



UNIVERSITE DE LIMOGES
École doctorale Science- Technologique- Santé
Faculté des Sciences et Techniques

N° d'ordre : 38 - 2006

THÈSE

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Limoges

Mention : Chimie Appliquée - Chimie des Substances Naturelles

Présentée par

Ludovic COLOMBEAU

Utilisation de bases pyrimidiques pour l'élaboration
d'analogues d'oligonucléosides ou de la chlorméthine

Directeurs de thèse :

Mme Rachida ZERROUKI, Professeur

M. Pierre KRAUSZ, Professeur

Soutenance prévue le Mercredi 19 juillet 2006

<u>Rapporteurs</u>	D. BEAUPERE	Professeur Université de Picardie Jules Verne
	Y. CHAPLEUR	Directeur de recherche CNRS Université de Nancy
<u>Examineurs</u>	M. KRAEMER	Professeur Université Paris XIII
	P. KRAUSZ	Professeur Université de Limoges
	R. ZERROUKI	Professeur Université de Limoges



UNIVERSITE DE LIMOGES
École doctorale Science- Technologique- Santé
Faculté des Sciences et Techniques

N° d'ordre : 38 - 2006

THÈSE

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Limoges

Mention : Chimie Appliquée - Chimie des Substances Naturelles

Présentée par

Ludovic COLOMBEAU

Utilisation de bases pyrimidiques pour l'élaboration
d'analogues d'oligonucléosides ou de la chlorméthine

Directeurs de thèse :

Mme Rachida ZERROUKI, Professeur

M. Pierre KRAUSZ, Professeur

Soutenance prévue le Mercredi 19 juillet 2006

<u>Rapporteurs</u>	D. BEAUPERE	Professeur Université de Picardie Jules Verne
	Y. CHAPLEUR	Directeur de recherche CNRS Université de Nancy
<u>Examineurs</u>	M. KRAEMER	Professeur Université Paris XIII
	P. KRAUSZ	Professeur Université de Limoges
	R. ZERROUKI	Professeur Université de Limoges

Remerciements

Cette thèse est l'aboutissement de quatre années de recherches effectuées au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'Université de Limoges.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers le Professeur Pierre Krausz qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire et qui me permet de présenter ce travail. Mes sincères remerciements à vous M. Krausz, qui en agissant à titre de co-directeur avait fortement enrichi ma formation; vos conseils, vos suggestions et commentaires m'ont été très utiles. Je vous remercie également pour m'avoir donné l'occasion d'enseigner en tant qu'ATER. M. Krausz, je vous remercie pour accorder à tous les doctorants toutes les facilités pour mener à bien leurs travaux.

Que Messieurs les Professeurs Daniel Beaupère et Yves Chapleur trouvent ici l'expression de ma plus haute considération et de ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à souligner l'implication de ma directrice de thèse, le Professeur Rachida Zerrouki, une personne si précieuse pour sa qualité d'encadrement, je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude. Rachida, je vous remercie pour m'avoir donné la chance de travailler avec vous sur un sujet aussi passionnant, d'être toujours présente et prête à aider vos étudiants, d'être passionnée, rigoureuse et enthousiaste. Travailler sous votre direction a été une très belle expérience, j'ai appris avec vous le goût de la recherche et l'ouverture d'esprit sur plusieurs domaines scientifiques. Je vous remercie également pour tous les précieux conseils pédagogiques que vous m'avez donnés et qui m'ont permis d'aborder mes activités d'enseignement avec beaucoup plus d'assurance. Sans oublier les conseils que vous m'avez donnés tout au long de la rédaction qui ont toujours été clairs, et m'ont facilités la tâche me permettant d'aboutir à la production de cette thèse. Pour moi, vous êtes un exemple à suivre.

Je tiens à remercier le Professeur Michel Kraemer et Odille Sainte Catherine de m'avoir accueilli très chaleureusement dans le Laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université Paris XIII et m'avoir permis d'effectuer un stage pour évaluer biologiquement certaines des molécules synthétisées. Grâce à vous ma thèse est devenu pluridisciplinaire. Odille, je te remercie pour ton implication dans ce travail, sans toi la rédaction de la partie biologique aurait été beaucoup plus difficile. M. Kraemer, je vous remercie d'avoir bien voulu examiner ce travail et d'avoir accepté d'être le Président du jury de ma thèse.

Je voudrais remercier également Yves Champavier pour sa gentillesse et sa disponibilité et m'excuser pour toutes mes impatiences à l'attente des spectres RMN.

Merci à tous les membres du LCSN (Valérie, Vincent Sol, Robert Granet, Michelle Constantin, Karine Cléries...) qui m'ont accueilli au laboratoire à mon arrivée et qui se sont intéressés de près ou de loin à ce travail et qui m'ont fait part d'observations ou de remarques qui m'ont toujours beaucoup appris. Je voudrais également remercier plus particulièrement Hamel et Karine avec qui j'ai eu un immense plaisir à travailler.

Je tiens à remercier tous les copains thésards pour tous les bons moments passés ensemble : Bilou, Nini, Francis, Yannick, Benoit, Carmen, Florient, Géraldine.

Enfin, je tiens à remercier tous mes proches pour leur soutien permanent et leur tendresse :

Mes parents, mes grands-parents, oncles et tantes, cousins et cousines...vous avez toujours cru en moi, alors juste merci pour votre tendresse qui m'accompagne chaque jour.

Eloïse, Céline et Alexandra, mes trois petits amours, vous comprendrez plus tard combien votre affection et vos sourires m'ont été précieux pendant les moments de doute...je vous adore les filles.

Les amis de toujours, Rom's, Phanou, Jay, Keuja, Aurélie, Agathe, Denis, Julie, Coach... merci pour tout ce que nous vivons ensemble.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION GENERALE.....	3
1 ^{ère} PARTIE : SYNTHÈSE DE DI- ET TRINUCLEOSIDES..	
CHAPITRE I : LES NUCLEOSIDES ET LEURS ANALOGUES .	
I. INTRODUCTION	4
I.1. Les nucléosides et oligonucléotides : définition, structure	4
I.2. Structure et fonction de l'ADN et de l'ARN	6
I.3. Virus et rétrovirus : généralités.....	11
I.4. Oligonucléotides à visée thérapeutique	12
I.4.1. La thérapie antisens.....	13
I.4.2. La thérapie triple hélice	14
I.5. Exemples d'analogues d'oligonucléotides thérapeutiquement actifs	21
II. OBJET DU TRAVAIL	27
CHAPITRE II : UTILISATION DE LA RÉACTION DE MÉTATHÈSE DES OLÉFINES POUR LA SYNTHÈSE D'ANALOGUES D'OLIGONUCLÉOTIDES.	
I. LA METATHÈSE – ETAT DE LA QUESTION.....	28
I.1. Généralités	28
I.2. Le nouvel essor de la réaction de métathèse.....	29
I.3. Les catalyseurs de métathèse les plus récents.....	30
I.3.1. Les catalyseurs de Grubbs de première génération.....	30
I.3.2. Les catalyseurs de deuxième génération.....	32
I.4. Mécanisme de la métathèse	33
I.5. Exemples d'application de la métathèse en chimie fine	38
I.6. Métathèse et micro-onde.....	41
II. SYNTHÈSE DE DINUCLÉOSIDES RELIÉS PAR UNE CHAÎNE BUT-2-ÈNE ENTRE LES POSITIONS 3'	43
II.1. Schéma général.....	43
II.2. Les différentes étapes	44
II.2.1. Synthèse de la 3'- <i>o</i> -allylthymidine	44
II.2.2. Réaction de métathèse à partir de la 3'- <i>o</i> -allylthymidine (Voie A).....	46
II.2.3. Synthèse du dimère 3'-3' à partir du précurseur protégé (Voie B).....	47
II.2.3.1. Réaction de métathèse sur le précurseur protégé.....	47
II.2.3.2. Synthèse par activation micro-onde	49
II.2.3.3. Déprotection des hydroxyles primaires	50
III. SYNTHÈSE DE NUCLEOSIDES RELIÉS PAR UNE CHAÎNE BUT-2-ÈNE ENTRE LES POSITIONS 3	51
III.1. Schéma général	51
III.2. Les différentes étapes	51
III.2.1. Synthèse de la 3-N-allylthymidine acétylée.....	51
III.2.2. Synthèse du dinucléoside relié par une chaîne but-2-ène entre les positions 3	52
IV. SYNTHÈSE DU DIMÈRE 5'-5'	54
IV.1. Stratégie de synthèse	55
IV.2. Résultats et discussion	55

IV.2.1. Synthèse de la 5'- <i>O</i> -allylthymidine	55
IV.2.1.1. Première voie de synthèse	55
IV.2.1.2. Deuxième voie de synthèse	58
IV.3. Synthèse du dimère 5'-5'	61
V. SYNTHÈSE DES HÉTÉRODIMÈRES 3'-5' ET 3'-3 DÉRIVANT DE LA THYMIDINE	63
V.1. Dinucléosides 3'-5' dérivant de la thymidine	63
V.1.1. Première stratégie de synthèse	63
V.1.2. Deuxième stratégie de synthèse	64
V.1.2.1. Schéma général	64
V.1.2.2. N-benzoylation du précurseur 3'	65
V.1.2.3. Réaction de métathèse	65
V.2. Dinucléosides 3'-3 dérivant de la thymidine	68
VI. SYNTHÈSE DU TRINUCLÉOSIDE RELIÉ PAR UNE CHAÎNE BUT-2-ÈNE ENTRE LES POSITIONS 3' ET 3'	71
VI.1. Schéma de synthèse	71
VI.2. Les différentes étapes	72
VI.2.1. Alkylation du groupe NH libre du dinucléoside 3'-3	72
VI.2.2. Réaction de métathèse	72
VI.2.3. Déprotection du trinucloside	73
VII. CONCLUSION	75
VIII. PARTIE EXPÉRIMENTALE	76
VIII.1. Réactifs et solvants	76
VIII.2. Chromatographie	77
VIII.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique	77
VIII.2.2. Chromatographie sur couche mince préparatives	78
VIII.2.3. Chromatographie sur colonne	78
VIII.3. Analyses	78
VIII.3.1. Température de fusion	78
VIII.3.2. Pouvoir rotatoire	78
VIII.3.3. Spectrométrie RMN	78
VIII.3.4. Spectrométrie Infrarouge	79
VIII.3.5. Spectrométrie de masse	79
VIII.4. Matériel	79
VIII.4.1. Cuve à ultrason	79
VIII.4.2. Micro-onde	79
VIII.5. Synthèses	80
2 ^{ème} PARTIE : SYNTHÈSE D'AGENTS ALKYLANTS ..	
CHAPITRE I : ÉTAT DE LA QUESTION- OBJET DU TRAVAIL ..	
I. INTRODUCTION	114
I.1. Qu'est ce que le cancer ?	114
I.2. La chimiothérapie et les agents anticancéreux	115
I.2.2. Les agents agissant sur les fonctions cellulaires	116
I.2.3. Les agents agissant principalement au niveau de l'ADN	117
I.2.3.1. Les inhibiteurs de la topoisomérase I et II	117
I.2.3.2. Les agents intercalants	118
I.2.3.3. Les agents alkylants	118
I.2.3.3.1. Les nitroso-urées	119
I.2.3.3.2. Les sels de platine	119

I.2.3.3.3. Les dérivés de la moutarde à l'azote.....	120
I.3. Généralités sur la chlorméthine	120
I.3.1. Mécanisme d'action dans l'organisme.....	121
II. OBJET DU TRAVAIL	123
CHAPITRE II : SYNTHÈSE D'AGENTS ALKYLANTS	
I. INTRODUCTION	124
II. SYNTHÈSES.....	127
II.1. Synthèse de chloroéthylthymine.....	127
II.1.1. Alkylation de la thymine	128
II.1.1.1. Synthèse par activation micro-onde	129
II.1.2. Réaction de désacétylation	132
II.1.3. Réaction de chloration	133
II.2. Synthèse d'analogues de nucléosides portant une chaîne chloroéthyle	134
II.2.1. Synthèse de l'analogue portant le 2'-désoxyribose	135
II.2.2. Synthèse de l'analogue portant le ribose	136
II.2.2.1. Stratégie de synthèse	136
II.2.2.2. Couplage de la base et du glucide	136
II.2.2.2.1. Méthode de Fischer	137
II.2.2.2.2. Méthode de Hilbert et Johnson.....	137
II.2.2.2.3. Méthode de Vorbrüggen.....	138
II.2.2.2.4. Résultats et discussion.....	139
II.2.2.3. Alkylation en position 3 de la thymine.....	141
II.2.2.4. Déprotection du glucide.....	142
II.2.3. Synthèse de l'analogue à partir de l'uridine	142
II.3. Synthèse d'analogues de la chlorméthine glucosylés.....	143
II.3.1. Réaction de <i>o</i> -glycosylation	144
II.3.1.1. Méthode de Fischer	145
II.3.1.2. Méthode de Koenigs-Knorr	145
II.3.1.3. Méthode de Helferish et Hellibrecht	146
II.3.1.4. Méthode de Schmidt et coll.....	146
II.3.1.5. Résultats et discussion.....	147
II.3.1.5.1. Méthode d'Hanessian et coll.	147
II.3.1.5.2. Méthode de Schmidt et coll.....	148
II.3.1.5.3. Méthode de Koenigs-Knorr	150
II.3.1.6. N-alkylation de la thymine et désacétylation du glucose	151
II.3.1.6.1. Voie A.....	152
II.3.1.6.2. Voie B.....	152
II.4. Synthèse d'un analogue glucosylé à partir de la thymidine	153
II.4.1. Stratégie de synthèse	153
III. CONCLUSION	157
IV. PARTIE EXPERIMENTALE.....	158
IV.1. Réactifs et solvants.....	158
IV.2. Matériels et méthodes	159
IV.3. Micro-ondes	159
IV.4. Synthèses.....	160
CHAPITRE III : EVALUATION BIOLOGIQUE DE QUELQUES MOLECULES SYNTHETISEES.	
I. MATERIELS ET METHODES	181
I.1. Matériel chimique	181

I.1.1. Molécules.....	181
I.2. Matériel biologique.....	182
I.2.1. Lignée cellulaire.....	182
I.2.2. Entretien cellulaire.....	182
I.3. Etude in vitro.....	182
I.3.1. Etude de la viabilité cellulaire.....	182
I.3.1.1. Tests MTT.....	182
I.3.1.1.1. Principe du test MTT.....	183
I.3.1.1.2. Etude des effets de doses et du temps.....	183
I.3.2. Etude de la migration et de l'invasion cellulaires.....	183
I.3.2.1. Préparation des inserts pour la migration.....	183
I.3.2.2. Préparation des inserts pour l'invasion.....	184
I.3.2.3. Préparation des cellules pour la migration.....	184
I.3.2.4. Préparation des cellules pour l'invasion.....	184
I.3.2.5. Migration cellulaire.....	184
I.3.2.6. Invasion cellulaire.....	185
I.3.2.7. Zymographie.....	186
I.3.2.7.1. Principe.....	186
II. RESULTATS.....	187
II.1. Effets de 3b, 7, 8, RBZK6, RBZK8 et du chlorambucil sur la viabilité des cellules A431.....	187
II.2. Effets de 8, RBZK8 et du chlorambucil sur la migration des cellules A431.....	188
II.3. Effets de 8, RBZK8 et du chlorambucil sur l'invasion des cellules A431.....	189
II.4. Effets de 8 sur l'expression de MMP9, ProMMP9 et ProMM92.....	190
III. CONCLUSION.....	190
CONCLUSION GENERALE.....	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	
ANNEXE : STRUCTURES DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS..	

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : acétyle

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

Ar : aryle

Bz : benzoyle

cata = en quantité catalytique

CCM : chromatographie sur couche mince

CEDU : 5-(2-chloroéthyl)^{2'}-désoxyuridine

CM : métathèse croisée (cross metathesis)

COSY : correlated spectroscopy

DBU : diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMT : diméthoxytrityle

EDTA : éthylènediaminetétracétate

EP : Ether de pétrole éq = équivalent

fig = figure

HIV : virus d'immunodéficience humaine

HMBC : Homonuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy

HMDS = 1,1,1,3,3,3-héxaméthylidisilazane

HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy

IC₅₀ : inhibition cellulaire

IR : infrarouge

Me = méthyle

MO : micro-onde

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium

PNA : acides polyamides nucléiques

ppm = partie par million

PPTS : pyridinium *paratoluene* sulfonate
RCM : métathèse par fermeture de cycle (ring closing metathesis)
Rf : rapport frontal (CCM)
RMN : résonance magnétique nucléaire
ROM : ouverture de cycle par métathèse (ring opening metathesis)
ROMP : polymérisation par ouverture de cycle par métathèse (ring opening metathesis polymerization)
SIDA : syndrome d'immuno-déficience acquise
SM : self-metathesis
TBDMS : tertibutyldiméthylsilyle
TMSCl = chlorure de tétraméthylsilane
TMSOTf : Triméthylsilyle trifluorométhane sulfonate
THF : tétrahydrofurane
Tf : température de fusion
 Δ : chauffage classique
ph : groupement phényle

INTRODUCTION GENERALE

La Chimie des nucléosides représente un des développements majeurs dans le domaine de la chimie fine. L'importance biologique de ces composés est apparue dès la première moitié du vingtième siècle. Leur présence dans la cellule est indispensable en raison de leur implication dans la synthèse protéique et dans les processus de transmission de l'information génétique, transcription et traduction.

Les nucléosides modifiés ont vivement intéressé le chimiste et le pharmacologue en raison de leur impact dans le domaine thérapeutique. En effet, ces composés après quelques modifications ont montré des propriétés antibiotiques, anticancéreuses, antivirales ou antirétrovirales. Cependant si certains d'entre eux comme l'AZT, le d4T ou l'acyclovir ont été largement médiatisés, on ne dispose que d'un éventail relativement modeste de molécules réellement actives. De plus, les phénomènes de résistances virales peuvent apparaître dans des délais plus ou moins longs. C'est pourquoi la recherche de nouveaux analogues est toujours d'actualité.

Dans le cadre du programme de recherche sur les analogues de nucléosides du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'Université de Limoges, nous proposons la synthèse d'analogues de di- et trinucleosides reliés par une chaîne carbonée insaturée. Cette structure, différente des liaisons phosphodiester classiques, pourrait présenter des propriétés biologiques intéressantes.

Nous présentons, dans une seconde partie, la synthèse de nouveaux agents anticancéreux et plus exactement des agents alkylants qui créent un lien chimique fort avec les bases de l'ADN. Lors de la division cellulaire, le dédoublement des deux brins d'ADN devient difficile et la transcription s'arrête au niveau de l'agent alkylant entraînant ainsi le suicide de la cellule.

1^{ère} PARTIE

SYNTHESE DE DI- ET TRINUCLEOSIDES

CHAPITRE I

LES NUCLEOSIDES ET LEURS ANALOGUES

LES NUCLEOSIDES ET LEURS ANALOGUES- ETAT DE LA QUESTION

I. INTRODUCTION

Dans ce chapitre, nous proposons de décrire du point de vue de leur structure et de leur activité biologique, les nucléosides et les oligonucléotides et de présenter quelques oligonucléotides modifiés connus pour leur activité thérapeutique.

I.1. Les nucléosides et oligonucléotides : définition, structure

Les nucléosides sont des molécules d'origine naturelle, constituants de base des acides nucléiques (ADN et ARN), qui jouent un rôle fondamental dans la vie et la reproduction des cellules animales, végétales et microbiennes. Les acides nucléiques sont des substances qui, comme leur nom l'indique, ont été tout d'abord isolées du noyau des cellules. En fait, comme on l'a su plus tard, il existe des acides nucléiques non seulement dans le noyau, mais aussi dans le cytoplasme des cellules. Ce terme n'est donc plus approprié, mais il a été cependant conservé. Il existe deux types d'acides nucléiques, l'ADN (acide désoxyribonucléique) essentiellement localisé dans le noyau des cellules, et l'ARN (acide ribonucléique) essentiellement retrouvé dans le cytoplasme des cellules. C'est dans la synthèse des protéines, composés fondamentaux de la cellule, supports de la plupart des activités biologiques, que les acides nucléiques ADN et ARN jouent un rôle essentiel.

D'une façon très schématique, l'ADN contient l'information nécessaire à cette synthèse, le programme. Il servira en quelque sorte à dicter l'ordre dans lequel tel acide aminé, puis tel autre acide aminé, doivent s'enchaîner pour donner finalement la protéine adéquate. Il renferme également l'information nécessaire à la régulation de la synthèse protéique. L'ADN est un élément permanent de la cellule. Les informations qu'il contient seront transmises aux descendants. On dit que l'ADN est le support de l'hérédité. Les ARN, quant à eux, permettent l'exécution de la synthèse protéique.

Les acides nucléiques sont de très longues molécules, formées par la répétition de sous-unités appelées « nucléotides ».

Du point de vue expérimental, les nucléosides résultent de l'union d'une base azotée (purique ou pyrimidique) reliée par une liaison carbone-azote à une partie glucidique : le ribose pour l'ARN ou le désoxyribose pour l'ADN (schéma 1.1).

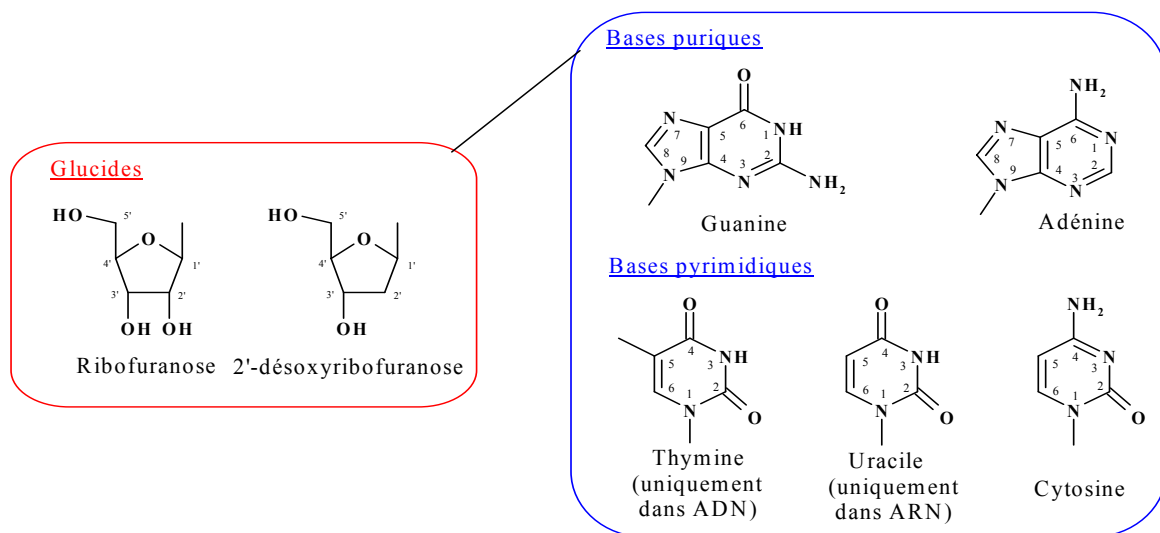


Schéma 1.1 : Structure générale d'un nucléoside

Les nucléotides résultent de la phosphorylation des nucléosides. La liaison entre les différents nucléosides est assurée par de l'acide phosphorique qui estérifie les fonctions alcool en position 3' et 5' des sucres. On appelle alors nucléotide chaque motif complet, comportant un groupe phosphate, un sucre et une base azotée (schéma 1.2).

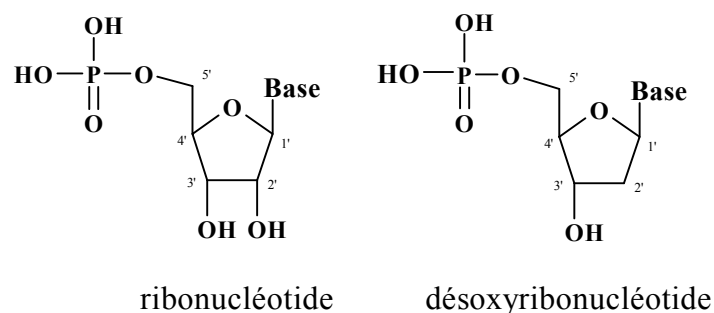


Schéma 1.2 : Ribo- et désoxyribonucléotide

Les polynucléotides ou les oligonucléotides sont des macromolécules constituées par l'enchaînement de plusieurs nucléotides reliés entre eux par une liaison 3',5'-phosphodiester. Un seul groupement phosphoryle réunit les deux nucléotides contigus en estérifiant d'une part

l'hydroxyle en position 3' du premier nucléotide et d'autre part l'hydroxyle en position 5' du deuxième nucléotide (schéma 1.3).

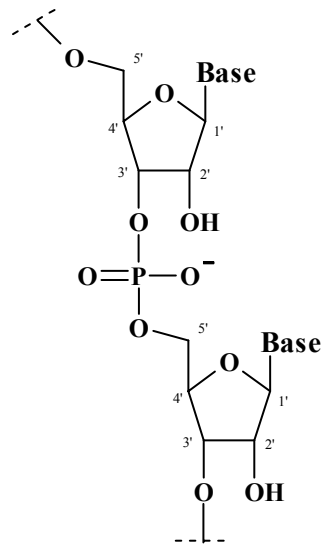


Schéma 1.3 : Schéma d'oligonucléotide

I.2. Structure et fonction de l'ADN et de l'ARN

L'ADN est donc formé de très nombreux nucléotides reliés entre eux par des fonctions phosphodiesters. Ce sont J.D. Watson et F.H.C. Crick¹ qui, en 1953, ont élucidé pour la première fois la structure de l'ADN. Trois caractéristiques sont propres à l'ADN, et vont le différencier des ARN. Comme les initiales « ADN » l'indiquent, l'ose entrant dans la constitution de l'ADN est du désoxyribose, et non du ribose comme ce sera le cas dans les ARN. Les bases constituant les nucléotides de l'ADN sont l'adénine, la guanine, la cytosine et la thymine. Il est à noter que, dans l'ADN, on ne trouve jamais d'uracile alors que dans les ARN, il y aura de l'uracile à la place de la thymine. Une molécule d'ADN est habituellement formée de deux chaînes (on dit aussi « deux brins ») de nucléotides, alors qu'une molécule d'ARN n'en comprend qu'une. On note cependant des exceptions chez certains virus.

Ces deux brins ont trois propriétés essentielles, ils sont dits antiparallèles, complémentaires et hélicoïdaux (schéma 1.4).

¹ a) J.D. Watson, F.H.C Crick, *Nature*, (1953), **171**, 737; *id.*, 1953, **171**, 964.

b) F.H.C. Crick, J.D. Watson, *Proc. Roy. Soc. (A)*, 1954, **223**, 80.

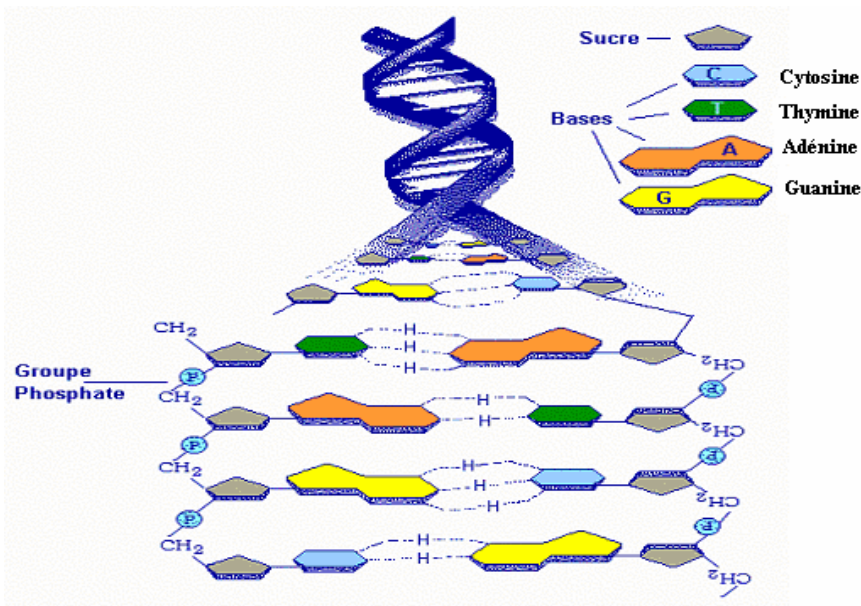


Schéma 1.4 : Structure de l'ADN

- Antiparallèle, signifie que les deux brins sont parallèles mais dans des directions opposées.

- Complémentaire, signifie qu'en face de l'adénine se trouve la thymine et en face de la cytosine, la guanine. Cette complémentarité entre les deux chaînes s'explique par des raisons stériques. En face d'une purine, on a obligatoirement une pyrimidine. Chaque paire de bases a donc la même dimension et ceci rend possible la structure régulière de la double hélice. Ceci pourrait laisser supposer qu'en face de l'adénine, on peut aussi bien trouver la thymine que la cytosine. Il n'en est rien, en effet, les bases complémentaires situées face à face sont liées entre elles par des liaisons hydrogène. En face d'un groupement NH_2 en position 6 d'une base purique se trouve un groupement $\text{C}=\text{O}$ d'une base pyrimidique, et inversement en face d'un groupement NH_2 d'une base pyrimidique se trouve un groupement $\text{C}=\text{O}$ d'une base purique. On peut remarquer que pour le couple A/T il y a deux liaisons hydrogène et que pour le couple C/G le nombre de liaisons hydrogène est de trois (schéma 1.5).

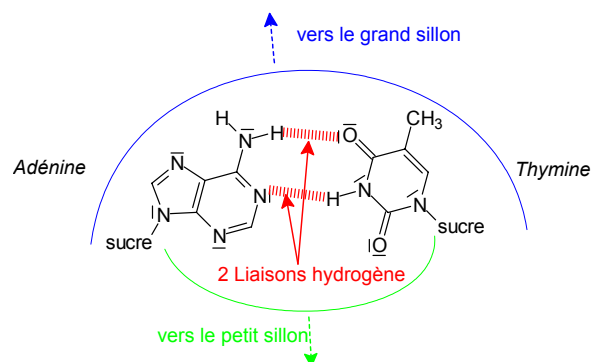


Schéma 1.5 : Appariement des bases par liaisons hydrogène

- Hélicoïdale, signifie que les deux chaînes de l'ADN présentent dans l'espace une configuration en forme d'hélice. Elles s'enroulent autour d'un axe central imaginaire en formant une double hélice. Il existe trois structures classiques des doubles brins de l'ADN, qui sont : l'ADN-A, l'ADN-B et l'ADN-Z. Cette classification est fondée sur des critères physico-chimiques. Ces types d'ADN diffèrent légèrement par le diamètre de leur hélice et par l'orientation de leurs paires de bases. De ce fait, les formes A et B sont composées d'hélices droites tandis que la forme Z est composée d'hélices gauches (schéma 1.6).

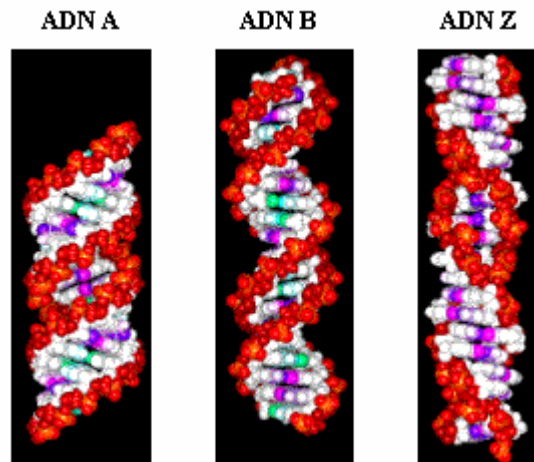


Schéma 1.6 : Les différentes formes de l'ADN

L'ADN-B est la forme biologiquement la plus importante. Les plans des bases sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice. Ces bases, à squelette hydrophobe, s'empilent les unes au-dessus des autres avec un certain décalage. Les analyses physico-chimiques d'ADN-B ont tout d'abord été effectuées sur des fibres cristallines : on trouve ainsi 10 paires de bases par tour de spire. La distance entre deux spires correspondant au pas de l'hélice est de 3,4 nm. Le diamètre de l'hélice est de 2,4 nm. Dans les cellules, l'ADN-B possède en moyenne 10,5 paires de bases par tour de spire.

Vue de profil, la double hélice de la forme B présente deux sillons, le grand et le petit, en spirale à peu près également creusés mais plus ou moins larges. Le fond du grand sillon contient un grand nombre d'atomes d'azote et d'oxygène qui appartiennent au sommet de la paire de bases et qui se projettent vers l'intérieur, à partir de leurs squelettes sucre-phosphate respectifs. Le fond du petit sillon est rempli d'atomes d'azote et d'oxygène des paires de bases et qui se projettent vers l'extérieur de leur squelette.

La forme A est rarement observée avec l'ADN, mais existe souvent avec l'ARN.

L'ADN-Z est une double hélice gauche. Il n'est pas l'image dans un miroir de l'ADN droite. Il a une conformation différente, le squelette sucre-phosphate est en zigzag. L'ADN-Z forme une hélice plus svelte et moins torsadée que l'ADN-B. Il comporte un nombre plus élevé de paires de bases par tour d'hélice. Ainsi, on trouve douze paires de bases par tour de spire. Le pas de l'hélice est de 4,6 nm et le diamètre de 1,8 nm.

Les acides nucléiques ADN ou ARN fournissent le scénario de tous les événements qui se produisent dans une cellule en étant les dépositaires moléculaires de l'information génétique. La structure de chaque protéine, et donc de chaque constituant cellulaire, est la résultante d'une information programmée dans la séquence nucléotidique des acides nucléiques cellulaires. La séquence en acides aminés de chaque protéine et la séquence nucléotidique de chaque molécule d'ARN dans une cellule sont déterminées par celle de l'ADN cellulaire. L'information nécessaire à la synthèse d'une protéine ou de l'ARN se trouve dans les séquences nucléotidiques correspondantes de l'ADN. Un segment d'ADN qui contient l'information nécessaire pour la synthèse d'un produit biologique fonctionnel est appelé gène. Afin de propager cette information génétique dans toutes les cellules, la nature permet la réplication de la molécule d'ADN. La réplication de l'ADN consiste en la copie de la totalité de l'information contenue dans le génome d'un organisme vivant. Ce processus se déroule selon un mode semi-conservatif, chacun des brins de l'ADN servant de modèle pour la copie du brin complémentaire (schéma 1.7).

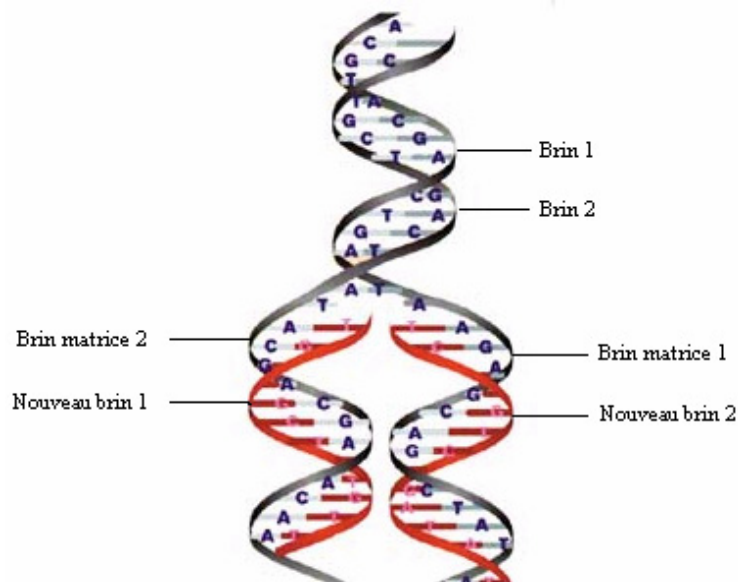


Schéma 1.7 : Réplication de l'ADN

Le processus de réplication démarre en un point fixe, appelé origine de réplication. La séquence de l'ADN, au niveau de l'origine, est capable d'induire des auto-appariements qui

sont reconnus par des protéines chargées d'initier la réplication. Une fois l'origine de la réplication reconnue, le processus suppose une séparation des deux brins par la rupture des liaisons hydrogène entre les bases (G/C et A/T). L'élongation est assurée dans les cellules par des enzymes appelées ADN polymérase. Ce sont des chaînes polypeptidiques qui sont chargées d'effectuer une attaque nucléophile par le groupement 3'-hydroxyle d'un nucléotide situé à l'extrémité 3' d'un brin de l'ADN en développement, sur le phosphore d'un désoxynucléoside 5'-triphosphate nouveau comme représenté sur le schéma 1.8. Du pyrophosphate inorganique est libéré au cours de la réaction.

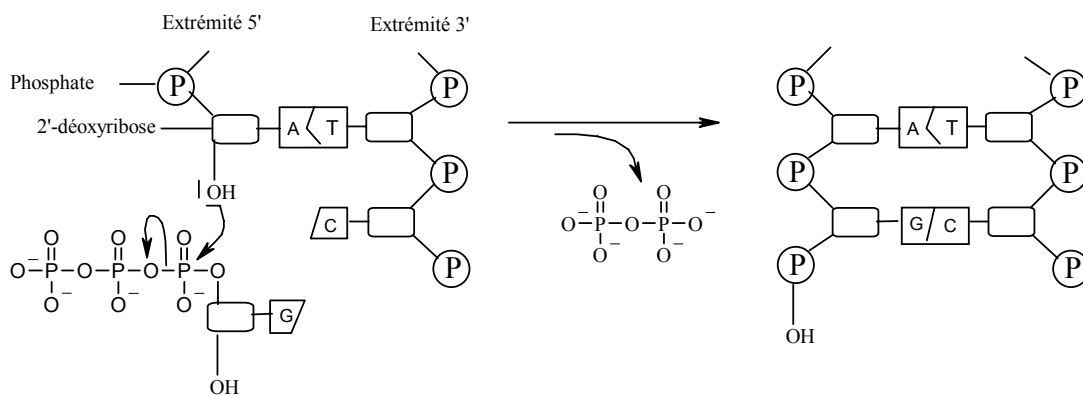


Schéma 1.8 : Elongation d'une chaîne d'ADN en cours de réplication²

La réaction de polymérisation est guidée par un brin d'ADN modèle selon les règles d'appariement des bases par paire, lorsqu'une guanine est présente dans cette matrice modèle, une cytosine est ajoutée au nouveau brin et ainsi de suite. Une amorce est aussi indispensable, il s'agit d'un segment de brin nouveau (complémentaire du modèle) possédant un groupement 3'-hydroxyle auquel peuvent être ajoutés des nucléotides. Cette réplication a lieu exclusivement dans le sens 5'→3' avec les nucléosides triphosphates comme source de monomères.

L'expression de l'information génétique contenue dans un segment d'ADN passe toujours par la formation d'une molécule d'ARN (ARN messenger). Au cours d'un phénomène appelé transcription, un système enzymatique (l'ARN polymérase) convertit l'information génétique d'un segment d'ADN en un brin d'ARN dont la séquence est complémentaire de celle d'un des brins de l'ADN.

² A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, *Principes de biochimie*, Ed : Médecine-Sciences, Flammarion, 2^{ème} édition, 1994, 336.

I.3. Virus et rétrovirus : généralités

Les virus sont les organismes les plus simples du monde vivant. Ils ne possèdent pas le matériel métabolique servant à la synthèse protéique et à la production d'énergie nécessaire à leur reproduction. Pour se reproduire, les virus doivent obligatoirement parasiter une cellule-hôte. Les rétrovirus quant à eux ont l'information génétique qui n'est contenue que dans l'ARN et non dans de l'ADN. Ils sont responsables de maladies graves telles que le SIDA ou certains cancers. Certains virus dont le génome est un ARN, présents dans les tissus animaux, contiennent à l'intérieur de la particule virale, une enzyme polymérase particulière appelée transcriptase inverse. Lors d'une infection, le génome viral constitué d'un ARN simple brin (qui contient environ 10000 nucléotides) et la transcriptase inverse pénètrent dans la cellule-hôte. La transcriptase inverse catalyse la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire de l'ARN viral. Le même enzyme dégrade le brin d'ARN de l'hybride ARN-ADN ainsi formé et le remplace par l'ADN complémentaire. La double hélice d'ADN qui en résulte est souvent incorporée dans le génome de la cellule-hôte. Dans certaines conditions, un tel génome viral intégré (et dormant) devient activé et est transcrit pour donner naissance à de nouveaux virus.

Les rétrovirus ont joué un rôle important dans l'évolution de la compréhension moléculaire des mécanismes du cancer. La plupart des rétrovirus ne tuent pas leur cellule-hôte, ils restent intégrés dans l'ADN cellulaire et sont répliqués avec lui. Certains rétrovirus possèdent cependant, un gène additionnel (oncogène) qui conduit la cellule à devenir cancéreuse (c'est-à-dire à croître de façon anormale), ces virus sont appelés virus tumorigènes à ARN. Par exemple, le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), l'agent causal du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), est un rétrovirus. Le HIV possède un ARN génomique contenant les gènes habituels des rétrovirus en même temps que plusieurs gènes inhabituels. Chez ce virus, le gène contenant le code des protéines de l'enveloppe virale subit (en même temps que le reste du génome) des mutations à une vitesse très rapide, ce qui complique le développement d'un vaccin efficace.

La transcriptase inverse³ du HIV est environ 10 fois moins exacte pour la transcription de l'information que les autres transcriptases inverses connues, ce qui suffit à expliquer le taux de mutations élevé observé chez ce virus. Il se produit en général une ou plusieurs erreurs à chaque répllication du génome viral, de telle sorte que deux molécules d'ARN viral ne sont pratiquement jamais identiques. La transcriptase inverse est la cible des médicaments les plus utilisés pour traiter les malades infectés par le HIV (schéma 1.9).

³ Transcriptase inverse : Enzyme virale nécessaire à la copie de l'ARN viral en ADN viral.

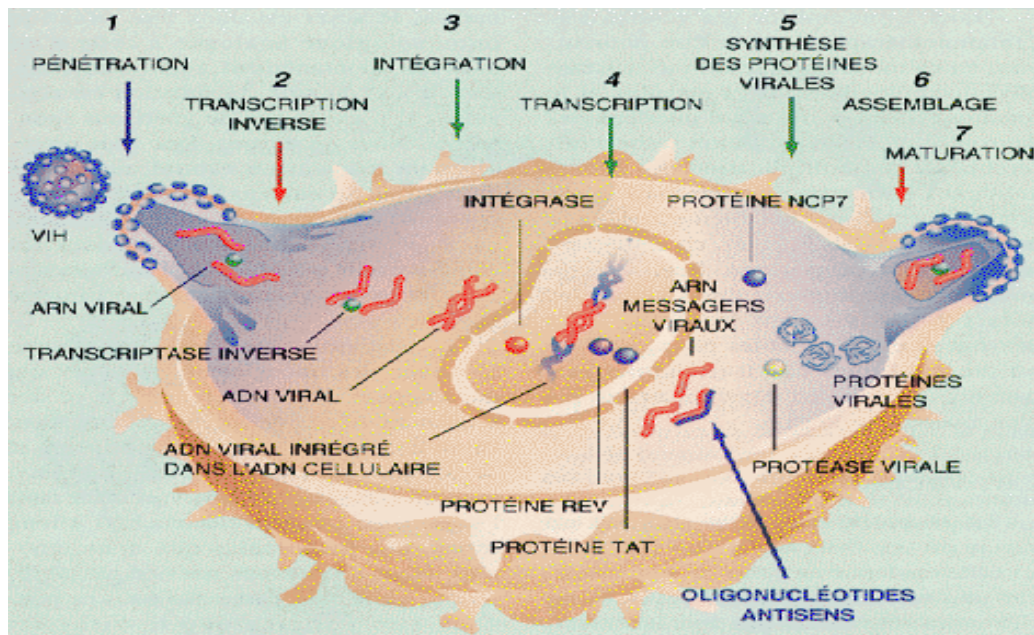


Schéma 1.9 : Cycle de réplication d'un rétrovirus, le HIV

I.4. Oligonucléotides à visée thérapeutique

Une maladie peut être causée par de nombreux facteurs : par exemple, une bactérie peut provoquer une infection, on la traite alors par des antibiotiques. D'autres maladies sont plus difficiles à traiter comme les maladies génétiques ou certaines maladies d'origine virale, pour lesquelles un segment de l'ADN est modifié ou ajouté et s'exprime alors en modifiant le fonctionnement normal de la cellule.

La régulation de l'expression des gènes, notamment de ceux responsables d'une maladie, peut être effectuée au moyen d'oligonucléotides spécifiques⁴. Cette régulation est déjà effective de manière naturelle au sein de chaque cellule lors de la production de telle ou telle protéine. Le même type d'approche est particulièrement adapté au traitement des cancers, des maladies infectieuses et de certaines maladies immunologiques. Le traitement consiste à supprimer l'expression d'un gène spécifique à l'origine des cellules cancéreuses, de l'infection, de l'allergie, de l'inflammation, etc..., sans interférer avec les fonctions cellulaires normales. On peut ainsi chercher à inhiber sélectivement l'expression d'un gène viral particulier nécessaire à la réplication du virus ou d'un oncogène activé de façon inappropriée. De plus, l'inhibition ciblée d'un gène peut offrir la possibilité de traiter certaines maladies

⁴ a) H. Schreier, *Pharm. Act. Helv.*, 1994, **68**, 145.

b) K.-Y. Jen; A.M. Gewirtz, *Stem Cells*, 2000, **18**, 307.

héréditaires dominantes. La thérapie par inhibition sélective de l'expression d'un gène est techniquement possible à trois niveaux :

i l'utilisation d'anticorps intracellulaires (qui peuvent être dirigés contre des sites spécifiques dans les cellules, afin de se lier à une protéine) ou d'oligonucléotides aptamères (qui peuvent se lier spécifiquement à un polypeptide sélectionné).

*ii la thérapie antisens*⁵ : un oligonucléotide spécifique du gène ou de l'ARN se lie à l'ARN. Dans certains cas, l'agent de liaison peut être un ribozyme, molécule d'ARN catalytique, spécifiquement conçu pour couper l'ARN transcrit.

*iii la thérapie triple hélice*⁶ : elle repose sur l'addition d'un oligonucléotide pour former une triple hélice au niveau de l'ADN double-brin du gène afin d'inhiber la transcription du gène.

Nous nous sommes intéressés plus précisément aux deux derniers types d'action, la thérapie antisens et la thérapie triple hélice.

I.4.1. La thérapie antisens

Une possibilité pour bloquer l'expression de l'ARN consiste à utiliser des oligodésoxynucléotides antisens. Au cours de la transcription, seul l'un des brins d'ADN, le *brin matrice*, sert de matrice pour la synthèse d'une molécule d'ARN complémentaire. Par conséquent, la séquence de base de l'ARN simple-brin ainsi transcrit est pratiquement identique (à l'exception de l'uracile qui remplace la thymine) à l'autre brin d'ADN, communément appelé *brin sens*. Tout oligonucléotide complémentaire dans la séquence d'un ARNm (donc pratiquement identique au brin matrice) peut être ainsi considéré comme une *séquence antisens*. La liaison d'une séquence antisens à une séquence ARNm correspondante est supposée interférer avec la traduction et, ainsi inhiber la synthèse du polypeptide. On sait que les ARN antisens permettent de contrôler l'expression de gènes dans certaines plantes et cellules animales comme dans certains micro-organismes. On peut créer des oligonucléotides synthétiques de séquence complémentaire à un ARNm spécifique, lorsqu'ils sont transférés dans les cellules, ces oligonucléotides ont un effet inhibiteur sur l'expression du gène correspondant. C'est sur cette base que s'est développé le concept de la thérapie antisens (schéma 1.10). On pourrait inhiber sélectivement l'expression non désirée du gène spécifique dans des tissus malades en utilisant une séquence antisens spécifique de gène artificielle.

⁵ M. Kumar; G. G. Carmichael, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* , 1998, **62**, 4, 1415.

⁶ S. Buchini; C. J. Leumann; *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, **7**, 717-726.

Différents types de séquences peuvent être utilisés, des oligodésoynucléotides antisens, des gènes antisens, des ribozymes...

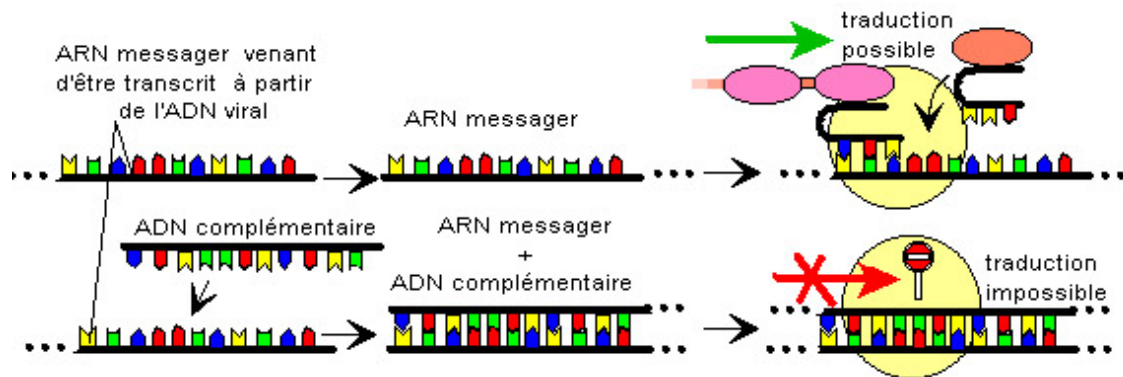


Schéma 1.10 : Principe de la thérapie antisens

I.4.2. La thérapie triple hélice

Des oligonucléotides peuvent être conçus pour se fixer sur une double hélice d'ADN. Une telle approche est nécessaire si l'on veut, par exemple, moduler la transcription d'un gène en se fixant sur son promoteur. La formation d'une triple hélice s'effectue par fixation d'un troisième brin oligodésoxyribonucléotidique dans le grand sillon de l'ADN (schéma 1.11).

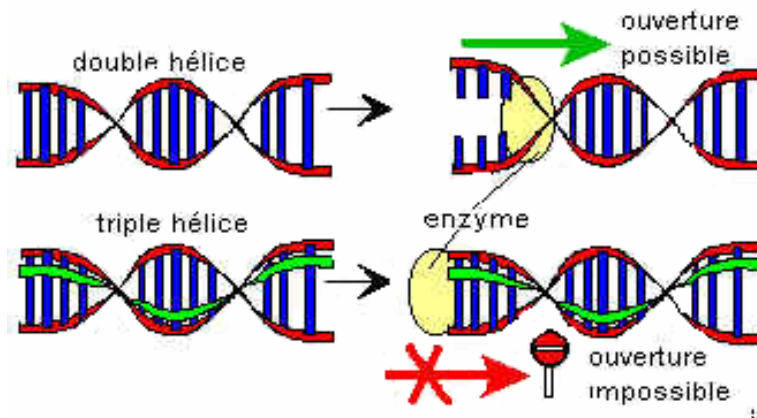


Schéma 1.11 : Principe de la thérapie triple hélice³

La fixation du troisième brin est rendue possible par des liaisons hydrogène de Hoogsteen (schémas 1.12, 1.13, 1.14 et 1.15). On voit sur ces schémas, que seules les bases guanine et cytosine sont capables de former, en plus d'une liaison de Watson-Crick, des liaisons hydrogène de Hoogsteen. La formation des liaisons hydrogène de Hoogsteen est possible de par le fait que sur les purines, il existe des sites pouvant se lier par liaison hydrogène autres que ceux déjà occupés par les liaisons hydrogène de Watson-Crick. En effet sur la guanine, un des doublets de l'oxygène du carbonyle en position 6 et le doublet de l'azote en position 7

sont disponibles pour de nouvelles liaisons hydrogène, de même que le doublet de l'azote en position 7 et qu'un des atomes d'hydrogène de la fonction amine en position 6. Il est ainsi possible qu'une base vienne se lier à ces purines permettant de former le triplex, de la manière suivante : une thymine peut se lier à l'adénine d'une paire adénine-thymine, une guanine peut se lier à une paire guanine-cytosine, une cytosine protonée sur l'azote en position 3 en milieu acide peut se lier à cette même paire et une adénine peut se lier à une paire adénine-thymine. Il est à noter que dans les trois premiers cas, deux possibilités de positionnement de la base supplémentaire sont envisageables, le sucre se trouvera alors d'un côté ou de l'autre. Cette structure a été clairement caractérisée par RMN par M.J.P. van Dongen et coll.⁷

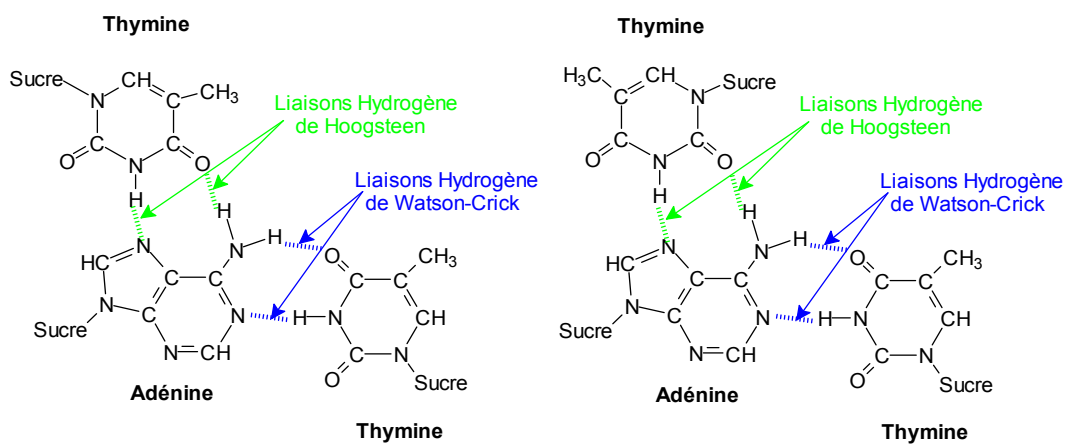


Schéma 1.12 : Liaisons hydrogène Thymine-Adénine-Thymine

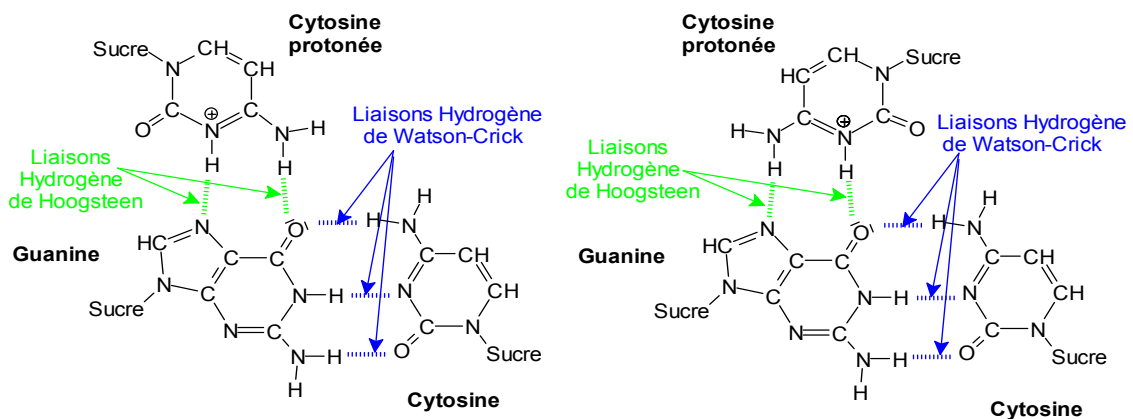


Schéma 1.13 : Liaisons hydrogène Cytosine protonée-Guanine-Cytosine

⁷ M.J.P. van Dongen; H.A. Heus; S.S. Wymenga; G.A. van der Marel; J.H. van Boom; C. W. Hilbers, *Biochemistry*, 1996, **35**(6), 1733.

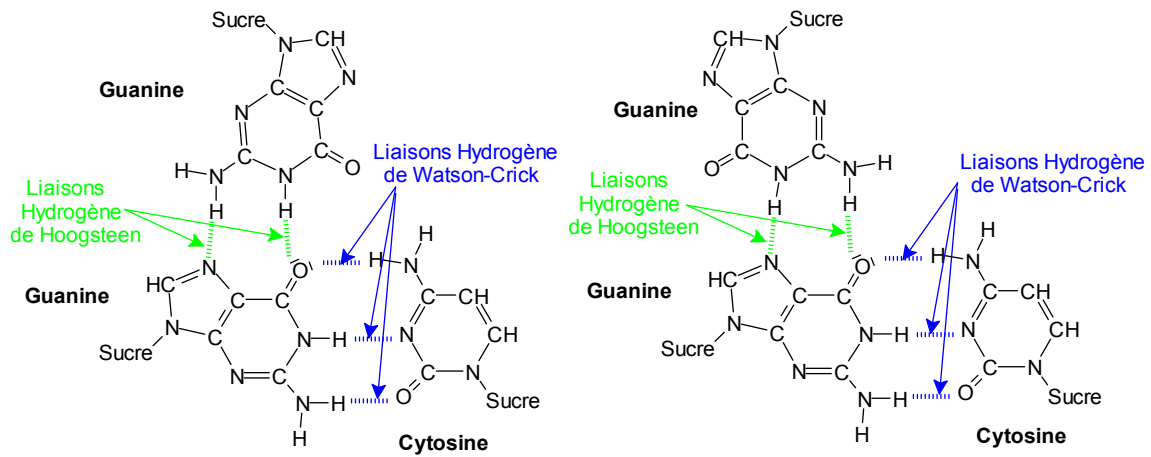


Schéma 1.14 : Liaisons Hydrogène Guanine-Guanine-Cytosine

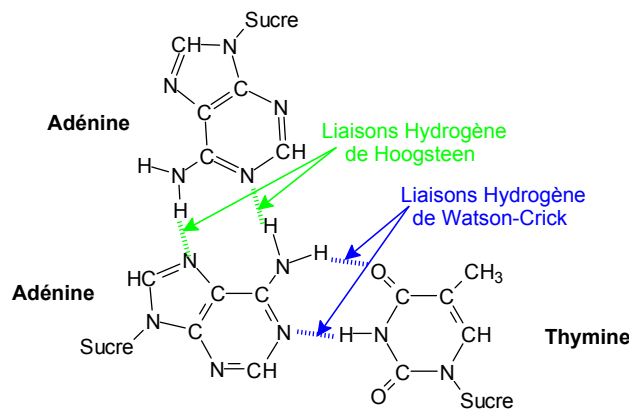


Schéma 1.15 : Liaisons Hydrogène Adénine-Adénine-Thymine

Le second brin d'ADN sur lequel s'hybride le troisième brin doit donc être, en règle générale, formé uniquement de purines. Il y a peu de séquences naturelles homopuriques assez longues sur l'ADN chromosomique pour former des triples hélices stables, ce qui rend cette stratégie assez difficile à mettre en œuvre. Néanmoins, des séquences homopuriques ont été identifiées chez certains virus, dont le virus HIV, ce qui rend la stratégie triple hélice attractive pour le développement de produits antiviraux à forte sélectivité d'action⁸.

Ces oligonucléotides peuvent être acheminés à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire par exemple, de liposomes, vésicules dont la paroi est formée d'une ou plusieurs bicouches le plus souvent de nature phospholipidique et renfermant un espace interne aqueux. Une fois à l'intérieur de la cellule, les oligonucléotides peuvent alors migrer rapidement vers le noyau de la cellule (schéma 1.16) où ils pourront alors se lier au segment d'ADN cible, en formant une triple hélice, inhibant ou tout du moins gênant l'expression du gène indésirable.^{9,10}

⁸ M. L. Capobianco; M. De Champdoré; F. Arcamone; A. Garbesi; D. Guianvarc'h; P. B. Arimondo; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, **13**, 3209-3218.

⁹ a) M. Grigoriev; D. Praseuth; A.-L. Guieysse; P. Robin; N.T. Thuong; C. Hélène; A. Harel-Bellan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 3501.

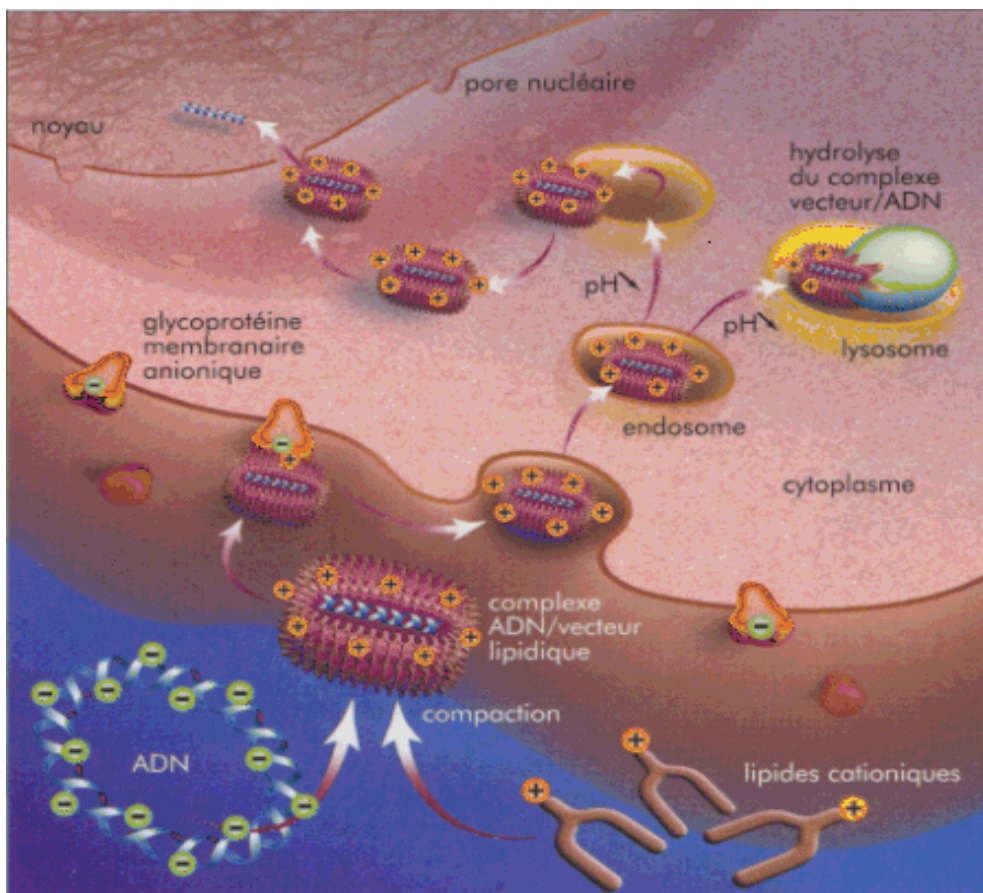


Schéma 1.16 : Introduction d'un vecteur synthétique dans une cellule¹¹

Cependant, à l'intérieur de la cellule, ces oligonucléotides sont exposés à l'attaque de nucléases, et la demi-vie des oligonucléotides conventionnels possédant des liaisons phosphodiesters est habituellement d'environ 20 minutes. Il est donc nécessaire de modifier chimiquement les extrémités 3' et 5' des oligonucléotides, afin de les protéger contre l'attaque des nucléases, enzymes qui catalysent l'hydrolyse des acides nucléiques, en rompant les chaînes de nucléotides en plus petites unités. Une possibilité réside dans l'incorporation de liaisons phosphorothioates. L'application de cette technique présente cependant des limitations, la principale est que pour établir des liaisons hydrogène de Hoogsteen, les séquences cibles doivent être complètement constituées de purines sur l'un des brins. Les

b) D. Praseuth; A.L. Guieysse; C. Hélène, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1999, **1489**, 181.

¹⁰ C.V. Catapano; E.M. McGuffie; D. Pacheco; G. M. R. Carbone, *Biochemistry*, 2000, **39** (17), 5126.

¹¹ www.ac-orleans-tours.fr

segments d'ADN mis en jeu dans les fonctions biologiques importantes ne remplissent que rarement cette condition. Pour reconnaître un plus grand nombre de séquences d'ADN, plusieurs approches ont récemment été proposées :

- de nouveaux analogues de bases ont été synthétisés pour se lier aux pyrimidines des paires Watson-Crick T-A et C-G. Ces nouvelles molécules ont montré qu'elles forment des triplets stables dans les conditions physiologiques¹², permettant de « sauter » les bases non-puriques ;
- plusieurs groupes de recherche ont exploré une approche basée sur le ciblage de séquences formées par l'enchaînement d'un segment ne comportant que des bases puriques suivi d'un segment exclusivement pyrimidique, que l'on note pour simplifier (purine)_m(pyrimidine)_n. En effet, si un brin de la double hélice présente cet enchaînement, cela implique que le brin complémentaire aura une séquence (pyrimidine)_m(purine)_n. Deux domaines puriques sont donc adjacents mais se trouvent sur des brins différents. Afin d'hybrider la totalité de cette zone de l'ADN, deux segments pyrimidiques reliés entre eux sont utilisés, chacun devant se fixer parallèlement à un des domaines puriques, dans le grand sillon, par liaison hydrogène de Hoogsteen. Ces deux segments étant orientés de manière opposée, une liaison internucléosidique reliant les positions 3' de deux sucres ou les positions 5' (ce type de liaison internucléosidique porte le nom de « pont inverseur ») est introduite entre les deux segments pour les relier. Celle-ci permet à l'oligonucléotide formant le troisième brin de traverser le grand sillon afin qu'il puisse « sauter » d'un segment purique à l'autre, pour s'y lier parallèlement. Le schéma 1.17 permet de visualiser cette approche. Un groupe EDTA-Fe est fixé en bout du troisième brin de manière à effectuer une coupure oxydante de la double hélice au niveau du segment ciblé¹³.

¹² S.C. Zimmerman; P. Schmitt, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 10769.

¹³ D. A. Horne; P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 2435.

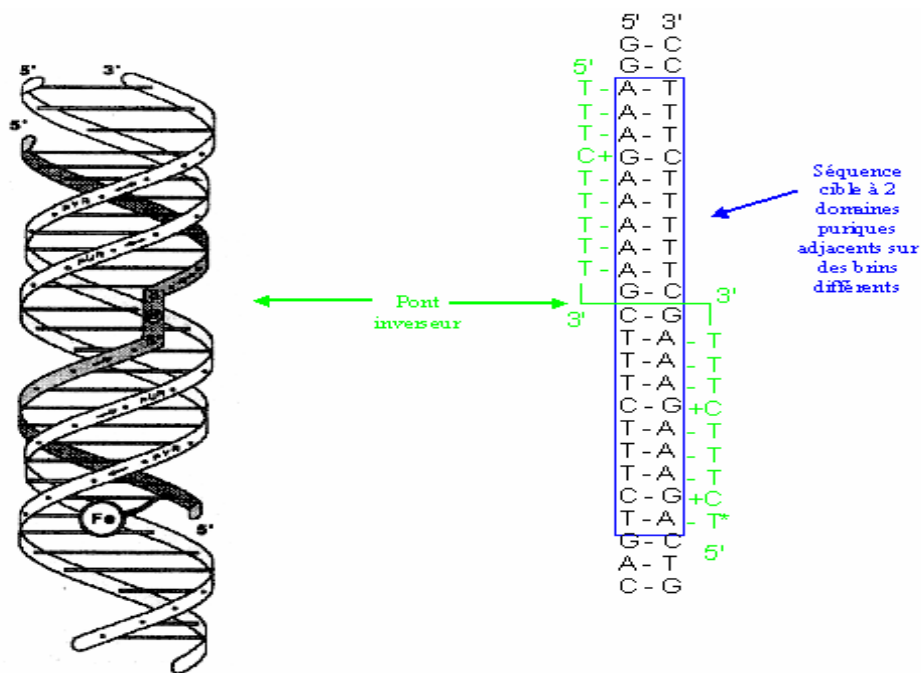


Schéma 1.17 : Triple hélice « sautant » d'un brin purique à l'autre

Au sein du motif triplex pyrimidine purine – pyrimidine (où une séquence polypyrimidine courte, parallèle, au domaine homopurine de la double hélice cible en formant des triades Hoogsteen, représentée par \cdot), une liaison simultanée au brin purique adjacent de l'autre brin, peut se réaliser si les conditions suivantes sont remplies :

- le « pont inverseur » de l'oligonucléotide doit être capable de lui faire traverser le grand sillon de la double hélice efficacement, sans causer de distorsions importantes à la structure de la triple hélice.
- l'oligonucléotide doit avoir une jonction introduisant une inversion de polarité appropriée (3'-3' ou 5'-5') ce qui assure aux deux extrémités 3' et 5' l'orientation exigée.

Parmi les ponts inverseurs décrits, nous pouvons citer par exemple, le 1,2-didésoxy-D-ribose¹⁴, le propane-1,3-diol¹⁴, le pentaerythritol¹⁴, une unité ortho-xylène¹⁵, une chaîne carbonée insaturée¹⁶, permettent de créer une liaison internucléosidique entre les positions 3' des deux segments nucléotides pyrimidiques. Un nucléoside se liant par la liaison phosphodiester habituelle aux extrémités 3' ¹⁷ ou une liaison interbase¹⁸ permet également

¹⁴ S. Hoshika; Y. Ueno; H. Kamiya; A. Matsuda, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, **14**, 3333.

¹⁵ S. McCurdy ; C. Moulds; B. Froehler, *Nucleosides & Nucleotides*, 1991, **10**, 287.

¹⁶ N. Batoux; R. Benhaddou-Zerrouki; P. Bressolier; R. Granet; G. Laumont; A-M. Aubertin; P. Krausz, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 1491.

¹⁷ L. De Napoli; A. Messere; D. Montesarchio, A. Pepe, G. Piccialli, M. Varra, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 9024.

¹⁸ a) U. Asseline; N. Thang Thuong, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 26, 4173.

d'obtenir un pont inverseur (schéma 1.18). Des triples hélices se forment effectivement avec ces troisièmes brins portant des ponts inverseurs et ont montré leur stabilité.

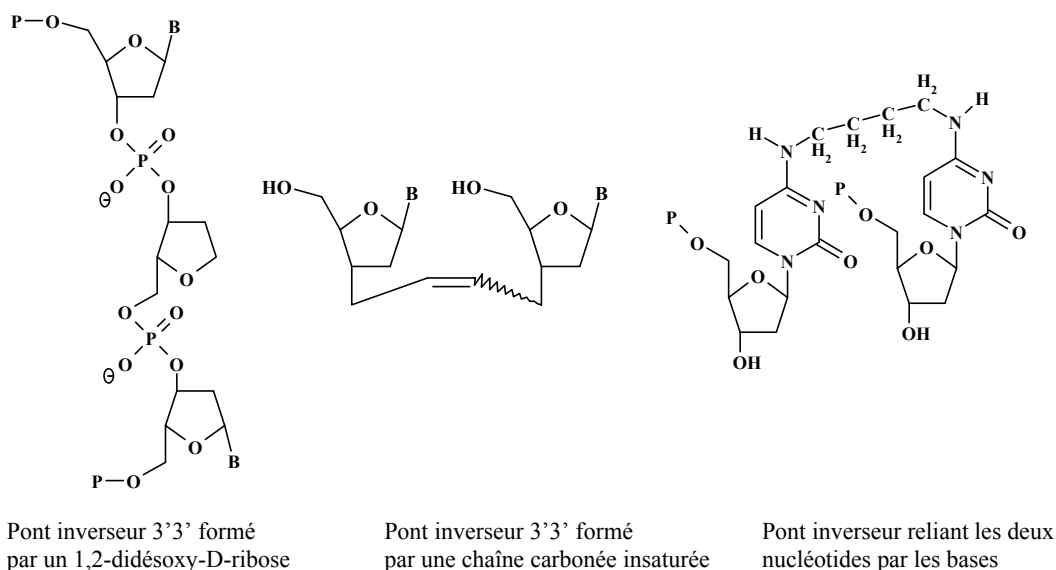


Schéma 1.18 : Exemples de ponts inverseurs

On trouve également dans la littérature des ponts inverseurs reliant les positions 5' des sucres des nucléotides, comme par exemple des phosphoramides¹⁹. Des dinucléotides reliés, par plusieurs liaisons phosphodiester entre les positions 5' trouvent également une application en tant qu'inhibiteurs de récepteurs P2Y (récepteurs d'hormones portés par la membrane cellulaire et couplés à une protéine de type G)²⁰, mais aussi par une chaîne carbonée insaturée¹⁶ (schéma 1.19).

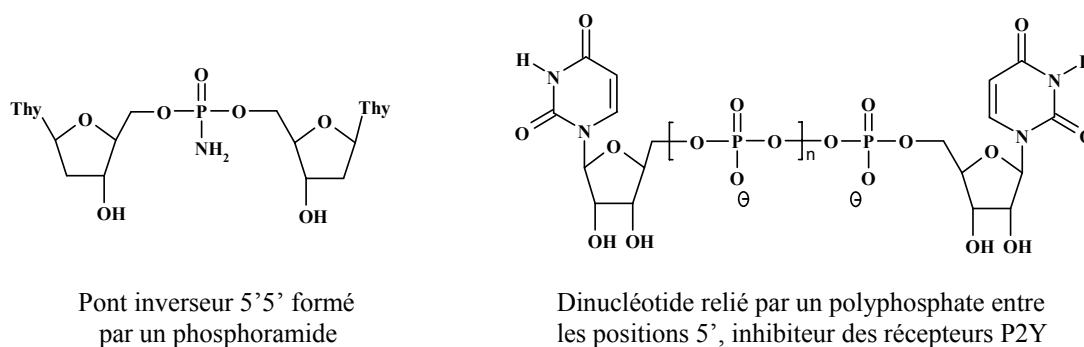


Schéma 1.19 : Exemples de dinucléotides reliés par les positions 5'

b) U. Asseline; N. Thang Thuong, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 29, 5221.

¹⁹ J. Tomasz, *Nucleosides & Nucleotides*, 1983, **2**, 1, 51.

²⁰ W. Pendergast; B. R. Yerxa; J. G. Douglass III; S. R. Shaver; R. W. Dougherty, C. C. Redick, I. F. Sims, J. L. Rideout, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 157.

I.5. Exemples d'analogues d'oligonucléotides thérapeutiquement actifs

Les oligonucléotides classiques traversent avec difficulté les membranes cellulaires, car ce sont des polyanions hydrophiles du fait de leurs liaisons internucléosidiques phosphodiesters. De plus ces oligonucléotides sont rapidement dégradés *in vivo* par des exonucléases, enzymes qui dégradent les oligonucléotides de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5'. Enfin, ils sont rapidement éliminés de la circulation par filtration rénale.

C'est pourquoi, afin d'augmenter la résistance de ces liaisons vis-à-vis de ces enzymes, des modifications de la liaison internucléosidique phosphodiester ont été réalisées. Par exemple, en remplaçant l'atome d'oxygène portant la charge négative par un atome de soufre²¹ ou de fluor²², pour mener à des phosphorothionates ou des fluorophosphates. Ou encore en substituant des atomes d'oxygène par un atome de sélénium et d'hydrogène, pour donner des diesters de H-phosphosélénates²³ ou par des atomes de soufre pour donner des phosphodithioates²⁴ (schéma 1.20).

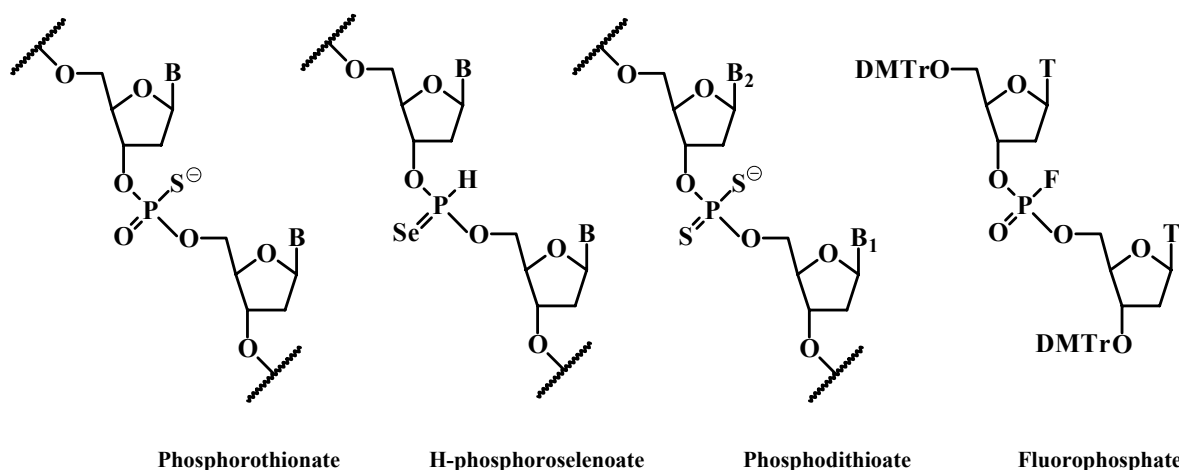


Schéma 1.20 : Exemples d'oligonucléotides modifiés au niveau de la jonction 3',5'

Des modifications stéréospécifiques de phosphonothioates ont également été conduites afin d'obtenir une chiralité bien définie du phosphore²⁵ (schéma 1.21). Ces modifications ont pour but de définir la configuration absolue la plus stable et la plus active vis-à-vis de la formation de triple et double hélice avec l'ADN ou l'ARN.

²¹ V. T. Ravikumar; D. C. Capaldi; W. F. Lima; E. Lesnik; B. Turney; D. L. Colle, *Bioorg. Med. Chem.* 2003, **11**, 4673.

²² J. Michalski; W. Dabkowski, *C. R Chimie*, 2004, **7**, 901-907.

²³ M. Bollmark; M. Kullberg; J. Stawinski, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **43**, 515.

²⁴ K. Kamaiki, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 5803.

²⁵ a) B. Nawrot; B. Rebowska, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 6641.

b) T. Johansson; J. Stawinski, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **60**, 389.

c) L. A. Wozniak; M. Janicka, *Jour. Organo. Chem.*, 2005, **690**, 2658.

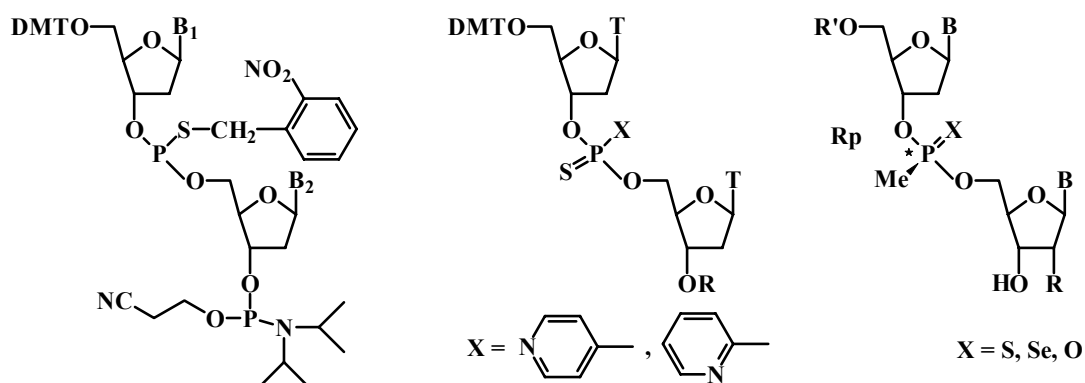


Schéma 1.21 : Exemples d'oligonucléosides modifiés au niveau de la jonction 3',5'

Des modifications plus importantes des liaisons internucléosidiques ont été proposées par de nombreux auteurs. Les acides nucléiques polyamides (PNA) constituent certainement la classe la plus étudiée, où le sucre peut être complètement éliminé ou alors lié au sucre suivant par une liaison amide²⁶ (schéma 1.22).

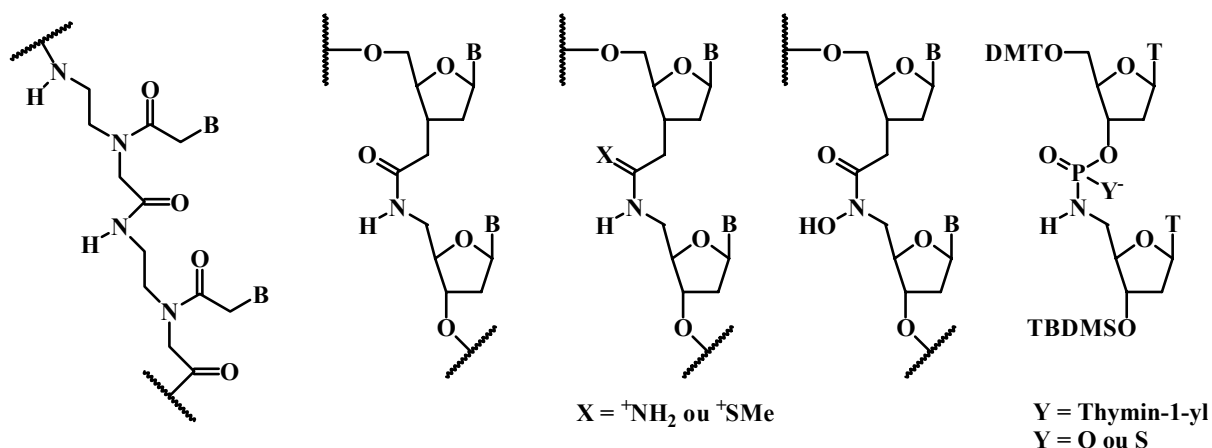


Schéma 1.22 : Acides nucléiques polyamides (PNA)

La liaison internucléosidique a également été remplacée par l'emploi d'un groupe carbazole²⁷, de chaînes comportant une cétone α -insaturée²⁸, d'une chaîne carbonée acétylénique²⁹, d'une chaîne comportant des fluors³⁰, ou encore d'une chaîne présentant une

²⁶ a) A. De Mesmaeker; R. Häner; P. Martin; H. E. Moser, *Acc. Chem. Res.*, 1995, **28**, 366.

b) P. M. J. Jung; R. Beaugégnies; A. De Mesmaeker; S. Wendeborn, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 293.

c) I. Kers; J. Stawinski, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **55**, 11579.

²⁷ J. Magdalena; S. Fernandez; M. Ferreo; V. Gotor, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 1787.

²⁸ K. Lee; D. F. Wiemer, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 7808.

²⁹ S. Wendeborn; C. Jouanno; R. M. Wolf; A. De Mesmaeker, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 31, 5511.

³⁰ A. Gautier; C. Lopin; G. Garipova; I. Kalina; S. R. Piettre, *Journal of Fluorine Chemistry*, 2004, **125**, 1745-1756.

double liaison, obtenue par la réaction de Wittig. Dans ce dernier cas, la formation et l'activité des deux isomères ont été étudiées³¹ (schéma 1.23).

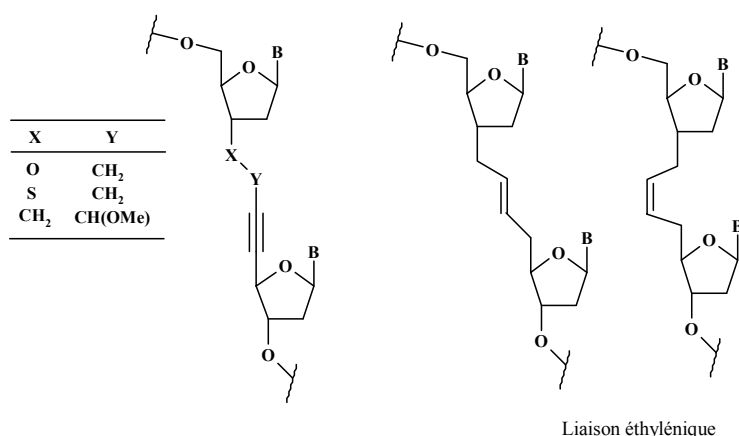


Schéma 1.23 : Exemples de liaisons internucléosidiques insaturées

Ces différentes liaisons internucléosidiques, ont généralement montré des propriétés antisens prometteuses, par une bonne aptitude à former des duplexes en double hélice et par une très bonne résistance vis-à-vis des nucléases. La température de dénaturation, T_m , qui correspond à la température à laquelle les deux brins d'ADN se séparent, représente donc la stabilité de la structure en double hélice. Lorsqu'elle a été évaluée, elle montre des variations n'excédant pas 5°C par rapport à l'oligonucléotide naturel, indiquant ainsi une bonne stabilité. Pour mieux résister aux enzymes qui ont pour fonction de dégrader la séquence d'acide nucléique en commençant par une des extrémités 3' ou 5', les exonucléases, Seliger et Coll.³² ont développé des analogues d'oligonucléotides présentant des liaisons internucléosidiques 3'-3' ou 5'-5' en position terminale (schéma 1.24).

³¹ S. Wenderborn; R. M. Wolf; A. De Mesmaeker, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 38, 6879.

³² H. Seliger; A. Fröhlich; M. Montenarh; J. F. Ramalho Ortigao; H. Rösch, *Nucleosides & Nucleotides*, 1991, **10**, 1-3, 469.

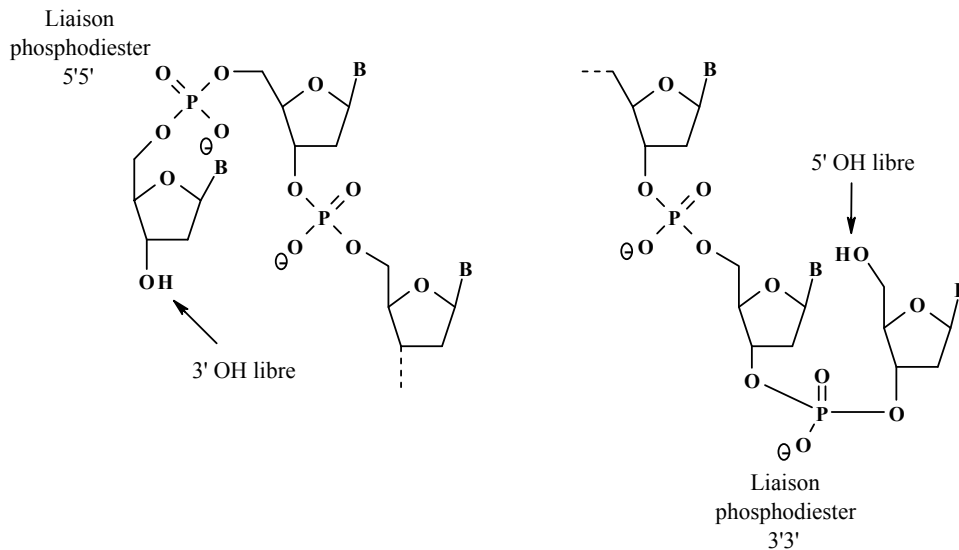


Schéma 1.24 : Oligonucléotides présentant des liaisons phosphodiester 3'3' et 5'5' terminales

De tels analogues d'oligonucléotides ont montré une résistance bien supérieure que les oligonucléotides non modifiés, vis-à-vis du sérum humain (pas de décomposition au bout de 90 minutes alors que le composé biologique correspondant est partiellement dégradé au bout de 30 minutes). On constate de plus, une inhibition importante du gène ciblé *in vitro* alors que l'homologue biologique de cet oligonucléotide modifié ne donne pas lieu à ce phénomène.

Dans la littérature, on rencontre également des séquences d'oligonucléotides permettant de bloquer l'expression d'un gène en formant une triple hélice avec l'ADN. Ainsi, l'utilisation d'oligonucléotides comportant dans leur séquence un lien entre les positions 3' ou 5' des parties glucidiques, peut être efficace pour bloquer l'expression d'un gène dont la séquence n'est pas uniquement constituée de purines sur l'un des brins. Un tel oligonucléotide particulier peut se lier à l'ADN en formant une triple hélice, le troisième brin « sautant » d'un brin à l'autre lorsqu'une base pyrimidique est rencontrée. Ainsi Seliger et coll.³² ont montré que ce type de composé avait une durée de vie supérieure à celle des oligonucléotides classiques et étaient donc plus résistants aux nucléases. McCurdy et coll.¹⁵ ont proposé un lien différent entre les positions 3' : un éther de *para*-xylène est fixé entre les positions 3' de deux nucléotides (schéma 1.25). Ces composés ont montré qu'ils se fixaient bien sur l'ADN cible par triple hélice.

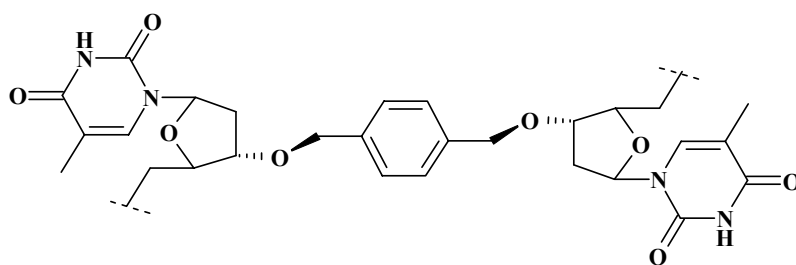


Schéma 1.25 : Liaison éther de para-xylène entre les positions 3' de deux nucléotides

Miller et coll.³³ ont mis en évidence que des oligonucléotides contenant alternativement des liaisons internucléotidiques méthylphosphonate et phosphodiester (schéma 1.26) étaient remarquablement résistants aux hydrolyses induites par des exo- et des endonucléases. Ces analogues forment une triple hélice stable avec le double brin d'ADN sous des conditions physiologiques. Cette propriété suggère que ces oligonucléotides peuvent être utilisés comme agents antisens ou antigène en culture cellulaire.

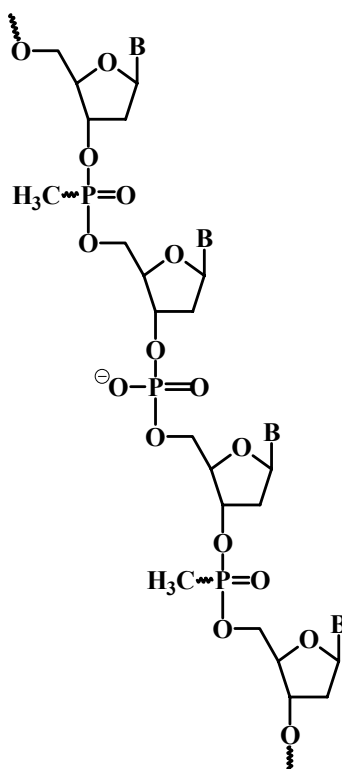


Schéma 1.26 : Structure générale de l'oligonucléotide modifié

³³ P. S. Miller ; R. A. Cassidy ; T. Hamma ; N. S. Kondo ; *Pharmacology & Therapeutics*, 2000, **85**, 159-163.

Asseline et coll.³⁴, quant à eux, ont montré que l'incorporation d'un ou plusieurs groupes bis-hydroxyéthyles ou bis-aminoéthyles sur le phosphore d'oligonucléotides par l'intermédiaire d'une liaison phosphoramidate (schéma 1.27) favorisait la formation de triple hélice avec un ADN double brin. Seuls les oligonucléotides ayant des groupes phosphates modifiés avec une configuration Rp forment des triples hélices plus stables que ceux ayant des liaisons phosphodiester. Une stabilisation plus forte est observée avec des composés contenant des liaisons phosphoramidates modifiées avec des fonctions amines.

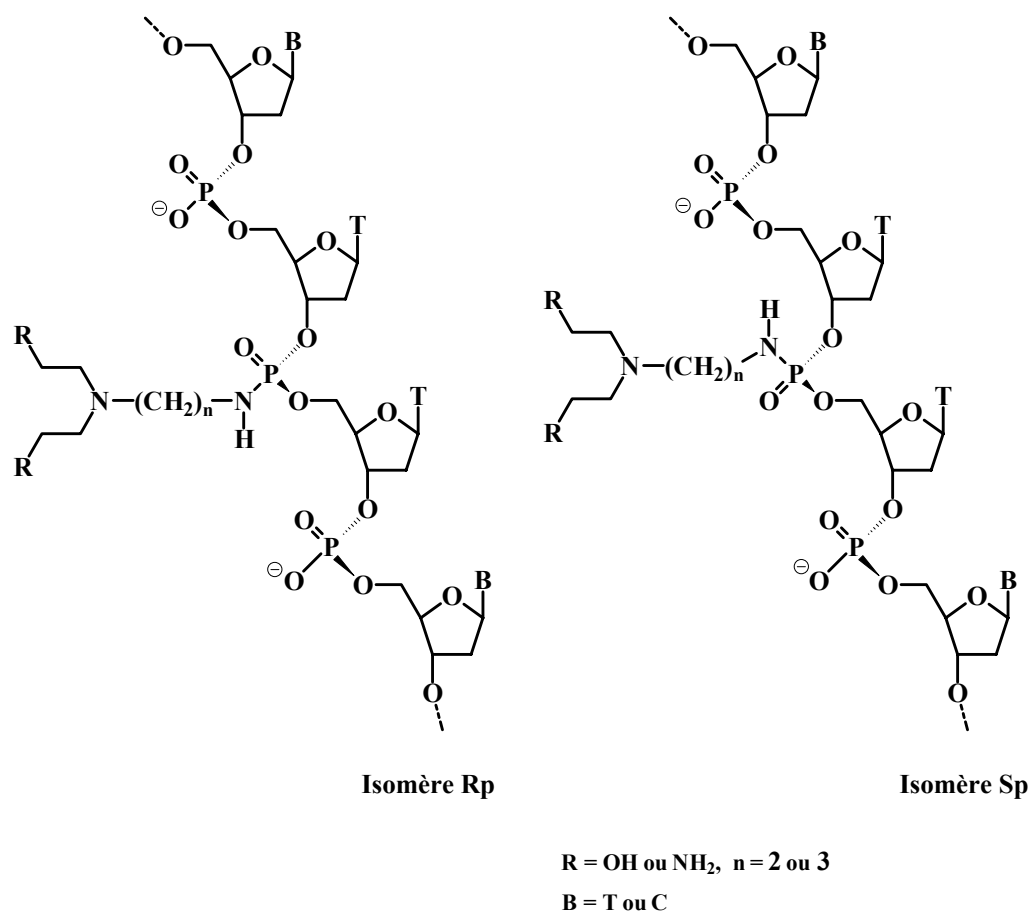


Schéma 1.27 : Structures des liaisons internucléotidiques modifiées

³⁴ U. Asseline ; M. Chassignol ; J. Draus ; M. Durand ; J-C. Maurizot ; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003, **11**, 3499-3511.

II. OBJET DU TRAVAIL

L'analyse bibliographique précédente fait apparaître qu'à l'heure actuelle, on possède assez peu de structures d'analogues d'oligonucléotides, en particulier de pont inverseur, malgré l'intérêt de telles molécules.

Dans le cadre du programme de synthèse d'analogues d'oligonucléotides du laboratoire, nous nous proposons de synthétiser des dinucléosides (3'-3', 3-3, 5'-5', 3'-3 et 3'-5') reliés par une chaîne but-2-ène à partir d'analogues de la thymidine comportant un groupement allyle. La synthèse du trinucleoside relié par la même chaîne insaturée entre les positions 3 et 3' sera également décrite (schéma 1.28). L'étape clé de toutes ces synthèses utilise la réaction de métathèse des oléfines.

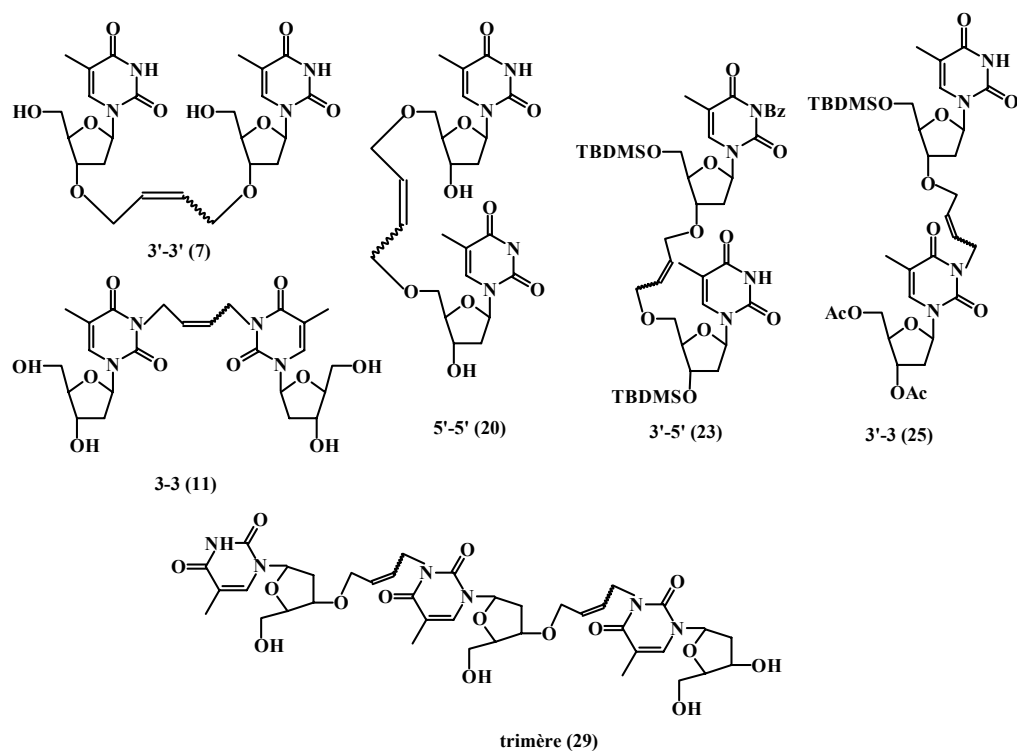


Schéma 1.28 : Di- et trinucleosides reliés par une chaîne hydrocarbonée insaturée.

Outre l'intérêt que présente l'élaboration de telles molécules *via* la réaction de métathèse, nous pensons que ces structures pourraient constituer de bonnes candidates comme synthons initiaux dans le cadre d'une stratégie antisens ou triple hélice.

CHAPITRE II

UTILISATION DE LA RÉACTION DE MÉTATHÈSE DES OLÉFINES POUR LA SYNTHÈSE D'ANALOGUES D'OLIGONUCLÉOTIDES

UTILISATION DE LA RÉACTION DE MÉTATHÈSE DES OLÉFINES POUR LA SYNTHÈSE D'ANALOGUES D'OLIGONUCLÉOTIDES

I. LA METATHÈSE – ETAT DE LA QUESTION

I.1. Généralités

Rappelons que la réaction de métathèse des alcènes consiste en un réarrangement de fragments alkylidènes de ces substrats selon le schéma 2.1.



Schéma 2.1 : Représentation simplifiée de la métathèse des alcènes

Cette réaction permet d'accéder à une grande variété de molécules insaturées.

Depuis les années 80, la mise au point de nouveaux catalyseurs plus tolérants vis-à-vis de groupements fonctionnels a relancé l'intérêt porté à cette réaction. On dénombre sous le terme métathèse cinq types de réactions (schéma 2.2).

- **La métathèse par fermeture de cycle « RCM » (*Ring Closing Metathesis*)** permet d'obtenir des cycles de tailles variées.
- **La métathèse des diènes acycliques « ADMet » (*Acyclic Diene Metathesis*)** conduit à des polymères insaturés.
- **La métathèse par ouverture de cycle « ROM » (*Ring Opening Metathesis*)** permet l'ouverture de cycles insaturés.
- **La métathèse de polymérisation par ouverture de cycle « ROMP » (*Ring Opening Metathesis Polymerisation*)** permet de former des polymères insaturés à partir de monomères cycliques insaturés.

- La métathèse croisée « CM » (*Cross Metathesis*) conduit à l'échange des groupements alkylidènes portés par les alcènes identiques ou distincts, donnant naissance à deux nouvelles molécules.

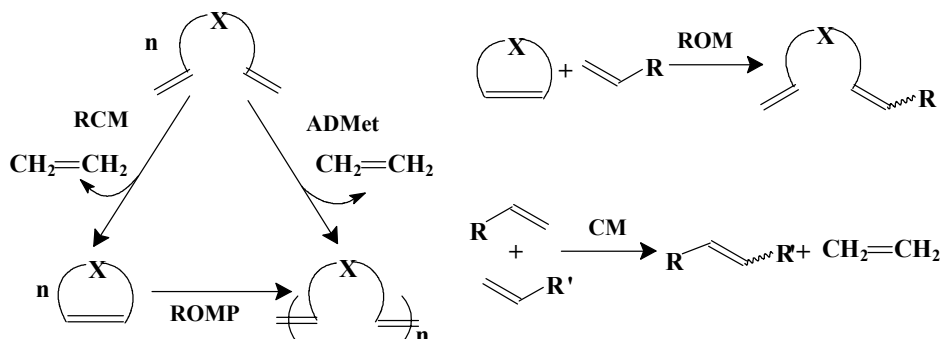


Schéma 2.2 : Les différentes possibilités de métathèse

En 1955, Anderson et Merckling³⁵ ont découvert cette transformation en observant la polymérisation du norbornène en présence de dérivé du titane II. Jusqu'au milieu des années 80, cette réaction n'a pas connu beaucoup d'applications en synthèse organique du fait de l'utilisation de catalyseurs mal définis, homogènes ou hétérogènes et ne tolérant pratiquement aucune fonction hétéroatomique (WCl_6/Bu_4Sn , $WOCl_4/EtAlCl_2$, MoO_3/SiO_2 , $W(CO)_6/h\nu$ ou Re_2O_7/Al_2O_3).^{36,37}

I.2. Le nouvel essor de la réaction de métathèse

A la fin des années 80, en prenant comme base de départ les travaux de Chauvin³⁸, la recherche de nouveaux catalyseurs de métathèse a constitué un développement important dans le domaine de la chimie fine. Les catalyseurs ainsi obtenus ont des structures bien définies dérivant notamment du tungstène, du titane ou encore du tantale, et permettent de transformer des oléfines fonctionnalisées.

Les premiers catalyseurs utilisés sont les alkylidènes de molybdène³⁹ et de tungstène de formule générale $(NAr)(OR')_2MCHR^{40}$, et en particulier le catalyseur au molybdène ($M =$

³⁵ A. W. Anderson ; N. G. Merckling, Brevet n°US 2721189. CAN 50:14596, 1955.

³⁶ P. Krausz ; F. Garnier ; J.E. Dubois, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 437-438.

³⁷ T. M. Trnka ; R. H. Grubbs, *Acc. Chem. Res.*, 2001, **34**, 18-29.

³⁸ a) Y. Chauvin, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1973, **276**, 169.

b) Y. Chauvin, D. Commereuc, D. Cruypelinc, *Makromol. Chem.*, 1976, **177**, 2637.

³⁹ R. R. Schrock ; J. S. Murdzek ; G. C. Bazn ; J. Robbins ; M. DiMare ; M. O'Regan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 3875.

Mo, Ar = 2,6-*i*Pr₂-C₆H₃, R = CMe₂Ph et R' = C(CH₃)(CF₃)₂.⁴¹ Ce dernier est très actif comme la plupart des catalyseurs, dérivant de métaux de transition situés dans la partie gauche de la classification périodique. Cependant, il présente une grande oxophilie, le rendant extrêmement sensible à l'humidité et au dioxygène de l'air. Les conditions de réaction doivent être rigoureuses, sous une atmosphère parfaitement inerte.

L'amélioration de la performance des catalyseurs passe par le développement de structures qui réagissent préférentiellement avec les oléfines plutôt qu'avec les fonctions hétéroatomiques ou le solvant. Les deux métaux les plus utilisés pour l'élaboration des catalyseurs sont le molybdène et surtout le ruthénium, car ces deux métaux sont les moins sensibles aux fonctions hétéroatomiques. Toutefois certains dérivés du tungstène possèdent une activité intéressante puisqu'ils tolèrent notamment des fonctions soufrées difficilement compatibles avec les catalyseurs au ruthénium et au molybdène.

I.3. Les catalyseurs de métathèse les plus récents

Les progrès les plus significatifs ont été réalisés par la synthèse des catalyseurs au ruthénium développés par Grubbs et coll.⁴² et ceux au molybdène étudiés par Schrock et coll.⁴³. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux catalyseurs au ruthénium car ils montrent une bonne tolérance aux fonctions oxygénées (aldéhyde, cétone, alcool ou ester).

I.3.1. Les catalyseurs de Grubbs de première génération

Le premier catalyseur au ruthénium synthétisé est le triphénylphosphine-3,3-diphénylprop-2-ényl-1-ylidènedichlororuthénium **A** obtenu par ouverture du cycle d'un 3,3-diphénylcyclopropène par un précurseur phosphine ruthénium. Son dérivé **B** est obtenu par le remplacement des groupes triphénylphosphines par des tricyclohexylphosphines⁴⁴ (schéma 2.3).

⁴⁰ R. R. Schrock ; R. T. DePue ; J. Feldman ; C. J. Schaverien ; J. C. Dewan ; A. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 1423.

⁴¹ O. Fujimura ; G. C. Fu ; R. H. Grubbs, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 4029.

⁴² S. T. Nguyen ; L. K. Johnson ; R. H. Grubbs ; J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 3974.

⁴³ a) G. C. Bazn ; J. H. Oskam ; H. N. Cho ; L. Y. Park ; R. R. Schrock, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 6899.

b) R. R. Schrock, *Top. Organomet. Chem.*, 1998, **1**, 1.

⁴⁴ S. T. Nguyen ; R. H. Grubbs ; J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 9858.

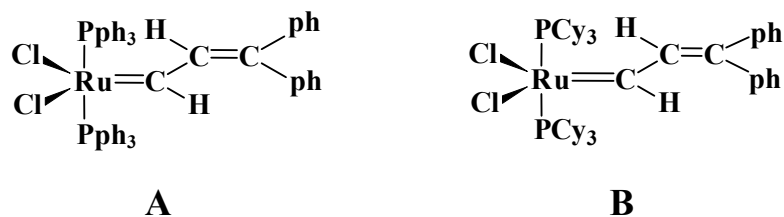


Schéma 2.3 : Catalyseurs au ruthénium

Ces deux catalyseurs présentent une activité très importante aussi bien en ROMP qu'en RCM, mais ils restent relativement peu performants au niveau de l'initiation de la réaction. Pour améliorer ce paramètre, Grubbs et coll.⁴⁵ ont remplacé le groupement diphenylvinyle carbène par un groupement benzylidène. Ils ont ainsi obtenu entre autres le bis-tricyclohexylphosphinedichloro-ruthénium benzylidène **C** (schéma 2.4) qui s'est révélé être un catalyseur de choix, très stable, très réactif et très tolérant aux fonctions hétéroatomiques. Ce catalyseur (appelé couramment Grubbs I) a ouvert la voie à un très vaste éventail de réactions de métathèse⁴⁶, y compris sur les oléfines fonctionnalisées.

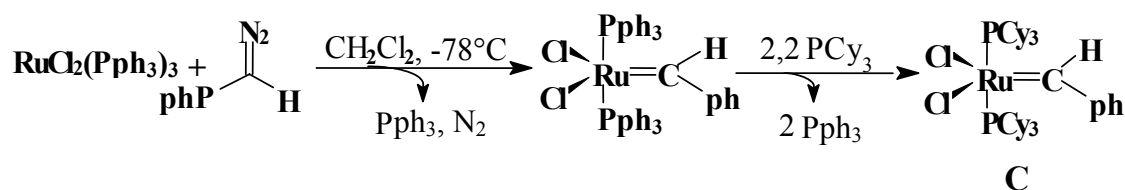


Schéma 2.4 : Synthèse du catalyseur de Grubbs I (C)

Il serait fastidieux d'énumérer toutes les synthèses réalisées avec ce catalyseur en raison du nombre très important de travaux publiés au cours de ces dernières années⁴⁷. La nature des substituants fixés sur les carbones sp² des alcènes initiaux n'est pas le seul facteur déterminant pour le bon déroulement d'une réaction de métathèse. La position relative de la double liaison et d'une fonction oxygénée (un carbonyle par exemple) peut être importante. En effet, le centre métallique de l'intermédiaire pour lequel le métal est fixé sur la double liaison, peut se chélater avec cet hétéroatome. Une telle interaction acide de Lewis/base de Lewis peut augmenter la possibilité de cyclisation interne d'un diène. Cependant si le chélate formé se présente sous la forme d'un cycle à 5 ou 6 chaînons, il peut s'avérer très stable et séquestrer le

⁴⁵ P. Schwab ; R. H. Grubbs ; J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 100.

⁴⁶ A. Fürstner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39**, 3012-3043.

⁴⁷ K. C. Nicolaou, P. G. Bulger, D. Sarlah, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 4490-4527.

catalyseur dans cette forme improductive, entraînant la fin de la conversion vers le produit final⁴⁸ (schéma 2.5).

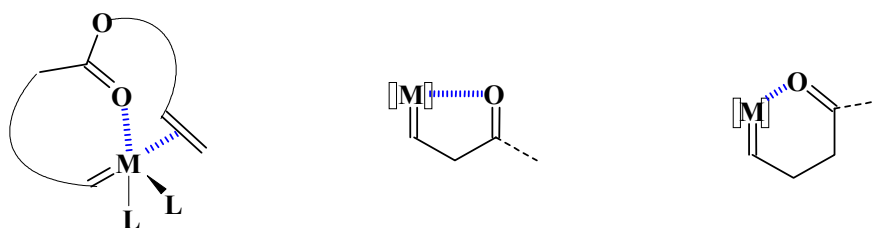


Schéma 2.5: Formation de chélates pouvant favoriser ou inhiber la métathèse

L'encombrement stérique du ligand peut aussi jouer un rôle favorable ou défavorable sur la réaction. Il sera favorable par exemple, lorsqu'il « masquera » une fonction amide ou amine. Par contre il sera défavorable lorsque les oléfines sont di-, tri- ou tétrasubstituées.⁴⁹

I.3.2. Les catalyseurs de deuxième génération

Dans le but d'améliorer les performances des catalyseurs de métathèse, de nombreux autres complexes du ruthénium ont été proposés depuis la dernière période. Parmi les catalyseurs nouvellement développés, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à ceux dérivant du catalyseur de Grubbs, dont un des groupes tricyclohexylphosphine est remplacé par un ligand hétérocyclique azoté insaturé **D**⁵⁰ ou saturé **E**⁵¹ (schéma 2.6). En effet, ils se sont révélés extrêmement réactifs même vis-à-vis de substrats qui ne réagissaient pas avec les catalyseurs habituels au ruthénium. Ces nouveaux catalyseurs **D** et **E** permettent d'effectuer des réactions de métathèse sur des oléfines électro-déficientes, notamment en position α d'une fonction carbonyle ou carboxyle.

⁴⁸ A. Fürstner ; G. Seidel ; N. Kindler, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 8215.

⁴⁹ T. R. Hoye ; H. Zhao, *Org. Lett.*, 1999, **1**, 1123.

⁵⁰ A. Fürstner ; O. R. Thiel ; L. Ackermann ; H. J. Schanz ; S. P. Nolan, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 2204.

⁵¹ M. Scholl ; S. Ding ; C. W. Lee ; R. H. Grubbs, *Org. Lett.*, 1999, **1**, 953.

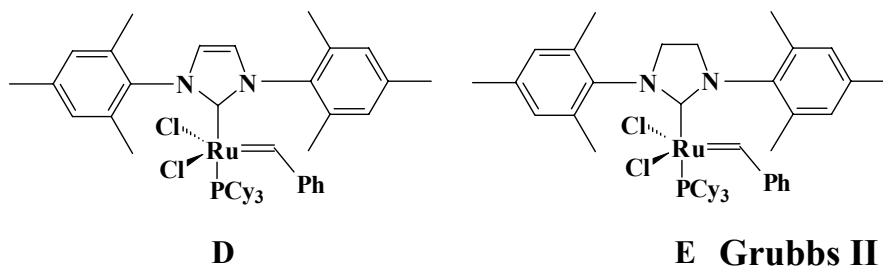


Schéma 2.6 : Catalyseurs de deuxième génération à base de ruthénium

I.4. Mécanisme de la métathèse

En 1971 Hérisson et Chauvin⁵² ont proposé, pour les systèmes existants à l'époque, un mécanisme pour cette réaction basé sur le postulat qu'un intermédiaire métallocyclobutane se forme par alternance de cycloaddition [2+2] et de cycloréversion à partir d'un métallocarbène (schéma 2.7).

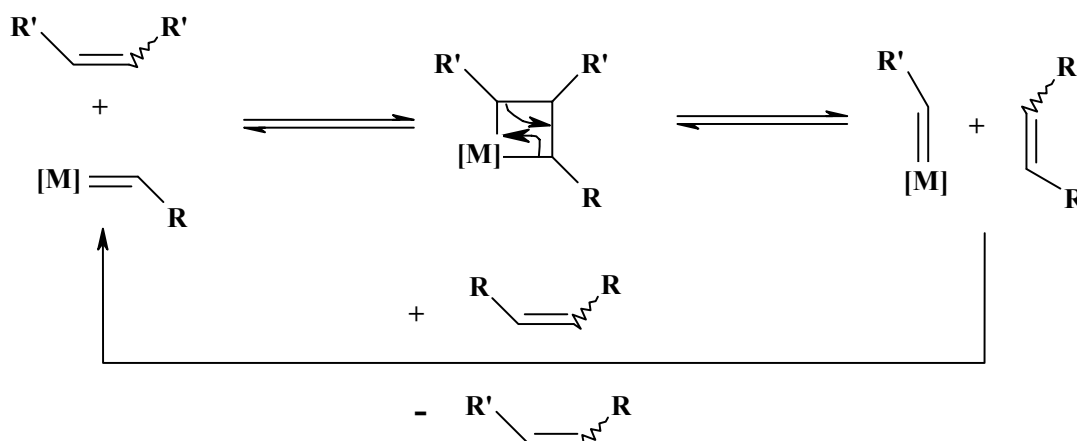


Schéma 2.7 : Mécanisme de la réaction de métathèse des alcènes proposé par Hérisson et Chauvin

La réaction de métathèse des oléfines est un processus réversible. Le gain d'entropie doit fournir un entraînement suffisant pour la réaction même si la variation d'enthalpie est faible.⁵³ C'est en se basant sur l'idée d'un mécanisme métallocarbénique que Grubbs et coll.⁵⁴ ont élaboré les catalyseurs **A** et **B** dans le but d'avoir des entités stables. Ces auteurs ont

⁵² a) J. L. Hérisson ; Y. Chauvin, *Makromol. Chem.*, 1971, **141**, 161-176.

b) Y. Chauvin, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1973, **276**, 169.

⁵³ A. Fürstner ; K. Langemann, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 3942-3943.

⁵⁴ E. L. Dias ; S. B. T. Nguyen ; R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 3887-3897.

réalisé une étude très complète pour mettre en évidence les différentes étapes de ce processus complexe ainsi que l'influence du ligand sur l'activité catalytique du catalyseur **A** (schéma 2.8).

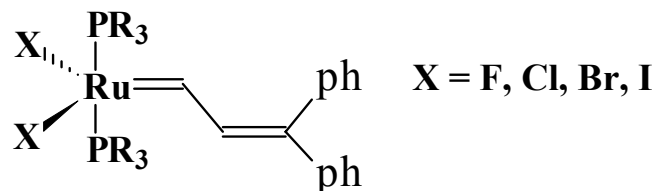


Schéma 2.8 : Dérivés du catalyseur **A**

Il a été montré dans un premier temps que les phosphines les plus encombrées et les plus électrodonneuses conduisaient aux catalyseurs les plus actifs. Ainsi, le classement de la réactivité en fonction du substituant de la phosphine fixée sur le métal varie dans le sens $\text{Pph}_3 \ll \text{PiPr}_2\text{ph} < \text{PCy}_2\text{ph} < \text{PiPr}_3 < \text{PCy}_3$. De plus, le remplacement du ligand chlore sur ces différentes structures, par d'autres halogènes, a montré que le ligand Cl était celui qui conduisait généralement aux meilleurs rendements. Par ailleurs, le métallocarbène $\text{Ru}=\text{CH}-\text{CH}=\text{Cph}_2$ sert d'initiateur et l'espèce réactive qui permet la propagation de la réaction est le carbène $\text{Ru}=\text{CH}_2$. Deux voies sont apparues possibles (schéma 2.9). Une voie principale dite dissociative, met en jeu la dissociation d'une des phosphines du centre métallique alors qu'une voie secondaire, appelée associative, laissant les groupements phosphines accrochés au métal, ne semble probable que dans le cas d'un milieu présentant une concentration importante en phosphine. La voie dissociative paraît un peu surprenante, puisqu'elle suggère un intermédiaire métallocyclobutane à 14 électrons, au lieu de 18 électrons, électroniquement déficitaire pour un métal de transition comme le ruthénium.

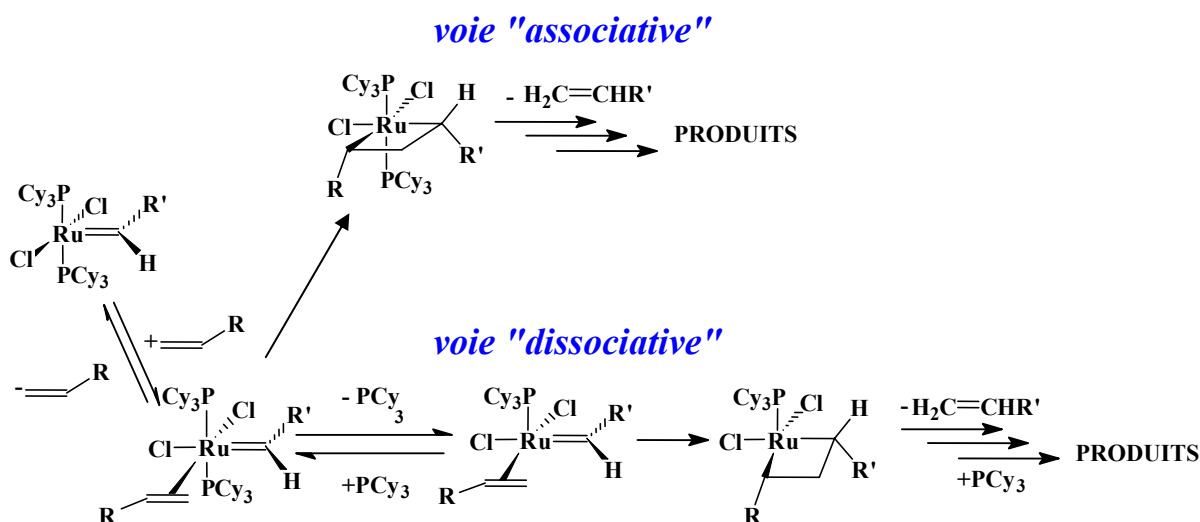


Schéma 2.9 : Mécanisme de la métathèse : dissociation ou non d'un groupe phosphine

La voie dissociative principale permet de mieux interpréter l'influence des différents ligands sur les réactivités. Les phosphines les plus encombrées favorisent la dissociation de l'une d'entre elles lorsque l'encombrement autour de l'atome de ruthénium augmente. L'influence plus grande en position *trans* des phosphines plus électro-donneuses favorise également la dissociation d'un groupe phosphine en stabilisant le complexe à 16 électrons monophosphine-oléfine et encore plus le métallocyclobutane électro-déficient à 14 électrons. D'autre part, les halogènes ont une double influence. Puisque les oléfines se lient en position *trans* de l'un des halogènes, les halogènes les plus électro-attracteurs minimiseront leur influence sur le complexe en se positionnant en *trans*. Par contre, comme les oléfines se lient en *cis* du deuxième halogène, les plus volumineux devraient déstabiliser le complexe par encombrement stérique. Le meilleur compromis est l'utilisation du chlore.

En 1998, Grubbs et coll. ont reporté une étude mécanistique de la métathèse des alcènes terminaux.⁵⁵ Ils ont étudié les intermédiaires réactionnels afin d'expliquer la différence de réactivité observée entre les alcènes encombrés et entre les isomères *Z* et *E* des alcènes internes. En effet, une oléfine encombrée ou une oléfine interne de configuration *E* réagiront moins vite. La première constatation effectuée est que le catalyseur **A** (schéma 2.3) n'est actif que pour les réactions de ROMP de grandes chaînes. Le remplacement des groupes triphénylphosphines par des groupes tricyclohexylphosphines ou tri-*iso*-propylphosphines plus encombrants, a permis d'étendre l'activité de ce catalyseur à des cycles plus courts et aux oléfines acycliques. Le catalyseur au ruthénium de première génération qui présente l'initiation la plus rapide pour les réactions de ROMP, RCM et ADMet, est le catalyseur **C**

⁵⁵ M. Ulman ; R. H. Grubbs, *Organometallics*, 1998, **17**, 2484.

(schéma 2.4). Le mécanisme proposé par Grubbs et coll. pour la métathèse d'alcènes terminaux est représenté sur le schéma 2.10.

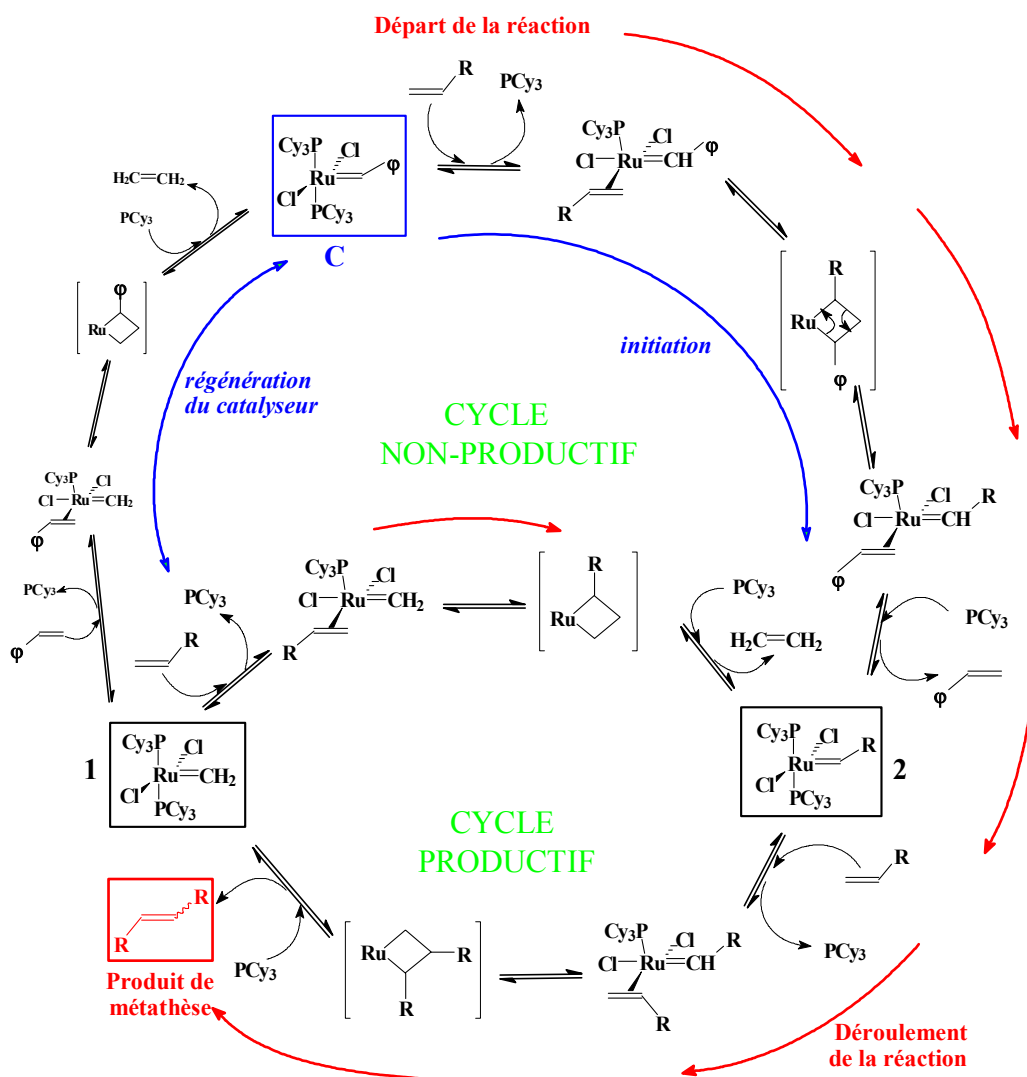


Schéma 2.10 : Mécanisme de la réaction de métathèse des oléfines terminales

- On peut distinguer deux cycles dans ce mécanisme, un cycle, dit non productif, au cours duquel la métathèse est initiée et/ou le catalyseur régénéré, le deuxième, dit productif, permet d'obtenir le produit souhaité et passe par l'intermédiaire d'un ruthénium méthylidène **1**. Le complexe **1** est en fait l'espèce réactive dans le cas d'alcènes terminaux ; c'est de sa stabilité et de sa réactivité dont dépendra la réaction de métathèse. De la capacité de **C**, ou plus généralement du catalyseur, à fixer l'oléfine de départ, dépendra l'étape d'initiation. Pour appuyer ce mécanisme, les remarques suivantes ont été proposées : lorsque l'encombrement stérique de l'oléfine augmente, le taux de conversion baisse : les oléfines terminales disubstituées ne réagissent pas.

- Le positionnement de l'oléfine et surtout de son substituant R par rapport à l'atome de ruthénium est important : il peut y avoir gêne stérique si R est placé d'un côté ou de l'autre du ruthénium.
- Dans le cas des oléfines internes, celles de configuration *Z* ne peuvent venir se lier au ruthénium que dans un seul sens afin de minimiser les interactions stériques au maximum. Par contre, lorsqu'une oléfine de configuration *E* se fixe sur le centre métallique, deux manières sont envisageables mais toutes deux présentent des interactions stériques avec les substituants du ruthénium (schéma 2.11).

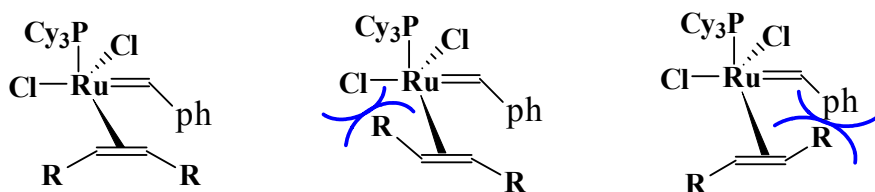


Schéma 2.11 : Positionnement relatif des oléfines *Z* et *E* par rapport au ruthénium

Ce constat permet d'expliquer pourquoi l'étape d'initiation de la métathèse d'oléfines internes de configuration *E* est plus lente que pour les mêmes oléfines de configuration *Z*.

Une étude mécanistique plus poussée à l'aide du catalyseur **E**, réalisée par Grubbs et coll.⁵⁶ a permis de mettre en évidence, le fait que l'étape de dissociation de la phosphine est l'étape déterminante de la réaction de métathèse. Ainsi, il a été suggéré que la grande activité du catalyseur **E** et de ses analogues puissent être dues à l'augmentation de la capacité de ces ligands à promouvoir cette étape critique. Deux possibilités sont envisagées : soit l'oléfine est fixée avant la perte du groupe PCy₃, soit la phosphine se dissocie pour générer un intermédiaire à 14 électrons avant l'arrivée de l'oléfine.

Une étude cinétique a montré que l'étape d'initiation de la réaction de métathèse est indépendante de la concentration en oléfine, ce qui permet de postuler que l'étape déterminante est la dissociation de la phosphine. L'intermédiaire à 14 électrons ainsi obtenu, de formule générale LCl₂Ru=CHph (L étant le ligand dérivant de l'imidazole) peut soit être piégé par la phosphine avec la constante de vitesse k_1 (régénération de l'alkylidène de départ), soit se lier au substrat oléfinique pour permettre la réaction de métathèse avec la constante de vitesse k_2 (schéma 2.12).

⁵⁶ M. S. Sanford ; M. Ulman ; R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 749-750.

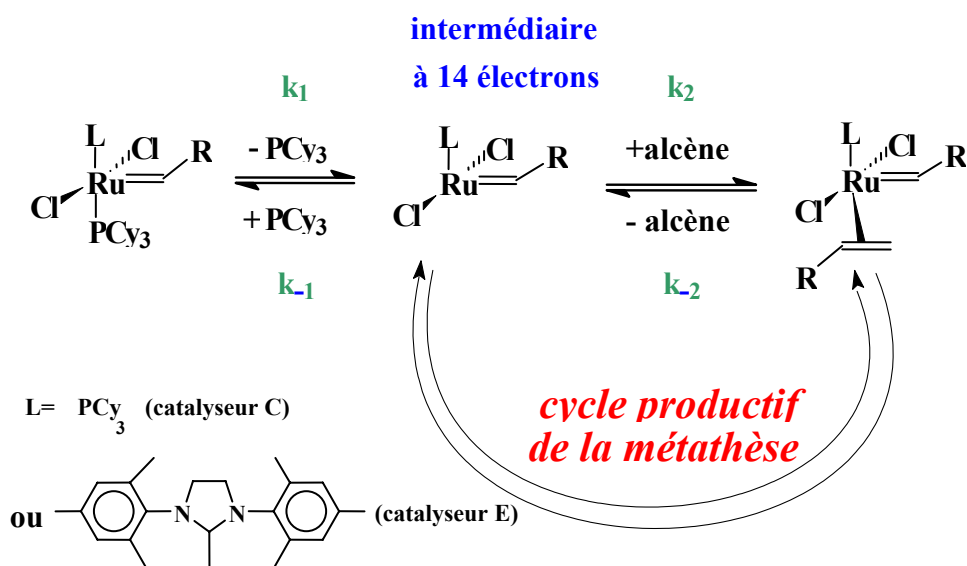


Schéma 2.12 : Possibilités d'évolution de l'intermédiaire à 14 électrons généré par la perte d'une phosphine

Les rapports k_1/k_2 dans le cas des catalyseurs **C** (schéma 2.4) et **E** (schéma 2.6) ont pour valeurs respectives 15300 et 1,25, ce qui signifie qu'une petite quantité de l'intermédiaire à 14 électrons est capable d'induire de nombreux cycles productifs de métathèse dans le cas du catalyseur **E**. En comparaison, les constantes k_{-1} et k_2 sont du même ordre pour le catalyseur **C** : l'étape d'initiation sera relativement rapide mais la fixation de l'oléfine sera en compétition avec celle d'une phosphine. Ainsi l'intermédiaire à 14 électrons formé à partir du catalyseur **C** induit relativement peu de cycles, avant d'être piégé par une phosphine libre.

I.5. Exemples d'application de la métathèse en chimie fine

Les applications de la métathèse en chimie fine sont extrêmement nombreuses.⁵⁷ Compte tenu de la finalité de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'utilisation de ce système catalytique en chimie des glucides et des produits naturels.

Le volume des travaux publiés sur les RCM, les ROM et leurs combinaisons, a largement surpassé ceux concernant la CM. Actuellement, la chimie des dérivés glucidiques utilise la métathèse croisée pour la formation de liaison carbone-carbone intermoléculaire. La fonction alcène est le plus souvent portée par un groupement fixé en position anomérique du glucide. Ce sucre peut être sous la forme de pyranose ou furanose. L'application de la CM en synthèse organique pose le problème, de sélectivité et de configuration *Z* ou *E* des produits

⁵⁷ A. J. Vernall ; A. D. Abell, *Aldrimica Acta*, 2003, **36**, 3, 93-101

obtenus. En effet lorsqu'on réalise cette réaction avec deux oléfines terminales différentes, la CM conduit à trois produits, le produit de réaction des deux oléfines différentes attendues mais aussi les produits d'homodimérisation des deux substrats oléfiniques (schéma 2.13).

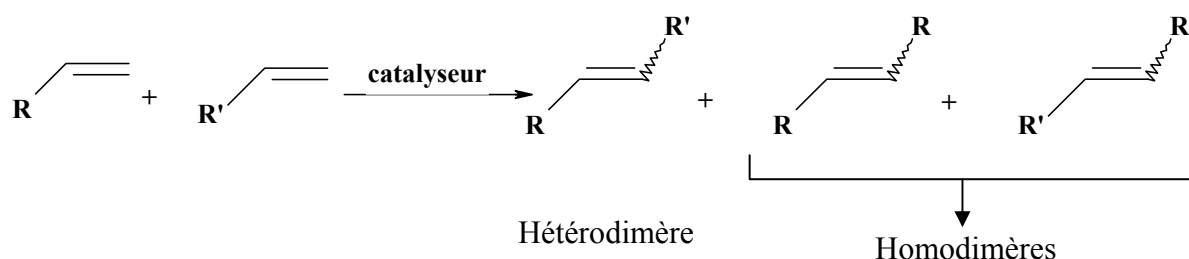


Schéma 2.13 : Produits obtenus par CM de deux oléfines différentes

Cette stratégie de synthèse est utilisée pour la réalisation de molécules plus ou moins complexes à base de glucides ou de polyglucides. Nous avons répertorié quelques exemples de synthèses dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Exemples de métathèse croisée en synthèse de dérivés glucidiques

Réactions	Rendement	Références
	45%	[58]
	62-77%	[59]
	19%	[60]

⁵⁸ M. A. Leeuwenburgh; G. A. Van der Marel; H. S. Overkleeft, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7, 757.

⁵⁹ O Plettenburg ; C Mui ; V Bodmer-Narkevitch ; CH Wong, *Adv. Synth. Catal.*, 2002, 344, 622.

⁶⁰ M. Lera; C. J. Hayes, *Org. Lett.*, 2001, 3, 2765.

Cependant, la réaction de deux oléfines identiques diminue le nombre des produits formés : il n'y a plus que les produits *Z* et *E*, la réaction sera alors appelée *self-métathèse (SM)* ou *homodimérisation*.

La modification des produits naturels par cette voie semble intéressante, cependant elle a été peu appliquée dans le domaine des analogues de nucléosides. La littérature montre que les fonctions azotées ont des influences variables sur les réactions de métathèse. En effet Roy et coll.⁶¹ ont mis en évidence dans leurs travaux le fait que les rendements de la SM d'un glucide O-Ac et de son homologue NH-Ac diminuent de 92% à 66% (schéma 2.14).

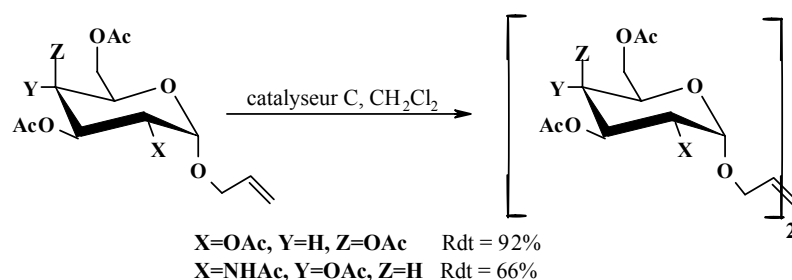


Schéma 2.14 : Variation du rendement de la SM avec et sans fonction amine sur le sucre

Kirschning et coll.⁶² ont également montré l'influence de la présence d'une fonction alcool portée par le sucre. En effet, la réalisation de la réaction de *self-métathèse* sur un sucre portant un groupe hydroxyle et celle réalisée sur le même sucre après protection de ce groupe par acétylation, conduit à une importante variation du rendement, celui-ci passe de 47% à 74% (schéma 2.15).

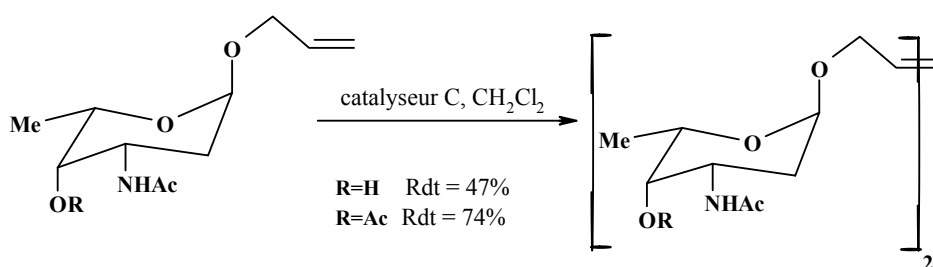


Schéma 2.15 : Influence d'une fonction hydroxyle sur le rendement

Il apparaît ainsi, suivant les auteurs et surtout suivant les substrats de départ utilisés, une grande disparité des produits obtenus dans les réactions de métathèse des composés

⁶¹ R. Roy ; S. K. Das, *J.C.S. Chem. Commun.*, 2000, 519.

⁶² A. Kirschning; G.W. Chen, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 4665-4668.

comportant des fonctions azotées.⁶³ Ce qu'il faut retenir d'une manière générale, c'est qu'il faut impérativement protéger les groupes amines et amides primaires de préférence par des groupes Boc ou Fmoc.⁶⁴ Une hypothèse tenterait d'expliquer ces résultats inégaux, par une coordination de l'amide et du catalyseur, qui contribuerait à inhiber cette réaction catalytique.

La métathèse de type RCM est employée pour la synthèse d'analogues de dinucléotides⁶⁵ et de nucléosides. Ewing et coll.⁶⁶ ont synthétisé le D4T en utilisant la métathèse par fermeture de cycle (schéma 2.16).

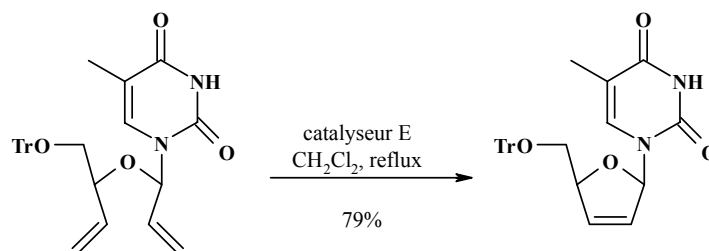


Schéma 2.16 : Synthèse du D4T par RCM

On peut observer que le groupement hydroxyle primaire en position 5' est protégé avant la réaction de métathèse. Pour les raisons énoncées précédemment et malgré les progrès réalisés sur les catalyseurs, les réactions de métathèse sur les nucléosides, sont réalisées sur des substrats protégés.⁶⁷

I.6. Métathèse et micro-onde

Comme nous l'avons déjà indiqué, depuis le début des années 80 l'intérêt porté à la réaction de métathèse a été relancé en raison de la facilité de sa mise en oeuvre pour la formation de liaisons carbone-carbone. En général, les réactions de métathèse sont réalisées à température ambiante ou légèrement élevée (par exemple, à 40°C à reflux dans le dichloroéthane) et conduisent après plusieurs heures à une conversion totale. Par activation micro-onde, la RCM apparaît nettement plus facile puisque la réaction est totale en quelques minutes, voire même quelques secondes.

⁶³ A. J. Phillips ; A. D. Abell, *Aldrichimica Acta*, 1999, **32**, 3, 75.

⁶⁴a) F.P.J.T. Rutjes; H. E. Schoemaker, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 4, 677.

b) C. M. Huwe; O.C. Kiehl; S. Blechert, *Synlett*, 1996, **65**.

c) H. E. Blackwell; D. J. O'Leary; A. K. Chatterjee; R. A. Washenfelder; D. A. Bussman; R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 58.

⁶⁵ C. Kirchoff; P. Nielsen, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 6475.

⁶⁶ D. F. Ewing; V. Glaçon; G. Mackenzie; D. Postel; C. Len, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **59**, 7, 941.

⁶⁷ P. Busca ; M. Etheve-Quellejeu ; J. M. Valéry, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 9131.

La découverte du phénomène d'échauffement par le rayonnement micro-onde date des années 50. Cette technologie, cas relativement rare, s'est d'abord développée dans le secteur grand public avant ceux de l'industrie et de la recherche. Aujourd'hui, ce type d'activation est assez bien connu et largement utilisé en synthèse organique. En fait, l'échauffement d'un produit grâce aux rayonnements micro-ondes résulte d'interactions onde-matière et est provoqué par la transformation en chaleur d'une partie de l'énergie contenue dans l'onde électromagnétique ($\nu=2,45$ GHz ; $\lambda=12,2$ cm).

Les molécules polaires ont la propriété de s'orienter dans le sens du champ électrique (phénomène de polarisation dipolaire) et, comme il est alternatif, l'orientation des dipôles change avec chaque alternance, ce qui contribue à agiter et donc à échauffer les particules sur une profondeur de l'ordre de la longueur d'onde (10 cm). Contrairement à la méthode traditionnelle où l'échauffement est difficile et non homogène, les micro-ondes permettent de chauffer à cœur instantanément (dans toute la masse avec des vitesses de montée en température qui peuvent atteindre 10°C par seconde), et de façon homogène et sélective.

En 2003, par exemple, Efskind et Undheim^{68a,b} ont montré que la « RCM Domino » (schéma 2.17) sur la diényne A, en présence de catalyseur de Grubbs II, avait conduit, après plusieurs ajouts de catalyseur (3 x 10% mol) et 9 heures de réaction par chauffage classique (85°C, toluène), au produit B avec un rendement de 92%. Ils ont également montré que par activation micro-ondes la conversion était totale après 10 minutes de réaction à 160°C en présence de 5% molaire de catalyseur dans le toluène. Les auteurs ont attribué ce résultat remarquable au chauffage rapide et uniforme du milieu réactionnel et à l'élimination des effets de paroi.

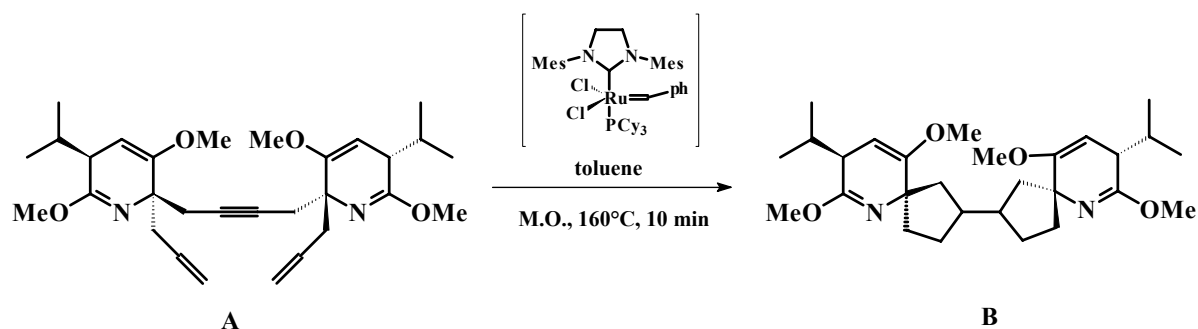


Schéma 2.17 : Réaction de métathèse par fermeture de cycle sur des diénynes

⁶⁸ a/ C. Oliver Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 6250-6284

b/ J. Efskind, K. Undheim, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 2837-2839

c/ A. Fürstner, F. Stelzer, A. Rumbo, H. Krause, *Chem. Eur. J.*, 2002, **8**, 1856-1871

Une réaction intéressante de métathèse par fermeture de cycle d'un alcyne (schéma 2.18) a été décrite par Fürstner et coll.^{68c}. Le traitement du diyne **C** par 10% molaire d'un catalyseur préparé in situ à partir de $[\text{Mo}(\text{CO})_6]$ et de 4-trifluorométhylphénol, par irradiation micro-onde (150°C, 5 min), conduit au cycloalcyne avec un rendement de 69%. Par chauffage classique, à reflux dans le dichlorobenzène, le produit **D** est obtenu dans les mêmes conditions avec un rendement de 83% en 4 heures de réaction.

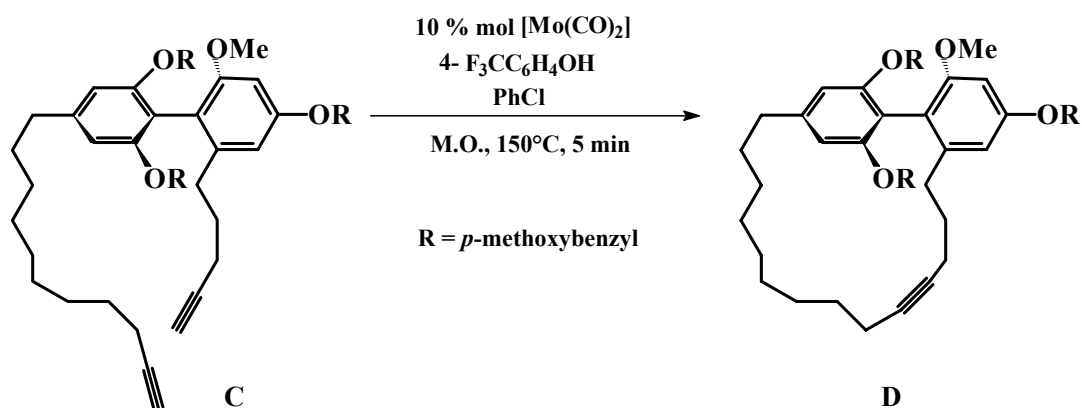


Schéma 2.18 : Réaction de métathèse par fermeture de cycle sur des alcynes

II. SYNTHÈSE DE DINUCLÉOSIDES RELIÉS PAR UNE CHAÎNE BUT-2-ÈNE ENTRE LES POSITIONS 3'

Comme nous l'avons indiqué à la fin du chapitre précédent la première finalité de ce travail est la synthèse de dinucléosides et nous commençons par décrire la synthèse du dimère 3'-3' 7.

II.1. Schéma général

La stratégie adoptée pour la synthèse du dinucléoside relié par les positions 3' est représentée sur le schéma 2.19. La première étape consiste à protéger sélectivement la position 5' de la thymidine. Le composé **1** ainsi obtenu est allylé en position 3' pour donner le composé **2**. A partir de ce substrat, deux voies ont été étudiées. Soit le composé **2** est déprotégé en position 5' suivie de la réaction de métathèse sur le substrat **3** (Voie A), soit la réaction de métathèse est réalisée à partir du composé **2** suivie de la déprotection du composé **5**.

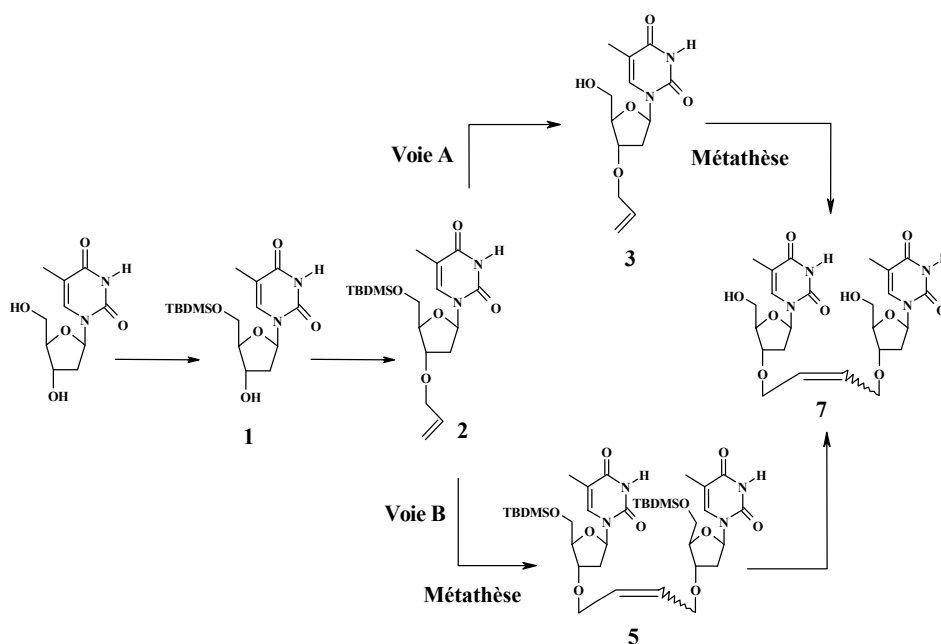


Schéma 2.19 : Stratégie de synthèse du dinucléoside relié par les positions 3'

II.2. Les différentes étapes

II.2.1. Synthèse de la 3'-*O*-allylthymidine

La synthèse de la 3'-*O*-allylthymidine **3** nécessite trois étapes (schéma 2.20). Tout d'abord la protection sélective de l'alcool primaire, puis l'alkylation de la position 3' et enfin la déprotection de la position 5' de la partie glucidique.

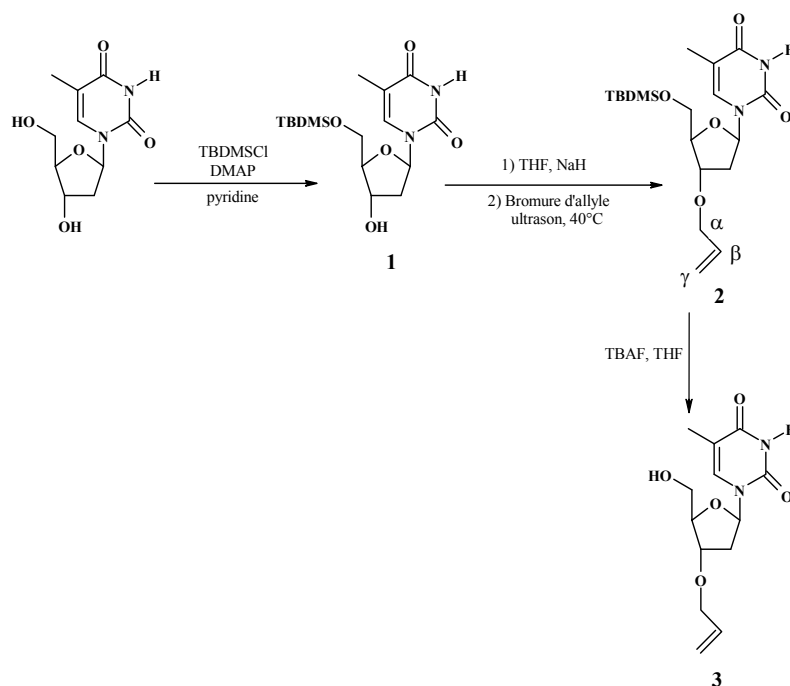


Schéma 2.20 : Schéma synthétique de la 3'-*O*-allylthymidine

La protection de la position 5' est effectuée classiquement par l'introduction d'un groupement encombrant (trityle⁶⁹ ou silyle⁷⁰) sur le carbone primaire de la partie glucidique. Dans notre cas, nous avons choisi le groupement tertibutyldiméthylsilyle (TBDMS) en raison de sa bonne résistance au milieu acide. La réaction est réalisée en 12 heures, à température ambiante, en présence de 1,5 équivalent de TBDMSCl et d'une quantité catalytique de DMAP, dans la pyridine. Le composé silylé **1** est obtenu, après purification, avec un rendement quasi quantitatif (97 %).

L'analyse RMN du proton montre la présence du groupement TBDMS par l'apparition de 3 singulets, un correspondant au tertibutyle à 0,92 ppm et deux correspondant aux deux groupements méthyles à 0,12 et 0,11 ppm.

La réaction d'allylation sélective en position 3' est réalisée selon la méthode de Chattopadhyaya et coll.⁷¹ Celle-ci est effectuée en deux étapes. On procède tout d'abord à la dissolution préalable du composé **1** dans le THF puis on additionne l'hydrure de sodium en excès (2,5 équivalents). Après 45 minutes d'activation par ultrasons le bromure d'allyle (2,5 équivalents) est ajouté et mène au bout de 30 minutes de sonication au composé attendu **2**, avec un rendement quantitatif.

Le spectre RMN du proton montre la fixation du groupement allyle, il présente un double double triplet correspondant au proton H-β du groupement allyle avec des constantes de couplages de 17,2, 10,6 et 5,5 Hz, deux double quadruplets pour les protons γ de la double liaison, avec des constantes de couplages de 1,6 et 17,2 Hz pour l'un et de 1,6 et 10,6 Hz pour l'autre et deux doubles doubles triplets à 4,04 et 3,95 ppm pour les protons H-α. Le spectre infrarouge montre bien la disparition du groupement hydroxyle.

La déprotection de l'hydroxyle primaire est alors réalisée en 1 heure 30 par le système classique Bu₄NF/THF pour mener au composé **3** avec un rendement de 88 %.

La structure du composé est confirmée par la disparition sur le spectre RMN des signaux correspondant aux protons du groupement TBDMS et l'apparition de la bande caractéristique de la fonction alcool (3415 cm⁻¹) en spectroscopie infrarouge.

⁶⁹ M. Smith; D. H. Rammner; I. H. Goldberg; H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 17, 430.

⁷⁰ a) E. J. Corey; A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 17, 6190.

b) S. Hanessian; P. Lavalley, *Can. J. Chem.*, 1975, **53**, 2975.

⁷¹ a) J. C. Wu; Z. Xi; C. J. Gioeli; Chattopadhyaya, *Tetrahedron*, 1991, **47**, 2237

b) M. Montembault; N. Bourgougnon; J. Lebreton, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 8091.

II.2.2. Réaction de métathèse à partir de la 3'-*o*-allylthymidine (Voie A)

Comme indiqué précédemment (schéma 2.19), nous avons envisagé deux voies pour obtenir le composé 7. Par la voie A, la réaction de métathèse est réalisée à partir du composé 3 et induite par les catalyseurs de Grubbs I (schéma 2.4) ou Grubbs II (schéma 2.6).

Bien que ces composés soient relativement peu sensibles à l'air, pour assurer la reproductibilité, nous les avons prélevés dans tous les cas sous atmosphère d'argon.

En raison de sa bonne tolérance aux fonctions hétéroatomiques (partie I), le catalyseur de Grubbs II a été utilisé dans un premier temps. La réaction est menée pendant 24 heures, à 40°C avec 10% molaire de catalyseur et suivie par CCM. Celle-ci ne montrant plus d'évolution du milieu réactionnel et le produit de départ n'étant pas totalement consommé, nous avons ajouté de nouveau 10% molaire de catalyseur et laissé sous agitation pendant 24 heures supplémentaires. Nous avons observé la formation de deux composés (schéma 2.21).

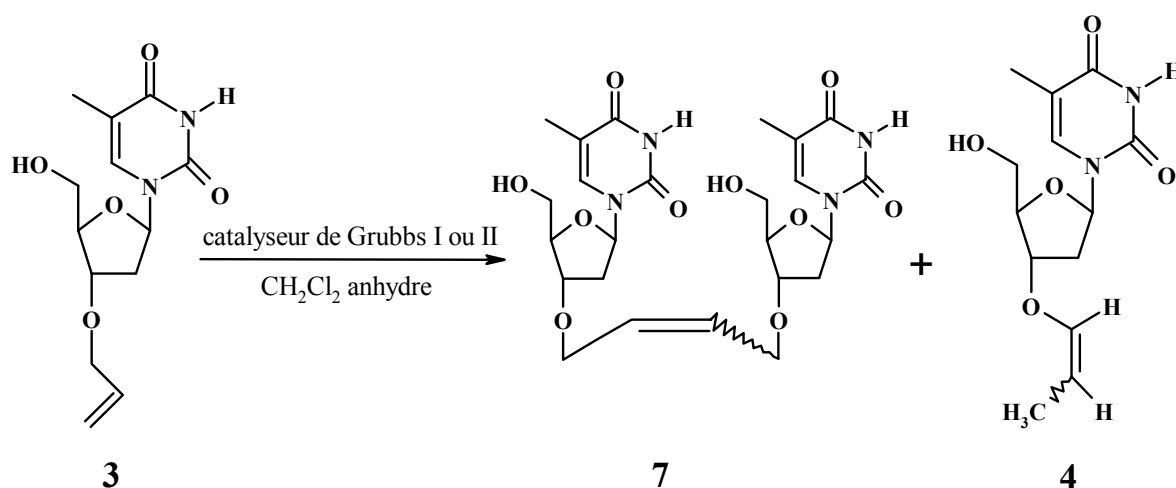


Schéma 2.21 : Essai de métathèse sur le produit non protégé en position 5'

Le produit attendu 7 se forme avec un faible rendement de 9 %. Le composé majoritaire 4 (45 %) résulte de la transposition de la double liaison du produit de départ, comme cela a déjà été observé sur des systèmes analogues⁷².

Nous avons alors utilisé le catalyseur de Grubbs I. Dans les mêmes conditions que précédemment on obtient un mélange des composés 4 et 7 dans les mêmes proportions.

⁷² a) G.W. Chen; A. Kirschning, *Chem. Eur. J.*, 2002, **8**, 12, 2717

b) C. Cadot; P.I. Dalko; J. Cossy, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 1839.

La réaction de métathèse étant donc moins efficace en présence d'un groupe hydroxyle libre⁶², nous nous sommes alors tournés vers l'utilisation des précurseurs protégés (schéma 2.19, Voie B).

II.2.3. Synthèse du dimère 3'-3' à partir du précurseur protégé (Voie B)

II.2.3.1. Réaction de métathèse sur le précurseur protégé

Nous avons réalisé la réaction de métathèse croisée à partir de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine **2** synthétisée précédemment (schéma 2.20), en présence encore une fois des catalyseurs de Grubbs I ou II (schéma 2.22).

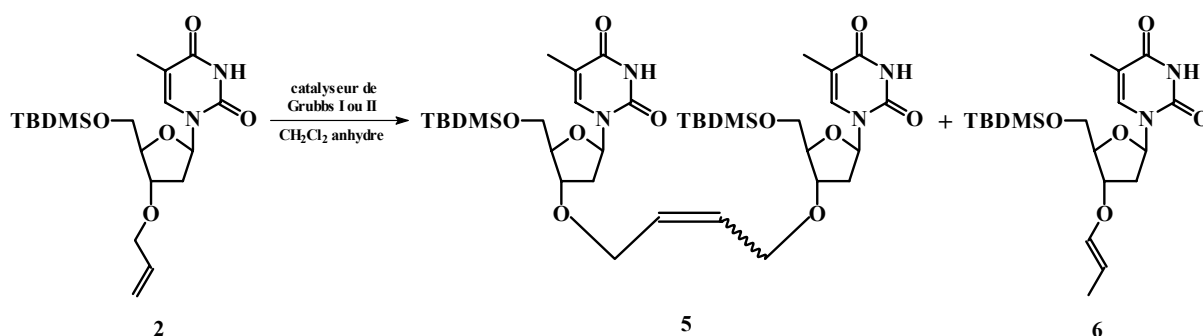


Schéma 2.22 : Self-métathèse à partir du précurseur protégé

Les premiers essais ont été réalisés par chauffage classique. Le catalyseur de Grubbs II, utilisé à 20 % molaire, conduit majoritairement au produit **6** résultant, cette fois encore, de la transposition de la double liaison (rendement 50 %) (tableau 2.2). Le produit attendu **5** est obtenu avec un rendement faible mais significatif de 35 %. L'utilisation du catalyseur de Grubbs I mène dans les mêmes conditions, cette fois-ci, principalement au produit **5** avec un rendement de 51 % (tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Rendements de la réaction de métathèse du composé **5**

Catalyseur de Métathèse	5 (%)	6 (%)
Grubbs II	35	50
Grubbs I	51	7

Sur le spectre RMN du mélange *E/Z*, une corrélation proton-carbone permet d'observer le dédoublement de signaux, correspondant aux carbones en α de la liaison

éthylénique. La littérature nous indique que les carbones en α de la double liaison permettent l'identification de la configuration de celle-ci, pour une configuration *Z*, les signaux de ces carbones auront un blindage supérieur à celui de la configuration *E*. L'interprétation (schéma 2.23) est liée aux répulsions stériques entre les atomes d'hydrogène sur le carbone en position α' d'une double liaison de configuration *Z*. Ces interactions conduisent à l'augmentation de la densité électronique sur les carbones α' et donc, au blindage de son signal de plusieurs ppm (39,61 ppm pour les carbones α' d'une double liaison de configuration *Z* et 43,18 ppm pour ceux de l'isomère *E*).

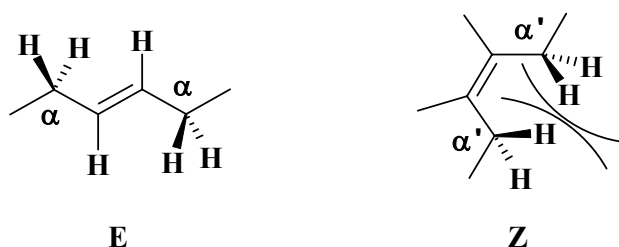


Schéma 2.23 : Encombrement stérique des hydrogènes en α' d'une double liaison *Z*

L'analyse par RMN du proton, du carbone, COSY et HMQC (tableau 2.3) ont donc permis de déterminer à partir des protons β et α le rapport $E/Z = 4,55$, confirmant ainsi le contrôle thermodynamique de ce processus complexe.

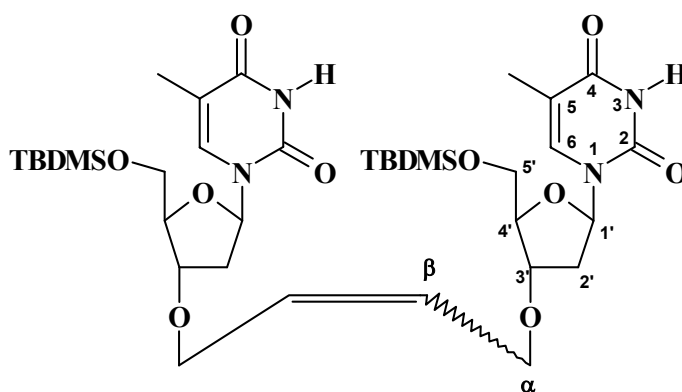


Tableau 2.3 : RMN ¹H et ¹³C du composé **5** dans CDCl₃

Attribution	¹ H δ ppm (J Hz)		¹³ C δ ppm	
	Isomère E	Isomère Z	Isomère E	Isomère Z
Base				
N-H	8,45 s	8,38 s		
C-2		-	150,13	
C-4		-	163,53	
C-5		-	110,83	
CH-6		7,49 q (1,0)	135,33	
CH ₃	1,89 d (1,0)	1,92 d (1,0)	12,53	
Sucre				
CH-1'	6,27 dd (5,5 ; 8,5)	6,26 dd (5,5 ; 8,5)	85,06	
CH-2'	2,43 ddd (1,4 ; 5,5 ; 14,4)			
CH-2''	1,96 ddd (5,5 ; 8,5 ; 14,4)		37,75	37,91
CH-3'	4,10 m		79,49	
CH-4'	4,10 m		85,13	
CH-5'a	3,89 dd (2,4 ; 11,3)			
CH-5'b	3,78 dd (2,4 ; 11,3)		63,68	
Chaîne allyle				
CH ₂ -α	4,04 ; 3,95 m		69,05	67,07
CH=CH	5,71 t (3,8)	5,71 t (2,7)	128,94	128,86
Groupe TBDMS				
Tertio-butyle	0,92 s	0,92 s	25,93	
Si-CH ₃		0,12 s	-5,32	
Si-CH ₃		0,11 s	-5,44	

Compte tenu de ces résultats, il apparaît que le catalyseur de Grubbs I donne les meilleurs résultats et sera donc le seul utilisé pour toutes les autres réactions de métathèse. De plus, la formation du sous-produit de transposition rendant la purification fastidieuse, nous avons étudié l'influence du mode d'activation sur la sélectivité et la cinétique de la réaction.

II.2.3.2. Synthèse par activation micro-onde

Nous avons réalisé la métathèse croisée en utilisant l'activation micro-onde. La réaction est suivie par CCM. On observe qu'au bout de 4 heures il n'y a plus d'évolution. Le produit **5** est isolé avec un rendement de 40 % (tableau 2.4).

Tableau 2.4 : Rendement de la réaction de métathèse en fonction du mode d'activation

Activation	Temps de réaction (h)	5 (%)
Chauffage classique	24	51
Micro-ondes	4	40

Pour un rendement certes légèrement inférieur, le temps de réaction en micro-ondes a été divisé par 6.

L'analyse par RMN¹H du composé **5** ainsi synthétisé est identique à celle donnée dans le tableau 2.3.

II.2.3.3. Déprotection des hydroxyles primaires

L'élimination du groupe protecteur silylé est effectuée avec le système classique, utilisant les ions fluorures (Bu₄NF/THF) (schéma 2.24). En fin de réaction nous avons tenté de séparer les isomères *E* et *Z*. Malgré les nombreux essais effectués, nous ne sommes jamais arrivés à avoir le composé *Z* pur. Par contre le composé *E* (composé **7**) a pu être isolé avec un rendement acceptable de 55 %.

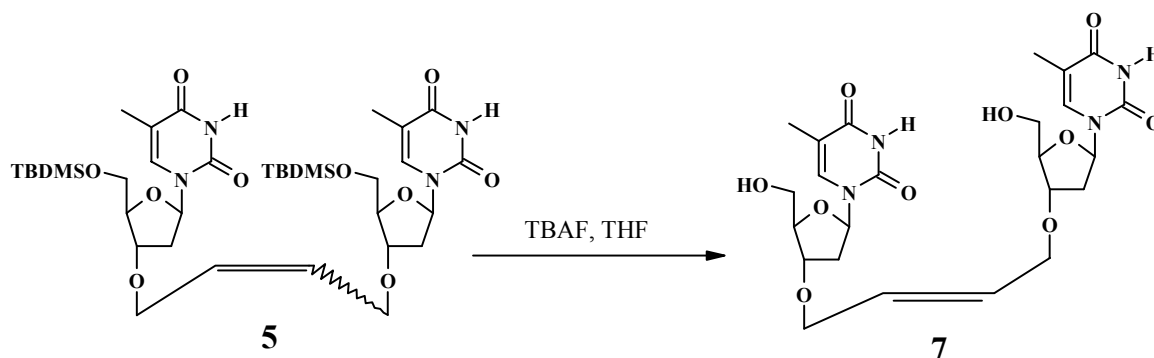


Schéma 2.24 : Déprotection des groupements TBDMS

Le spectre RMN du proton montre la disparition du groupement TBDMS et appuie la structure du composé **7**. L'analyse par spectroscopie infrarouge, confirme la déprotection des groupements hydroxyles par l'apparition d'une bande caractéristique à 3382 cm⁻¹.

III. SYNTHÈSE DE NUCLÉOSIDES RELIÉS PAR UNE CHAÎNE BUT-2-ÈNE ENTRE LES POSITIONS 3

Dans une seconde phase de ce travail, nous avons poursuivi la synthèse par métathèse de dinucléosides en nous intéressant cette fois-ci au dimère relié au niveau des positions N-3 de la base par un bras oléfinique à quatre carbones.

III.1. Schéma général

La stratégie adoptée pour la synthèse du dinucléoside relié par les positions 3 est représentée sur le schéma 2.25.

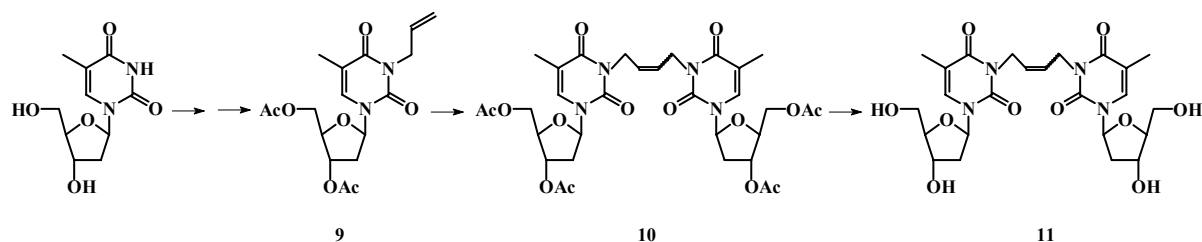


Schéma 2.25 : Schéma général de la synthèse du dinucléoside relié par les positions 3

Les premières étapes consistent à synthétiser un précurseur de la thymidine, allylé en position 3 et protégé sur les positions 5' et 3'. La réaction de métathèse est appliquée à ce composé. Le dinucléoside est ensuite déprotégé pour donner le composé final.

III.2. Les différentes étapes

III.2.1. Synthèse de la 3-N-allylthymidine acétylée

La voie de synthèse utilisée pour parvenir au composé allylé 9 est réalisée en deux étapes (schéma 2.26). Après allylation directe et régiosélective de la position 3 de la thymidine, les hydroxyles des positions 5' et 3' de la partie glucidique sont protégés par acétylation.

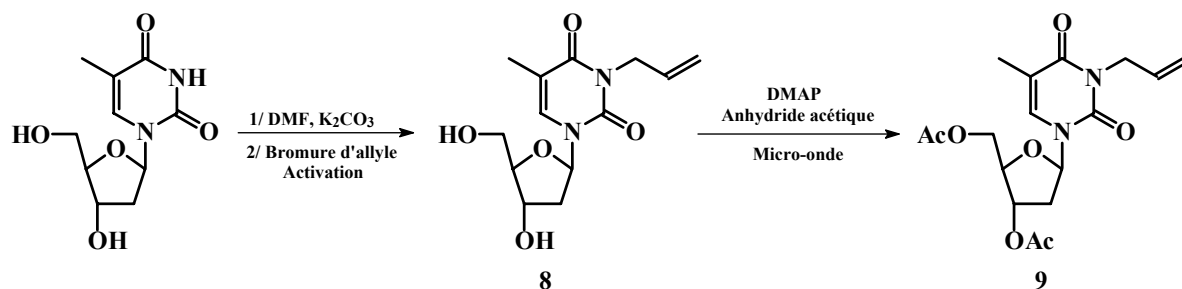


Schéma 2.26 : Stratégie de synthèse de la 3-N-allylthymidine.

Les premiers essais ont été réalisés par chauffage classique (80°C). La thymidine est mise en présence d'un excès de carbonate de potassium dans le DMF. Après 30 minutes d'agitation, le bromure d'allyle est ajouté au milieu réactionnel et laissé sous agitation pendant 1 heure. Le produit attendu **8** est obtenu avec un rendement de 75%. Ces premiers essais nous ont encouragé à étudier l'influence du mode d'activation sur la sélectivité de la réaction.

L'utilisation des micro-ondes a conduit à la formation d'un seul composé **8** après seulement 4 minutes d'activation (P=150W, T=80°C) avec un rendement de 87% qui est supérieur à celui obtenu par chauffage classique.

La RMN du proton présente un double double triplet correspondant au proton H-β du groupement allyle avec des constantes de couplage de 17,2, 10,2 et 5,8 Hz et deux doubles quadruplets pour les protons terminaux de la double liaison, avec des constantes de 17,2 et 1,3 Hz pour l'un et de 10,2 et 1,3 Hz pour l'autre. Les deux H-α sont présents sous la forme d'un multiplet à 4,54 ppm.

La réaction d'acétylation du composé **8** est réalisée par activation micro-onde en présence d'un excès d'anhydride acétique et de DMAP. Le composé **9** est isolé avec un rendement quasi quantitatif.

La RMN du proton montre l'apparition de deux singulets à 2,10 et 2,12 ppm correspondant aux protons des deux groupes acétyles.

III.2.2. Synthèse du dinucléoside relié par une chaîne but-2-ène entre les positions 3

La synthèse du dimère 3-3 (**11**) est réalisée par réaction de métathèse en présence de catalyseur de Grubbs I à partir du précurseur 3-N-allylé protégé **9**, suivie de la désacétylation des positions 5' et 3' de la partie glucidique (schéma 2.27).

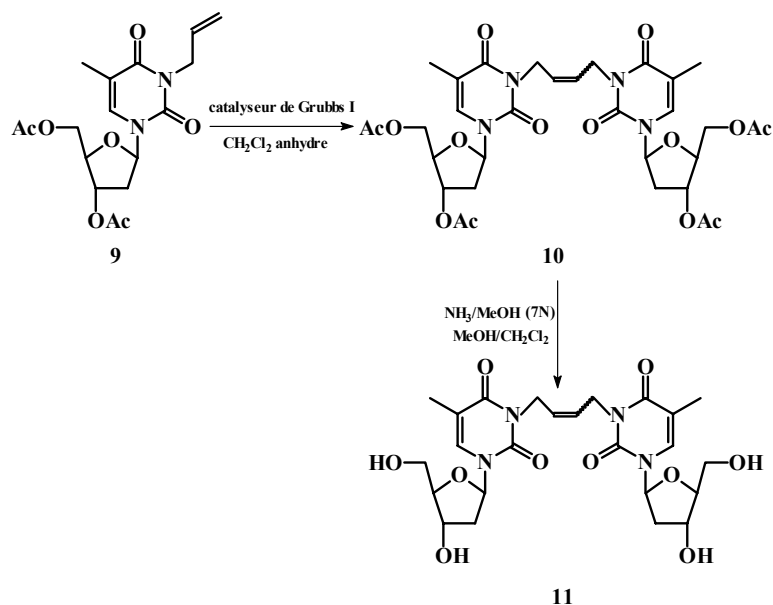


Schéma 2.27 : Réaction de métathèse suivie de la désacétylation

Le dimère 3-3 (**10**) est obtenu en utilisant la même procédure que pour le dimère 3'-3' **5**. Par chauffage classique, le produit **10** est obtenu, au bout de 5 jours, avec un rendement de 57 %. La même réaction induite par irradiation micro-onde conduit au dimère 3-3 en seulement 2 heures d'activation avec un rendement de 62 % après purification (tableau 2.5).

Tableau 2.5 : Influence du mode d'activation sur le rendement de la réaction de métathèse

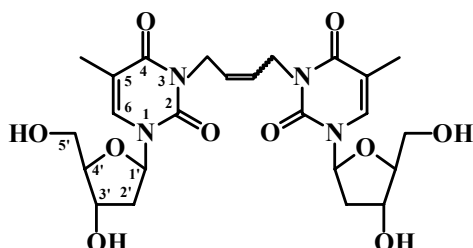
Activation	Temps de réaction	10 (%)
Chauffage classique	5 jours	57
Micro-ondes	2 h	62

Les deux isomères *Z* et *E* sont difficiles à séparer et leur proportion a été déterminée par RMN¹H et ¹³C, avec un rapport *E/Z* de 5. Le dédoublement des signaux en ¹³C associé à la disparition en RMN du proton des alcènes terminaux à 5,26 et 5,19 ppm, confirment ce résultat.

Enfin le composé **10** est désacétylé avec le système classique NH₃/MeOH dans un solvant mixte dichlorométhane/méthanol. Le produit **11** est obtenu en 5 heures avec un rendement de 59 %. La RMN du proton montre la disparition des figures caractéristiques des groupements acétyles mais aussi la présence des deux isomères, dont le rapport *E/Z* = 5 a pu être déterminé cette fois encore par RMN. L'analyse par spectroscopie infrarouge confirme la déprotection des fonctions alcool par l'apparition d'une bande les caractérisant à 3403 cm⁻¹.

Les données RMN¹H et ¹³C des isomères *Z* et *E* du composé **11** sont rassemblées sur le tableau 2.6.

Tableau 2.6 : RMN ¹H et ¹³C du composé **11** dans CD₃OD



Attribution	¹ H δ ppm (J Hz)		¹³ C δ ppm	
	Isomère E	Isomère Z	Isomère E	Isomère Z
Base				
C-2	-	-	152,2	152,6
C-4	-	-	165,2	165,9
C-5	-	-	110,9	
CH-6	7,83 q (1,2)	7,84 q (1,2)	136,6	136,5
CH ₃	1,89 d (1,2)	1,91 d (1,2)	13,7	13,4
Sucre				
CH-1'	6,27 t (6,7)	6,30 t (6,7)	87,4	87,2
CH-2'	2,2 m			
CH-2''			41,4	41,6
CH-3'	4,39 m		72,2	72,8
CH-4'	3,90 m		89,0	89,4
CH-5'a	3,79 dd (3,4 ; 12,0)	3,80 dd (3,4 ; 12,1)	62,8	62,7
CH-5'b	3,72 dd (3,7 ; 12,0)	3,73 dd (3,7 ; 12,0)		
Chaîne allyle				
CH ₂ -α	4,51 m	4,82 m	43,7	38,6
CH=CH	5,81 m	5,66 m	128,7	127,6

IV. SYNTHÈSE DU DIMÈRE 5'-5'

Ces synthèses se sont poursuivies par l'élaboration de dimères oléfiniques de thymidine reliés par un pont au niveau des carbones primaires.

IV.1. Stratégie de synthèse

La stratégie adoptée pour la synthèse du dinucléoside relié par les positions 5' consiste à allyler la thymidine en position 5' par une suite réactionnelle de protection et déprotection (schéma 2.28). La réaction de métathèse est appliquée sur le précurseur protégé. Le dinucléoside est déprotégé pour donner le composé final.

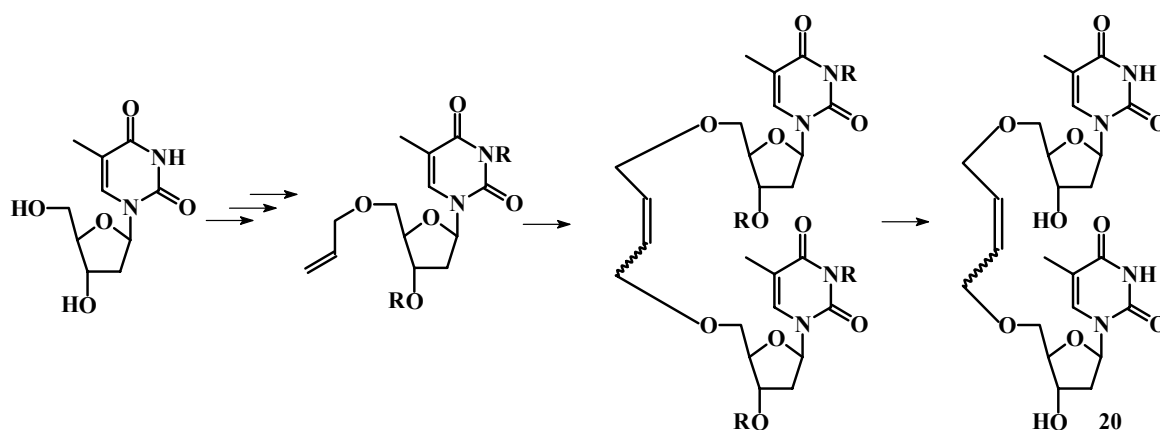


Schéma 2.28 : Stratégie de synthèse

IV.2. Résultats et discussion

IV.2.1. Synthèse de la 5'-*o*-allylthymidine

IV.2.1.1. Première voie de synthèse

La première voie de synthèse est réalisée en 4 étapes (schéma 2.29). La thymidine est tout d'abord silylée sélectivement en position 5', suivie de la benzylation sur les positions 3' et 3''. Après déprotection de la position 5', le substrat **13** est allylé pour donner le composé **14**. La 5'-*o*-allylthymidine **15** est obtenue après déprotection des groupements benzoyles.

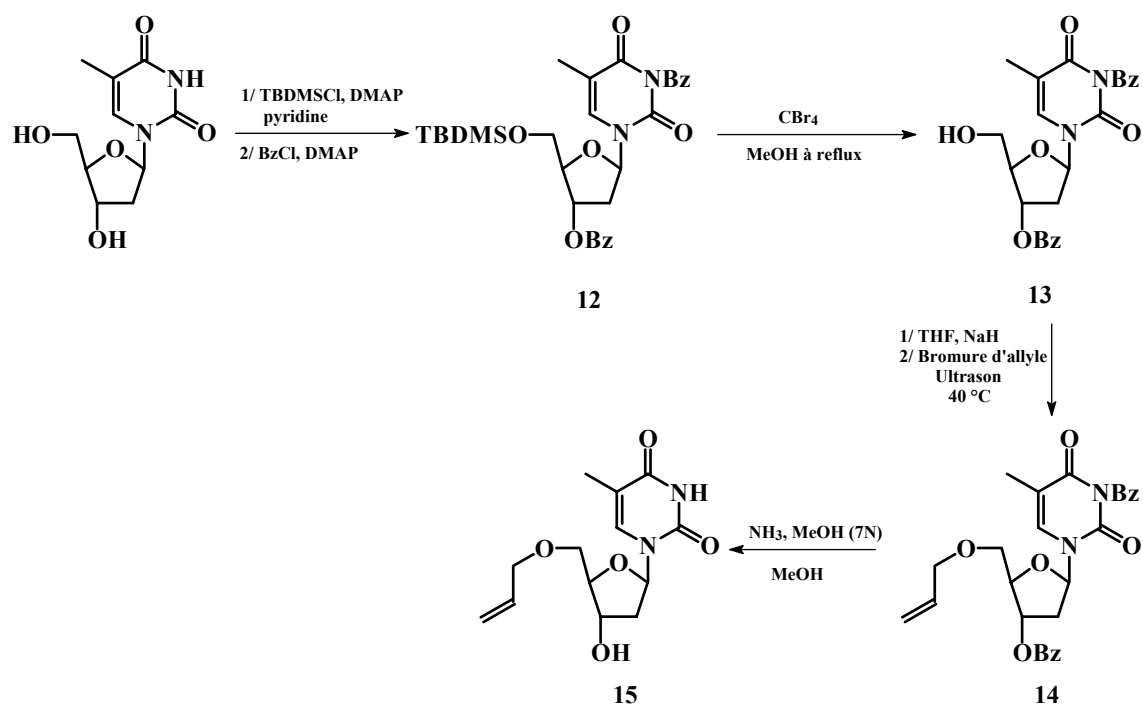


Schéma 2.29 : Schéma synthétique de la 5'-O-allylthymidine en 4 étapes.

Nous avons dans un premier temps réalisé une silylation sélective de la fonction alcool primaire de la thymidine, dans la pyridine à température ambiante. Nous avons utilisé le même mode opératoire que celui décrit précédemment (composé **1**, paragraphe II.2.1). L'ajout en fin de réaction de 6 équivalents de chlorure de benzoyle et d'un équivalent de DMAP conduit au bout de 14 heures et après purification au composé **12** avec un rendement de 83 %. L'analyse par RMN¹H montre la présence des protons aromatiques entre 7,17 et 8,02 ppm, ainsi que ceux correspondant au groupement TBDMS à 0,20 et 0,99 ppm. Nous remarquons en spectroscopie infrarouge la disparition du signal correspondant aux groupements hydroxyles.

La déprotection du groupement hydroxyle en position 5' est effectuée dans le système CBr₄/MeOH. La réaction s'effectue à reflux du solvant pendant 1 heure 30 et le produit **13** est obtenu avec un rendement de 88%. L'analyse IR montre clairement l'apparition de la bande caractéristique du groupement hydroxyle et la RMN¹H, la disparition des protons correspondant au groupement TBDMS.

La fixation du groupement allyle est réalisée en deux temps. Tout d'abord le composé est mis en présence d'hydruure de sodium dans le THF et activé aux ultrasons pendant 15 minutes. On ajoute alors le bromure d'allyle au milieu réactionnel. Après 5 minutes de réaction on procède au traitement du brut réactionnel puis à la purification. Le produit majoritaire est analysé par RMN. Le spectre du proton présente un double double triplet

correspondant au proton H-β du groupement allyle à 5,86 ppm et deux doubles quadruplets pour les H-γ de la liaison insaturée à 5,18 et 5,25 ppm. Les protons H-α résonnent à 4,55 ppm sous la forme d'un multiplet. L'étude de la corrélation proton-carbone (HMBC), qui s'intéresse aux couplages longue distance 3J , montre que le groupement allyle est fixé sur la position 3 de la thymidine. On observe en effet une corrélation entre les protons H-α (4,55 ppm) et les carbones C-2 et C-4 (150,65 ppm et 162,82 ppm respectivement) de la thymidine (schéma 2.30). De plus la position 5' s'est benzoylée comme le montre le spectre ci-dessous, il y a corrélation entre les protons 5' et le carbonyle des benzoyles.

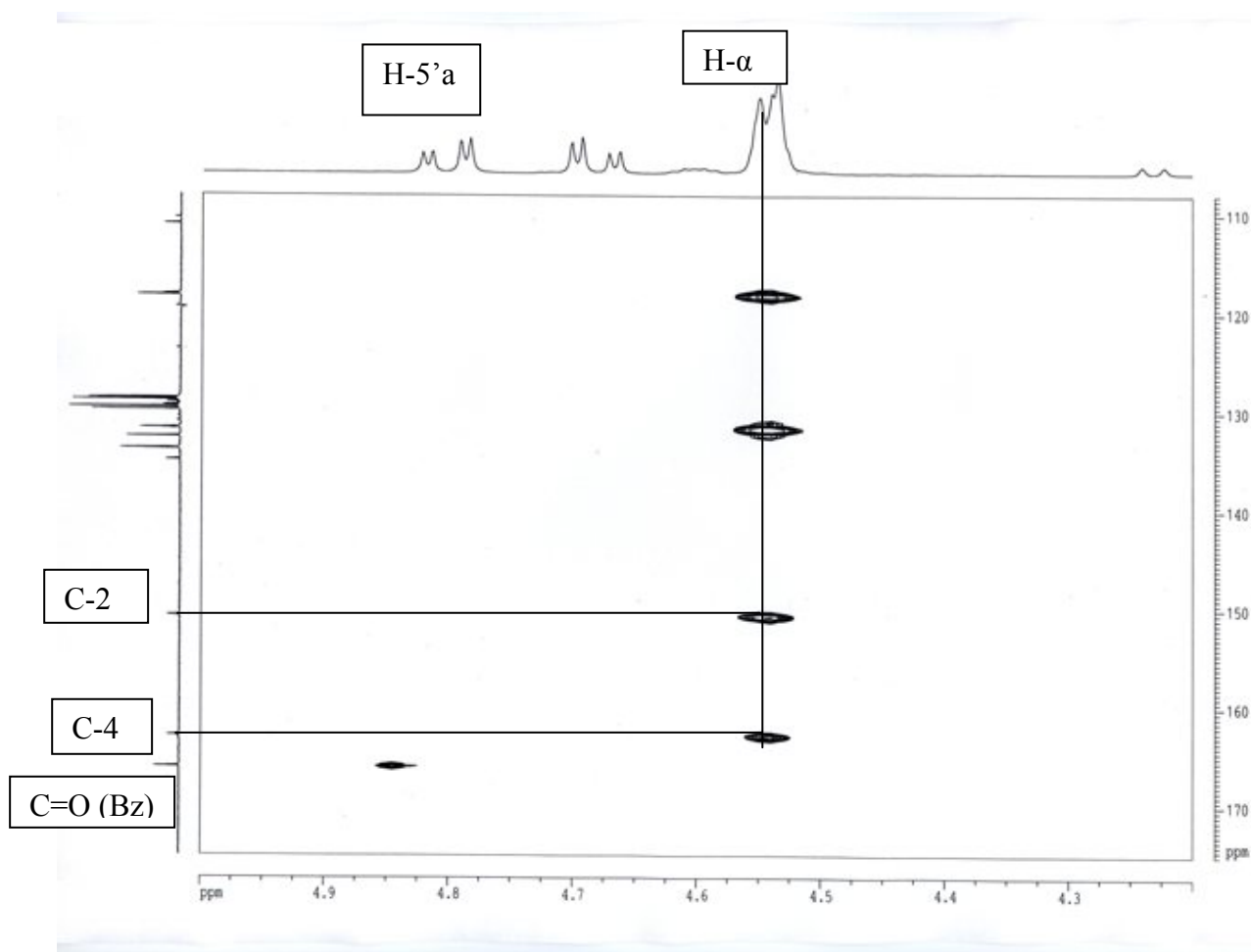
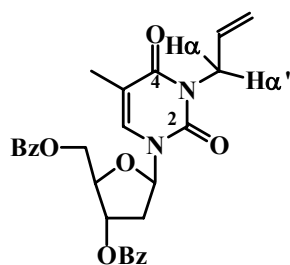


Schéma 2.30.: Spectre de corrélation proton-carbone du produit obtenu

Ce résultat tend à suggérer qu'au cours de la première étape de la réaction d'allylation il y a eu un transfert du groupement benzoyle de la position 3 vers la position 5'. L'allylation se faisant par la suite sur la seule position libre donc en position 3 (schéma 2.31).

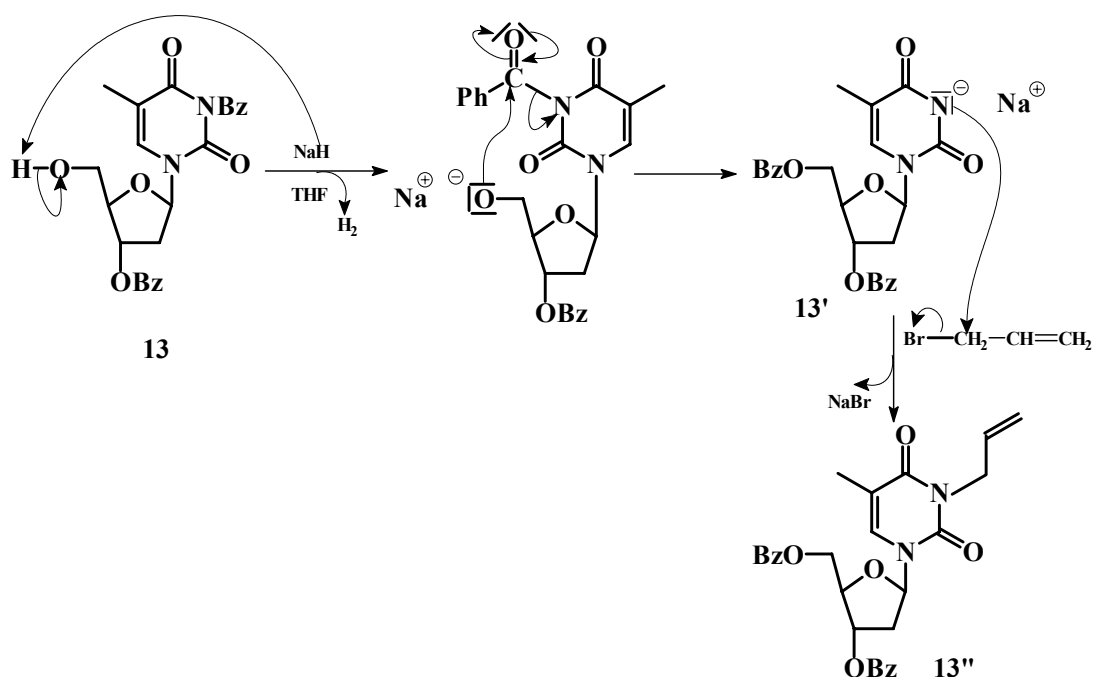


Schéma 2.31 : Proposition de mécanisme pour le transfert du groupement benzoyle

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons introduit le composé **13** dans le THF en présence d'hydrure de sodium et activé 15 minutes aux ultrasons. Après traitement et purification, on isole un nouveau produit. L'analyse par RMN de ce composé est compatible avec la structure de la thymidine dibenzoylée au niveau des groupements hydroxyles de la partie glucidique. On remarque également à 8,50 ppm la présence du proton sur l'azote en position 3 de la thymine (voir partie expérimentale).

Compte tenu de ces résultats décevants, nous avons élaboré une nouvelle voie de synthèse de la 5'-*O*-allylthymidine protégée.

IV.2.1.2. Deuxième voie de synthèse

Cette nouvelle stratégie de synthèse comporte 3 étapes (schéma 2.32). La thymidine est tout d'abord silylée sur les positions 5' et 3'. Après déprotection sélective de la position 5', le substrat **17** est allylé pour mener au composé **18**.

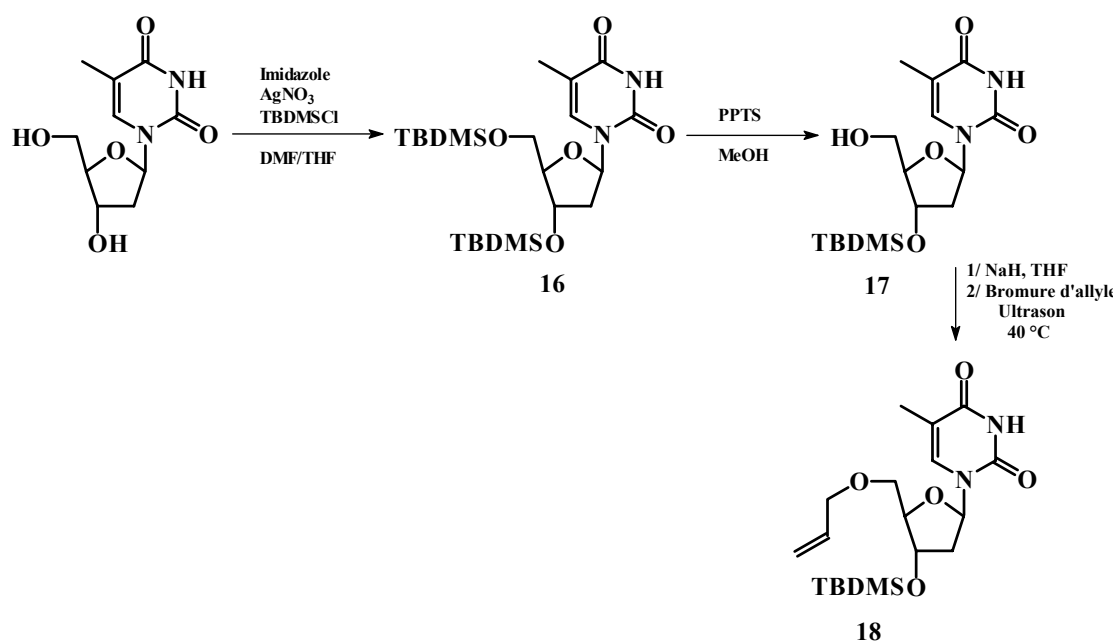


Schéma 2.32 : Nouvelle voie de synthèse pour la 5'-*O*-allylthymidine

Dans un premier temps, les fonctions hydroxyles de la partie glucidique de la thymidine sont silylées par le TBDMSCl, selon la méthode de Montecchi et coll.⁷³, en présence d'imidazole et de nitrate d'argent dans les solvants mixtes DMF/THF, 1/1. Après trois heures de réaction, le composé **16** est isolé avec un rendement de 85 %. L'analyse par RMN du proton montre la présence des protons correspondant au groupement TBDMS en position 3' à 0,89 ppm et 0,08 ppm et ceux correspondant au groupement TBDMS de la position 5' à 0,93 ppm et 0,11 ppm. Cette structure est confirmée par spectroscopie infrarouge par l'observation de la disparition du signal correspondant aux groupements hydroxyles.

La déprotection sélective de l'hydroxyle en position 5' est réalisée, selon la méthode d'Ogilvie⁷⁴, en présence de PPTS (*para*-pyridinium toluene sulfonate) dans le méthanol. Après 20 heures de réaction, le produit **17** est obtenu avec un rendement de 64 % et est utilisé tel quel pour la suite de la préparation du précurseur 5'-*O*-allylé **18**. Son spectre IR montre l'apparition de la bande caractéristique de la fonction alcool et la RMN¹H, la disparition des protons correspondant au groupement TBDMS fixé sur la position 5'.

L'allylation sélective en position 5' est effectuée, comme précédemment (II.2.1), en présence d'un excès (2,5 équivalents) d'hydrure de sodium et de la même quantité de bromure

⁷³ a/ Montecchi, P. C.; Manetto, A.; Navacchia, M. L.; Chatgililoglu, C.; *Tetrahedron*, 2004, **60**, 4303-4308.

b/ Buchko, G. W.; Hruska, F. E.; Sadana, K. L.; *Can. J. Chem.*, 1989, **67**, 109-119.

⁷⁴ a/ Ogilvie, K. K.; *Can. J. Chem.*, 1973, **51**, 3799-3807.

b/ White, J. D.; Kawasaki, M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 4991-4993.

d'allyle dans le THF. Le milieu réactionnel est plongé dans un bain à ultrason et après 15 minutes d'activation le composé **18** est isolé après purification avec un rendement de 78 %.

La RMN du proton présente un double double triplet correspondant au H- β du groupement allyle avec des constantes de couplage de 17,2 ; 10,3 et 5,3 Hz et deux doubles quadruplets pour les protons H- γ avec des constantes de 17,2 et 1,5 Hz pour l'un et 10,3 et 1,5 Hz pour l'autre. Les deux H- α sont présents sous la forme d'un multiplet à 4,06 ppm. De plus, la corrélation proton-carbone (HMBC) confirme la fixation du groupement allyle sur la position 5'. Nous observons une corrélation entre les H- α et le carbone C-5' et une corrélation entre les protons H-5' et le carbone C- α (schéma 2.33).

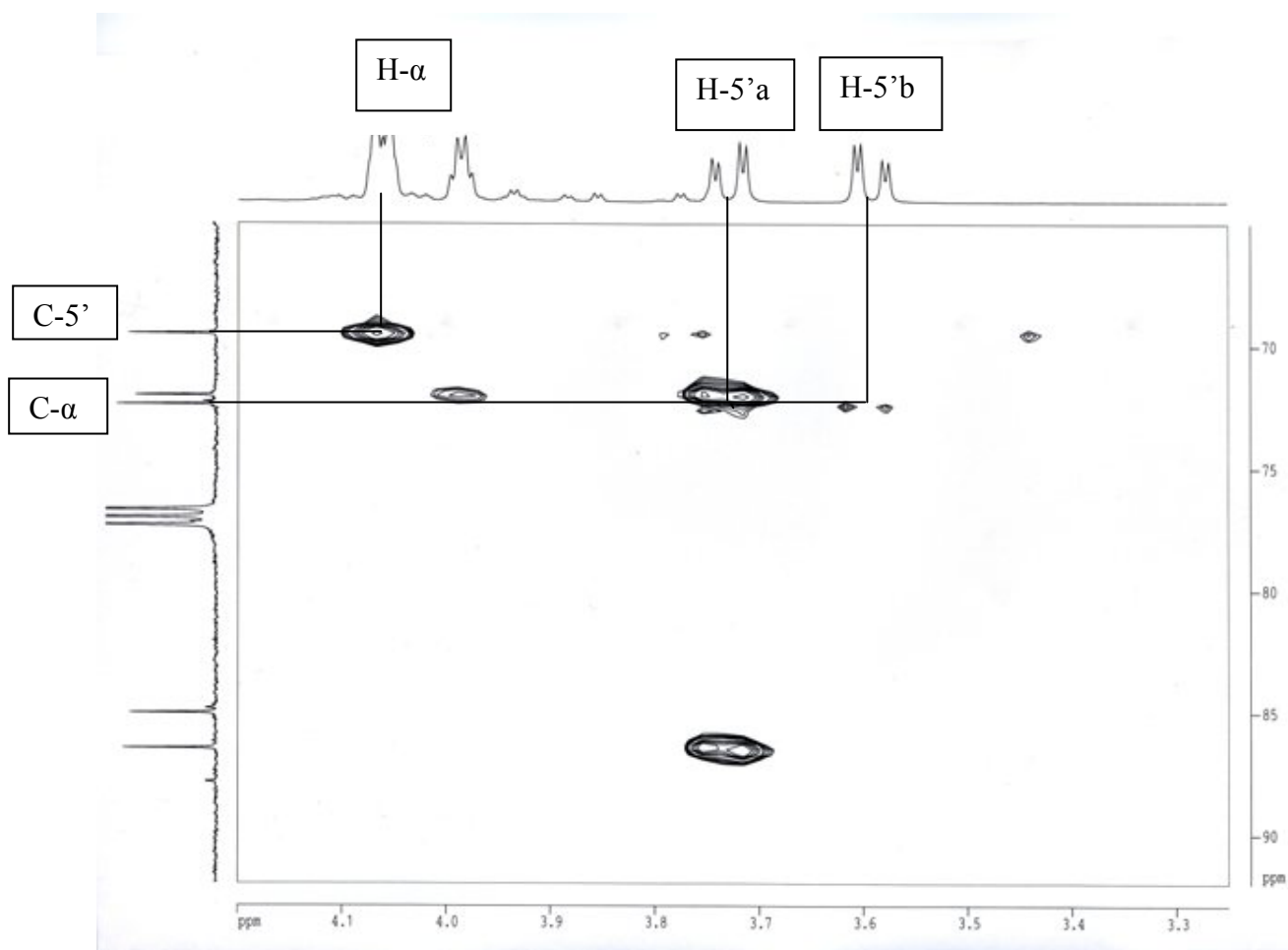
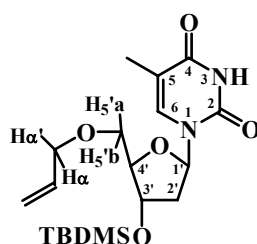


Schéma 2.33 : HMBC du composé **18**

IV.3. Synthèse du dimère 5'-5'

La stratégie de synthèse (schéma 2.34) consiste, comme nous l'avons mentionnée pour les composés **5** et **10**, à appliquer la réaction de métathèse sur la 5'-*O*-allylthymidine protégée en présence de catalyseur de Grubbs I, puis à déprotéger le dinucléoside pour donner le composé **20**.

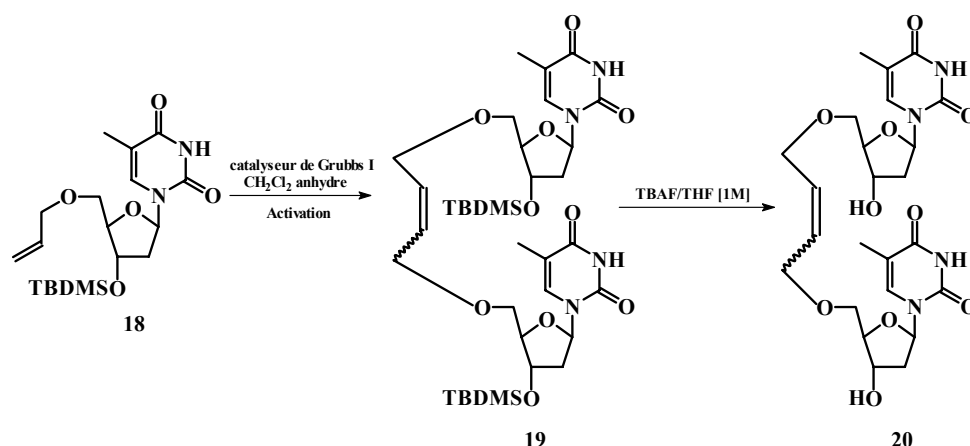


Schéma 2.34 : Synthèse du dimère 5'-5'

Les premiers essais de métathèse croisée ont été réalisés par chauffage classique. Le composé **18** est solubilisé dans le dichlorométhane et le catalyseur de Grubbs I (39 % mol) en solution dans du dichlorométhane est ajouté goutte à goutte au milieu réactionnel. Après une semaine de réaction, la purification conduit au dimère 5'-5' **19** avec un rendement de 49 %.

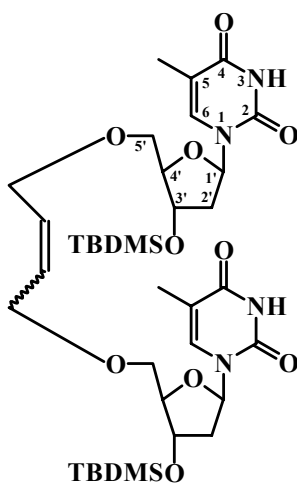
L'étude, dans les mêmes conditions opératoires, de l'influence de l'activation par irradiation micro-onde (tableau 2.7) sur la sélectivité et la cinétique de la réaction de métathèse mène au composé désiré **19** avec un rendement de 51 % en 7 heures d'activation. Le rendement est comparable à celui obtenu par chauffage classique, le temps de réaction quant à lui passe de 7 jours à 7 heures.

Tableau 2.7 : Rendement de la réaction de métathèse en fonction du mode d'activation

Activation	Temps de réaction	19 (%)
Chauffage classique	7 jours	49
Micro-ondes	7 h	51

Le spectre RMN du proton montre comme pour les composés précédents **5**, **7**, **10** et **11**, un excès d'isomères géométrique *E* avec un rapport identique ($E/Z = 5$) à celui obtenu dans le cas du dimère **10** (tableau 2.8).

Tableau 2.8 : RMN ^1H et ^{13}C du composé **19** dans CDCl_3



Attribution	^1H δ ppm (J Hz)		^{13}C δ ppm	
	Isomère E	Isomère Z	Isomère E	Isomère Z
Base				
N-H	8,22 s			
C-2	-		150,36	150,27
C-4	-		163,91	163,75
C-5	-		110,65	
CH-6	7,57 q (1,0)	7,55 q (1.1)	136,24	136,12
CH ₃	1,88 d (1,0)	1,90 s	12,62	12,58
Sucre				
CH-1'	6,28 t (6,2)	6,29 t (6,2)	84,80	84,77
CH-2'	2,26 ddd (4,2 ; 6,2 ; 13,3)			
CH-2''	2,12 dt (6,2 ; 13,3)		41,40	41,38
CH-3'	4,42 dt (3,8 ; 6,2)		72,51	72,45
CH-4'	3,97 q (3,8)		87,35	87,30
CH-5'a	3,72 dd (2,9 ; 10,7)	3,70 dd (2,5 ; 10,4)		
CH-5'b	3,58 dd (2,9 ; 10,7)	3,59 dd (2,5 ; 10,4)	72,40	72,30
Chaîne allyle				
CH ₂ - α	4,04 m	4,14 m	79,13	74,87
CH=CH	5,83 t (2,5)	5,76 t (3,8)	134,96	133,12
Groupe TBDMS				
Tertio-butyle	0,89 s		25,74	
Si-CH ₃	0,08 s		-4,86	
Si-CH ₃	0,07 s		-4,74	

Enfin, la désilylation de la partie glucidique est réalisée avec le système TBAF/THF [1M]. Le dimère 5'-5' déprotégé **20** est obtenu en 2 heures 40 minutes avec un rendement de 79 %.

Le spectre RMN du proton montre la disparition du groupement TBDMS et toujours la présence de deux isomères avec un rapport *E/Z* de 5. L'analyse par IR confirme la déprotection des groupements hydroxyyles par l'apparition d'une bande OH à 3353 cm⁻¹.

V. SYNTHÈSE DES HÉTÉRODIMÈRES 3'-5' ET 3'-3 DÉRIVANT DE LA THYMIDINE

Après la synthèse des dinucléosides 3'-3', 3-3 et 5'-5', nous nous sommes intéressés à la synthèse des dinucléosides 3'-5' et 3'-3 (schéma 2.35) dont la structure, proche de dinucléosides classiques, a été modifiée par le remplacement de la liaison phosphodiester par une chaîne carbonée insaturée.

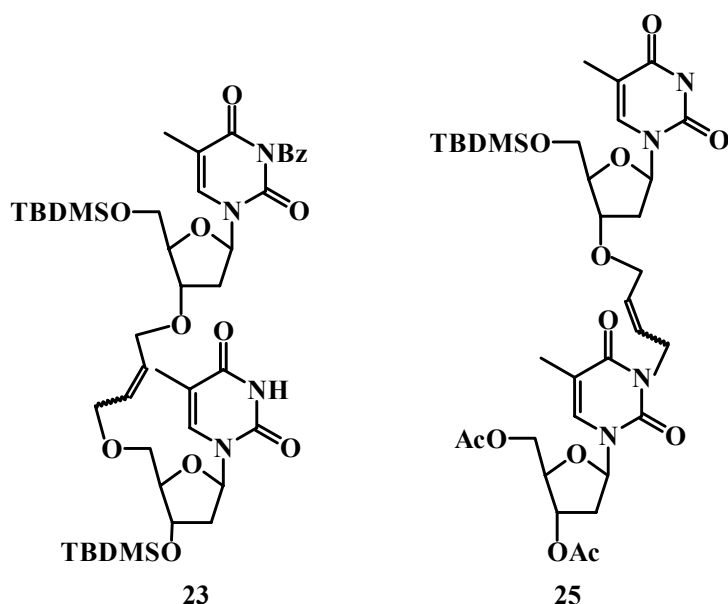


Schéma 2.35 : Structure des dimères 3'-3 et 3'-5'

V.1. Dinucléosides 3'-5' dérivant de la thymidine

V.1.1. Première stratégie de synthèse

Cette stratégie consiste à faire simplement réagir les précurseurs **2** et **18**, dont la synthèse a déjà été présentée (II.2.1. et IV.2.1.2.) en présence de catalyseur pour obtenir le dinucléoside 3'-5' par réaction de métathèse croisée (schéma 2.36).

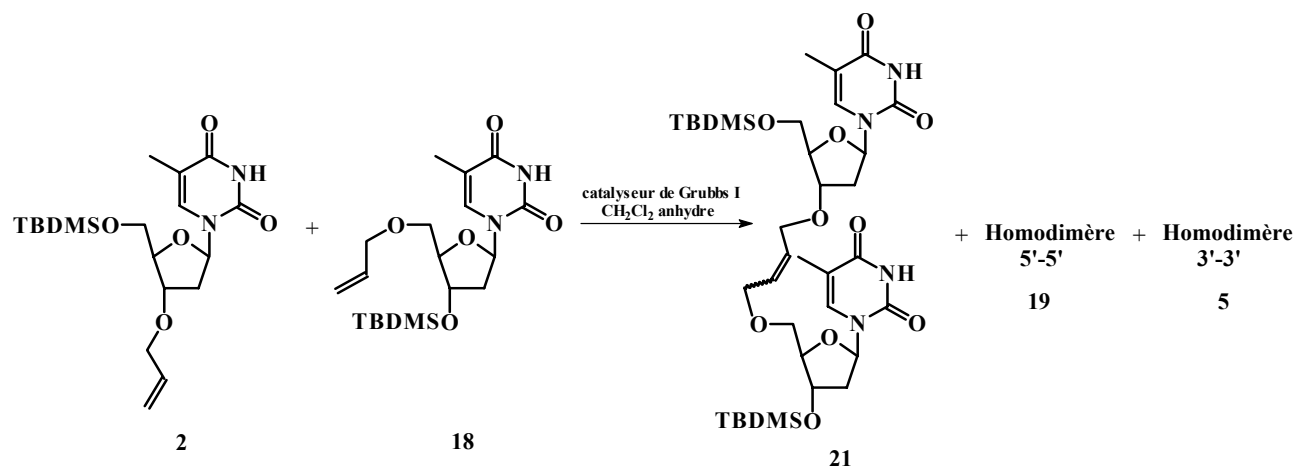


Schéma 2.36 : Stratégie de synthèse

Pour la synthèse du composé **21** nous avons utilisé les meilleures conditions obtenus lors de la synthèse des homodimères **5**, **10** et **19**. Les composés **2** et **18** sont solubilisés dans le dichlorométhane et le catalyseur de Grubbs I (33 % mol) dans le dichlorométhane est ajouté goutte à goutte au milieu réactionnel. La réaction de métathèse croisée est induite par irradiation micro-onde et ne présente plus d'évolution après 5 heures d'activation. La CCM, par comparaison avec des composés déjà obtenus, montre la présence d'un mélange de trois produits, les homodimères 3'-3' et 5'-5' et le composé **21** avec une majorité de dimère 3'-3'. Une purification sur colonne de silice suivie d'une purification sur CCM préparative n'ont pas permis d'isoler le dinucléoside 3'-5'. A chaque purification, on récupère le mélange des produits de métathèse. En effet, ces composés étant des isomères, ils ont, sur CCM, des rapports frontaux très proches ce qui rend leur séparation très fastidieuse.

Devant cet échec relatif, nous avons élaboré une nouvelle stratégie de synthèse du dimère 3'-5'.

V.1.2. Deuxième stratégie de synthèse

V.1.2.1. Schéma général

Cette nouvelle voie de synthèse comporte deux étapes (schéma 2.37). Le groupe NH de la 3'-O-allylthymidine protégée **2** est benzoylé⁷⁵. Le nouveau précurseur 3' et la 5'-O-allylthymidine seront ensuite mis en présence de catalyseur pour obtenir le dimère 3'-5' par réaction de métathèse. La N-benzoylation du précurseur 3'-O-allylé devrait permettre une

⁷⁵ A. R. Maguire; I. Hladezuk; A. Ford, *Carbohydrate Research*, 2002, **337**, 369-372.

meilleure séparation des produits de métathèse lors de la purification. En effet, la réaction de métathèse devrait conduire à la formation d'un homodimère 3'-3' dibenzoylé, un homodimère 5'-5' et l'hétérodimère 3'-5' monobenzoylé. En raison de leur différence de polarité, ces composés devraient avoir en CCM des rapports frontaux bien distincts permettant ainsi une meilleure séparation.

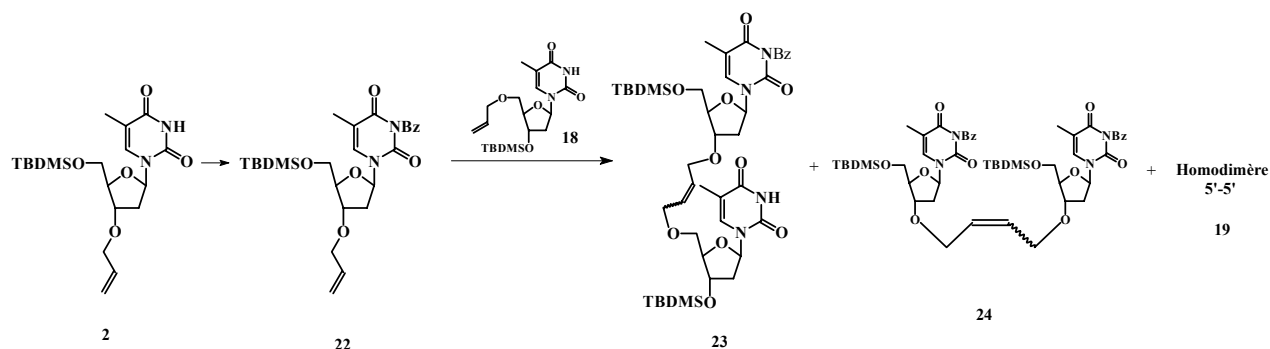


Schéma 2.37 : Nouvelle voie de synthèse du dimère 3'-5'

V.1.2.2. N-benzoylation du précurseur 3'

La position 3 de la 3'-O-allyl-5'-O-tert-butylidiméthylthymidine **2** est benzoylée, dans le dichlorométhane en présence de quantités stoechiométriques de chlorure de benzyle et de triéthylamine (schéma 2.38), pendant 10 heures. Le composé attendu est obtenu avec un rendement de 97 % après purification.

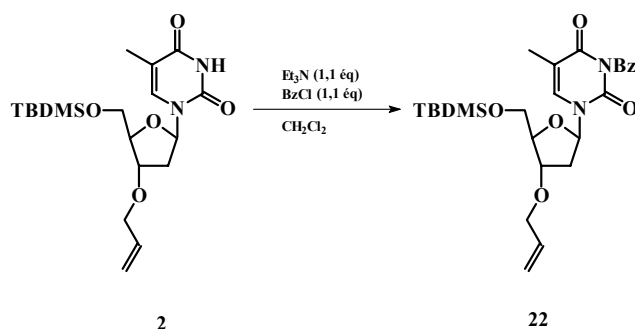


Schéma 2.38 : Réaction de N-benzoylation

La structure de ce composé est confirmée par RMN du proton et par IR.

V.1.2.3. Réaction de métathèse

Les précurseurs **22** et **18** sont introduits à 40 °C sous argon dans le dichlorométhane et le catalyseur de Grubbs I est injecté progressivement dans le milieu réactionnel. La réaction ne présente plus d'évolution après 24 heures d'agitation, et montre la présence de 3 produits,

les homodimères 3'-3' et 5'-5' et l'hétérodimère 3'-5' (schéma 2.39). Le dinucléoside 3'-5' est isolé après purification avec un rendement de 27 %.

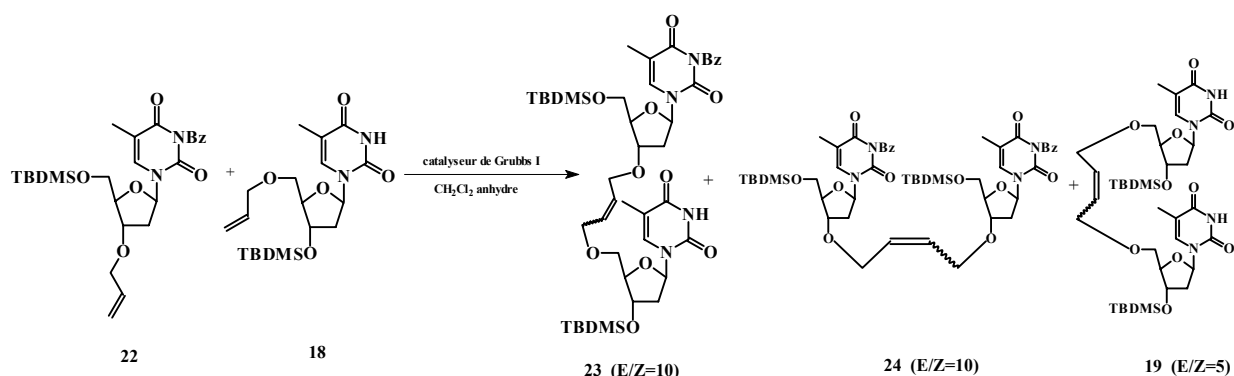


Schéma 2.39 : Réaction de métathèse

En RMN du proton, on observe un doublement des signaux, particulièrement ceux des parties thymine. Nous observons la présence du proton porté par l'atome d'azote en position 3 résonant à 8,10 ppm et celle du groupement benzoylé porté par l'atome d'azote de la deuxième base. L'analyse par RMN du proton et du carbone (tableau 2.9) montre la présence de deux isomères *E* et *Z* avec un rapport $E/Z = 10$. Dans ce cas, la proportion de l'isomère *Z* est très faible. Il semblerait que la présence du groupement benzoylé sur la base entraîne un encombrement privilégiant l'isomère *E*. Ceci a également été observé lors de l'analyse de l'homodimère dibenzoylé **24**, produit secondaire obtenu lors de la réaction. Dans ce cas, le rapport E/Z est également de 10 (L'intensité trop faible de la plupart des signaux de l'isomère *Z* ne nous a permis d'identifier précisément cet isomère).

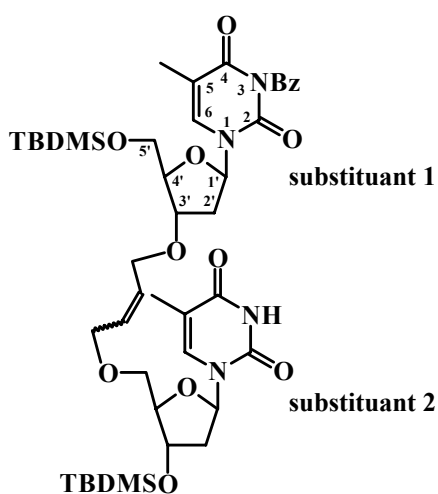


Tableau 2.9 : RMN¹H et ¹³C du composé **23** dans CDCl₃

Attribution	¹ H δ ppm (J Hz)	¹³ C δ ppm
	Isomère E	Isomère E
Substituant 1		
Base		
N-H		
C-2		150,07
C-4		163,46
C-5		110,91
CH-6	7,48 sé	135,34
CH ₃	1,96 sé	12,62
Sucre		
CH-1'	6,27 dd (5,7 ; 8,5)	86,40
CH-2'	2,46 ddd (1,4 ; 5,7 ; 13,5)	
CH-2''	2,00 ddd (5,7 ; 8,5 ; 13,5)	37,89
CH-3'	4,09 m	79,78
CH-4'	4,12 m	87,86
CH-5'a	3,93 dd (2,7 ; 11,3)	
CH-5'b	3,79 dd (2,7 ; 11,3)	63,72
Substituant 2		
Base		
N-H	8,10 sé	
C-2		149,28
C-4		162,83
C-5		110,51
CH-6	7,61 sé	136,09
CH ₃	1,87 d (0,7)	12,56
Sucre		
CH-1'	6,33 t (6,5)	85,05
CH-2'	2,24 m	
CH-2''	2,11 dt (6,5 ; 13,2)	41,37
CH-3'	4,43 dt (3,6 ; 6,5)	72,40
CH-4'	3,96 m	85,39
CH-5'a	3,71 dd (2,4 ; 10,7)	
CH-5'b	3,57 dd (2,4 ; 10,7)	72,40
Chaîne allyle		
CH ₂ -α	4,05-3,99 m	79,78 et 65,07
CH=CH	5,79 m	134,00 et 131,69
Groupe TBDMS		
5'- <i>o</i> -Tertio-butyle	0,94 s	25,94
Si-CH ₃	0,14 s	-4,67
Si-CH ₃	0,13 s	-4,85
3'- <i>o</i> -Tertio-butyle	0,88 s	25,71
Si-CH ₃	0,07 s	-5,43
Si-CH ₃	0,06 s	-5,30

V.2. Dinucléosides 3'-3 dérivant de la thymidine⁷⁶

La stratégie de synthèse pour obtenir le dimère 3'-3 consiste à faire réagir les nucléosides allylés **2** et **9** en présence de catalyseur pour réaliser la métathèse croisée (schéma 2.40).

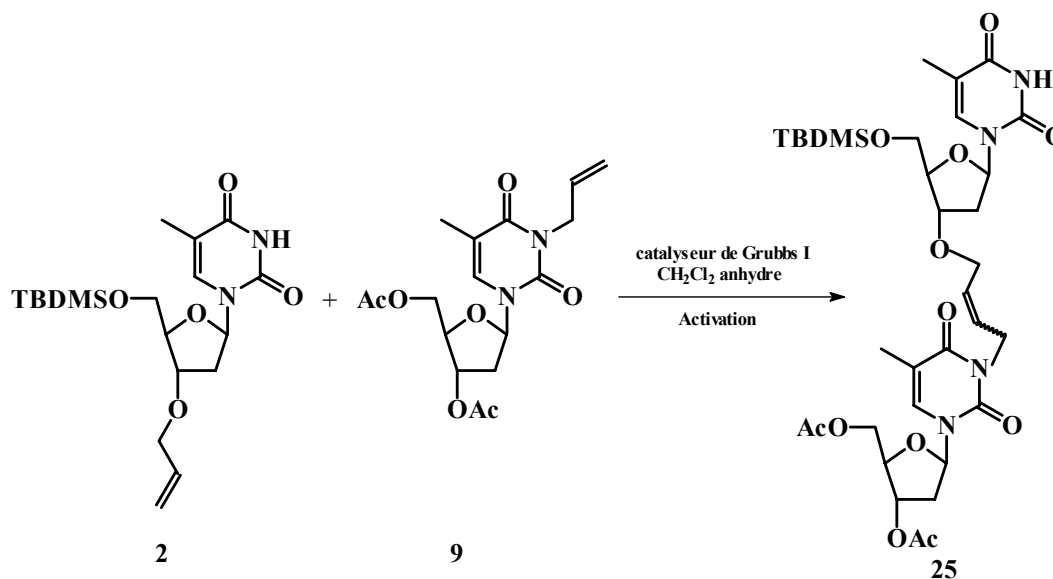


Schéma 2.40 : Schéma synthétique du dinucléoside 3'-3

La réaction est tout d'abord réalisée par chauffage classique, dans le dichlorométhane anhydre sous atmosphère d'argon en présence de 24 % molaire de catalyseur de Grubbs I. Le dimère **25** est obtenu après 6 jours de réaction avec un rendement de 60 %.

Pour améliorer le système, l'irradiation micro-onde a ensuite été réalisée. Les résultats les plus significatifs sont présentés dans le tableau 2.10. En utilisant 1 équivalent du composé **2**, la réaction conduit à un mélange de trois produits, les homodimères 3'-3' et 3-3 et l'hétérodimère 3'-3 avec une majorité d'homodimère 3-3 et seulement 13 % du composé souhaité. Une étude de la réaction avec un excès du précurseur 3'-*O*-allylé a donc été menée. Le meilleur résultat est obtenu avec 2,4 équivalents du composé **2**. Le dinucléoside 3'-3 (**25**) est obtenu après purification avec un rendement de 71 % avec une diminution considérable du temps de réaction, celui-ci passe de 6 jours à 5h. Il est à noter que dans le cas du chauffage

⁷⁶ L. Colombeau, R. Zerrouki, P. Krausz, Y. Champavier, *Letters in Organic Chemistry*, 2005, **2**, 613-615.

classique, l'utilisation d'un excès du composé **2** (2,4 éq) conduit majoritairement à la formation de l'homodimère 3'-3' (**5**).

Tableau 2.10 : Etude de la réaction de métathèse en fonction du mode d'activation et du nombre d'équivalent du composé **2**

Essai	Activation	2 (équiv)	Temps de réaction (h)	25 (%)	5 (%)	10 (%)
1	Δ	1	144	60	5	5
		2,4	144	8	50	4
2	M.O	1	5	13	15	40
3		1,9	6	51	10	6
4		2,4	5	71	15	5

Comme pour le composé **23**, les deux isomères *Z* et *E* (tableau 2.11) sont difficiles à isoler et leur proportion a été déterminée par RMN. Le rapport *E/Z* est de 8. Celle-ci présente tous les signaux correspondant à chacun des deux précurseurs avec la disparition des protons des alcènes terminaux à 5,26 et 5,19 ppm, confirmant ce résultat.

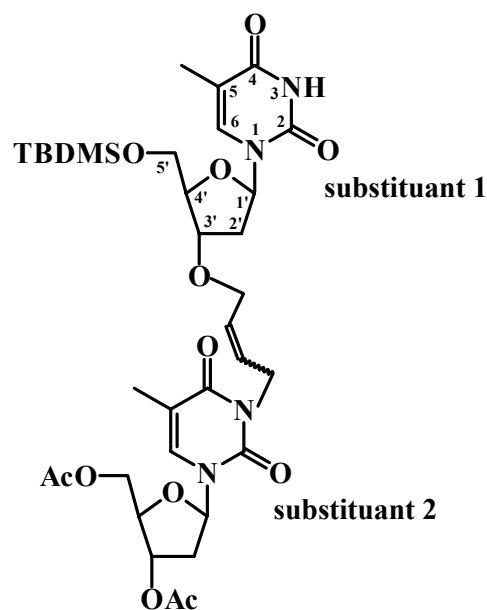


Tableau 2.11 : RMN¹H et ¹³C du composé **25** dans CDCl₃

Attribution	¹ H δ ppm (J Hz)		¹³ C δ ppm	
	Isomère E	Isomère Z	Isomère E	Isomère Z
Substituant 1				
Base				
N-H	8,15 s	8,43 s		
C-2	-		150,56	150,30
C-4	-		163,54	
C-5	-		110,76	110,80
CH-6	7,48 q (1,0)	7,52 q (1,1)	135,42	135,40
CH ₃	1,91 d (1,0)	1,92 s (1,1)	13,41	13,33
Sucre				
CH-1'	6,25 dd (5,6 ; 8,4)	6,28 dd (5,6 ; 7,8)		85,04
CH-2'	2,39 ddd (1,6 ; 5,6 ; 13,4)			
CH-2''	1,93 ddd (5,6 ; 8,4 ; 13,4)			37,93
CH-3'	4,07 m	4,09 m	79,32	79,40
CH-4'			85,14	85,15
CH-5'a	3,88 dd (2,6 ; 11,4)	3,92 dd (2,4 ; 11,4)		
CH-5'b	3,76 dd (2,6 ; 11,4)	3,81 dd (2,4 ; 11,4)	63,63	63,66
Substituant 2				
Base				
N-H				
C-2	-		150,07	150,17
C-4	-		162,81	162,90
C-5	-		110,76	110,80
CH-6	7,26 s	7,46 s	132,69	132,70
CH ₃	1,95 d (0,9)	1,94 d (1,0)	12,51	12,54
Sucre				
CH-1'	6,35 dd (5,6 ; 8,4)	6,32 dd (5,6 ; 8,4)		85,45
CH-2'	2,48 ddd (1,9 ; 5,6 ; 14,2)			
CH-2''	2,17 ddd (5,6 ; 8,4 ; 14,2)			37,63
CH-3'	5,22 dt (1,9 ; 5,6)	5,19 dt (2,3 ; 6,7)	74,09	74,10
CH-4'		4,25 m	82,03	82,04
CH-5'a	4,37 dd (4,2 ; 12,2)	4,35 dd (4,1 ; 12,2)		63,85
CH-5'b	4,34 dd (4,2 ; 12,2)	4,24 dd (4,1 ; 12,2)		
Chaîne allyle				
CH ₂ -α	4,00-3,92 m	4,59-3,95 m	69,07 et 42,3	65,05 et 38,6
CH=CH	5,81 m	5,63 m	130,29 et 126,28	129,25 et 126,12
Groupe TBDMS				
Tertio-butyle		0,92 s		25,93
Si-CH ₃	0,10 s	0,12 s		-5,36
Si-CH ₃		0,09 s		-5,45
Acétyles				
OCO-CH ₃	2,13-2,11 s	2,13-2,10 s	170,3 et 20,8	

Cet hétérodimère ne sera pas déprotégé car il servira de précurseur pour la synthèse du trimère.

VI.SYNTHESE DU TRINUCLEOSIDE RELIE PAR UNE CHAINE BUT-2-ENE ENTRE LES POSITIONS 3' ET 3'

Après la synthèse des dinucléosides 3'-3 et 3'-5', nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un trinucléoside relié toujours par la même chaîne éthylénique entre les positions 3' et 3'.

VI.1. Schéma de synthèse

La stratégie d'obtention du trimère **29** comporte 4 étapes (schéma 2.41) :

- l'allylation du groupe NH du dinucléoside **25**,
- la métathèse avec le précurseur 3'-O-allylé **2**,
- la déprotection du produit **27** en 2 étapes (désilylation et désacétylation).

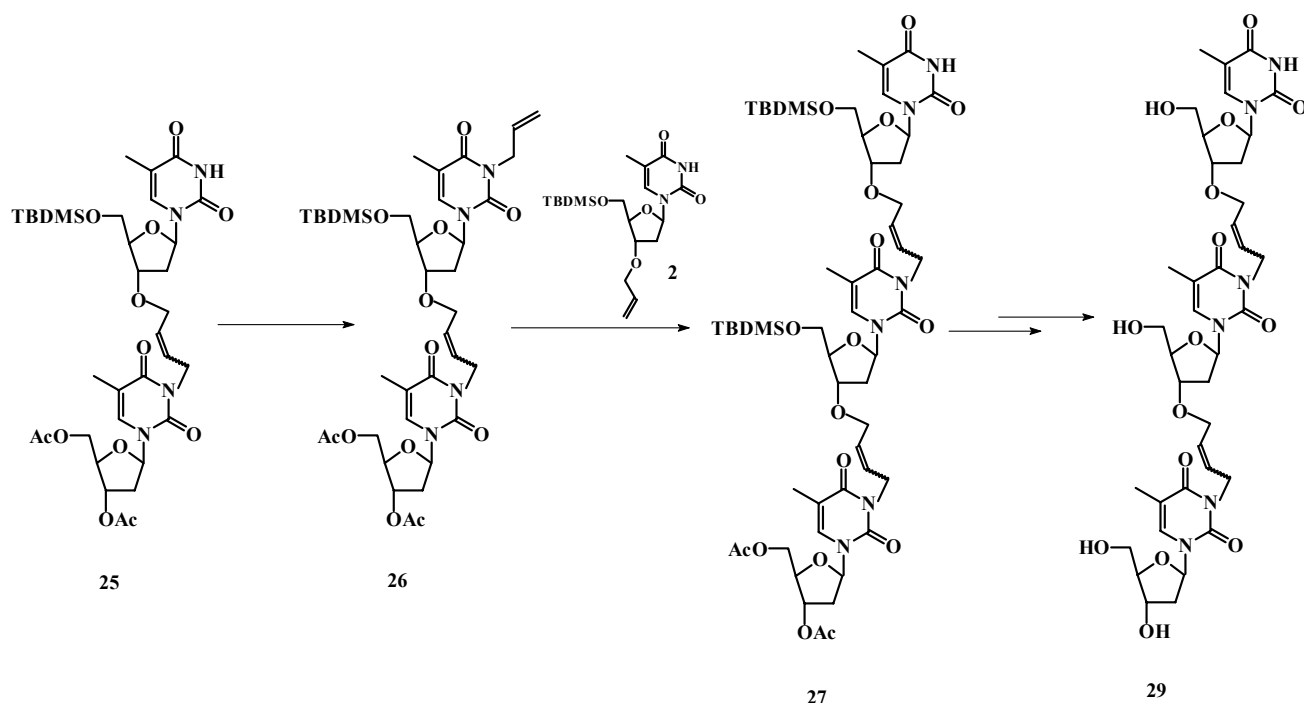


Schéma 2.41 : Stratégie de synthèse du trimère

VI.2. Les différentes étapes

VI.2.1. Alkylation du groupe NH libre du dinucléoside 3'-3

Le dimère **25** est mis en présence d'un excès de K_2CO_3 dans le DMF (schéma 2.42). Après 2 minutes d'activation par irradiation micro-onde, le bromure d'allyle est ajouté au milieu réactionnel. La réaction est suivie par CCM et n'évolue plus après 2 minutes d'activation. Le produit attendu **26** est obtenu avec un rendement de 39 %. L'alkylation de la thymidine selon le même mode opératoire (III.2.1.) avait conduit au composé N-allylé **8** avec un rendement de 87 %. Le rendement modeste obtenu dans le cas du composé **26** est probablement dû à la difficulté d'accessibilité de la position 3 de la thymine du composé **25**.

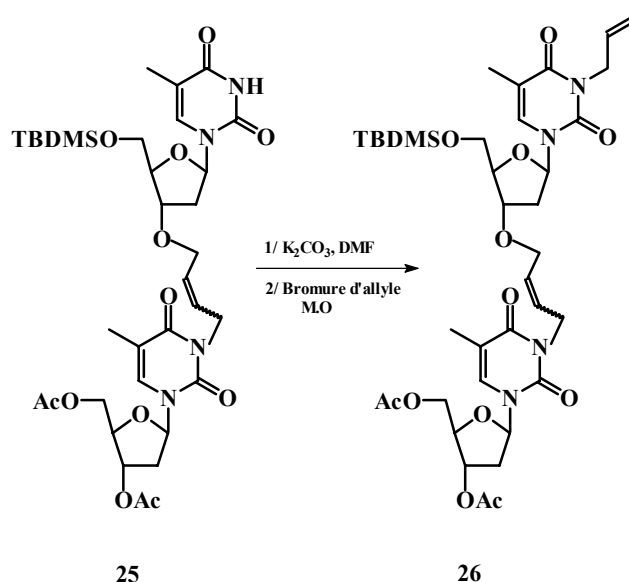


Schéma 2.42 : N-alkylation du composé **25**

La structure du composé est confirmée par RMN du proton qui montre la présence du groupe allyle et la disparition du proton en position 3.

VI.2.2. Réaction de métathèse

Le trinucléoside est obtenu en utilisant la même procédure que pour les différents dinucléosides (schéma 2.43). Le produit **27** est obtenu, après purification, avec un rendement de 40 %.

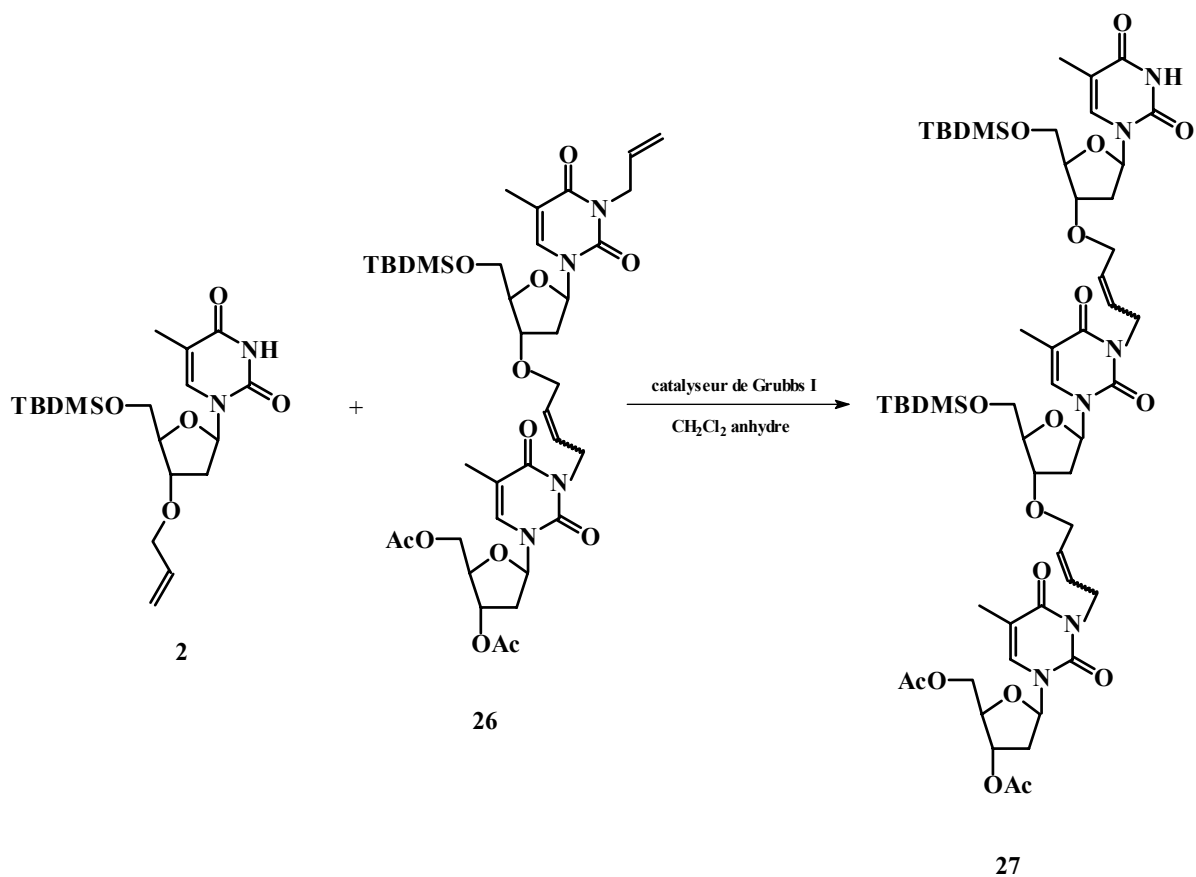


Schéma 2.43 : Réaction de métathèse croisée pour la formation du trimère

L'analyse par RMN du proton montre les signaux correspondant aux trois thymines et ceux des parties glucidiques. On observe la présence du proton porté par l'azote en position 3 résonant à 8,41 ppm. La structure du composé **27** a été confirmée par spectrométrie de masse. On observe le pic MH^+ m/z 1143 et le pic MNa^+ m/z 1165.

VI.2.3. Déprotection du trinucleoside

La déprotection du trinucleoside **27** se fait en deux étapes (schéma 2.44), tout d'abord élimination des groupements silyles suivie de la désacétylation.

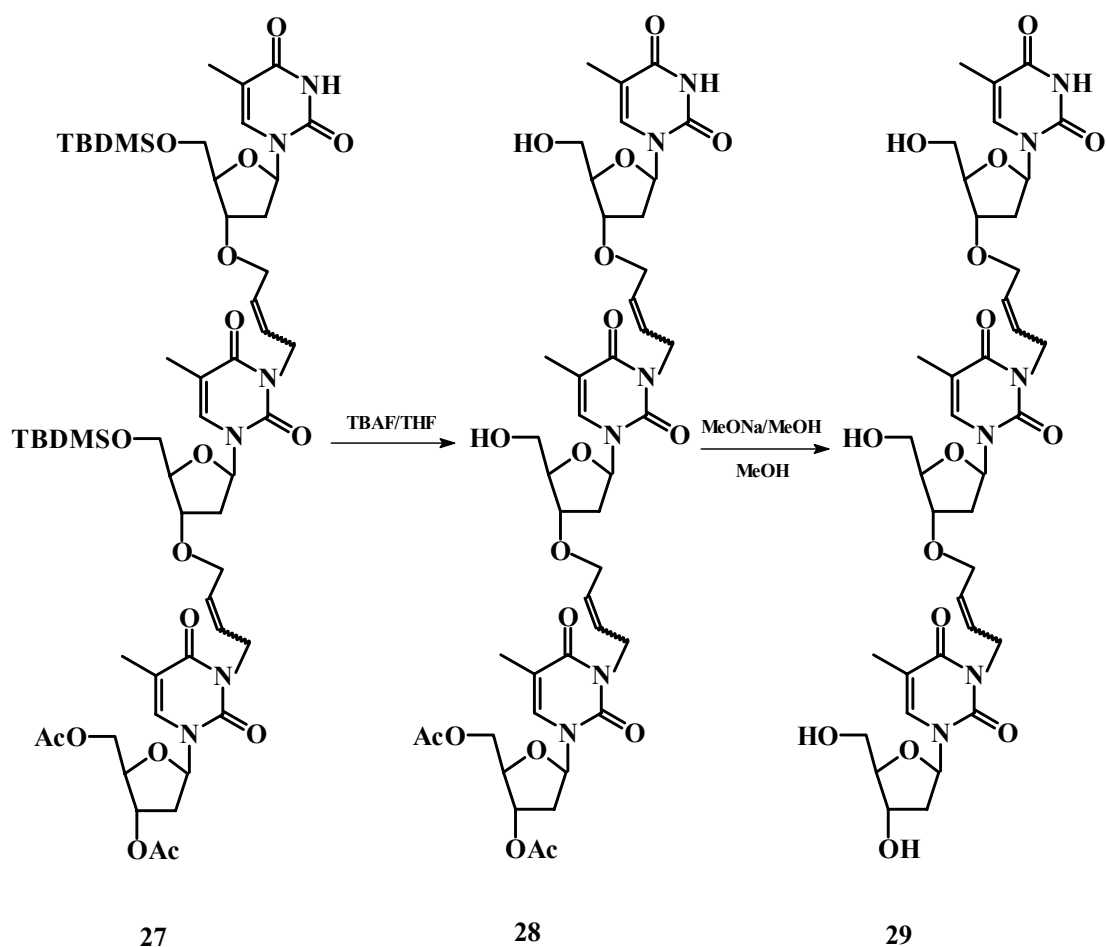


Schéma 2.44 : Déprotection du trimère

La désilylation des positions 5' de la partie glucidique est réalisée avec le système TBAF/THF [1M]. Le produit **28** est obtenu en 3 heures 30 minutes de réaction avec un rendement de 58 %.

Enfin le trinuéoside **28** est désacétylé avec le système classique MeONa/MeOH [0,5M] dans le méthanol. Le trimère déprotégé **29** est obtenu en 1 heure 30 minutes de réaction avec un rendement de 56 %.

La RMN¹H montre la disparition des figures caractéristiques des groupements TBDMS et des groupements acétyles. L'analyse par spectroscopie infrarouge confirme la déprotection des fonctions hydroxyles par la disparition des carbonyles des acétyles et l'apparition d'une bande OH à 3214 cm⁻¹.

VII. CONCLUSION

Nous avons rapporté dans cette partie la synthèse d'analogues de di- et trinucleosides dérivant de la thymidine, reliés par une chaîne insaturée. Nous avons utilisé presque toutes les combinaisons possibles pour la dimérisation : 3'-3', 3-3, 5'-5', 3'-5' et 3'-3. Ces nucleosides ont été obtenus par la réaction de métathèse des oléfines. Nous avons également étudié l'influence du mode d'activation, tels que les micro-ondes et les ultrasons sur la sélectivité et le rendement de certaines réactions clés. Tous les composés ont été synthétisés avec des rendements acceptables et ont été complètement caractérisés par différentes méthodes physiques (IR, RMN, spectrométrie de masse).

Ces di- et trinucleosides ouvrent comme perspective leur utilisation pour la synthèse d'analogues d'oligonucleotides dans lesquelles les liaisons phosphodiester seraient remplacées par des chaînes carbonées. Il sera intéressant d'examiner l'influence des régions de couplage sur l'activité biologique et également d'utiliser d'autres bases, et surtout des bases de nature différente.

VIII. PARTIE EXPÉRIMENTALE

VIII.1. Réactifs et solvants

L'origine des réactifs et solvants utilisés au cours de ce travail est présentée dans le tableau 2.12. Sauf mention contraire, tous ces composés sont utilisés tels quels après avoir contrôlé leur pureté et leur absence d'eau par IR.

Tableau 2.12 : Réactifs et solvants utilisés

Réactifs et solvants	Origine
Acétate d'éthyle	Prolabo
Acétone	Prolabo
Anhydride acétique	Acros
(Bis-tricyclohexylephosphine)dichloro-ruthénium (IV) benzylidène	Aldrich
Bromure d'allyle	Aldrich
Chloroforme	SDS
Chlorure d'ammonium	Aldrich
Chlorure de benzoyle	Aldrich
Chlorure de <i>tertio</i> -butyldiméthylsilane	Aldrich
Dichlorométhane	SDS
(4,5-dihydro-1,3-dimésityl-imidazolin-2-ylidène)(tricyclohexylphosphine)dichlororuthénium-benzylidène	Strem
4-diméthylaminopyridine	Acros
Diméthylformamide	SDS
Ethanol	SDS
Ethanol absolu	Prolabo
Ether de pétrole	SDS
Fluorure de tétrabutylammonium (1M, THF)	Acros
Hydruure de sodium	Aldrich
Imidazole	Aldrich
Méthanol	Fisher
Méthanolate de sodium dans le méthanol (0,5 M)	Acros

Nitrate d'argent	Aldrich
PPTS (pyridinium <i>paratoluene</i> sulfonate)	Aldrich
Pyridine anhydre	Aldrich
Solution méthanolique d'ammoniac (7N)	Acros
Tétrabromure de carbone	Aldrich
Tétrahydrofurane anhydre	Fluka
Thymidine	Aldrich
Toluène	SDS

VIII.2. Chromatographie

VIII.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique

Les plaques de silice (Kieselger 60 F₂₅₄ de 0,2 mm d'épaisseur, Merck) sont employées pour la chromatographie sur couche mince. La révélation des plaques se fait :

- par observation sous ultraviolet ;
- par vaporisation d'une solution 6N d'acide sulfurique suivie d'un chauffage à 100°C dans le cas des produits comportant un glucide ;
- par combinaison de ces deux techniques.

Les divers éluants utilisés sont :

Eluant A : CHCl₃/éther de pétrole ; 9/1 ; v/v

Eluant B : CHCl₃/EtOH ; 95/5 ; v/v

Eluant C : CHCl₃/EtOH ; 9/1 ; v/v

Eluant D : CHCl₃/éther de pétrole ; 8/2 ; v/v

Eluant E : CHCl₃ ; v

Eluant F : CHCl₃/EtOH ; 99/1 ; v/v

Eluant G : CH₂Cl₂/EtOH ; 9/1 ; v/v

Eluant H : CH₂Cl₂/EtOH ; 95/5 ; v/v

Eluant I : CHCl₃/EtOH ; 97/3 ; v/v

Eluant J : CHCl₃/EtOH ; 98/2 ; v/v

Eluant K : CHCl₃/EtOH ; 7/3 ; v/v

Eluant L : toluène/acétate d'éthyle ; 8/2 ; v/v

Eluant M : CHCl₃/EtOH ; 85/15 ; v/v

Eluant N : CHCl₃/EtOH ; 8/2 ; v/v

VIII.2.2. Chromatographie sur couche mince préparatives

On dépose une couche uniforme de silice de 2 mm d'épaisseur (Kieselger 60 PF₂₅₄ Merck) sur des plaques de verre (20 cm x 20 cm) que l'on active à 100°C durant 2 heures.

VIII.2.3. Chromatographie sur colonne

Le support utilisé est la silice (60 ACC, 20-40 µm, SDS). Les colonnes sont équilibrées dans le système d'élution. Tous les produits à purifier sont dissous dans un minimum de solvant ou fixés sur florisile et sont introduits en tête de colonne. L'élution des composés peut être accélérée par la mise sous légère surpression d'air comprimé du système. L'éluant est ensuite fractionné afin de récupérer le produit pur désiré.

VIII.3. Analyses

VIII.3.1. Température de fusion

Les températures de fusion (T_f) sont mesurées sur banc Köfler.

VIII.3.2. Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires $[\alpha]_D$ sont mesurés sur un polarimètre Jasco (DIP-370) pour la raie D du sodium dans une cuve de 10 cm de longueur. Ces mesures sont effectuées à température ambiante dans un solvant.

VIII.3.3. Spectrométrie RMN

Les spectres RMN ont été réalisés soit sur un appareil Bruker DPX-400 avec une fréquence de 400 MHz pour le proton et de 100 MHz pour le carbone 13. Les déplacements chimiques δ sont donnés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplages J sont données en Hertz (Hz). Les abréviations utilisées sont : s (singulet), sé (singulet élargi), d (doublet), dé (doublet élargi), dd (double doublet), ddé (double doublet élargi), t (triplet), dt (double triplet), ddt (double double triplet), tt (triple triplet), q (quadruplet), dq (double quadruplet).

VIII.3.4. Spectrométrie Infrarouge

Les spectres IR sont réalisés sur un appareil Perkin Elmer 310 sur des échantillons déposés sur pastille de KBr. Les nombres d'onde sont exprimés en cm^{-1} .

VIII.3.5. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse par ionisation chimique (IC) et par ionisation par électrospray (ESI) ont été réalisés sur un appareil R10-10 Nermag au Laboratoire de Chimie Organique Structurale de l'Université de Paris VI. L'agent ionisant dans le cas de l'ionisation chimique est le gaz ammoniac NH_3 .

VIII.4. Matériel

VIII.4.1. Cuve à ultrason

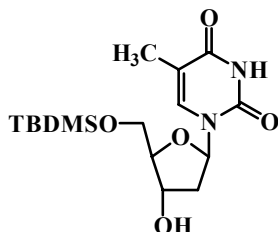
Cuve à ultrason (LEO-80) avec une fréquence de 46 kHz et de puissance 30 W. Toutes les réactions sont réalisées dans un ballon, immergé dans la cuve remplie d'eau à 40°C.

VIII.4.2. Micro-onde

Les irradiations micro-ondes ont été réalisées au moyen d'un four micro-onde de laboratoire (Milestone, modèle : MicroSynth). Avec celui-ci, la durée, la température et la puissance sont ajustées par ordinateur au moyen d'un logiciel de contrôle. La température et la puissance sont évaluées à l'aide d'une sonde.

VIII.5. Synthèses

5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**1**)



Dans un ballon de 100 mL, on introduit 2,5 g (10.33 mmol) de thymidine, 63 mg (0,05 éq.) de DMAP et 30 mL de pyridine anhydre, sous atmosphère d'argon. On ajoute 1,713 g (1,5 éq.) de chlorure de tertibutyldiméthylsilane (TBDMSCl). On laisse réagir pendant 10 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors évaporé, la pyridine est azéotropée trois fois au toluène. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (20 x 4,5 cm ; gradient d'éluant : éluant A à éluant B). 3,586 g de produit pur sont recueillis sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 97 %.

$$[\alpha]_D^{22} = + 6,957^\circ \quad (c 1,0 ; \text{CHCl}_3)$$

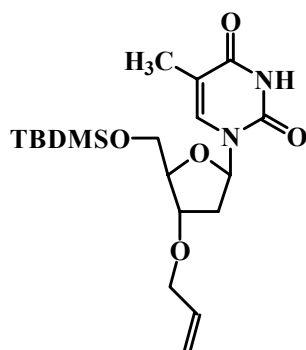
$$T_f = 201 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$R_f = 0,44 \text{ (éluant C)}$$

IR: 3445 (OH), 3186 (NH), 3051-2860 (CH ar.), 2928 (CH alkyl), 1695 (C=O Thym), 1635 (C=C).

RMN ^1H , (CDCl_3 , δ) : *Thymine*: 8,70 (s, 1H, N-H), 7,50 (q, 1H, $J=1,1\text{Hz}$, H_6), 1,91 (d, 3H, $J=1,1\text{Hz}$, CH_3) ; *sucre*: 6,36 (dd, 1H, $J=5,7\text{Hz}$, $J=8,1\text{Hz}$, $\text{H}_{1'}$), 4,46 (dt, 1H, $J=2,4\text{Hz}$, $J=5,7\text{Hz}$, $\text{H}_{3'}$), 4,03 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3,89 (dd, 1H, $J=2,8\text{Hz}$, $J=11,3\text{Hz}$, $\text{H}_{5'a}$), 3,83 (dd, 1H, $J=2,8\text{Hz}$, $J=11,3\text{Hz}$, $\text{H}_{5'b}$), 2,36 (ddd, 1H, $J=5,7\text{Hz}$, $J=2,4\text{Hz}$, $J=13,6\text{Hz}$, $\text{H}_{2'a}$), 2,10 (ddd, 1H, $J=5,7\text{Hz}$, $J=8,1\text{Hz}$, $J=13,6\text{Hz}$, $\text{H}_{2'b}$), *TBDMS*: 0,92 (s, 9H, *tert-but*), 0,12 (s, 3H, CH_3), 0,11 (s, 3H, CH_3).

3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (2)



Dans un ballon de 50 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 678 mg (1,904 mmol) de produit **1** dans 15 mL de THF anhydre, 190 mg (2,5 éq.) d'hydrure de sodium en suspension à 60% dans une huile minérale. Nous observons un dégagement gazeux et au bout de 45 minutes de sonication, 0,412 mL (2,5 éq.) de bromure d'allyle sont ajoutés. La réaction est terminée au bout de 30 minutes de sonication. Le mélange réactionnel est versé dans 50 mL d'une solution saturée de chlorure d'ammonium, puis est repris deux fois dans 60 mL de chloroforme et lavé avec 30 mL d'eau puis séché sur MgSO₄, filtré et évaporé. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (30 x 4 cm ; gradient d'éluant : éluant D à éluant B). 754 mg de produit pur est recueilli sous forme d'une huile avec un rendement quantitatif.

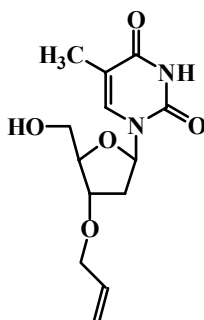
$[\alpha]_D^{22} = + 27,77$ (c 3,5 ; CHCl₃)

R_f = 0,44 (éluant B)

IR: 3158,(NH), 3068 (CH ar.), 2931 (CH alkyl), 1696 (C=O Thym), 1632 (C=C), 1270 (C-O-C).

RMN ¹H, (CDCl₃, δ) : *thymine*: 8,76 (s, 1H, N-H), 7,50 (q, 1H, J=1,0Hz, H₆), 1,91 (d, 3H, J=1,0Hz, CH₃-thymine) ; *sucrose*: 6,30 (dd, 1H, J=5,6Hz, J=8,4Hz, H_{1'}), 4,12 (m, 2H, H_{3'}, H_{4'}), 3,90 (dd, 1H, J=2,4Hz, J=11,4Hz, H_{5'a}), 3,78 (dd, 1H, J=2,4Hz, J=11,4Hz, H_{5'b}), 2,44 (ddd, 1H, J=5,6Hz, J=1,7Hz, J=13,7Hz, H_{2'a}), 1,95 (ddd, 1H, J=5,6Hz, J=8,4Hz, J=13,7Hz, H_{2'b}), *TBDMS*: 0,92 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,11 (s, 6H, Si-CH₃), *allyle*: 5,89 (ddt, 1H, J=5,5Hz, J=10,6Hz, J=17,2Hz, H_β), 5,30 (dd, 1H, J=1,6Hz, J=17,2Hz, H_γ), 5,21 (dd, 1H, J=1,6Hz, J=10,6Hz, H_{γ'}), 4,04 (ddt, 1H, J=1,6Hz, J=5,5Hz, J=12,7Hz, H_α), 3,95 (ddt, 1H, J=1,6Hz, J=5,5Hz, J=12,7Hz, H_{α'}).

3'-*O*-allylthymidine (**3**)



Dans un ballon de 100 mL, on introduit 1,723 g (4,48 mmol) de produit **2** dans 30 mL de THF anhydre et 5 mL (1,2 éq.) d'une solution de fluorure de tétrabutylammonium 1 M dans le THF. Le mélange réactionnel est mis sous agitation pendant 1h30 à température ambiante et l'avancement de la réaction est suivi par CCM. Le brut réactionnel est évaporé puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (25 x 4 cm ; éluant C). 1,191 g de produit pur est recueilli, soit un rendement de 88% sous forme d'un solide blanc.

$C_{14}H_{22}N_2O_5$ M = 298,33

$T_f = 140-142$ °C

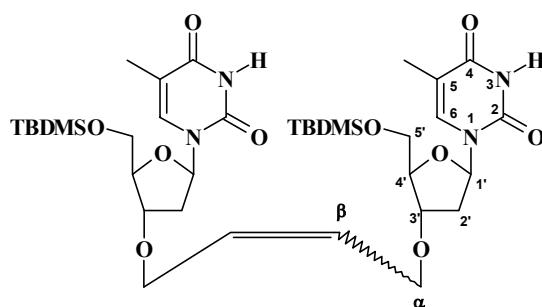
$[\alpha]_D^{22} = +37,444$ (c=1,8 ; $CHCl_3$)

$R_f = 0,45$ (éluant C)

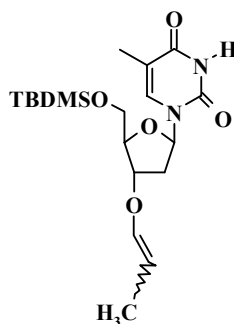
IR: 3415 (OH), 3187 (NH), 3081 (CH ar.), 2928 (CH alkyl), 1698 (C=O Thym), 1633 (C=C), 1271 (C-O-C).

RMN 1H , (CD_3OD , δ) : *thymine* : 7,78 (sé, 1H, H_6), 1,85 (sé, 3H, CH_3 -thymine) ; *sucré* : 6,22 (dd, 1H, $J=5,9Hz$, $J=8,0Hz$, $H_{1'}$), 4,19 (dt, 1H, $J=2,4Hz$, $J=5,9Hz$, $H_{3'}$), 4,05 (m, 3H, H_{α} , $H_{4'}$, $H_{\alpha'}$), 3,78 (dd, 1H, $J=3,5Hz$, $J=12,0Hz$, $H_{5'a}$), 3,71 (dd, 1H, $J=3,5Hz$, $J=12,0Hz$, $H_{5'a}$), 2,35 (ddd, 1H, $J=2,4Hz$, $J=5,9Hz$, $J=13,8Hz$, $H_{2'a}$), 2,15 (ddd, 1H, $J=5,9Hz$, $J=8,0Hz$, $J=13,8Hz$, $H_{2'b}$), *allyle*: 5,92 (ddt, 1H, $J=5,4Hz$, $J=10,4Hz$, $J=17,1Hz$, H_{β}), 5,29 (ddé, 1H, $J=1,6Hz$, $J=17,1Hz$, H_{γ}), 5,21 (ddé, 1H, $J=1,6Hz$, $J=10,4Hz$, $H_{\gamma'}$).

1,4-bis-[3'-*O*-(5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidiny)]-but-2-ène (5)



3'-*O*-(prop-1-ényl)-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (6)



Par chauffage classique :

Dans un ballon de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 462 mg (1,16 mmol) de **2** dissous dans 3,5 mL de dichlorométhane distillé sur P₂O₅ puis CaH₂ et dégazé par barbotage d'argon. 216 mg (0,26 mmol, 22% molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)-dichloro- ruthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 2 mL de dichlorométhane distillé et dégazé, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. Le mélange est placé à 35°C sous agitation magnétique. Au bout de 10 heures, plus aucune évolution n'est constatée par CCM. Le milieu réactionnel est alors concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (22 x 2 cm ; gradient d'éluant : éluant E à éluant F). 227 mg (51%) de produit **5** sous forme d'une huile noirâtre sont ainsi obtenus avec un mélange d'isomères *E/Z* = 4,55. On récupère également 7 % du composé **6**.

Par activation micro-onde :

Dans un bicol de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 189 mg (0,477 mmol) de **2** dissous dans 5 mL de dichlorométhane anhydre. 46 mg (0,056 mmol, 24% molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)-dichloro- ruthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 4 mL de dichlorométhane anhydre, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. Le mélange est mis sous agitation magnétique et activé par irradiation micro-onde (P=80W, T=38°C). Au bout de 4 heures d'activation, plus aucune évolution n'est constatée par CCM

(éluant B). Le milieu réactionnel est alors évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (16 x 2,5 cm ; gradient d'éluant : éluant E à éluant F). 73 mg (40%) de produit **5** sous forme d'une huile noirâtre sont ainsi obtenus avec un mélange d'isomères $E/Z = 4,55$.

1,4-bis-[3'-*O*-(5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidinyl)]-but-2-ène (**5**)

$R_f = 0,35$ (éluant B)

IR: 3165 (NH), 3076 (CH ar.), 2932 (CH alkyl), 1696 (C=O Thym), 1630 (C=C), 1278 (C-O-C).

RMN ^1H (CDCl_3 , δ) : **Isomère E** : *thymine*, 8,45 (s, 2H, N-H), 7,49 (q, 2H, $J=1,0\text{Hz}$, H6), 1,89 (d, 6H, $J=1,0\text{Hz}$, CH_3 -*thymine*) ; *sucré*, 6,27 (dd, 2H, $J=5,5\text{Hz}$, $J=8,5\text{Hz}$, H1'), 4,11-4,09 (m, 4H, H3' et H4'), 3,89 (dd, 2H, $J=2,4\text{Hz}$, $J=11,3\text{Hz}$, H5'a), 3,78 (dd, 2H, $J=2,4\text{Hz}$, $J=11,3\text{Hz}$, H5'b), 2,43 (ddd, 2H, $J=1,4\text{Hz}$, $J=5,5\text{Hz}$, $J=14,4\text{Hz}$, H2'a), 1,96 (ddd, 2H, $J=5,5\text{Hz}$, $J=8,5\text{Hz}$, $J=14,4\text{Hz}$, H2'b) ; *but-2-ène*, 5,71 (t, 2H, $J=3,8\text{Hz}$, H β), 4,04-3,95 (m, 4H, H α) ; *TBDMS*, 0,92 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,12 (s, 12H, Si- CH_3) ; **Isomère Z** : *thymine*, 8,38 (s, 2H, N-H), 7,49 (q, 2H, $J=0,9\text{Hz}$, H6), 1,91 (d, 6H, $J=0,9\text{Hz}$, CH_3 -*thymine*) ; *sucré*, 6,26 (dd, 2H, $J=5,5\text{Hz}$, $J=8,5\text{Hz}$, H1'), 4,11-4,09 (m, 4H, H3' et H4'), 3,89 (dd, 2H, $J=2,4\text{Hz}$, $J=11,3\text{Hz}$, H5'a), 3,78 (dd, 2H, $J=2,4\text{Hz}$, $J=11,3\text{Hz}$, H5'b), 2,43 (ddd, 2H, $J=4,4\text{Hz}$, $J=5,5\text{Hz}$, $J=14,4\text{Hz}$, H2'a), 1,96 (ddd, 2H, $J=5,5\text{Hz}$, $J=8,5\text{Hz}$, $J=14,4\text{Hz}$, H2'b) ; *but-2-ène*, 5,71 (t, 2H, $J=2,7\text{Hz}$, H β), 4,04-3,95 (m, 4H, H α) ; *TBDMS*, 0,92 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,12 (s, 12H, Si- CH_3).

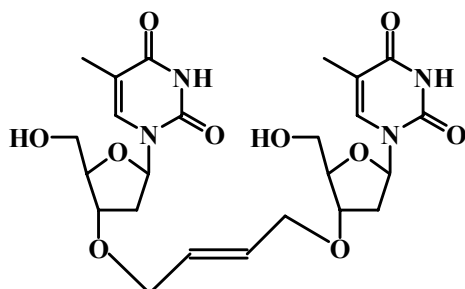
RMN ^{13}C (CDCl_3) : **Isomère E** ; *thymine* : 163,53 (C-4), 150,13 (C-2), 110,83 (C-5), 135,33 (C-6), 12,53 (CH_3) ; *but-2-ène* : 128,94 (C- β), 69,05 (C- α) ; *sucré* : 85,06 (C-1'), 85,13 (C-4'), 79,49 (C-3'), 63,68 (C-5'), 37,75 (C-2') ; *TBDMS* : 25,93 (*tert*-butyle), -5,32 (CH_3), -5,44 (CH_3). **Isomère Z** ; *thymine* : 163,53 (C-4), 150,13 (C-2), 110,83 (C-5), 135,33 (C-6), 12,53 (CH_3) ; *sucré* : 85,06 (C-1'), 85,13 (C-4'), 79,49 (C-3'), 63,68 (C-5'), 37,91 (C-2'), *but-2-ène* : 128,86 (C- β), 65,07 (C- α) ; *TBDMS* : 25,93 (*tert*-butyle), -5,32 (CH_3), -5,44 (CH_3).

3'-*O*-(prop-1-ényle)-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**6**)

RMN ^1H (CDCl_3 , δ) : **Isomère E** : *thymine*, 8,50 (s, 1H, N-H), 7,49 (q, 1H, $J=1,1\text{Hz}$, H6), 1,92 (d, 3H, $J=1,1\text{Hz}$, CH_3 -*thymine*) ; *sucré*, 6,34 (dd, 1H, $J=5,4\text{Hz}$, $J=8,8\text{Hz}$, H1'), 4,41 (dt, 1H, $J=2,0\text{Hz}$, $J=5,8\text{Hz}$, H3'), 4,16 (m, 1H, H4'), 3,91 (dd, 1H, $J=2,2\text{Hz}$, $J=11,3\text{Hz}$, H5'a), 3,90 (dd, 1H, $J=2,2\text{Hz}$, $J=11,3\text{Hz}$, H5'b), 2,47 (ddd, 1H, $J=1,4\text{Hz}$, $J=5,4\text{Hz}$, $J=13,7\text{Hz}$, H2'a), 2,00 (ddd, 1H, $J=5,8\text{Hz}$, $J=8,8\text{Hz}$, $J=13,7\text{Hz}$, H2'b) ; *prop-1-ényle*, 6,07 (dq, 1H, $J=1,5\text{Hz}$,

J=13,0Hz, H α), 4,83 (dq, 1H, J=6,7Hz, J=13,0Hz, H β), 1,56 (dd, 3H, J=1,5Hz, J=6,7Hz, CH₃)
TBDMS, 0,93 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,13 (s, 6H, Si-CH₃) ; ***Isomère Z*** : *thymine*, 8,50 (s, 1H, N-H),
7,49 (q, 1H, J=1,1Hz, H6), 1,92 (d, 3H, J=1,1Hz, CH₃-thymine) ; *sucres*, 6,30 (dd, 1H,
J=5,4Hz, J=8,8Hz, H1'), 4,39 (dt, 1H, J=2,0Hz, J=5,8Hz, H3'), 4,16 (m, 1H, H4'), 3,80 (dd,
1H, J=1,8Hz, J=11,3Hz, H5'a), 3,79 (dd, 1H, J=1,8Hz, J=11,3Hz, H5'b), 2,46 (ddd, 1H,
J=1,4Hz, J=5,4Hz, J=13,7Hz, H2'a), 2,01 (ddd, 1H, J=5,8Hz, J=8,8Hz, J=13,7Hz, H2'b) ;
prop-1-ènyle, 5,89 (dq, 1H, J=1,6Hz, J=6,5Hz, H α), 4,57 (q, 1H, J=6,5Hz, H β), 1,56 (dd, 3H,
J=1,6Hz, J=6,5Hz, CH₃) ; TBDMS, 0,92 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,12 (s, 6H, Si-CH₃).

1,4-bis-(3'-*O*-thymidinyl)-but-2-ène (7)



Dans un ballon de 25 mL, on introduit 285 mg (0,373 mmol) de **5** dissous dans 4 mL de THF. On ajoute 1 mL (2,7 éq.) d'une solution de fluorure de tétrabutylammonium 1 M dans le THF. Le mélange réactionnel est mis sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. Après évaporation et purification sur plaques préparatives (éluant A), on obtient 110 mg (55%) de produit sous forme d'un solide blanc.

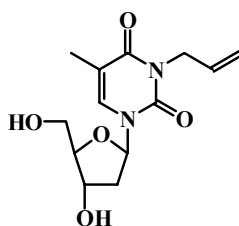
$T_f = 119-121\text{ }^\circ\text{C}$

$R_f = 0,44$ (éluant A)

IR: 3382 (OH), 3174 (NH), 3081 (CH ar.), 2928 (CH alkyl), 1698 (C=O Thym), 1633 (C=C), 1272 (C-O-C).

RMN ^1H ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, δ) : *thymine*: 7,61 (d, 2H, $J=0,6\text{Hz}$, H_6), 1,90 (d, 6H, $J=0,6\text{Hz}$, CH_3 -thymine); *sucré*: 6,20 (dd, 1H, $J=6,0\text{Hz}$, $J=7,8\text{Hz}$, $\text{H}_{1'}$), 4,22 (dt, 2H, $J=2,4\text{Hz}$, $J=5,4\text{Hz}$, $\text{H}_{3'}$), 4,08 (m, 2H, $\text{H}_{4'}$), 3,85 (dd, 2H, $J=3,0\text{Hz}$, $J=12,0\text{Hz}$, $\text{H}_{5'a}$), 3,74 (dd, 2H, $J=3,0\text{Hz}$, $J=12,0\text{Hz}$, $\text{H}_{5'b}$), 2,40 (ddd, 2H, $J=2,4\text{Hz}$, $J=6,0\text{Hz}$, $J=13,6\text{Hz}$, $\text{H}_{2'}$), 2,19 (ddd, 2H, $J=5,4\text{Hz}$, $J=7,8\text{Hz}$, $J=13,6\text{Hz}$, $\text{H}_{2'b}$); *but-2-ène* : 5,82 (t, 2H, $J=2,7\text{Hz}$, H_β), 4,05 (m, 2H, H_α), 4,01 (m, 2H, H_α).

N-3-allylthymidine (**8**)



Par chauffage classique :

Dans un ballon de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 242 mg (1 mmol) de thymidine dans 8 mL de DMF anhydre, 690 mg (5 éq.) de carbonate de potassium. Le ballon est plongé dans un bain d'huile à 80°C et le milieu réactionnel est mis sous agitation. Au bout de 30 minutes, 0,104 mL (1,2 éq.) de bromure d'allyle sont ajoutés. La réaction est terminée au bout de 1h30 et filtrée sur fritté, avant d'être évaporée. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur couche mince préparative (éluant G). 212 mg de produit pur est recueilli sous forme d'une huile avec un rendement de 75%.

Par activation micro-onde :

Dans un bicol de 25 mL, on introduit 242 mg (1 mmol) de thymidine qui sont dissous dans 8 mL de DMF anhydre. 690 mg (5 éq.) de carbonate de potassium et 0,104 mL de bromure d'allyle (1,2 éq.) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et activé par irradiation micro-onde (P=150W, T=80°C). La réaction est suivie par CCM (éluant G). La réaction est terminée au bout de 4 minutes et filtrée sur fritté, avant d'être évaporée. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur couche mince préparative (éluant G). 247 mg de produit pur est recueilli sous forme d'une huile avec un rendement de 87 %.

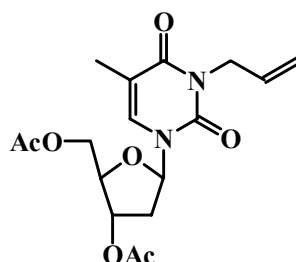
$[\alpha]_D^{22} = + 27,77$ (c 3,5 ; CHCl₃)

R_f = 0,37 (éluant G)

IR: 3432 (OH), 3068 (CH ar.), 2931 (CH alkyle), 1696 (C=O Thym), 1632 (C=C), 1270 (C-O-C).

RMN ¹H, (CDCl₃, δ) : *thymine*: 7,41 (q, 1H, J=1,2Hz, H₆), 1,93 (d, 3H, J=1,2 Hz, CH₃-thymine) ; *sucrose*: 6,21 (t, 1H, J=6,8Hz, H_{1'}), 4,54 (m, 1H, H_{3'}), 4,01 (q, 1H, J=3,3Hz, H_{4'}), 3,92 (dd, 1H, J=3,3Hz, J=11,8Hz, H_{5'a}), 3,83 (dd, 1H, J=3,3Hz, J=11,8Hz, H_{5'b}), 2,38 (ddd, 1H, J=6,8Hz, J=2,0Hz, J=13,7 Hz, H_{2'a}), 2,32 (ddd, 1H, J=6,8Hz, J=2,0Hz, J=13,7 Hz, H_{2'b}), *allyle*: 5,87 (ddt, 1H, J=5,8Hz, J=10,2Hz, J=17,2Hz, H_β), 5,24 (dq, 1H, J=1,3Hz, J=17,2Hz, H_γ), 5,17 (dq, 1H, J=1,3Hz, J=10,2Hz, H_{γ'}), 4,54 (m, 2H, H_α).

3',5'-di-*O*-acétyl-N-3-allylthymidine (**9**)



Dans un bicol de 25 mL, on introduit 446 mg (1,49 mmol) de produit **8**, 365 mg (2 éq.) de DMAP, 2,8 mL (20 éq.) d'anhydride acétique. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince et nous apparaît quantitative au bout de deux minutes. Le mélange réactionnel est alors neutralisé avec une solution saturée de NaHCO₃ suivi de trois extractions avec 30 mL de CHCl₃. Après séchage sur MgSO₄, filtration et évaporation, le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (16 x 3 cm ; gradient d'éluant CHCl₃ / éther de pétrole). 572 mg (100 %) sont ainsi obtenus sous forme d'huile.

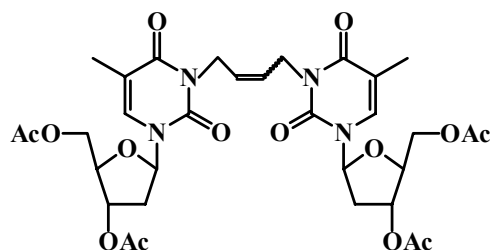
$[\alpha]_D^{22} = +4,799^\circ$ (c 0,7; CHCl₃)

R_f = 0,82 (éluant H)

IR: 3065 (CH ar.), 2957 (CH alkyles), 1743 (C=O acétyles), 1698 (C=O Thym), 1598 (C=C), 1269 (C-O-C).

RMN ¹H (CDCl₃, δ): *thymine*: 7,26 (sé, 1H, H₆), 1,95 (d, 3H, J=0,9Hz), CH₃-thymine) ; *sucre* : 6,35 (dd, 1H, J=5,7Hz, J=8,4Hz, H_{1'}), 5,22 (dt, 1H, J=2,3Hz, J=6,5Hz, H_{3'}), 4,25 (m, 1H, H_{4'}), 4,37 (dd, 1H, J=3,4Hz, J=12,2Hz, H_{5'a}), 4,34 (dd, 1H, J=3,4Hz, J=12,2 Hz, H_{5'b}), 2,48 (ddd, 1H, J= 2,3Hz, J=5,7Hz, J=14,5Hz, H_{2'a}), 2,15 (ddd, 1H, J=6,5Hz, J=8,4Hz, J=14,5Hz, H_{2'b}) ; *allyle*: 5,86 (ddt, 1H, J=10,3Hz, J=16,8Hz, J=5,9Hz, H_β), 5,26 (dq, 1H, J=1,0Hz, J=16,8Hz, H_{γ'}), 5,19 (dq, 1H, J=1,0 Hz, J=10,3Hz, H_γ), 4,55 (dé, 2H, J=5,9Hz, H_α) ; *acétyles*: 2,12 (s, 3H, CH₃), 2,10 (s, 3H, CH₃).

1,4-bis-[N-3-(3',5'-di-*O*-acétylthymidinyl)]-but-2-ène (**10**)



Par chauffage classique :

Dans un ballon de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 246 mg (0,67 mmol) de **9** dissous dans 5,5 mL de dichlorométhane anhydre. 148 mg (0,1 mmol, 31 % molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)-dichloro-ruthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 4,5 mL de dichlorométhane anhydre, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. Le mélange est placé à 35°C sous agitation magnétique. La réaction est suivie par CCM (éluant B). Au bout de 6 jours, la réaction n'évolue plus et le milieu réactionnel est alors évaporé. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (22 x 3 cm ; éluant E) on obtient 133 mg (57 %) de produit sous forme d'une mousse blanche. La proportion des isomères *Z* et *E* est déterminée par RMN ¹H et nous obtenons 83% d'isomère *E* et 17% d'isomère *Z*.

Par activation micro-onde :

Dans un bicol de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 177 mg (0,48 mmol) de **9** dissous dans 5 mL de dichlorométhane anhydre. 130 mg (0,056 mmol, 33 % molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)-dichloro-ruthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 4 mL de dichlorométhane anhydre, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. L'ensemble est mis sous agitation magnétique et activé par irradiation micro-onde (P=100W, T=38°C). Au bout de 2 heures d'activation, plus aucune évolution n'est constatée par CCM (éluant B). Le milieu réactionnel est alors évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice (éluant I). 105 mg (62 %) de produit **10** sous forme d'une huile noirâtre sont ainsi obtenus avec un mélange d'isomères *E/Z*= 5.

R_f = 0,35 (éluant J)

IR: 3050 (CH ar.), 2972 (CH alkyles), 1712 (C=O acétyle), 1689 (C=O Thym), 1635 (C=C Thym), 1259 (C-O-C).

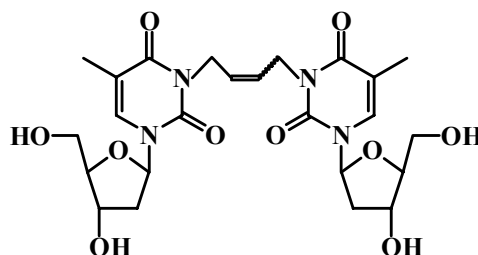
RMN ^1H (CDCl_3 , δ): **Isomère E**: *thymine*: 7,24 (q, 2H, $J=0,9\text{Hz}$, H_6), 1,93 (d, 6H, $J=0,9\text{Hz}$, CH_3 -*thymine*); *sucre*: 6,33 (dd, 2H, $J=5,6\text{Hz}$, $J=8,5\text{Hz}$, $\text{H}_{1'}$), 5,21 (dt, 2H, $J=2,3\text{Hz}$, $J=6,5\text{Hz}$, $\text{H}_{3'}$), 4,24 (m, 2H, $\text{H}_{4'}$), 4,37 (dd, 2H, $J=4,1\text{Hz}$, $J=12,2\text{Hz}$, $\text{H}_{5'a}$), 4,33 (dd, 2H, $J=4,1\text{Hz}$, $J=12,2\text{Hz}$, $\text{H}_{5'b}$), 2,48 (ddd, 2H, $J=2,3\text{Hz}$, $J=5,6\text{Hz}$, $J=14,2\text{Hz}$, $\text{H}_{2'}$), 2,13 (m, 2H, $\text{H}_{2'b}$); *but-2-ène* : 5,81 (m, 2H, H_β), 4,51 (m, 4H, H_α) ; *acétyles* : 2,13 (s, 6H, CH_3), 2,10 (s, 6H, CH_3).

Isomère Z : *thymine*: 7,25 (d, 2H, $J=0,9\text{Hz}$, H_6), 1,95 (q, 6H, $J=0,9\text{Hz}$, CH_3 -*thymine*); *sucre*: 6,37 (dd, 2H, $J=5,6\text{Hz}$, $J=8,5\text{Hz}$, $\text{H}_{1'}$), 5,21 (dt, 2H, $J=2,3\text{Hz}$, $J=6,7\text{Hz}$, $\text{H}_{3'}$), 4,24 (m, 2H, $\text{H}_{4'}$), 4,37 (dd, 2H, $J=4,1\text{Hz}$, $J=12,2\text{Hz}$, $\text{H}_{5'a}$), 4,33 (dd, 2H, $J=4,1\text{Hz}$, $J=12,2\text{Hz}$, $\text{H}_{5'b}$), 2,49 (ddd, 2H, $J=2,3\text{Hz}$, $J=5,6\text{Hz}$, $J=14,2\text{Hz}$, $\text{H}_{2'}$), 2,13 (m, 2H, $\text{H}_{2'b}$); *but-2-ène* : 5,66 (m, 2H, H_β), 4,82 (m, 4H, H_α) ; *acétyles* : 2,13 (s, 6H, CH_3), 2,10 (s, 6H, CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : **Isomère E** : *thymine* : 162,78 (C-4), 150,53 (C-2), 110,74 (C-5), 132,57 (C-6), 13,41 (CH_3); *but-2-ène* : 127,72 (C- β), 42,28 (C- α) ; *sucre* : 85,42 (C-1'), 82,04 (C-4'), 74,18 (C-3'), 63,87 (C-5'), 37,62 (C-2') ; *acétyles* : 170,37 (C=O), 20,89 (CH_3).

Isomère Z : *thymine* : 162,91 (C-4), 150,66 (C-2), 110,74 (C-5), 132,52 (C-6), 13,41 (CH_3); *sucre* : 85,42 (C-1'), 82,04 (C-4'), 74,18 (C-3'), 63,87 (C-5'), 37,62 (C-2'), *but-2-ène* : 127,66 (C- β), 38,65 (C- α) ; *acétyles* : 170,20 (C=O), 20,89 (CH_3).

1,4-bis-[N-3-thymidinyl]-but-2-ène (11)



Dans un ballon de 25 mL, on introduit 99 mg (0,141 mmol) du produit **10** dissous dans 3 mL de méthanol et 1 mL de dichlorométhane afin de le solubiliser. On ajoute 4 mL d'une solution méthanolique d'ammoniac (7N). La réaction est placée à température ambiante sous agitation magnétique et suivie par CCM (éluant K). Après 5 heures de réaction, le milieu est concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié sur plaques préparatives (éluant K). 44 mg de produit pur sont recueillis sous forme d'une mousse blanche avec un rendement de 59 %.

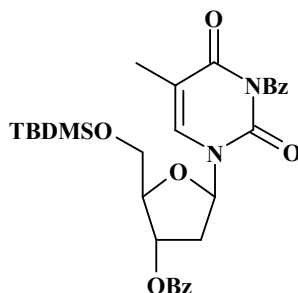
$R_f = 0,49$ (éluant K)

IR: 3403 (OH), 1690 (C=O Thym), 1567 (C=C Thym), 1290 (C-O-C).

RMN ^1H (CD_3OD , δ): **Isomère E**: thymine: 7,83 (q, 2H, $J=1,2\text{Hz}$, H_6), 1,89 (d, 6H, $J=1,2\text{Hz}$, CH_3 -thymine); sucre: 6,27 (t, 2H, $J=6,7\text{Hz}$, $\text{H}_{1'}$), 4,39 (m, 2H, $\text{H}_{3'}$), 3,90 (m, 2H, $\text{H}_{4'}$), 3,79 (dd, 2H, $J=3,1\text{Hz}$, $J=12,0\text{Hz}$, $\text{H}_{5'a}$), 3,72 (dd, 2H, $J=3,1\text{Hz}$, $J=12,0\text{Hz}$, $\text{H}_{5'b}$), 2,2 (m, 4H, H_2); but-2-ène : 5,81 (m, 2H, H_β), 4,51 (m, 4H, H_α). **Isomère Z**: thymine: 7,84 (q, 2H, $J=0,9\text{Hz}$, H_6), 1,91 (d, 6H, $J=0,9\text{Hz}$, CH_3 -thymine); sucre: 6,30 (t, 2H, $J=6,9\text{Hz}$, $\text{H}_{1'}$), 4,39 (m, 2H, $\text{H}_{3'}$), 3,90 (m, 2H, $\text{H}_{4'}$), 3,80 (dd, 2H, $J=3,7\text{Hz}$, $J=12,1\text{Hz}$, $\text{H}_{5'a}$), 3,73 (dd, 2H, $J=3,7\text{Hz}$, $J=12,1\text{Hz}$, $\text{H}_{5'b}$), 2,2 (m, 4H, H_2); but-2-ène : 5,66 (m, 2H, H_β), 4,82 (m, 4H, H_α).

RMN ^{13}C (CDCl_3): **Isomère E**: thymine : 165,2 (C-4), 152,2 (C-2), 110,9 (C-5), 136,7 (C-6), 13,7 (CH3); but-2-ène : 128,7 (C- β), 43,7 (C- α); sucre : 87,4 (C-1'), 89,0 (C-4'), 72,2 (C-3'), 62,8 (C-5'), 41,4 (C-2'). **Isomère Z**: thymine : 165,9 (C-4), 152,6 (C-2), 110,7 (C-5), 136,5 (C-6), 13,4 (CH3); sucre : 87,2 (C-1'), 89,4 (C-4'), 72,8 (C-3'), 62,7 (C-5'), 41,6 (C-2'), but-2-ène : 127,6 (C- β), 38,6 (C- α).

N-3-benzoyl-3'-O-benzoyl-5'-O-tert-butyltrimethylsilylthymidine (**12**)



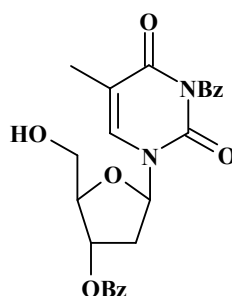
A une solution de thymidine (1,5 g, 6,19 mmol) dans la pyridine anhydre (25 mL) on ajoute 1,05 équivalent de TBDMSCl (0,980 g, 6,50 mmol) et on laisse le mélange réactionnel sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Le DMAP (1,13 g, 9,28 mmol) et le chlorure de benzoyle (4,21 mL, 37,14 mmol) sont ensuite ajoutés. Après 28 heures sous agitation à température ambiante, le mélange est solubilisé dans le chloroforme, traité avec une solution saturée de NaHCO₃ et extrait avec du CHCl₃ (3 x 20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée à sec. Le brut est ensuite purifié sur colonne de silice (27 x 4 cm ; gradient d'éluant : toluène/AcOEt) pour donner le composé **8** avec 83% de rendement (2,897 g), sous forme d'une mousse blanche.

R_f = 0,55 (éluant L).

IR: 2930 (CH), 1763 (C=O Bz), 1702 (C=O Thym), 1600 (C=C), 1269 (C-O-C).

RMN ¹H (CDCl₃, δ): *thymine* 7,72 (q, 1H, J=1,0Hz, H₆), 1,98 (d, 3H, J=1,0Hz, CH₃); *sucres*: 6,49 (dd, 1H, J=5,2Hz, J=9,3Hz, H_{1'}), 5,52 (m, 1H, H_{3'}), 4,28 (m, 1H, H_{4'}), 4,04 (dd, 1H, J=11,4Hz, J=2,0Hz, H_{5'a}), 4,02 (dd, 1H, J=11,4Hz, J=2,0Hz, H_{5'b}), 2,42 (ddd, 1H, J=3,6Hz, J=5,2Hz, J=13,8Hz, H_{2'a}), 2,09 (ddd, 1H, J=9,3Hz, J=6,1Hz, J=13,8Hz, H_{2'b}) ; *TBDMS* : 0,20 (s, 6H, CH₃-Si), 0,99 (s, 9H, CH₃, *t*-Bu) ; *benzoyles* : 7,17-8,02 (m, 10H, H-Arom).

N-3-benzoyl-3'-*O*-benzoylthymidine (**13**)



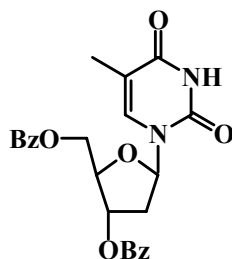
Au composé **12** (1,746 g, 3,096 mmol), solubilisé dans le méthanol anhydre (25 mL), on ajoute 0,1 équivalent de tétrabromure de carbone (0,105 g, 0,310 mmol). Le mélange réactionnel est mis sous agitation et à reflux pendant 1h30. Le solvant est ensuite évaporé et le brut est purifié sur colonne de silice (18x 4 cm ; gradient d'éluant : CHCl₃/EP→CHCl₃/EtOH), le composé **13** est récupéré avec un rendement de 88 % (1,226 g), sous forme d'une mousse blanche.

R_f = 0,47 (éluant B)

IR: 3494 (OH), 3068 (CH ar.), 2929 (CH alkyles), 1768 (C=O Bz), 1698 (C=O Thym), 1599 (C=C), 1271 (C-O-C).

RMN ¹H (CD₃OD, δ): *thymine* 8,09 (q, 1H, J=0,8Hz, H-6), 1,96 (d, 3H, J=0,8Hz, CH₃) ; *sucres*: 6,39 (dd, 1H, J=6,4Hz, J=7,9Hz, H_{1'}), 5,59 (dt, 1H, J=2,7Hz, J=5,4Hz, H_{3'}), 4,26 (q, 1H, J=2,7Hz, H_{4'}), 3,93 (dd, 1H, J=12,1Hz, J=2,7Hz, H_{5'b}), 3,90 (dd, 1H, J=2,7Hz, J=12,1Hz, H_{5'a}), 2,59 (ddd, 1H, J=2,7Hz, J=6,4Hz, J=14,3Hz, H_{2'a}), 2,55 (ddd, 1H, J=5,4Hz, J=7,9Hz, J=14,3Hz, H_{2'b}) ; *benzoyles*: 7,48-8,04 (m, 10 H, H-Arom).

3',5'-di-*o*-benzoylthymidine (**13'**)



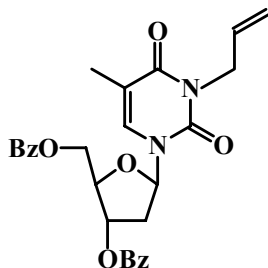
Dans un ballon de 50 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 187 mg (0,416 mmol) de produit **13** dans 8 mL de THF anhydre, 23 mg (1,4 éq.) d'hydrure de sodium en suspension à 60% dans une huile minérale. Nous observons un dégagement gazeux et au bout de 30 minutes de sonication le mélange réactionnel est versé dans 10 mL d'eau, puis est repris deux fois dans 50 mL de chloroforme, séché sur MgSO₄, filtré et évaporé. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur couche mince (éluant B). 102 mg de produit pur est recueilli sous forme d'une huile avec un rendement de 54 %.

R_f = 0,65 (éluant B)

RMN ¹H (CDCl₃, δ) : *thymine* 8,50 (s, 1H, N-H), 7,26 (q, 1H, J=0,9Hz, H-6), 1,62 (d, 3H, J=0,9Hz, CH₃-thymine) ; *sucre*: 6,46 (dd, 1H, J=5,5Hz, J=8,8Hz, H_{1'}), 5,66 (dt, 1H, J=2,9Hz, J=6,5Hz, H_{3'}), 4,54 (q, 1H, J=2,9Hz, H_{4'}), 4,80 (dd, 1H, J=12,2Hz, J=2,9Hz, H_{5'b}), 4,68 (dd, 1H, J=2,9 Hz, J=12,2Hz, H_{5'a}), 2,71 (ddd, 1H, J=2,9Hz, J=5,5Hz, J=14,3Hz, H_{2'a}), 2,34 (ddd, 1H, J=6,5 Hz, J=8,8Hz, J=14,3Hz, H_{2'b}) ; *benzoyles*: 7,46-8,08 (m, 10 H, H-arom).

RMN ¹³C (CDCl₃) : *thymine* : 163,19 (C-4), 150,14 (C-2), 111,73 (C-5), 134,37 (C-6), 12,15 (CH₃-thymine) ; *sucre* : 84,9 (C-1'), 82,7 (C-3'), 75,02 (C-4'), 64,33 (C-5'), 38,02 (C-2') ; *benzoyles* : 165,99 (C=O), 133,73-129,50 (C-arom).

N-3-allyl-3',5'-di-*o*-benzoylthymidine (**13''**)



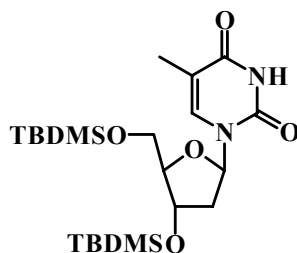
Dans un ballon de 10 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 78 mg (0,173 mmol) de produit **13** dans 15 mL de THF anhydre, 8 mg (1,2 éq.) d'hydrure de sodium en suspension à 60% dans une huile minérale. Nous observons un dégagement gazeux et au bout de 15 minutes de sonication, 30 μ L (2 éq.) de bromure d'allyle sont ajoutés. La réaction est terminée au bout de 5 minutes de sonication. Le mélange réactionnel est versé dans 5 mL d'une solution saturée de chlorure d'ammonium, puis est repris deux fois dans 20 mL de chloroforme et lavé avec 10 mL d'eau puis séché sur $MgSO_4$, filtré et évaporé. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie préparative (éluant B). 44 mg de produit pur est recueilli sous forme d'une huile avec un rendement de 52 %.

$R_f = 0,50$ (éluant B)

RMN 1H , ($CDCl_3$, δ) : *thymine*: 7,26 (q, 1H, $J=0,8Hz$, H_6), 1,66 (d, 3H, $J=0,8Hz$, CH_3 -thymine) ; *sucre*: 6,51 (dd, 1H, $J=5,5Hz$, $J=8,7Hz$, $H_{1'}$), 5,65 (dt, 1H, $J=1,8Hz$, $J=6,6Hz$, $H_{3'}$), 4,54 (m, 1H, $H_{4'}$), 4,80 (dd, 1H, $J=3,1Hz$, $J=12,2Hz$, $H_{5'a}$), 4,68 (dd, 1H, $J=3,1Hz$, $J=12,2Hz$, $H_{5'b}$), 2,72 (ddd, 1H, $J=5,5Hz$, $J=1,8Hz$, $J=14,2Hz$, $H_{2'a}$), 2,33 (ddd, 1H, $J=6,6Hz$, $J=8,7Hz$, $J=14,2Hz$, $H_{2'b}$) ; *benzoyles*: 8,06-7,45 (m, 10H, H-arom) ; *allyle*: 5,86 (ddt, 1H, $J=5,9Hz$, $J=10,2Hz$, $J=17,1Hz$, H_β), 5,25 (dq, 1H, $J=1,2Hz$, $J=17,1Hz$, H_γ), 5,18 (dd, 1H, $J=1,2Hz$, $J=10,2Hz$, $H_{\gamma'}$), 4,55 (m, 2H, H_α).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : *thymine* : 162,82 (C-4), 150,65 (C-2), 110,95 (C-5), 132,5 (C-6), 12,9 (CH_3 -thymine) ; *sucre* : 85,53 (C-1'), 82,57 (C-3'), 75,04 (C-4'), 64,29 (C-5'), 38,05 (C-2') ; *allyle*: 131,61 (C- β), 118,15 (C- γ), 43,46 (C- α) ; *benzoyles* : 166,01 (C=O), 133,81-128,94 (C-arom).

3',5'-di-*o*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (16)

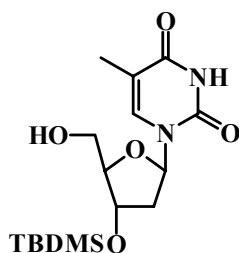


Dans un ballon de 100 mL, on introduit 2,5 g (10,33 mmol) de thymidine qui sont dissous dans 30 mL d'un mélange DMF/THF, 1/1. On ajoute 2,807 g (4,02 éq) d'imidazole, 3,896 g (2,22 éq) de nitrate d'argent et 2,22 mg (2,22 éq) de TBDMSCl. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et atmosphère inerte. La réaction est suivie par CCM (éluant B) et est arrêtée au bout de 3 heures. Le mélange réactionnel est alors filtré sur fritté, repris dans 60 mL d'acétate d'éthyle, puis lavé 3 fois avec 4 mL d'eau, séché sur MgSO₄ et évaporé. La purification sur colonne de silice (20 cm x 4 cm, gradient d'éluant : éluant A à éluant E) conduit au produit pur avec un rendement de 85 % (4,112 g).

$[\alpha]_D^{22} = + 11,52$ (c 2 ; CHCl₃) ; T_f = 125°C ; R_f = 0,75 (éluant B)

RMN ¹H (CDCl₃, δ): *thymine* : 8,48 (s, 1H, N-H), 7,47 (q, 1H, J=0,8Hz, H6), 1,91 (d, 3H, J=0,8Hz, CH₃-thymine) ; *sucre* : 6,33 (dd, 1H, J=5,9Hz, J=7,9Hz, H1'), 4,40 (dt, 1H, J=2,5Hz, J=5,9Hz, H3'), 3,94 (q, 1H, J=2,5Hz, H4'), 3,87 (dd, 1H, J=2,5Hz, J=11,4Hz, H5'a), 3,76 (dd, 1H, J=2,5Hz, J=11,4Hz, H5'b), 2,25 (ddd, 1H, J=2,5Hz, J=7,9Hz, J=13,1Hz, H2'a), 2,00 (ddd, 1H, J=5,9Hz, J=7,9Hz, J=13,1Hz, H2'b) ; 5'-*o*-TBDMS : 0,93 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,11 (sé, 6H, Si-CH₃) ; 3'-*o*-TBDMS : 0,89 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,08 (sé, 6H, Si-CH₃).

3'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (17)

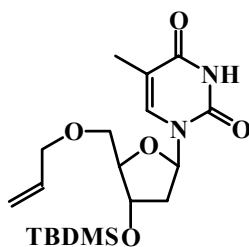


Dans un ballon de 25 mL, on introduit 500 mg (1,064 mmol) de produit **16** dans 8 mL de MeOH anhydre, 1,123 g (4,2 éq.) de PPTS. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et sous atmosphère d'argon. La réaction est suivie par CCM (éluant C). Celle-ci est terminée au bout de vingt heures, puis le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite. Le résidu est repris par 20 mL d'acétate d'éthyle et lavé trois fois avec 2 mL d'eau puis séché sur MgSO₄, filtré et évaporé. Le produit brut obtenu avec un rendement de 64 % (240 mg) est utilisé tel quel par la suite. Le produit se présente sous la forme d'un solide blanc.

$[\alpha]_D^{22} = + 20,41$ (c 3,2 ; CHCl₃) ; T_f = 95°C ; R_f = 0,16 (éluant B)

RMN ¹H, (CDCl₃, δ) : *thymine*: 8,91 (s, 1H, N-H), 7,37 (q, 1H, J=0,9Hz, H₆), 1,91 (d, 3H, J=0,9Hz, CH₃-thymine) ; *sucrose*: 6,14 (t, 1H, J=6,8Hz, H_{1'}), 4,50 (dt, 1H, J=3,4Hz, J=6,8Hz, H_{3'}), 3,92 (m, 1H, H_{4'}), 3,92 (dd, 1H, J=2,4Hz, J=12,4Hz, H_{5'a}), 3,75 (dd, 1H, J=2,4Hz, J=12,4 Hz, H_{5'b}), 2,35 (dt, 1H, J=6,8Hz, J=13,5Hz, H_{2'a}), 2,22 (ddd, 1H, J=3,4Hz, J=6,8Hz, J=13,5Hz, H_{2'b}), *TBDMS*: 0,89 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,09 (s, 6H, Si-CH₃).

3'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-5'-*O*-allylthymidine (**18**)



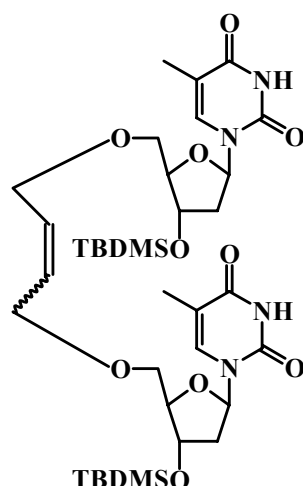
Dans un ballon de 100 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 630 mg (1,769 mmol) de produit **17** dans 15 mL de THF anhydre, 177 mg (2,5 éq.) d'hydrure de sodium en suspension à 60% dans une huile minérale. Nous observons un dégagement gazeux et au bout de 20 minutes de sonication, 0,39 mL (2,5 éq.) de bromure d'allyle sont ajoutés. La réaction est terminée au bout de 15 minutes de sonication. Le mélange réactionnel est versé dans 5 mL d'une solution saturée de chlorure d'ammonium, puis est repris deux fois dans 60 mL de chloroforme et lavé avec 5 mL d'eau puis séché sur MgSO₄, filtré et évaporé. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (18 x 3,5 cm ; gradient d'éluant : éluant A à éluant E). 550 mg de produit pur est recueilli sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 78 %.

$[\alpha]_D^{22} = +21,96$ (c 1,6 ; CHCl₃) ; T_f = 99°C ; R_f = 0,49 (éluant B)

RMN ¹H, (CDCl₃, δ) : *thymine*: 8,46 (s, 1H, N-H), 7,65 (q, 1H, J=0,8Hz, H₆), 1,89 (d, 3H, J=0,8Hz, CH₃-thymine) ; *sucre*: 6,33 (t, 1H, J=6,5Hz, H_{1'}), 4,45 (dt, 1H, J=2,5Hz, J=6,5Hz, H_{3'}), 3,98 (q, 1H, J=2,5Hz, H_{4'}), 3,76 (dd, 1H, J=2,5Hz, J=10,7Hz, H_{5'a}), 3,59 (dd, 1H, J=2,5Hz, J=10,7Hz, H_{5'b}), 2,25 (ddd, 1H, J=2,5Hz, J=6,5Hz, J=13,3Hz, H_{2'a}), 2,12 (dt, 1H, J=6,5Hz, J=13,3Hz, H_{2'b}), *TBDMS*: 0,89 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,08 (s, 6H, Si-CH₃), *allyle*: 5,92 (ddt, 1H, J=5,3Hz, J=10,3Hz, J=17,2Hz, H_β), 5,30 (dq, 1H, J=1,5Hz, J=17,2Hz, H_γ), 5,24 (dq, 1H, J=1,5Hz, J=10,3Hz, H_{γ'}), 4,06 (m, 2H, H_α).

RMN ¹³C, (CDCl₃, δ) : *thymine* : 163,69 (C-4), 150,24 (C-2), 136,03 (C-6), 110,68 (C-5), 12,56 (CH₃-thymine) ; *sucre* : 86,47 (C-4'), 85,03 (C-1'), 72,39 (C-5'), 72,03 (C-3'), 41,39 (C-2') ; *allyle* : 134,00 (C-β), 117,56 (C-γ), 69,50 (C-α) ; *TBDMS* : 25,72 (CH₃-*tert*-butyle), -4,87 (Si-CH₃).

1,4-bis-[5'-O-(3'-O-*tert*-butyldiméthylsilylthymidinyl)]-but-2-ène (**19**)



Par chauffage classique :

Dans un bicol de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 92 mg (0,232 mmol) du composé **18** dissous dans 4 mL de dichlorométhane anhydre. 37 mg (0,045 mmol, 39 % molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)-dichloro-ruthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 2 mL de dichlorométhane anhydre, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. Le mélange est placé à 35°C sous agitation magnétique. La réaction est suivie par CCM (éluant B). Au bout de 6 jours, la réaction n'évolue plus et le milieu réactionnel est alors évaporé. Le résidu est purifié sur plaques de silice (éluant B), on obtient 43 mg (49 %) de produit sous forme d'une mousse verte. On obtient un mélange des deux isomères avec un rapport $E/Z = 5$.

Par activation micro-onde :

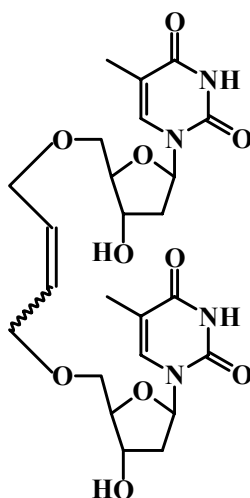
Dans un bicol de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 162 mg (0,409 mmol) de **18** dissous dans 6 mL de dichlorométhane anhydre. 57 mg (0,069 mmol, 34 % molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)-dichloro-ruthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 2 mL de dichlorométhane anhydre, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. Le mélange est placé sous agitation magnétique et activé par irradiation micro-onde (P=80W, T=38°C). La réaction est suivie par CCM (éluant B). Au bout de 5 heures, la réaction n'évolue plus et le milieu réactionnel est alors évaporé. Le résidu est purifié sur plaques de silice (éluant B), on obtient 80 mg (51 %) de produit sous forme d'une mousse verte. On obtient un mélange des deux isomères avec un rapport $E/Z = 5$.

R_f = 0,57 (éluant B)

RMN ¹H (CDCl₃, δ) : **Isomère E** : *thymine*, 8,22 (s, 2H, N-H), 7,57 (q, 2H, J=1,0Hz, H6), 1,88 (d, 6H, J=1,0Hz, CH₃-thymine) ; *sucre*, 6,28 (t, 2H, J=6,4Hz, H1'), 4,42 (dt, 2H, J=3,8Hz, J=6,4Hz, H3'), 3,97 (m, 2H, H4'), 3,72 (dd, 2H, J=2,7Hz, J=10,6Hz, H5'a), 3,58 (dd, 2H, J=2,7Hz, J=10,6Hz, H5'b), 2,26 (ddd, 2H, J=3,8Hz, J=6,4Hz, J=13,3Hz, H2'a), 2,12 (dt, 2H, J=6,4Hz, J=13,3Hz, H2'b) ; *but-2-ène*, 5,83 (t, 2H, J=2,5Hz, Hβ), 4,07 (m, 4H, Hα) ; *TBDMS*, 0,89 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,08 (s, 12H, Si-CH₃) ; **Isomère Z** : *thymine*, 8,22 (s, 2H, N-H), 7,55 (q, 2H, J=0,9Hz, H6), 1,90 (d, 6H, J=0,9Hz, CH₃-thymine) ; *sucre*, 6,29 (t, 2H, J=6,2Hz, H1'), 4,42 (dt, 2H, J=3,8Hz, J=6,2Hz, H3'), 3,97 (m, 2H, H4'), 3,70 (dd, 2H, J=2,6Hz, J=10,4Hz, H5'a), 3,59 (dd, 2H, J=2,6Hz, J=10,4Hz, H5'b), 2,26 (ddd, 2H, J=3,8Hz, J=6,2Hz, J=13,3Hz, H2'a), 2,12 (dt, 2H, J=6,2Hz, J=13,3Hz, H2'b) ; *but-2-ène*, 5,76 (t, 2H, J=3,8Hz, Hβ), 4,07 (m, 4H, Hα) ; *TBDMS*, 0,88 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,07 (s, 12H, Si-CH₃)

RMN ¹³C (CDCl₃) : **Isomère E** ; *thymine* : 163,91 (C-4), 150,36 (C-2), 110,65 (C-5), 136,24 (C-6), 12,62 (CH₃) ; *sucre* : 84,80 (C-1'), 87,35 (C-4'), 72,51 (C-3'), 72,40 (C-5'), 41,40 (C-2') ; *but-2-ène* : 134,96 (C-β), 79,13 (C-α) ; *TBDMS* : 25,72 (*tert*-butyle), -4,86 (CH₃), -4,74 (CH₃). **Isomère Z** ; *thymine* : 163,75 (C-4), 150,27 (C-2), 110,65 (C-5), 136,12 (C-6), 12,58 (CH₃) ; *sucre* : 84,77 (C-1'), 87,30 (C-4'), 72,45 (C-3'), 72,30 (C-5'), 41,38 (C-2') ; *but-2-ène* : 133,12 (C-β), 74,87 (C-α) ; *TBDMS* : 25,74 (*tert*-butyle), -4,86 (CH₃), -4,74 (CH₃).

1,4-bis-[5'-*O*-thymidiny]-but-2-ène (20)

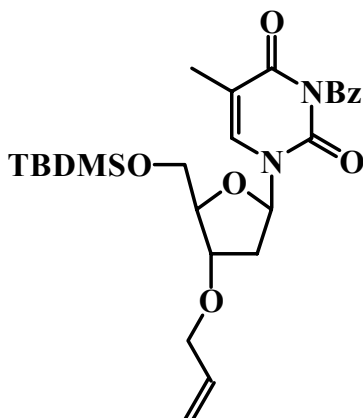


Dans un ballon de 10 mL, on introduit 62 mg (0,081 mmol) du composé **19** dissous dans 1 mL de THF anhydre. On ajoute 0,65 mL (2,7 équiv.) d'une solution de fluorure de tétrabutylammonium 1 M dans le THF. Le mélange réactionnel est mis sous agitation pendant 2 heures 40 minutes à température ambiante. Après évaporation et purification sur plaques préparatives (éluant M), on obtient 34 mg (79 %) de produit sous forme d'une mousse blanche.

$R_f = 0,46$ (éluant N)

RMN ^1H (CD_3OD , δ) : *thymine*: 7,75 (d, 2H, $J=1,0\text{Hz}$, H_6), 1,85 (d, 6H, $J=1,0\text{Hz}$, CH_3 -*thymine*) ; *sucres*: 6,28 (t, 2H, $J=6,8\text{Hz}$, $\text{H}_{1'}$), 4,40 (dt, 2H, $J=2,9\text{Hz}$, $J=5,8\text{Hz}$, $\text{H}_{3'}$), 4,01 (q, 2H, $J=2,9\text{Hz}$, $\text{H}_{4'}$), 3,73 (dd, 2H, $J=2,9\text{Hz}$, $J=10,7\text{Hz}$, $\text{H}_{5'a}$), 3,64 (dd, 2H, $J=2,9\text{Hz}$, $J=10,7\text{Hz}$, $\text{H}_{5'b}$), 2,25 (ddd, 2H, $J=2,9\text{Hz}$, $J=6,8\text{Hz}$, $J=13,4\text{Hz}$, $\text{H}_{2'a}$), 2,17 (ddd, 2H, $J=5,8\text{Hz}$, $J=6,8\text{Hz}$, $J=13,4\text{Hz}$, $\text{H}_{2'b}$) ; *but-2-ène* : 5,88 (m, 2H, H_β), 4,09 (m, 4H, H_α).

3-N-benzoyl-3'-*o*-allyl-5'-*o*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**22**)

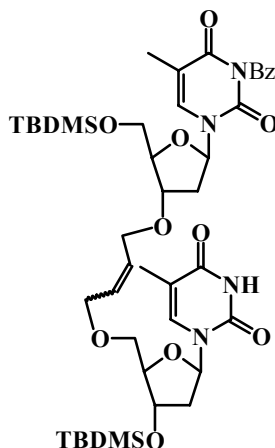


Dans un ballon de 100 mL, on introduit 2,307 g (5,826 mmol) du composé **2** qui sont dissous dans 40 mL de dichlorométhane anhydre. On ajoute 0,9 mL (1,1 équ.) de triéthylamine et 0,74 mL (1,1 équ.) de chlorure de benzoyle. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et atmosphère inerte. La réaction est suivie par CCM (éluant F) et est arrêtée après 8 heures d'agitation. Le mélange réactionnel est alors évaporé et azéotropé une fois avec du toluène. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (26 cm x 4,5 cm ; gradient d'éluant CHCl₃/ éther de pétrole, 80/20 à 95/5). On récupère le produit attendu pur avec un rendement de 97 % (2,815 g).

R_f = 0,85 (éluant B)

RMN ¹H, (CDCl₃, δ) : *thymine*: 7,63 (sé, 1H, H₆), 1,96 (d, 3H, J=0,6Hz, CH₃-thymine) ; *sucre*: 6,29 (dd, 1H, J=5,6Hz, J=8,2Hz, H_{1'}), 4,14 (m, 2H, H_{3'}, H_{4'}), 3,94 (dd, 1H, J=1,7Hz, J=11,5Hz, H_{5'a}), 3,80 (dd, 1H, J=1,7Hz, J=11,5Hz, H_{5'b}), 2,47 (ddd, 1H, J=5,6Hz, J=1,2Hz, J=13,5Hz, H_{2'a}), 2,00 (ddd, 1H, J=6,0Hz, J=8,2Hz, J=13,5Hz, H_{2'b}), *TBDMS*: 0,95 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,13 (s, 6H, CH₃), *allyle*: 5,88 (ddt, 1H, J=5,3Hz, J=10,4Hz, J=17,1Hz, H_β), 5,28 (dq, 1H, J=1,5Hz, J=17,1Hz, H_γ), 5,20 (dd, 1H, J=1,5Hz, J=10,4Hz, H_{γ'}), 4,04 (ddt, 1H, J=1,2Hz, J=5,3Hz, J=12,7Hz, H_α), 3,95 (ddt, 1H, J=1,2Hz, J=5,3Hz, J=12,7Hz, H_{α'}), *benzoyle* : 7,94-761 (m, 5H, H-arom).

1-[5'-*O*-(3'-*O*-*tert*-butyldiméthylthymidinyl)]-4-[3'-*O*-(5'-*O*-*tert*-butyldiméthyl-N-3-benzoylthymidinyl)]but-2-ène (**23**)



Par chauffage classique :

Dans un bicol de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 111 mg (0,28 mmol) du composé **18** et 113 mg (0,226 mmol) du composé **22** dissous dans 6 mL de dichlorométhane anhydre. 35 mg (0,043 mmol, 19 % molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)-dichloro-ruthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 2 mL de dichlorométhane anhydre, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. Le mélange est placé à 35°C sous agitation magnétique. La réaction est suivie par CCM (éluant B, montée deux fois). Au bout de 24 heures, la réaction n'évolue plus et le milieu réactionnel est alors évaporé. Le résidu est purifié sur plaques de silice (éluant B), on obtient 53 mg (27 %) de produit sous forme d'une huile verdâtre. On obtient un mélange de deux isomères avec un rapport *E/Z* de 10.

$R_f = 0,41$ (éluant B)

RMN ^1H (CDCl_3 , δ) : **Isomère E** : *thymine 1*, 7,48 (sé, 1H, H6), 1,96 (sé, 3H, CH_3 -thymine 1) ; *sucré 1*, 6,27 (dd, 1H, $J=5,4\text{Hz}$, $J=8,5\text{Hz}$, H1'), 4,12 (m 1H, H4'), 4,09 (m, 1H, H3'), 3,93 (dd, 1H, $J=2,7\text{Hz}$, $J=11,3\text{Hz}$, H5'a), 3,79 (dd, 1H, $J=2,7\text{Hz}$, $J=11,3\text{Hz}$, H5'b), 2,46 (ddd, 1H, $J=1,4\text{Hz}$, $J=5,4\text{Hz}$, $J=13,4\text{Hz}$, H2'a), 2,00 (ddd, 1H, $J=8,5\text{Hz}$, $J=13,4\text{Hz}$, $J=5,4\text{Hz}$, H2'b) ; *thymine 2*, 8,10 (sé, 1H, N-H), 7,61 (sé, 1H, H6), 1,87 (d, 3H, $J=0,7\text{Hz}$, CH_3 -thymine 2) ; *sucré 2*, 6,33 (t, 1H, $J=6,5\text{Hz}$, H1'), 4,43 (dt, 1H, $J=3,6\text{Hz}$, $J=6,5\text{Hz}$, H3'), 3,96 (m, 1H, H4'), 3,71 (dd, 1H, $J=2,7\text{Hz}$, $J=10,4\text{Hz}$, H5'a), 3,57 (dd, 1H, $J=2,7\text{Hz}$, $J=10,4\text{Hz}$, H5'b), 2,24 (m, 1H, H2'a), 2,11 (dt, 1H, $J=6,5\text{Hz}$, $J=13,2\text{Hz}$, H2'b) ; *but-2-ène*, 5,79 (m, 2H, H β), 4,05 (m,

2H, H α) ; 3,99 (m, 2H, H α') ; 5'-*O*-TBDMS, 0,94 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,14 (s, 6H, Si-CH₃) ; 3'-*O*-TBDMS, 0,88 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,07 (s, 6H, Si-CH₃) ; benzoyle : 7,93-7,61 (m, 5H, H-arom).

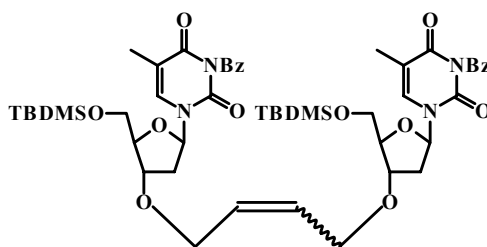
RMN ¹³C (CDCl₃) : **Isomère E** ; *thymine 1* : 163,46 (C-4), 150,11 (C-2), 110,91 (C-5), 135,34 (C-6), 12,62 (CH₃) ; *sucré 1* : 86,40 (C-1'), 87,86 (C-4'), 79,78 (C-3'), 63,72 (C-5'), 37,89 (C-2') ; *thymine 2* : 162,83 (C-4), 149,28 (C-2), 110,51 (C-5), 136,09 (C-6), 12,56 (CH₃) ; *sucré 2* : 85,05 (C-1'), 85,39 (C-4'), 72,40 (C-3'), 72,40 (C-5'), 41,37 (C-2') ; *but-2-ène* : 134,00 et 131,69 (C- β), 69,50 (C- α 1), 79,78 (C- α 2) ; *benzoyles* : 168,98 (C=O), 136,05 et 129,14 (C-arom) ; *TBDMS 1* : 25,94 (*tert*-butyle), -4,95 (CH₃), -4,67 (CH₃) ; *TBDMS 2* : 25,71 (*tert*-butyle), -5,43 (CH₃), -5,30 (CH₃).

L'intensité trop faible de la plupart des signaux de l'isomère *Z* ne nous a pas permis d'identifier précisément cet isomère.

1,4-bis-[3'-*O*-(5'-*O*-*tert*-butyldiméthyl-N-3-benzoylsilylthymidinyl)]-but-2-ène

(24)

(produit secondaire)

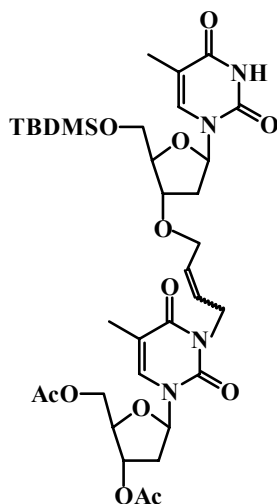


R_f = 0,44 (éluant F)

RMN ¹H (CDCl₃, δ) (*E/Z* = 10) : **Isomère E** ; *thymine*: 7,61 (q, 2H, J=0,9Hz, H₆), 1,95 (d, 6H, J=0,9Hz, CH₃-thymine) ; *sucré* : 6,27 (dd, 2H, J=5,6Hz, J=8,4Hz, H_{1'}), 4,12 (m, 2H, H_{3'}), 4,09 (m, 2H, H_{4'}), 3,92 (dd, 2H, J=2,4Hz, J=11,4Hz, H_{5'a}), 3,79 (dd, 2H, J=2,4Hz, J=11,4Hz, H_{5'b}), 2,45 (ddd, 2H, J=1,3Hz, J=5,6Hz, J=13,6Hz, H_{2'a}), 1,99 (ddd, 2H, J=5,6Hz, J=8,4Hz, J=13,6Hz, H_{2'b}) ; *but-2-ène* : 5,78 (t, 2H, J=2,7Hz, H β), 3,97 (m, 4H, H α) ; *benzoyles* : 7,92-7,48 (m, 5H, H-arom) ; *TBDMS* : 0,93 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,13 (s, 12H, Si-CH₃).

L'intensité trop faible de la plupart des signaux de l'isomère *Z* ne nous a pas permis d'identifier précisément cet isomère.

1-[N-3-(3',5'-di-*O*-acétylthymidinyl)]-4-[3'-*O*-(5'-*O*-*tert*-butyldiméthylthymidinyl)]but-2-ène (25)



Par chauffage classique :

Dans un bicol de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 114 mg (0,311 mmol) du composé **9** et 128 mg (0,323 mmol) du composé **2** dissous dans 6 mL de dichlorométhane anhydre. 62 mg (0,075 mmol, 24 % molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)-dichlororuthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 4 mL de dichlorométhane anhydre, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. Le mélange est placé à 35°C sous agitation magnétique. La réaction est suivie par CCM (éluant B). Au bout de 5 jours, la réaction n'évolue plus et le milieu réactionnel est alors évaporé. Le résidu est purifié sur plaques de silice (éluant B), on obtient 136 mg (60 %) de produit sous forme d'une mousse blanche. La proportion des isomères *E* et *Z* est déterminée par RMN et est de 8.

Par activation micro-onde :

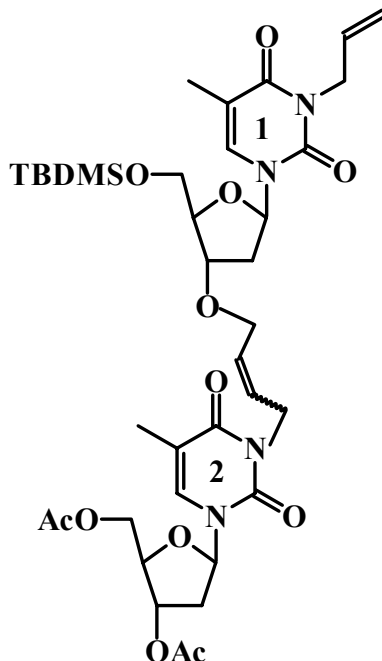
Dans un bicol de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 84 mg (0,229 mmol) du composé **9** et 216 mg (0,545 mmol, 2,4 éq.) du composé **2** dissous dans 6 mL de dichlorométhane anhydre. 45 mg (0,055 mmol, 24 % molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)-dichlororuthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 4 mL de dichlorométhane anhydre, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. Le mélange est placé sous agitation magnétique et activé par irradiation micro-onde (P=80W, T=38°C). La réaction est suivie par CCM (éluant B). Au bout de 5 heures, la réaction n'évolue plus et le milieu réactionnel est alors évaporé. Le résidu est purifié sur plaques de silice (éluant B), on obtient 120 mg (71 %) de produit sous forme d'une mousse blanche.

R_f = 0,25 (éluant B)

RMN ¹H (CDCl₃, δ) : **Isomère E** : *thymine 1*, 8,15 (s, 1H, N-H), 7,48 (q, 1H, J=1,0Hz, H₆), 1,91 (d, 3H, J=1,0Hz, CH₃-thymine 1) ; *sucre 1*, 6,25 (dd, 1H, J=5,6Hz, J=8,4Hz, H1'), 4,07 (m, 2H, H3'et H4'), 3,88 (dd, 1H, J=2,6Hz, J=11,4Hz, H5'a), 3,76 (dd, 1H, J=2,6Hz, J=11,4Hz, H5'b), 2,39 (ddd, 1H, J=2,6Hz, J=5,6Hz, J=13,4Hz, H2'a), 1,93 (ddd, 1H, J=8,4Hz, J=13,4Hz, J=2,6Hz, H2'b) ; *thymine 2*, 7,26 (q, 1H, J=0,9Hz, H₆), 1,95 (d, 3H, J=0,9Hz, CH₃-thymine 2) ; *sucre 2*, 6,35 (dd, 1H, J=5,6Hz, J=8,4Hz, H1'), 5,22 (dt, 1H, J=2,1Hz, J=6,3Hz, H3'), 4,25 (m, 1H, H4'), 4,37 (dd, 1H, J=4,2Hz, J=12,2Hz, H5'a), 4,34 (dd, 1H, J=3,5Hz, J=12,2Hz, H5'b), 2,48 (ddd, 1H, J=2,1Hz, J=5,6Hz, J=14,2Hz, H2'a), 2,17 (ddd, 1H, J=8,4Hz, J=14,2Hz, J=6,3Hz, H2'b) ; *but-2-ène*, 5,81 (m, 2H, H_β), 4,00 (m, 2H, H_α) ; 3,92 (m, 2H, H_α') ; *TBDMS*, 0,92 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,10 (s, 6H, Si-CH₃) ; *acétyles* : 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,11 (s, 3H, CH₃). **Isomère Z** : *thymine 1*, 8,43 (s, 1H, N-H), 7,52 (q, 1H, J=1,1Hz, H₆), 1,92 (d, 3H, J=1,1Hz, CH₃-thymine 1) ; *sucre 1*, 6,28 (dd, 1H, J=5,6Hz, J=7,8Hz, H1'), 4,15-4,09 (m, 2H, H3'et H4'), 3,92 (dd, 1H, J=2,4Hz, J=11,4Hz, H5'a), 3,81 (dd, 1H, J=2,4Hz, J=11,4Hz, H5'b), 2,48 (ddd, 1H, J=1,9Hz, J=5,6Hz, J=14,2Hz, H2'a), 2,16 (ddd, 1H, J=7,8Hz, J=14,2Hz, J=6Hz, H2'b) ; *thymine 2*, 7,46 (q, 1H, J=1,0Hz, H₆), 1,94 (d, 3H, J=1,0Hz, CH₃-thymine 2) ; *sucre 2*, 6,32 (dd, 1H, J=5,6Hz, J=7,8Hz, H1'), 5,19 (dt, 1H, J=2,3Hz, J=6,7Hz, H3'), 4,25 (m, 1H, H4'), 4,35 (dd, 1H, J=4,1Hz, J=12,2Hz, H5'a), 4,24 (dd, 1H, J=3,2Hz, J=12,2Hz, H5'b), 2,48 (ddd, 1H, J=2,3Hz, J=5,6Hz, J=14,2Hz, H2'a), 2,16 (ddd, 1H, J=7,8Hz, J=14,2Hz, J=6,7Hz, H2'b) ; *but-2-ène*, 5,63 (m, 2H, H_β), 4,59 (m, 2H, H_α 2) ; 4,05 (m, 1H, H_α1), 3,95 (m, 1H, H_α'1) ; *TBDMS*, 0,92 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,12 (s, 6H, Si-CH₃) ; *acétyles* : 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,10 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃) : **Isomère E** : *thymine 1* : 163,54 (C-4), 150,56 (C-2), 110,76 (C-5), 135,42 (C-6), 13,41 (CH₃) ; *sucre 1* : 85,04 (C-1'), 85,15 (C-4'), 79,32 (C-3'), 63,63 (C-5'), 37,93 (C-2') ; *thymine 2* : 162,81 (C-4), 150,07 (C-2), 110,76 (C-5), 132,69 (C-6), 12,51 (CH₃) ; *sucre 2* : 85,45 (C-1'), 82,03 (C-4'), 74,09 (C-3'), 63,85 (C-5'), 37,63 (C-2') ; *but-2-ène* : 130,29 et 126,28 (C-β), 69,07 (C-α 1), 42,3 (C-α 2) ; *acétyles* : 170,38 et 170,19 (C=O), 20,89 et 20,83 (CH₃) ; *TBDMS* : 25,93 (*tert*-butyle), -5,46 (CH₃), -5,35 (CH₃). **Isomère Z** : *thymine 1* : 163,54 (C-4), 150,30 (C-2), 110,80 (C-5), 135,40 (C-6), 13,33 (CH₃) ; *sucre 1* : 85,04 (C-1'), 85,14 (C-4'), 79,40 (C-3'), 63,66 (C-5'), 37,93 (C-2') ; *thymine 2* : 162,90 (C-4), 150,17 (C-2), 110,76 (C-5), 132,70 (C-6), 12,54 (CH₃) ; *sucre 2* : 85,45 (C-1'), 82,04 (C-4'), 74,10 (C-3'), 63,85 (C-5'), 37,63 (C-2') ; *but-2-ène* : 129,25 et 126,12 (C-β), 65,05 (C-α 1), 38,60 (C-α 2) ; *acétyles* : 170,38 et 170,20 (C=O), 20,89 et 20,83 (CH₃) ; *TBDMS* : 25,93 (*tert*-butyle), -5,45 (CH₃), -5,35 (CH₃).

1-[N-3-(3',5'-di-*O*-acétylthymidinyl)]-4-[3'-*O*-(5'-*O*-*tert*-butyldiméthyl-N-3-allylthymidinyl)]but-2-ène (**26**)



Par activation micro-onde :

Dans un bicol de 25 mL, on introduit 227 mg (0,366 mmol) du composé **25** qui sont dissous dans 8 mL de DMF anhydre. 179 mg (5 éq.) de carbonate de potassium et 0,038 mL de bromure d'allyle (1,2 éq.) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et activé par irradiation micro-onde (P=100 W, T=40°C). La réaction est suivie par CCM (éluant G). La réaction est terminée au bout de 4 minutes et filtrée sur fritté, avant d'être évaporée. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur couche mince préparative (éluant G). 94 mg de produit pur est recueilli sous forme d'une huile avec un rendement de 39 %. Le rapport *E/Z* étant de 8.

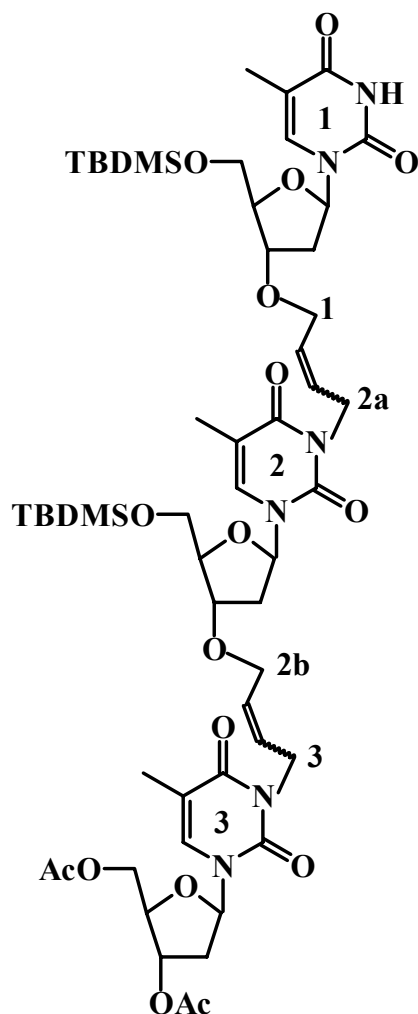
R_f = 0,47 (éluant B)

RMN ¹H (CDCl₃, δ) : **Isomère E** : *thymine 1*, 7,45 (q, 1H, J=0,9Hz, H6), 1,95 (d, 3H, J=0,9Hz, CH₃-thymine 1) ; *sucres 1*, 6,25 (t, 1H, J=6,8Hz, H1'), 4,25 (m, 1H, H4'), 4,20 (q, 1H, J=2,9Hz, H3'), 3,81 (dd, 1H, J=2,9Hz, J=11,8Hz, H5'a), 3,69 (dd, 1H, J=2,9Hz, J=11,8Hz, H5'b), 2,45 (ddd, 1H, J=2,9Hz, J=6,8Hz, J=14,0Hz, H2'a), 2,01 (m, 1H, H2'b) ; *thymine 2*, 7,24 (q, 1H, J=1,0Hz, H6), 1,94 (d, 3H, J=1,0Hz, CH₃-thymine 2) ; *sucres 2*, 6,35 (dd, 1H, J=5,7Hz, J=8,3Hz, H1'), 5,21 (dt, 1H, J=3,3Hz, J=6,6Hz, H3'), 4,36 (q, 1H,

J=3,3Hz, H4'), 4,37 (dd, 1H, J=3,3Hz, J=12,1Hz, H5'a), 4,34 (m, 1H, H5'b), 2,48 (ddd, 1H, J=3,3Hz, J=5,7Hz, J=14,4Hz, H2'a), 2,17 (ddd, 1H, J=8,3Hz, J=14,4Hz, J=6,6Hz, H2'b) ; *but-2ène*, 5,78 (m, 2H, H β), 4,02 (m, 2H, H α 1) ; 3,94 (m, 2H, H α 2) ; *allyle* : 5,86 (ddt, 1H, J=5,6Hz, J=10,2Hz, J=17,3Hz, H β), 5,25 (dq, 1H, J=1,3Hz, J=17,3Hz, H γ), 5,18 (dq, 1H, J=1,3Hz, J=10,2Hz, H γ'), 4,54 (m, 2H, H α) ; *TBDMS*, 0,91 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,11 (s, 12H, Si-CH₃) ; *acétyles* : 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,11 (s, 3H, CH₃).

L'intensité trop faible de la plupart des signaux de l'isomère *Z* ne nous a pas permis d'identifier précisément cet isomère.

Trimère (27)



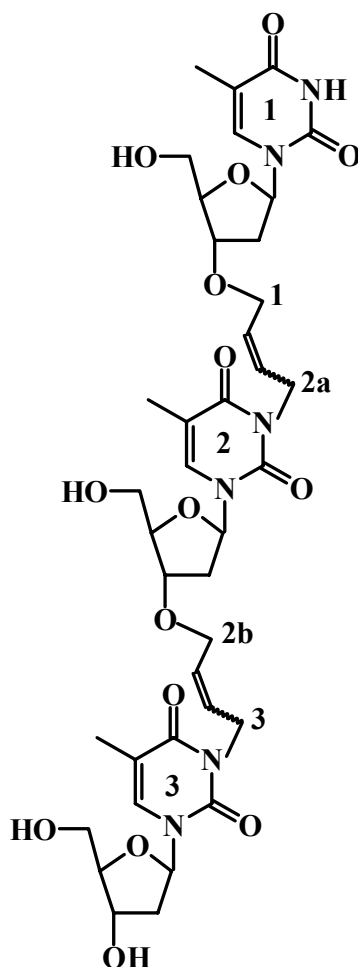
Dans un bicol de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 104 mg (0,156 mmol) du composé **26** et 62 mg (0.156 mmol) du composé **2** dissous dans 7 mL de dichlorométhane anhydre. 57 mg (0,07 mmol, 43 % molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)-dichlororuthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 3 mL de dichlorométhane anhydre, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. Le mélange est placé à 35°C sous agitation magnétique. La réaction est suivie par CCM (éluant B). Au bout de 4 jours, la réaction n'évolue plus et le mélange est alors évaporé. Le résidu est purifié sur plaques de silice (éluant B), on obtient 65 mg (40 %) du produit **27** sous forme d'une huile verdâtre.

$R_f = 0,25$ (éluant B)

RMN ^1H (CDCl_3 , δ) : *thymine 1*, 8,06 (sé, 1H, NH), 7,38 (q, 1H, $J=0,8\text{Hz}$, H6), 1,91 (d, 3H, $J=0,9\text{Hz}$, CH_3 -thymine 1) ; *sucres 1*, 6,07 (t, 1H, $J=6,7\text{Hz}$, H1'), 4,07 (m, 2H, H4' et H3'),

3,90 (m, 1H, H5'a), 3,71 (m, 1H, H5'b), 2,32 (m, 1H, H2'a), 1,93 (m, 1H, H2'b) ; *thymine 2*, 7,28 (sé, 1H, H6), 1,95 (sé, 3H, CH₃-thymine 2) ; *sucré 2*, 6,32 (dd, 1H, J=5,5Hz, J=8,5Hz, H1'), 4,19 (m, 1H, H3'), 4,25 (m, 1H, H4'), 3,90 (m, 1H, H5'a), 3,71 (m, 1H, H5'b), 2,42 (m, 1H, H2'a), 2,32 (m, 1H, H2'b) ; *thymine 3*, 7,28 (sé, 1H, H6), 1,95 (sé, 3H, CH₃-thymine 3) ; *sucré 3*, 6,34 (dd, 1H, J=5,7Hz, J=8,3Hz, H1'), 5,22 (dt, 1H, J=2,5Hz, J=6,6Hz, H3'), 4,37 (q, 1H, J=2,5Hz, H4'), 4,38 (dd, 1H, J=2,5Hz, J=12,1Hz, H5'a), 4,34 (m, 1H, H5'b), 2,48 (ddd, 1H, J=2,5Hz, J=5,7Hz, J=14,4Hz, H2'a), 2,32 (m, 1H, H2'b) ; *but-2-ène*, 5,77 (m, 4H, H β), 4,54 (m, 4H, 2H α 1 et 2H α 2b), 4,02 (m, 2H, H α 3), 3,90 (m, 2H, H α 2a) ; *TBDMS*, 0,92 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,11 (s, 6H, Si-CH₃), 0,10 (s, 6H, Si-CH₃) ; *acétyles* : 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,11 (s, 3H, CH₃).

Trimère (29)



Désilylation :

Dans un ballon de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 43 mg (0,042 mmol) de **27** dissous dans 2 mL de THF anhydre. On ajoute 50 μ L (4,02 eq.) d'une solution de fluorure de tétrabutylammonium 1 M dans le THF. Le mélange réactionnel est mis sous agitation pendant 3 heures 30 minutes à température ambiante. Après évaporation et purification sur plaques préparatives (éluant C), on obtient 22 mg (58 %) du produit attendu.

Désacétylation :

Dans un ballon de 10 mL, on introduit 22 mg (0,024 mmol) du produit **28** dissous dans 2 mL de méthanol anhydre. On ajoute 0,2 mL d'une solution méthylate de sodium à 0,5 M dans le méthanol. La réaction est placée à température ambiante sous agitation magnétique et suivie par CCM (éluant K). Après 1 heure 30 minutes de réaction, le milieu est neutralisé par ajouts successifs de résine H⁺, filtré, rincé au méthanol et évaporé. Le brut réactionnel est purifié sur plaques préparatives (éluant N). 11 mg de produit pur est recueilli sous forme d'une huile avec un rendement de 56 %.

$R_f = 0,45$ (éluant B)

RMN ^1H (CD_3OD , δ) : *thymine 1*, 7,75 (q, 1H, $J=0,8\text{Hz}$, H6), 1,87 (d, 3H, $J=0,8\text{Hz}$, CH_3 -thymine 1) ; *sucré 1*, 6,19 (dd, 1H, $J=6,0\text{Hz}$, $J=7,7\text{Hz}$, H1'), 4,58 (m, 1H, H3'), 4,14 (m, 1H, H4'), 3,80-3,70 (m, 2H, H5'), 2,34 (ddd, 1H, $J=2,5\text{Hz}$, $J=7,7\text{Hz}$, $J=13\text{Hz}$, H2'a), 2,20 (m, 1H, H2'b) ; *thymine 2*, 7,85 (q, 1H, $J=0,9\text{Hz}$, H6), 1,90 (sé, 3H, CH_3 -thymine 2) ; *sucré 2*, 6,30 (t, 1H, $J=6,7\text{Hz}$, H1'), 4,58 (m, 1H, H3'), 4,14 (m, 1H, H4'), 3,80-3,70 (m, 2H, H5'), 2,29 (ddd, 1H, $J=3\text{Hz}$, $J=6,7\text{Hz}$, $J=13\text{Hz}$, H2'a), 2,24 (ddd, 1H, $J=2,4\text{Hz}$, $J=6,7\text{Hz}$, $J=13\text{Hz}$, H2'b) ; *thymine 3*, 7,80 (q, 1H, $J=0,8\text{Hz}$, H6), 1,90 (sé, 3H, CH_3 -thymine 3) ; *sucré 3*, 6,22 (dd, 1H, $J=6,0\text{Hz}$, $J=7,5\text{Hz}$, H1'), 4,39 (m, 1H, H3'), 3,90 (m, 1H, H4'), 3,80-3,70 (m, 2H, H5'), 2,15 (m, 2H, H2') ; *but-2-ène*, 5,75 (m, 4H, H β), 4,52 (m, 4H, 2H α 2a et 2H α 3), 4,00 (m, 4H, 2H α 1 et 2H α 2b).

Spectroscopie de masse (ionisation chimique) : MH^+ : $m/z = 1143$, MNa^+ : $m/z = 1165$

Prolongeant notre intérêt pour les dérivés de la thymine, nous nous sommes proposés dans une seconde phase de ces travaux d'utiliser ce synthon pour l'élaboration d'agents alkylants originaux qui constituent une thérapie antitumorale importante.

2^{ème} PARTIE

SYNTHESE D'AGENTS ALKYLANTS

CHAPITRE I

ETAT DE LA QUESTION- OBJET DU TRAVAIL

ETAT DE LA QUESTION - OBJET DU TRAVAIL

I. INTRODUCTION

Le cancer, par l'importance du nombre de personnes qu'il atteint, constitue un problème majeur de santé publique. Il est l'une des premières causes de mortalité dans les pays développés. Les traitements anticancéreux incluent, suivant le type et le degré d'évolution du cancer, la chirurgie, l'irradiation et la chimiothérapie. Cette dernière garde une place de choix car elle a pour objectif de détruire les cellules cancéreuses et d'éviter les rechutes locales et métastases.

Les traitements par chimiothérapie consistent à injecter, le plus souvent par voie intraveineuse, des agents anticancéreux. Ceux-ci tuent les cellules cancéreuses en agissant sur l'ADN, sur l'ARN ou sur les protéines des cellules, pour bloquer certaines étapes de la division cellulaire.

Dans ce chapitre, nous nous proposons de présenter les différents agents anticancéreux disponibles aujourd'hui. Nous nous intéresserons de plus près aux agents alkylants et, plus précisément à la bis-(β -chloroéthyl)méthylamine ou chlorméthine (schéma 1.1).

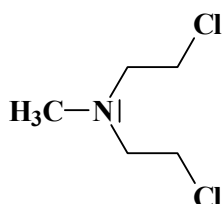


Schéma 1.1 : bis-(β -chloroéthyl)méthylamine ou “Moutarde à l’azote” ou chlorméthine.

I.1. Qu'est ce que le cancer ?

Le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules normales de l'organisme, qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur multiplication. En outre, ces cellules sont capables d'envahir le tissu normal avoisinant, en le détruisant, puis de migrer à distance pour former des métastases.

Chaque type de cancer a probablement des facteurs déclenchant, de promotion et de progression différents. Cependant, on peut décrire un schéma général de l'histoire naturelle d'un cancer :

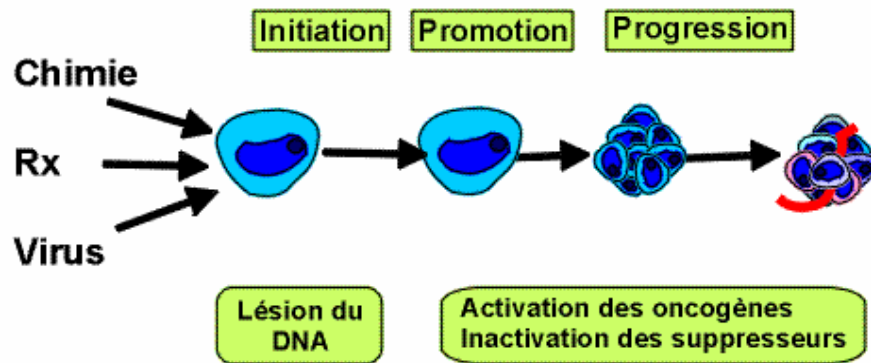


Schéma 1.2 : Schéma général des premières étapes de la cancérisation.

On peut distinguer schématiquement, trois étapes (schéma 1.2) :

- **L'initiation** : correspond à une lésion rapide et irréversible de l'ADN après exposition à un carcinogène (physique, chimique, viral, etc...).
- **La promotion** : correspond à une exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiée.
- **La progression** : correspond à l'acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, l'acquisition de l'indépendance, la perte de la différenciation, l'invasion locale et métastatique.

I.2. La chimiothérapie et les agents anticancéreux

Rappelons que la chimiothérapie fait appel à des substances chimiques qui empêchent les cellules tumorales de se diviser. Il n'existe pas de classification consensuelle pour ces substances anticancéreuses car elles ont plusieurs modes d'action. Cependant ces médicaments peuvent être classés en trois catégories.

I.2.1. Les antimétabolites

Les antimétabolites sont des composés qui se substituent au métabolite naturel du fait de leur analogie structurale. Ils inhibent la synthèse des acides nucléiques, première étape nécessaire à toute multiplication cellulaire. Parmi ces composés, nous pouvons citer les antagonistes de l'acide folique (méthotrexate) et les analogues des nucléosides naturels (la 2'-désoxy-5-fluorouridine (5-FU), la cytarabine et la cladribine) (schéma 1.3).

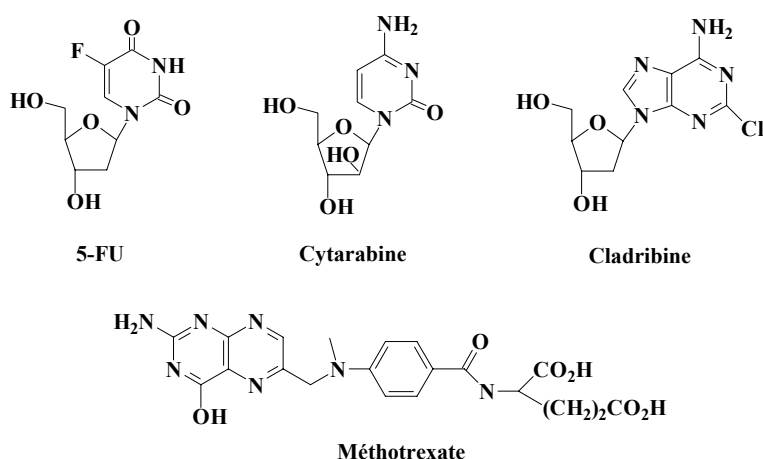


Schéma 1.3 : exemples d'antimétabolites.

I.2.2. Les agents agissant sur les fonctions cellulaires

Les agents agissant sur les fonctions cellulaires sont des composés qui bloquent la division cellulaire au moment où les cellules commencent à se diviser, et ont pour cible la tubuline. Cette protéine se polymérise en fibres tubulaires microscopiques appelées microtubules. Ces derniers sont les principaux constituants du fuseau mitotique, qui contribuent à la séparation des chromosomes, lors de la mitose (d'où leur nom d'agents antimitotiques).

Les agents antimitotiques peuvent être classés en deux catégories : les agents inhibant la polymérisation de la tubuline en microtubules (colchicine et vinblastine) et les agents stabilisant les microtubules (paclitaxel et docétaxel) (schéma 1.4).

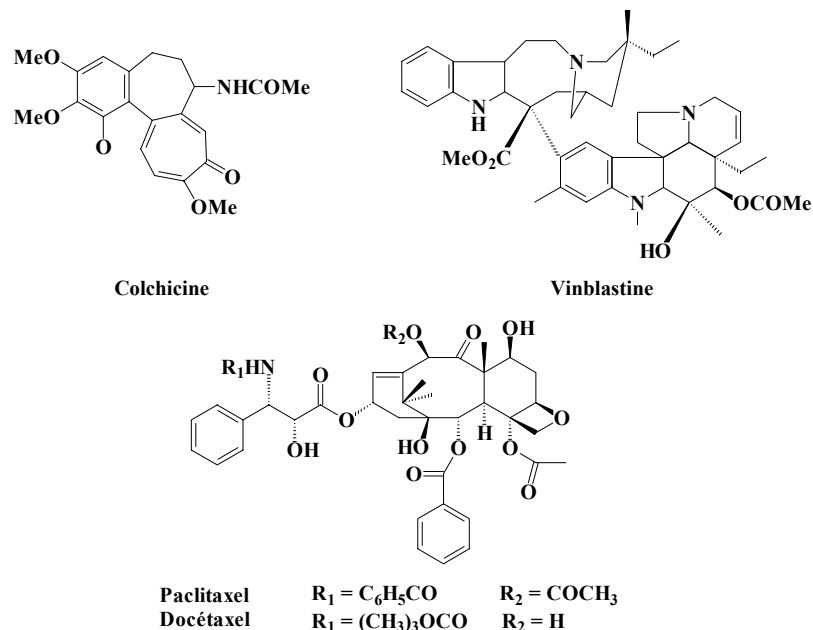


Schéma 1.4 : Les agents antimétabolites.

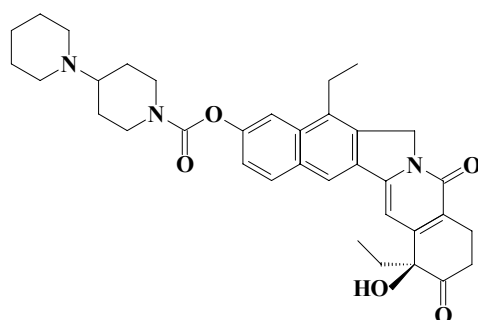
I.2.3. les agents agissant principalement au niveau de l'ADN

Les agents agissant principalement au niveau de l'ADN peuvent être classés selon leur mode d'action, en alkylants, intercalants, inhibiteurs des topoisomérases I et II. Ils agissent sur la duplication ou la transcription de l'ADN ou encore cassent celui-ci (scindants).

I.2.3.1. Les inhibiteurs de la topoisomérase I et II⁷⁷

Les topoisomérases I et II sont des enzymes indispensables pour la réplication de l'ADN. La topoisomérase I permet le clivage d'un brin d'ADN au niveau de la liaison phosphodiester, puis assure sa religation. L'inhibition de cette enzyme empêche la reconstitution du brin d'ADN après clivage. La coupure ainsi maintenue de l'ADN interromp le cycle de la division cellulaire et conduit à sa mort. Un exemple de ces inhibiteurs est l'irinocétan (schéma 1.5). Ces produits sont relativement nouveaux, assez toxiques et leur place réelle dans la panoplie thérapeutique n'est pas encore parfaitement définie.

⁷⁷ Kirkiacharian, S. Guidede la Chimie Thérapeutique, Ellipse : Paris, 1996, p 519-550.

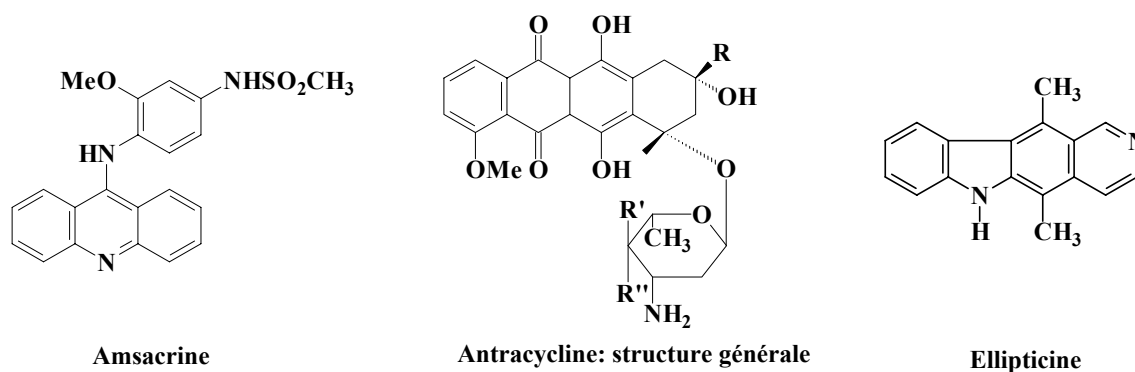


Irinocétan

Schéma 1.5 : Exemple d'inhibiteur de la topoisomérase I.

I.2.3.2. Les agents intercalants

Ce sont des produits polycycliques plans, qui inhibent la réplication de l'ADN en s'intercalant entre deux paires de bases de la double hélice d'ADN : ils provoquent ainsi des modifications de structure inhibant la transcription et la réplication de l'ADN. Il existe deux types d'agents intercalants : les composés tricycliques comme l'amsacrine et les composés tétracycliques comme les antracyclines et l'ellipticine⁷⁸ (schéma 1.6).



Amsacrine

Antracycline: structure générale

Ellipticine

Schéma 1.6 : Exemple d'agents intercalants.

I.2.3.3. Les agents alkylants

On appelle alcoylant ou alkylant un composé capable d'introduire une ou plusieurs chaînes alkyles dans une molécule. Ce sont les substances les mieux connues et les plus anciennement utilisées. Capables de se fixer à de nombreux substrats nucléophiles (groupements phosphates, hydroxyles, carboxyles, amines, sulfures, etc...); ils possèdent

⁷⁸ Liu, L. F.; Row, T. C.; Yang, L.; *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 9182.

habituellement deux fonctions alkylantes (ils sont bifonctionnels). Ces deux groupements réactifs se fixent sur l'ADN et forment des ponts intracaténaux entre deux guanines adjacentes sur le même brin d'ADN. Ces ponts peuvent aussi être intercaténaux, entre deux guanines situées presque face à face sur deux brins opposés de l'ADN, bloquant ainsi la réplication de l'ADN.

Les agents alkylants provoquent aussi des cassures dans la chaîne d'ADN et des pontages ADN-protéines. Les agents alkylants les plus utilisés sont les nitroso-urées, les sels de platine et les dérivés de la "moutarde à l'azote" qui font l'objet de ce travail.

I.2.3.3.1. Les nitroso-urées

Composés alkylants bifonctionnels, les nitroso-urées se caractérisent par une réactivité chimique très importante, entraînant en milieu aqueux neutre une décomposition rapide en un groupe chloroéthyle à fonction alkylante et un isocyanate, agissant par carbamoylation des protéines. On distingue trois familles de nitrosourées : les chloroéthyl-nitrosourées, les nitrosourées ayant un radical glucidique et les nitrosourées vectorisées, comme la fotémustine. Parmi les chloroéthyl-nitrosourées (schéma 1.7), les plus utilisées sont la carmustine et la fotémustine.

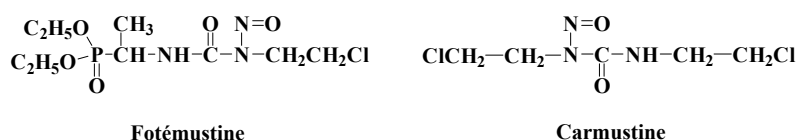
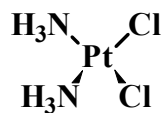


Schéma 1.7 : Exemple de nitroso-urées.

I.2.3.3.2. Les sels de platine

Le cisplatine ou cisplatine (schéma 1.8), utilisable uniquement par voie veineuse, est l'agent majeur de la chimiothérapie des tumeurs solides. Il a une action homologue à celle des moutardes azotées, en induisant des liaisons inter- et intracaténaux dans l'ADN et des ponts ADN-protéines. Il possède également une action intercalante et inhibe la réparation de l'ADN.



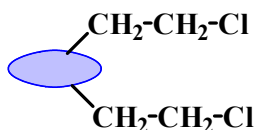
Cisplatine

Schéma 1.8 : Exemple de sels de platine.

En dépit des progrès réalisés, le cancer reste un problème de santé majeur, aussi l'élaboration de nouveaux médicaments, plus sélectifs et moins toxiques, demeure donc une priorité. Un grand nombre de ces médicaments est issu de produits naturels et agit au cours des différentes phases de la réplication cellulaire, par exemple sur le patrimoine génétique (ADN, ARN) et/ou ses enzymes associées.

I.2.3.3.3. Les dérivés de la moutarde à l'azote

La structure des dérivés de la moutarde à l'azote est assez commune et peut être schématisée comme ci-dessous.



Au cours de ce travail nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ce type d'anticancéreux. Nos efforts se sont orientés vers l'élaboration d'agents alkylants, analogues de la chlorméthine.

I.3. Généralités sur la chlorméthine

Le premier agent anticancéreux a été découvert accidentellement, du fait des propriétés leucopéniantes d'un gaz de combat : le gaz moutarde (schéma 1.9) échappé d'un navire américain en 1942, lors du bombardement de Bari.

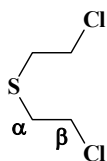


Schéma 1.9 : Sulfure de bis(chloroéthyl)amine ou "gaz moutarde" ou ypérite.

L'ypérite est d'une part, trop toxique par ses propriétés vésicantes et, d'autre part, très peu soluble dans l'eau. On a alors essayé d'améliorer la molécule en remplaçant le soufre par de l'azote méthylé pour obtenir la chlorméthine (schéma 1.10).

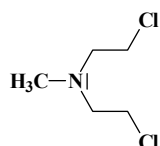
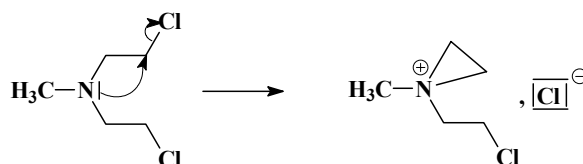


Schéma 1.10 : Chlorméthine.

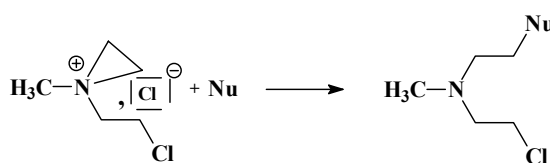
Ce produit constitue le représentant de base de la famille des agents alkylants. La chlorméthine ou "Moutarde à l'azote" est un médicament utilisé dans le traitement de différentes formes de cancers (cancer des poumons, des ovaires, leucémie lymphoïde chronique, et plus spécialement la maladie de Hodgkin). Cette molécule modifie la structure de l'ADN empêchant ainsi la division cellulaire.

I.3.1. Mécanisme d'action dans l'organisme

La chlorméthine est stable à pH acide, mais s'il augmente, le substrat apparaît dans l'organisme sous sa forme basique neutre. Sous cette forme, le produit subit une réaction d'élimination spontanée du chlore (le doublet de l'azote se rabat sur le carbone électrophile avec départ du chlore).

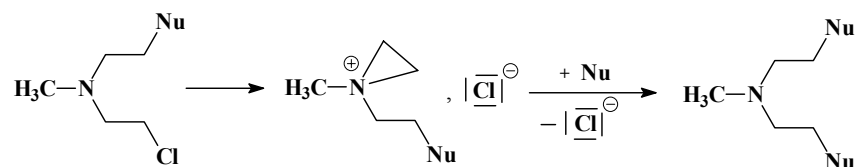


On a donc une substitution nucléophile intramoléculaire qui aboutit à un composé cyclisé cationique. Cette structure est appelée éthylène-imonium. C'est cette forme qui représente le véritable intermédiaire actif. Ce dernier s'est avéré extrêmement réactif vis-à-vis de toute une série de centres nucléophiles (Nu).



Il y a réouverture du cycle et fixation du centre nucléophile. Comme on le voit, le résultat de cet ensemble de réactions est d'aboutir au remplacement du chlore par une série de substrats à

propriétés nucléophiles (-SH, -OH, -NH₂...). Il est intéressant de noter que cette réaction peut se poursuivre avec la deuxième chaîne.



On a donc greffé deux chaînes alkyles sur deux centres nucléophiles, qui est à l'origine de cette dénomination d'agents alkylants.

En milieu biologique l'alkylation intervient essentiellement au moment de la réplication de l'ADN, quand les deux brins sont séparés et exposent ainsi les sites d'intérêt à l'action alkylante. De la sorte les deux groupements alkylants⁷⁹ peuvent réagir, avec par exemple l'azote en position 7 de la guanine de la chaîne d'ADN, ce qui revient à rattacher les deux brins de l'ADN en formant un pont intercaténaire, empêchant de la sorte que ceux-ci ne se désenroulent lors de la transcription ou de la réplication (schéma 1.11).

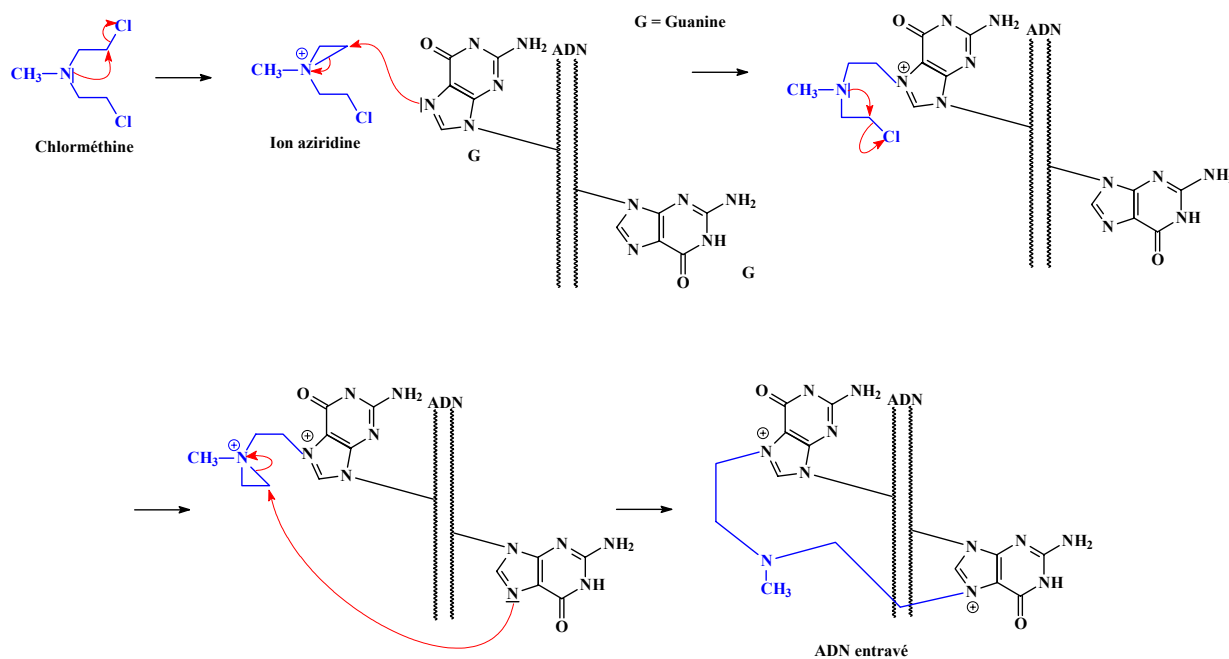


Schéma 1.11 : Alkylation de l'ADN par la chlorméthine.

L'agent alkylant peut aussi se fixer sur l'ADN et former des ponts intracaténaires entre deux guanines adjacentes sur le même brin d'ADN. Une telle fixation revient à masquer cette partie de l'ADN, et donc à empêcher l'accès des enzymes indispensables au bon fonctionnement de l'ADN (schéma 1.12).

⁷⁹ Graham L. Patrick, *Chimie pharmaceutique*, De Boeck, 2003, 128-132.

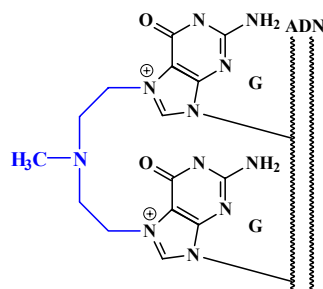


Schéma 1.12 : Autre alternative d'alkylation de l'ADN par la chlorméthine.

Cependant ce produit en plus de son action vésicante et de sa toxicité élevée pour la moelle osseuse réalise une alkylation qui n'a rien de spécifique. En effet sa forme éthylène-imonium attaque toute une série de cellules. Elle se fixe sur les protéines plasmatiques, sur les éléments figurés du sang, elle diffuse dans les tissus sains. Finalement, il n'y a qu'une infime fraction qui arrive au tissu cancéreux, pour y réaliser l'alkylation recherchée. C'est pourquoi les scientifiques ont orienté leurs recherches vers des dérivés dénués d'action vésicante et possédant une spécificité d'action aussi développée que possible vis-à-vis des cellules cancéreuses.

II. OBJET DU TRAVAIL

L'objet de la deuxième partie de ce travail est la synthèse d'agents alkylants en utilisant une base pyrimidique comme synthon naturel (schéma 1.13). La thymine, par exemple, est l'une des quatre bases azotées qui servent de " lettre " au code génétique, c'est une molécule naturelle sur laquelle peut être greffée le groupement chloroéthyle au niveau des atomes d'azote. Nous avons synthétisé les composés suivants :

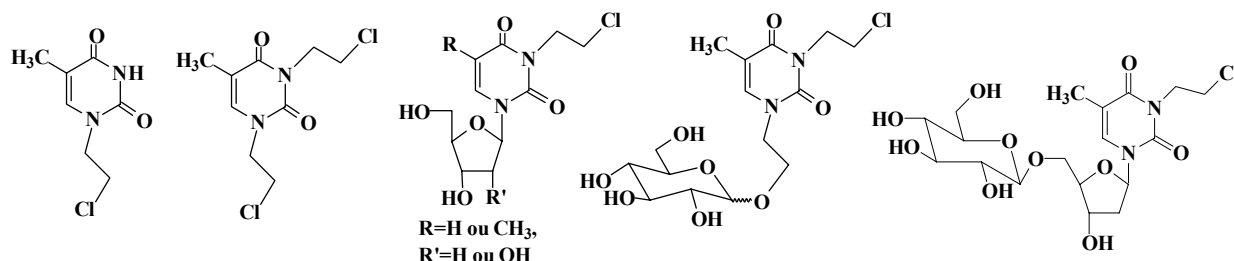


Schéma 1.13: Agents alkylants.

L'activité anticancéreuse de certains de ces composés a été évaluée sur des lignées cancéreuses par le Professeur Michel Kraemer au Laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire, UPRES 2360, UFR-SMBH, Université Paris XIII.

CHAPITRE II

SYNTHESE D'AGENTS ALKYLANTS

SYNTHÈSE D'AGENTS ALKYLANTS

I. INTRODUCTION

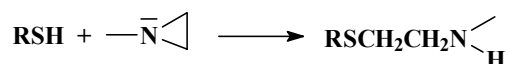
Puisque le véritable réactif d'attaque biologique n'est pas la chlorméthine comme telle, mais bien le noyau éthylène-imonium, un premier type de développement a donné des produits contenant cette structure dès le départ.



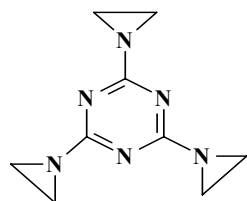
On a dès lors synthétisé des molécules renfermant le cycle aziridine.



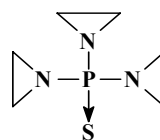
Le mécanisme d'action d'un composé à centre nucléophile R-S-H est représenté sur le schéma :



On obtient donc un produit où l'on a greffé une chaîne alkyle β -amino-éthyle. Nous en retiendrons deux qui sont le triéthylène mélanine (T.E.M.) et le THIOTEPA⁸⁰ (schéma 2.1).



Tris-(éthylène-imino)-1,3,5 s-triazine
Triéthylène mélanine (T.E.M)



Sulfure de triazirinylphosphine
Triéthylène thiophosphoramide
THIOTEPA

Schéma 2.1: Triéthylène mélanine et Triéthylène thiophosphoramide

Leur toxicité est moindre, parce que le noyau aziridinique est moins réactionnel que la structure éthylène-imonium.

Un deuxième type de développement a consisté à synthétiser des molécules qui renferment à l'état latent, les formes potentiellement actives et qui ne font apparaître cette

⁸⁰ Schell, R. F.; Hall, B. E.; *Surgery, gynecology & obstetrics*, 1958, **106** (4), 459-65.

activité qu'à l'endroit voulu (au niveau du tissu cancéreux). Une réussite est le cyclophosphamide⁸¹ (schéma 2.2).

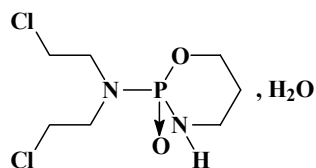


Schéma 2.2 : Cyclophosphamide (Eudoxan).

Comme tel, le produit n'a aucune activité alkylante. En effet le caractère nucléophile de l'azote est ici très diminué, car ce dernier est lié au radical phosphoré possédant un pouvoir attracteur. Le doublet de l'azote cesse alors d'être disponible pour la cyclisation menant à l'intermédiaire éthylène-imonium.

Cependant, par hydrolyse, ou sous l'action dans l'organisme d'enzymes, les phosphoramidases (schéma 2.3) conduisent à la bis(β -chloroéthyl)amine⁸² qui peut entraîner des alkylations.

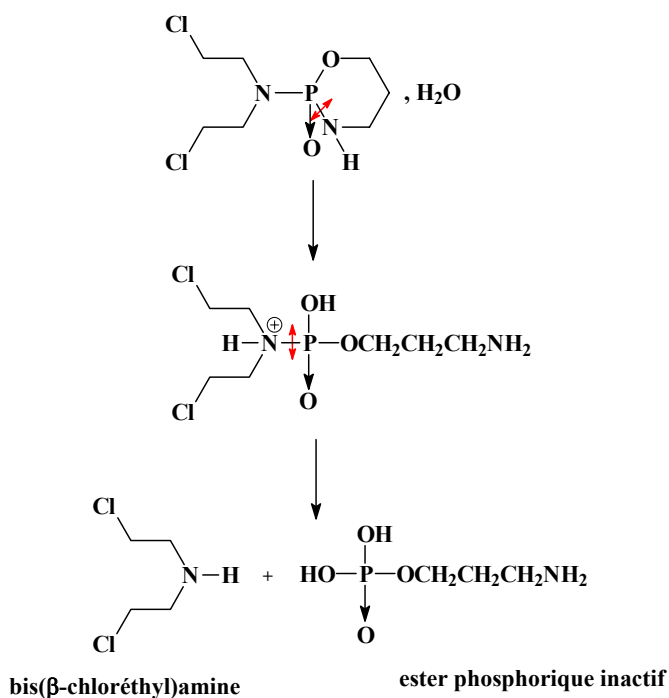


Schéma 2.3 : Métabolisme du cyclophosphamide

Ce produit est efficace dans les lymphopaties chroniques et plus que les produits précédents, contre divers cancers épithéliaux, notamment celui de l'ovaire. Il est bien toléré et moins toxiques pour la moelle osseuse.

⁸¹ Br J Haematol ; *Annals of Internal Medicine*; 1998; **103**; 678-683.

⁸² Jacquillat,C.; Auclerc, G.; Duprez-Curely, J-P.; *Nouv. Presse Med.*, 1979, **8**, 2591-2595.

Un troisième type de développement consiste à greffer le groupe actif bis-(β -chloréthyl)amine soit sur un support aromatique, soit sur des molécules prises parmi les produits biologiques.

L'un des composés les plus intéressants de la première série est le chlorambucil⁸³ (schéma 2.4).

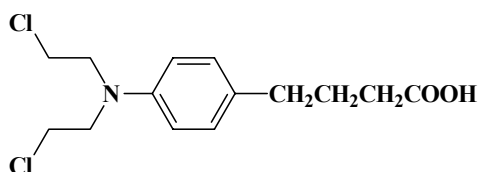
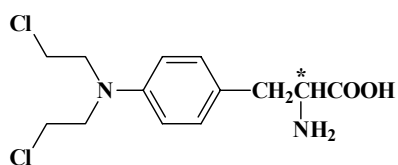


Schéma 2.4 : Acide [[bis-(β -chloroéthyl)amino]-4-phényl]butyrique
(chlorambucil ou chloraminophène)

Ici le noyau aromatique aura tendance à entraîner dans son système de résonance les atomes présentant des doublets libres. Par conséquent, le doublet de l'azote devient de moins en moins disponible pour le phénomène de cyclisation. On diminue, donc, la vitesse de formation de l'ion éthylène-imonium, ce qui entraîne une diminution de la réactivité du produit. Ceci se traduit par un meilleur effet pharmacologique.

On a constaté que le produit de loin le plus actif est celui qui correspond à l'isomère L de la phénylalanine (le melphalan) (schéma 2.5). La forme racémique est utilisée sous le nom de sarcolysine⁸⁴.



[bis-(β -chloroéthyl)amino]-4-phénylalanine

Schéma 2.5 : [bis-(β -chloroéthyl)amino]-4-phénylalanine ou Melphalan.

⁸³ a) J. L. Everett; J. J. Roberts; W. C. J. Ross, *J. Chem. Soc.*, 1953, 2386.

b) A. McLean; A. D. Newell; G. Baker; T. Connors, *Biochem. Pharmacol.*, 1980, **29**, 2039.

⁸⁴ Larionov, L. F.; Shkodinskaya, E. N.; Vasina, O. S.; Khokhlov, A. S.; Trusheikina, V. I., 1957

II. SYNTHÈSES

II.1. Synthèse de chloroéthylthymine

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la synthèse de dérivés de la thymine portant une ou deux chaînes chloroéthyles (schéma 2.6).

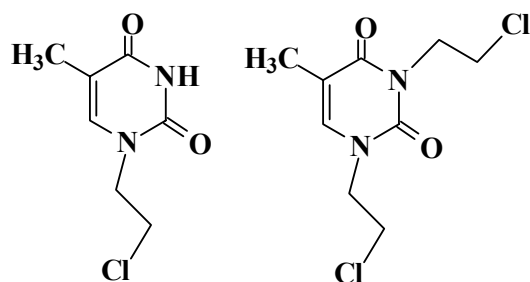


Schéma 2.6 : Structure des composés chloroalkylés

La méthode la plus simple pour l'obtention de la bis(chloroéthyl)thymine est l'alkylation directe avec le 1,2-dichloroéthane mais Nawrot et coll.⁸⁵ ont montré que la réaction d'alkylation de la thymine avec le 1,2-dibromoéthane en présence de K_2CO_3 dans le DMF a conduit à un mélange de plusieurs composés (schéma 2.7).

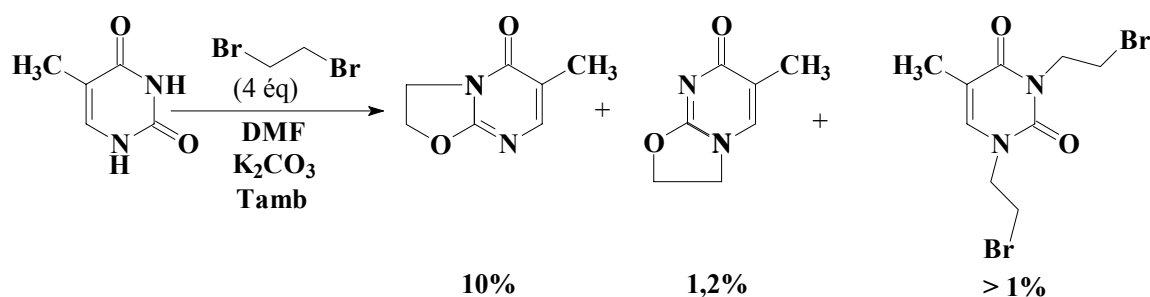


Schéma 2.7 : Réaction d'alkylation selon Nawrot et coll.

Nous avons alors opté pour une stratégie en trois étapes (schéma 2.8). Tout d'abord l'alkylation par l'acétate de bromoéthyle, suivie de la déprotection et enfin la substitution de l'hydroxyle par un chlore.

⁸⁵ B. Nawrot, O. Michalak, S. Olejniczak, M.W. Wieczorek, T. Lis, W.J. Stec, *Tetrahedron Letters*, 2001, **57**, 3979-3985.

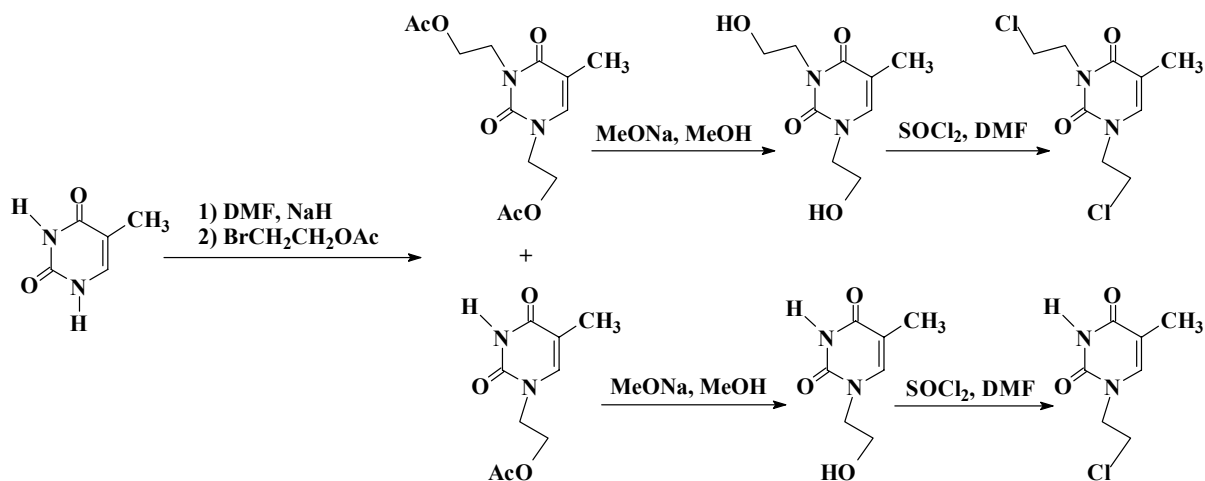


Schéma 2.8 : Schéma synthétique.

II.1.1. Alkylation de la thymine

Pour réaliser l'alkylation, nous avons choisi la méthode de Pedersen et coll.⁸⁶ qui utilise des halogénures d'alkyles. La thymine non protégée réagit d'abord avec l'hydrure de sodium puis le dérivé halogéné est additionné. Une étude de l'influence de différents paramètres tels que le mode d'activation, la longueur de la chaîne ou la nature du dérivé halogéné, sur la sélectivité a été conduite dans notre laboratoire^{87,88} afin de déterminer les conditions optimales pour obtenir le produit de monoalkylation en position 1.

Dans notre cas, compte tenu de la finalité de départ nous nous sommes attachés à la mise au point d'un système permettant d'obtenir majoritairement le produit résultant de la double alkylation en position 1 et 3. Cette étude a été réalisée en utilisant l'activation par irradiation micro-onde^{89,90}

⁸⁶ A.E.S. Abdel-Megied ; M.S. Motawia ; E.B. Pedersen ; C.M. Nielsen, *Heterocycles*, 1992, **34**, 713.

⁸⁷ P. Grandjean, R. Benhaddou, R. Granet, P. Krausz, *Tetrahedron Letters*, 1997, **38** (35), 6185-6188.

⁸⁸ V. Roy; R. Zerrouki; P. Krausz; S. Schmidt; A. M. Aubertin, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2004, **23**, 1625.

⁸⁹ A. Loupy, *Comptes Rendus Chimie*, 2004, **7** (2), 103-112.

⁹⁰ C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 6250-6284.

II.1.1.1. Synthèse par activation micro-onde

Nous avons utilisé dans un premier temps un four micro-onde domestique pour réaliser la dialkylation de la thymine par l'acétate de bromoéthyle (schéma 2.9).

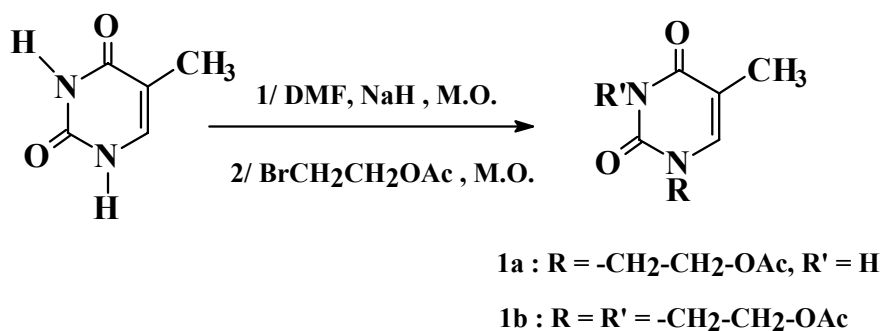


Schéma 2.9 : Alkylation de la thymine.

La thymine solubilisée dans le diméthylformamide anhydre est additionnée à l'hydrure de sodium et la solution est activée dans un four micro-onde domestique. L'acétate de bromoéthyle est alors ajouté et le mélange activé de nouveau. Après traitement et purification par chromatographie sur colonne, nous avons obtenu le composé N-1,N-3-dialkylé **1b** avec un rendement de 46 % et le composé N-1-alkylé **1a** avec un rendement de 27 % (tableau 2.1). L'utilisation d'un excès de base (NaH) et d'agent alkylant ou l'augmentation du temps d'activation n'a pas permis d'améliorer ce résultat.

Pour tenter d'optimiser ce système, tant du point de vue du rendement que de la cinétique de formation de la thymine disubstituée, nous avons utilisé ensuite un four micro-onde de laboratoire (voir détails dans la partie expérimentale). Celui-ci nous permettant de fixer la température et la puissance. Les essais les plus significatifs sont présentés dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Activation micro-onde du système thymine/acétate de bromoéthyle/NaH/DMF

	NaH (équiv.)	R-Br (équiv.)	Temps d'activation		1a (%)	1b (%)
			1 ^{ère} activation	2 ^{ème} activation		
Four Micro-ondes domestique	2	2,3	5 X 1 min	5 X 1 min	27	46
Four Micro-ondes de Laboratoire^{(a), (b)}	2	2,3	5 X 2min (P =100W, T=100°C)	10 X 2 min (P =100W, T=100°C)	26	24
	3	3	1 X 5min (P =200W, T=150°C)	1 X 5 min (P =200W, T =150°C)	5,5	62
	4	4	2 X 7min (P =150W, T=150°C)	2 X 7 min (P =150W, T =150°C)	17	40

(a) P = puissance, T = température

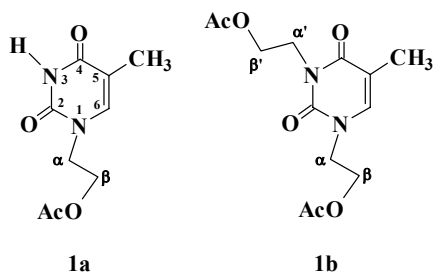
(b) Voir caractéristiques de l'appareil en partie expérimentale

L'augmentation de la puissance et de la température favorise la formation du composé dialkylé. Les différents essais réalisés montrent un rendement optimal avec 3 équivalents d'hydruure de sodium et d'agent alkylant et une puissance de 200 W à une température de 150 °C.

La structure des composés mono- et dialkylés **1a** et **1b** a été déterminée par spectroscopie IR et RMN. Les spectres IR de ces deux composés présentent une bande à 1740 cm^{-1} correspondant au carbonyle du groupement acétyle et à 1700 cm^{-1} un signal des carbonyles de la thymine. Les signaux correspondant aux CH de la chaîne alkyle se trouvent à 2960 cm^{-1} et ceux correspondant à la double liaison C=C à 1670 cm^{-1} . Dans le cas du composé **1a**, le spectre présente une bande supplémentaire à 3160 cm^{-1} correspondant à la vibration NH.

Le spectre RMN du proton du composé **1b** (tableau 2.2) présente un quadruplet à 6,97 ppm correspondant au proton H-6 et un doublet à 1,93 ppm représentant le groupement méthyle. Les protons aliphatiques des bras résonnent entre 3,96 et 4,31 ppm. Le spectre du composé **1a** présente en plus un singulet à 8,54 ppm correspondant au proton H-3.

Tableau 2.2 : RMN ^1H (CDCl_3) des produits d'alkylation **1a** et **1b**.



composé		1a δ ppm, fig (J Hz)	1b δ ppm, fig (J Hz)
Thymine	H-3	8,54, s	-
	H-6	6,98, q (1,1)	6,97, q (1,0)
	CH ₃	1,93, d (1,1)	1,93, d (1,0)
<u>Bras</u>	H- α	3,96, t (5,3)	3,96, t (4,8)
	H- α'	-	4,25, t (5,3)
	H- β	4,31, t (5,3)	4,31, m
	H- β'	-	4,31, m
	O-CO- <u>CH₃</u>	2,07, s	2,07, s
	O-CO- <u>CH₃</u>	-	2,01, s

II.1.2. Réaction de désacétylation

Les produits résultants de la mono- et dialkylation de la thymine sont désacétylés avec le système classique MeONa/MeOH (schéma 2.10).

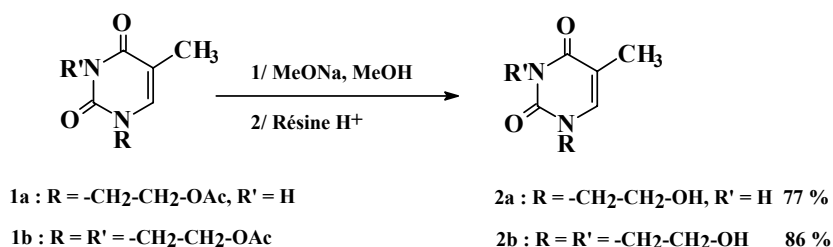


Schéma 2.10 : Réactions de désacétylation.

Après deux heures de réaction, la CCM montre la disparition totale du substrat de départ et la formation d'un nouveau produit. Le mélange est alors neutralisé avec de la résine H⁺, filtré, puis le solvant évaporé. Les composés **2a** et **2b**, obtenus avec des rendements respectifs de 77 et 86 %, sont utilisés tels quels pour l'étape suivante.

Les spectres IR de ces deux composés montrent la disparition de la bande des carbonyles des groupements acétyles, et présente une bande large à 3480 cm⁻¹ correspondant à la vibration OH. Dans le cas du composé **2a** on observe toujours la bande large à 3160 cm⁻¹ correspondant à la vibration NH.

La RMN du proton montre la disparition des protons acétyles (tableau 2.3). On observe un quadruplet à 7,39 ppm (proton H-6) et à 1,9 ppm le doublet du groupement méthyle. Les protons aliphatiques résonnent entre 3,7 et 4,1 ppm.

Tableau 2.3 : RMN¹H (CDCl₃) des produits de désacétylation **2a** et **2b**.

Composé	2a δ ppm, fig (J Hz)	2b δ ppm, fig (J Hz)
<u>Thymine</u> H-3	8,55, s	-
H-6	7,39, q (1,0)	7,39, q (1,0)
CH ₃	1,86, d (1,0)	1,89, d (1,0)
<u>Bras</u> H-α	3,81, t (4,8)	3,85, t (5,1)
H-α'	-	4,11, t (6,2)
H-β	3,74, t (4,8)	3,75, t (5,1)
H-β'	-	3,71, t (6,2)

II.1.3. Réaction de chloration

Les composés résultants des déprotections sont chlorés dans le DMF en présence de 2,5 équivalents de chlorure de thionyle par groupement hydroxyle (schéma 2.11).

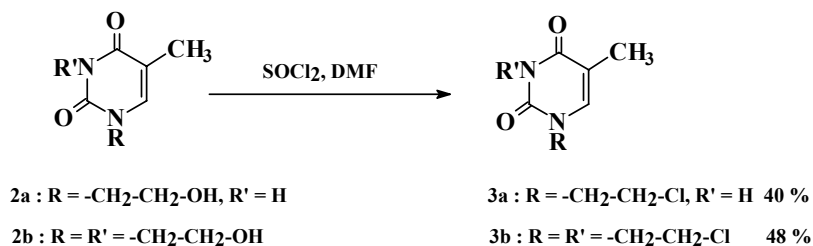


Schéma 2.11 : Réactions de chloration.

Après une heure de réaction, la CCM montre la disparition totale du produit de départ et la formation d'un composé majoritaire avec des rendements de 40 et 48 %, respectivement pour **3a** et **3b**. Cependant, après une heure de réaction on observe l'apparition de nombreux produits secondaires. Leur structure n'a pu être déterminée. Le mélange est alors traité et les composés attendus sont isolés avec des rendements respectifs de 40 et 48 %.

Les spectres IR montrent bien la disparition des groupements hydroxyles. Ils présentent une bande à 654 cm⁻¹ correspondant à la vibration C-Cl, à 1700 cm⁻¹ un signal des carbonyles de la thymine. Les signaux des CH de la chaîne alkyle se trouvent à 2960 cm⁻¹ et ceux de la double liaison C=C à 1670 cm⁻¹. Dans le cas du composé **3a** on observe une bande à 3160 cm⁻¹ correspondant à la vibration NH.

Les spectres RMN du proton (tableau 2.4) sont semblables à ceux des composés hydroxylés.

Tableau 2.4 : RMN¹H (CDCl₃ pour **3a** et CD₃OD pour **3b**) des produits de chloration.

composé	3a δ ppm, fig (J Hz)	3b δ ppm, fig (J Hz)
<u>Thymine</u> H-3	8,07, s	-
H-6	7,44, q (1,0)	7,07, q (1,1)
CH ₃	1,87, d (1,0)	1,95, d (1,1)
<u>Bras</u> H-α	4,04, t (5,9)	4,04, t (5,5)
H-α'	-	4,33, t (6,7)
H-β	3,81, t (5,9)	3,81, t (5,5)
H-β'	-	3,73, t (6,7)

En spectrométrie de masse la fixation du chlore est confirmée par la présence de deux isotopes. Pour le composé **3a**, elle montre le pic quasi moléculaire MH^+ m/z 189 et m/z 191 et le pic correspondant à MNH_4^+ m/z 206 et m/z 208 ainsi que sa dimérisation dans la source du spectromètre de masse (structure non covalente) MNH_4^+M m/z 377 et 379. Pour le composé **3b** on observe également le pic MH^+ m/z 251, m/z 253 et m/z 255 et le pic MNH_4^+ m/z 268, m/z 270 et m/z 272.

II.2. Synthèse d'analogues de nucléosides portant une chaîne chloroéthyle

Différents auteurs⁹¹ ont montré qu'un analogue de nucleoside portant une chaîne chloroéthyle, la 5-(2-chloroéthyl)-2'-désoxyuridine (CEDU) (schéma 2.13) présente une activité antivirale et est utilisée pour le traitement de l'herpes simplex. Ce composé entraîne des mutations dans l'appariement des bases G/C et A/T.

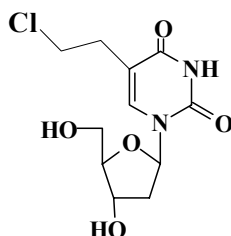


Schéma 2.13 : Structure de la 5-(2-chloroéthyl)-2'-désoxyuridine (CEDU).

Nous avons alors poursuivi ce travail par la synthèse d'analogues de nucléosides portant une chaîne chloroéthyle **4**, **7** et **8** (schéma 2.12). Ceux-ci, dont la structure est plus éloignée de la chlorméthine originale, dérivent de la 2'-hydroxythymidine pour le composé **7**, de l'uridine pour le composé **8** et de la thymidine pour le composé **4**.

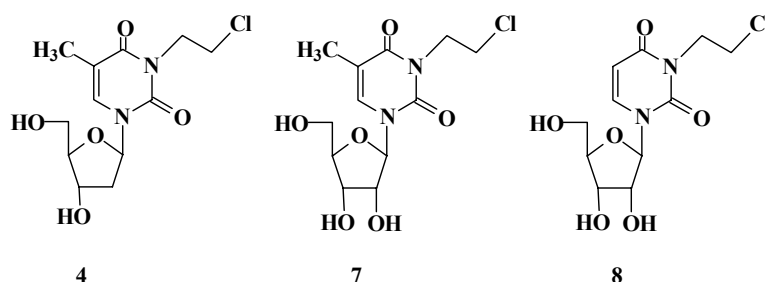


Schéma 2.12 : Analogues de nucléosides portant une chaîne chloroéthyle.

⁹¹ a) F. Staedtler, W. Suter, H-J. Martus, *Mutation Research*, 2004, **568**, 211-220.

b) W. Suter, ; U. Plappert-Helbig, ; S. Glowienke, ; F. Poetter-Locher, F. Staedtler, R. Racine, ; H-J. Martus, *Mutation Research*, 2004, **568**, 195-209.

c) E. De Clercq; B. Rosenwirth, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1985, **28**, 246-251.

II.2.1. Synthèse de l'analogue portant le 2'-désoxyribose

Nous avons tout d'abord préparé un analogue chloré de nucléoside portant le 2'-désoxyribose comme partie glucidique. Dans ce cas, la thymidine étant commerciale nous l'avons directement alkylée. Celle-ci est mise en solution dans le DMF, on ajoute par la suite du carbonate de potassium et du dichloroéthane en excès (schéma 2.14).

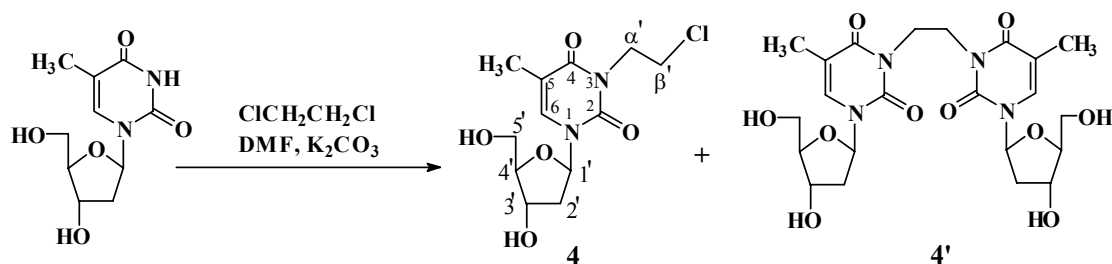


Schéma 2.14 : Alkylation de la thymidine.

Cette réaction étant très lente, un chauffage à 60°C a été utilisé pour accélérer la cinétique de la réaction. Après 7 heures de réaction l'analyse par CCM montre la formation d'un produit secondaire 4' résultant de la réaction du composé 4 et de la thymidine comme le montre le spectre RMN (voir partie expérimentale). L'utilisation de l'activation micro-ondes n'a pas donné d'amélioration (tableau 2.5).

Tableau 2.5 : N-3-alkylation de la thymidine

Mode d'activation	Temps de réaction	4 (%)	4' %
Chauffage classique	7 h	49	3
Activation micro-onde	20 min (P = 100W, T = 80°C)	42	10

La structure du composé 4 a été déterminée par RMN. Le spectre RMN ¹H montre que les protons H-α' et H-β' résonnent respectivement sous forme de double triplet et de triplet à 4,25 ppm et 3,71 ppm. On note également la présence de tous les protons du glucide ainsi que ceux correspondant à la thymine.

II.2.2. Synthèse de l'analogue portant le ribose

Nous avons ensuite synthétisé un analogue portant le ribose, avec le groupement chloroéthyle en position 3 de la thymine.

II.2.2.1. Stratégie de synthèse

On procède tout d'abord au couplage de la thymine et du D-ribose protégé puis à l'alkylation de l'azote en position 3 sur la thymine et enfin la déprotection du glucide conduit au composé attendu (schéma 2.15).

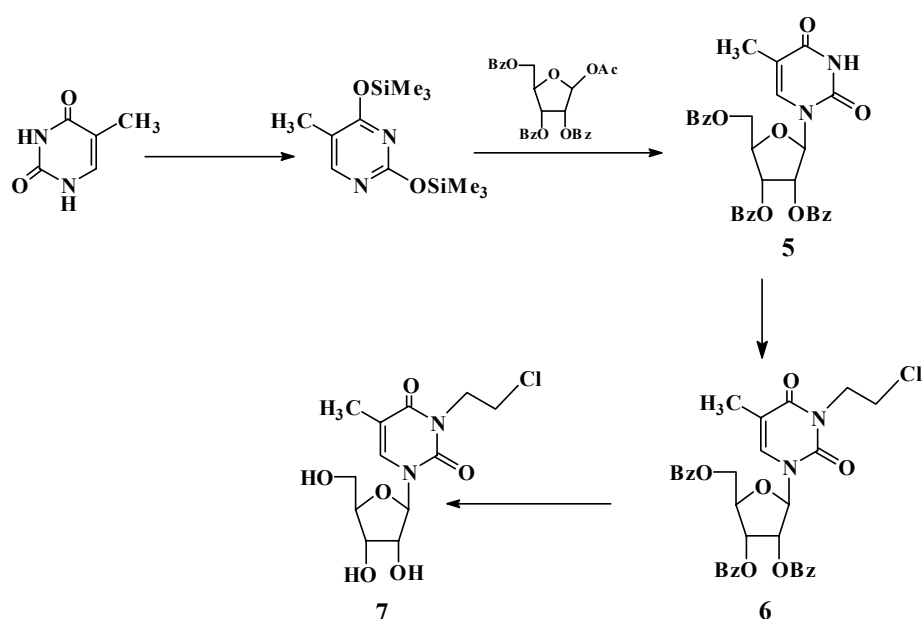


Schéma 2.15 : Schéma synthétique.

II.2.2.2. Couplage de la base et du glucide

Une des étapes clés de la synthèse des nucléosides est le couplage de la base et du glucide. Nous nous proposons tout d'abord de présenter un bref inventaire de quelques méthodes de couplage.

II.2.2.2.1. Méthode de Fischer

Fischer et Helferich⁹² ont réalisé la première synthèse de nucléosides en 1914, en utilisant le sel d'argent d'une base purique qu'ils ont fait réagir sur un bromoglucopyranose. Cette méthode a ensuite été utilisée par Todd et Coll.⁹³ en 1948 pour obtenir l'adénosine et la guanosine. En 1951, Davoll et Lowy⁹⁴ ont remplacé les sels d'argent des purines par des sels chloro-mercuriques. Les rendements ainsi obtenus sont meilleurs. Le mécanisme peut être décrit de la manière suivante (schéma 2.16) :

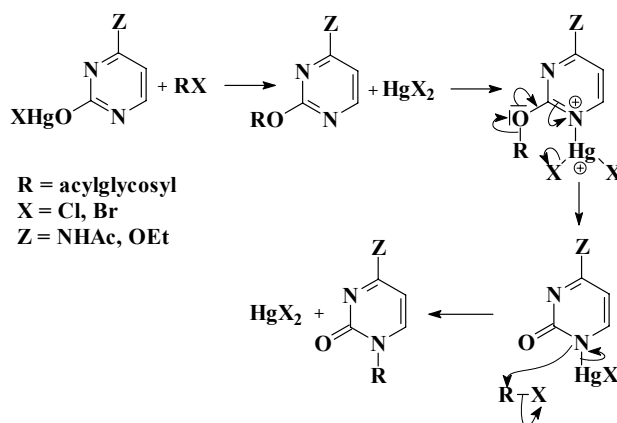


Schéma 2.16 : Formation de nucléosides par la méthode de Fischer.

Cependant ces sels de métaux lourds présentent l'inconvénient d'être difficiles à éliminer et sont sources de toxicité. Par ailleurs les furanoses halogénés sont peu stables.

II.2.2.2.2. Méthode de Hilbert et Johnson

Parallèlement à ces méthodes employant des sels de métaux lourds, Hilbert et Johnson⁹⁵ ont développé une procédure de couplage également appelée méthode de quaternisation. Elle est appliquée principalement pour la synthèse de nucléosides pyrimidiques. Elle s'effectue par condensation de 2,4-dialcoxypyrimidine sur des halogénures acétylés, selon le mécanisme suivant (schéma 2.17) :

⁹² E. Fischer, B. Helferich, *Chem. Ber.*, 1914, **47**, 210.

⁹³ J. Davoll, B. Lythgoe, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1948, 967.

⁹⁴ J. Davoll, B. A. Lowy, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 1650, J. J. Fox, N. Young, J. Davoll, G. B. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 2117.

⁹⁵ G. E. Hilbert, T. B. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1930, **52**, 2001.

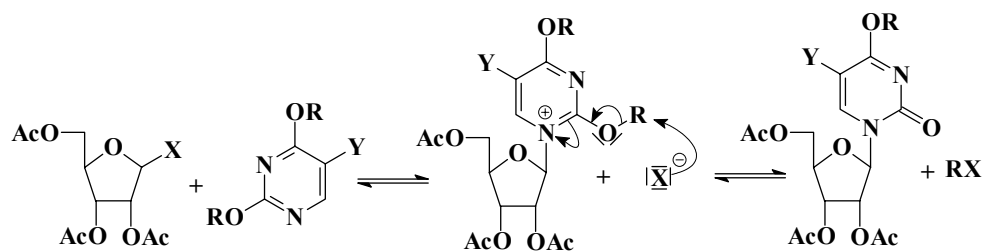


Schéma 2.17 : Formation de nucléosides par la méthode de Hilbert et Johnson.

Cette méthode donne des rendements variables qui sont influencés par plusieurs facteurs :

- la facilité de dissolution du sucre halogéné, favorisée par l'utilisation de solvants tels que l'acétonitrile ;
- l'aptitude du groupe alkyle R du sel quaternaire intermédiaire à subir l'attaque nucléophile de l'ion halogénure X^- ; il est possible dans certains cas d'utiliser un catalyseur tel que $HgBr_2$ qui, en se complexant avec le sel quaternaire, favorisera l'élimination du groupe R en position 2 ;
- l'électronégativité du substituant Y en position 5.

II.2.2.2.3. Méthode de Vorbrüggen

En remarquant que les catalyseurs de Friedel-Crafts permettent la conversion des 1-acyloxy-sucres acétylés en leurs dérivés 1-halogénés, Vorbrüggen et coll.⁹⁶ ont tenté la réaction avec des pyrimidines et des sucres *peracétylés* ou 1-*O*-acétylé-2,3,5-tri-*O*-benzoylés. La réaction est réalisée à température ambiante dans un solvant polaire (1,2-dichloroéthane, acétonitrile ou mélange des deux en proportions variables). Après divers essais avec différents catalyseurs de Friedel et Crafts ($ZnCl_2$, $TiCl_4$, $AlCl_3$, $SnCl_4$ ou $BF_3 \cdot Et_2O$), il apparaît que la combinaison 1,2-dichloroéthane/ $SnCl_4$ donne de bons résultats. Ce solvant ainsi que l'acétonitrile sont d'utilisation aisée car ils sont facilement purifiables et permettent un chauffage à plus de 70°C si nécessaire. Cependant l'emploi de l'un ou de l'autre engendre des modifications du comportement des réactions (temps, proportions des produits N-1 et N-3 substitués sur les bases pyrimidiques).

Le mécanisme de la réaction de glycosylation (schéma 2.18) met en jeu la participation du groupement en position 2 du sucre. Le groupement acétyle ou benzoyle

⁹⁶ U.Neidballa, N. Vorbrüggen, *J. Org. Chem.*, 1974, **39**, 3654-3668.

intervient pour former un intermédiaire « sucre-cation » cyclique qui encombre la face α . L'attaque nucléophile de la base silylée se fait alors préférentiellement sur la face β .

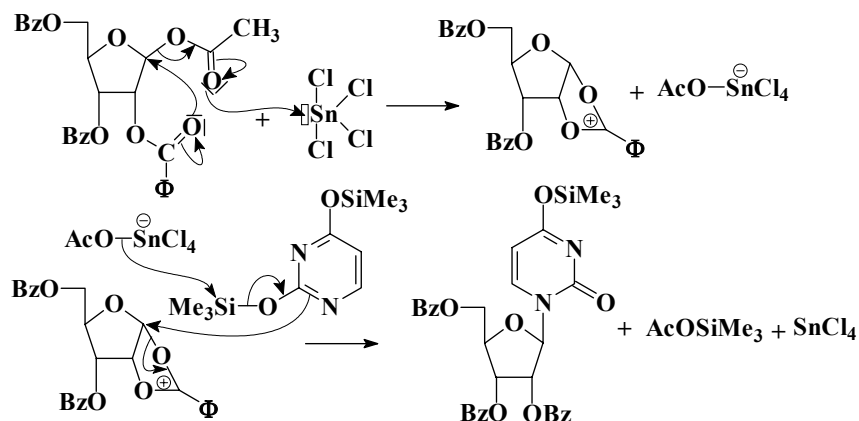


Schéma 2.18 : Formation de nucléosides par la méthode de Vorbrüggen.

La méthode de Vorbrüggen est devenue la plus fréquemment employée dans la synthèse des nucléosides en raison de ses nombreux avantages :

- la fixation du groupe TMS sur la base est très aisée ;
- le TMS s'élimine facilement en fin de réaction au cours du traitement ;
- les rendements obtenus sont élevés du fait de l'activation par des groupes TMS pour l'attaque nucléophile ;
- la possibilité d'utiliser des sucres 1-*O*-acétylés ou 1-*O*-méthylés plus stables et faciles d'accès.

II.2.2.2.4. Résultats et discussion

Pour réaliser le couplage de la thymine et du ribofuranose, nous avons opté pour la méthode de Vorbrüggen (schéma 2.19) qui, comme nous l'avons montré précédemment est d'un usage facile tout en minimisant le nombre de purifications.

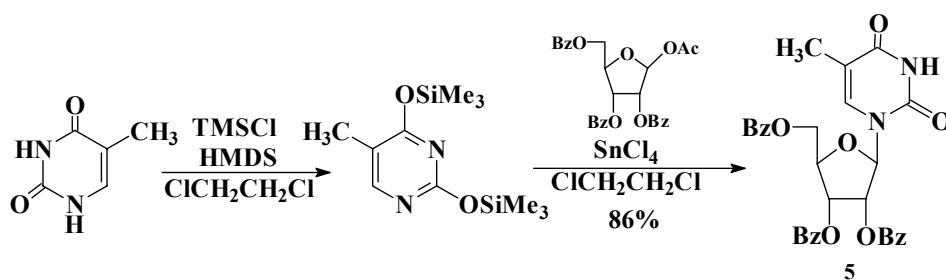


Schéma 2.19 : Réaction de couplage.

Nous avons tout d'abord réalisé la silylation de la thymine par un groupe triméthylsilyle, les agents silylants utilisés sont le 1,1,1,3,3,3-hexaméthyldisilazane (HMDS) et le chlorure de triméthylsilane (TMSCl). La silylation est réalisée dans le 1,2-dichloroéthane. Un excès de catalyseur sera utilisé pour le couplage afin d'éviter qu'il ne soit entièrement consommé par les restes des agents silylants.

La réaction de couplage est ensuite réalisée en introduisant le 1-*O*-acétyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl-β-D-ribofuranose, suivie du tétrachlorure d'étain, sous atmosphère d'argon. Après traitement et purification par chromatographie sur colonne, on obtient le produit de couplage avec un rendement de 86,5%.

Le spectre infrarouge montre, comme nous l'avons déjà observé sur les composés **1a**, **2a** et **3a**, la présence du groupement N-H de la thymine à 3186 cm^{-1} , ainsi que celle des C-H aromatiques vers 3065 cm^{-1} . Il présente les bandes des vibrations C=O du carbonyle de la thymine à 1694 cm^{-1} et du carbonyle des benzoyles à 1724 cm^{-1} , le signal de la vibration C=C se trouve, encore cette fois-là, à 1603 cm^{-1} .

Le spectre RMN du proton montre une non-équivalence des protons portés par le carbone 5' du ribofuranose, ils se présentent sous forme de doubles doublets correspondants d'une part à leur couplage avec le H-4' (qui est en plus couplé avec H-3') avec des constantes de 2,5 et 3,4 Hz, et d'autre part à leur couplage entre eux avec une forte constante de 12,1 Hz caractéristique des protons géminés. Le proton H-1' résonne sous forme de doublet à 6,3 ppm, le proton H-2' sous forme de triplet à 5,75 ppm, le proton H-3' sous forme de double doublet à 5,91 ppm et enfin le proton H-4' résonne sous forme d'un multiplet à 4,70 ppm. On note également la présence de tous les protons de la thymine.

II.2.2.3. Alkylation en position 3 de la thymine

La réaction d'alkylation du composé **5** est réalisée dans le DMF en présence de carbonate de potassium (K_2CO_3) et de 1,2-dichloroéthane en large excès⁹⁷ (schéma 2.20). Après les traitements habituels et une purification par chromatographie le produit **6** est isolé avec un rendement de 76 %.

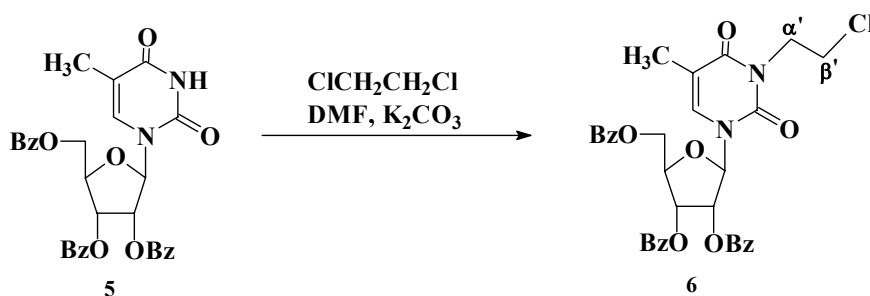


Schéma 2.20 : Alkylation en position 3 de la thymine.

Pour tenter d'améliorer les conditions expérimentales nous avons également effectué cette réaction par activation micro-onde (tableau 2.6).

Tableau 2.6 : N-3-alkylation du composé **5**

Mode d'activation	Temps de réaction	6 (%)
Chauffage classique	7 h	76
Activation micro-onde	20 min (P = 100W, T = 80°C)	70

L'activation micro-onde conduit à un résultat comparable à celui obtenu par chauffage classique avec cependant un temps de réaction beaucoup plus faible puisque l'on passe de 7 heures à 20 minutes. Une durée d'activation plus longue n'a pas permis d'optimiser ces résultats.

Le spectre RMN¹H montre la disparition du proton N-H et l'apparition des protons H- α' et H- β' de la chaîne alkyle. Ces derniers se présentent sous forme de multiplet à 4,26 ppm et 3,64 ppm. On note également la présence de tous les protons correspondant à la thymine, au glucide et aux groupements protecteurs.

⁹⁷ E. Ferrer, A. Schevchenko, R. Eritja, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2000, **8**, 291-297.

II.2.2.4. Déprotection du glucide

Le produit résultant de l'alkylation en position 3 de la thymine est déprotégé dans le méthanol en présence de résine basique OH⁻ (schéma 2.21), l'utilisation de méthylate de sodium comme précédemment pouvant conduire à une réaction de substitution nucléophile sur la chaîne chlorée.

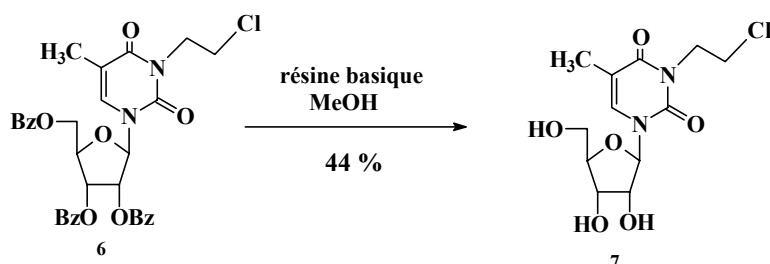


Schéma 2.21 : Réaction de déprotection du sucre.

Après cinq heures de réaction, on observe la disparition quasi-totale du produit de départ et la formation d'un produit majoritaire. La purification par chromatographie sur couche mince permet d'isoler le composé **7** avec un rendement de 44 %. Ce rendement relativement modeste est lié à la difficulté de purification de ces composés.

La structure du composé **7** a été déterminée par RMN du proton et confirmée par spectrométrie de masse. Le spectre RMN¹H montre la disparition des protons aromatiques. On remarque un blindage de tous les protons glucidiques. On note également la présence de tous les protons correspondant à la thymine. Le spectre de masse par ionisation chimique présente le pic moléculaire MH⁺ m/z 320.5 et m/z 322.5 en raison de la présence des deux isotopes du chlore, et également MNa⁺ m/z 343 et m/z 345, MK⁺ m/z 359 et m/z 361, MNa⁺M m/z 663 et m/z 665.

II.2.3. Synthèse de l'analogue à partir de l'uridine

Nous avons enfin préparé un troisième analogue chloré de nucléoside portant le ribose comme partie glucidique et l'uracile comme base. Dans ce cas, l'uridine étant commerciale nous l'avons directement alkylée. Celle-ci est mise en solution dans le DMF en présence de 5 équivalents de carbonate de potassium et d'un large excès de dichloroéthane (schéma 2.22).

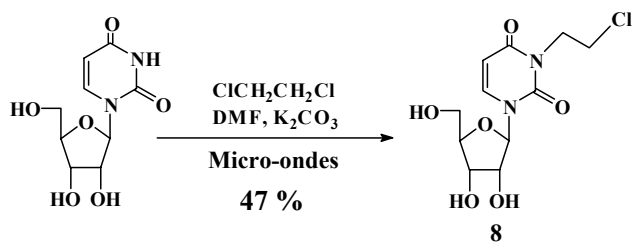


Schéma 2.22 : Alkylation de l'uridine.

Cette réaction est activée par irradiation micro-onde. Après 18 minutes d'activation, la réaction est arrêtée car, comme dans le cas de la thymidine, l'analyse par CCM montre la formation d'un dimère par réaction du composé **8** sur l'uridine. Après traitement et purification, le produit **8** est récupéré avec un rendement de 47 %, rendement comparable à celui obtenu avec la thymidine.

La structure du composé **8** a été déterminée par RMN. Le spectre RMN ^1H montre comme attendu une non-équivalence des protons portés par le carbone en position 5' du ribofuranose. Les protons H-5' se présentent sous forme de doubles doublets pour les deux correspondant d'une part à leur couplage avec le proton H-4' avec des constantes de 2,8 Hz, et d'autre part à leur couplage entre eux avec une forte constante de 12,3 Hz caractéristique des protons géminés. Le proton H-1' résonne sous forme de doublet à 5,91 ppm. Les protons H- α' et H- β' résonnent respectivement sous forme de double triplet et de triplet à 4,25 ppm et 3,72 ppm. On note également la présence de tous les protons du glucide ainsi que ceux correspondant à l'uridine.

II.3. Synthèse d'analogues de la chlorméthine glucosylés

Les progrès considérables de la chimiothérapie antitumorale durant ces dernières décennies reposent en grande partie sur les protocoles d'association de médicaments aux effets pharmacologiques complémentaires. Dans les combinaisons utilisées, les agents alkylants, dont la cible est, rappelons-le, le matériel génétique même de la cellule transformée, comptent parmi les plus efficaces mais sont aussi ceux dont les limites d'utilisation sont les plus sévères en raison de leurs effets secondaires. Les recherches sont donc actives pour améliorer l'index thérapeutique de ce type de composés. C'est dans cette perspective que nous nous sommes intéressés à la streptozocine (schéma 2.23). Cette molécule est une nitrosourée

substituée par un glucose. Par nature, elle a une activité carbamoylante qui est vectorisée sur le pancréas grâce à une glucosamine. En effet, la streptozocine est utilisée dans le traitement des tumeurs pancréatiques.

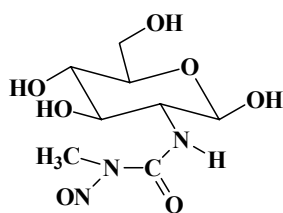


Schéma 2.23 : Streptozocine

C'est ainsi qu'il nous est paru intéressant de fixer un glucose sur les agents alkylants que nous avons synthétisés (schéma 2.24). Le glucose est reconnu pour son implication dans des phénomènes de reconnaissance cellulaire et pourrait, en particulier, servir de transporteur de l'agent alkylant jusqu'au pancréas.

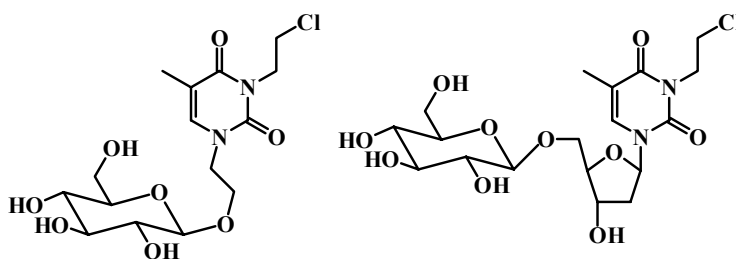


Schéma 2.24 : Analogues glucosylés.

A cet effet, nous avons étudié la réaction de *o*-glycosylation que nous avons réalisée sur la thymine hydroxyalkylée **2a** et sur la thymidine.

II.3.1. Réaction de *o*-glycosylation

Rappelons que la *o*-glycosylation est une réaction qui permet de modifier le carbone anomérique d'un glucide afin d'obtenir un hétéroside non réducteur comprenant le glucide et une partie non saccharidique appelée aglycone. Comme les dérivés glycosylés présentent un intérêt important en Chimie et en Biologie, leurs synthèses font l'objet d'une littérature très abondante. Nous nous proposons tout d'abord d'en présenter un bref inventaire.

II.3.1.1. Méthode de Fischer

La méthode de Fischer est la méthode de *o*-glycosylation⁹⁸ la plus ancienne. Elle se fait à partir d'un glucide non protégé. Elle consiste en la protonation de l'hydroxyle porté par le carbone anomérique du sucre, puis l'attaque nucléophile de l'alcool que l'on veut greffer (schéma 2.25).



Schéma 2.25 : Méthode de Fischer.

Cette réaction est une solvolysé et donc nécessite un excès d'alcool. C'est pourquoi, pour des raisons de coût essentiellement, elle n'est utilisée que pour greffer des substituants tels que les méthyles, benzyles ou allyles dont l'alcool correspondant est peu coûteux.

II.3.1.2. Méthode de Koenigs-Knorr

La méthode de Koenigs et Knorr⁹⁹ (schéma 2.26) a été introduite pour la première fois en 1901. C'est une réaction stoechiométrique qui passe par la formation d'un glucide halogéné en position anomérique à l'aide d'acides de Lewis ou des sels de métaux lourds, suivie de l'attaque nucléophile de l'alcool. Cette méthode s'applique aux seuls composés dont la forme halogénée est stable.

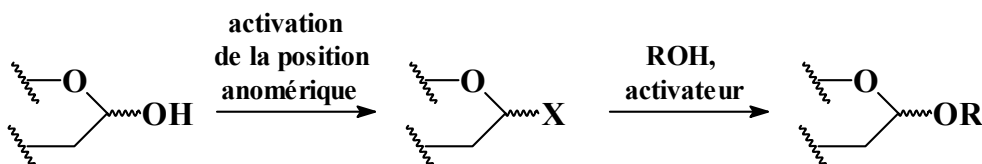


Schéma 2.26 : Méthode de Koenigs-Knorr.

⁹⁸ E. Fischer, *Chem. Ber.*, (1893), **2**, 400.

⁹⁹ W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.*, (1901), **34**, 957.

II.3.1.3. Méthode de Helferish et Hellibrecht

La *o*-glycosylation d'un glucide préalablement acétylé a été réalisée la première fois par Helferish et Hellibrecht¹⁰⁰ en 1933. Elle est un cas particulier de la méthode de Koenigs-Knorr et peut être considérée comme la plus simple à mettre en œuvre (schéma 2.27). Celle-ci a été développée par Hanessian et coll.¹⁰¹ pour la *o*-glycosylation sur des séries D-ribofuranose et D-glucopyranose.

Il est à noter que cette méthode permet également d'obtenir uniquement l'anomère β lorsqu'on utilise un sucre protégé par un groupement acétyle ou benzoyle comme dans le cas de la synthèse des nucléosides dont le mécanisme a été détaillé précédemment.

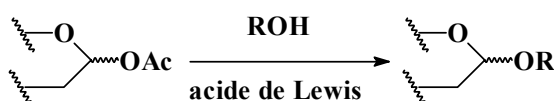


Schéma 2.27 : Glycosylation à partir d'un sucre 1-*O*-acétylé.

II.3.1.4. Méthode de Schmidt et coll.

La méthode du trichloroacétimidate a été proposée par Schmidt et coll.¹⁰² en 1980 et constitue une bonne alternative à la méthode de Koenigs et Knorr. Elle repose sur la formation d'un intermédiaire réactionnel obtenu par réaction du trichloroacétonitrile sur un sucre hydroxylé, en présence d'hydruure de sodium ou de carbonate de potassium.

Bien que comportant deux étapes, les réactions de glycosylation impliquant des trichloroacétimidates de glycosyle présentent l'avantage de donner des rendements globaux importants associés à une excellente stéréosélectivité β .

Le principe de base de cette méthode repose sur la réaction, en milieu basique, du trichloroacétonitrile et l'hydroxyle anomérique. Il en résulte la formation du trichloroacétimidate de glycosyle avec, généralement, de bons rendements. En raison de sa réversibilité, cette réaction permet de contrôler la sélectivité au niveau de la position anomérique (schéma 2.28). En effet, Schmidt et coll. ont montré que suivant la base utilisée, on pouvait favoriser soit le produit cinétique **II'** (anomère β), soit le produit

¹⁰⁰ B.L. Helferich, S. Winkler, *Chem. Ber.*, (1933), **66B**, 1556-1558.

¹⁰¹ S. Hanessian, J. Banoub, *Carbohydrate Research*, 1977, **59**, 261-267.

¹⁰² R.R. Schmidt, J. Michel, *Tetrahedron Letters*, 1984, **25**, 821-824.

thermodynamique **I'** (anomère α), via la rapide anomérisation de l'intermédiaire **II**. Ainsi, l'utilisation de carbonate de potassium conduit à la formation du produit de contrôle cinétique **II'** et l'hydrure de sodium mène au produit de contrôle thermodynamique **I'**.

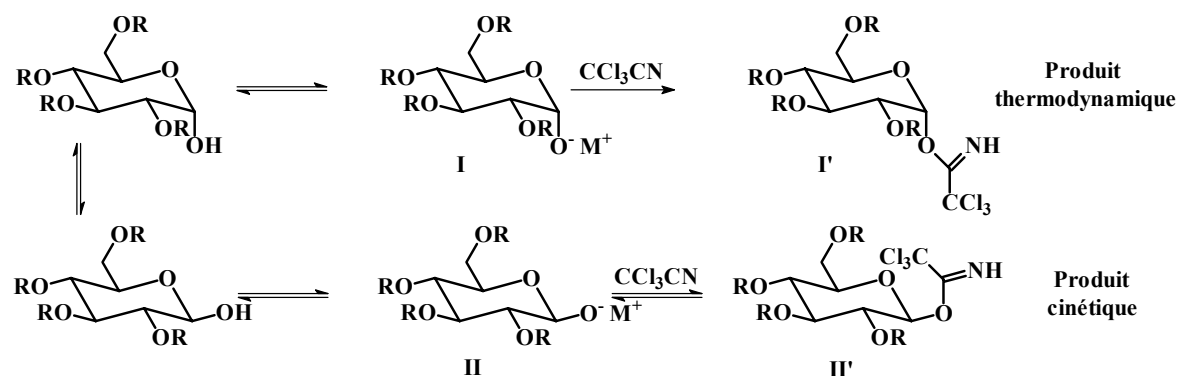


Schéma 2.28 : Formation du produit cinétique ou thermodynamique suivant la base utilisée.

D'autres bases sont fréquemment employées afin de fixer le groupement trichloroacétimide. Parmi celles-ci, nous pouvons citer le DBU conduisant généralement à un mélange α/β ou encore le carbonate de césium.

II.3.1.5. Résultats et discussion

Après avoir décrit quelques méthodes de glycosylation, nous présentons le couplage de la thymine hydroxyalkylée **2a** avec le glucose.

II.3.1.5.1. Méthode d'Hanessian et coll.

Les premiers essais de couplage ont été réalisés à partir du glucose *peracétylé* dans le dichloroéthane en présence de tétrachlorure d'étain selon Hanessian et coll. (schéma 2.29). Après 4 heures de réaction, on observe par CCM la disparition du sucre de départ et l'apparition d'une nouvelle tache majoritaire qui, après purification et analyse RMN montre la présence de deux composés. L'un correspond au glucose désacétylé en position anomérique **10**, l'autre résultant d'une réaction de transestérification entraînant l'acétylation de la thymine hydroxyalkylée **2a**. La variation du solvant ou de l'acide de Lewis n'a pas donné d'amélioration.

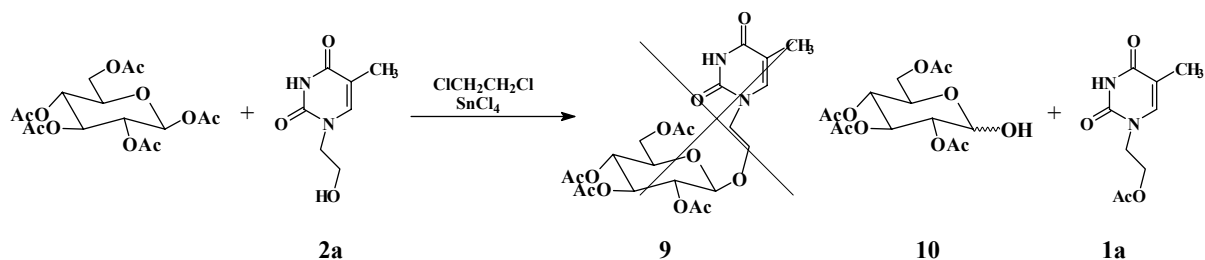


Schéma 2.29 : Glycosylation directe.

II.3.1.5.2. Méthode de Schmidt et coll.

Les premiers essais de glycosylation n'ayant pas donné de résultats satisfaisants, nous avons opté pour la méthode de Schmidt qui consiste, rappelons le, en la déprotection du carbone anomérique du pentaacétate glucose, suivie de l'activation de cette position par action du trichloroacétonitrile, et enfin la glycosylation de la thymine hydroxyalkylée (schéma 2.30).

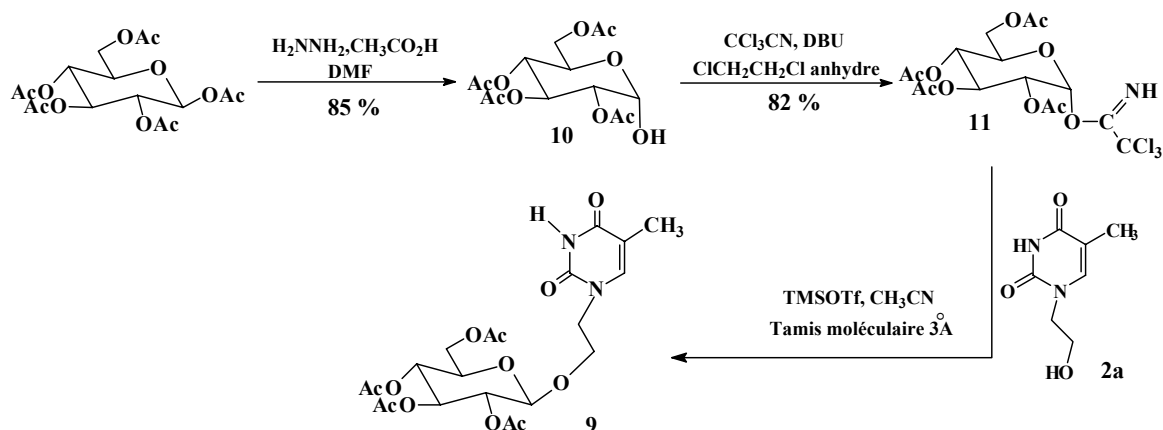


Schéma 2.30 : Schéma synthétique.

Nous avons tout d'abord réalisé la déprotection sélective du carbone anomérique du pentaacétate- β -D-glucopyranoside par l'acétate d'hydrazine dans le DMF. Après 1h20 de réaction, on observe la disparition totale du produit de départ et la formation d'un seul composé. Après neutralisation du milieu réactionnel avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée et extraction avec du dichlorométhane, on obtient le composé **10** avec un rendement de 85 %. L'analyse par spectroscopie RMN du proton montre que l'anomère α est majoritaire.

Le brut réactionnel obtenu étant proche de la pureté analytique, nous l'avons utilisé tel quel pour la synthèse du trichloroacétimidate. Le produit déprotégé **10** est mis en présence de trichloroacétonitrile (10 éq) et de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBU) en quantité catalytique (0,3 éq) en milieu dichloroéthane anhydre. Après 1h15 de réaction, la CCM montre que le sucre de départ n'est plus qu'à l'état de trace et qu'il y a formation d'un seul composé. Le mélange réactionnel est alors filtré et le solvant évaporé. Après purification, le composé **11** est obtenu avec un rendement de 82 %.

On procède ensuite à la réaction de glycosylation. La 1-(2-hydroxyéthyl)thymine **2a** est dissoute dans l'acétonitrile, on ajoute à cette solution du tamis moléculaire 3Å préalablement activé puis une solution du trichloroacétamidate dans l'acétonitrile. Le triméthylsilyltrifluorométhane sulfonate (TMSOTf) est alors additionné au mélange. La réaction est mise sous atmosphère inerte et agitation à température ambiante. Au bout de 4h15 de réaction, la CCM montre une disparition partielle du sucre de départ et la formation d'un composé majoritaire. On note également la présence d'autres produits à l'état de trace. Après neutralisation de la réaction avec une solution de triéthylamine et évaporation du solvant, le brut réactionnel est purifié et on isole le produit majoritaire.

L'analyse du spectre RMN du proton montre encore la présence d'un mélange de deux composés. En plus du composé attendu **9** (rendement 15,5 %), on observe la présence du composé **1a** en quantité non négligeable (rendement 26,5 %) (rendements déterminés par RMN¹H) résultant d'un transfert d'un groupement acétyle entre le glucose *peracétylé* et le composé **2a**.

La structure des composés **10**, **11** et **9** a été déterminée par RMN¹H (tableau 2.7). Les spectres des composés **10** et **11** montrent bien la formation de l'anomère α car la constante de couplage du carbone anomérique est voisine de 4 Hz. Dans le cas du composé **11**, on observe un léger déblindage du signal du proton porté par le carbone anomérique et le carbone en position 2'' dû à l'effet attracteur du groupement trichloroacétimidate. Les spectres montrent comme attendu une non équivalence des protons portés par le carbone en position 6'' du glucopyranose. Les protons H-6'' se présentent sous forme de double doublet pour les deux correspondant d'une part à leur couplage avec le proton H-5'' avec des constantes de couplage de 4,5 Hz et 2,1 Hz, et d'autre part à leur couplage entre eux avec une forte constante de couplage de 12 Hz. Le spectre du produit **9** présente tous les signaux correspondant à la thymine, au bras espaceur et au sucre dont la constante de couplage du carbone anomérique est de 7,9 Hz correspondant à l'anomère β attendu.

Tableau 2.7 : RMN¹H (CDCl₃) des produits de glycosylation de **2a**.

Composé	10 δ ppm, fig (J Hz)	11 δ ppm, fig (J Hz)	9 δ ppm, fig (J Hz)
<u>Sucre</u>			
H-1''	5,47, d _e (3,8)	6,56, d (3,7)	4,47, d (7,9)
H-2''	4,91, dd (9,9 et 3,8)	5,13, dd (3,7 et 9,8)	4,99, dd (7,9 et 9,6)
H-3''	5,54, t (9,9)	5,57, t (9,8)	5,19, t (9,6)
H-4''	5,10, t (9,9)	5,18, t (9,8)	5,05, t (9,6)
H-5''	4,28, ddd (9,9, 4,4 et 2,2)	4,21, ddd (1,9, 4,1 et 9,8)	3,70, ddd (9,6, 4,9 et 2,2)
H-6'' ^a	4,24, dd (4,4 et 10,1)	4,27, dd (4,1 et 12,3)	4,26, dd (4,9 et 12,5)
H-6'' ^b	4,14, dd (2,2 et 10,1)	4,13, dd (1,9 et 12,3)	4,11, dd (2,2 et 12,5)
<u>Thymine</u>			
H-3	-	-	8,81, s
H-6	-	-	7,02, q (0,9)
CH ₃	-	-	1,93, d (0,9)
<u>Bras</u>			
H-α	-	-	4,05, m
H-β	-	-	3,78, m

II.3.1.5.3. Méthode de Koenigs-Knorr

Compte-tenu des rendements relativement modérés de la méthode précédente associés à la formation de sous-produits, nous avons opté pour une nouvelle stratégie. Celle-ci consiste à réaliser la réaction de *o*-glycosylation selon la méthode de Koenigs-Knorr à partir du 1-bromo-2,3,4,6-tétra-*o*-acétyl- α -D-glucopyranose (schéma 2.31).

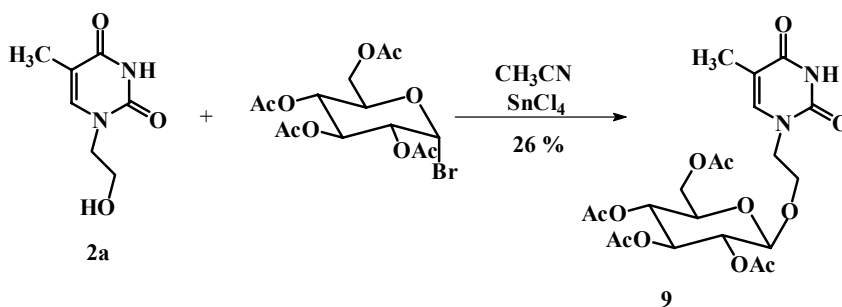


Schéma 2.31 : Réaction de glycosylation.

La réaction est réalisée avec un équivalent de bromure de 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranosyle, synthétisé selon Schuster et coll.¹⁰³, 1 équivalent de 2'-hydroxyéthylthymine **2a**, à température ambiante dans l'acétonitrile en présence de 2 équivalents de tétrachlorure d'étain. Après traitement et purification, le produit attendu **9** est isolé avec un rendement de 26 %. Par rapport à la méthode précédente le rendement est sensiblement amélioré, il passe de 15% à 26%. De plus, l'absence de transestérification permet d'isoler le produit sans difficulté.

L'analyse du spectre RMN du proton montre comme attendu la présence de l'anomère β (constante de couplage $J_{H1'',H2''} = 7,9\text{Hz}$). Le spectre présente également tous les autres signaux du glucide ainsi que ceux correspondant à la thymine, au bras espaceur et aux acétyles.

II.3.1.6. *N*-alkylation de la thymine et désacétylation du glucose

Deux voies de synthèse ont été utilisées pour obtenir le composé **13** (schéma 2.32). Par la voie A, on procède tout d'abord à la déprotection des hydroxyles puis on alkyle la position 3 de la thymine. Par la voie B, on réalise l'alkylation avant la déprotection du glucide.

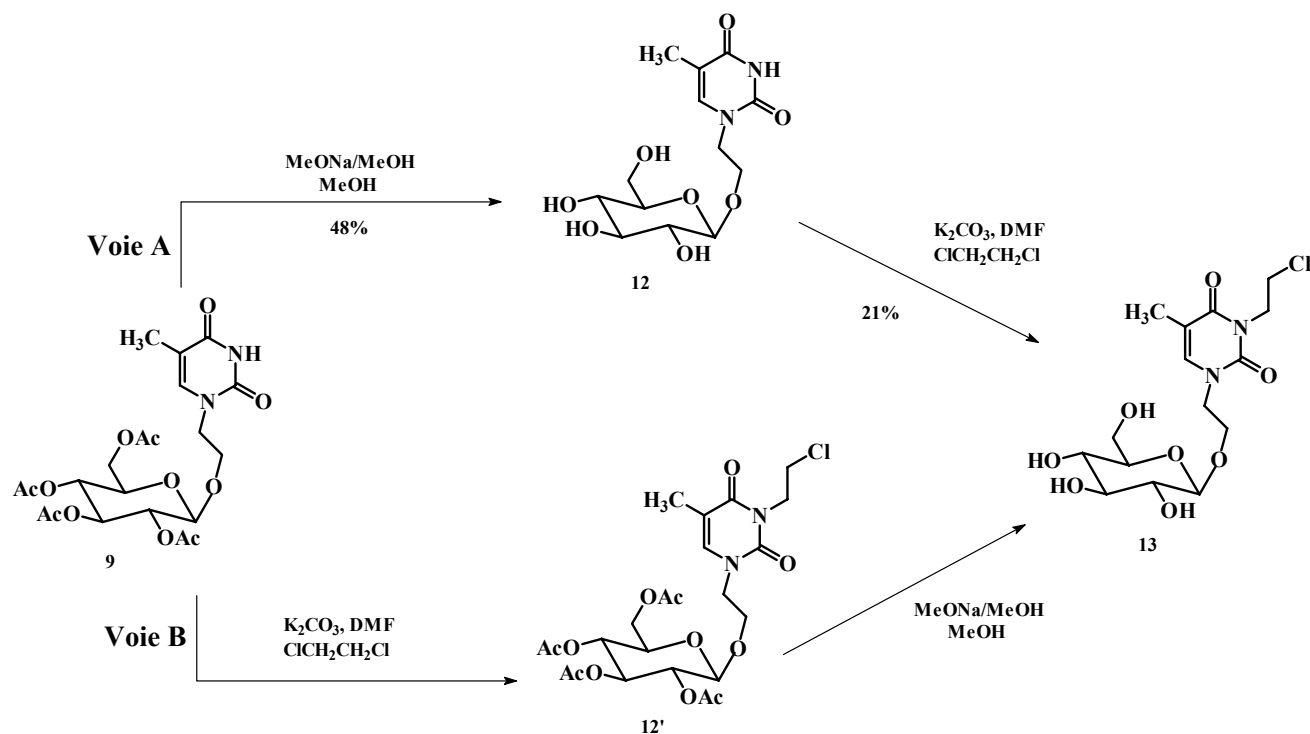


Schéma 2.32 : Les deux voies de synthèse de l'analogue glucosylé **13**.

¹⁰³ B. Schuster, M. Winter, K. Herrman, *Z.Naturforsch., C: J. Biosc.*, 1986, **41** (5-6), 511-520.

II.3.1.6.1. Voie A

Comme pour les analogues de nucléosides **4**, **7** et **8**, le produit résultant de la réaction de *o*-glycosylation **9** est déprotégé dans le méthanol en présence de méthylate de sodium. Après 3h30 de réaction, la CCM montre la disparition totale du substrat de départ. Le mélange réactionnel est alors neutralisé avec de la résine H⁺, filtré, puis le solvant évaporé. Le produit attendu **12** est obtenu après purification avec un rendement de 48 %.

Le spectre RMN de ce composé montre la disparition des signaux des acétyles. On observe également tous les signaux correspondant à la thymine et au glucose. Les protons aliphatiques résonnent entre 4,05 et 3,77 ppm.

La réaction d'alkylation est réalisée, comme précédemment, dans le DMF en présence de carbonate de potassium et d'un large excès de 1,2-dichloroéthane (schéma 2.33). La réaction est suivie par CCM, dès l'apparition du dimère celle-ci est arrêtée. On procède à la filtration du K₂CO₃ puis à l'évaporation du solvant. La purification par CCM préparative conduit au produit alkylé désiré **13** avec un rendement de 21 %.

Le spectre RMN¹H montre la disparition du proton H-3 et l'apparition des protons H- α' et H- β' de la chaîne alkyle fixée. Ils se présentent sous forme de triplet à 4,26 et 3,71 ppm avec une constante de couplage de 6,9Hz.

II.3.1.6.2. Voie B

Dans ce cas, nous avons tout d'abord réalisé la N-alkylation comme précédemment dans le DMF en présence de K₂CO₃. Dans ce cas également, par analogie aux résultats observés pour la formation du composé **4**, on peut raisonnablement penser que le co-produit formé est une entité dimérique du composé **13**. La réaction est arrêtée après 7h à 60°C. La CCM, après évaporation montre une évolution. On observe la disparition totale du produit majoritaire en fin de réaction et l'apparition d'un nouveau composé ayant un R_f plus faible. L'analyse par RMN a permis de déterminer la structure de ce composé. Il correspond au produit **13**. Il semblerait que l'évaporation en milieu basique a conduit à la déprotection du glucide. Nous avons donc réalisé les deux réactions en une seule étape. Le rendement dans ce cas est de 18%, supérieur à celui obtenu en deux étapes par la voie A (10%).

II.4. Synthèse d'un analogue glucosylé à partir de la thymidine

Nous avons ensuite préparé l'analogue de la thymidine glucosylée **16** (schéma 2.33). Cette structure, par la présence du glucose, devrait améliorer l'index thérapeutique car le glucose est connu pour son implication dans des phénomènes de reconnaissance cellulaire.

II.4.1. Stratégie de synthèse

Cette stratégie de synthèse consiste à réaliser la glycosylation directe de la thymidine non protégée en position 5', suivie de la désacétylation du glucose et enfin à alkyler la position 3 de la thymidine pour obtenir l'analogue désiré **16** (schéma 2.33).

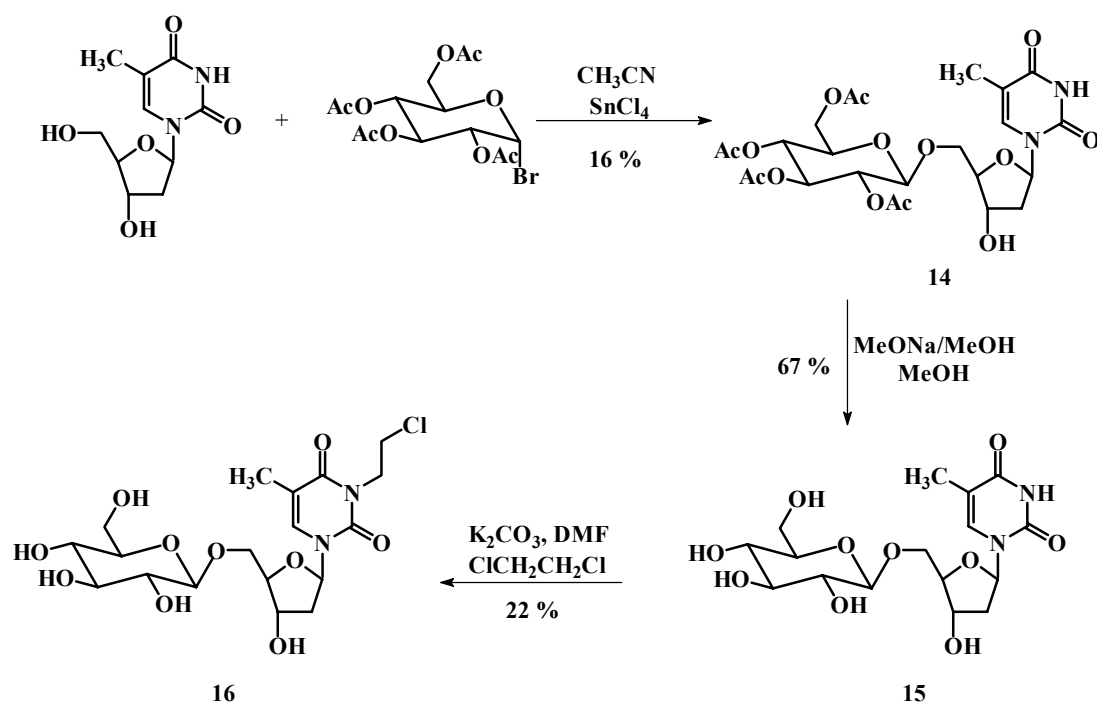
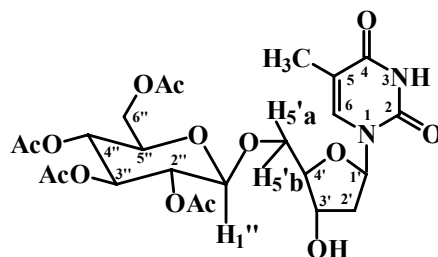


Schéma 2.33 : Schéma synthétique.

On procède tout d'abord à la réaction de *o*-glycosylation. La thymidine est dissoute dans l'acétonitrile, puis une solution de un équivalent de bromure de 2,3,4,6-tétra-*o*-acétyl- α -D-glucopyranosyle dissoute dans l'acétonitrile est ajoutée. Le tétrachlorure d'étain (2

équivalents) est alors additionné au mélange. La réaction est mise sous atmosphère inerte et agitation à température ambiante. Au bout de 5 minutes, la CCM montre la disparition partielle du sucre de départ et la formation d'un composé majoritaire. On note également des traces de produits de dégradation du glucide. Après purification par chromatographie, le produit attendu **14** est isolé avec un rendement de 16 %. L'augmentation du temps de réaction entraîne des rendements beaucoup plus faibles liés à la dégradation partielle du produit formé. La RMN du proton confirme la présence du glucose et de tous les signaux correspondant à la thymidine. La spectroscopie RMN (HMBC) (schéma 2.34) montre que le glucose s'est fixé sur la position 5' de la thymidine. On observe effectivement une corrélation entre les protons H-5' de la thymidine (4,19 et 3,70 ppm) et le carbone anomérique du glucose (100,86 ppm), et une corrélation entre le proton anomérique du glucose (4,56 ppm) et le carbone C-5' de la thymidine (69,84 ppm).



14

H-5'b thymidine

H-1'' glucose

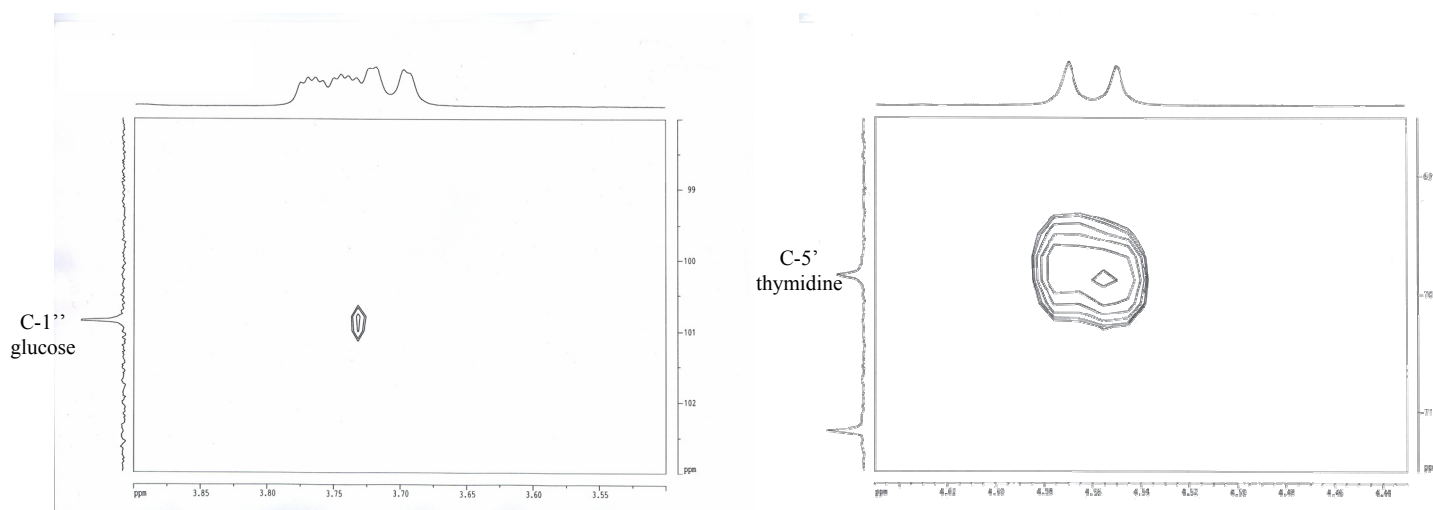


Schéma 2.34 : HMBC du composé **14**

Le produit résultant de la réaction de *o*-glycosylation **14** est déprotégé dans le méthanol en présence de méthylate de sodium. Après 2h40 de réaction, la CCM montre la disparition totale du substrat de départ et la formation d'un nouveau produit. Le mélange est alors neutralisé avec de la résine H⁺, filtré, puis le solvant évaporé. Le produit attendu **15** est obtenu après purification avec un rendement de 67 %. Le spectre RMN du proton montre la disparition des acétyles.

Enfin la réaction d'alkylation est réalisée, par activation micro-onde, dans le DMF en présence de carbonate de potassium et d'un large excès de 1,2-dichloroéthane. Après 20 minutes d'activation, on procède à la filtration du K₂CO₃ puis à l'évaporation du solvant. La purification par CCM préparative conduit au produit alkylé désiré **16** avec un rendement de 22 %.

Les structures des composés **14**, **15** et **16** ont été déterminées par RMN du proton (tableau 2.8). Les spectres RMN montrent que l'anomère β est majoritaire. Comme attendu, il y a une non équivalence des protons portés par le carbone en position 6'' du glucose, et également pour les protons portés par les carbones en position 2' et 5' du ribose. Pour le composé **15**, l'analyse du spectre RMN montre la disparition des acétyles ce qui entraîne un blindage de tous les protons glycopyranosiques. Concernant le produit **16**, l'apparition des signaux à 4,33 ppm et à 3,83 ppm prouve que la chaîne alkyle a bien été fixée en position 3 de la thymine.

Tableau 2.8 : RMN¹H (CDCl₃ pour **14** et CD₃OD pour **15** et **16**) des produits de la réaction de glycosylation.

Composé	14 δ ppm, fig (J Hz)	15 δ ppm, fig (J Hz)	16 δ ppm, fig (J Hz)
<u>Glucose</u> H-1''	4,56, d (8,2)	4,34, d (7,8)	4,54, d (7,9)
H-2''	4,98, dd (9,6 et 8,2)	3,20, dd (7,8 et 9,6)	3,33, dd (7,9 et 9,2)
H-3''	5,26, t (9,6)	3,37, t (9,6)	3,52, t (9,2)
H-4''	5,07, t (9,6)	3,27, t (9,6)	3,39, t (9,2)
H-5''	3,75, ddd (2,2, 4,4 et 9,6)	3,32, m	3,49, ddd (9,2, 6,3 et 2,1)
H-6''a	4,31, dd (4,4 et 12,4)	3,89, dd (1,7 et 11,9)	3,95, dd (2,1 et 12,3)
H-6''b	4,14, dd (2,2 et 12,4)	3,66, dd (5,7 et 11,9)	4,11, dd (6,3 et 12,3)
Acétyles	2,07-2,02, s		
<u>Thymine</u> H-3	8,84, s	-	-
H-6	7,49, s _é	7,82, q (1,2)	7,74, q (0,8)
CH ₃	2,00, s _é	1,90, d (1,2)	1,97, s _é
<u>Ribose</u> H-1'	6,39, dd (6,3 et 7,6)	6,32, dd (6,5 et 7,5)	6,37, t (6,8)
H-2'a	2,30, ddd (1,8, 6,3 et 13,7)	2,29, ddd (6,5, 7,5 et 13,6)	2,43, m
H-2'b	2,11, m	2,23, ddd (2,8, 6,5 et 13,5)	2,43, m
H-3'	4,38, m	4,52, dt (2,8 et 6,5)	4,60, m
H-4'	4,11, m	4,09, q (2,8)	4,23, m
H-5'a	4,19, dd (2,8 et 10,3)	4,23, dd (2,8 et 10,8)	4,24, dd (3,1, 11,9)
H-5'b	3,70, dd (1,8 et 10,3)	3,72, dd (2,8 et 10,8)	3,88, dd (5,5, 11,9)
<u>Bras</u> H-α	-	-	4,33, t (6,4)
H-β	-	-	3,83, t (6,4)

III. CONCLUSION

Dans cette seconde partie nous avons synthétisé un large échantillonnage d'analogues d'agents alkylants. Toutes les structures ont été construites à partir de la thymine et des méthoudes et/ou des conditions originales.

Une évaluation biologique a été menée, dans le cadre d'une collaboration avec le Professeur Kraemer, au laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire de l'université Paris XIII, afin de déterminer l'activité antitumorale de ces composés (chapitre III).

IV. PARTIE EXPERIMENTALE

IV.1. Réactifs et solvants

L'ensemble des réactifs et solvants commerciaux utilisés spécifiquement dans cette partie sont : chloroforme 99,9% (SDS), toluène 99,3% (SDS), méthanol 99,99% (Fisher), éthanol absolu (Prolabo), éther de pétrole 40-65°C (Prolabo), acétone (Prolabo), dichloroéthane, dichlorométhane 99,8%, chlorure de thionyle, acétate de bromoéthyle (Merck), tétrachlorure d'étain, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBU), triméthylsilyl-trifluoro-méthane sulfonate (TMSOTf), acétonitrile, acétate d'hydrazine et trichloroacétonitrile sont utilisés sans purification complémentaire.

Les divers éluants utilisés sont :

éluant A : éther de pétrole/toluène/acétone ; 4/4/5 ; v/v/v

éluant B : dichlorométhane/méthanol ; 95/5 ; v/v

éluant C : dichlorométhane/méthanol ; 98/2 ; v/v

éluant D : dichlorométhane/méthanol ; 99/1 ; v/v

éluant E : dichlorométhane/méthanol ; 97/3 ; v/v

éluant F : dichlorométhane/éthanol ; 90/10 ; v/v

éluant G : dichlorométhane/éthanol ; 97/3 ; v/v

éluant H : dichlorométhane/éthanol ; 99/1 ; v/v

éluant I : chloroforme/éthanol ; 70/30 ; v/v

éluant J : chloroforme/éthanol ; 80/20 ; v/v

éluant K : toluène/acétone ; 9/3 ; v/v

éluant L : éther de pétrole/acétate d'éthyle ; 65/35 ; v/v

éluant M : toluène/acétone ; 7/5 ; v/v

éluant N : acétate d'éthyle/éther de pétrole ; 2/1 ; v/v

éluant O : chloroforme/éthanol ; 95/5 ; v/v

éluant P : chloroforme/méthanol ; 7/3 ; v/v

éluant Q : chloroforme/éthanol ; 7/3 ; v/v

éluant R : chloroforme/méthanol ; 9/1 ; v/v

IV.2. Matériels et méthodes

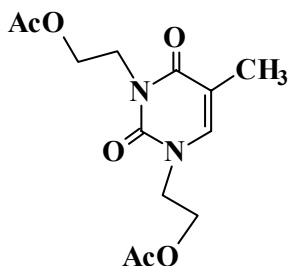
Les méthodes et matériels de purification et d'analyse sont les mêmes que ceux décrits dans la 1^{ère} partie.

IV.3. Micro-ondes

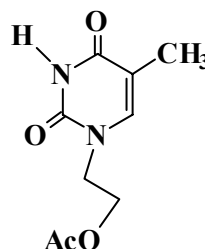
Les irradiations micro-ondes ont été réalisées au moyen de deux types de four micro-onde : un four micro-onde domestique qui a été utilisé en mode décongélation et un four micro-onde de laboratoire (Milestone, modèle : MicroSynth).

IV.4. Synthèses

1,3-di(2-acétoxyéthyl)thymine (**1b**)



1-(2-acétoxyéthyl)thymine (**1a**)



Après avoir introduit dans un bécher de 250 mL, 6 mmol (0,757 g) de thymine dissoute dans 20 mL de DMF, on ajoute 0,72g (3 équ) d'hydrure de sodium dispersé à 60% dans une huile minérale, le mélange est activé cinq minutes au micro-onde (5 fois 1 min). On ajoute 2 mL (3 équ) d'acétate de 2-bromoéthyle et on active de nouveau cinq fois une minute. La réaction est alors traitée. Le brut réactionnel est placé dans une ampoule à décanter avec 40 ml de chloroforme et 30 mL d'eau, on récupère la phase organique et on extrait la phase aqueuse avec 2 fois 20 ml de chloroforme. Les trois phases organiques sont rassemblées et lavées avec 20 ml d'eau et, après séchage sur MgSO₄, filtration, puis évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice en utilisant un gradient d'éluant éther de pétrole/acétone. On récupère 0,792g (46,5%) du composé **1b** et 0,348g (27,3%) du composé **1a**.

1,3-di-(2-acétoxyéthyl)thymine (**1b**) : huile translucide ; R_f (éluant A) = 0.46

C₁₃H₁₈N₂O₆ M = 298,29

RMN¹H (CDCl₃) (Tableau 1) : δ = 6,97 (1H, q, J=1Hz, H-6), 4,31 (4H, dt, J=4,8Hz, J=5,4Hz, H-β, H-β'), 4,25 (2H, t, J=5,4Hz, H-α'), 3,96 (2H, t, J=4,8Hz, H-α), 2,07 (3H, s, CH₃-CO), 2,01 (3H, s, CH₃-CO), 1,93 (3H, d, J=1Hz, CH₃-thymine).

RMN¹³C (CDCl₃) : δ = 170,97 (-OCO-), 170,51 (-OCO-), 163,61 (C-4), 151,43 (C-2), 138,86 (C-6), 109,82 (C-5), 61,83 (CH₂-β'), 61,26 (CH₂-β), 48,41 (CH₂-α'), 40,21 (CH₂-α), 20,86 (CH₃CO-O), 20,74 (CH₃CO-O), 13,01 (CH₃-thymine).

IR (KBr): 3071 cm⁻¹ (C-H), 1743 cm⁻¹ (C=O des acétyles), 1702 cm⁻¹ (C=O de la thymine), 1604 cm⁻¹ (C=C), 1231 cm⁻¹ (C-O-C).

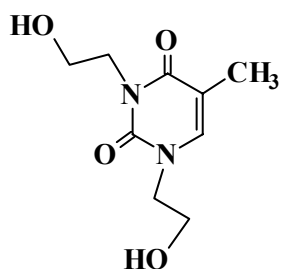
1-(2-acétoxyéthyl)thymine (**1a**) : solide blanc ; R_f (éluant A) = 0.25 ; T_f = 160 °C

C₉H₁₂N₂O₄ M = 212,20

RMN¹H (CDCl₃) (Tableau 1) : δ = 8,54 (1H, s, H-3), 6,98 (1H, q, J=1,1Hz, H-6), 4,31 (2H, d, J=5,3Hz, H-β), 3,96 (2H, d, J=5,3Hz, H-α), 2,07 (3H, s, CH₃-CO), 1,93 (3H, d, J=1,1Hz, CH₃-thymine) .

IR (KBr): 3160 cm⁻¹ (NH), 3039 cm⁻¹ (C-H), 1732 cm⁻¹ (C=O des acétyles), 1694 cm⁻¹ (C=O de la thymine), 1604 cm⁻¹ (C=C), 1224 cm⁻¹ (C-O-C).

1,3-di(2-hydroxyéthyl)thymine (**2b**)



Dans le ballon contenant le composé **1b** (0,791g, 2,6mmol), on ajoute 23 mL d'un solution de méthanolate de sodium dans le méthanol à 0,5 M (2 éq). L'ensemble est mis sous agitation, et on suit la réaction par CCM dans l'éluant B. On arrête la réaction au bout de 30 minutes. On neutralise la solution par ajouts de résine H⁺, on filtre sur fritté, puis on évapore à sec. On récupère ainsi 0,478g (86%) du composé **2b**.

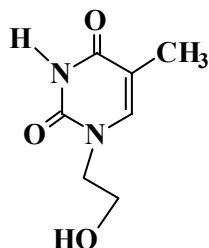
1,3-di-(2-hydroxyéthyl)thymine (**2b**) : solide blanc ; R_f (éluant B) = 0.34 ; T_f = 112°C

C₉H₁₄N₂O₄ M = 214,22

RMN¹H (CD₃OD) (Tableau 2): δ = 7,39 (1H, q, J=1Hz, H-6), 4,11 (2H, t, J=6,2Hz, H-α'), 3,85 (2H, t, J=5,1Hz, H-α), 3,75 (2H, t, J=5,1Hz, H-β), 3,71 (2H, t, J=6,2Hz, H-β'), 1,89 (3H, d, J=1Hz, CH₃-thymine).

IR (KBr): 3486 cm⁻¹ (OH), 3071 cm⁻¹ (C-H), 1706 cm⁻¹ (C=O de la thymine), 1604 cm⁻¹ (C=C), 1224 cm⁻¹ (C-O-C).

1-(2-hydroxyéthyl)thymine (2a)



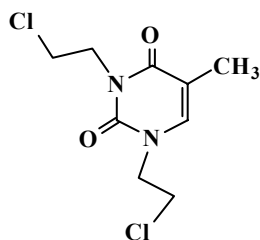
On applique un protocole identique à celui utilisé pour la préparation du composé **2b** en prenant 7mL d'une solution de méthylate de sodium dans le méthanol à 0,5 M (2éq). A partir de 0,34g (1,6mmol) de composé **1a** on récupère 0,162g (59,4%) du composé **2a**.

1-(2-hydroxyéthyl)thymine (**2a**) : solide blanc ; Rf (éluant B)= 0.33 ; Tf = 180°C

C₇H₁₀N₂O₃ M = 170,16

RMN¹H (CD₃OD) (Tableau 2) : δ = 7,39 (1H, q, J=1,1Hz, H-6), 3,81 (2H, t, J=4,8Hz, H- α), 3,74 (2H, t, J=4,8Hz, H- β), 1,86 (3H, d, J=1,1Hz, CH₃-thymine).

1,3-di(2-chloroéthyl)thymine (**3b**)



Le composé **2b** (0,178g, 0,83mmol) est dissous dans 10 mL de DMF anhydre. L'ensemble est mis sous atmosphère d'argon. 2 éq (0,250 mL) de chlorure de thionyle sont ajoutés goutte à goutte. La réaction est suivie par CCM dans l'éluant B. Elle est arrêtée au bout d'une heure, puis on évapore le mélange réactionnel à sec. Le brut est alors traité : il est placé dans une ampoule à décanter avec 40 ml de chloroforme et 15 mL d'une solution de NaHCO₃ saturée, on récupère la phase organique qui est lavée 2 fois avec 20 mL d'eau, le pH est alors neutre. Après séchage sur MgSO₄, filtration, puis évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie sur couche mince dans l'éluant D. On récupère 100mg (48%) du composé **3b**.

1,3-di(2-chloroéthyl)thymine (**3b**) : huile marron ; R_f (éluant B) = 0.75

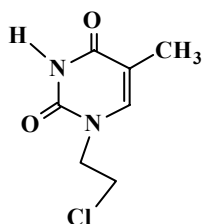
C₉H₁₂Cl₂N₂O₂ M = 251,11

RMN¹H (CDCl₃) (Tableau 3) : δ = 7,07 (1H, q, J=1,1Hz, H-6), 4,33 (2H, t, J=6,7Hz, H- α'), 4,04 (2H, t, J=5,5Hz, H- α), 3,81 (2H, t, J=5,5Hz, H- β), 3,73 (2H, t, J=6,7Hz, H- β'), 1,95 (3H, d, J=1,1Hz, CH₃-thymine).

RMN¹³C (CDCl₃) : δ = 163,43 (C-4), 151,19 (C-2), 139,61 (C-6), 109,63 (C-5), 40,03 (CH₂- β'), 41,93 (CH₂- β), 42,28 (CH₂- α'), 51,58 (CH₂- α), 12,98 (CH₃-thymine).

IR (KBr): 3072 cm⁻¹ (C-H), 1704 cm⁻¹ (C=O de la thymine), 1606cm⁻¹ (C=C), 1225 cm⁻¹ (C-O-C), 654 cm⁻¹ (C-Cl).

1-(2-chloroéthyl)thymine (**3a**)



On applique un mode opératoire identique à celui utilisé pour la synthèse du composé **3b**. A partir de 0,132g (0,78mmol) de composé **2a**, on obtient après purification (éluant B) 28,4% (42 mg) du composé **3a**.

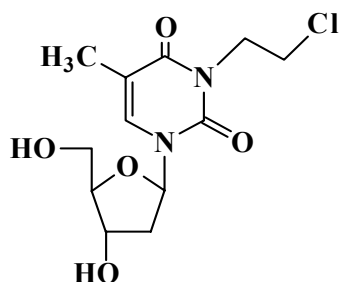
1-(2-chloroéthyl)thymine (**3a**) : solide blanc ; R_f (éluant B) = 0,75 ; T_f = 203°C

C₇H₉ClN₂O₂ M = 188,61

RMN¹H (CD₃OD) (Tableau 3) : δ = 7,44 (1H, q, J=1,0Hz, H-6), 4,04 (2H, t, J=5,9Hz, H-β), 3,81 (2H, t, J=5,9Hz, H-α), 1,87 (3H, d, J=1,0Hz, CH₃-thymine).

IR (KBr): 3158 cm⁻¹ (NH), 3095 cm⁻¹ (C-H), 1714 cm⁻¹ (C=O de la thymine), 1616cm⁻¹ (C=C), 1225 cm⁻¹ (C-O-C), 659 cm⁻¹ (C-Cl).

1-(2-désoxy-β-D-ribofuranosyl)-3-(2-chloroéthyl)thymine (4)



Par chauffage classique :

Dans un ballon de 100 mL, on introduit 246 mg (1 mmol) de thymidine qui sont dissouts dans 20 mL de DMF. 490 mg (5 éq) de K₂CO₃ sont ajoutés au mélange réactionnel. La solution est mise sous atmosphère d'argon et sous agitation. Au bout de 20 min, 2 mL (25 éq) de dichloroéthane sont ajoutés à la solution, le ballon est plongé dans un bain d'huile à 60 °C et l'agitation est poursuivie. La réaction est suivie par CCM dans l'éluant I. La réaction est arrêtée au bout de 7h, le milieu réactionnel est alors filtré sur fritté et le solvant évaporé. Le brut réactionnel est purifié sur plaques chromatographiques dans l'éluant J. On récupère 149 mg du composé **4**, soit un rendement de 49%.

Par irradiation micro-onde :

Dans un bicol de 25 mL, on introduit 242 mg (2 mmol) de thymidine qui sont dissous dans 10 mL de DMF. 490 mg (5 éq) de K₂CO₃ et 2 mL (20 éq) de dichlorométhane sont ajoutés au mélange réactionnel. La solution est mise sous atmosphère d'argon et sous agitation puis est activée par irradiation micro-onde (P = 100 W, T = 80 °C). La réaction est suivie par CCM dans l'éluant Q. La réaction est arrêtée au bout de 20 minutes d'activation, le milieu réactionnel est alors filtré sur fritté et le solvant évaporé. Le brut réactionnel est purifié sur plaques chromatographiques dans l'éluant Q. On récupère 129 mg du composé **8**, soit un rendement de 42 %.

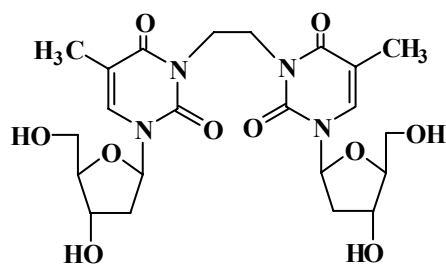
1-(2-désoxy-β-D-ribofuranosyl)-3-(2-chloroéthyl)thymine **4** : huile ; Rf(éluant I) = 0,7

C₁₂H₁₇ClN₂O₅ M = 304,73

RMN¹H (CD₃OD) : δ = 7,85(1H, q, J=0,8Hz, H-6), 6,29 (1H, t, J=6,7Hz, H-1'), 4,39 (1H, dt, J=6,7Hz, J=3,5Hz, H-3'), 4,25 (2H, t, J=6,9Hz, H-α'), 3,91 (1H, dd, J=3,5Hz, J=6,7Hz, H-4'), 3,80 (1H, dd, J=12,2Hz, J=3,5Hz, H-5'a), 3,73 (1H, dd, J=12,2Hz, J=3,5Hz, H-5'b), 3,71 (2H,

t, $J=6,9\text{Hz}$, H- β'), 2,28 (1H, ddd, $J=13,5\text{Hz}$, $J=6,7\text{Hz}$, $J=3,7\text{Hz}$, H-2'a), 2,20 (1H, ddt, $J=13,5\text{Hz}$, $J=6,7\text{Hz}$, $J=3,7\text{Hz}$, H-2'b), 1,91 (3H, d, $J=0,8\text{ Hz}$, CH_3 -thymine).

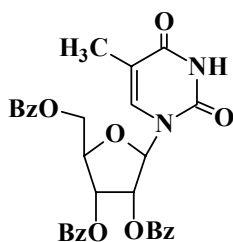
Dans les deux cas d'activation, il se forme un sous produit, le 1,2-di-[1-(2-désoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-thyminy]éthane (4').



huile ; R_f (éluant Q) = 0,2, $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{10}$ $M = 510,50$

RMN^1H (CD_3OD) : $\delta = 7,78$ (2H, q, $J=1,1\text{Hz}$, H-6), 6,17 (2H, t, $J=6,5\text{Hz}$, H-1'), 4,37 (2H, dt, $J=6,5\text{Hz}$, $J=3,8\text{Hz}$, H-3'), 4,32 (2H, m, H- α'), 4,19 (2H, t, $J=6,9\text{Hz}$, H- β'), 3,89 (2H, q, $J=3,8\text{Hz}$, H-4'), 3,80 (2H, dd, $J=12,1\text{Hz}$, $J=3,8\text{Hz}$, H-5'a), 3,71 (2H, dd, $J=12,1\text{Hz}$, $J=3,8\text{Hz}$, H-5'b), , 2,26 (2H, ddd, $J=13,5\text{Hz}$, $J=6,5\text{Hz}$, $J=3,8\text{Hz}$, H-2'a), 2,20 (2H, ddd, $J=13,5\text{Hz}$, $J=6,5\text{Hz}$, $J=3,8\text{Hz}$, H-2'b), 1,83 (6H, d, $J=1,1\text{ Hz}$, CH_3 -thymine).

1-(2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)thymine (**5**)



Dans un bicol de 100 ml surmonté d'un réfrigérant, on introduit 500 mg (4 mmole) de thymine et 20 ml de 1,2-dichloroéthane. On ajoute, sous atmosphère d'argon, 0,676 ml de HMDS (3,2 mmole, 0,8 éq.) et 0,3 ml de TMSCl (3,2 mmole, 0,8 éq.) et on chauffe à 80°C ce mélange jusqu'à obtention d'une solution limpide (environ 3 heures). On laisse refroidir et on ajoute successivement 2,016 g de 1-*O*-acétyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranose (4 mmole, 1 éq.) dissous dans 20 ml de 1,2-dichloroéthane anhydre et 932 μ l de tétrachlorure d'étain (2 éq.). On suit l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince dans l'éluant G. La réaction est arrêtée après 1 heure 30, le brut réactionnel est placé dans une ampoule à décanter avec 30 ml d'une solution basique saturée de NaHCO₃ et 60 ml de chloroforme, on récupère la phase organique et on extrait la phase aqueuse avec 2 fois 40 ml de chloroforme. Les trois phases organiques sont rassemblées et lavées avec 20 ml d'eau et, après séchage sur MgSO₄, filtration, puis évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice en utilisant l'éluant H. On récupère 1,97g de composé **5** sous forme de solide blanc (86,5%).

1-(2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)thymine **5** ; Rf = 0,53 (éluant G) ; Tf = 92-94°C.

$[\alpha]_D = -21,1^\circ$ (c=1, CHCl₃)

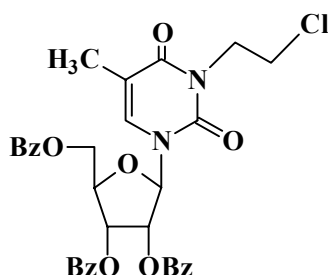
C₃₁H₂₆N₂O₉ M = 570,55

RMN ¹H (CDCl₃): δ = 8,80 (1H, s, N-H), 7,15 (1H, q, J=1Hz, H-6), 6,43 (1H, d, J= 6,4Hz, H-1'), 5,91 (1H, dd, J=6,4Hz, J=3,8Hz, H-3'), 5,75 (1H, t, J=6,4Hz, H-2'), 4,88 (1H, dd, J= 12,1Hz, J=2,5Hz, H-5'a), 4,70 (1H, dt, J=2,5Hz, J=3,8Hz, H-4'), 4,64 (1H, dd, J=12,1Hz, J= 3,8Hz, H-5'b), 1,59 (3H, d, J=1Hz, CH₃-thymine).

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 163,27 (C-4), 150,29 (C-2), 134,84 (C-6), 112,22 (C-5), 86,93 (C-1'), 80,62 (C-4'), 73,37 (C-2'), 71,44 (C-3'), 63,94 C-5'), 12,11 (CH₃-thymine).

IR (KBr): 3186 cm⁻¹ (N-H), 3065 cm⁻¹ (C-H), 1724 cm⁻¹ (C=O benzoyle), 1694 cm⁻¹ (C=O thymine), 1603 cm⁻¹ (C=C), 1266 cm⁻¹ (C-O-C).

1-(2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)-3-(2-chloroéthyl)thymine (6)



Par chauffage classique :

Dans un ballon de 25 mL, on introduit 213 mg (0,37mmol) du composé **5**. On ajoute 5 mL de 1,2-dichloroéthane, puis 349 mg (3,7mmol) de K_2CO_3 . On ajoute au mélange réactionnel 1 mL de DMF. Le milieu réactionnel est placé dans un bain d'huile à 70°C, sous agitation et sous atmosphère d'argon. La réaction est suivie par CCM dans l'éluant G. Après 7 heures de réaction, on filtre sur fritté, puis on évapore à sec. On récupère le composé **6** (240mg) avec un rendement quantitatif.

Par irradiation micro-onde :

Dans un bicol de 25 mL, on introduit 213 mg (0,37 mmol) du composé **5** qui sont dissous dans 8 mL de DMF. 183 mg (5 éq) de K_2CO_3 et 0,6 mL (20 éq) de dichlorométhane sont ajoutés au mélange réactionnel. La solution est mise sous atmosphère d'argon et sous agitation puis est activée par irradiation micro-onde ($P = 100$ W, $T = 80$ °C). La réaction est suivie par CCM dans l'éluant G. La réaction est arrêtée au bout de 20 minutes d'activation, le milieu réactionnel est alors filtré sur fritté et le solvant évaporé. Le brut réactionnel est purifié sur plaques chromatographiques dans l'éluant G. On récupère 165 mg du composé **6**, soit un rendement de 70 %.

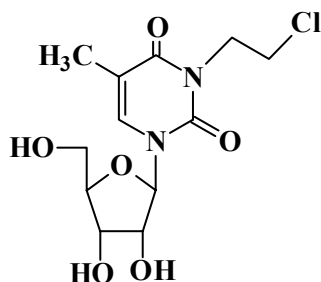
1-(2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)-3-(2-chloroéthyl)thymine **6** ; mousse ; $R_f = 0,86$

$C_{33}H_{29}ClN_2O_9$ $M = 633,05$

RMN 1H ($CDCl_3$): $\delta = 7,17$ (1H, q, $J=1,1$ Hz, H-6), 6,39 (1H, d, $J=5,9$ Hz, H-1'), 5,94 (1H, dd, $J=5,9$ Hz, $J=4,2$ Hz, H-3'), 5,76 (1H, t, $J=5,9$ Hz, H-2'), 4,90 (1H, dd, $J=12,3$ Hz, $J=2,7$ Hz, H-5'a), 4,71 (1H, ddd, $J=2,7$ Hz, $J=4,2$ Hz, $J=5,9$ Hz, H-4'), 4,64 (1H, dd, $J=12,3$ Hz, $J=4,2$ Hz, H-5'b), 4,26 (2H, m, $J=6,6$ Hz, $CH_2-\alpha'$), 3,64 (2H, m, $J=6,6$ Hz, $CH_2-\beta'$), 1,65 (3H, d, $J=1,1$ Hz, CH_3 -thymine).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : $\delta = 162,79$ (C-4), 150,87 (C-2), 133,53 (C-6), 111,32 (C-5), 88,3 (C-1'), 80,5 (C-4'), 73,63 (C-2'), 71,33 (C-3'), 63,69 (C-5'), 42,33 ($\underline{C}H_2-\alpha'$), 39,78 ($\underline{C}H_2-\beta'$), 12,83 ($\underline{C}H_3$ -thymine).

1-(β-D-ribofuranosyl)-3-(2-chloroéthyl)thymine (7)



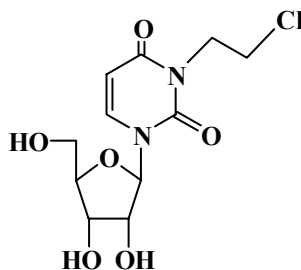
Dans un ballon de 50 mL, on introduit 280 mg (0,4 mmol) du composé benzoylé qui sont dissout dans 8 mL de MeOH. On ajoute au mélange réactionnel 400 mg de résine basique OH⁻, et on applique une agitation douce. La réaction est suivie par CCM dans l'éluant F. La réaction est arrêtée au bout de 5h30, et on ajoute alors au milieu réactionnel du MeOH. On filtre sur fritté et on évapore à sec. Le brut réactionnel est purifié sur plaques chromatographiques dans l'éluant F. On récupère ainsi 38 mg de produit soit un rendement de 27%.

1-(β-D-ribofuranosyl)-3-(chloroéthyl)thymine 7: solide blanc ; R_f (éluant F)= 0,47 ; T_f= 92°C

C₁₂H₁₇ClN₂O₆ M = 320,72

RMN¹H (CD₃OD) : δ = 7,90 (1H, q, J=1Hz, H-6), 5,92 (1H, m, H-1'), 4,26 (2H, dt, J=6,8Hz, J=0,5Hz, CH₂-α'), 4,16 (1H, m, H-2'), 4,16 (1H, m, H-3'), 4,00 (1H, m, H-4'), 3,86 (1H, dd, J=12,2Hz, J=2,6Hz, H-5'a), 3,74 (1H, dd, J=12,2Hz, J=2,6Hz, H-5'b), 3,71 (2H, t, J=6,8Hz, CH₂-β'), 1,90 (3H, d, J=1Hz, CH₃-thymine).

3-(2-chloroéthyl)uridine (**8**)



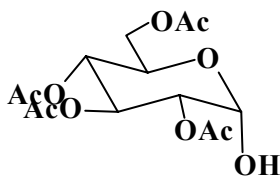
Dans un bicol de 25 mL, on introduit 488 mg (2 mmol) d'uridine qui sont dissous dans 8 mL de DMF. 1,38 g (5 éq) de K_2CO_3 et 3,15 mL (20 éq) de dichlorométhane sont ajoutés au mélange réactionnel. La solution est mise sous atmosphère d'argon et sous agitation puis est activée par irradiation micro-onde ($P = 100 \text{ W}$, $T = 80 \text{ °C}$). La réaction est suivie par CCM dans l'éluant Q. La réaction est arrêtée au bout de 20 minutes d'activation, le milieu réactionnel est alors filtré sur fritté et le solvant évaporé. Le brut réactionnel est purifié sur plaques chromatographiques dans l'éluant Q. On récupère 289 mg du composé **8**, soit un rendement de 47%.

3-(2-chloroéthyl)uridine **8** : huile ; R_f (éluant Q) = 0,55

$C_{11}H_{15}ClN_2O_6$ $M = 306,7$

RMN¹H (CD_3OD) : $\delta = 8,05$ (1H, d, $J=8,2\text{Hz}$, H-6), 5,91 (1H, d, $J=5,1\text{Hz}$, H-1'), 5,77 (1H, d, $J=8,2\text{Hz}$, H-5), 4,25 (2H, dt, $J=6,8\text{Hz}$, $J=0,7\text{Hz}$, H- α'), 4,16 (2H, t, $J=5,1\text{Hz}$, H-2'), 4,15 (1H, t, $J=5,1\text{Hz}$, H-3'), 4,01 (1H, dt, $J=5,1\text{Hz}$, $J=2,8\text{Hz}$, H-4'), 3,86 (1H, dd, $J=12,2\text{Hz}$, $J=2,8\text{Hz}$, H-5'a), 3,74 (1H, dd, $J=12,2\text{Hz}$, $J=2,8\text{Hz}$, H-5'b), 3,72 (2H, t, $J=6,8\text{Hz}$, H- β').

2,3,4,6-tétra-*o*-acétyl- α -D-glucopyranose (**10**)



Dans un ballon de 10 mL, on introduit 1,01g (2,58 mmol) de pentaacétate- β -D-glucose qui sont dissouts dans 3 mL de DMF. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et atmosphère inerte. Puis on introduit 0,338g (3,67mmol) d'acétate d'hydrazine. Le mélange réactionnel est alors placé dans un bain d'huile à 50°C. La réaction est suivie par CCM dans l'éluant K. La réaction est arrêtée au bout de 1h20.

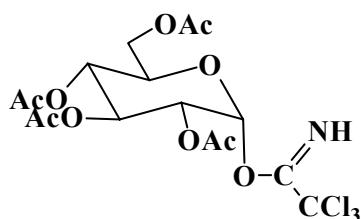
Le brut réactionnel, une fois à température ambiante, est placé dans une ampoule à décanter de 125 mL et on ajoute 50 mL d'acétonitrile. La phase organique est lavée avec deux fois 30 mL d'une solution saturée en NaCl, puis neutralisée avec 5 mL de NaHCO₃. La phase organique est lavée avec 2 fois 30 mL d'eau, séchée sur MgSO₄, puis filtrée et le solvant évaporé. On récupère 767 mg du produit désiré (rendement = 85,3%).

2,3,4,6-tétra-*o*-acétyl- α -D-glucopyranose **10** : huile ; Rf (éluant K) = 0.38

C₁₄H₂₀O₁₀ M = 348,30

RMN¹H (CDCl₃) : δ = 5,54(1H, t, J= 9,8Hz, H-3''), 5,47(1H, de, J= 3,8Hz, H-1''), 5,1 (1H, t, J=9,8Hz, H-4''), 4,91 (1H, dd, J=9,8Hz, J=3,8Hz, H-2''), 4,28 (1H, ddd, J=9,8Hz, J=4,4Hz, J=1,8Hz, H-5''), 4,24 (1H, dd, J=4,4Hz, J=10,1Hz, H-6''a), 4,14 (1H, dd, J=1,8Hz, J=10,1Hz, H-6''b).

(2,3,4,6-tétra-*o*-acétyl- α -D-glucopyranosyl)trichloroacétimide (11)



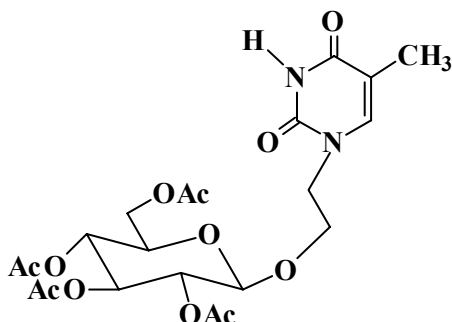
Dans le ballon contenant le composé **10** (767mg, 2,2mmol), 7 mL de CH₂Cl₂ anhydre sont ajoutés pour le dissoudre. Le milieu réactionnel est placé dans un bain de glace, sous atmosphère inerte et agitation. Puis 2,2 mL (10 éq) de CCl₃CN et 100 μ L (0,3 éq) de DBU sont ajoutés au mélange réactionnel. On observe une coloration « rouge brique » après l'ajout du catalyseur. La réaction est suivie par CCM dans l'éluant K. Elle est arrêtée au bout de 1h15, et la concentration est réduite par évaporation. Le mélange est alors purifié sur colonne chromatographique de silice dans l'éluant L. On récupère 893 mg du composé **11** soit un rendement de 82%.

(2,3,4,6-tétra-*o*-acétyl- α -D-glucopyranosyl)trichloroacétimide **11**: huile ; R_f(éluant K) = 0.56

C₁₆H₂₀ClNO₁₀ M = 492,69

RMN¹H (CDCl₃) : δ = 8,69 (1H, s, NH), 6,56 (1H, d, J=3,7Hz, H-1''), 5,57 (1H, t, J=9,8Hz, H-3''), 5,18 (1H, t, J=9,8Hz, H-4''), 5,13 (1H, dd, J=9,8Hz, J=3,7Hz, H-2''), 4,27 (1H, dd, J=4,1Hz, J=12,3Hz, H-6''a), 4,21 (1H, ddd, J=2,1Hz, J=4,1Hz, J=9,8Hz, H-5''), 4,13 (1H, dd, J=2,1Hz, J=12,3Hz, H-6''b).

1-[2-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-glucosyloxy)-éthyl]thymine (**9**)



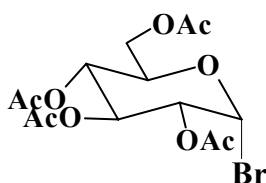
Dans un ballon de 25 mL, on dissout 33 mg (0,2mmol) de 1-(2-hydroxyéthyl)thymine (**2a**) dans 2 mL d'acétonitrile anhydre puis on y additionne le mélange de 147 mg du trichloroacétimide dans 6 mL d'acétonitrile anhydre. Du tamis moléculaire 3Å, préalablement activé, est alors ajouté. Le mélange réactionnel est placé sous atmosphère inerte et agitation. A l'aide d'une seringue on introduit 0,05 mL (1,5 éq) de TMSOTf. La réaction est suivie par CCM dans l'éluant M. Après 4h15 elle est arrêtée, le milieu est neutralisé par une solution de triéthylamine, puis le solvant est évaporé. Le brut réactionnel est dissout dans l'acétate d'éthyle. On observe la formation d'un précipité blanc, ce dernier est filtré et le filtrat récupéré. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite. On procède alors à la purification par chromatographie sur couche mince dans l'éluant M. On récupère 42 mg du composé désiré soit un rendement de 42%.

1-[2-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-glucosyloxy)-éthyl]thymine **9** : huile ; Rf (éluant M) = 0,32

$C_{23}H_{33}N_2O_{12}$ M = 529,52

RMN¹H (CDCl₃) : δ = 8,81 (1H, s, H-3), 7,02(1H, q, J=0,9Hz, H-6), 5,19 (1H, t, J=9,5Hz, H-3''), 5,05 (1H, t, J=9,5Hz, H-4''), 4,99 (1H, dd, J=7,9Hz, J=9,5Hz, H-2''), 4,47 (1H, d, J=7,9Hz, H-1''), 4,26 (1H, dd, J=4,9Hz, J=12,5Hz, H-6''a), 4,11 (1H, dd, J=2,2Hz, J=12,5Hz, H-6''b), 4,05 (2H, m, H- α), 3,78 (2H, m, H- β), 3,70 (1H, ddd, J=9,5Hz, J=4,9Hz, J=2,2Hz, H-5''), 1,93 (3H, d, J=0,9Hz, CH₃-thymine).

1-bromo-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranose

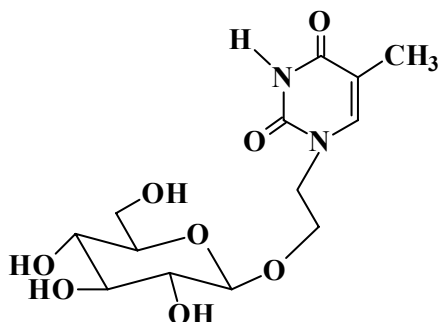


Le glucose *peracétylé* (3g ; 7,7mmol) est dissous, à 4 °C, dans 4mL d'une solution à 33% de HBr dans l'acide acétique. La réaction est laissée sous agitation pendant 4 heures puis le mélange réactionnel est mis au réfrigérateur pendant 12 heures. L'excès d'acide bromhydrique est chassé à 0°C par barbotage d'argon suivi d'une extraction par le dichlorométhane (20mL) et l'eau bidistillée (2 x 40mL), puis une neutralisation rapide avec une solution saturée de NaHCO₃ glacée (2 x 5mL). Après lavage de la phase organique à l'eau distillée (2 x 40mL), séchage sur MgSO₄, filtration et évaporation du solvant, le produit brut est recristallisé deux fois dans 8mL d'éther diisopropylique. On isole alors 2,60g (82%) de 1-bromo-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranose.

1-bromo-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranose : solide blanc ; Rf(éluant N) = 0,6 ; Tf = 88°C (litt. Tf = 88-89°C) ; $[\alpha]_D = +196^\circ$ (c=2, CHCl₃)

C₁₄H₁₉BrO₉ M = 411,20

1-[2-(β -D-glucosyloxy)-éthyl]thymine (12)



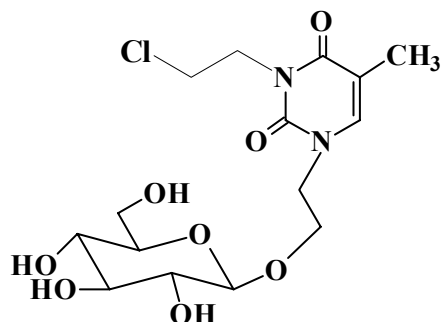
Dans un ballon de 25mL on introduit 78mg (0,156 mmol) du composé **9** qui sont dissous dans 3mL de MeOH puis on ajoute 2,5mL d'une solution de MeONa dans le méthanol à 0,5M. Le mélange réactionnel est mis sous agitation pendant 3h30. Puis on procède à sa neutralisation par ajouts de résine H⁺. Après filtration et concentration, on purifie le brut réactionnel par chromatographie sur couche mince dans l'éluant P. Le composé désiré est obtenu avec un rendement de 48% (25mg).

1-[2-(β -D-glucosyloxy)-éthyl]thymine **12**: huile ; Rf(éluant P) = 0.26

C₁₄H₂₃N₂O₈ M = 347,34

RMN¹H (CD₃OD) : δ = 7,51 (1H, q, J=1,0Hz, H-6), 4,29 (1H, d, J=7,9Hz, H-1''), 4,04 (1H, m, H-6''a), 3,95 (1H, m, H-6''b), 3,65 (1H, m, H-5''), 3,26 (2H, m, H-3'' et H-4''), 3,15 (1H, dd, J=7,9Hz, J=9,0Hz, H-2''), 4,05 (2H, m, H- α), 3,77 (2H, m, H- β), 1,86 (3H, d, J=1,0Hz, CH₃-thymine).

1-[2-(β-D-glucosyloxy)-éthyl]-3-[2-chloroéthyl]thymine (13)



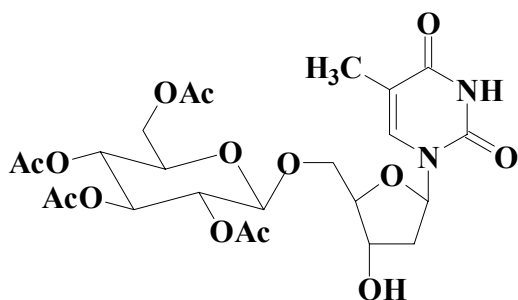
Dans un ballon de 25mL, on introduit 20mg (0,06 mmol) du composé **12** qui sont dissous dans 2mL de DMF anhydre. 43mg (5éq) de K_2CO_3 et 119 μ L (25éq) de 1,2-dichloroéthane sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est mis sous agitation et atmosphère inerte pendant 7h30. Après filtration et concentration, le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur couche mince dans l'éluant Q. Après désorption, filtration et évaporation du solvant, on récupère 5mg du produit désiré, soit un rendement de 21%.

1-[2-(β-D-glucosyloxy)-éthyl]-3-[2-chloroéthyl]thymine **13**: huile ; Rf(éluant Q) = 0.49

$C_{16}H_{26}ClN_2O_8$ M = 409,84

RMN¹H (CD₃OD) : δ = 7,54 (1H, q, J=0,9Hz, H-6), 4,28 (1H, d, J=7,8Hz, H-1''), 4,26 (2H, t, J=6,9Hz, H- α'), 4,03 (2H, m, H- α), 3,87 (2H, m, H-6''a et H-6''b), 3,85 (2H, m, H- β), 3,71 (2H, t, J=6,9Hz, H- β'), 3,63 (1H, m, H-5''), 3,25 (2H, m, H-3'' et H-4''), 3,14 (1H, dd, J=8,9Hz, J=7,8Hz, H-2''), 1,89 (3H, d, J=0,9Hz, CH₃-thymine).

5'-O-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-glucosyloxy)thymidine (14)



Dans un ballon de 25 mL, 100mg (0,413 mmol) de thymidine et 174mg (1 éq) de 1-bromo-2,3,4,6-tétra-O-acétyl-α-D-glucopyranose sont solubilisés dans 4 mL d'acétonitrile. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et atmosphère inerte. Puis le ballon est placé dans un bain de glace et on injecte 100 μL (2 éq) de tétrachlorure d'étain. Quand le mélange réactionnel est parfaitement solubilisé, le ballon est retiré du bain de glace et l'agitation est poursuivie pendant 5 minutes.

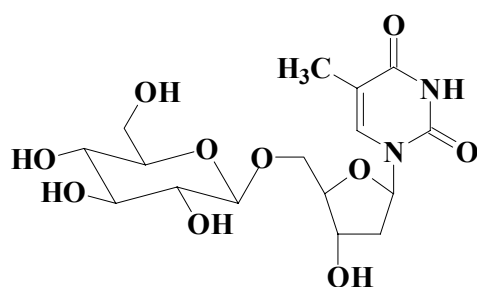
Puis le mélange réactionnel est neutralisé par ajouts de NaHCO₃ solide et d'eau, et la phase organique est extraite avec du dichlorométhane (2 x 40 mL). Après séchage sur MgSO₄, filtration et évaporation du solvant, le produit brut est purifié par CCM préparative dans l'éluant R. On récupère 37,5mg du composé désiré, soit 16 % de rendement.

5'-O-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-glucosyloxy)thymidine **14**: mousse blanche ; R_f (éluant R) = 0,45 ; T_f = 88°C

C₂₆H₃₉N₂O₁₄ M = 603,60

RMN¹H (CDCl₃) : δ = *thymine* : 8,84 (1H, s, H-3), 7,49 (1H, sé, H-6), 2,00 (3H, sé, CH₃-thymine) ; *ribofuranose* : 6,39 (1H, dd, J=6,3Hz, J=7,6Hz, H-1'), 4,38 (1H, m, H-3'), 4,19 (1H, dd, J=2,8Hz, J=10,3Hz, H-5'a), 4,11 (1H, m, H-4'), 3,70 (1H, dd, J=1,8Hz, J=10,3Hz, H-5'b), 2,30 (1H, ddd, J=1,8Hz, J=6,3Hz, J=13,7Hz, H-2'a), 2,11 (1H, m, H-2'b), *glucopyranose* : 5,26 (1H, t, J=9,6Hz, H-3''), 5,07 (1H, t, J=9,6Hz, H-4''), 4,98 (1H, dd, J=8,2Hz, J=9,6Hz, H-2''), 4,56 (1H, d, J=8,2Hz, H-1''), 4,31 (1H, dd, J=4,6Hz, J=12,4Hz, H-6'a), 4,14 (1H, dd, J=2,2Hz, J=12,4Hz, H-6'b), 3,75 (1H, ddd, J=2,2Hz, J=4,6Hz, J=12,4Hz, H-5'') ; *acétyles* : 2,07-2,02 (12H, s, CH₃-COO).

5'-O-β-D-glucosyloxythymidine (15)



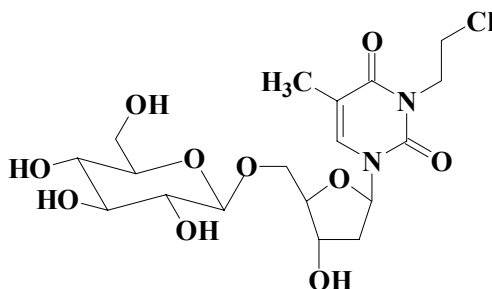
Dans un ballon de 25 mL, on introduit 125mg (0,218 mmol) du composé **14** qui sont solubilisés dans 1mL de méthanol, puis on ajoute 3,5 mL de MeONa/MeOH à 0,5M. Le mélange réactionnel est mis sous agitation et atmosphère inerte pendant 2h40. Puis on procède à sa neutralisation par ajouts de résine H⁺. Après filtration, rinçage de la résine et concentration réduite du solvant, on purifie le mélange réactionnel par chromatographie sur couche mince dans l'éluant P. Le composé attendu est obtenu avec un rendement de 67 % (59mg).

5'-O-β-D-glucosyloxythymidine **15**: solide blanc ; R_f (éluant P) = 0,23 ; T_f = 126°C

C₁₈H₃₁N₂O₁₀ M = 435,45

RMN¹H (CD₃OD) : δ = *thymine* : 7,82 (1H, q, J=1,2Hz, H-6), 1,90 (3H, d, J=1,2Hz, CH₃-thymine) ; *ribofuranose* : 6,32 (1H, dd, J=6,5Hz, J=7,5Hz, H-1'), 4,52 (1H, dt, J=2,5Hz, J=5,7Hz, H-3'), 4,23 (1H, dd, J=2,5Hz, J=10,8Hz, H-5'a), 4,09 (1H, q, J=2,5Hz, H-4'), 3,72 (1H, dd, J=2,5Hz, J=10,8Hz, H-5'b), 2,29 (1H, ddd, J=5,7Hz, J=7,5Hz, J=13,6Hz, H-2'a), 2,23 (1H, ddd, J=2,5Hz, J=6,5Hz, J=13,6Hz, H-2'b), *glucopyranose* : 4,34 (1H, d, J=7,8Hz, H-1''), 3,89 (1H, dd, J=1,7Hz, J=11,9Hz, H-6''a), 3,66 (1H, dd, J=5,7Hz, J=11,9Hz, H-6''b), 3,37 (1H, t, J=8,8Hz, H-3''), 3,32 (1H, m, H-5''), 3,27 (1H, t, J=8,8Hz, H-4''), 3,20 (1H, dd, J=7,8Hz, J=8,8Hz, H-2'').

5'-O-β-D-glucosyloxy-3-(2-chloroéthyl)thymidine (16)



Dans un bicol de 25 mL, on introduit 56mg (0,139 mmol) du composé **15** qui sont dissous dans 7 mL de DMF anhydre. On ajoute 105mg (5 éq) de K_2CO_3 et 280 μ L (25 éq) de 1,2-dichloroéthane. Le milieu réactionnel est activé 10 x 2 minutes par irradiation micro-onde (P = 120W, T = 80°C). Après filtration et évaporation, le brut réactionnel est purifié par CCM préparative dans l'éluant P. Après désorption, filtration et évaporation du solvant, on récupère 22 mg de produit désiré, soit un rendement de 22 %.

5'-O-β-D-glucosyloxy-3-(2-chloroéthyl)thymidine **16**: huile ; Rf(éluant P) = 0,52

$C_{20}H_{34}ClN_2O_{10}$ M = 497,95

RMN¹H (CD₃OD) : δ = *thymine* : 7,74 (1H, q, J=0,8Hz, H-6), 1,97 (3H, s₆, CH₃-thymine) ; *ribofuranose* : 6,37 (1H, t, J=6,8Hz, H-1'), 4,60 (1H, m, H-3'), 4,24 (1H, dd, J=3,1Hz, J=11,9Hz, H-5'a), 4,23 (1H, m, H-4'), 3,88 (1H, dd, J=5,5Hz, J=11,9Hz, H-5'b), 2,43 (2H, m, H-2'), *glucopyranose* : 4,54 (1H, d, J=7,9Hz, H-1''), 4,11 (1H, dd, J=6,3Hz, J=12,3Hz, H-6''b), 3,95 (1H, dd, J=2,1Hz, J=12,3Hz, H-6''a), 3,52 (1H, t, J=9,2Hz, H-3''), 3,49 (1H, ddd, J=2,1Hz, J=6,3, J=9,2Hz, H-5''), 3,39 (1H, t, J=9,2Hz, H-4''), 3,33 (1H, dd, J=7,9Hz, J=9,2Hz, H-2'') ; *chloroéthyle* : 4,33 (2H, t, J=6,4Hz, H- α), 3,83 (2H, t, J=6,4Hz, H- β).

CHAPITRE III

EVALUATION BIOLOGIQUE DE QUELQUES MOLECULES SYNTHETISEES

EVALUATION BIOLOGIQUE DE QUELQUES MOLECULES SYNTHETISEES

Les analogues de la chlorméthine **3b**, **7**, **8**, RBZK6, RBZK8 et le chlorambucil, qui servira de référence, (schéma 3.1) ont été évalués pour leur activité anticancéreuse sur les cellules A431, en utilisant comme référence le chlorambucil. Les tests ont été réalisés au Laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université Paris XIII sous la direction du professeur Michel Kraemer.

I. MATERIELS ET METHODES

I.1. Matériel chimique

I.1.1. Molécules

Nous avons étudié les effets de six molécules (schéma 3.1). Les trois premières ont été synthétisées au cours de ce travail, RBZK6 et RBZK8 ont été synthétisé au laboratoire dans le cadre du même programme de synthèse d'agents alkylants ; enfin le chlorambucil est la référence.

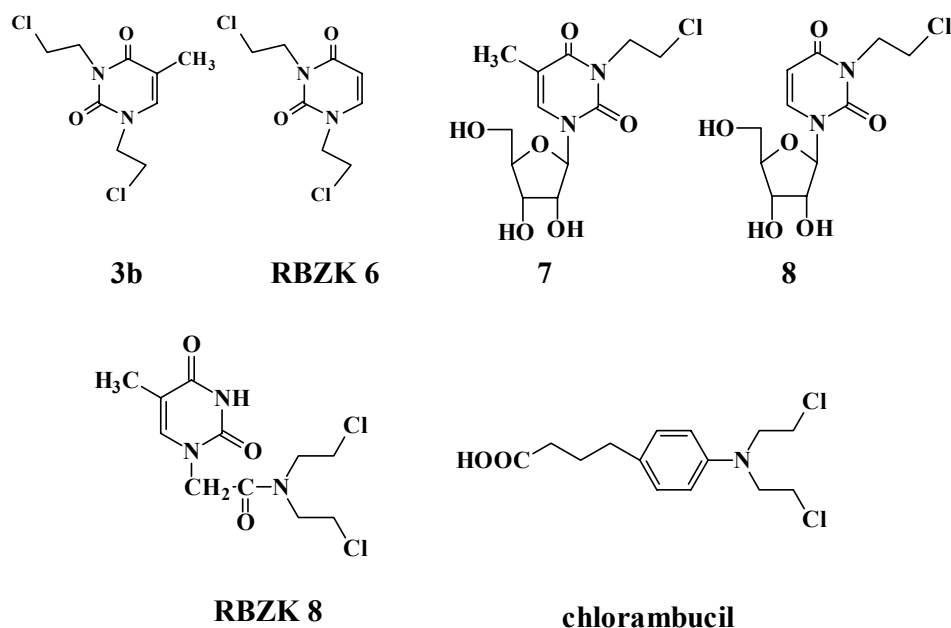


Schéma 3.1 : Structure chimique des molécules

Les solutions-mères sont préparées extemporanément. Les molécules sont dissoutes dans de l'eau distillée à une concentration de 10 mM (pH 7,4). Le chlorambucil, qui servira de référence, est préparé dans l'éthanol à une concentration de 10 mM.

I.2. Matériel biologique

I.2.1. Lignée cellulaire

Les études ont été menées sur des cellules de la lignée tumorale A431 provenant de l'ATCC (American Type Collection Culture). Cette lignée d'un carcinome épidermoïde vulvaire humain se caractérise par une morphologie de cellules épithéliales et un grand nombre de récepteurs à l'EGF (Malliri *et al.*, 1998). Par ailleurs, ces cellules sécrètent une quantité importante de VEGF, favorisant l'angiogenèse (Melnyk *et al.*, 1996).

I.2.2. Entretien cellulaire

La lignée cellulaire est cultivée dans un milieu de culture DMEM (4500mg/mL de glucose, pyruvate de sodium et glutaMAX), enrichi de 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté et contenant un mélange d'antibiotiques (50UI/mL de pénicilline, 50µg/mL de streptomycine) (Invitrogen). Les cellules sont ensemencées dans des T75 (Falcon) à raison de $5 \cdot 10^5$ à 10^6 cellules/10mL de milieu de culture et maintenues en culture dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂ en atmosphère humide. A confluence, les cellules sont rincées avec une solution saline de phosphate tamponnée (PBS ; Gibco) puis détachées par une solution de trypsine-EDTA (0,025 % de trypsine, 0,01 % d'EDTA ; Invitrogen) et ré-ensemencées au 1/10^{ème} de la confluence dans de nouvelles boîtes de culture. Chaque trypsination correspond à un passage numéroté.

I.3. Etude in vitro

I.3.1. Etude de la viabilité cellulaire

I.3.1.1. Tests MTT

L'effet des différents composés sur la viabilité cellulaire a été étudié grâce à un test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ; Sigma-Aldrich) (Mosmann, 1983).

I.3.1.1.1. Principe du test MTT

Les sels de tétrazolium, comme le MTT, peuvent être réduits en milieu alcalin et donner un composé coloré : le bleu de formazan. Les mitochondries sont capables de réaliser cette réduction grâce à leurs déshydrogénases membranaires. Ainsi, le nombre de mitochondries fonctionnelles, proportionnel au nombre de cellules vivantes, peut être quantifié en fonction de l'intensité de la coloration.

I.3.1.1.2. Etude des effets de doses et du temps

Les cellules sontensemencées dans des plaques de 96 puits (Falcon) à raison de $5 \cdot 10^3$ cellules/100 μ L dans du milieu complet (10% de SVF). Après 24h de culture, le milieu est enlevé et remplacé par du milieu à 2% de SVF contenant des concentrations croissantes de produits (15 μ M, 30 μ M, 60 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 500 μ M et 1mM). Après 72h de traitement, les cellules sont rincées au PBS puis incubées avec 100 μ L de MTT (0,2mg/mL de PBS) pendant 4h à 37 °C et 5 % de CO₂. Le MTT, réduit en bleu de formazan, est solubilisé par l'addition de 100 μ L/puits de DMSO (diméthylsulfoxyde ; Sigma-Aldrich). La densité optique (DO) est mesurée à 595nm grâce à un lecteur de plaque Labsystem Multiskan MS. Le pourcentage de viabilité cellulaire (%V) est déterminé selon la formule suivante :

$$\%V = [\text{DO}_{\text{cellules traitées}} / \text{Moy}(\text{DO}_{\text{cellules non traitées}})] \cdot 100$$

I.3.2. Etude de la migration et de l'invasion cellulaires

Nous avons étudié les effets de RBZK7, RBZK8 et CBL sur la migration et l'invasion des cellules A431. Pour cela, nous avons utilisé des chambres de culture (ou chambre de migration) appelées chambres de Boyden (Becton Dickinson). Ces chambres sont composées d'inserts constitués d'une membrane poreuse (membrane de 0,3cm², pores de 8 μ m), placés dans des plaques de 24 puits (plaques companions ; Falcon ; Becton Dickinson).

I.3.2.1. Préparation des inserts pour la migration

Pour l'étude de la migration cellulaire, l'intérieur des inserts (déposés dans les puits de la plaque companion) est recouvert de 100 μ L de fibronectine (à 100 μ g/mL dans du PBS) par inserts. Après une nuit à 4 °C, l'excédent de fibronectine est enlevé, les membranes sont

rincées 2 fois au PBS puis saturées 1 heure avec 1 % de BSA (albumine bovine ; Sigma-Aldrich). Le milieu avec 1 % BSA est enlevé.

1.3.2.2. Préparation des inserts pour l'invasion

Pour l'étude de l'invasion cellulaire, l'intérieur des inserts (déposés dans les puits de la plaque companion) est recouvert par 100µL de Matrigel à (10mg/mL PBS ; Becton Dickinson). La plaque de culture est alors placée dans l'incubateur à 37 °C pendant 3 heures, puis sous une hotte à flux laminaire (12 à 24 heures) pour permettre la polymérisation du Matrigel. Les inserts sont stockés à 4 °C puis réhydratés 24 heures avant l'expérience avec 500µl de milieu.

1.3.2.3. Préparation des cellules pour la migration

Les cellules A431 sontensemencées dans des T25 à raison de $1,7 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^6$ cellules/5mL/T25 dans du milieu de culture à 10 % de SVF. Après 24h, les cellules sont rincées au PBS puis traitées par 50 ou 100 µM de **8**, RBZK8 et chlorambucil (dilution dans du milieu à 10% de SVF) pendant 24h. Des cellules, servant de témoins, ne sont pas traitées (milieu 10 % SVF). Après les traitements par les différentes molécules, les cellules sont rincées au PBS, détachées à la trypsine, puis comptées. Elles sont alors diluées dans du milieu dépourvu de sérum mais additionné de 0,1 % de BSA.

1.3.2.4. Préparation des cellules pour l'invasion

Les cellules ne sont pas pré-traitées mais sont mises en même temps que **8**, RBZK8 et chlorambucil à 50 ou 100 µM dans les inserts.

1.3.2.5. Migration cellulaire

Les cellules pré-traitées et non traitées (témoins) sont déposées dans les inserts recouverts de fibronectine à raison de $10 \cdot 10^4$ cellules/500µL/insert dans du milieu 0,1 % de BSA. Du milieu à 10 % de SVF est placé comme chémoattractant dans les puits de la plaque companion (500µL/puits), afin de permettre la formation d'un gradient chimiotactique de part et d'autre de la membrane poreuse (schéma 3.2). Après 24h de migration dans l'incubateur à 37 °C, le surnageant est enlevé et les inserts sont rincés au PBS sur chaque face. Les cellules n'ayant pas migré à travers les pores (face interne des inserts) sont éliminées par grattage avec

un coton-tige, celles qui ont migré sur la fibronectine (face externe des inserts) sont fixées pendant 10min au méthanol, puis colorées au crystal violet. Les cellules sont comptées au microscope (Zeiss Axiophot). L'ensemble des cellules est compté (grossissement X200) et les pourcentages de migration sont déterminés en comparant le nombre de cellules pré-traitées qui ont migré ($N_{\text{traitées}}$) au nombre de cellules non traitées qui ont migré ($N_{\text{non traitées}}$). Ainsi :

$$\% \text{Migration} = (N_{\text{traitées}}/N_{\text{non traitées}}) \cdot 100$$

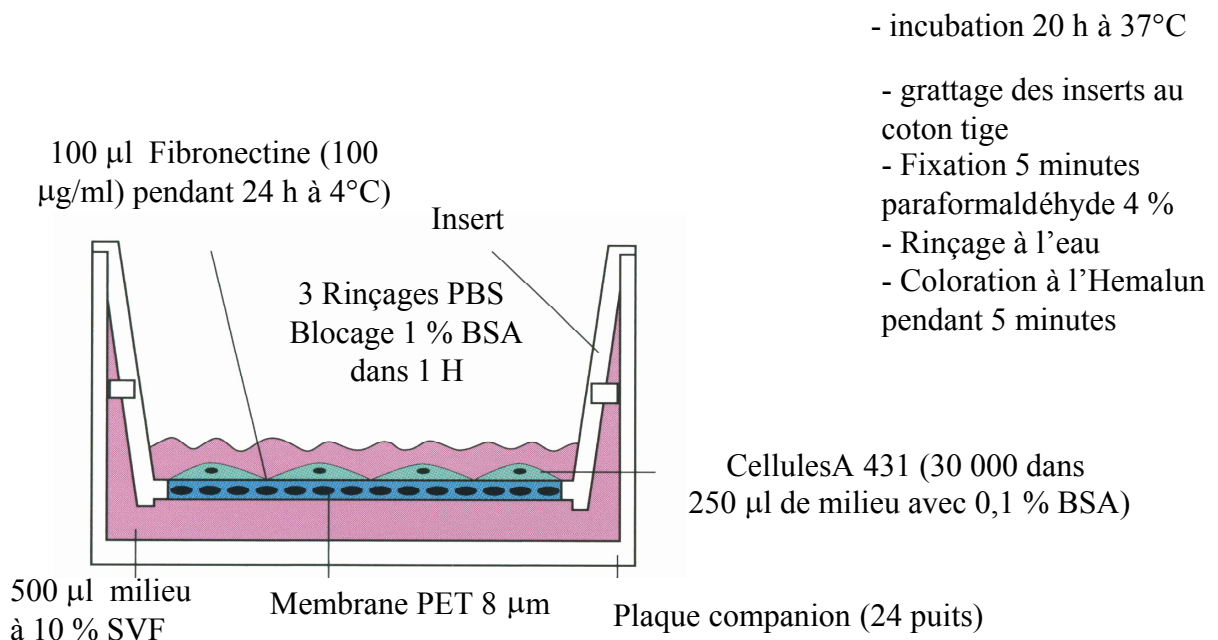


Schéma 3.2 : Principe de la migration et de l'invasion cellulaires en chambre de Boyden.

1.3.2.6. Invasion cellulaire

Les cellules non traitées sont déposées dans les inserts recouverts par le Matrigel à raison de $10 \cdot 10^4$ cellules/500µL/insert dans du milieu 0,1 % de BSA contenant différentes concentrations de **8**, RBZK8 et chlorambucil. Comme précédemment, du milieu à 10 % de SVF est placé dans les puits de la plaque companion (500µL/puits). Après 24h d'invasion dans l'incubateur à 37 °C, les inserts sont récupérés et les cellules ayant traversé le Matrigel sont lavées, fixées, colorées et comptées comme décrit pour l'étude de la migration. Des pourcentages d'invasion cellulaire sont calculés de la même manière que les pourcentages de migration.

I.3.2.7. Zymographie

I.3.2.7.1. Principe

L'activité gélatinolytique des métalloprotéases 2 et 9 contenues dans les surnageants de culture ainsi que celle de leurs formes zymogènes est étudiée par zymographie. Il s'agit d'une électrophorèse SDS-PAGE effectuée en conditions non réductrices. Le substrat de la protéase étudiée (gélatine) est copolymérisé avec l'acrylamide.

Les cellules sontensemencées dans des plaques de 6 puits (Falcon) à raison de 50.10^4 cellules/2mL dans du milieu complet (10 % de SVF). L'expérience comporte des temps de traitement des cellules de 24h, 48h et 72 h. Après 24h de culture, le milieu est enlevé et remplacé par du milieu sans SVF pour les cellules non traitées, et 0,015 mM de **8** pour les cellules traitées pour la première plaque. Les autres plaques sont maintenues avec 10 % de SVF pour 24h et 48 h supplémentaires. Les surnageants des cellules A431 (sans sérum) sont récoltés toutes les 24 heures de traitement. Les surnageants sont concentrés avec des centrifuges 1000g pendant 1h30 (Millipore) puis dilués dans un tampon d'échantillon non réducteur SDS 4X, 30 minutes à température ambiante avant le dépôt sur un gel de polyacrylamide 10 % co-polymérisés avec 1 mg/mL de Gélatine (Gélatine type B ; Sigma-Aldrich) ; substrat préférentiel des MMP-2 et MMP-9. L'électrophorèse débute à 60V pendant 20 minutes puis continue à 160V à 4 °C. Après migration, le SDS est éliminé par des lavages successifs dans une solution de Triton sous agitation à température ambiante pour permettre la renaturation des protéines, puis à l'eau distillée. Les gels sont incubés dans un tampon de digestion (50mM Tris-HCl pH 7,4 ; 0,2M NaCl ; 5 mM CaCl₂ ; 0,05 % Brij 35) contenant les éléments nécessaires à l'activité enzymatique des MMPs durant 19 heures à 37 °C. Le gel est enfin coloré pendant 1 heure dans une solution à 30 % de méthanol, 10 % d'acide acétique et 0,5 % de Bleu de Coomassie R.250 puis décoloré dans des bains à 30 % de méthanol, 10 % d'acide acétique. Les gélatinases sont révélées par une bande claire sur un fond bleu, correspondant à la protéolyse locale de la gélatine dans le gel.

Sur chacun des zymogrammes réalisés, une fraction de surnageant issue de la culture de la lignée HT1080 (Fibrosarcome humain, ATCC) et sécrétant les pro-MMP2 et pro-MMP9 en quantité importante est déposée en parallèle des échantillons analysés. La quantification des plages de lyse est effectuée par analyse semi-automatique. La surface (μm^2), ainsi que la densité grise des plages de lyse sont mesurées pour chaque dépôt effectué, les activités pro-MMP2 sont alors exprimées en teinte gris/ μm^2 . Les activités ainsi mesurées sont ramenées au nombre de cellule déterminées dans chaque puits dont sont issus les échantillons analysés (dosage de protéines). De façon à pouvoir normaliser l'ensemble des valeurs obtenues et

effectuer une comparaison des activités mesurées à partir des différents gels, la valeur d'activité mesurée pour la plage de lyse correspondant à l'activité pro-MMP2 sécrétée par HT1080 est prise pour référence et chacune des valeurs lui est comparée.

II. RESULTATS

II.1. Effets de **3b**, **7**, **8**, **RBZK6**, **RBZK8** et du chlorambucil sur la viabilité des cellules A431

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets de différentes concentrations de **3b**, **7**, **8**, **RBZK6**, **RBZK8** et chlorambucil sur la viabilité des cellules tumorales A431. Les cellules ont été incubées en présence de concentrations croissantes de produits (0,015 à 1 mM) pendant 72 h. La viabilité cellulaire est évaluée grâce à des tests MTT.

Une réduction de la viabilité de 50 % des cellules après 72 h de traitement correspond à l'IC₅₀ du produit. L'IC₅₀ du chlorambucil et du **RBZK8** sont de 15 µM. L'IC₅₀ de **8** est de 60 µM. Les trois autres produits **3b**, **7** et **RBZK6** se révèlent être moins efficaces et ne permettent pas, aux concentrations testées, d'atteindre l'IC₅₀ (schéma 3.3).

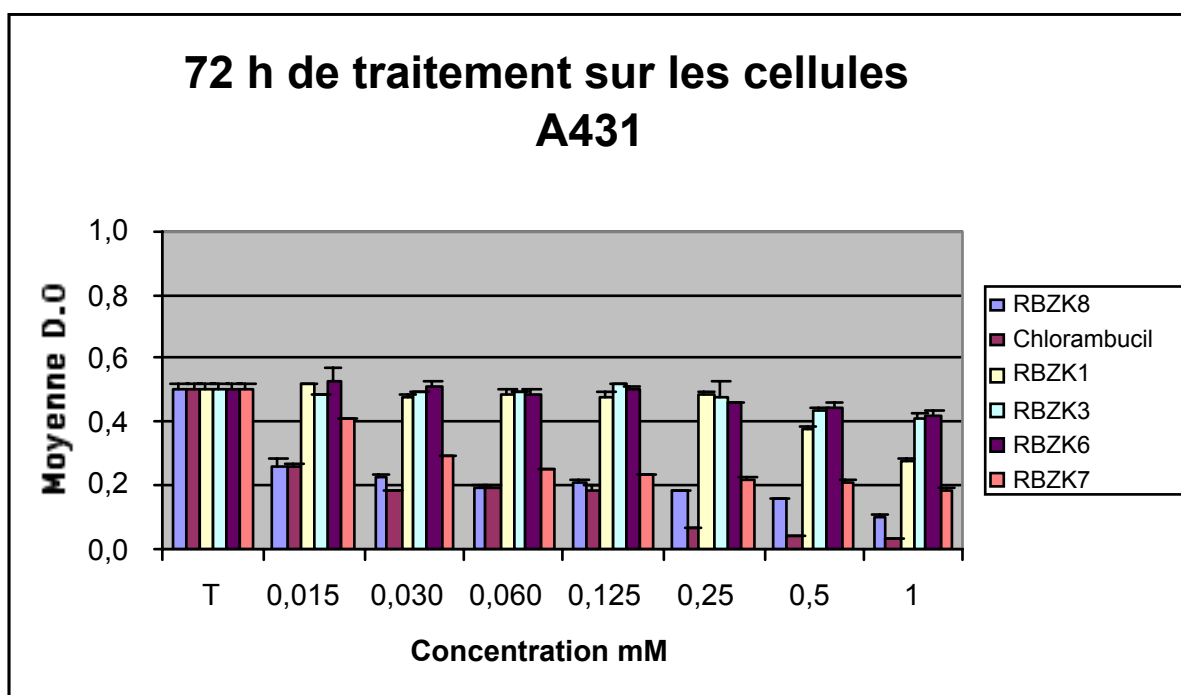


Schéma 3.3 : Effets du **3b**, **7**, **8**, **RBZK6**, **RBZK8** et Chlorambucil sur la viabilité des cellules A431.

Les cellules A431 ont été traitées pendant 72h avec des doses croissantes (0,015 à 1mM) de **3b**, **7**, **8**, **RBZK6**, **RBZK8** et chlorambucil. La viabilité cellulaire est estimée par tests MTT. Les résultats correspondent à la moyenne des pourcentages de viabilité par rapport au contrôle (cellules non traitées) calculés sur 3 expériences séparées.

Le chlorambucil, **8** et RBZK8 étant les produits les plus efficaces, nous avons testé leur efficacité sur l'inhibition de la migration et de l'invasion des cellules A431.

II.2. Effets de **8**, RBZK8 et du chlorambucil sur la migration des cellules A431

Les cellules A431 ont été traitées pendant 24 h avec 50µM ou 100 µM de **8**, RBZK8 et chlorambucil, puis déposées sur la matrice de fibronectine. Après 24 h de traitement, le chlorambucil à 50 ou 100 µM inhibe la migration des cellules A431 de plus de 95 % par rapport aux cellules non traitées (schéma 3.4).

Le composé **8** inhibe de façon dose dépendante la migration des cellules A431 respectivement de 69 % et 77 % pour 50 ou 100 µM. Le produit RBZK8 n'a été testé qu'à une concentration de 0,1 mM à laquelle il provoque une inhibition de la migration de 47 %.

L'inhibition de la migration pour ces 3 produits est significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules non traitées.

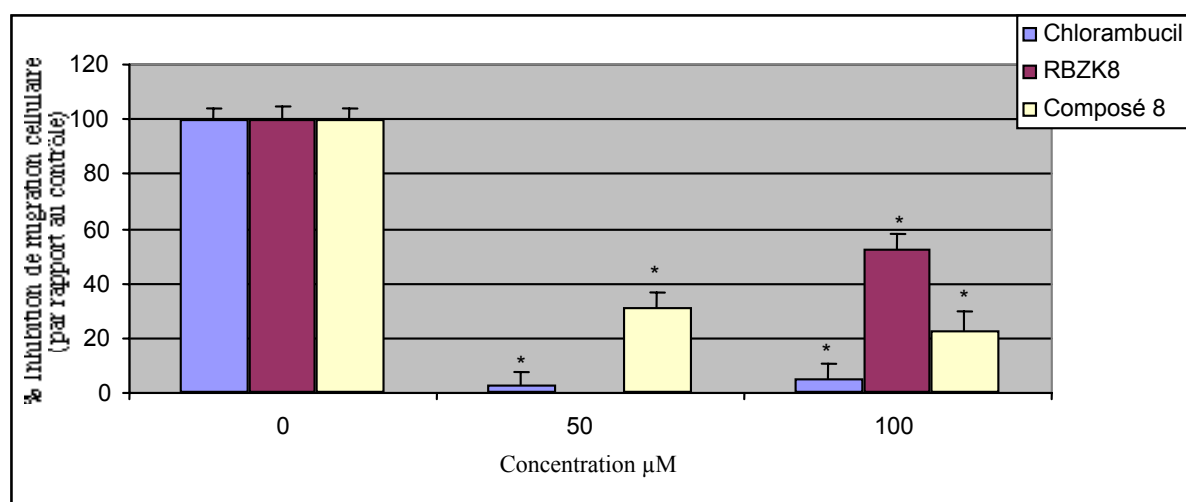
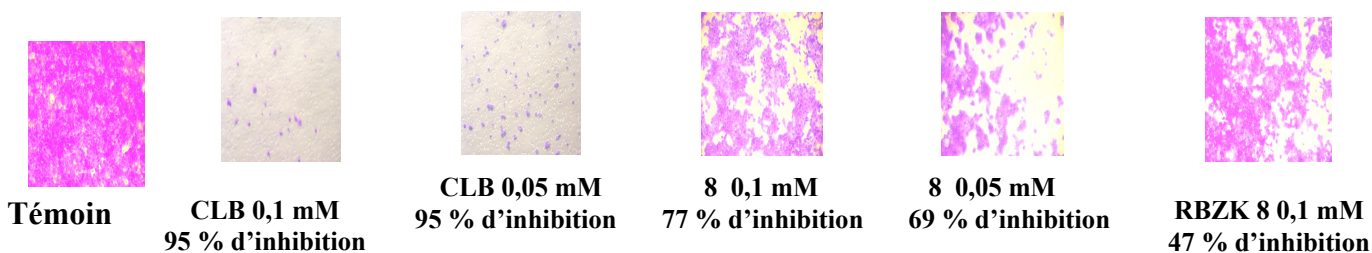


Schéma 3.4 : Effets du composé **8**, RBZK8 et chlorambucil sur la migration des cellules A431 *in vitro* en chambre de Boyden.

Les cellules A431 prétraitées 24h avec différentes doses **8**, RBZK8 et chlorambucil (50 µM et 100 µM) sontensemencées dans des inserts de fibronectine. Après 24h, les cellules ayant traversé la membrane poreuse de l'insert et migré sur la fibronectine sont fixées, colorées et dénombrées sous microscope. Les résultats correspondent aux pourcentages moyens de cellules ayant migré à travers les pores par rapport au contrôle (cellules non traitées) calculés pour une expérience représentative sur 3 réalisées.



II.3. Effets de **8**, RBZK8 et du chlorambucil sur l'invasion des cellules A431

Les cellules A431 ont été déposées en même temps que les molécules à tester sur les inserts coâtés avec du Matrigel.

Après 24 h à 37 °C, les produits présentent un effet inhibiteur sur l'invasion des cellules A431 (schéma 3.5). Le chlorambucil inhibe l'invasion des cellules A431 d'environ 75 % à 50 et 100 μ M. Le composé **8** inhibe de façon dose dépendante l'invasion des cellules de 19 et 34 % à respectivement 50 et 100 μ M. RBZK8 inhibe l'invasion des cellules A431 de 37 % à 100 μ M. L'ensemble de ces résultats sont significativement différents ($p < 0,05$) par rapport aux cellules non traitées.

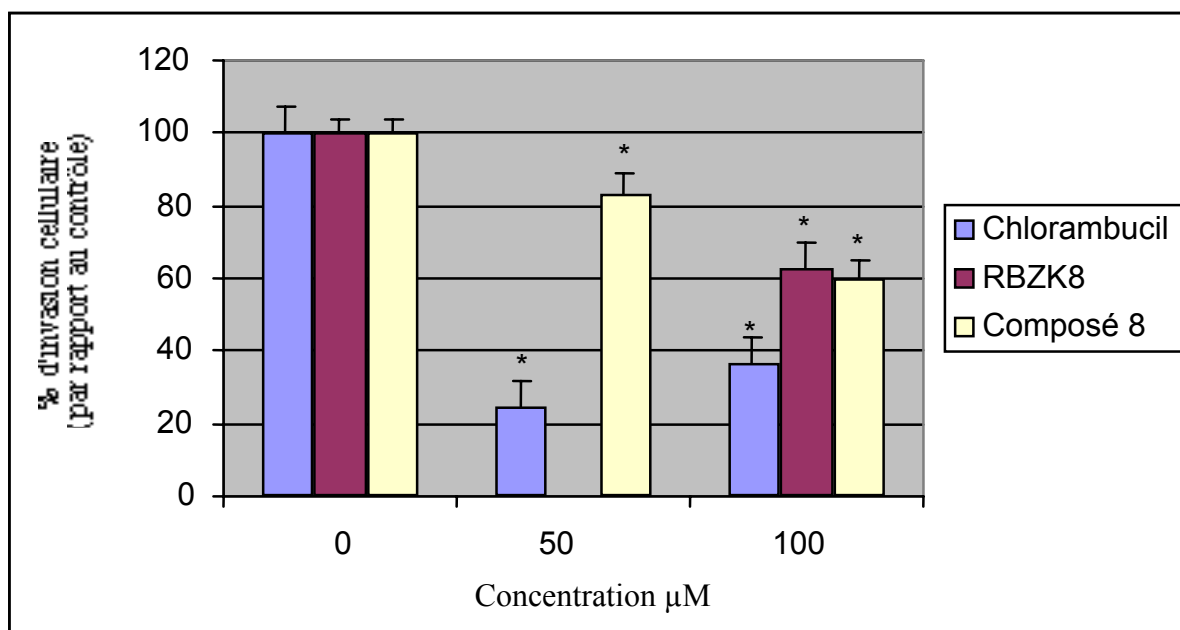
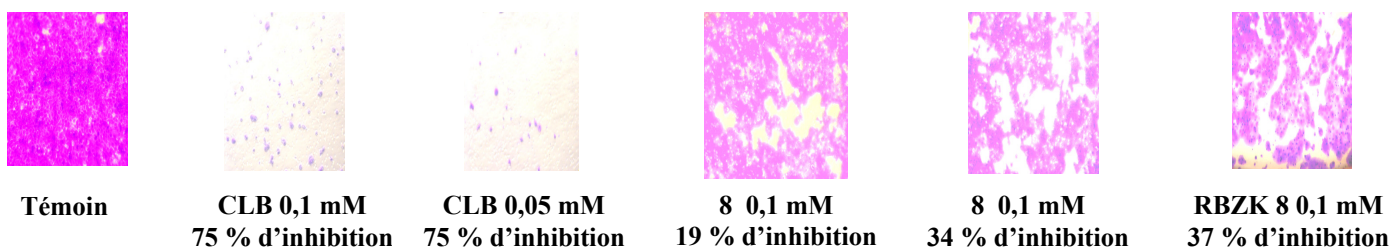


Schéma 3.5 : Effets du composé **8**, RBZK8 et chlorambucil sur l'invasion des cellules A431 *in vitro* en chambre de Boyden.

Les cellules A431 mises en présence des différentes concentrations de **8**, RBZK8 et Chlorambucil (50 μ M et 100 μ M) . Pour les témoins du milieu avec 0,1 % BSA sont ensemencées dans des inserts contenant du matrigel.

Après 24h, les cellules ayant traversé le matrigel et la membrane poreuse de l'insert sont fixées, colorées et dénombrées sous microscope. Les résultats correspondent aux pourcentages moyens de cellules ayant envahi le matrigel par rapport au contrôle (cellules non traitées) calculés pour une expérience représentative sur 3 réalisées.



II.4. Effets de **8** sur l'expression de MMP9, ProMMP9 et ProMMP2

L'expression de ProMMP2, MMP9 et ProMMP9 est visualisée sous forme de plages de lyses dont les poids moléculaires correspondent aux proMMP2 (72kDa), ProMMP9 (92 kDa) et MMP9 (88kDa).

Le produit **8** à 0,015 mM n'a pas d'effet sur l'expression de la ProMMP9, MMP9 et ProMMP2 après 24 h et 48 h de traitement. Après 72h de traitement, le composé **8** inhibe complètement l'expression de ProMMP9 et MMP9 et d'environ 60 % l'expression de ProMMP2.

III. CONCLUSION

Tous les agents alkylants que nous avons synthétisés ont fait l'objet de tests biologiques. De plus, nous avons également réalisé les tests sur un composé (RBZK8) préparé par ailleurs au laboratoire dans le cadre du même programme de synthèse d'agents anticancéreux.

Les produits **3b**, **7**, RBZK6 se sont révélés très peu efficaces et ne permettent pas, aux concentrations testées, d'atteindre l'IC50.

Les produits **8** et RBZK8 sont plus efficaces et montrent une activité très intéressante proche de celle du chlorambucil.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés, dans une première partie, à l'application de la réaction de métathèse des oléfines pour synthétiser des analogues de di- et trinucleosides reliés par une chaîne hydrocarbonée insaturée. Les homodimères 3-3, 3'-3' et 5'-5' pourraient être incorporés dans des séquences d'oligonucléotides en tant que pont inverseur, dans le but d'être utilisé dans la thérapeutique triple hélice. Le dinucleoside 3'-5' et le trinucleoside ouvrent comme perspective leur utilisation pour la synthèse d'analogues d'oligonucléotides dans lesquelles les liaisons phosphodiesters seraient remplacées par des chaînes carbonées. De telles liaisons permettraient à ces oligonucléosides de mieux résister aux attaques des nucléases dans les cellules.

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux agents alkylants. Ces derniers peuvent réagir avec les bases de l'ADN lors de la division cellulaire créant un lien chimique fort. Les premiers résultats sur l'activité biologique sont très encourageants.

Sur un plan perspectif, afin d'augmenter notre famille d'agents alkylants, nous proposons la N-chloroalkylation de certains de nos dinucleosides. Ces chaînes chloroalkyles pourront interagir avec les bases des acides nucléiques présentant des sites nucléophiles libres. Nous pensons également travailler sur d'autres bases pour voir si elles ont une influence sur l'activité biologique. Enfin, nous envisageons d'optimiser les rendements par des méthodes de chimie propre (chimie sans solvant ou chimie dans l'eau).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ¹ a) J.D. Watson, F.H.C Crick, *Nature*, (1953), **171**, 737; *id.*, 1953, **171**, 964.
b) F.H.C. Crick, J.D. Watson, *Proc. Roy. Soc. (A)* , 1954, **223**, 80.
- ² A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, *Principes de biochimie*, Ed : Médecine-Sciences, Flammarion, 2^{ème} édition, 1994, 336.
- ³ Transcriptase inverse : Enzyme virale nécessaire à la copie de l'ARN viral en ADN viral.
- ⁴ a) H. Schreier, *Pharm. Act. Helv.* , 1994, **68**, 145.
b) K.-Y. Jen; A.M. Gewirtz, *Stem Cells*, 2000, **18**, 307.
- ⁵ M. Kumar; G. G. Carmichael, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* , 1998, **62**, 4, 1415.
- ⁶ S. Buchini; C. J. Leumann; *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, **7**, 717-726.
- ⁷ M.J.P. van Dongen; H.A. Heus; S.S. Wymenga; G.A. van der Marel; J.H. van Boom; C. W. Hilbers,
Biochemistry, 1996, **35**(6), 1733.
- ⁸ M. L. Capobianco; M. De Champdoré; F. Arcamone; A. Garbesi; D. Guianvarc'h; P. B. Arimondo; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, **13**, 3209-3218.
- ⁹ a) M. Grigoriev; D. Praseuth; A.-L. Guieysse; P. Robin; N.T. Thuong; C. Hélène; A. Harel-Bellan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 3501.
b) D. Praseuth; A.L. Guieysse; C. Hélène, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1999, **1489**, 181.
- ¹⁰ C.V. Catapano; E.M. McGuffie; D. Pacheco; G. M. R. Carbone, *Biochemistry*, 2000, **39** (17), 5126.
- ¹¹ [www. ac-orleans-tours.fr](http://www.ac-orleans-tours.fr)
- ¹² S.C. Zimmerman; P. Schmitt, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 10769.
- ¹³ D. A. Horne; P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 2435.
- ¹⁴ S. Hoshika; Y. Ueno; H. Kamiya; A. Matsuda, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, **14**, 3333.
- ¹⁵ S. McCurdy ; C. Moulds; B. Froehler, *Nucleosides & Nucleotides*, 1991, **10**, 287.
- ¹⁶ N. Batoux; R. Benhaddou-Zerrouki; P. Bressolier; R. Granet; G. Laumont; A-M. Aubertin; P. Krausz, *Tetrahedron Lett.* , 2001, **42**, 1491.
- ¹⁷ L. De Napolì; A. Messere; D. Montesarchio, A. Pepe, G. Piccialli, M. Varra, *J. Org. Chem.* , 1997, **62**, 9024.
- ¹⁸ a) U. Asseline; N. Thang Thuong, *Tetrahedron Lett.* , 1993, **34**, 26, 4173.
b) U. Asseline; N. Thang Thuong, *Tetrahedron Lett.* , 1994, **35**, 29, 5221.
- ¹⁹ J. Tomasz, *Nucleosides & Nucleotides*, 1983, **2**, 1, 51.
- ²⁰ W. Pendergast; B. R. Yerxa; J. G. Douglass III; S. R. Shaver; R. W. Dougherty, C. C. Redick, I. F. Sims, J. L. Rideout, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* , 2001, **11**, 157.

- ²¹ V. T. Ravikumar; D. C. Capaldi; W. F. Lima; E. Lesnik; B. Turney; D. L. Colle, *Bioorg. Med. Chem.* 2003, **11**, 4673.
- ²² J. Michalski; W. Dabkowski, *C. R Chimie*, 2004, **7**, 901-907.
- ²³ M. Bollmark; M. Kullberg; J. Stawinski, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **43**, 515.
- ²⁴ K. Kamaiki, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 5803.
- ²⁵ a) B. Nawrot; B. Rebowska, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 6641.
b) T. Johansson; J. Stawinski, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **60**, 389.
c) L. A. Wozniak; M. Janicka, *Jour. Organo. Chem.*, 2005, **690**, 2658.
- ²⁶ a) A. De Mesmaeker; R. Häner; P. Martin; H. E. Moser, *Acc. Chem. Res.*, 1995, **28**, 366.
b) P. M. J. Jung; R. Beaudegnies; A. De Mesmaeker; S. Wendeborn, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 293.
c) I. Kers; J. Stawinski, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **55**, 11579.
- ²⁷ J. Magdalena; S. Fernandez; M. Ferreo; V. Gotor, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 1787.
- ²⁸ K. Lee; D. F. Wiemer, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 7808.
- ²⁹ S. Wenderborn; C. Jouanno; R. M. Wolf; A. De Mesmaeker, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 31, 5511.
- ³⁰ A. Gautier; C. Lopin ; G. Garipova ; I. Kalina; S. R. Piettre, *Journal of Fluorine Chemistry*, 2004, 125, 1745-1756.
- ³¹ S. Wenderborn; R. M. Wolf; A. De Mesmaeker, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 38, 6879.
- ³² H. Seliger; A. Fröhlich; M. Montenarh; J. F. Ramalho Ortigao; H. Rösch, *Nucleosides & Nucleotides*, 1991, **10**, 1-3, 469.
- ³³ P. S. Miller ; R. A. Cassidy ; T. Hamma ; N. S. Kondo ; *Pharmacology & Therapeutics*, 2000, **85**, 159-163.
- ³⁴ U. Asseline ; M. Chassignol ; J. Draus ; M. Durand ; J-C. Maurizot ; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003, **11**, 3499-3511.
- ³⁵ A. W Anderson ; N. G. Merckling, Brevet n°US 2721189. CAN 50:14596, 1955.
- ³⁶ P. Krausz ; F. Garnier ; J.E. Dubois, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 437-438.
- ³⁷ T. M. Trnka ; R. H. Grubbs, *Acc. Chem. Res.*, 2001, **34**, 18-29.
- ³⁸ a) Y. Chauvin, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1973, **276**, 169.
b) Y. Chauvin, D. Commereuc, D. Cruypelinck, *Makromol. Chem.*, 1976, **177**, 2637.
- ³⁹ R. R. Schrock ; J. S. Murdzek ; G. C. Bazn ; J. Robbins ; M. DiMare ; M. O'Regan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 3875.
- ⁴⁰ R. R. Schrock ; R. T. DePue ; J. Feldman ; C. J. Schaverien ; J. C. Dewan ; A. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 1423.

- ⁴¹ O. Fujimura ; G. C. Fu ; R. H. Grubbs, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 4029.
- ⁴² S. T. Nguyen ; L. K. Johnson ; R. H. Grubbs ; J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 3974.
- ⁴³ a) G. C. Bazn; J. H. Oskam; H. N. Cho; L. Y. Park; R. R. Schrock, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 6899.
- b) R. R. Schrock, *Top. Organomet. Chem.*, 1998, **1**, 1.
- ⁴⁴ S. T. Nguyen ; R. H. Grubbs ; J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 9858.
- ⁴⁵ P. Schwab ; R. H. Grubbs ; J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 100.
- ⁴⁶ A. Fürstner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39**, 3012-3043.
- ⁴⁷ K. C. Nicolaou, P. G. Bulger, D. Sarlah, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 4490-4527.
- ⁴⁸ A. Fürstner ; G. Seidel ; N. Kindler, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 8215.
- ⁴⁹ T. R. Hoye ; H. Zhao, *Org. Lett.*, 1999, **1**, 1123.
- ⁵⁰ A. Fürstner ; O. R. Thiel ; L. Ackermann ; H. J. Schanz ; S. P. Nolan, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 2204.
- ⁵¹ M. Scholl ; S. Ding ; C. W. Lee ; R. H. Grubbs, *Org. Lett.*, 1999, **1**, 953.
- ⁵² a) J. L. Hérisson ; Y. Chauvin, *Makromol. Chem.*, 1971, **141**, 161-176.
- b) Y. Chauvin, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1973, **276**, 169.
- ⁵³ A. Fürstner ; K. Langemann, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 3942-3943.
- ⁵⁴ E. L. Dias ; S. B. T. Nguyen ; R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 3887-3897.
- ⁵⁵ M. Ulman ; R. H. Grubbs, *Organometallics*, 1998, **17**, 2484.
- ⁵⁶ M. S. Sanford ; M. Ulman ; R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 749-750.
- ⁵⁷ A. J. Vernall ; A. D. Abell, *Aldrichimica Acta*, 2003, **36**, 3, 93-101
- ⁵⁸ M. A. Leeuwenburgh; G. A. Van der Marel; H. S. Overkleeft, *Current Opinion in Chemical Biologie*, 2003, **7**, 757.
- ⁵⁹ O Plettenburg ; C Mui ; V Bodmer-Narkevitch ; CH Wong, *Adv. Synth. Catal.*, 2002, **344**, 622.
- ⁶⁰ M. Lera; C. J. Hayes, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 2765.
- ⁶¹ R. Roy ; S. K. Das, *J.C.S. Chem. Commun.*, 2000, 519.
- ⁶² A. Kirsching; G.W. Chen, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 4665-4668.
- ⁶³ A. J. Phillips ; A. D. Abell, *Aldrichimica Acta*, 1999, **32**, 3, 75.
- ⁶⁴ a) F.P.J.T. Rutjes; H. E. Schoemaker, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 4, 677.
- b) C. M. Huwe; O.C. Kiehl; S. Blechert, *Synlett*, 1996, **65**.
- c) H. E. Blackwell; D. J. O'Leary; A. K. Chatterjee; R. A. Washenfelder; D. A. Bussman; R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 58.

- ⁶⁵ C. Kirchhoff; P. Nielsen, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 6475.
- ⁶⁶ D. F. Ewing; V. Glaçon; G. Mackenzie; D. Postel; C. Len, , *Tetrahedron Lett.*, 2003, **59**, 7, 941.
- ⁶⁷ P. Busca ; M. Etheve-Quelquejeu ; J. M. Valéry, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 9131.
- ⁶⁸ a/ C. Oliver Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 6250-6284
b/ J. Efskind, K. Undheim, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 2837-2839
c/ A. Fûrstner, F. Stelzer, A. Rumbo, H. Krause, *Chem. Eur. J.*, 2002, **8**, 1856-1871
- ⁶⁹ M. Smith; D. H. Rammler; I. H. Goldberg; H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 17, 430.
- ⁷⁰ a) E. J. Corey; A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 17, 6190.
b) S. Hanessian; P. Lavallee, *Can. J. Chem.*, 1975, **53**, 2975.
- ⁷¹ a) J. C. Wu; Z. Xi; C. J. Gioeli; Chattopadhyaya, *Tetrahedron*, 1991, **47**, 2237
b) M. Montebault; N. Bourgougnon; J. Lebreton, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 8091.
- ⁷² a) G.W. Chen; A. Kirschning, *Chem. Eur. J.* , 2002, **8**, 12, 2717
b) C. Cadot; P.I. Dalko; J. Cossy, *Tetrahedron Lett.* , 2002, **43**, 1839.
- ⁷³ a/ Montecvecchi, P. C.; Manetto, A.; Navacchia, M. L. ; Chatgililoglu, C. ; *Tetrahedron*, 2004, **60**, 4303-4308.
b/ Buchko, G. W. ; Hruska, F. E.; Sadana, K. L.; *Can. J. Chem.*, 1989, **67**, 109-119.
- ⁷⁴ a/ Ogilvie, K. K.; *Can. J. Chem.*, 1973, **51**, 3799-3807.
b/ White, J. D.; Kawasaki, M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 4991-4993.
- ⁷⁵ A. R. Maguire; I. Hladezuk; A. Ford, *Carbohydrate Research*, 2002, **337**, 369-372.
- ⁷⁶ L. Colombeau, R. Zerrouki, P. Krausz, Y. Champavier, *Letters in Organic Chemistry*, 2005, **2**, 613-615.
- ⁷⁷ Kirkiacharian, S. Guidede la Chimie Thérapeutique, Ellipse : Paris, 1996, p 519-550.
- ⁷⁸ Liu, L. F.; Row, T. C.; Yang, L.; *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 9182.
- ⁷⁹ Graham L. Patrick, *Chimie pharmaceutique*, De Boeck, 2003, 128-132.
- ⁸⁰ Schell, R. F.; Hall, B. E.; *Surgery, gynecology & obstetrics*, 1958, **106 (4)**, 459-65.
- ⁸¹ Br J Haematol ; *Annals of Internal Medicine*; 1998; **103**; 678-683.
- ⁸² Jacquillat,C.; Auclerc, G.; Duprez-Curely, J-P.; *Nouv. Presse Med.*, 1979, **8**, 2591-2595.
- ⁸³ a) J. L. Everett; J. J. Roberts; W. C. J. Ross, *J. Chem. Soc.*, 1953, 2386.
b) A. McLean; A. D. Newell; G. Baker; T. Connors, *Biochem. Pharmacol.*, 1980, **29**, 2039.
- ⁸⁴ Larionov, L. F.; Shkodinskaya, E. N.; Vasina, O. S.; Khokhlov, A. S.; Trusheikina, V. I., 1957

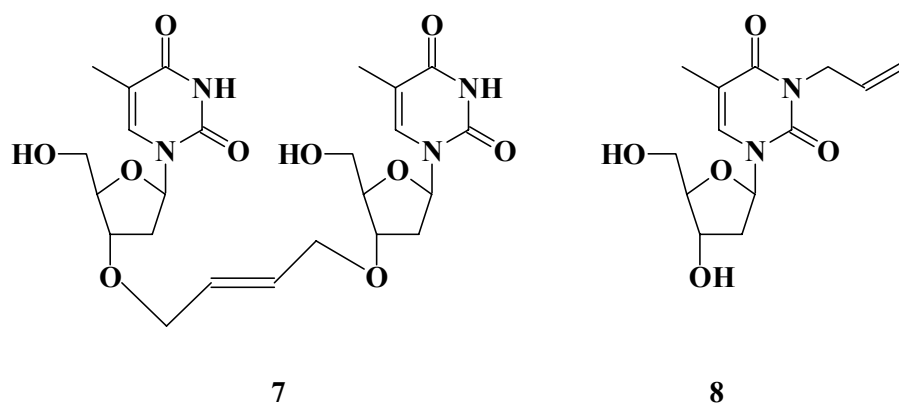
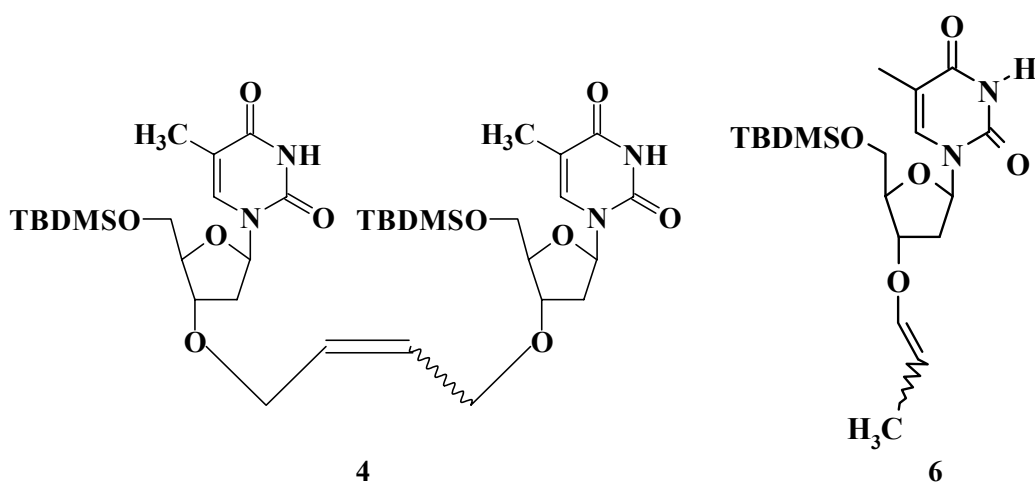
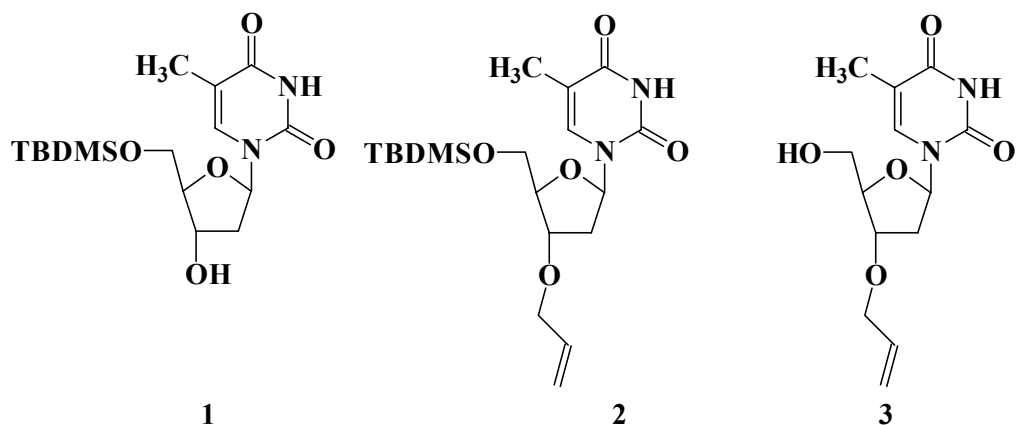
- ⁸⁵ B. Nawrot, O. Michalak, S. Olejniczak, M.W. Wieczorek, T. Lis, W.J. Stec, *Tetrahedron Letters*, 2001, **57**, 3979-3985.
- ⁸⁶ A.E.S. Abdel-Megied ; M.S. Motawia ; E.B. Pedersen ; C.M. Nielsen, *Heterocycles*, 1992, **34**, 713.
- ⁸⁷ P. Grandjean, R. Benhaddou, R. Granet, P. Krausz, *Tetrahedron Letters*, 1997, **38** (35), 6185-6188.
- ⁸⁸ V. Roy; R. Zerrouki; P. Krausz; S. Schmidt; A. M. Aubertin, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2004, **23**, 1625.
- ⁸⁹ A. Loupy, *Comptes Rendus Chimie*, 2004, **7** (2), 103-112.
- ⁹⁰ C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 6250-6284.
- ⁹¹ a) F. Staedtler, W. Suter, H-J. Martus, *Mutation Research*, 2004, **568**, 211-220.
b) W. Suter, ; U. Plappert-Helbig,; S. Glowienke,; F. Poetter-Locher, F. Staedtler, R. Racine,; H-J. Martus, *Mutation Research*, 2004, **568**, 195-209.
c) E. De Clercq; B. Rosenwirth, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1985, **28**, 246-251.
- ⁹² E. Fischer, B. Helferich, *Chem. Ber.*, 1914, **47**, 210.
- ⁹³ J. Davoll, B. Lythgoe, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1948, 967.
- ⁹⁴ J. Davoll, B. A. Lowy, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 1650, J. J. Fox, N. Young, J. Davoll, G. B. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 2117.
- ⁹⁵ G. E. Hilbert, T. B. Jobhson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1930, **52**, 2001.
- ⁹⁶ U. Neidballa, N. Vorbrüggen, *J. Org. Chem.*, 1974, **39**, 3654-3668.
- ⁹⁷ E. Ferrer, A. Schevchenko, R. Eritja, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2000, **8**, 291-297.
- ⁹⁸ E. Fischer, *Chem. Ber.*, (1893), **2**, 400.
- ⁹⁹ W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.*, (1901), **34**, 957.
- ¹⁰⁰ B.L. Helferich, S. Winkler, *Chem. Ber.*, (1933), **66B**, 1556-1558.
- ¹⁰¹ S. Hanessian, J. Banoub, *Carbohydrate Research*, 1977, **59**, 261-267.
- ¹⁰² R.R. Schmidt, J. Michel, *Tetrahedron Letters*, 1984, **25**, 821-824.
- ¹⁰³ B. Schuster, M. Winter, K. Herrman, *Z. Naturforsch., C: J. Biosc.*, 1986, **41** (5-6), 511-520.

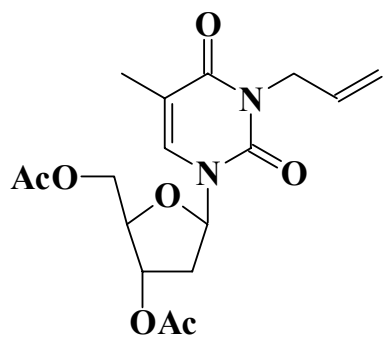
ANNEXE

STRUCTURES DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS

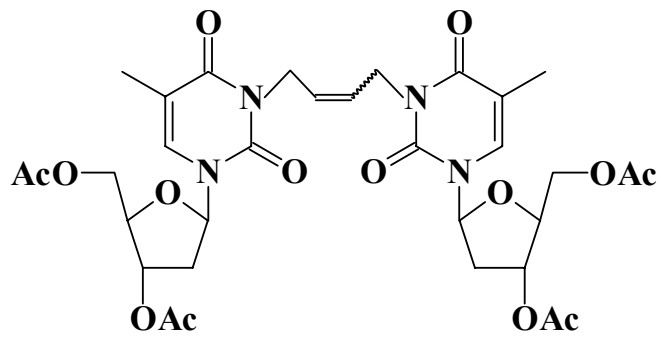
STRUCTURES DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS

1^{ère} partie

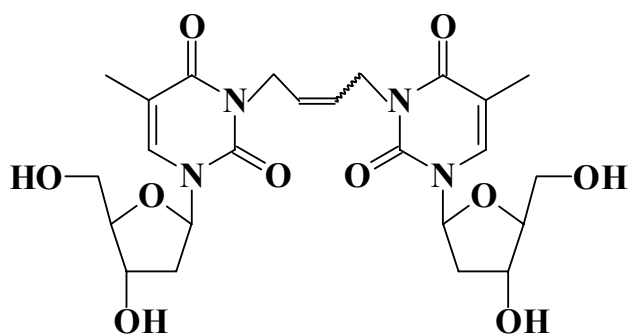




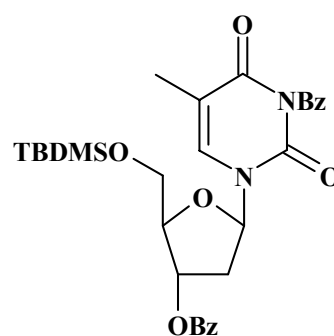
9



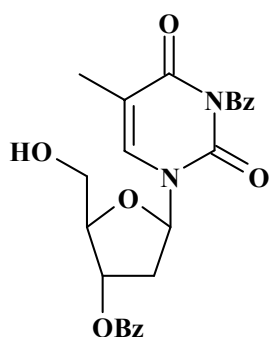
10



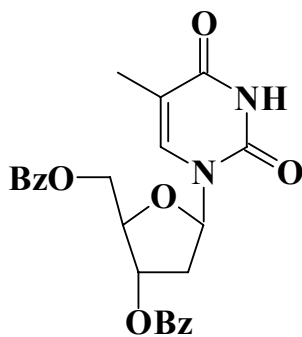
11



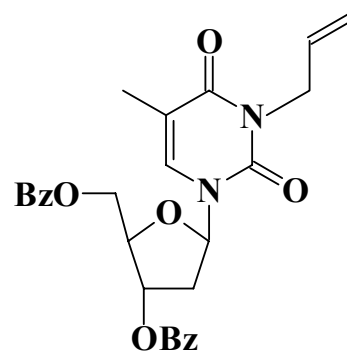
12



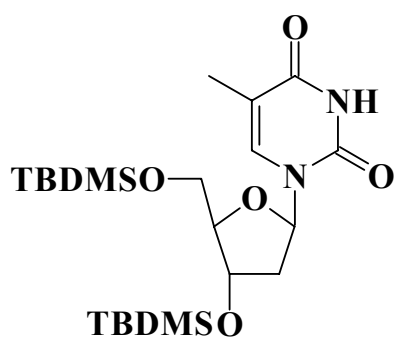
13



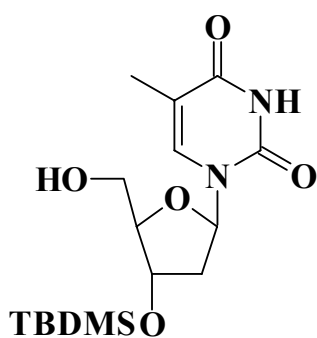
13'



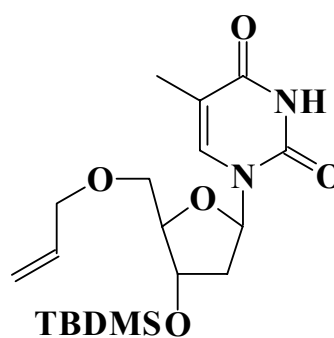
13''



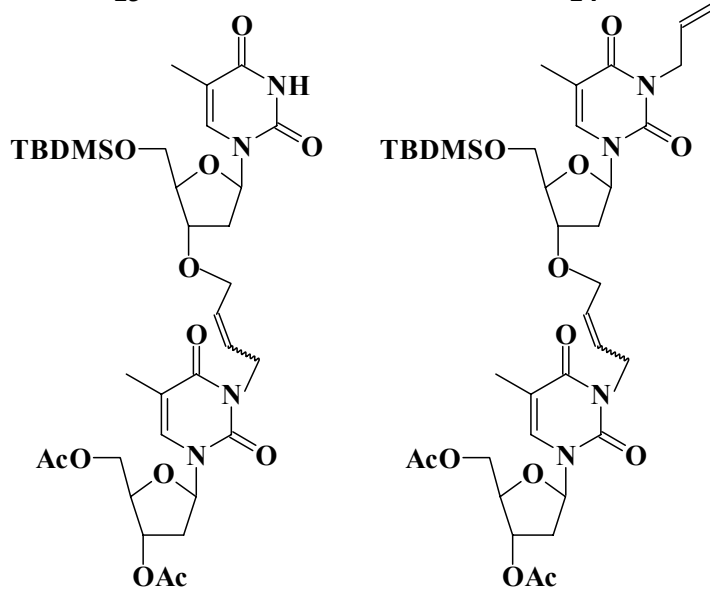
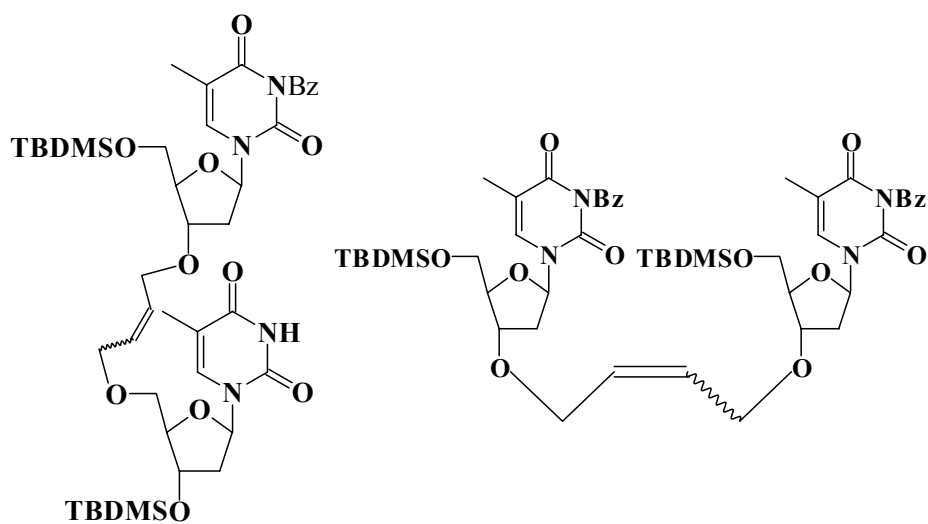
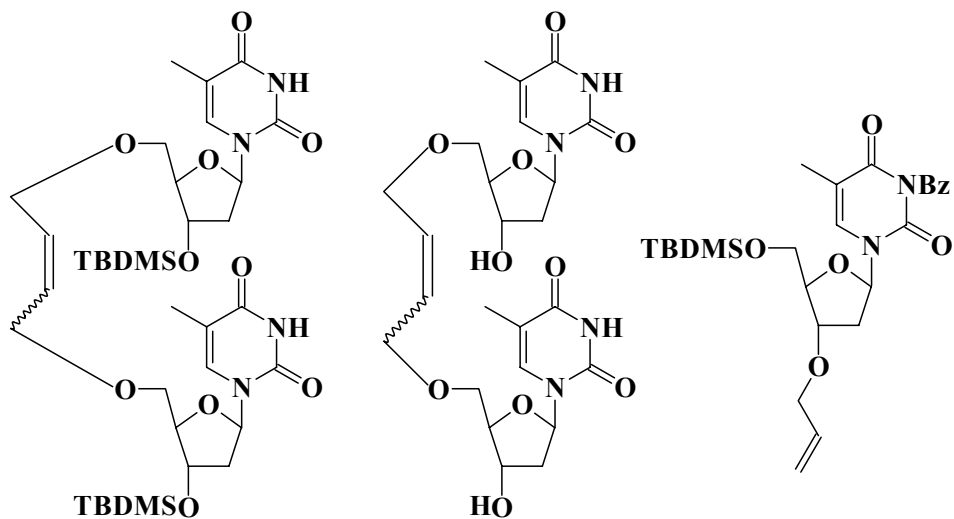
16

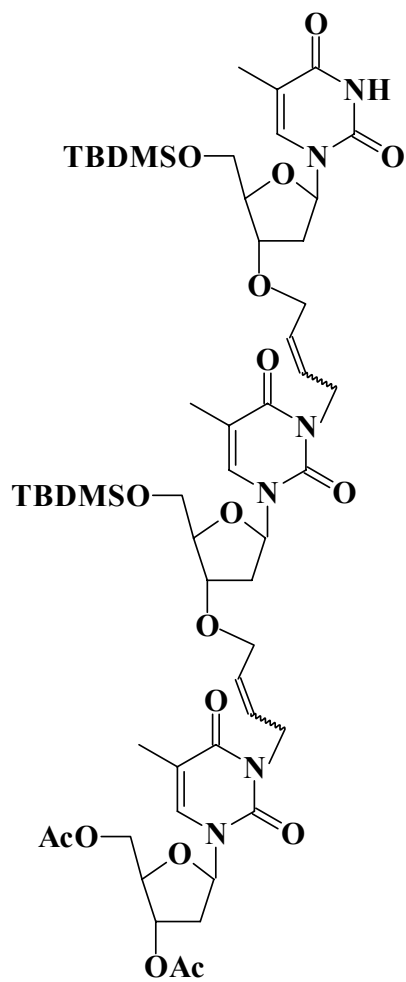


17

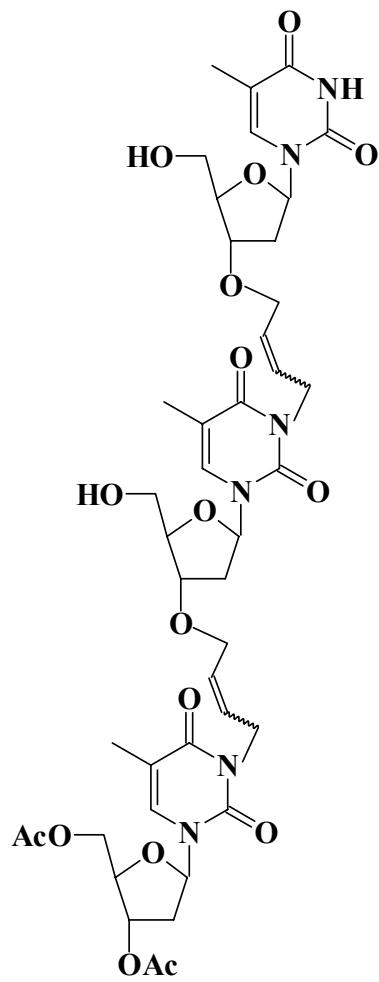


18

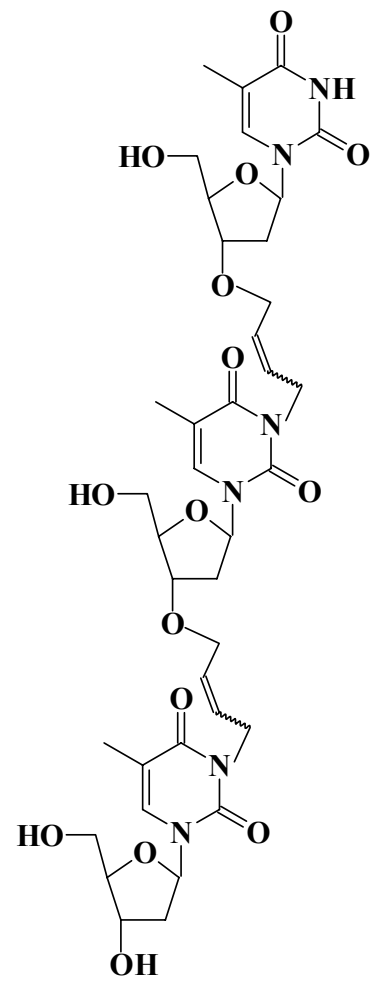




27

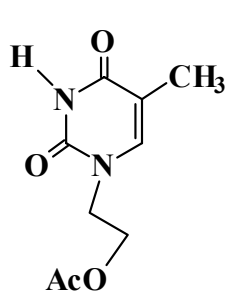


28

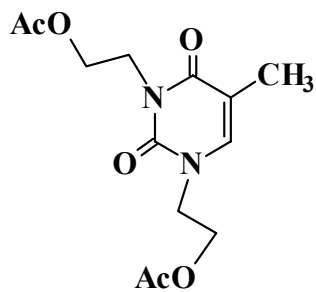


29

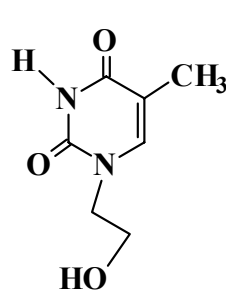
2^{ème} partie



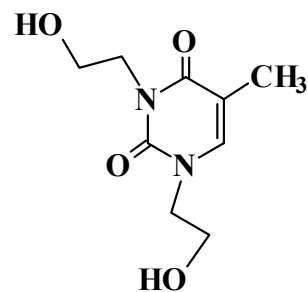
1a



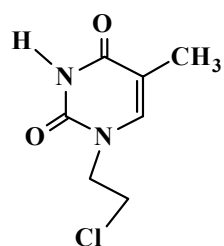
1b



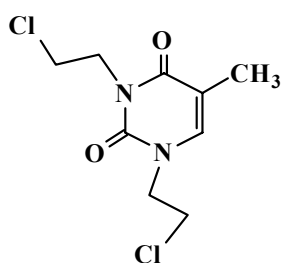
2a



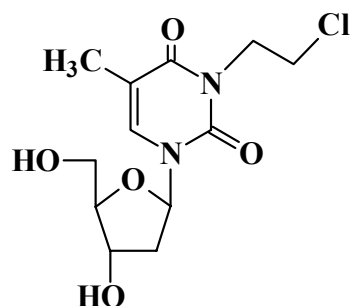
2b



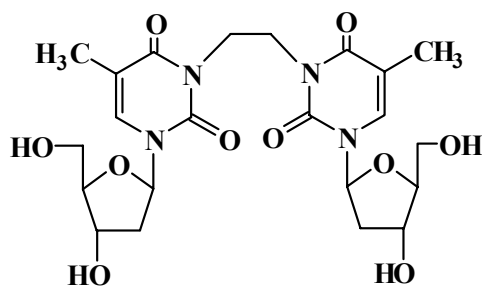
3a



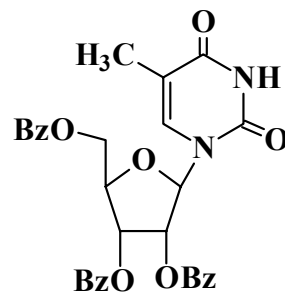
3b



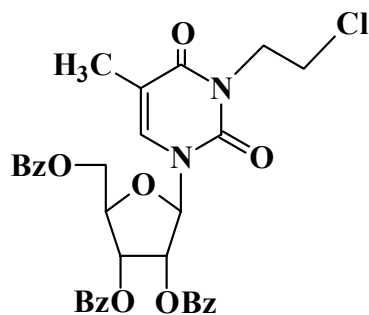
4



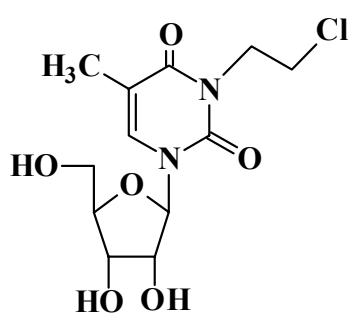
4'



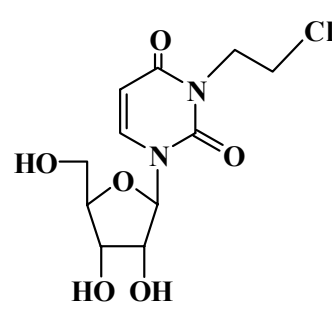
5



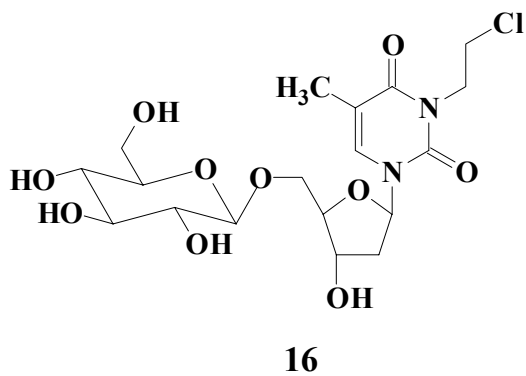
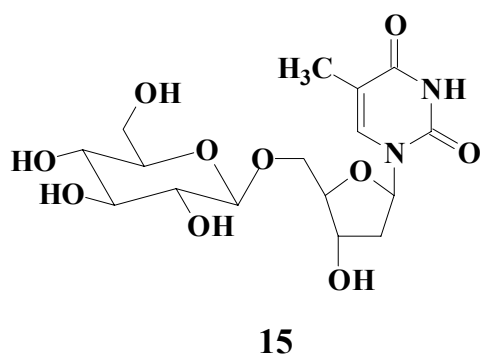
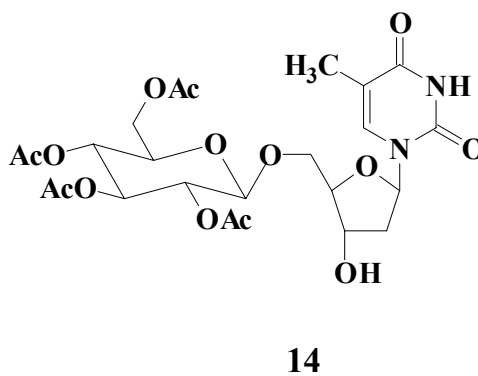
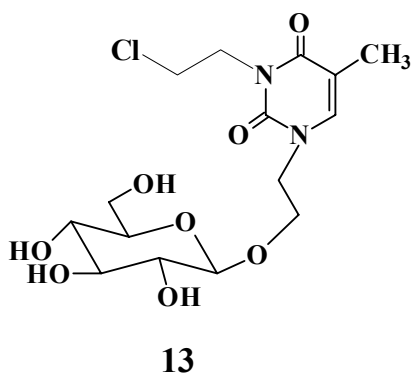
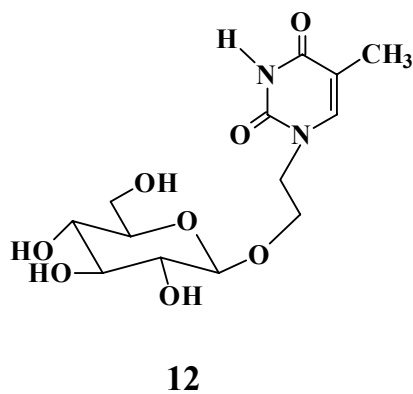
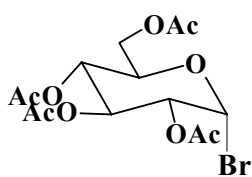
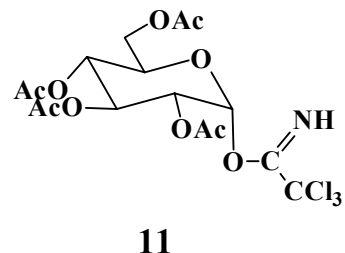
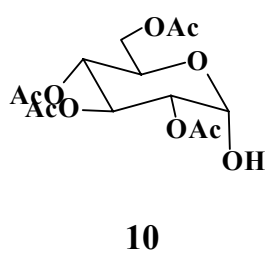
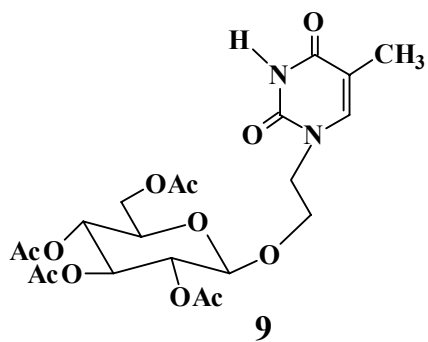
6



7



8



Résumé :

Nous décrivons la synthèse d'analogues d'oligonucléosides et de la chlorméthine à partir de bases pyrimidiques. Dans une première partie, la synthèse des analogues de dinucléosides reliés par une chaîne carbonée insaturée entre les positions 3', 3 et 5' à partir de la thymidine portant des groupements allyles est décrite. Un analogue de trinucleoside présentant la même chaîne carbonée entre les positions 3' et 3 a également été synthétisé. L'étape clé de ces synthèses utilise la réaction de métathèse des oléfines. Une étude de cette réaction par activation micro-onde a été réalisée. Dans une seconde partie, nous présentons la synthèse d'agents alkylants à partir de bases pyrimidiques, suivie de leur évaluation biologique. L'étape clé de ces synthèses est la fixation d'une ou deux chaînes chloroéthyle sur la base pyrimidique, dont une optimisation a été réalisée par activation micro-onde. Certains analogues ont été glycosylés afin d'augmenter leur index thérapeutique. Tous les produits synthétisés ont été caractérisés par différentes méthodes spectroscopiques. L'activité anticancéreuse de plusieurs agents alkylants synthétisés donne des résultats préliminaires très encourageants.

Abstract :

The synthesis of oligonucleoside and chlormethine analogues from pyrimidic bases is described. The first part presents the synthesis of dinucleoside analogues linked by an unsaturated hydrocarbon chain between positions 3', 3 and 5' from thymidine with an allyle group. One trinucleoside analogue containing the same hydrocarbon chain between the positions 3' and 3 is also synthesized. The key step of these syntheses is the use of olefin metathesis reaction. We performed a study of microwave-activated cross metathesis. In the second part, we present the synthesis and the biological activity of alkylating agents from pyrimidic bases. The key step of these syntheses is the fixation of one or two chloroethyle chains on pyrimidic base. An optimization of this step is obtained by microwave activation. Some analogues have been glycosylated to increase their therapeutic index. All synthesized products have been characterized by spectroscopic analyses. The antitumoral activity of several synthesized alkylating agents gave very interesting preliminary results.