (1C, C1).

6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de méthyle (15)



Mode opératoire

600 mg de 6-déoxy-6-iodo-α-D-mannopyranoside de méthyle (14) (1,97mmol, 1éq) et 0,26 g de NaN_3 (3,94mmol, 2éq) azidure de sodium sont mélangés et broyés au mortier pendant 5min. Le mélange est plongé dans un bain d'huile à 80°C. Après 20 min d'agitation manuelle, le mélange réactionnel est directement purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2/MeOH 9,5/0,5 v/v) pour donner une huile jaune avec 87% de rendement.

Rf= 0,40

Analyse chimique

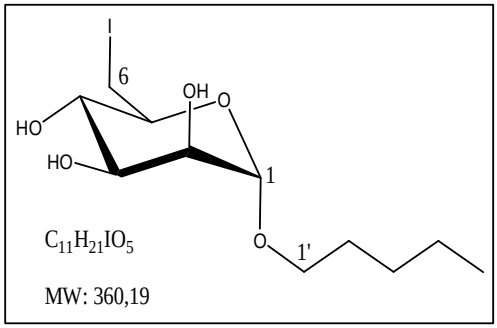
SM (ESI^+/MeOH) m/z : 242,30 $[M+Na]^+$

(ESI^-/MeOH) m/z : 218,15 $[M-H]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ (ppm) : 3,40 (s, 3H, -OC*H*3); 3,54 (dd, 1H, J_{H6a-H5} = 6,2 Hz, $J_{H6a-H6b}$ = - 13,3 Hz, H_{6a}); 3,60 - 3,73 (m, 4H, H_{6b}, H_5, H_4 et H_3); 3,91 (dd, 1H, J_{H2-H3} = 3,3 Hz, J_{H2-H1} = 1,7 Hz, H_2); 4,73 (d, 1H, J_{H1-H2} = 1,6 Hz, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ (ppm) : 51,4 (1C, C6); 55,2 (1C, -OCH3); 67,8 (1C, C5); 70,2 (1C, C2); 70,7 (1C, C3); 71,6 (1C, C4); 101,4 (1C, C1).

6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de pentyle (16)



Mode opératoire

La synthèse de cette molécule est effectuée de la même manière que pour le 6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de méthyle (14). Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune

Rf= 0,48 (CH_2Cl_2/MeOH 8/2 v/v).

Rendement quantitatif

Analyse chimique

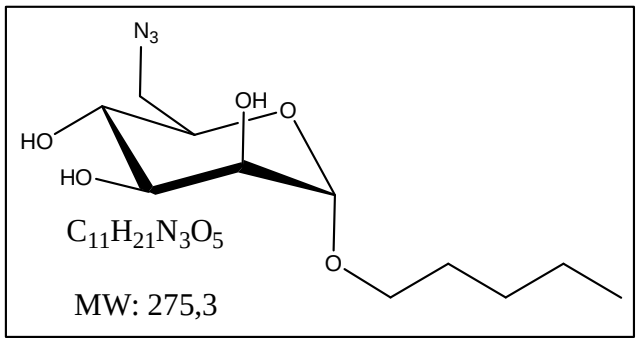
SM (ESI$^+$/MeOH) m/z : 383,20 $[M+Na]^+$; 743,11 $[2M+Na]^+$

(ESI$^-$/MeOH) m/z : 395,25 $[M+Cl]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ (ppm) : 0,98 (m, 3H, $H_{5'}$) ; 1,41 -1,50 (m, 4H, $H_{4'}$ et $H_{3'}$) ; 1,54 (m, 2H, $H_{2'}$) ; 3,49 -3,38 (m, 3H, H_{6a}, H_{6b} et $H_{1'b}$) ; 3,58 – 3,52 (m, 1H, H_5) ; 3,60 (dt, $J_{1'a-1'b}$=9,6Hz, $J_{1'a-2'}$= 6,7Hz, 1H, $H_{1a'}$); 3,69 – 3.63 (m, 2H, H_3 et H_4) ; 3,75 (dd, J_{2-3}=3,3Hz, J_{2-1}=1,7Hz, 1H, H_2); 4,90 (d, J=1,6Hz, 1H, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ (ppm) : 7,90 (C, C6); 14,10 (C, C5') ; 22,94 (C, C4') ; 29,21 (C, C3') ; 29,64 (C, C2') ; 68,19 (C, C1') ; 69,85 (C, C4); 73,34 (C, C2) ; 74,80 (C, C3) ;77,30 (C, C5) ; 103,79 (C, C1).

6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de pentyle (17)



Mode opératoire

La synthèse de cette molécule se fait de la même manière que pour le 6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de méthyle (15). Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v) pour donner une huile jaune avec 80% de rendement. Rf= 0,53 (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v).

Analyse chimique

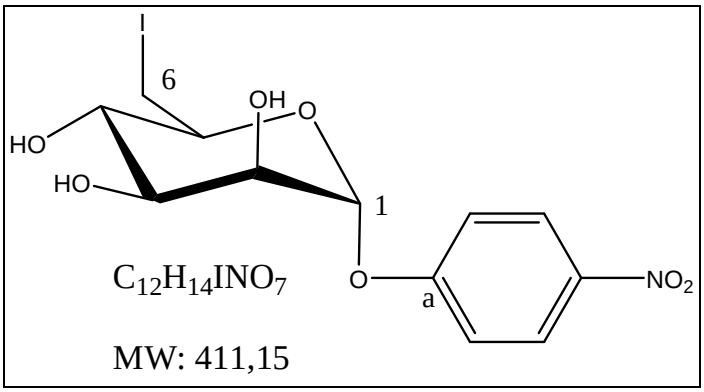
SM (ESI$^+$/MeOH) m/z : 298,30 $[M+Na]^+$

(ESI$^-$/MeOH) m/z : 310,15 $[M+Cl]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ (ppm) : 0,95 – 0,90 (m, 3H, $H_{5'}$); 1,41 -1,34 (m, 4H, $H_{4'}$ et $H_{3'}$) ; 1,66 – 1,57 (m, 2H, $H_{2'}$) ; 3,49 -3,38 (m, 3H, H_{6a}, H_{6b} et $H_{1'b}$); 3,58 – 3,52 (m, 1H, H_5) ; 3,69 – 3,63 (m, 2H, H_3 et H_4) ; 3,74 (dt, $J_{1'a-1'b}$=9,6Hz, $J_{1'a-2'}$= 6,7Hz, 1H, H1a') ; 3,79 (dd, J_{2-3}=3,3Hz, J_{2-1}=1,7Hz, 1H, H_2) ; 4,74 (d, J=1,6Hz, 1H, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ (ppm) : 14,52 (C, C5'); 23,67 (C, C4'); 29,76 (C, C3') ; 30,46 (C, C2'); 53,10 (C, C6) ; 68,96 (C, C1'); 69,71 (C, C5); 72,31 (C, C2); 72,59 (C, C3) ;74,02 (C, C4); 101,68 (C, C1).

6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de para nitro phényle (18)



Mode opératoire

La synthèse de cette molécule se fait de la même manière que pour le 6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de méthyle (14). Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune.

Rf= 0,65 (CH_2Cl_2/MeOH 8/2 v/v).

Rendement quantitatif

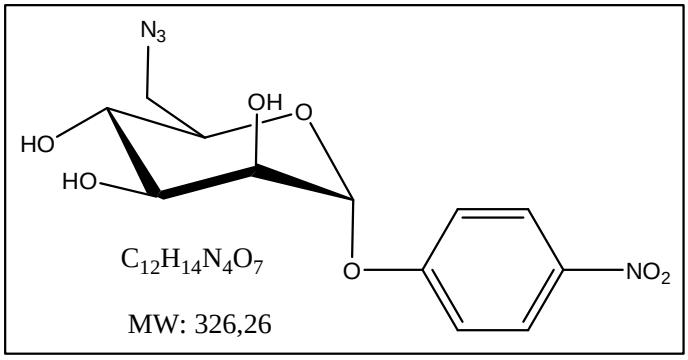
Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 434,13 $[M+Na]^+$
(ESI^-/MeOH) m/z : 410,28 $[M-H]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ (ppm) : 3,17(m, 2H, H_6); 3,52 (dd, 1H, $3J_{H3-H2}$=3,4 Hz, $3J_{H3-H4}$=9,5 Hz, H_3); 3,63 (m, 1H, H_5); 3,74(t; 1H; $3J_{H4-H3}$=$3J_{H4-H5}$=9,4 Hz, H_4); 4,20 (dd, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,7 Hz, $3J_{H2-H3}$=3,4 Hz, H_2); 5,80 (d, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,5Hz, H_1); 7,26-8,14 (m,4H,$H_{b,c,e,f}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ (ppm) : 7,90 (1C, C6); 69,85(1C, C4); 73,24 (1C, C2); 74,80(1C, C3); 77,30 (C,C5);101,16 (1C, C1); 118,70(2C, *Cb,Cf*); 127,15(2C, *Cc,Ce*).

6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de para nitro phényle (19)



Mode opératoire

La synthèse de cette molécule se fait de la même manière que pour le 6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de méthyle (15). Le produit est purifié chromatographie sur colonne de gel de silice pour obtenir un solide marron clair avec 70% de rendement.

Rf= 0,55 (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v).

Analyse chimique

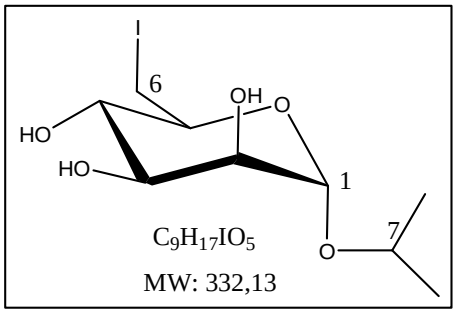
SM (ESI^+/MeOH) m/z : 349,19 $[M+Na]^+$

(ESI^-/MeOH) m/z : 361,46 $[M+Cl]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ (ppm) : 3,10 (m, 2H, H_6); 3,55 (dd, 1H, $3JH_{3-H2}$=3,4 Hz, $3J_{H3-H4}$=9,5 Hz, H3); 3,63 (m, 1H, H_5); 3,74(t; 1H; $3J_{H4-H3}$=$3J_{H4-H5}$=9,4 Hz, H_4); 4,80 (dd, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,7 Hz, $3J_{H2-H3}$=3,4 Hz, H_2); 5,80 (d,1H, $3J_{H1-H2}$=1,5Hz, H_1),7,15-8,40 (m,4H,$H_{b,c,e,f}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ (ppm) : 52,51 (C, C6); 70,90 (C,C7); 71,89 (C, C4); 72,93 (C, C5); 73,26 (C, C2); 74,80(C, C3) ; 101,16 (C, C1); 118,70 (2C,*Cb,Cf*); 127,15 (2C, *Cc,Ce*).

6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside d'isopropyle (20)



Mode opératoire

La synthèse de cette molécule se fait de la même manière que pour le6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de méthyle (14). Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune

Rf= 0, 42 (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v).

Rendement 70%

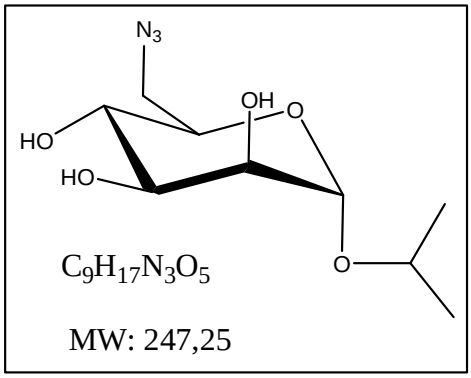
Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 355,23 $[M+Na]^+$; 687,17 $[2M+Na]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 1,21(m,6H, H_8,H_9);3,26 (dd, 1H, $3J_{H6a-H5}$=7,0 Hz, $2J_{H6a-H6b}$= -10,9 Hz, H_{6a}); 3,40(m, 1H, H_5); 3,53 (t; 1H; $3J_{H4-H3}$=$3J_{H4-H5}$=9,4 Hz, H4); 3,50 (dd, 1H, $3J_{H6b-H5}$=2,2 Hz, $2J_{H6b-H6a}$= -10,9 Hz, H_{6b}); 3,69(s,1H,H_7); 3,68 (dd, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,7 Hz, $3J_{H2-H3}$=3,4 Hz, H_2); 3,70 (dd, 1H, H_3); 5,40 (d, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,5 Hz, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 7,85 (C, C6); 23,78(2C,C8,C9); 69,85 (C, C4); 70,94 (C,C7); 73,84 (C, C2); 74,83(C, C3); 77,50 (C, C5); 99,22 (C, C1).

6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside d'isopropyle (21)



Mode opératoire

La synthèse de cette molécule se fait de la même manière que pour le 6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de méthyle (15). Le produit est purifié chromatographie sur colonne de gel de silice pour obtenir une huile marron clair avec 45% de rendement.

Rf= 0,32 (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v).

Analyse chimique

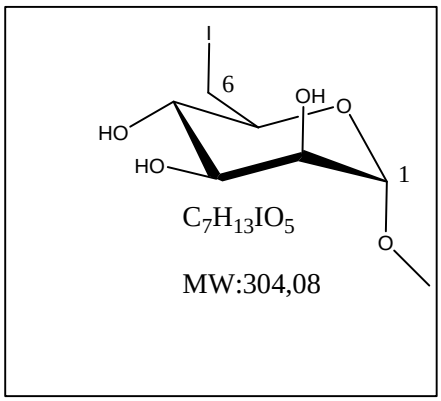
SM (ESI^+/MeOH) m/z : 270,36 $[M+Na]^+$
(ESI^-/MeOH) m/z : 282,11 $[M+Cl]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 1,04 (m,6H, H_8,H_9); 3,26 (dd, 1H, $3J_{H6a-H5}$=7,0 Hz, $2J_{H6a-H6b}$= -10,9 Hz, H_{6a}); 3,52 (m, 1H, H_5); 3,50 (dd, 1H, $3J_{H6b-H5}$=2,2 Hz, $2J_{H6b-H6a}$= -10,9 Hz, H_{6b}); 3,65(m,2H,H_3,H_4); 3,70(s,1H,H_7); 3,68 (dd, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,7 Hz, $3J_{H2-H3}$=3,4 Hz, H_2); 4,80 (d, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,5 Hz, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 23,80(2C,C8,C9); 52,51 (C, C6); 70,90 (C,C7); 71,89 (C, C4); 72,93 (C, C5); 73,80 (C, C2); 74,80(C, C3); 99,22 (C, C1).

Autres méthode de préparation du dérivé azido

6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de méthyle (22)



Mode opératoire

Une solution de 30 mL de THF anhydre contenant 8,86 g (34,9 mmol, 1,5 éq) d'iode (2 ml THF/1,5 mmol I_2) est ajoutée, goutte à goutte, sous azote, à une solution de 90 ml de THF anhydre à reflux, contenant 4,50 g (23 mmol, 1 éq) de α-D-mannopyranoside de méthyle (1). 9,11 g (34,5 mmol, 1,5 éq) de PPh_3 et 3,15 g (46 mmol, 2 éq) d'imidazole.

La réaction d'iodation est suivie par CCM (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 V/V) et dure 2 heures (formation d'un sel d'imidazole). Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante, les sels d'imidazole sont filtrés et après concentration du filtrat, le brut réactionnel est directement purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 V/V).

Aspect physique : Mousse blanche.

Rendement : quantitatif

Rf=0,47 (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 V/V)

Analyse chimique

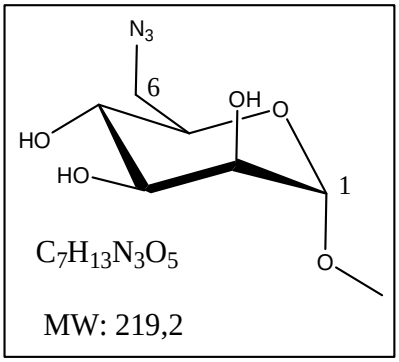
SM (ESI^+/MeOH) m/z: 305,06 $[M+H]^+$; 327,0 $[M+Na]^+$

(ESI^-/MeOH) m/z: 339,24 $[M+Cl]^{-.}$

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 3,26 (dd, 1H, $3J_{H6a-H5}$=7,0 Hz, $2J_{H6a-H6b}$= -10,9 Hz, H6a); 3,32 (s,3H, -OCH3); 3,32-3,36 (m, 1H, H_5); 3,45 (t; 1H; $3J_{H4-H3}$=$3J_{H4-H5}$=9,4 Hz, H_4); 3,5 (dd, 1H, $3J_{H6b-H5}$=2,2 Hz,$2J_{H6b-H6a}$= -10,9 Hz, H_{6b}); 3,65 (dd, 1H, $3J_{H3-H2}$=3,4 Hz, $3J_{H3-H4}$=9,5 Hz, H_3); 3,82 (dd, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,7 Hz,$3J_{H2-H3}$=3,4 Hz, H_2); 6,10 (d, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,5 Hz, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 6,3 (1C, C6); 55,0 (1C, -O*C*H3); 69,8 (1C, C2); 70,1 (1C, C3); 70,6 (1C, C4); 71,5 (1C, C5); 101,1 (1C, C1).

<u>6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de méthyle (23)</u>



Mode opératoire

16g (52,61mmol, 1éq) de 6-déoxy-6-iodo-α-D-mannopyranoside de méthyle (22) et 6,84g (105,22 mmol 2éq) de NaN_3 sont mis en solution dans 90 mL de DMF et la température est portée à 65°C pendant 3 heures. Ensuite, le mélange est refroidi à température ambiante puis les sels sont filtrés et rincés avec du CH_2Cl_2.

Le brut réactionnel est concentré est lavé avec 50ml d'H_2O. Puis la phase aqueuse est lyophilisée pour obtenir notre produit azido.

Le produit azido et le dérivé iodé ont le même Rf, mais le produit azido ne se révèle pas à la lumière UV. Il donne une tache de révélation marron rouge à l'anisaldéhyde.

Aspect physique : solide jaune clair.

Rendement : Quantitatif

Rf = 0,32 (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 V/V).

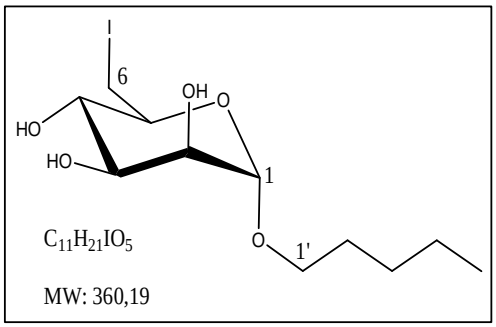
Analyse chimique

SM (ESI$^+$/MeOH) m/z : 242,30 [M+Na] $^+$; 461,20 [2M+Na] $^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 3,41 (s,3H,-OCH_3);3,55 (dd,1H, $^3J_{H6a-H5}$=6,1 Hz, $^2J_{H6a-H6b}$=-13,3Hz, H_{6a}); 3,60-3,74(m,4H, H_{6b}, H_5, H_4 et H_3) ; 3,90 (dd, 1H, $^3J_{H2-H3}$=3,2 Hz, $^3J_{H2-H1}$=1,7Hz, H_2); 4,72 (d, 1H, $^3J_{H1-H2}$=1,7 Hz, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ (ppm) : 51,4 (1C, C6); 55,2 (1C, -OCH3); 67,8 (1C, C5); 70,2 (1C, C2); 70,7 (1C, C3); 71,6 (1C, C4); 101,4 (1C, C1).

<u>6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de pentyle (24)</u>



Mode opératoire

Une solution de 30 mL de THF anhydre contenant 6,85 g (26,98 mmol, 1,5 éq) d'iode (2 ml THF/1,5 mmol I_2) est ajoutée, goutte à goutte, sous azote, à une solution de 100 mL de THF anhydre à reflux, contenant 4,50 g (17,99 mmol, 1 éq) de α-D-mannopyranoside de pentyle (2). 7,08 g (26,98 mmol, 1,5 éq) de PPh_3 et 2,45 g (35,98 mmol, 2 éq) d'imidazole.
La réaction d'iodation est suivie par CCM (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 V/V) et dure 1heure et 30 minutes (formation d'un sel d'imidazole). Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante, les sels d'imidazole sont filtrés et après concentration du filtrat, le brut réactionnel est directement purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 V/V).

Aspect physique : huile jaune claire.
Rendement : quantitatif

Rf= 0,50 (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 V/V)

Analyse chimique

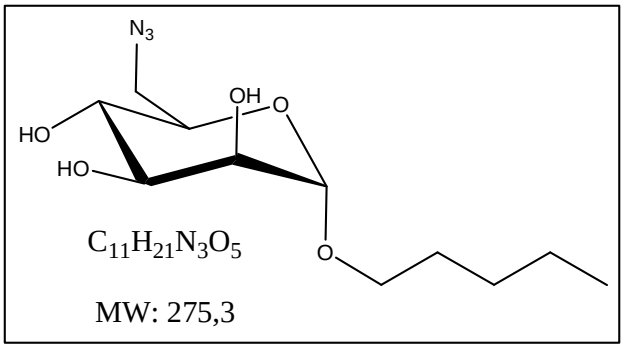
SM (ESI$^+$/MeOH) m/z : 383,10 $[M+Na]^+$; 743,22 $[2M+Na]^+$

(ESI$^-$/MeOH) m/z : 395,36 $[M+Cl]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ (ppm) : 0,98 (m, 3H, $H_{5'}$); 1,41 -1,50 (m, 4H, $H_{4'}$ et $H_{3'}$) ; 1,54 (m, 2H, $H_{2'}$) ; 3,49 -3,38 (m, 3H, H_{6a}, H_{6b} et $H_{1'b}$); 3,58 – 3,52 (m, 1H, H_5) ; 3,60 (dt, $J_{1'a-1'b}$=9,6Hz, $J_{1'a-2'}$= 6,7Hz, 1H, $H_{1a'}$) ; 3,69 – 3.63 (m, 2H, H_3 et H_4) ; 3,75 (dd, J_{2-3}=3,3Hz, J_{2-1}=1,7Hz, 1H, H_2); 4,90 (d, J=1,6Hz, 1H, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ (ppm) : 7,90 (C, C6); 14,10 (C, C5'); 22,94 (C, C4') ; 29,21 (C, C3') ; 29,64 (C, C2') ; 68,19 (C, C1') ; 69,85 (C, C4); 73,34 (C, C2) ; 74,80 (C, C3) ;77,30 (C, C5) ; 103,79 (C, C1).

6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de pentyle (25)



Mode opératoire

11g (30,53 mmol, 1éq) de 6-déoxy-6-iodo-α-D-mannopyranoside de pentyle (24) et 3,97g (61,07 mmol 2éq) de NaN_3 sont mis en solution dans 100 mL de DMF et la température est portée à 65°C pendant 5 heures. Ensuite, le mélange est refroidi à température ambiante puis les sels sont filtrés et rincés avec du CH_2Cl_2.

Le brut réactionnel est concentré est lavé avec 50ml d'H_2O. Puis la phase organique est séchée avec Na_2SO_4 puis concentrée au rotavapeur.

Le produit azido et le dérivé iodé ont le même Rf, mais le produit azido ne se révèle pas à la lumière UV. Il donne une tache de révélation marron rouge à l'anisaldéhyde.

Aspect physique : cristaux blancs.

Rendement : Quantitatif

Rf = 0,60 (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 V/V).

Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 298,26 $[M+Na]^+$

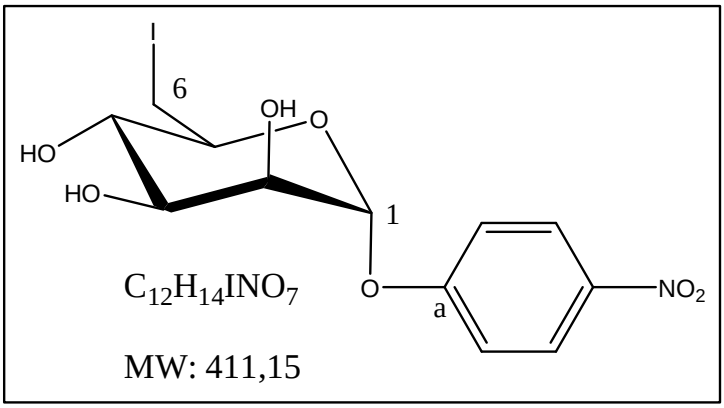
(ESI^-/MeOH) m/z : 310,04 $[M+Cl]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ (ppm) : 0,95 – 0,90 (m, 3H, $H_{5'}$) ; 1,41 -1,34 (m, 4H, $H_{4'}$ et $H_{3'}$) ; 1,66 – 1,57 (m, 2H, $H_{2'}$) ; 3,49 -3,38 (m, 3H, H_{6a}, H6b et $H_{1'b}$) ; 3,58 – 3,52 (m, 1H, H_5)

; 3,69 – 3.63 (m, 2H, H3 et H4) ; 3,74 (dt, $J_{1'a-1'b}$=9,6Hz, *J1'a-2'*= 6,7Hz, 1H, $H_{1a'}$) ; 3,79 (dd, J_{2-3}=3,3Hz, J_{2-1}=1,7Hz, 1H, H_2); 4,74 (d, *J*=1,6Hz, 1H, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ (ppm) : 14,52 (C, C5') ; 23,67 (C, C4') ; 29,76 (C, C3') ; 30,46 (C, C2') ; 53,10 (C, C6) ; 68,96 (C, C1') ; 69,71 (C, C5) ; 72,31 (C, C2) ; 72,59 (C, C3) ; 74,02 (C, C4) ; 101,68 (C, C1).

6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de para nitro phényle (26)



Mode opératoire

La synthèse de cette molécule se fait de la même manière que pour le 6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside de pentyle (24). Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune.

Rf= 0,44 (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v).

Rendement quantitatif

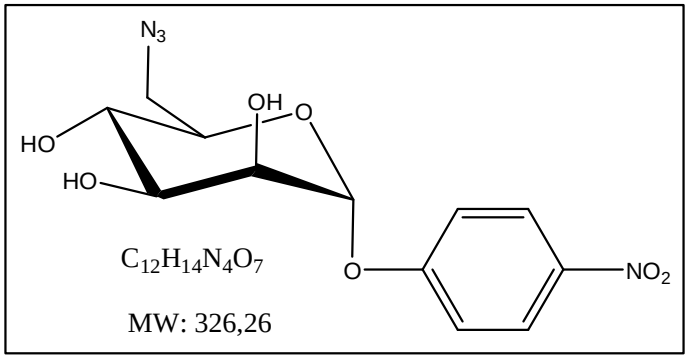
Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 434,25 $[M+Na]^+$
(ESI^-/MeOH) m/z : 410,30 $[M-H]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 3,17(m, 2H, H_6); 3,52 (dd, 1H, 3_{JH3-H2}=3,4 Hz, $3J_{H3-H4}$=9,5 Hz, H_3); 3,63 (m, 1H, H_5); 3,74(t; 1H; $3J_{H4-H3}$=$3J_{H4-H5}$=9,4 Hz, H_4); 4,20 (dd, 1H, 3JH1-H2=1,7 Hz, $3J_{H2-H3}$=3,4 Hz, H_2); 5,80 (d, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,5Hz, H_1),7,26-8,14 (m,4H,Hb,c,e,f).

RMN ^{13}C (101 MHz, CD3OD) δ (ppm) : 7,90 (1C, C6); 69,85(1C, C4); 73,24 (1C, C2);74,80(1C, C3); 77,30 (C,C5);101,16 (1C, C1); 118,70 (2C, *Cb,Cf*); 127,15 (2C, *Cc,Ce*).

<u>6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de para nitro phényle (27)</u>



Mode opératoire

La synthèse de cette molécule se fait de la même manière que pour le 6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de pentyle (25). Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune après 3 heures de réaction Le brut réactionnel est concentré est lavé avec 50ml d'H_2O. Puis la phase organique est séchée avec Na_2SO_4 puis concentrée au rotavapeur.

RF= 0,56 (CH_2Cl_2/MeOH 8,5/1,5 v/v).

Rendement 60%

Analyse chimique

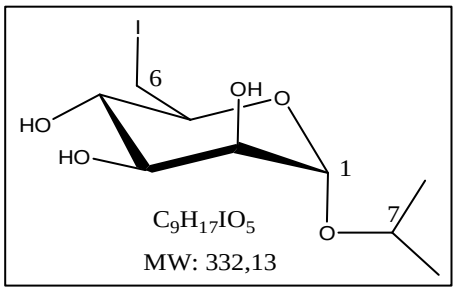
SM (ESI^+/MeOH) m/z : 349,33 $[M+Na]^+$

(ESI^-/MeOH) m/z : 361,17 $[M+Cl]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ (ppm) : 3,10 (m, 2H, H_6); 3,55 (dd, 1H, $3J_{H3-H2}$=3,4 Hz, $3J_{H3-H4}$=9,5 Hz, H_3); 3,63 (m, 1H, H_5); 3,74(t; 1H; $3J_{H4-H3}$=$3J_{H4-H5}$=9,4 Hz, H4); 4,80 (dd, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,7Hz,$3J_{H2-H3}$=3,4Hz,H_2); 5,80(d,1H,3JH1-H2=1,5Hz,H_1) ;7,15-8,40 (m,4H,Hb,c,e,f).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ (ppm) : 52,51 (C, C6); 70,90 (C,C7); 71,89 (C, C4); 72,93 (C, C5); 73,26 (C, C2); 74,80(C, C3); 101,16 (C, C1); 118,70 (2C, *Cb,Cf*); 127,15 (2C, *Cc,Ce*).

<u>6-déoxy-6-iodo-α –D-mannopyranoside d'isopropyle (28)</u>



Mode opératoire

La synthèse de cette molécule se fait de la même manière que pour le 6-déoxy-6-iodo-α –D mannopyranoside de pentyle (24). La réaction dure 5heures et le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune

RF= 0,55 (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v).

Rendement quantitatif

Analyse chimique

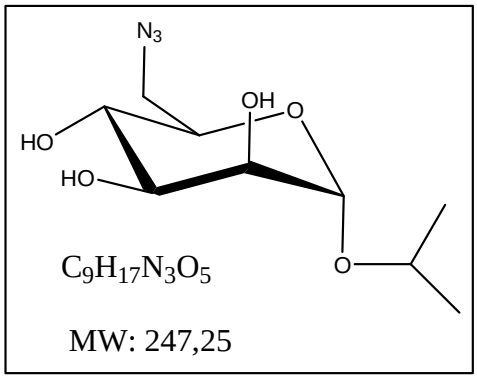
SM (ESI^+/MeOH) m/z : 355,10 $[M+Na]^+$; 687,47 $[2M+Na]^+$

RMN ^{1}H (400,13 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 1,21(m,6H, H_8,H_9);3,26 (dd, 1H, $3J_{H6a-H5}$=7,0 Hz, $2J_{H6a-H6b}$= -10,9 Hz, H_{6a}); 3,40(m, 1H, H_5); 3,53 (t; 1H; $3J_{H4-H3}$=$3J_{H4-H5}$=9,4 Hz, H_4); 3,50 (dd,

1H, $3J_{H6b-H5}$=2,2 Hz, 2JH6b-H6a= -10,9 Hz, H6b);3,69(s,1H,H_7); 3,68 (dd, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,7 Hz, $3J_{H2-H3}$=3,4 Hz, H_2); 3,70 (dd, 1H, H_3); 5,40 (d, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,5 Hz, H_1).

RMN 13C (101 MHz, CDCl3) δ (ppm) : 7,85 (C, C6); 23,78(2C,C8,C9); 69,85 (C, C4); 70,94 (C,C7); 73,84 (C, C2); 74,83(C, C3);77,50 (C, C5); 99,22 (C, C1).

6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside d'isopropyle (29)



Mode opératoire

La synthèse de cette molécule se fait de la même manière que pour le 6-déoxy-6-azido-α –D-mannopyranoside de pentyle (25). Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune après 4 heures de réaction. Le brut réactionnel est concentré est lavé avec 50ml d'H_2O. Puis la phase organique est séchée avec Na_2SO_4 puis concentrée au rotavapeur.

RF= 0,56 (CH_2Cl_2/MeOH 8/2 v/v).

Rendement 50%

Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 270,22 $[M+Na]^+$

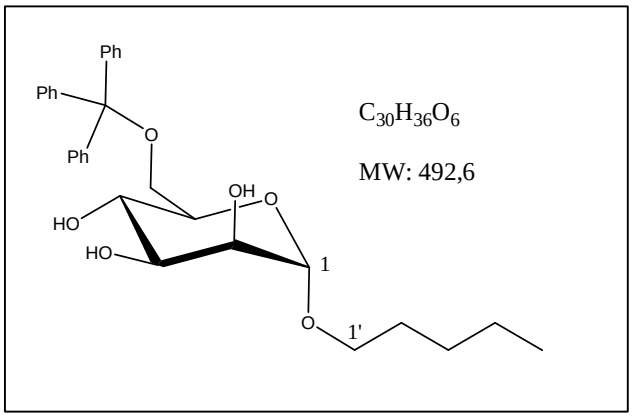
(ESI^-/MeOH) m/z : 282,18 $[M+Cl]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ (ppm) : 1,04 (m,6H, H_8,H_9);3,26 (dd, 1H, $3J_{H6a-H5=}$7,0 Hz, $2JH_{6a-H6b}$= -10,9 Hz, H6a); 3,52 (m, 1H, H5); 3,50 (dd, 1H, 3JH6b-H5=2,2 Hz, $2J_{H6b-H6a}$= -10,9 Hz, H_{6b}); 3,65(m,2H,H_3,H_4); 3,70(s,1H,H_7); 3,68 (dd, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,7 Hz, $3J_{H2-\ H3}$=3,4 Hz, H_2); 4,80 (d, 1H, $3J_{H1-H2}$=1,5 Hz, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ (ppm) : 23,80(2C,C8,C9); 52,51 (C, C6); 70,90 (C,C7); 71,89 (C, C4); 72,93 (C, C5) ; 73,80 (C, C2) ; 74,80(C, C3) ; 99,22 (C, C1).

Préparation du dérivé boronate

<u>6-trityl- α –D-mannopyranoside de pentyle (30)</u>



Mode opératoire

7g de α-D-mannopyranoside de pentyle (2) (28 mmol, 1éq) et 1,03g de DMAP (8,4mmol, 0,3éq) sont dissous dans 50ml de pyridine. 11,71g de chlorure de trityle (42mmol, 1,5éq) sont ajoutés au mélange par fractions. La réaction est laissée pendant la nuit.

Le lendemain, le milieu réactionnel est dilué dans de l'AcOEt et lavé successivement avec une solution HCl (2N), une solution de $NaHCO_3$ 5% et de l'eau glacé.

La phase organique est lavée deux fois avec une solution de $CuSO_4$ pour enlever toute trace de pyridine puis une autre fois avec de l'eau distillée.

La phase organique est séchée avec Na_2SO_4, filtrée et concentrée.

Le produit est ensuite purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec un gradient d'éluant (CH_2Cl_2/MeOH 9,5/0,5 V/V).

RF= 0,52

Rendement quantitatif

Aspect physique : mousse blanche

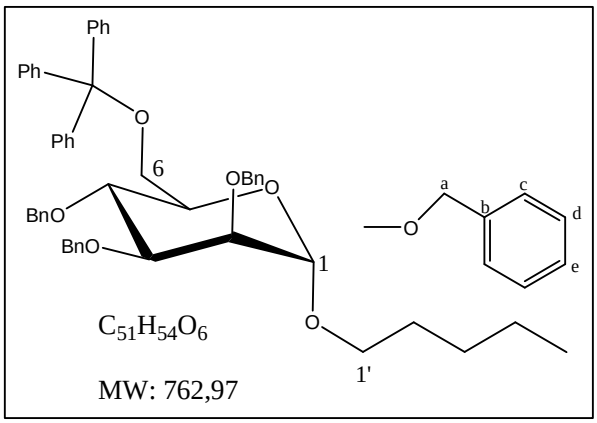
Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 515,01 $[M+Na]^+$
(ESI^-/MeOH) m/z : 491,17 $[M-H]^-$

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm) : 0,90 (m, 3H; $H_{5'}$) ; 1,43 (m, 4H; $H_{3'}$ et $H_{4'}$) ; 1,53 (m, 2H; $H_{2'}$) ; 3,46 (dt, $J_{1'a-1'b}$ = 9,6Hz ; $J_{1'a-2'}$ = 6,3Hz, 1H; $H_{1'a}$) ; 3,59 (dt, $J_{1'b-1'a}$ = 9,6Hz, $J_{1'b-2'}$ = 6,6Hz, 1H, $H_{1'b}$) ; 3,96 -3,84 (m, 3H, H_5 et H_6) ; 3,62 (m, 1H, H2) ; 3,70 (m, 1H, H4) ; 4,24-4,17 (m, 1H, H_3) ; 5,40(d, J_{1-2} = 0,6Hz, 1H_1) ; 7,30-7,37 (m, 15H,$H_{9,10,11,12,13}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 14,02 (C, C5') ; 22,94 (C, C4') ; 29,21 (C, C3') ; 29,64 (C, C2') ; 64,67 (C, C6) ; 68,19(C, C1') ; 70,93 (C, C4) ; 73,34 (C, C2) ; 74,80 (C, C3) ; 75,81 (C, C5) ; 87,18 (C,C7); 103,80 (C, C1); 144,50(3C8);128-131(15C, C9,10,11,12).

2, 3, 4- tri-O-benzyl-6-trityl- α –D-mannopyranoside de pentyle (31)



Mode opératoire

7,76g de 6-trityl-α-D-mannopyranoside de pentyle (30) (15,75mmol, 1éq) sont dissous dans 28,26ml de bromure de benzyle (236,30 mmol, 15éq). 17,67g de KOH broyés sont ajoutés (315mmol 20éq) et la température du mélange est portée à 80°C.

Le suivi de la réaction se fait par CCM avec un éluant (EP/Et_2O 8/2 V/V).

Après 2h30 le milieu réactionnel est dilué avec CH_2Cl_2 puis la phase organique est lavée à l'eau distillée, séchée sur Na_2SO_4, filtrée et concentrée.

Remarque

L'excès de bromure de benzyle est évaporé à 60°C à l'aide d'une pompe.

Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice avec un gradient d'éluant de 100% d'EP pour éliminer toute les impuretés puis passer à un gradient en EP/Et_2O 9/1 V/V).

RF=0,65 (EP/Et_2O 8/2 V/V).

Rendement 70%

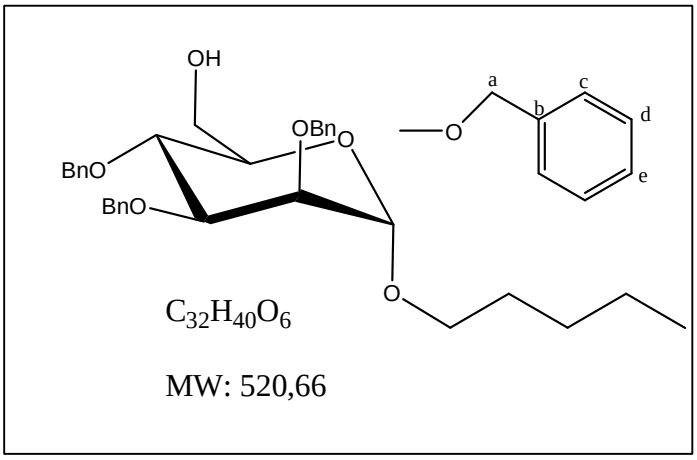
Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 785,10 $[M+Na]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm) : 0,91 (m, 3H; $H_{5'}$) ; 1,43 (m, 4H; $H_{3'}$ et $H_{4'}$) ; 1,53 (m, 2H; $H_{2'}$) ; 3,46 (dt, $J_{1'a-1'b}$ = 9,6Hz ; $J_{1'a-2'}$ = 6,3Hz, 1H; $H_{1'a}$) ; 3,50 (dt, $J_{1'b-1'a}$ = 9,6Hz, $J_{1'b-2'}$ = 6,6Hz, 1H, $H_{1'b}$) ; 3,56(dd,1H, H_{6b}) ; 3,69 (m,1H,H_5) ; 3,73 (dd, 1H, H_2) ; 3,80 (dd, 1H, H_3); 3,95 (t,1H,H_4); 4,43 (m,4H,H_a) ; 4 ,80(d, *J1-2* = 0,6Hz, 1H_1) ; 6,70-7,50 (m, 30H, $H_{9,10,11,12,13}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 14,05 (C, C5'); 22,94 (C, C4'); 29,21 (C, C3'); 29,64 (C, C2'); 64,48 (C, C6); 68,19(C, C1'); 72,57 (C, C5); 77,20 (C, C4); 79,28 (C, C3); 80,40(C, C2); 87,18 (C,C7); 101,53 (C, C1),127-132(30C,C9,10,11,12,c,d,e); 144,50(C,3C8).

2, 3, 4- tri-O-benzyl- α –D-mannopyranoside de pentyle (32)



Mode opératoire

5,90g de 2, 3, 4- tri-O-benzyl-6-trityl- α –D-mannopyranoside de pentyle (31) sont dissous dans 100ml d'un mélange (93/7 CH_3CN/H_2O V/V). 1,6g de CAN (3,1mmol, 0,4éq) sont ajoutée et la température est portée à 60°C. La réaction est suivie par CCM (EP/EtO_2 6/4 V/V). Après 2 heures 30 minutes la réaction est terminée puis le mélange réactionnel est dilué avec CH_2Cl_2. La phase organique est lavée plusieurs fois avec de l'eau distillée, l'extraction se fait difficilement car on a formation d'émulsion puis séchée avec Na_2SO_4 et concentrée.

Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice avec un gradient d'éluant 100% en CH_2Cl_2 au début puis (CH_2Cl_2/MeOH 9,5/0,5 V/V).

Rf= 0,45 (EP/EtO_2 6/4 V/V).

Rendement 60%

Aspect physique huile claire

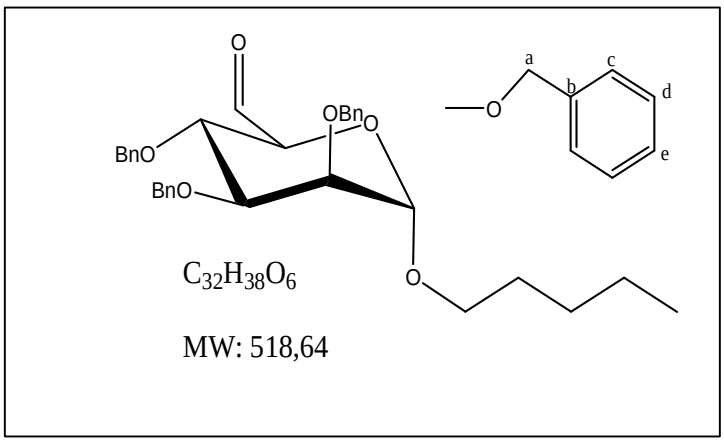
Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 543,14 $[M+Na]^+$; 521,30$[M+H]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ(ppm) : 0,97 (m, $3H_{5'}$) ; 1,38 (m, H_4, $H_{4'}$, $H_{3'}$) ; 1,60(m, 2H, $H_{2'}$) ; 3,46 (m, 1H, $H_{1'}$) ; 3,57 (m, 1H, H_5) ; 3,74 (m, 3H, H6a, H_2); 3,81 (dd, 1H, H_{6b}) ; 3,86 (dd,1H, H_3) ; 3,93(t,1H ,H_4); 4,65(m,3H, H_a); 4,80 (d,1H, H_1); 7,24-7,31(m,15H, Hc,d,e).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ (ppm) : 7,26 (C,C7); 14,02 (C, C5') ; 22,94 (C, C4'); 29,21 (C, C3') ; 29,64 (C, C2'); 62,18 (C, C6) ; 68,20(C, C1') ; 73,01 (C, C3) ; 74,17 (C, C5) ; 77,95 (C, C4) ; 80,40 (C, C2) ; 101,53(C, C1); 127-138 (15C,C9,10,11,12).

2,3,4-tri-O-benzyl-6-déoxy-6-oxy-α–D-mannopyranoside de pentyle (33)



Mode opératoire

Dans un ballon bicol et sous un courant d'azote, 0,6ml de $(COCl)_2$ (5,92mmol, 1,1éq) sont dilués dans 12ml de THF anhydre. Le mélange réactionnel est refroidi à -60°C. 1ml de DMSO (12,91mmol, 2,4éq) est alors ajouté goutte à goutte.

Un dégagement gazeux se produit. Après 10 min sous agitation, 2,8g du composé 2,3,4-tri-O benzyl-α-D-mannopyranoside de pentyle (32) (5,38mmol,1éq) dissous dans 9ml de THF anhydre est ajouté goutte à goutte. Après 15minutes d'agitation à -60°C, 4,7ml de DIEA (26,9 mmol, 5éq) sont ajoutés goutte à goutte. Après 15min sous agitation à -60°C, le mélange réactionnel est laissé à température ambiante pendant 1h30 min puis le THF est évaporé. Du CH_2Cl_2 est alors ajouté pour solubiliser le brut obtenu, puis de l'eau est versée sur le mélange réactionnel. La phase organique est extraite, séchée avec Na_2SO_4, filtrée, concentrée et purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (EP/Et_2O 8/2 V/V) pour donner notre produit désiré.

Rf=0,30 (EP/Et_2O 6/4 V/V).

Rendement quantitatif

Aspect physique : huile claire.

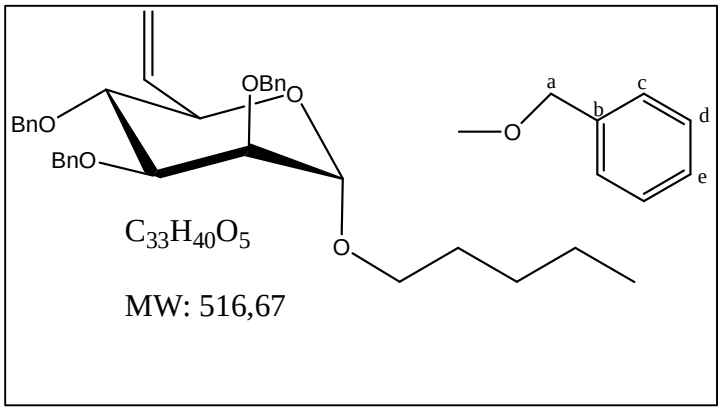
Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 541,65$[M+Na]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm) : 0,97 (m, $3H_{5'}$) ; 1,38 (m, H_4, $H_{4'}$, $H_{3'}$) ; 1,60(m, 2H, $H_{2'}$) ; 3,46 (m, 1H, $H_{1'}$); 3,72(t,1H,H_2) ;3,86 (dd,1H, H_3) ; 3,93(t,1H,H_4); 4,50 (m,1H,H_5) ; 4,69 (m,6H, H_a); 4,78 (d,1H, H_1); 7,25-7,33(m,15H, Hc,d,e) ; 9,71(s,1H,H_6).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 7,26 (C,C7); 14,03 (C, C5') ; 22,94 (C, C4'); 29,21 (C, C3') ; 29,64 (C, C2') ; 68,19(C, C1') ; 72,76 (C, C5) ; 76,72 (C, C4) ; 79,68 (C, C3) ; 80,40 (C, C2) ; 100,76(C, C1); 127-138 (15C,C9,10,11,12);193,56 (C, C6).

2,3,4-tri-O-benzyl-6-déoxy-6-allyl-α–D-mannopyranoside de pentyle (34)



Mode opératoire

2,48g de bromure de triméthyle phosphonium (6,94mmol, 1,2éq) sont dissous dans 30 ml de THF anhydre avant d'ajouter sous atmosphère d'argon à-5°C 1,60ml de BuLi (17,34mmol,3éq). L'agitation est maintenue pendant 30min à -5°C, la solution devient jaune puis 3g de 2,3,4-tri-O-benzyl-6-déoxy-6-oxy-α-D-mannopyranoside de pentyle (33) (5,78mmol,1éq)dissous au préalable dans 20ml de THF anhydre sont ajoutés à la solution à -78°C.

Après 2 heures sous agitation à la même température puis laisser pendant la nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué dans du EtO_2 puis lavé avec une solution

de NH_4Cl. La phase organique est ensuite séchée avec du Na_2SO_4, filtrée, concentrée et purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (AcOEt/EP 2/8 V/V).

Rf=0,60 (AcOEt/EP 3,5/6,5 V/V).

Rendement 70%

Aspect physique : huile claire.

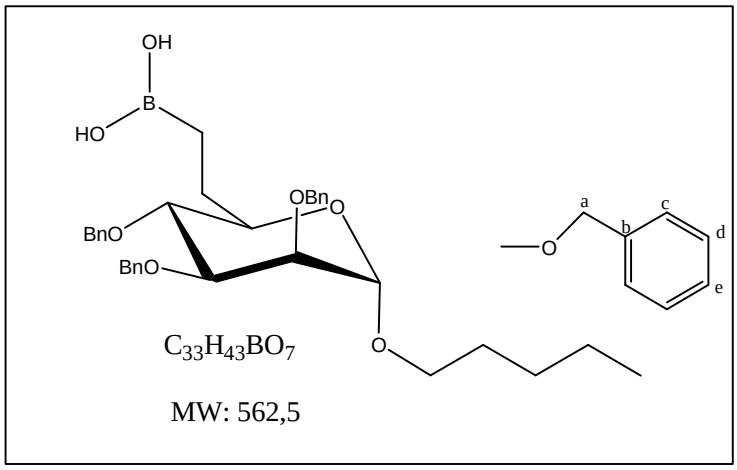
Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 539,00 $[M+Na]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) δ(ppm) : 0,97 (m, $3H_{5'}$) ; 1,38 (m, H_4, $H_{4'}$, H3') ; 1,60(m, 2H, $H_{2'}$) ; 3,46 (m, 1H, $H_{1'}$); 3,71(t,1H,H_4) ; 3,75(dd,1H,H2) ;3,86 (dd,1H, H3); 4,45 (m,1H,H_5) ; 4,72(d,2H,H_a) ; 4,80 (d,1H, H_1); 5,21(2m ,1H,H_{7a}) ; 5,43 (2m,1H,H_{7b}) ; 5,89(m,1H,H_6) ; 7,21-7,34(m,15H, Hc,d,e).

RMN ^{13}C (101 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 14,02 (C, C5') ; 22,94 (C, C4') ; 29,21 (C, C3') ; 29,64 (C, C2') ; 68,18(C, C1') ; 71,18 (C, C5) ; 77,31 (C, C4) ; 79,28 (C, C3) ; 80,40 (C, C2) ; 100,76(C, C1); 119,49(C,C7); 127-137 (15C,C9,10,11,12); 139,21 (C, C6).

Acide (2,3,4-tri-O-benzyl-6,7-didéoxy-α–D-mannopyranoside de pentyle) boronique (35)



Mode opératoire

2,30g de 2,3,4-tri-O-benzyl-6-déoxy-6-allyl-α-D-mannopyranoside de pentyle (34) (4,45mmol, 1éq) sont dissous dans 35ml de pentane avant d'ajouter sous argon à -78°C, 0,42ml de tribromure de bore (4,45mmol, léq) et 0,71 ml de triéthyl silane (4,45mmol, 1éq).

L'agitation est maintenue pendant 4 heures à la même température, puis pendant 16 heures à température ambiante. 0,36g de soude (8,90mmol, 2éq) sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel et agité pendant 30 minutes. La solution est par la suite diluée dans l'AcOEt puis lavée à l'eau. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée, concentrée puis purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (AcOEt/EP 2/8 V/V) pour donner une huile beige avec un rendement de 90%.

Rf=0,40 (AcOEt/EP 4/6 V/V)

Aspect physique huile beige

Analyse chimique

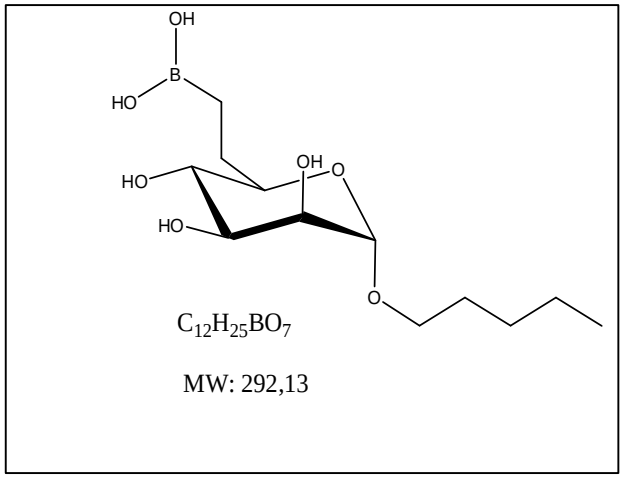
SM (ESI^+/MeOH) m/z : 585,09 $[M+Na]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) δ(ppm) : 0,97 (m, $3H_{5'}$) ; 1,38 (m, H4, H4', $H_{3'}$) ; 1,60(m, 2H, $H_{2'}$) ; 3,33(dd,1H,H_{6a}) ; 3,46 (m, 1H, $H_{1'}$); 3,52 (m,1H,H_5,H_3); 3,78(t,1H,H_4) ;3,86 (m,1H,

H_2) ; 4,61-5,01(m,6H,H_a) ; 4,80 (d,1H, H_1); 5,20 (m ,2H,H_7); 5,57(dd,1H,H_{6b}) ; 7,27-7,45 (m,15H, Hc,d,e).

RMN ^{13}C (101 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 7,26 (C,C7); 14,02 (C, C5') ; 22,94 (C, C4') ; 26,96 (C, C6) ; 29,21 (C, C3') ; 29,64 (C, C2') ; 68,18(C, C1') ; 76,05 (C, C5) ; 79,28 (C, C3) ; 79,95 (C, C4) ; 80,40 (C, C2) ; 101,53(C, C1); 127-138 (15C,C9,10,11,12).

Acide (6,7-didéoxy-α–D-mannopyranoside de pentyle) boronique (36)



Mode opératoire

0,820g d'acide (2,3,4-tri-O-benzyl-6,7-didéoxy-6-α-D-mannopyranoside de pentyle) boronique (35) et de Pd/C 10% (0,44mmol, 0,3éq) sont mis en solution dans d'un mélange (THF/MeOH 1/1 V/V) préalablement dégazé. Le mélange est mis sous atmosphère d'hydrogène à l'aide d'un ballon rempli d'hydrogène et laissé sous agitation magnétique pendant 24 heures.

Après filtration du Pd/C sur célite et évaporation des solvants organiques, on obtient un produit sous forme d'huile beige.

RF= 0,56 (IPrOH/NH_4Cl 5/5 V/V).

Rendement 80%

Aspect physique : huile beige.

Analyse chimique

SM (ESI^+/MeOH) m/z : 315,14 $[M+Na]^+$

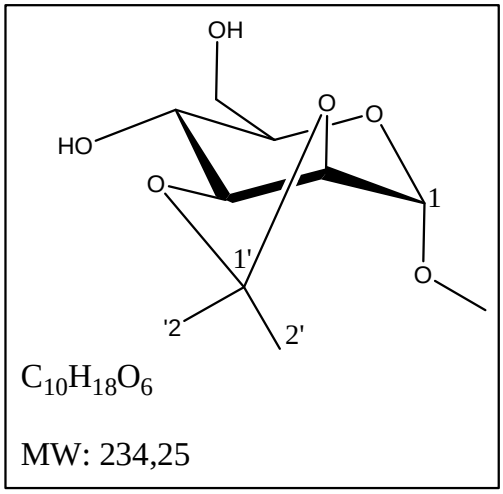
RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ(ppm) : 0,97 (m, $3H_{5'}$); 1,38 (m, H_4, $H_{4'}$, $H_{3'}$); 1,57(m,1H,H_{7a}); 1,60 (m, 2H, $H_{2'}$); 1,88(m,1H,H_{7b}); 2,70(m,1H,H6a); 2,78(m,1H,H_{6b}) ; 3,36 (t,1H,H_4); 3,45(td,1H,H_5); 3,48(dd,1H,H_3) ; 3,57 (m, 1H, $H_{1'}$); 3,82 (dd,1H, H_2) ; 4,56-4,65 (m,6H,Ha) ; 4,78 (d,1H, H_1); 7,18-7,33 (m,15H, Hc,d,e).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ (ppm) : 7,26 (C,C7); 14,02 (C, C5') ; 22,95 (C, C4') ; 26,72 (C, C6) ; 29,23 (C, C3') ; 29,64 (C, C2') ; 68,20(C, C1') ; 72,77 (C, C4) ; 73,34 (C, C2) ; 74,80 (C, C3) ; 79,39 (C, C5) ; 103,79(C, C1).

Préparation des phosphonates

- **Préparation du sulfate cyclique**

<u>2,3-O-isopropylidène α–D-mannopyranoside de méthyle (37)</u>



Mode opératoire

Le 2,3-O-isopropylidène-α-D-mannopyranoside de méthyle (1) est obtenu en deux étapes « one pot », via le 2,3,4,6-di-O-isopropylidène correspondant :

Formation du di-O-isopropylidène

5g de α-D-mannopyranoside de méthyle (25,75mmol,1 éq) (1) pilés au mortier sont mis en suspension dans 25ml d'acétone avant d'ajouter 15,83ml de diméthoxy propane (128,75mmo,5éq) ainsi que 245,38mg d'acide para-toluène sulfurique (1,29mmol,0,05éq).

Le mélange est laissé sous agitation magnétique à température ambiante jusqu'à ce que le solide soit dissous (2 heures, plus si l' α-D-mannopyranoside de méthyle n'est pas pilé au préalable).

Un suivi par CCM (AcOEt) indique alors qu'il ne reste plus de produit de départ, un peu de 2,3-O-isopropylidène (Rf=0,52) est observé, mais le produit majoritaire est le di-O-isopropylidène désiré (Rf=0,78).

Ouverture sélective

5ml d'eau sont ajoutés au mélange réactionnel et l'agitation magnétique est poursuivie.

La réaction de déprotection sélective du 4,6-O-isopropylidène est suivie par CCM et dure environ 35 minutes.

Si elle est laissée trop longtemps, des cristaux de l' α-D-mannopyranoside de méthyle commencent à précipiter.

L'acide para-toluène sulfonique est neutralisé avec une solution de $NaHCO_3$ (10%) et le mélange est concentré.

Le di-O-isopropylidène n'ayant pas réagit est extrait à l'éther de pétrole, puis la phase aqueuse est saturée avec du NaCl et le 2,3-O-isopropylidène désiré est récupéré par extraction continue au CH_2Cl_2. Puis ces opérations sont suivies par CCM. La phase organique est ensuite séchée avec Na_2SO_4, filtrée et concentrée pour donner un solide blanc.

Caractérisation du mono isopropylidène :

Rf= 0,52 (AcOEt)

Rendement : 70% sur les 2 étapes.

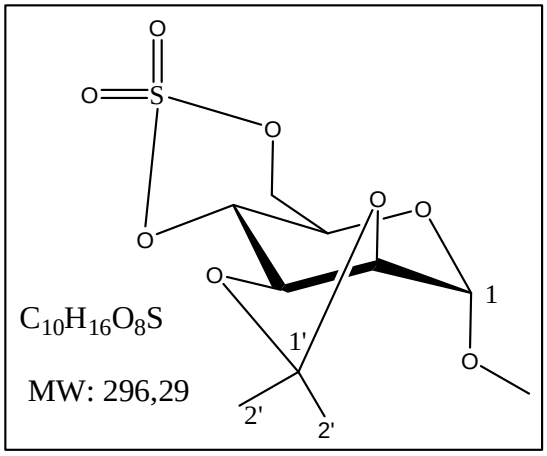
Analyse chimique

SM : (ESI^+/MeOH) m/z : 257,34 $[M+H]^+$; 491,61 $[2M+Na]^+$.
(ESI^-/MeOH) m/z : 233,56 $[M+H]^-$; 467,20 $[2M+Na]^-$.

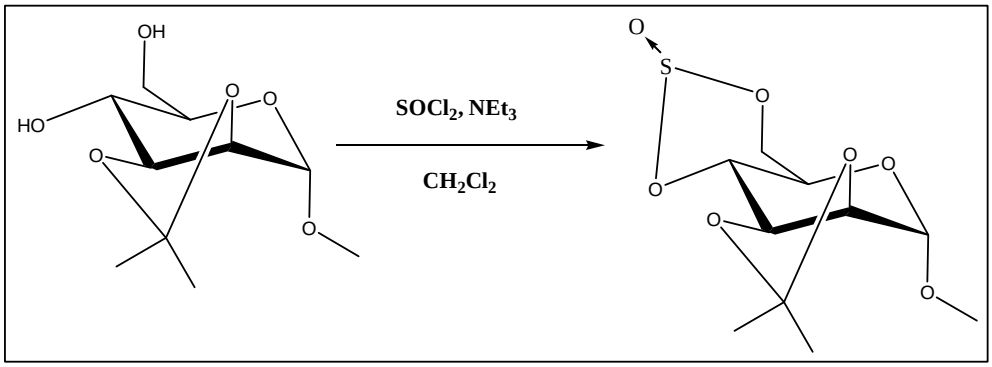
RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ (ppm) : 1,28 et 1,42 (2s, 6H, $H_{2'}$); 3,35 (s, 3H, -OCH3); 3,46 (ddd, 1H, J_{H5-H4} = 10,2 Hz, J_{H5-H6a} = 2,6 Hz, J_{H5-H6b} = 5,6 Hz, H_5); 3,52 (dd, 1H, J_{H4-H5} = 10,2 Hz, J_{H4-H3} = 6,9 Hz, H_4); 3,65 (dd, 1H, J_{H6b-H5} = 5,8 Hz, $J_{H6b-H6a}$ = -12,0 Hz, H_{6b}); 3,81 (dd, 1H, J_{H6a-H5} = 2,6 Hz, $J_{H6a-H6b}$ = -11,9 Hz, H_{6a}); 4,01 (dd, 1H, J_{H3-H4} = 6,9 Hz, J_{H3-H2} = 5,7 Hz, H_3); 4,06 (dd, 1H, J_{H2-H3} = 5,7 Hz, J_{H2-H1} = 0,8 Hz, H_2).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ (ppm) : 26,5 et 28,3 (2C, C2'); 55,5 (1C, -O*C*H3); 62,7 (1C, C6); 69,7 (1C, C5); 70,0 (1C, C4); 75,9 et 78,8 (2C, C2 et C3); 98,8 (1C, C1); 110,0 (1C, C1').

2,3-O-Isopropylidène-4,6-O-(sulfate cyclique)-α-D-mannopyranoside de méthyle (38)



Le sulfate cyclique est obtenu en deux étapes sans purification intermédiaire via le sulfite correspondant.



Mode opératoire

3,4g de 2,3-isopropylidène-α-D-mannopyranoside de méthyle (37) (14,51mmol,1éq) et 6,1ml de triéthyl amine (43,54mmol,3éq) sont dissous dans 68ml de CH_2Cl_2.

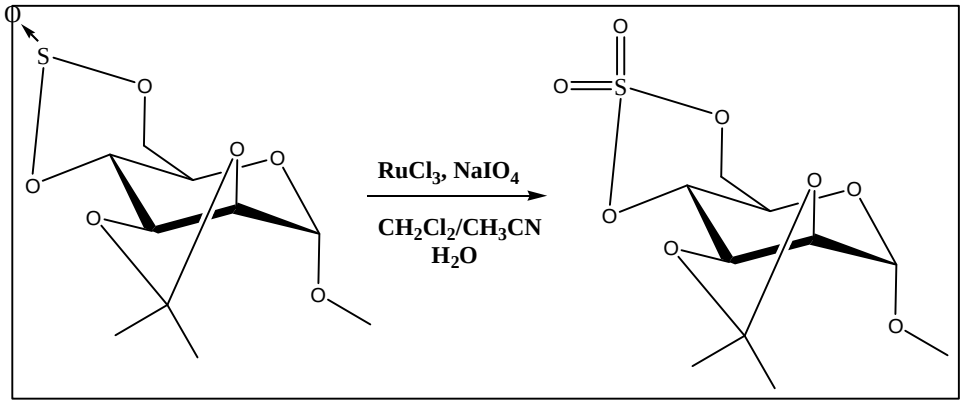
Le mélange est refroidi à 0°C et 1,2ml de $SOCl_2$ (15,96mmol, 1,1éq) sont ajoutés lentement, un précipité blanc de chlorure de triéthyl ammonium se forme instantanément et le mélange devient progressivement jaune puis marron dans les 10 minutes qui suivent.

Une CCM (EP/AcOEt 6/4 v/v) indique alors qu'il ne reste plus de produit de départ. Le produit est obtenu sous forme de deux diastéréoisomères (Rf=0,45 et Rf= 0,60).

Le mélange réactionnel est alors filtré et la phase organique est lavée avec de l'eau distillée, une solution d'HCl (1N) puis à nouveau avec de l'eau distillée.

Cette phase est séchée avec Na_2SO_4 puis filtrée et concentrée pour donner un solide légèrement marron qui est directement remis en réaction.

Oxydation en sulfate



Mode opératoire

Le sulfite brut (14,27 mmol - 1 éq, théoriquement) est dissous dans 60 ml d'une solution CH_2Cl_2/CH_3CN 1/1 v/v avant d'ajouter successivement 3,36 g de métapériodate de sodium (15,70 mmol -1,1 éq), 20 ml d'eau et 12 mg de chlorure de ruthénium (0,06 mmol - 0,004 éq). La réaction est exothermique, et la formation du précipité de $NaIO_3$ s'observe très rapidement. Après 1 heure de réaction, il ne reste plus de sulfite et seul le sulfate est observé sur CCM. (Si la réaction « traîne » un peu, l'ajout d'une pointe de spatule de $NaIO_4$ suffit à la compléter dans les minutes suivantes.) Le mélange réactionnel est alors filtré et dilué avec 100 ml de CH_2Cl_2. L'eau résiduelle de la réaction est supprimée et la phase organique est lavée 2 fois avec une solution de $NaHCO_3$ 5%, puis avec de l'eau distillée. Elle est ensuite séchée (Na_2SO_4), filtrée et concentrée pour donner un solide légèrement marron. Ce solide est

dissous dans un minimum de CH_2Cl_2 en présence de charbon actif, et filtré sur silice. La silice est rincée avec 300 ml de CH_2Cl_2. Les impuretés marron, contenant les sels de ruthénium, restent à la surface. Le solide blanc obtenu sera utilisé sans aucune autre purification.

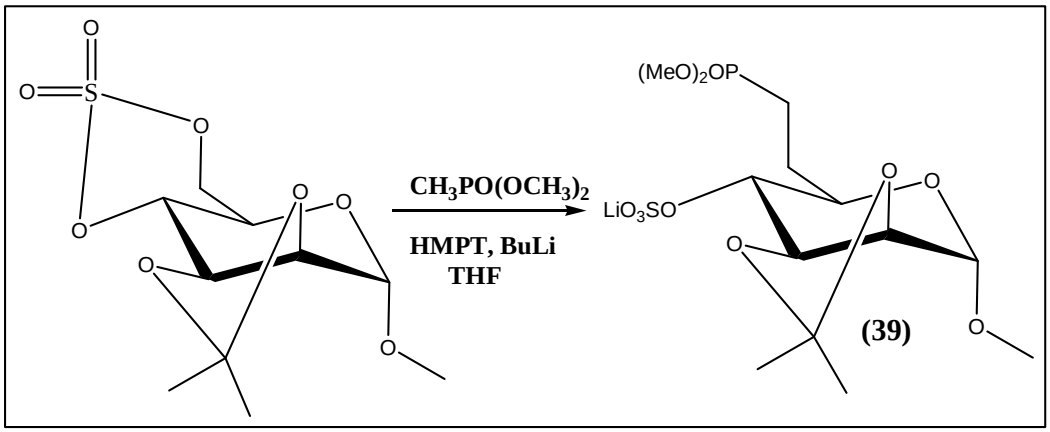
Aspect physique : Solide blanc.
Rendement : 85% sur les 2 étapes.
Rf: 0,48 (EP/AcOEt 6/4 V/V).
Analyse chimique
SM: (ESI^+/MeOH) m/z : 297,60 $[M+H]^+$, 319,45 $[M+Na]^+$.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 1,38 et 1,53 (2s, 6H, $H_{2'}$); 3,46 (s, 3H, -OC*H*3); 4,17 (td, 1H, $J_{H5-H4} = J_{H5-H6b}$ = 10,6 Hz, J_{H5-H6a} = 5,5 Hz, H_5); 4,32 (dd, 1H, J_{H2-H3} = 5,6 Hz, J_{H2-H1} = 0,4 Hz, H_2); 4,42 (dd, 1H, J_{H3-H2} = 5,6 Hz, JH3-H4 = 7,7 Hz, H_3); 4,59 (dd, 1H, J_{H4-H3} = 7,8 Hz, J_{H4-H5} = 10,4 Hz, H_4); 4,64 (t, 1H, J_{H6b-H5} = 10,7 Hz, $J_{H6b-H6a}$ = -10,7 Hz, H_{6b}); 4,87 (dd, 1H, J_{H6a-H5} = 5,5 Hz, $J_{H6a-H6b}$ = -10,5 Hz, H6a); 5,01 (d, 1H, J_{H1-H2} = 0,5 Hz, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 26,4 et 28,3 (2C, C2'); 56,1 (1C, -O*C*H3); 58,9 (1C, C5); 72,3 (1C, C6); 73,6 (1C, C3); 76,3 (1C, C2); 84,6 (1C, C4); 99,4 (1C, C1); 111,0 (1C, C1').

- **Attaque nucléophile sur le sulfate**

6-Désoxy-6-diméthoxyphosphinylméthylène-4-lithiumsulfate-2,3-O-isopropylidène-α-D-mannopyranoside de méthyle (39)



Mode opératoire

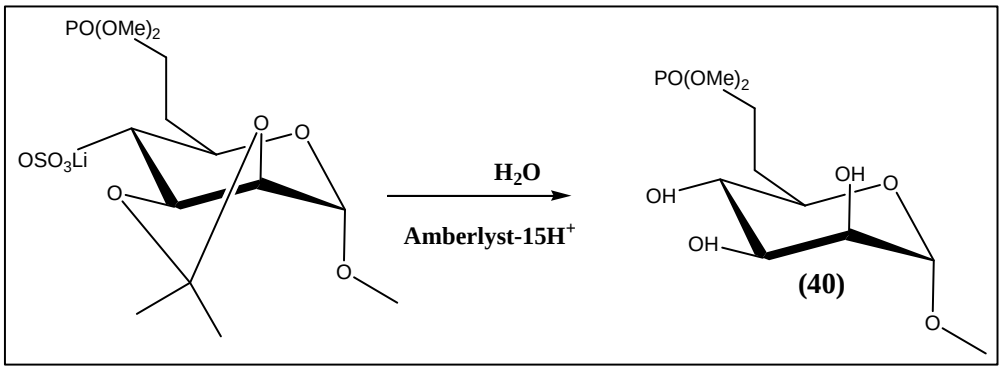
Sous argon, 0,84g de diisopropyl méthyle phosphonate (6,74 mmol - 2 éq) et 3 gouttes de 1,1-diphényléthylène (indicateur coloré) sont dissous dans 8 ml de THF anhydre. Le mélange est refroidi à -78°C et le butyl lithium (4,38 mmol - 1,3 éq) est ajouté goutte à goutte. Une couleur rouge (dûe au 1,1-diphénylhexyllithium) apparaît petit à petit. L'addition du butyl lithium est stoppée, la couleur rouge foncée persiste. Après 5 minutes sous agitation à la même température, 1g de sulfate cyclique (38) (3,37 mmol - 1 éq.) dissous dans 10 ml de THF anhydre sont ajoutés lentement au mélange. La couleur rouge disparaît rapidement. 1ml de HMPT (6,74 mmol - 2 éq) sont alors ajoutés. Le mélange est laissé revenir à température ambiante. Après 15 minutes, tout le produit de départ est consommé. Le milieu réactionnel est alors dilué avec 20 ml de CH_2Cl_2. Le produit est extrait par 2 x 10 ml d'eau distillée. Cette phase aqueuse est ensuite lavée au CH_2Cl_2 jusqu'à ce que les impuretés organiques, comme le diphényléthylène et le HMPT soient éliminées. Après lyophilisation, le solide obtenu est directement remis en réaction, sans aucune autre purification.

Rendement : Quantitatif.

Rf : 0,34 (CH_2Cl_2/MeOH 8,5/1,5 V/V).

- **Déprotection des alcools 2,3 et 4**

6-Désoxy-6-diméthoxyphosphinylméthylène-α-D-mannopyranoside de méthyle (40)



Mode opératoire

793mg (1,73mmol-1éq.) du 6-Désoxy-6-diméthoxy phosphinyl méthylène-4-lithiumsulfate-2,3- *O*-isopropylidène-α-D-mannopyranoside de méthyle (39) sont dissous dans 15 ml d'eau distillée, avant d'ajouter 500 mg de résine Amberlyst-15 H^+. Après 3 heures de réaction, les résines sont filtrées et la phase aqueuse est lyophilisée. Le solide obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH_2Cl_2/MeOH 8/2 v/v) pour donner une poudre blanche.

Aspect physique : Poudre blanche.

Rendement : 90%.

Rf = 0,20 (CH_2Cl_2/MeOH 8/2 V/V).

Analyse chimique

SM : (ESI^+/MeOH) m/z : 323,06 $[M+Na]^+$

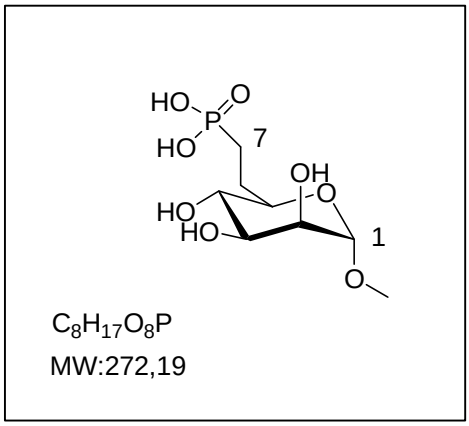
(ESI^-/MeOH) m/z : 355,19 $[M+Cl]^-$.

RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 1,94 et 2,17 (2m, 4H, H_6 et H_7); 3,36 (s, 3H, -OCH3); 3,20 (m, 1H, H_5); 3,74 et 3,77 (2m, 6H, H_8); 3,87 (m, 2H, H_2 et H_3); 4,32 (t, 1H, $3J_{H4-H3} = 3J_{H4-H5} = 9,2$ Hz, H_4); 4,64 (s, 1H, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 20,9 et 25,3 (C6 et C7); 53,1 et 53,6 (C8); 55,4 (-OCH3); 70,3 (C5); 71,5 et 71,8 (C2 et C3); 78,4 (C4); 102,2 (C1).

RMN ^{31}P (162 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 30,84.

<u>6,7-didéoxy-phosphinyl- α-D-mannopyranoside de méthyle (41)</u>



Mode opératoire

450 mg (1,65 mmol - 1 éq) du 6-Désoxy-6-diméthoxy phosphinyl méthylène-α-D-mannopyranoside de méthyle (40) sont dissous dans 4 ml de CH_2Cl_2. Ensuite est ajoutée, goutte à goutte, une solution formée de 632 mg (4,13mmol - 2,5 éq) de TMSBr dans 4 ml de CH_2Cl_2. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique pendant 12h à température ambiante. Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est concentré et le produit obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (*i*PrOH/NH_4OH 8/2 v/v) pour donner une mousse blanche.

Aspect physique : Mousse blanche.

Rendement : 84%.

Rf : 0,24 (*i*PrOH/NH_4OH 8/2 v/v).

Analyse chimique

SM: (ESI^+/MeOH) m/z : 273,41 $[M+H]^+$, 295,86 $[M+Na]^+$.

(ESI^-/MeOH) m/z : 271,35 $[M-H]^-$.

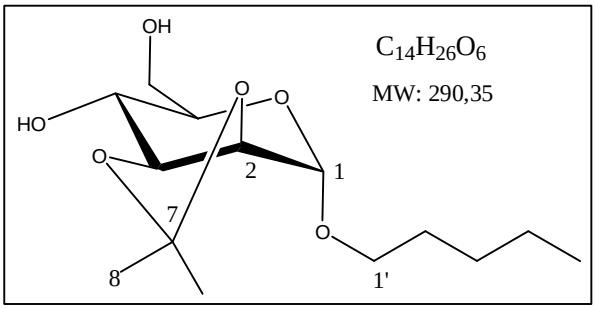
RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 1,89 et 2,10 (2m, 4H, H_6 et H_7); 3,32 (s, 3H,-OCH3); 3,21- 3,22 (m, 1H, H_5); 3,72-3,76 (2m, 6H, H_8); 3,91 (m, 2H, H_2 et H_3); 4,40 (t, 1H, $3J_{H4-H3}$ =8,7 Hz, $3J_{H4-H5}$ = 9,3 Hz, H_4); 4,68 (s, 1H, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 21,8 et 25,1 (C6 et C7); 53,1 et 53,6 (C8); 55,3 (-O*C*H3); 69,4 (C5); 71,7 et 72,1 (C2 et C3); 79,3 (C4); 101,2 (C1).

RMN ^{31}P (162 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 32,24.

- **Préparation du sulfate cyclique**

<u>2,3-O-isopropylidène α–D-mannopyranoside de pentyle (42)</u>



Mode opératoire

Le 2,3-O-isopropylidène-α-D-mannopyranoside de pentyle est obtenu en deux étapes « one pot », via le 2,3,4,6-di-O-isopropylidène correspondant :

Formation du di-O-isopropylidène

5g de α-D-mannopyranoside de pentyle (2) (19,98 mmol, 1éq) sont mis en suspension dans 25ml d'acétone avant d'ajouter 12,3 ml de diméthoxy propane (99,9 mmol, 5éq) ainsi que 0,20g d'acide para-toluène sulfurique (0,99 mmol, 0,05éq).

Le mélange est laissé sous agitation magnétique à température, au bout de 2 heures la réaction est terminée.

Un suivi par CCM (AcOEt) indique alors qu'il ne reste plus de produit de départ, un peu de 2,3-O-isopropylidène (Rf=0,53) est observé, mais le produit majoritaire est le di-O-isopropylidène désiré (Rf=0,78).

Ouverture sélective

5ml d'eau sont ajoutés au mélange réactionnel et l'agitation magnétique est poursuivie. La réaction de déprotection sélective du 4,6-O-isopropylidène est suivie par CCM et dure environ 40 minutes.

L'acide para-toluène sulfonique est neutralisé avec une solution de $NaHCO_3$ (10%) et le mélange est concentré.

Le di-O-isopropylidène n'ayant pas réagit est extrait à l'éther de pétrole, puis la phase aqueuse est saturée avec du NaCl et le 2,3-O-isopropylidène désiré est récupéré par extraction continue au CH_2Cl_2. Puis ces opérations sont suivies par CCM. La phase organique est ensuite séchée avec Na_2SO_4, filtrée et concentrée pour donner une huile incolore.

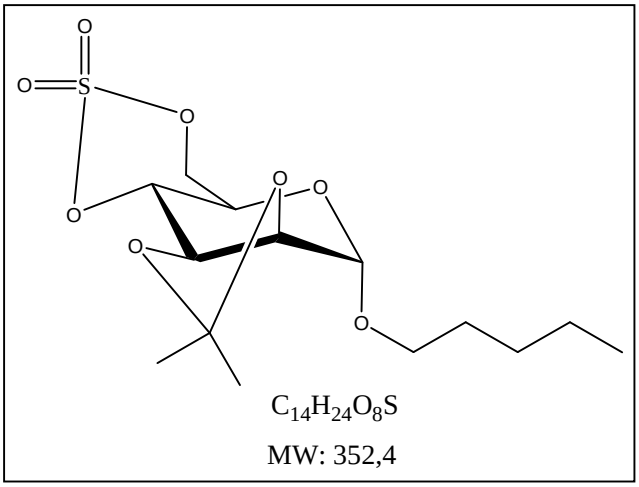
Rf: 0,53 (AcOEt)
Rendement : 54%
SM : (ESI^+/MeOH) 313,10 $[M+Na]^+$; 291,40 $[M+H]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ (ppm) : 0,91, 0,87 (m, 3H, $H_{5'}$) ; 1,29 (s, 3H, $H_{13'}$) ; 1,37-1,32 (m, 4H, $H_{3'}$ et $H_{4'}$) ; 1,41 (s, 3H, H_{13}) ; 1,57 (m, 2H, $H_{2'}$) ; 3,41 (dt, J_{7b-7a} = 6.4Hz, J_{7b-8} = 9,6Hz, 1H, $H_{1b'}$) ; 3,53 - 3,51 (dd, J_{3-4} = 3,0Hz, J_{3-2} = 5,4Hz, 1H, H_3) ; 3,68 -3,62 (m, 1H, H_{6b}) ; 3,75 (dt, J_{7a-b} = 6,7Hz, J_{7a-8} = 9,6Hz, 1H, H1a') ; 3,81 (ddd, J_{6a-4} = 3,2Hz, J_{6a-5} = 6,8Hz, J_{6a-6b} = 12,2, 1H, H_{6a}) ; 4,00 (dd, J_{4-3} = 4,9Hz, J4-5 = 11,2Hz, 1H, H_4) ; 4,08 - 4,04 (m, 1H, H_5) ; 4,37 (d, J_{2-3} = 5,1Hz, 1H, H_2) ; 4,93 (s, 1H, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ (ppm) : 14,39 (C, C5') ; 23,22 (2C, C3' et C4') ; 26,61 (C, C8) ; 28,45 (2C, C2' et C8') ; 62,80 (C, C6) ; 67,84 (C, C1') ; 70,3 (C, C3) ; 71,57 (C, C7) ; 76,80 (C, C5) ; 80,08 (C, C4) ; 97,87 (C, C1) ; 109,64 (C, C2).

2,3-O-Isopropylidène-4,6-O-(sulfate cyclique)-α-D-mannopyranoside de pentyle (43)

.



Le sulfate cyclique est obtenu en deux étapes sans purification intermédiaire via le sulfite correspondant.

Préparation du sulfite

Mode opératoire

1,4g de 2,3-isopropylidène α-D-mannopyranoside de pentyle (42)(4,82 mmol,1éq) et 2,02ml de triéthyl amine (14,47mmo 3éq) sont dissous dans 30ml de CH_2Cl_2.

Le mélange est refroidi à 0°C et 0,385ml de $SOCl_2$ (5,30mmol, 1,1éq) sont ajoutés lentement, un précipité blanc de chlorure de triéthyl ammonium se forme instantanément et le mélange devient progressivement jaune puis marron dans les 30 minutes qui suivent.

Une CCM (EP/AcOEt 7/3 v/v) indique alors qu'il ne reste plus de produit de départ. Le produit est obtenu sous forme de deux diastéréoisomères (Rf=0,83 et Rf= 0,71).

Le mélange réactionnel est alors filtré et la phase organique est lavée avec de l'eau distillée, une solution d'HCl (1N) puis à nouveau avec de l'eau distillée.

Cette phase est séchée avec Na_2SO_4 puis filtrée et concentrée pour donner une huile jaune qui est directement remis en réaction.

Oxydation en sulfate

Mode opératoire

Le sulfite brut (4,46 mmol, 1 éq, théoriquement) est dissous dans 30 ml d'une solution CH_2Cl_2/CH_3CN 1/1 v/v avant d'ajouter successivement 1,05 g de métapériodate de sodium (4,91 mmol -1,1 éq), 10 ml d'eau et 9 mg de chlorure de ruthénium (0,018 mmol, 0,004 éq). La réaction est exothermique, et la formation du précipité de $NaIO_3$ s'observe très rapidement. Après 2 heures 30 minutes de réaction, il ne reste plus de sulfite et seul le sulfate est observé sur CCM. (Si la réaction « traîne » un peu, l'ajout d'une pointe de spatule de $NaIO_4$ suffit à la compléter dans les minutes suivantes.)

Le mélange réactionnel est alors filtré et dilué dans 30 ml de dichlorométhane. L'eau résiduelle de la réaction est supprimée et la phase organique est lavée 1 fois avec une solution de $NaHCO_3$ 5%, puis à l'eau. Elle est séchée au Na_2SO_4, filtrée et concentrée pour donner une huile légèrement marron. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (EP/AcOEt ; 7/3 ; v/v) pour donner une huile incolore

Rf: 0, 83 (EP/AcOEt 7/3 v/v).

Rendement : 75%

Analyse chimique

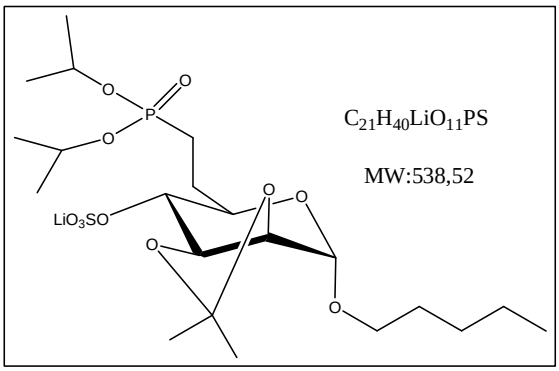
SM : (ESI^+/MeOH) : 353,75 $[M+H]^+$; 375,20 $[M+Na]^+$

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ (ppm) : 0,90 (t, $J_{5'-4'}$ = 7,2Hz, 3H, $H_{5'}$) ; 1,39 -1,33 (m, 7H, $H_{8'}$ et $H_{3'}$ et $H_{4'}$) ; 1,51 (s, 3H, H_8) ; 1,66 - 1,59 (m, 2H, $H_{2'}$) ; 3,52 (dt, $J_{1b'-1a'}$ = 9,6Hz, $J_{1b'-2}$ = 6,5Hz, 1H, $H_{1b'}$) ; 3,79 (dt, $J_{1a'-1b'}$ = 9,6Hz, $J_{1a'-2'}$ = 6,6Hz, 1$H_{1a'}$) ; 4,18 (td, J_{5-4} = J_{5-6a} = 10,5Hz, J_{5-6b} = 5,3Hz, 1H_5) ; 4,32 (d, J_{2-3} = 5,6, 1H, H_2) ; 4,42 (dd, J_{3-4} = 7,8Hz, J_{3-2} = 5,6Hz,1H, H_3) ; 4,57 (dd, J_{4-5} = 10,5Hz, J_{4-3} = 7,8Hz, 1H, H_4) ; 4,61 (t, J_{6a-6b} = J_{6a-5} = 10,7Hz, 1H, H_{6a}) ; 4,82 (dd, J_{6b-6a}= 10,5Hz, J_{6b-5} = 5,5Hz, 1H, H_{6b}) ; 5,16 (s, 1H, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ (ppm) : 14,28 (C, C5') ; 23,12 (C, C4') ; 26,20 (C, C2') ; 28,19 (2C, C8' et C3') ; 28,93 (C, C8) ; 59,14 (C, C5) ; 68,99 (C, C7) ; 73,45 (C, C6) ; 74,05 (C, C3) ; 77,13 (C, C2) ; 85,91 (C, C4) ; 98,71 (C, C1) ; 100,89 (C, C8).

Attaque nucléophile sur le sulfate

<u>6-Désoxy-6-diméthoxyphosphinylméthylène-4-lithiumsulfate-2,3-O-isopropylidène-α-D-mannopyranoside de pentyle (44)</u>



Mode opératoire

À température ambiante ; 0,3mL de diméthyle méthyle phosphate (2éq ; 1,45 10^{-3} mol) ; 3 goutte de 1,1-diphényléthylène et 0,3ml de DMPA (4éq ; 2,898. 10^{-3} mol) sont dissous dans 2mL de THF sec sous atmosphère inerte. Le mélange est porté à -70°C avant d'ajouter un excès de butyle lithium jusqu'à ce que la coloration rouge persiste. Après 5min d'agitation à -78 °C; 250 mg de 4,6-O-(sulfate cyclique)-2,3-O-isopropylidène-α-D-mannopyranoside de pentyle (43) (1éq ; 7,24.10^{-4} mol) préalablement dissous dans 5mL de THF sec sont lentement additionnés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique à -78°C pendant 3 heures puis durant 24 heures à température ambiante. A la fin de la réaction, le produit est extrait au CH_2Cl_2. La phase organique séchée sur du Na_2SO_4, concentrée et le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice, éluent (CH_2Cl_2/MeOH 8/2 v/v).

Rendement: 50%

Rf: 0, 56 (CH_2Cl_2/MeOH 8/2 v/v).

Analyse chimique

SM: (ESI^+/MeOH) ; 561,23 $[M+Na]^+$; 577,47 $[M+K]^+$

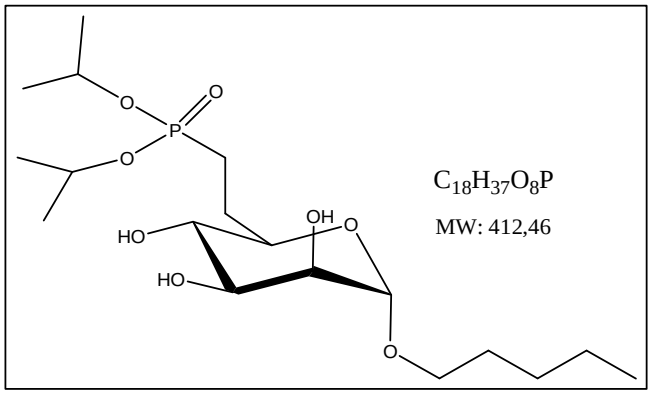
RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ (ppm) : 0,92 (t, $J_{5'-4'}$ = 7,1Hz, 3H, $H_{5'}$) ; 1,33 (m, 19H, $H_{4'}$, $H_{3'}$,H_9, $H_{9'}$,$H_{11'}$) ; 1,52 (s, 3H, H_{11}) ; 1,61 (m, 2H, $H_{2'}$) ; 1,77 (m, 2H, H_6) ; 2,11 - 1,98 (m, 1H,H_7) ; 2,26 - 2,12 (m, 1H, $H_{7'}$) ; 3,45 (dt, $J_{1a'-1b'}$ = 9,5Hz, $J_{1'-2'}$ = 6,4Hz, 1H, $H_{1'}$) ; 3,74-3,60 (m, 2H, H1' et H_5) ; 4,10 (d, J_{2-3}=5.3Hz, 1H, H_2) ; 4,28 - 4,19 (m, 2H, H_3 et H_4) ; 4,72 - 4,60 (m; 2H, H_8 et $H_{8'}$) ; 4,93 (s, 1H, H_1).

RMN 13C (101 MHz, MeOD) δ (ppm) : 14,40 (C, C5') ; 23,56 (C, C6); 23,78 (C, C4'); 24,32- 24,28 (C, C9'); 25,68 - 25,64 (C, C9); 25,72 (C, C7) ; 26,50 (C, C11'); 28,07 (C, C11); 29,56 (C, C3'); 30,22(C, C2') ; 68,97(C, C1') ; 69,18 (C, C5); 72,24 (C, C8); 69,36 (C, C1'); 77,11 (C, C2); 78,16 (C, C4); 78,83 (C, C3); 98,58 (C, C1); 110,55 (C, C10).

RMN ^{31}P (162 MHz, MeOD) δ (ppm): 31,74.

Déprotection des alcools 2,3 et 4

6-Désoxy-6-diméthoxyphosphinylméthylène-α-D-mannopyranoside de pentyle (45)



Mode opératoire

180 mg du composé (44) sont dissous dans un mélange THF/MeOH, 1/1, avant d'ajouter 15 mg de résine Amberlyst $15H^+$. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 2 heures. La réaction de déprotection est suivie par chromatographie sur couche mince, éluent (CH_2Cl_2/MeOH, 9/1, v/v). A la fin de la réaction, le brut réactionnel est concentré et le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH_2Cl_2/MeOH, 9/1, v/v).

Rendement: 80%

Rf: 0,53 (CH_2Cl_2/MeOH 9/1 v/v)

Analyse chimique

SM: (ESI^+/MeOH) m/z : 435,56 $[M+Na]^+$, 413,26 $[M+H]^+$

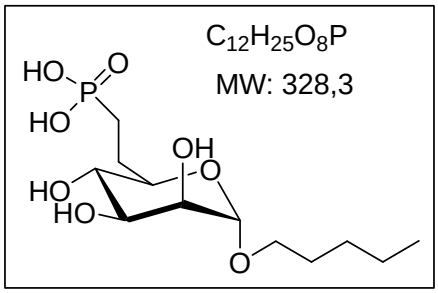
RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ(ppm) : 0,91 (t, $J_{5'-4'}$ = 7,1Hz, 3H, $H_{5'}$); 1,37 - 1,29 (m, 16H,$H_{3'}$, $H_{4'}$, H_9 et $H_{9'}$); 1,62 - 1,53 (m, 2H, $H_{2'}$); 1,78 - 1,64 (m, 2H, H_6); 2,15 - 1,92 (m, 2H,H_7); 3,44 - 3,32 (m, 3H, H_4, H_5 et $H_{1b'}$); 3,63 (m, 2H, H_3 et $H_{1a'}$); 3,76 (dd, J_{2-3} = 3,4Hz, J_{2-1} = 1,7Hz, 1H, H_2); 4,67-4,59(m, 2H, H_8 et $H_{8'}$); 4,67 (d, J_{1-2} = 1,6Hz, 1H, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ (ppm) : 14,40 (C, C5') ; 22,79 (C, C7) ; 23,58 (C, C6) ; 24,28-24,21 (C,C9') ; 25,74-24,31 (C, C9) ; 25,79 (C, C4') ; 29,66 (C, C3') ; 30,34 (C, C2') ;

68,65 (C, C1') ; 72,00 (C, C4) ; 72,08 (C, C3); 72,60 - 72,28 (2C,C8 et C8') ; 73,10 (C, C5) ; 73,28 (C, C2) ; 101,70 (C, C1).

RMN ^{31}P (162 MHz, MeOD) δ (ppm) : 30,52.

6,7-didéoxy-phosphinyl- α-D-mannopyranoside de pentyle (46)



Mode opératoire

80mg(1éq,1,84.10^{-4}mol)du 6,7-didéoxy-diisopropyl phosphinyl-α-D mannopyranoside de pentyle (45) sont dissous dans un mélange de 0,15ml de pyridine (10 éq ; 1,844. 10^{-3}mol) et 2ml de CH_2Cl_2. Ensuite, une solution de 0,12 ml de TMSBr (5 éq, 9,22. 10^{-4} mol) dissout dans 3mL de CH_2Cl_2 est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 12 heures. A la fin de la réaction, le brut réactionnel est dilué dans 25 mL de CH_2Cl_2. Le produit est extrait à l'eau, traité avec des résines H^+. La phase aqueuse est traitée à nouveau à l'AcOEt puis lyophilisée. Le produit est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

Rendement : 78%

Rf *:* 0,08 (*i*PrOH/NH_4OH 8/2 v/v).

SM (ESI$^+$/MeOH) m/z : 351,50 [M+Na]+

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ(ppm) : 0,98 (t, $J_{5'-4'}$ = 7,1Hz, 3H, $H_{5'}$) ; 1,23 - 1,42 (m, 4H, $H_{4'}$et $H_{3'}$) ; 1,58 (m, 4H; $H_{2'}$,H_7) ; 1,85 (m, 1H, $H_{6b'}$) ; 2,05 (m, 1H, $H_{6a'}$) ; 3,33-3,59 (m,3H, $H_{1b'}$ et H_4 et H_5); 3,70-3,63 (m, 2H, $H_{1a'}$ et H_3) ; 3,67 (dd, J_{2-3} = 3,4Hz, J_{2-1} = 1,7Hz, 1H, H_2) ; 4,80 (d, J_{1-2} = 1,7Hz, 1H, H_1).

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ (ppm) : 14,02 (C, C5') ; 22,78 (C, C7) ; 22,94 (C, C4'); 26,08 (C, C5); 27,38 (C, C6); 29,21 (C, C3') ; 29,64 (C, C2') ; 68,19 (C, C1'); 72,77 (C, C4) ; 73,34 (C, C2) ;74,80 (C, C3) ; 103,79 (C, C1).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ(ppm) = 28,93

CONCLUSION

GENERALE

ET

PERPSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

L'angiogenèse, c'est-à-dire la croissance des vaisseaux, est un processus essentiel du développement embryonnaire et de la réparation tissulaire. Un déséquilibre de ce processus est observé dans de nombreuses pathologies, dans les cancers tout d'abord mais aussi au cours de pathologies infectieuses et immunologiques.

L'angiogenèse moderne commence en 1971 avec Judah Folkman qui va consacrer toute sa vie, jusqu'à sa mort récente le 14 janvier 2008, aux recherches sur l'angiogenèse. Ce chirurgien de formation, professeur à Harvard et directeur du Programme de biologie vasculaire au Children's Hospital de Boston, va affronter pendant de très nombreuses années le scepticisme de la communauté médicale et scientifique tant son hypothèse de 1971 que les tumeurs sont incapables de dépasser la taille de 1 à 2 mm^3 sans la mobilisation permanente des vaisseaux sanguins. Il a déduit enfin que les tumeurs secrétaient des molécules capables de stimuler l'angiogenèse.

L'un des défis des recherches actuelles réside dans l'élaboration d'outils pharmacologiques capables de juguler la croissance tumorale en ciblant spécifiquement son angiogenèse. L'angiogenèse est un processus physiologique complexe qui fait intervenir de nombreux récepteurs, parmi lesquels se trouve le récepteur du Mannose-6-Phosphate ou Insuline like Growth Factor II (RM6P/IGF-II).

Dans notre laboratoire des dérivés du mannose -6- phosphate ayant en position anomére un groupement méthyle ont été préparés, ils ont montré qu'ils étaient effecteurs de l'angiogenèse. Une étude *in vivo* sur des souris a montré que ces composés sont très rapidement éliminés. Un calcul théorique des méthyle-mannosides a mis en évidence leur caractère hydrophile. En effet, ces produits ont un coefficient de Hansch autour de -2. Par ailleurs il a été largement démontré que la substitution sur la position anomère d'un sucre ne modifie pas sa reconnaissance vis-à-vis d'un récepteur. Pour cela, nous avons souhaité préparer des analogues aux dérivés précédents mais présentant une plus grande lipophilie.

Il sera question de remplacer le méthyle en position anomére par une plus grande chaine c'est à dire par des groupements : pentyle, isopropyle et para nitro phényle. Et cela pour augmenter le coefficient de Hansch de nos composés pour qu'ils soient mieux absorbés dans le corps d'où leurs efficacités et leurs bio disponibilités.
L'activité biologique de nos composés a ensuite été évaluée *ex ovo* selon le modèle de la CAM sur l'embryon de poulet.

Au cours du premier chapitre, la présentation des processus de formation et développement des vaisseaux sanguins a été étudiée et une définition du cancer a été donnée. Nous avons élucidé les différents facteurs angiogéniques et nous avons détaillé le déroulement de l'angiogenèse physiologique et tumorale. Ce chapitre nous a principalement permis d'avoir une large idée sur ces processus et les principales voix cibles. Nous avons parlé des différents traitements du cancer et particulièrement des stratégies anti-angiogéniques.

Dans le deuxième chapitre, nous avons décrit notre stratégie de synthèse. La description du récepteur du M6P a ensuite été effectuée, en donnant la structure, les ligands et les fonctions principales de chacun d'eux. Nous nous sommes cependant focalisés sur le grand récepteur RM6P-CI puisqu'il est impliqué dans l'angiogenèse.

Par la suite, nous avons parlé de la notion de bioisostérie. Nous nous somme intéressés à détailler les différentes réactions déjà faites au laboratoire ainsi que les mécanismes de réactions choisis pour nos dérivés.

Dans le troisième chapitre, pour déterminer l'effet pro ou anti angiogénique de nos dérivés, les résultats de tests de CAM *ex ovo* ont été présentés. Ce test consiste à évaluer la croissance des vaisseaux sanguins dans la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet.

Les résultats obtenus par le test sur la CAM montrent que tous les composés testés sont bien des effecteurs de l'angiogenèse. L'activité angiogénique de nos composés a été confirmée. Ces résultats préliminaires suggèrent que les composés M-6-P ayant en position anomère le pentyle ou l'isopropyle ou le para-nitro phényle ont un effet anti-angiogénique

alors que la modification de la fonction en position 6 du mannose aboutit à une modulation de cette activité.

Dans le quatrième chapitre, une nouvelle série de composés a été étudié. Dans notre laboratoire des dérivés du mannose -6- phosphate ayant en position anomère un groupement méthyle ont été préparés, ils ont montré qu'ils étaient effecteurs de l'angiogenèse.
Dans ce chapitre nous nous somme intéressés à synthétiser une série de dérivés du mannopyranoside avec différentes chaines en position anomère et modifiés en position 6.
Par ailleurs, il a été largement démontré que la substitution sur la position anomère d'un sucre ne modifie pas sa reconnaissance vis-à-vis d'un récepteur.

Pour cela, nous avons souhaité préparer des analogues aux dérivés précédents mais présentant une plus grande lipophilie. Il sera question de remplacer le méthyle en position anomère par un une plus grande chaine c'est à dire par des groupements : pentyle, isopropyle et para nitro phényle afin d'augmenter la biodisponibilité de nos composés.

En perspective, la synthèse de nouveaux analogues du M6P peut être réalisée, et leur activité angiogénique pourra être évaluée.
Il sera aussi intéressant de faire des études pharmacocinétiques sur nos composés afin de vérifier leurs biodisponibilités ***in vivo***.
Il sera aussi possible de localiser par la technique de fluorescence, le récepteur mis en jeu au niveau de la CAM et l'identifier par la technique de protéo-précipitation, ce qui fera le sujet d'une nouvelle étude.

De plus, les tests sur la CAM pour les produits restants doivent être réalisés.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

[1] L. Remontet, et al., Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France, 2003, INVS.

[2] P. Carmeliet, Angiogenesis in health and disease, Nat Med, 2003, 9 (6): 653-60.

[3] J. Folkman, Tumor angiogenesis: therapeutic implications, N Engl J Med,1971;285:1182-6.

[4] DG. Duda, RK. Jain, CG. Willett, Antiangiogenics: the potential role of integrating this novel treatment modality with chemoradiation for solid cancers, J Clin Oncol, 2007, 25(26):4033–42.

[5] D.Ribatti, B.Vacca, M. Presta, "The gelatin sponge- chorioallantoic membran assay", Nat Protoc 2006, 1: 85-91.

[6] C.Clavel, "Synthèse et évaluation biologique de dérivés du mannose modifiés en position 6." Thèse de doctorat, Université de Montpellier, 2009.

[7] D. Hanahan, RA .Weinberg, The hallmarks of cancer, Cell, 2000, 100: 57-70.

[8] C. Michiels, Endothelial cell functions, J. Cell. Physiol, 2003, 196: 430-443.

[9] K. Ley, C. Laudanna, MI. Cybulsky, S. Nourshargh, Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, Nat. Rev. Immunol, 2007, 7: 678-689.

[10] k. Castermans, AW. Griffioen, Tumor blood vessels, a difficult hurdle for infiltrating leukocytes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Reviews on Cancer, 2007, 1776: 160-174.

[11] A.J. Weber, M. De Bandt, Angiogenesis: general mechanisms and implications for rheumatoid arthritis, Rev Rhum, 2000; 67 : 573-92.

[12] P. Carmeliet, RK. Jain, Angiogenesis in cancer and other diseases, Nature 2000, 407(6801):249–57.

[13] N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor, European Journal of Cancer, 1996, 14, p. 2413.

[14] N. Ferrara, WJ. Henzel, Pituitary follicular cells secrete a novel heparinbinding growth factor specific for vascular endothelial cells, Biochem Biophys Res Commun, 1989, 161:851–8.

[15] M. Klein, B. Catargi, VEGF in physiological process and thyroid disease, Annales d'Endocrinologie 68 (2007) 45–56.

[16] G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch, Z. Poltrorak, Vascular endothe- lial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB Journal, 1999, 139.

[17] HF. Dvorak,Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy, J Clin Oncol 2002;20(21):4368-80.

[18] G. Bergers, R. Brekken, G. McMahon, TH. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb, D. Hanahan, Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis, Nat Cell Biol, 2000; 2(10):737-44

[19] L.F. Brown, K.T. Yeo, B. Berse, T. K. Yeo, D.R. Senger, H.F. Dvorak, L. van de Water, Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing, J Exp Med, 1992;176(5):1375-9.

[20] N. Ferrara, HP. Gerber, J. LeCouter.The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 2003; 9(6):669-76.

[21] P. Carmeliet, L. Moons, A. Luttun, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions, Nat Med, 2001;7(5):575-83.

[22] MG. Achen, GB. Mann, S. A. Stacker. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. Br J Cancer, 2006 May 22; 94(10):1355-60.

[23] S. Soker, Neuropilin in the midst of cell migration and retraction. Int J Biochem Cell Biol 2001; 33(4):433-7.

[24] M. Shibuya, Role of VEGF-FLT receptor system in normal and tumor angiogenesis.Advances in Cancer Research, 1995, 67, p. 281.

[25] T. Mustonen, K. Alitalo, Endothelial receptor tyrosine kinase involved in angiogenesis.Journal of Cell Biology, 1995,129, p. 895.

[26] B. Olofsson, E. Korpelainen, M.S. Pepper, S.J. Mandriota, K. Aase, V. Kumar, Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1998, 95(11), p. 709.

[27] T. Veikkola, K. Alitalo, VEGFs, receptors and angiogenesis.Seminars in Cancer Biology, 1999, 9, p. 211.

[28] A. Méjean, T. Lebret, Angiogenesis: the renal cancer model. Progrés en urologie, 2008, 7, p. 309.

[29] KN. Meadows, P. Bryant, K. Pumiglia. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. J Biol Chem, 2001;276(52):49289-98.

[30] DJ. Hicklin, LM. Ellis. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol 2005; 23(5):1011-27.

[31] N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. Recent Prog Horm Res 2000; 55:15-35.

[32] M. Murakami, L. T. Nguyen, Z. W. Zhuang , K.L. Moodie, P. Carmeliet, R.V. Stan, M. Simons, The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. Journal of Clinical Investigation, 2008, 118(10), p. 3355.

[33] S. Ortega, M. Ittmann, S.H. Tsang, M. Ehrlich, C. Basilico, Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2.Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1998, 95(10), p. 5672

[34] M. Klein, E. Picard, J-M. Vignaud, B. Marie, L. Bresler, B. Toussaint, et al. Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. J Endocrinol, 1999; 161:41–9.

[35] R. J. Tomanek, G. C. Schatteman, Angiogenesis: New insights and therapeutic potential. Anatomical Record, 2000, 261(3), p. 126.

[36] S. Soker, M. Machado, A. Atala, Systems for therapeutic angiogenesis in tissue engineering. World Journal of Urology, 2000, 18, p. 10

[37] A. Baird, M. Klagsbrun, The fibroblast growth factor family. Cancer Cells. 1991, 3(6), p. 239.

[38] M. Klagsbrun, Mediators of angiogenesis: the biological significance of basic fibroblast growth factor (bFGF)-heparin and heparin sulfate interactions. Seminars in Cancer Biology, 1992, 3(2), p. 81.

[39] RH. Adams, K. Alitalo, Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol, 2007, 8: 464-478.

[40] P. Carmeliet, Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nature Medicine, 2000, 6(4), p 932.

[41] J. E. Girling, P. A. Rogers, Recent advances in endometrial angiogenesis research. Angiogenesis, 2005, 8(2), p. 89.

[42] U. A. Kayisli, R. Demir, G. Erguler, A. Arici, Vasodilator stimulated phosphoprotein expression and its cytokine-mediated regulation in vasculogenesis during human placental development. Molecular Human Reproduction, 2002, 8(11), 1023.

[43] S. D'Alessandro, M. Gelati, N. Basilico, E. A. Parati, R. K. Haynes, Taramelli, Differential effects on angiogenesis of two antimalarial compounds, dihydroartemisinin and artemisone: implications for embryotoxicity. Toxicology, 2007, 241(1–2), p. 66.

[44] F. Tertemiz, U. A. Kayisli, A. Arici, R. Demir, Apoptosis contributes to vascular lumen formation and vascular branching in human placental vasculogenesis. Biology of Reproduction, 2005, 72(3), p. 727.

[45] P. Carmeliet, Angiogenesis in health and disease. Nat. Med, 2003, 9: 653-660.

[46] H. Gerhardt, M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima, C. Betsholtz, VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. J. Cell Biol, 2003, 161: 1163-1177.

[47] M. S. Pepper, Lymphangiogenesis and tumor metastasis: more questions than answers. Lymphology, 2000, 33, 144-7.

[48] R. Benedito, C. Roca, I. Sörensen, S. Adams, A. Gossler, M. Fruttiger, R.H. Adams, The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis.Cell, 2009, 137: 1124-1135.

[49] L-K. Phng, H. Gerhardt, Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. Dev. Cell, 2009, 16: 196-208.

[50] M. Hellström, L-K. Phng, J. J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A-K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, ML. Iruela-Arispe, M. Kalén, H. Gerhardt, C. Betsholtz, Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. Nature, 2007, 445: 776-780.

[51] S. Suchting, A. Eichmann, Jagged gives endothelial tip cells an edge. Cell, 2009, 137: 988-990.

[52] KK. Hirschi, SA. Rohovsky, PA. D'Amore, PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. J.Cell Biol, 1998, 141: 805-814.

[53] EP. Amento, N. Ehsani, H. Palmer, P. Libby, Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler. Thromb, 1991, 11: 1223-1230.

[54] J. Folkman, and M. Klagsbrun."Angiogenic factors." Science, 1987, 235(4787): 442-7.

[55] P. H. Burri, and M. R. Tarek, "Anovel mechanism of capillarygrowth in the rat pulmonary microcirculation." Anat Rec, 1990, 228(1): 35-45

[56] S. Patan, Vasculogenesis and angiogenesis.Cancer Treatmentand Research, 2004, 117, p. 3.

[57] V. Djonov, O. Baum, P. H. Burri, Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis.Cell and Tissue Research, 2003, 314(1), 107.

[58] B. Döme, MJC. Hendrix, S. Paku, J. Tóvári, J. Tímár, Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. Am. J. Pathol, 2007, 170: 1-15.

[59] G. Weston, P. A. Rogers, Endometrial angiogenesis Baillieres. Best Practice and Reseach Clinical Obstetrics and Gynaecology, 2000, 14(6), p. 919.

[60] J. Sugawara, M. Mitsui-Saito, C. Hayashi, T. Hoshiai, M. Senoo, H. Chisaka, Decrease and senescence of endothelial progenitor cells in patients with pree- clampsia. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2005, 90(9), p. 5329.

[61] J. Folkman, Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. Ann Surg. 1972, 175 (3): 409-16.

[62] T. Boehm, J. Folkman, T. Browder and MS. O'Reilly, Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. Nature, 1997, 390 (6658): 404-7.

[63] C.M. Bloor, Angiogenesis during exercise and training. Angiogenesis, 2005, 8(3): p. 263-71.

[64] B.D. Kelly, et al, Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. Circ Res, 2003, 93(11): p. 1074-81.

[65] R. Roy, B. Zhang, M. A. Moses. Making the cut : Protease-mediated regulation of angiogenesis. Exp. Cell Res. 2006, 312, 608-622.

[66] M. J. Frederick, and G.L. Clayman, Chemokines in cancer. Expert Rev Mol Med, 2001, 3, 1-18.

[67] CE. Geyer, J. Forster, D. Lindquist, S. Chan, CG. Romieu, T. Pienkowski, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. N Engl J Med 2006;355: 2733–43.

[68] R.S. Kerbel, Issues regarding improving the impact of antiangiogenic drugs for the treatment of breast cancer, 2009, Breast 18 Suppl 3, S41-47.

[69] A. Bagri, L. Berry, B. Gunter, M. Singh, I. Kasman, L.A. Damico, H. Xiang, M. Schmidt, G. Fuh, B. Hollister, et al, Effects of anti-VEGF treatment duration on tumor growth, tumor regrowth, and treatment efficacy. Clin Cancer Res, 2010, *16*, 3887-3900.

[70] E. Cohen-Jonathan Moyal. Thérapies antiangigénique et radiothérapie. Cancer and Radiothérapie 13 (2009) 562–567

[71] R. M. Steinman, and I. Mellman, "Immunotherapy: bewitched, bothered, and bewildered no more." Science, 2004, 305(5681): 197-200.

[72] p. corvol, base moléculaire de l'angiogénese tumorale, Annales de pathologie, 2010, 30, 32-36

[73] S. Goel, D.G. Duda, L. Xu, L.L. Munn, Y. Boucher, D. Fukumura, and R.K. Jain, Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. Physiol Rev, 2011, 91, 1071-1121

[74] R.K. Jain, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenictherapy. Science, 2005, *307*, 58-62.

[75] RK. Jain, DG. Duda, JW.Clark, JS. Loeffler: Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. Nat Clin Pract Oncol, 2006; 3 : 24-40.

[76] I. J. Fidler, and L. M. Ellis, The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. Cell, 1994, 79,185-8.

[77] T.J. Lynch, D.W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R.A. Okimoto, B.W. Brannigan, P.L. Harris, S.M. Haserlat, J.G Supko, F.G. Haluska, F.G, et al., Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med, 2004, *350*, 2129-2139.

[78] K. Miller, M. Wang, J. Gralow, M. Dickler, M. Cobleigh, E.A Perez, T. Shenkier, D. Cella, D and N.E. Davidson, Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. N Engl J Med, 2007, 357, 2666-2676.

[79] H. Hurwitz, L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, et al, Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med, 2004,350, 2335-2342.

[80] B. Escudier, A. Pluzanska, P. Koralewski, A. Ravaud, S. Bracarda, C. Szczylik, C. Chevreau, M. Filipek, B. Melichar, E. Bajetta, et al, Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. Lancet, 2007, 370, 2103-2111.

[81] H.S. Friedman, M.D. Prados, P.Y.Wen, T. Mikkelsen, D. Schiff, L.E. Abrey, W.K. Yung, N. Paleologos, M.K. Nicholas, R. Jensen, et al, Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. J Clin Oncol, 2009, 27, 4733-4740.

[82] A. Sandler, R. Gray, M.C. Perry, J. Brahmer, J.H. Schiller, A. Dowlati, R. Lilenbaum, and D.H. Johnson, Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-smallcell lung cancer. N Engl J Med, 2006, 355, 2542-2550.

[83] R.A. Burger, M.F. Brady, M.A. Bookman, G.F. Fleming, B.J. Monk, H. Huang, R.S. Mannel, H.D. Homesley, J. Fowler, B.E. Greer, et al, Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. N Engl J Med, 2011, 365, 2473-2483.

[84] R.A. Burger, Role of vascular endothelial growth factor inhibitors in the treatment of gynecologic malignancies. J Gynecol Oncol, 2010, 21, 3-11.

[85] F. Kazazi-Hyseni, J.H. Beijnen, and J.H. Schellens, Bevacizumab. Oncologist, 2010, 15, 819-825.

[86] S.M. Gressett, and S.R. Shah, Intricacies of bevacizumab-induced toxicities and their management. Ann Pharmacother, 2009, 43, 490-501.

[87] F. Petrelli, and S. Barni, Bevacizumab in advanced breast cancer: an opportunity as second-line therapy, Med Oncol, 2012, 29, 1-4.

[88] F. Petrelli, M. Cabiddu, M. Carpo, M. Ghilardi, and S. Barni, Progression of intramedullary metastasis during perioperative cessation of sunitinib. Nat Rev Urol, 2010, 7, 634- 637.

[89] V. Ranpura, S. Hapani, and S. Wu, Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. JAMA, 2011, 305, 487-494.

[90] A. Rapisarda, M. Hollingshead, B. Uranchimeg, C.A. Bonomi, S.D. Borgel, J.P. Carter, B. Gehrs, M. Raffeld, R.J. Kinders, R. Parchment, et al, Increased antitumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. Mol Cancer Ther, 2009, 8, 1867-1877.

[91] M. Burger, A. Glodek, T. Hartmann, A. Schmitt-Graff, L.E. Silberstein, N. Fujii, T.J. Kipps, and J.A. Burger, Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells, 2003, Oncogene 22, 8093-8101.

[92] C.J. Allegra, G. Yothers, M.J. O'Connell, S. Sharif, N.J. Petrelli, L.H. Colangelo, J.N. Atkins, T.E. Seay, L. Fehrenbacher, R.M. Goldberg, et al, Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. J Clin Oncol, 2011, 29, 11-16.

[93] R. Kerbel, and J. Folkman, Clinical translation of angiogenesis inhibitors. Nat Rev Cancer, 2002, 2, 727-739.

[94] M.R. Mancuso, R. Davis, S.M. Norberg, S. O'Brien, B. Sennino, T. Nakahara, V.J. Yao, T. Inai, P. Brooks, B. Freimark, et al, Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. J Clin Invest, 2006,116, 2610-2621.

[95] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet, 2005, 365, 1687-1717.

[96] E. Van Cutsem, J. Tabernero, R. Lakomy, H. Prenen, J. Prausova, T. Macarulla, P. Ruff, G.A. van Hazel, V.Moiseyenko, D. Ferry, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. J Clin Oncol, 2012, 30, 3499-3506.

[97] R. Ramlau, V. Gorbunova, T.E. Ciuleanu, S. Novello, M. Ozguroglu, T. Goksel, C. Baldotto, J. Bennouna, F.A. Shepherd, S. Le-Guennec, et al, Aflibercept and Docetaxel versus Docetaxel alone after platinum failure in patients with advanced or metastatic nonsmall- cell lung cancer: a randomized, controlled phase III trial. J Clin Oncol, 2012, 30, 3640-3647.

[98] M.C. Heinrich, R.G. Maki, C.L. Corless, C.R. Antonescu, A. Harlow, D. Griffith, A. Town, A. McKinley, W.B. Ou, J.A. Fletcher, et al, Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. J Clin Oncol, 2008, 26, 5352-5359.

[99] R.J. Motzer, T.E. Hutson, P. Tomczak, M.D. Michaelson, R.M. Bukowski, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, R. Pili, G.A. Bjarnason, et al, Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol, 2009, 27, 3584-3590.

[100] E. Raymond, L. Dahan, J.L. Raoul, Y.J. Bang, I. Borbath, C. Lombard-Bohas, J. Valle, P. Metrakos, D. Smith, A. Vinik, et al, Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med, 2011, 364, 501-513.

[101] J.M. Llovet, S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J.F. Blanc, A.C. de Oliveira, A. Santoro, J.L. Raoul, A. Forner, et al, Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. N Engl J Med, 2008, 359, 378-390.

[102] D.C. Smith, M.R. Smith, C. Sweeney, A.A. Elfiky, C. Logothetis, P.G. Corn, N.J. Vogelzang, E.J. Small, A.L. Harzstark, M.S. Gordon, et al, Cabozantinib in patients with advanced prostate cancer: results of a phase II randomized discontinuation trial. J Clin Oncol, 2013, 31, 412-419.

[103] H.C. Toh, P.J. Chen, B.I. Carr, J.J. Knox, S. Gill, P. Ansel, E.M. McKeegan, B. Dowell, M. Pedersen, Q. Qin, et al, Phase 2 trial of linifanib (ABT-869) in patients with unresectable or metastatic hepatocellular carcinoma. Cancer, 2013, 119, 380-387.

[104] N.M. Tannir, Y.N. Wong, C.K. Kollmannsberger, M.S. Ernstoff, D.J. Perry, L.J. Appleman, E.M. Posadas, D. Cho, T.K. Choueiri, A. Coates, et al, Phase 2 trial of linifanib (ABT-869) in patients with advanced renal cell cancer after sunitinib failure. Eur J Cancer, 2011, 47, 2706-2714.

[105] D.A. Nosov, B. Esteves, O.N. Lipatov, A.A. Lyulko, A.A. Anischenko, R.T. Chacko, D.C. Doval, A. Strahs, W.J. Slichenmyer, and P. Bhargava, Antitumor activity and safety of tivozanib (AV-951) in a phase II randomized discontinuation trial in patients with renal cell carcinoma. J Clin Oncol, 2012, 30, 1678-1685.

[106] S. Wu, J.J. Chen, A. Kudelka, J. Lu, and X. Zhu, X, Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. Lancet Oncol, 2008, 9, 117-123.

[107] G. Hudes, M. Carducci, P. Tomczak, J. Dutcher, R. Figlin, A. Kapoor, E. Staroslawska, J. Sosman, D. McDermott, I. Bodrogi, et al, Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. N Engl J Med, 2007, 356, 2271-2281.

[108] G.V. Thomas, C. Tran, I.K. Mellinghoff, D.S. Welsbie, E. Chan, B. Fueger, J. Czernin, and C.L. Sawyers, Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. Nat Med, 2006, 12, 122-127.

[109] S.M. Ansell, H. Tang, P.J. Kurtin, P.A. Koenig, D.J. Inwards, K. Shah, S.C. Ziesmer, A.L. Feldman, R. Rao, M. Gupta, et al, Temsirolimus and rituximab in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a phase 2 study. Lancet Oncol, 2011, 12, 361-368.

[110] J.C. Yao, M.H. Shah, T. Ito, C.L. Bohas, E.M. Wolin, E. Van Cutsem, T.J. Hobday, T. Okusaka, J. Capdevila, E.G. de Vries, et al, Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med, 2011, 364, 514-523.

[111] M.Yu, R. Berk, and M.A. Kosir, CXCL7-Mediated Stimulation of Lymphangiogenic Factors VEGF-C, VEGF-D in Human Breast Cancer Cells. J Oncol, 2010, 339-407.

[112] J.M. Ebos, and R.S. Kerbel, Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8, 210-221.

[113] R.K. Jain, D.G. Duda, C.G. Willett, D.V. Sahani, A.X. Zhu, J.S. Loeffler, T.T. Batchelor, and A.G. Sorensen, Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6, 327-338.

[114] G. Bergers, and D. Hanahan, Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. Nat Rev Cancer, 2008, 8, 592-603.

[115] A. Bottos, and A. Bardelli, Oncogenes and angiogenesis: a way to personalize antiangiogenic therapy? Cell Mol Life Sci, 2013, 6, 22-26.

[116] J.G. Paez, P.A. Janne, J.C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F.J. Kaye, N. Lindeman, T.J. Boggon, et al, EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science, 2004, 304, 1497-1500.

[117] G. Iyer, A.J. Hanrahan, M.I. Milowsky, H. Al-Ahmadie, S.N. Scott, M. Janakiraman, M. Pirun, C. Sander, N.D. Socci, I. Ostrovnaya, et al. Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity.Science, 2012, 338, 221.

[118] GD. Demetri, M. VonMehren, C.D. Blanke, A.D.Van Den Abbeele, B. Eisenberg, P.J. Roberts et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. N Eng J Med, 2002, 347:472–80.

[119] GA. McArthur, G.D. Demetri, A. Van Oosterom, M.C. Heinrich, M. Debiec-Rychter, C.L. Corless, et al. Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib: Imatinib target exploration consortium study B2225. J Clin Oncol, 2005 ;23: 866–73.

[120] MG. Kris, R.B. Natale, R.S. Herbst, T.J. Lynch, D. Prager, C.P. Belani, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non small cell lung cancer, a randomized trial. J Am Med Assoc, 2003, 290:2149–58.

[121] C. Dreyer, E. Raymond , S. Faivre. Targeted therapies and their indications in solid neoplasias. La Revue de médecine interne, 2009, 30, 416–424.

[122] V. Barragan, F. M. Menger, K. L. Caran, C. Vidil, A. Morère and J.L. Montero. A mannose-6 phosphonate–cholesterylamine conjugate as a specific molecular adhesive linking cancer cells with vesicles. Chem. Commun., 2001, 85–86.

[123] N. Dahms, M.K. Hancock, "P-type lectins" Biochim Biophys Acta, 2002, 1572: 317-340.

[124] P. Ghosh, and al, "Mannose 6-Phosphate Receptors: New twists in the tale " Nat Rev, 2003, 4: 202-212.

[125] D. C. Kilpatrick, Animal lectins: a historical introduction and overview. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2002, 1572 (2-3), 187-197.

[126] S. J. Lee, D. Nathans, Proliferin secreted by cultured-cells binds to mannose 6-phosphate receptors. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263 (7), 3521-3527.

[127] O. Volpert, D. Jackson, N. Bouck, D.I.H. Linzer, The insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor isnrequired for proliferin-induced angiogenesis. Endocrinology, 1996, 137 (9), 3871-3876.

[128] R. J. Wood, M.D. Hulett, M, Cell surface-expressed cation-independent mannose 6-phosphate receptor (CD222) binds enzymatically active heparanase independently of mannose 6-phosphate to promote extracellular matrix degradation. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283 (7), 4165-4176.

[129] V. Leksa, S. Godar, H.B. Schiller, E. Fuertbauer, A. Muhammad, K. Slezakova, V. Horejsi, P. Steinlein, U.H. Weidle, B.R. Binder, H. Stockinger, TGF-beta-induced apoptosis in endothelial cells mediated by M6P/IGFII-R and mini-plasminogen. Journal of Cell Science, 2005, 118 (19), 4577-4586.

[130] Langmuir, "Isomorphism, isostérism and covalence." J Am chem Soc,1919, 41, (10):1543-1559.

[131] H. Grimm, "Über Bau und Grösse der Nichtmetallhydride." Z. Elektrochem, 1925, 31: 474-480.

[132] H. Friedman, "Influence of isosteric reolacements upon: Biological activity." Nansrs,1951, 206: 295-358.

[133] L. M. A. Lima, E.J. Barreiro, Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. Current Medicinal Chemistry 2005, 12 (1), 23-49.

[134] A. Burger, In Medicinal Chemistry. 3rd ed. Ed, 1970, p 64-80.

[135] S. Hanessian, "Preparative carbohydrate chemistry, University of Montreal, Canada, Marcel Dekker." Inc New York, 1997, 12,134-154.

[136] E. Fischer, "Ueber die verbindungen der zucker mit den alkoholen und keton." Ber. Dtsch. Chem. Ges, 1895, 28, 1145-1167.

[137] R.R. Schmidt,"New methods for the synthesis of glycosides and oligosaccharides Are there alternatives to the Koenigs-Knorr methode." Angew Chem Int Ed, 1986, 25, 212-235.

[138] A. Jeanjean, M. Garcia, A. Leydet, J.L. Montero, A. Morere, Synthesis and receptor binding affinity of carboxylate analogues of the mannose 6-phosphate recognition marker. Bioorganic and Medicinal Chemistry 2006, 14 (10), 3575-3582.

[139] C. Vidil, A .Morere, M. Garcia, V. Barragan, B. Hamdaoui, H. Rochefort, J.L. Montero, Synthesis and biological activity of phosphonate analogs of mannose 6-phosphate (M6P). European Journal of Organic Chemistry 1999, (2), 447-450.

[140] B. Bashyal, M. Grough, P. Smith, "Synthesis of the α-Mannosidase Inhibitors Swainsonine [(1S, 2R, 8R, 8aR)-1, 2, 8-trihydroxyoctahydroindolizine] and 1, 4-dideoxy-1, 4- imino-D-mannitol from mannose." Tetrahedron, 1987, 43: 3083-3093.

[141] H. S. Byun, L.L. He, R. Bittman, Cyclic sulfites and cyclic sulfates in organic synthesis. Tetrahedron, 2000, 56 (37),7051-7091.

[142] W. Baker, F.B. Field, Cyclic esters of sulphuric acid. Part II. The constitution of methylene and glyoxal sulphates, and the reaction of methylene sulphate with tertiary bases. Journal of the Chemical Society, 1932, 86-91.

[143] A. Nishinaga, S. Wakabayashi, Cyclic sulfate formation from epoxides. Chemistry Letters, 1978, (8), 913-914.

[144] R. W. Hoffmann, H. C. Stiasny, Diastereoselective bromine/lithium-exchange applied to the synthesis of A C-1/C-9- segment of bryostatins. Tetrahedron Letters, 1995, 36 (26), 4595-4598.

[145] M. S. Berridge, M.P. Franceschini, E. Rosenfeld, T.J. Tewson, Cyclic sulfates - useful substrates for selective nucleophilic-substitution. Journal of Organic Chemistry, 1990, 55 (4), 1211-1217.

[146] K. P. M. Vanhessche, K.B. Sharpless, Catalytic asymmetric synthesis of new halogenated chiral synthons. Chemistry-a European Journal, 1997, 3 (4), 517-522.

[147] M. M. Abdelmalik, A.S. Perlin, Reactions of phenyl chlorosulfate at OH-2 and OH-3 of aldohexopyranose derivatives - competing substitution and displacement-reactions. Carbohydrate Research, 1989, 190 (1), 39-52.

[148] F. Latif, M.S. Shekhani, W. Voelter, Convenient synthesis of mono and cyclic sulfates of carbohydrates via triflate displacement. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1, 1990, (6), 1573-1575.

[149] H. Woerden,"Organic sulfites." Chem Rev, 1963, 63: 557-571.

[150] I. Langmuir,"Isomorphism, isosterism and covalence", Journal of the American Chemical Society, 1919,41 (10), 1543-1559.

[151] S. Denmark,"Facile oxetane formation in a rigid bicycle [2.2.2]octane system. J Org Chem, 1981, 46: 3144-3147.

[152] Y. Gao, "Vicinal Diol cyclic sulfates. Like epoxides onlymore reactive. J Am Chem Soc,1988, 110: 7538-7539.

[153] A. Awwad, "Synthèse d'analogues du mannose-6-phosphate : activité antiangiogénique anti-cancéreuse." Thèse de doctorat, Université demontpellier II, 2009.

[154] M. E. Evans, F.W. Parrish, Mono-molar acetalations of methyl alpha-D-mannosides - synthesis of methyl alpha-Dtalopyranoside. Carbohydrate Research, 1977, 54 (1), 105-114.

[155] P. A. M.Vanderklein, J.H. Vanboom, Application of cyclic sulfates in the synthesis of 6-deoxy-D-mannoheptopyranose derivatives. Carbohydrate Research 1992, 224, 193-200.

[156] B. Kim, "Cyclic sulfates contening acid-sensitive groups and chemoselective hydrolysis of sulphate ester." Tetrahedron Lett, 1989, 30 : 655-658.

[157] M. Taverna-Porro, L.A. Bouvier, C.A. Pereira, J.M. Montserrat, A.M. Iribarren, Chemoenzymatic preparation of nucleosides from furanoses. Tetrahedron Letters, 2008, 49 (16), 2642-2645.

[158] P. R. Skaanderup, C.S. Poulsen, L. Hyldtoft, M.R. Jorgensen, R. Madsen, "Regioselective conversion of primary alcohols into iodides in unprotected methyl furanosides and pyranosides" Synthesis, 2002, 12, 1721-1727

[159] E.E. Carpenter, S.Calvin, R.M. Stroud, V.G.Harris,"Passivated iron as core-shell Nanoparticle", Chemistry of Materials, 2003, 15 (17), 3245-3246

[160] N. Khanjin, J-L. Montero, "Synthesis of mannose-6-phosphate analogs : largescale preparation of isosteric mannose-6-phosphonate via cyclic sulfate precursor." Tetrahedron Lett, 2002, 43 : 4017-4020.

[161] E. Frankland, B.F. Duppa, Justus Liebigs Ann. Chem, 1860, 115, 319.

[162] D. G. Hall, Boronic Acids. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 2005.

[163] K. Ishihara, H. Yamamoto, “Arylboron compounds as acid catalysts in organic synthetic transformations”, European Journal of Organic Chemistry, 1999 (3), 527-538.

[164] W. Seaman, J.R. Johnson, J. Am. Chem. Soc, 1931, 53 (2), 711-723.

[165] R. T. Hawkins, D.B. Stroup, J. Org. Chem. 1969, 34 (4), 1173-1174.

[166] J. Kristensen, M. Lysen, P. Vedso, M. Begtrup, Org. Lett. 2001, 3 (10), 1435-1437.

[167] M. Murata, S. Watanabe, Y. Masuda, J. Org. Chem. 1997, 62 (19), 6458-6459.

[168] W. Li, D.P. Nelson, M.S. Jensen, R.S. Hoerrner, D. Cai, R.D. Larsen, P.J. Reider, J. Org. Chem, 2002, 67 (15), 5394-5397.

[169] D. A. Evans, J.L. Katz, G.S. Peterson, T. Hintermann, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123 (49), 12411-12413.

[170] T. Horrobin, C.H. Tran, D.Crout, “Esterase-catalysed regioselective 6-deacylation of hexopyranose per-acetates, acid-catalysed rearrangement to the 4-deprotected products and conversions of these into hexose4- and 6-sulfates”, Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1998, 6, 1069-1080.

[171] A. Morere, C. Vidil, P.Skaanderup, J.Thorsen, J.P.Roque, J.L.Montero, “The benzyloxycarbonyl group: an alternative protective group in the mannose series”, Carbohydrate Research, 1997, 300 (2), 175-178.

[172] A. J. Mancuso, S-L. Huang, D. Swern, J Org Chem,1978, 43, 2480.

[173] N.M. Weinshenker, C.M.Shen, J. Y.Wong, “Polymeric carbodiimide, Moffat oxidation : 4- tert-butylcyclohexanone”, Organic Syntheses,1988, 6, 218-219

[174] F. C. Fischer, E. Havinga, Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 1974, 93 (1), 21-24.

[175] P. Schlatter, F. Köning, M. Karisson, H. Burri, "Quantitative study of intussusception capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryon." Microvasc Res, 1997, 54: 65-73.

[176] D. Ribatti, Endogenous inhibitors of angiogenesis. Leukimia Research, 2009,33, p. 638.

Résumé

L'un des défis des recherches actuelles réside dans l'élaboration d'outils pharmacologiques capables de juguler la croissance tumorale en ciblant spécifiquement son angiogenèse. L'angiogenèse est un processus physiologique complexe qui fait intervenir de nombreux récepteurs, parmi lesquels se trouve le récepteur du mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II (M6-P/IGFII).

Des travaux antérieurs effectués au laboratoire ont montré que des molécules analogues du M6P sont des effecteurs d'angiogenèse mais qu'au cours de leur administration, ces composés sont facilement éliminés car trop hydrophiles. Afin d'obtenir des analogues du M6P plus lipophiles nous avons remplacé le méthyle en position anomère par d'autres chaines plus longues. Nous présentons, au cours de cette thèse, la synthèse d'analogues du mannose 6-phosphate et l'évaluation de leur activité angiogénique par la méthode « CAM »

Mots clés : M6P, angiogenèse, Cancer, CAM

Summary

One of the challenges of the current research is to develop pharmacological tools able to prevent tumor growth by specifically targeting the angiogenesis. Angiogenesis is a complex physiological process that involves a large number of receptors, among which the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II (M6-P/IGF-II) receptor.

Previous work conducted in our laboratory has shown that analogues of M6P are effectors of angiogenesis but during administration, these compounds are easily removed due to their hydrophilicity. To increase the lipophilicity of the M6P analogues, we have replaced the methyl in position anomeric by other longer chains.

We present in this manuscript, the synthesis of mannose 6-phosphate analogues and the evaluation of their angiogenic activity by the "CAM assay".

Keywords: M6P, angiogenesis, Cancer, CAM