



Université de Limoges
École doctorale Science- Technologique- Santé
Faculté des Sciences et Techniques

N° d'ordre : 9-2006

THÈSE

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Limoges

Mention : Chimie Appliquée- Chimie des Substances Naturelles

Présentée par

Amel Hadj-Bouazza

**Utilisation de bases pyrimidiques pour l'obtention de
nouveaux agents anti-viraux et anti-cancéreux**

Directeurs de thèse :

Mme Rachida ZERROUKI, Professeur

M. Pierre KRAUSZ, Professeur

Soutenance prévue le jeudi 30 mars 2006

Rapporteurs

P. ROLLIN

Professeur

Université d'Orléans

G. PLE

Professeur

Université de Rouen

Examineurs

F. HEYMANS

Professeur

Université Paris 7

P. KRAUSZ

Professeur

Université de Limoges

R. ZERROUKI

Professeur

Université de Limoges

à mes parents, Rachida, ma sœur et toute ma famille ...

REMERCIEMENTS

Quatre années déjà se sont écoulées depuis mon entrée dans le monde de la recherche. Pour moi, la seule évidence est qu'il s'agit de quatre années tout à fait remarquables et qui resteront dans ma mémoire comme une période d'apprentissage, d'échange et d'enrichissement tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Plusieurs personnes ont participé à cette aventure et méritent des remerciements. En premier lieu, je tiens à souligner l'implication majeure de ma directrice de thèse, le Professeur Zerrouki, une personne si précieuse par sa qualité d'encadrement, je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude. Rachida, je te remercie pour m'avoir donné la chance de travailler avec toi sur un sujet aussi passionnant, d'être toujours présente et prête à aider tes étudiants, d'être passionnée, rigoureuse et enthousiaste. Travailler sous ta direction était une très belle expérience, j'ai appris avec toi le goût de la recherche et l'ouverture d'esprit sur plusieurs domaines scientifiques. Tu as su orienter mes recherches en me faisant découvrir la synthèse organique. Je te remercie également pour tous les précieux conseils pédagogiques que tu m'as donnés et qui m'ont permis d'aborder mes activités d'enseignement avec beaucoup plus d'assurance. Sans oublier, les conseils que tu m'as donnés tout au long de la rédaction qui ont toujours été clairs, et m'ont facilité la tâche permettant l'aboutissement de cette thèse. Rachida, tu es pour moi un être humain exceptionnel et un modèle scientifique.

Mes sincères remerciements vont également au Professeur Krausz qui en agissant à titre de co-directeur a fortement enrichi ma formation, ses conseils, ses suggestions et commentaires m'ont été très utiles. Je le remercie également pour avoir bien voulu réviser la thèse. Mr Krausz, je vous remercie de nous accorder toutes les facilités pour mener à bien nos travaux.

Je remercie également l'ensemble des membres du jury : Professeur Rollin et Professeur Plé pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et le Professeur Heymans de l'avoir examiné.

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

Merci à tous les membres du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles qui m'ont accueillie au laboratoire à mon arrivée et qui se sont intéressés de près ou de loin à ce travail, et m'ont fait part d'observations et de remarques qui m'ont toujours beaucoup appris. Je voudrai remercier plus particulièrement Ludovic.

Pendant ces quatre années de thèse et bien avant, ma famille a été toujours présente. Papa et Mama, je ne serai jamais assez reconnaissante pour l'amour que vous me donnez. Merci de croire en moi et de m'avoir laissé partir loin de vous pour réussir. Sans vous, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie également les deux personnes, mon oncle et ma tante, qui étaient et restent toujours là pour moi depuis mon arrivée en France ; sur qui j'ai pu compter et qui m'ont aidé par leurs conseils et leur écoute. Leur affection a comblé le vide que j'ai pu ressentir loin de ma famille et leur protection m'a rassuré et m'a renforcé pour réussir dans un pays que je ne connaissais pas, je ne leur serai jamais assez reconnaissante.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE	3
1 ^{ÈRE} PARTIE : SYNTHÈSE D'ACYCLONUCLEOSIDES	4
I. INTRODUCTION	4
I.1. LES NUCLEOSIDES ET NUCLEOTIDES : DEFINITION, STRUCTURE.....	4
I.2. STRUCTURE ET FONCTION DE L'ADN ET DE L'ARN	6
II. IMPORTANCE THERAPEUTIQUE DES ANALOGUES DE NUCLEOSIDES ..	10
II.1. LE SIDA	10
II.1.1. GENERALITES	10
II.1.2. LE CYCLE DE REPLICATION DU VIH	11
II.1.3. LES AGENTS ANTI-VIH.....	13
II.1.3.1. les inhibiteurs de l'interaction gp120-CD4	13
II.1.3.2. les inhibiteurs de la transcriptase inverse	13
II.1.3.3. les inhibiteurs de l'intégrase	16
II.1.3.4. les oligonucléotides anti-gène ou antisens.....	17
II.1.3.5. les inhibiteurs de protéines Tat et Rev.....	17
II.1.3.6. les inhibiteurs de la protéase.....	18
II.1.3.7. la multithérapie	19
II.2. LE VIRUS HERPES SIMPLEX	19
II.2.1. GENERALITES	19
II.2.2. STRUCTURE DES VIRUS DE L'HERPES.....	20
II.2.3. CYCLE DE REPLICATION DE L'HERPES	21
II.2.4. LES AGENTS ANTIHERPETIQUES	23
II.2.5. MODE D'ACTION DES AGENTS HERPETIQUES	24
II.3. OBJET DU TRAVAIL	25
III. DEPROTECTION SELECTIVES DES HYDROXYLES SECONDAIRES	27
III.1. ETAT DE LA QUESTION	27
III.2. RESULTATS ET DISCUSSION	28
III.3. NOUVELLE METHODE DE DEBENZOYLATION SELECTIVE.....	29
III.3.1. DEPROTECTION SELECTIVE EN SERIE FURANOSE	29
III.3.2. CARACTERISATION SPECTRALE.....	30
III.3.3. DEPROTECTION SELECTIVE EN SERIE PYRANOSE	31
III.3.4. CARACTERISATION SPECTRALE.....	32
III.4. CONCLUSION	32
IV. SYNTHÈSE D'ACYCLONUCLEOSIDES	33
IV.1. INTRODUCTION	33
IV.2. SYNTHÈSE	34
IV.2.1. COUPLAGE DE LA BASE ET DU GLUCIDE.....	34
IV.2.1.1. Méthode de Fischer (ou Koenigs-Knorr) utilisant les sels de métaux lourds	34
IV.2.1.2. Méthode de Hilbert et Johnson	35
IV.2.1.3. Méthode de Vorbrüggen	35
IV.2.1.4. Résultats et discussion	37
IV.2.1.5. Caractérisation spectrale	37
IV.2.2. ALKYLATION DE LA THYMINE EN POSITION 3	38
IV.2.3. REACTIONS DE DEPROTECTION TOTALE DES HYDROXYLES	40

IV.2.4. COUPURE OXYDANTE ET REDUCTION	41
IV.2.4.1. Résultats et discussion	42
IV.2.4.2. Caractérisation spectrale	42
IV.2.5. AZIDATION DES ACYCLONUCLEOSIDES	43
IV.2.5.1. Résultats et discussion	45
IV.2.5.2. Caractérisation spectrale	45
IV.2.6. CHLORATION DES ACYCLONUCLEOSIDES	47
IV.2.7. DEPROTECTION DU GROUPEMENT BENZOYLE EN POSITION 5'	50
IV.2.8. DEPROTECTION DE LA FONCTION ACIDE CARBOXYLIQUE	51
CONCLUSION	54
V. PARTIE EXPERIMENTALE	55
V.1. MESURES PHYSIQUES	55
V.2. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ANALYTIQUE	55
V.3. CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVES	56
V.3.1. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE PREPARATIVE	56
V.3.2. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SILICE	56
V.4. REACTIFS ET SOLVANTS	56
V.5. SYNTHESSES	58
V.5.1. DEPROTECTION SELECTIVE DES HYDROXYLES SECONDAIRES	58
V.5.1.1. déprotection sélective en série furanose	58
V.5.1.2. déprotection sélective en série pyranose	60
V.5.2. GLYCOSYLATION	61
V.5.3. ALKYLATION DE LA THYMINE EN POSITION 3	62
V.5.4. DEPROTECTION TOTALES DES HYDROXYLES	63
V.5.5. COUPURE OXYDANTE ET REDUCTION	65
V.5.5.1. Préparation des réactifs	65
V.5.5.2. Oxydation-réduction	66
V.5.6. AZIDATION	69
V.5.7. CHLORATION	72
V.5.8. DEPROTECTION DU GROUPEMENT BENZOYLE EN POSITION 5'	75
V.5.9. DEPROTECTION DE LA FONCTION ACIDE CARBOXYLIQUE	76
2^{EME} PARTIE : ANALOGUES PYRIMIDIQUES DU CHLORAMBUCIL	79
MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE	79
I. INTRODUCTION	79
I.1. QU'EST CE QUE LE CANCER	79
I.2. LA CHIMIOThERAPIE ET LES AGENTS ANTICANCEREUX	80
I.2.1. LES ANTIMETABOLITES	80
I.2.2. LES AGENTS AGISSANT SUR LES FONCTIONS CELLULAIRES	81
I.2.3. LES AGENTS AGISSANT PRINCIPALEMENT AU NIVEAU DE L'ADN	81
I.2.3.1. les inhibiteurs de la topoisomérase I et II	81
I.2.3.2. les agents intercalants ¹ :	82
I.2.3.3. les agents alkylants	82
I.3. GENERALITES SUR LES DERIVES DE LA MOUTARDE A L'AZOTE	84
I.3.1. MECANISME D'ACTION DANS L'ORGANISME	84
I.3.2. LE CHLORAMBUCIL	87
I.3.3. RETROSPECTIVES DES ANALOGUES DU CHLORAMBUCIL	88
I.4. FINALITE DU TRAVAIL	89
II. ALKYLATION DE LA THYMINE	90
II.1. MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE :	90

II. 2. STRATEGIE ET RESULTATS	92
II.2.1. ACTIVATION PAR CHAUFFAGE CLASSIQUE	93
II.2.2. SYNTHÈSE PAR ACTIVATION MICRO-ONDES	93
II.2.2.1. Origine du chauffage des matériaux sous activation micro-onde :	93
II.2.2.2. Influences des micro-ondes sur les grandeurs d'activation	94
II.2.2.3. Résultats de l'activation micro-ondes.....	95
II.2.2.4. Caractérisation spectrale.....	97
III. TRANSFORMATION DU CARBONYLE EN POSITION 4 DE LA THYMINE	99
III.I. INTRODUCTION	99
III.2. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	102
CONCLUSION	111
IV. PARTIE EXPERIMENTALE.....	112
IV.1. REACTIFS ET SOLVANTS	112
IV.2. METHODES ET MATERIELS.....	113
IV.3. FOUR MICRO-ONDES	113
IV. 4. SYNTHÈSE	114
IV.4.1. REACTION D'ALKYLATION	114
IV.4.1.1. Alkylation par chauffage classique en présence de DBU	114
IV.4.1.2. Alkylation par chauffage classique en présence de NaH.....	114
IV.4.1.3. Alkylation par irradiation micro-ondes.....	115
IV.4.2. TRANSFORMATION DU CARBONYLE EN POSITION 4 DE LA THYMINE	118
IV.4.2.1. Passage par le groupement mesitylenesulfonyle.....	118
IV.4.2.2. Passage par le groupement triazolyle.....	119
IV.4.2.2. Passage par le groupement triazolyle.....	119
IV.4.2.3. Réaction de thionation	121
IV.4.2.1. Par chauffage classique:.....	121
IV.4.5. FIXATION DE LA DIETHANOLAMINE	123
IV.4.6. CHLORATION DES HYDROXYLES	125
CONCLUSION GENERALE	127
ESSAIS BIOLOGIQUES.....	128
STRUCTURES DES COMPOSES SYNTHETISES AU COURS DE CE TRAVAIL	130

Liste des abréviations

3TC	: 2',3'-didéoxy-3-thiocytidine
A	: adénine
ACV	: acyclovir
ADN	: acide déoxyribonucléique
ADN pol	: ADN polymérase
ANP	: analogues de nucléosides phosphonates
ARN	: acide ribonucléique
AZT	: 3'-azido-3'-déoxythymidine
Bz	: benzoyle
C	: cytosine
CD4	: protéine de surface des lymphocytes T et CD: cluster of differentiation
ccm	: chromatographie sur couche mince
CLB	: chlorambucil
D4T	: 2', 3'-didéhydro-2', 3'-didéoxythymidine
DBU	: 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène
DDC	: 2',3'-didéoxycytidine
DDI	: 2',3'-didéoxyinosine
DMAP	: 4-diméthylaminopyridine
DMF	: N,N-diméthylformamide
éq.	: équivalent
G	: guanine
HEPT	: 1-[(2-hydroxyethoxy)méthyl]-6-(phenylthio)thymine
HIV	: virus d'immunodéficience humaine
HMDS	: 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexaméthylidisilazane
HSV	: virus de l'herpès simplex
IR	: infrarouge
Ms	: mésyle
PMPA	: bis(isopropyloxyméthylcarbonyle)
PPI	: pyrophosphate inorganique
Rev	: régulation de l'expression des virions
Rf	: rapport frontal

R.L	: réactif de Lawesson
RMN	: résonance magnétique nucléaire
T	: thymine
TAT	: Trans-Activator of Transcription
TBDMS	: tertibutyldiméthylsilyle
TBDPS	: tertibutyldiphénylsilyle
TCD4	: lymphocyte T
Tf	: température de fusion
TFA	: acide trifluoroacétique
THF	: tétrahydrofurane
TIBO	: tétrahydroimidazo[4,5,1- <i>jk</i>][1,4]-benzodiazépine-2(1 <i>H</i>)-thione
TK	: thymidine kinase
TMS	: triméthylsilyle
TMSCl	: chlorure de triméthylsilyle

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les nucléosides constituent les éléments fondamentaux des acides nucléiques (ADN ou ARN). L'importance biologique de ces composés est apparue dès la première moitié du vingtième siècle en raison de leur rôle dans la transmission de l'information génétique et dans la synthèse des protéines. Cette fonction particulière implique que ces composés, après quelques modifications, constitue une source importante d'agents thérapeutiques.

Les très nombreuses recherches effectuées depuis les trois dernières décennies, ont montré des applications des nucléosides comme antirétroviraux, antiviraux et anticancéreux. Si des molécules comme l'AZT (3'-azido-3'-désoxythymidine, anti-HIV), le d4T (2',3'-didéhydro-2',3'-didésoxythymidine, également anti-HIV) ou l'acyclovir (9-(2-hydroxyéthoxyméthyl) guanine, anti-herpès) ont été largement médiatisées, on ne dispose que d'un éventail relativement modeste de molécules réellement actives.

La Chimie des nucléosides est extrêmement délicate car ceux-ci présentent de nombreux centres réactionnels aussi bien sur la partie base que sur la partie sucre. La modification chimique de ces composés nécessite donc une attention particulière aussi bien dans le choix des réactions employées que dans les protections des diverses fonctions.

La recherche de nouvelles molécules de types nucléosidiques reste un sujet d'actualité, en particulier en raison des phénomènes de résistance virale qui peuvent apparaître vis à vis de telle ou telle structure. En raison du grand nombre de cibles l'activité de ces composés ne peut cependant que très difficilement être prédite à l'avance, il est donc nécessaire de synthétiser de nouvelles molécules et de les tester.

La modification du nucléoside peut être effectuée soit au niveau de la partie base soit au niveau de la partie sucre. Dans ce dernier cas, la partie glucidique peut être parfois tout simplement remplacée par une partie acyclique.

Au cours de ce travail, nous nous sommes proposés de synthétiser quelques acyclonucléosides originaux en raison de leur impact vis à vis de nombreux virus et rétrovirus. Ceci nous a permis la mise au point d'une nouvelle méthode de débenzoylation sélective d'hydroxyles secondaires. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux analogues pyrimidiques du chlorambucil. Ce dernier est un anticancéreux et plus exactement un agent alkylant qui crée 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
Synthèse d'acyclonucléosides

CHAPITRE I
Les nucléosides, nucléotides
et leurs analogues
Etat de la question

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

I. INTRODUCTION

Les chercheurs, et plus particulièrement les chimistes, s'intéressent depuis longtemps aux nucléotides. Durant les années 50, la découverte de la structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et la compréhension du rôle des acides nucléiques au cœur des cellules, ont suscité un vif intérêt au sein du corps scientifique. L'inhibition du fonctionnement des acides nucléiques a fait l'objet de nombreux travaux en particulier il a clairement été démontré que les analogues de nucléosides interfèrent avec les nucléosides naturels, modifiant ainsi le métabolisme cellulaire. Les propriétés thérapeutiques de ces composés sont très variables : antitumorales, anticancéreuses ou antivirales.

Dans ce chapitre introductif, nous nous proposons de décrire la structure des nucléosides ainsi que leurs rôles dans les traitements du VIH et de l'herpès. Cela passera par une nécessaire présentation d'autres notions que sont les nucléotides, les polynucléotides ainsi que les acides nucléiques.

I.1. LES NUCLEOSIDES ET NUCLEOTIDES : DEFINITION, STRUCTURE

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction générale, les **nucléosides** sont des molécules naturelles d'une importance capitale car ils jouent un rôle essentiel dans de très nombreux processus biologiques. Ce sont des précurseurs de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et de l'acide ribonucléique (ARN) .

Ces acides sont constitués de sous unités appelées nucléotides, qui renferment le patrimoine héréditaire de chaque individu et le code génétique permettant à chaque cellule de reproduire deux cellules filles en tous points identiques aux modèles parentaux.

Du point de vue structural, les nucléosides résultent de l'assemblage d'une base azotée (purique ou pyrimidique) et d'une partie glucidique (ribose pour l'ARN et désoxyribose pour l'ADN), reliées entre elles par une liaison carbone-azote (schéma I.1)

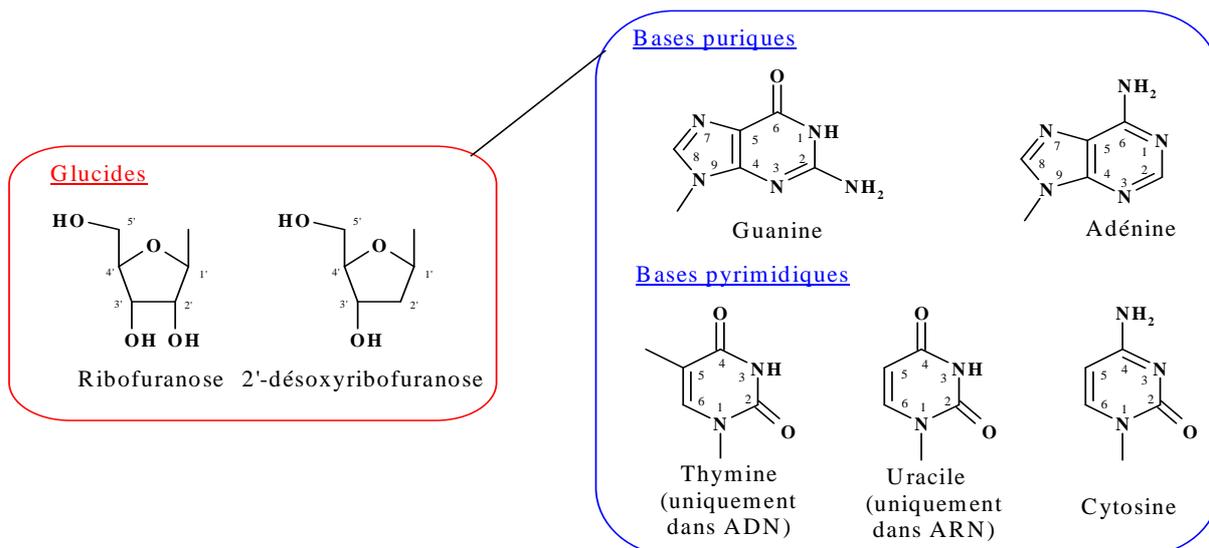


Schéma I.1 : Structure générale d'un nucléoside

Les nucléotides résultent de la phosphorylation des nucléosides. Ainsi on appelle **nucléotide**, tout motif complet qui comporte un groupe phosphate, un sucre et une base azotée (schéma I.2).

La liaison entre les différents nucléosides d'un nucléotide est assurée par de l'acide phosphorique qui estérifie les fonctions alcool en position 3' et 5' du sucre.

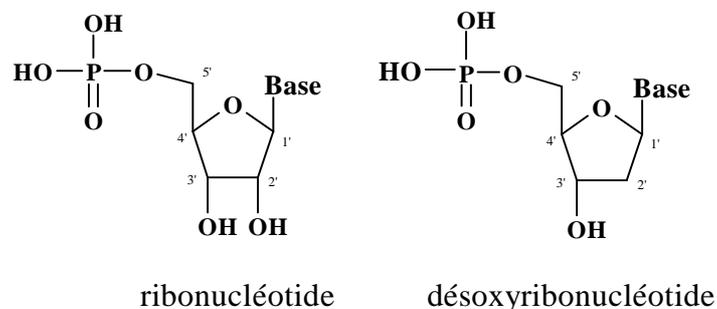


Schéma I.2 : Ribo- et désoxyribonucléotide

On appelle **polynucléotides** ou **oligonucléotides**, 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' d'un premier nucléotide et d'autre part l'hydroxyle en position 5' de l'autre nucléotide (schéma I.3).

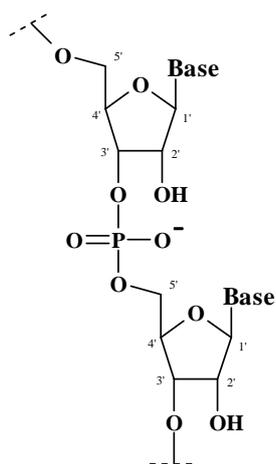


Schéma I.3 : Schéma d'un oligonucléotide

I.2. STRUCTURE ET FONCTION DE L'ADN ET DE L'ARN

J.D. Watson et F.H.C. Crick.¹ ont proposé en 1953, une structure de l'ADN. Elle comprend deux chaînes de polynucléotides présentant dans l'espace une configuration hélicoïdale : elles s'enroulent autour d'un axe central imaginaire en formant une double hélice (schéma I.4).

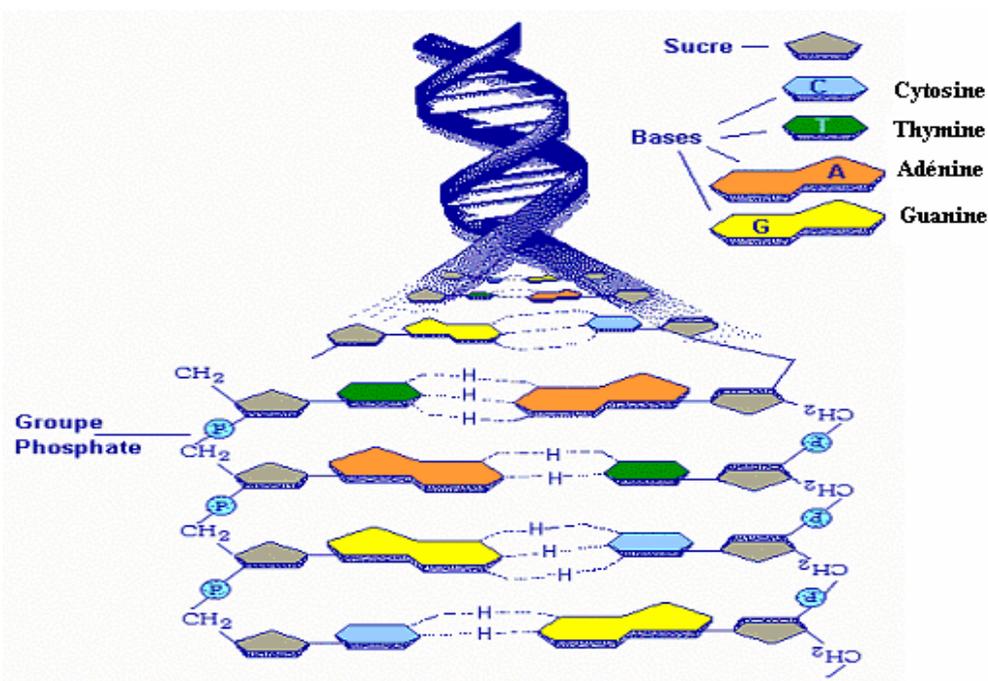


Schéma I.4 : Structure de l'ADN

¹ a) J.D. Watson, F.H.C. Crick, *Nature*, **171**, 737; (1953), *id.*, **171**, 964 (1953).
b) F.H.C. Crick, J.D. Watson, *Proc. Roy. Soc. (A)*, **223**, 80 (1954).

Ces deux brins de nucléotides sont antiparallèles, les deux squelettes pentose-phosphate se trouvent sur les bordures extérieurs de l'hélice, alors que les bases azotées se font face à l'intérieur et s'apparient par des liaisons hydrogène qui maintiennent ensemble les deux brins. Dans cette double hélice, chacune des bases azotées a un complément exclusif : l'adénine est toujours appariée avec la thymine et la guanine avec la cytosine (ces bases sont respectivement représentées par les lettres A, T, G et C (schéma I.5).

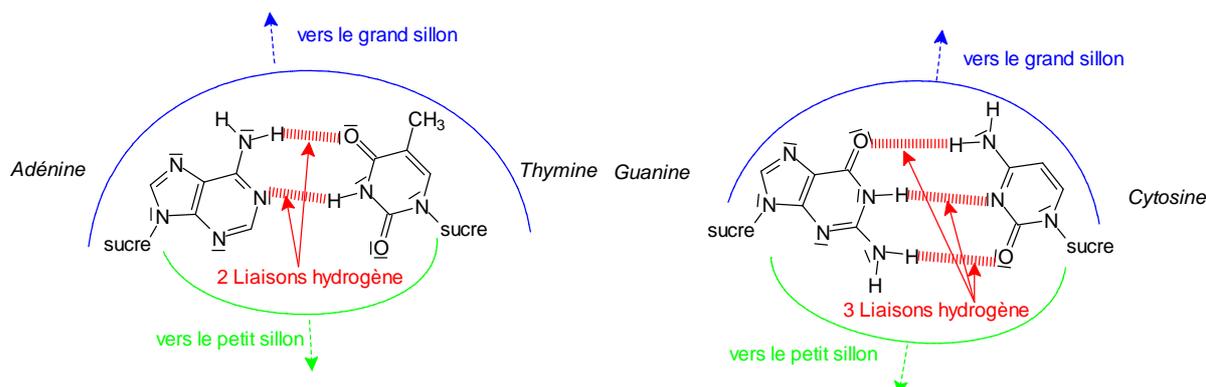


Schéma I.5 : Appariement des bases par liaisons hydrogène

Cet appariement spécifique est lié au fait que les liaisons hydrogènes ont des distances et des géométries bien déterminées: l'appariement de deux purines occuperait un volume trop grand pour permettre une hélice régulière alors que deux pyrimidines seraient trop éloignées pour former des liaisons stables. L'exactitude de cette règle d'appariement entraîne une complémentarité entre les séquences de bases de deux chaînes associées. Ainsi si la séquence 5'-ATGTC-3' existe sur l'une des chaînes, l'autre chaîne devra porter obligatoirement la séquence 3'-TACAG-5'.

Il existe plusieurs formes d'ADN dont la 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.

La structure de Watson et Crick - également appelée forme B de l'ADN - est la forme biologiquement la plus importante. Elle se caractérise par un pas à droite de l'enroulement de la double hélice.

Lorsque l'humidité est faible et que la salinité est forte, l'ADN se présente sous la forme A. Dans ce cas la double hélice a un pas à droite et un intervalle entre les paires de bases plus faible que dans l'ADN B. La molécule d'ADN dans la forme A est donc plus courte et de diamètre plus large que dans l'ADN B (schéma I.7)

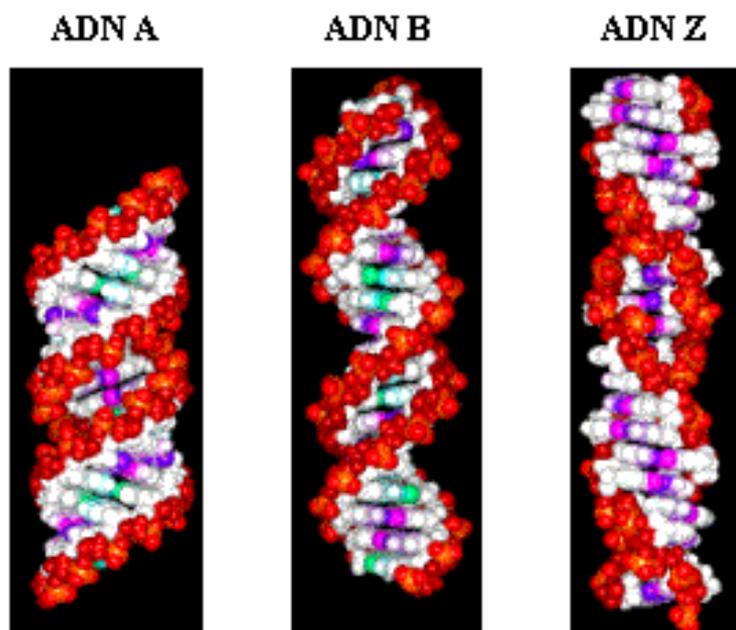


Schéma I.7 : Les différentes formes de l'ADN

Une troisième forme dite ADN Z se différencie par des hélices qui tournent vers la gauche. Cet ADN de gauche n'est pas l'image dans un miroir de l'ADN de droite. Il a une conformation différente de la forme B. Le squelette sucre-phosphate prend une disposition en zigzag (d'où le nom qui lui a été donné), l'hélice est plus svelte et moins torsadée (que le B-ADN), et l'intervalle entre les paires de bases est légèrement supérieur.

Quel est le rôle des acides nucléiques ?

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.

Les informations contenues dans l'ADN nécessaires pour la synthèse des différentes protéines vont être transmises de génération en génération par un processus dit de réplication. La complémentarité de la structure en double hélice a amené Watson et Crick à suggérer une manière selon laquelle l'ADN pourrait s'auto dupliquer et transmettre le code génétique. Selon ce mécanisme, chacune des deux chaînes d'ADN fonctionne comme une matrice, la double hélice se défait partiellement et les enzymes commencent à assembler le nouvel ADN en couplant les nucléotides les uns aux autres selon une séquence complémentaire de celle de la matrice, c'est à dire en faisant correspondre C à G et A à T (schéma I.8). Finalement deux doubles hélices complètes sont produites à partir de l'original.

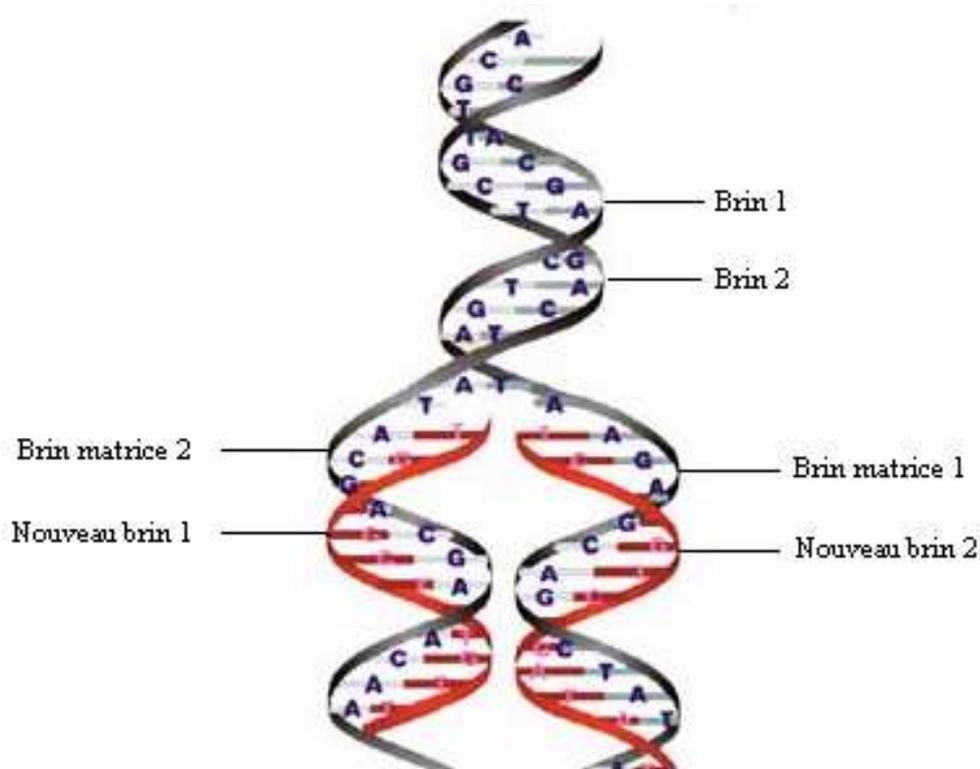


Schéma I.8 : Réplication de l'ADN

CHAPITRE II
Les analogues de nucléosides

II. IMPORTANCE THERAPEUTIQUE DES ANALOGUES DE NUCLEOSIDES

Les analogues de nucléosides constituent des structures aptes à inhiber les virus. Dans la présente étude bibliographique nous nous sommes particulièrement intéressé à deux maladies : le VIH et l'herpès simplex qui constituent de bons modèles de rétrovirus et de virus.

II.1. LE SIDA

II.1.1. GENERALITES

En 1981, aux Etats Unis puis en Europe, apparaît une nouvelle maladie infectieuse : le syndrome d'immunodéficience acquise ou sida. Cette épidémie est un fléau planétaire, et plus particulièrement dans les pays en voie de développement. Environ 14 millions de personnes sont décédées depuis le début de l'épidémie. Elle est due au virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1), virus le plus courant. Une autre épidémie due au VIH-2 moins agressif, fut identifiée postérieurement en Afrique de l'Ouest².

Le VIH appartient à la famille des lentivirus (ou rétrovirus lents) et est responsable du sida qui provoque un affaiblissement du système immunitaire de l'homme. Ce système est indispensable pour l'organisme car il est capable de reconnaître les agents infectieux et de leur opposer une cascade de réactions de défense. Ce sont les lymphocytes qui ont ce rôle de défense.

Le VIH se fixe sur la glycoprotéine CD4 des lymphocytes T et les infecte. Les lymphocytes T CD4 infectés sont progressivement détruits et leur concentration sanguine diminue. Au bout d'une dizaine d'années, le nombre de lymphocytes T CD4 atteint un certain seuil au dessous duquel le système immunitaire de l'organisme n'est plus capable de se défendre contre ces germes, bactéries ou virus, infections caractéristiques de la maladie.

Le but de la chimiothérapie est de bloquer la réplication virale en intervenant lors des différentes étapes du cycle viral.

² J.P.Lévy, *Pour la Science* Hors-série, 26-32 (octobre 1995).

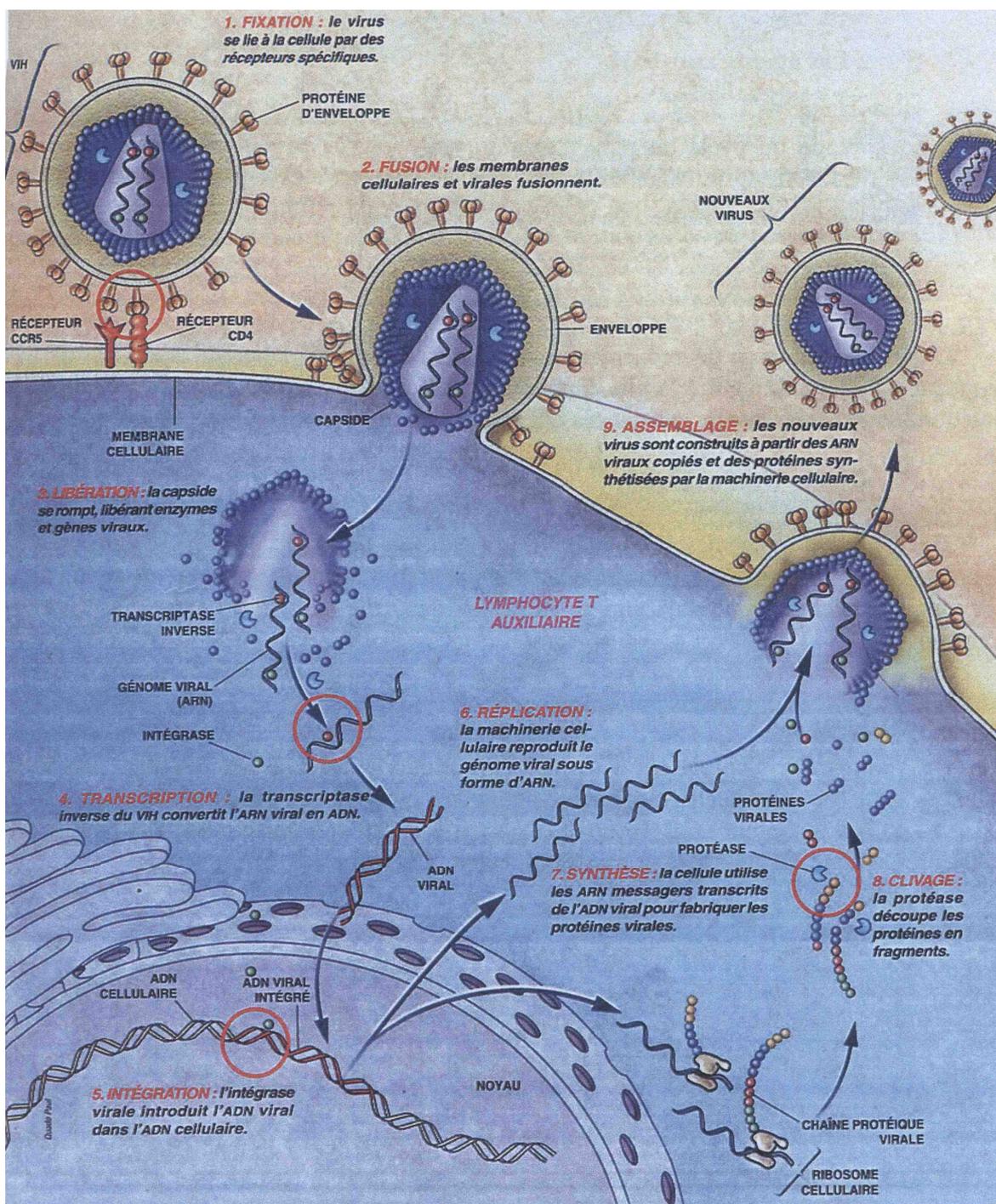
II.1.2. LE CYCLE DE REPLICATION DU VIH

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 qui va fabriquer de nouveaux virus selon un procédé de biosynthèse que l'on appelle réplication. Celle-ci se déroule en plusieurs étapes (schéma II.1)^{3,4}.

- La fixation et la pénétration : la fixation du virus se fait sur une glycoprotéine appelée gp120 (présente à la surface de l'enveloppe du virus) qui s'attache à la protéine CD4, récepteur situé sur la membrane cytoplasmique des lymphocytes T CD4⁺. Ensuite, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire et le virus pénètre dans la cellule en y déversant son matériel génétique et les protéines (décapsidation).
- La rétrotranscription : la réplication du génome viral a lieu dans la cellule infectée. Le génome viral transmet son information par son ARN messenger viral. Cet ARN sert de matrice à la formation d'un ADN double brin dans un processus que l'on appelle la transcriptase inverse.
- Intégration : l'ADN est intégré dans les chromosomes de la cellule hôte grâce à une enzyme virale, l'intégrase. Cet ADN est appelé ADN pro viral.
- La transcription et la traduction : à partir de cet ADN intégré, la cellule produit, comme pour ses propres gènes, des ARN viraux identiques à l'ARN de départ. Ceux ci vont ensuite synthétiser les protéines virales régulatrices et de structure (traduction).
- L'assemblage et le bourgeonnement : les particules virales sont assemblées par diverses enzymes virales, et en particulier *la protéase*. Cet assemblage est suivi du bourgeonnement du virion (provirus) à la surface de la cellule. Le virus se détache ensuite de la membrane cellulaire.

³ P.Sonigo, *Science & Vie* Hors-Série, **193**, 90-95 (1995).

⁴ W.Haseltine,, *Pour la Science*, **291**, 52-59 (2002).



Le virus se fixe (1) sur les récepteurs (les protéines CD4 et CCR5) d'un lymphocyte. Lorsque les membranes virale et cellulaire ont fusionné (2), la capside se rompt (3) et le virus injecte dans la cellule son génome sous forme d'ARN et d'enzymes. L'une d'elles, la transcriptase inverse, transcrit (4) l'ARN viral en ADN qu'une enzyme, l'intégrase, insère dans le génome de la cellule (5). La machinerie cellulaire fabrique alors d'une part, des copies ARN de l'ADN viral (6) et d'autre part, les protéines codées par cet ADN (7). Certaines de ces protéines sont découpées par une protéase (8) en protéines actives. De nouveaux virus sont assemblés et libérés à l'extérieur (9). Chacun des composants viraux intervenant dans n'importe laquelle de ces étapes est une cible thérapeutique potentielle (cercle rouge).

Schéma II.1 : le cycle de réplication du VIH⁺

II.1.3. LES AGENTS ANTI-VIH

Le cycle de réplication du virus VIH comporte plusieurs étapes dont chacune d'elles peut être la cible potentielle d'un traitement contre ce virus. Nous présentons dans ce qui suit dans l'ordre du cycle réplcatif, les différents agents qui interfèrent avec chacune de ces étapes.

II.1.3.1. les inhibiteurs de l'interaction gp120-CD4

les inhibiteurs de l'interaction gp120-CD4 sont des molécules capables d'empêcher la fusion entre la glycoprotéine gp120 de l'enveloppe du virus VIH et la protéine CD4 de la membrane cellulaire. Pour inhiber cette interaction⁵, un excès de molécules CD4 se fixe sur la gp 120, la bloque et ainsi inhibe la fixation membranaire. Si ceci est bien efficace *in vitro*, des problèmes pharmacologiques apparaissent néanmoins: la demi-vie de la molécule CD4 soluble est très courte dans l'organisme. La dégradation rapide de cette molécule fait qu'elle n'est pas utilisée en pratique courante.

Par ailleurs, il y a les composés polyanioniques qui bloquent *in vitro* la réplication du VIH à son premier stade. Ces substances sont des polysaccharides sulfatés comme l'Héparine qui empêche le gp120 de se fixer sur le récepteur CD4 ou des polycarboxylates comme par exemple l'acide aurintricarboylrique qui interagit avec le récepteur CD4. Cependant les essais cliniques ont montré que ces composés, quoique très efficaces, sont trop toxiques.

II.1.3.2. les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Les inhibiteurs de la transcriptase inverse sont des composés qui perturbent (retardent ou arrêtent) l'action de l'enzyme transcriptase inverse. Ils agissent de manière à prévenir la conversion de l'ARN viral en ADN. Si l'ARN n'est pas converti en ADN, le virus est incapable de s'intégrer dans la cellule. Il existe trois catégories d'inhibiteurs de la transcriptase inverse :

- Les analogues nucléosidiques : ils ont constitué la première classe d'antirétroviraux mis sur le marché en 1985. Ils sont actifs contre le VIH-1 et le VIH-2. Ces nucléosides sont des didésoxynucléosides qui, sous leur forme triphosphatée, interfèrent avec la réplication virale de deux manières : soit en inhibant la transcriptase inverse par

⁵ E.Declercq, *La Recherche*, **23**, 288-295 (1992).

compétition avec les substrats naturels, soit par incorporation dans la chaîne d'ADN proviral en formation. Dans ce dernier cas ils agissent en tant que terminateurs de la chaîne du fait qu'ils ne possèdent pas d'hydroxyle en 3'. A l'heure actuelle, six analogues nucléosidiques sont disponibles : l'AZT (Retrovir®),⁶ le ddI (Videx®)⁷, le ddC (Hivid®), le d4T (Zerit®)⁸, le 3TC (Epivir®)⁹ et l'Abacavir (Ziagen®)¹⁰ (schéma II.2).

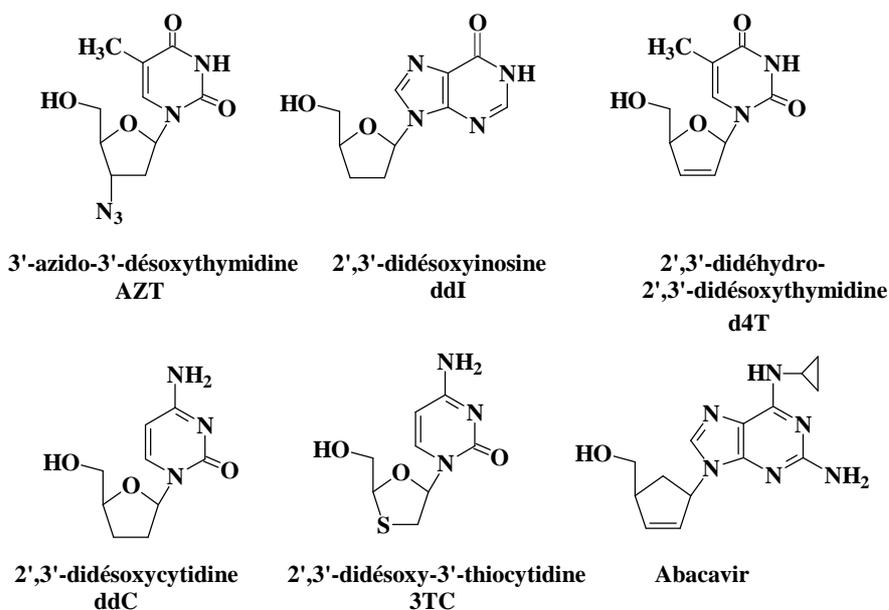


Schéma II.2 : quelques analogues nucléosidiques

Il convient néanmoins de ne pas sous-estimer les effets secondaires de ces médicaments, le problème posé par ces substances est surtout leur toxicité. De plus, le virus semble leur présenter une certaine résistance après une exposition prolongée.

- Les analogues nucléotidiques : il s'agit de nucléotides acycliques (schéma II.3). Ils présentent une activité anti HIV très marquée. Ces composés se comportent dans la cellule comme des inhibiteurs compétitifs du dATP (déoxyadénosine triphosphate). Ils peuvent être incorporés à l'ADN en formation, mettant ainsi fin à sa synthèse. La 9-R-2-Phosphonomethoxypropyl Adénine (PMPA) est inhabituellement stable dans la

⁶ H.Mitsuya; K.J.Weinhold; P.A.Furman; M.St Clair; S.Nussinoff Lehrman; R.C.Gallo; D.Bolognesi; D.W.Barry; S.Broder, *Roc.Natl.Acad.Sci.USA*, **82**, 7096-7100 (1985).

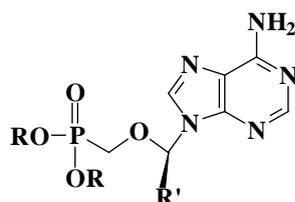
⁷ H.Mitsuya; S.Broder, *Roc.Natl.Acad.Sci.USA*, **82**, 1911-1915 (1986).

⁸ M.J.Browne; K.H.Mayer; S.B.D.Chafee; M.N.Dudley; M.R.Posner; S.M.Steinberg; K.K.Graham; S.M.Geletko; S.H.Zinner; S.L.Denman; L.M.Dunkle; S.Kaul; C.McLaren; G.Skowron; N.M.Kouttab; T.A.Kennedy; A.B.Weitberg, G.A.Curt, *J.Infect.Dis*, **167**, 21-29 (1993).

⁹ M.Browne; L.S.Jeong; H.O.Kim; S.Nampalli; K.Shanmuganathan; C.K.Chu, *Nucleosides & Nucleotides as Antitumor & Antiviral agents*, C.K.Chu and D.C.Baker, Plenum Press : New York, 219-243 (1993).

¹⁰ R.H.Foster ; D.Faulds, *Drugs*, **55**, 729-736 (1998).

cellule ce qui explique qu'il possède un effet antiviral prolongé qui peut s'étendre de plusieurs jours à une semaine. Néanmoins, son développement clinique reste problématique. Un autre nucléotide, le bis(isopropylloxyméthylcarbonyl)PMPA (Bis(POC)PMPA) a eu l'autorisation de mise sur le marché. Ce dernier, prodrogue du PMPA, contient deux groupes esters qui masquent les fonctions phosphonates augmentant ainsi la biodisponibilité cellulaire du PMPA.¹¹ Le Bis(POC)PMPA est hydrolysé en PMPA qui est ensuite phosphorylé en PMPA diphosphate et triphosphate qui est la forme active.



R = R' = H, PMEAs
 R = H, R' = CH₃, PMPA
 R = iPrOC(O)OCH₂, R' = CH₃, Bis(POC)PMPA

Schéma II.3: quelques analogues nucléotidiques

- Les inhibiteurs non nucléosidiques : ils sont actifs sur le VIH de type 1. Ils inhibent la transcriptase inverse du VIH-1 par liaison directe en perturbant le site catalytique de l'enzyme. Dans ce groupe, on peut citer le 1-[(2-hydroxyéthoxy)méthyl]-6-(phénylthio)thymine (HEPT) et les dérivés du tétrahydroimidazo[4,5,1-*jk*][1,4]-benzodiazépin-2(1*H*)-thione (TIBO) qui sont considérés comme des inhibiteurs puissants⁵ (schéma II.4). A ce jour, d'autres classes de molécules présentant une activité comparable à celle des TIBO et HEPT ont été identifiées telles que la névirapine, la delavirdine... Malheureusement, le VIH développe très vite une résistance aux substances TIBO ; voilà pourquoi ces substances ne sont potentiellement utilisables qu'en association.

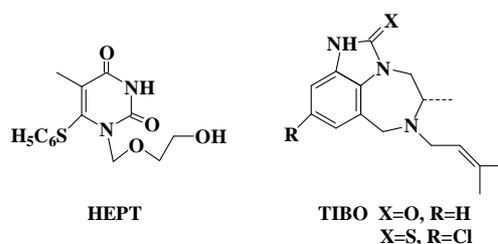


Schéma II.4: quelques inhibiteurs non nucléosidiques

¹¹ M.N. Arimilli ; C.U. Kim ; J. Dougherty ; A.Mulato; R.Oliyai; J.P.Shaw ; K.C.Cundy ; N.Bischoberger, *Antiviral Chem. Chemoth.* **8**, 557-564 (1997).

II.1.3.3. les inhibiteurs de l'intégrase

Cette nouvelle classe d'antirétroviraux mise sur le marché en 1996 a constitué un tournant majeur dans les stratégies thérapeutiques contre le VIH. Ils agissent en inhibant l'action de la protéase virale qui permet d'assembler les protéines virales, processus clé de la réplication. On obtient alors des virions incapables d'infecter de nouvelles cellules. Plusieurs substances ont été mises au point pour permettre de bloquer l'intégrase. Malheureusement, les tests cliniques effectués n'ont pas mis en évidence une inhibition suffisante du système enzymatique. Entre-temps, la recherche fondamentale a mis au point de nouveaux modèles permettant de comprendre le fonctionnement de l'intégrase. Trois substances semblent être en mesure de bloquer l'intégrase dans une culture de cellules : l'arctigénine, l'acide chicorique et l'étoposide (schéma II.5). Mais aucune d'entre elles n'est actuellement en développement clinique en raison de leur toxicité.

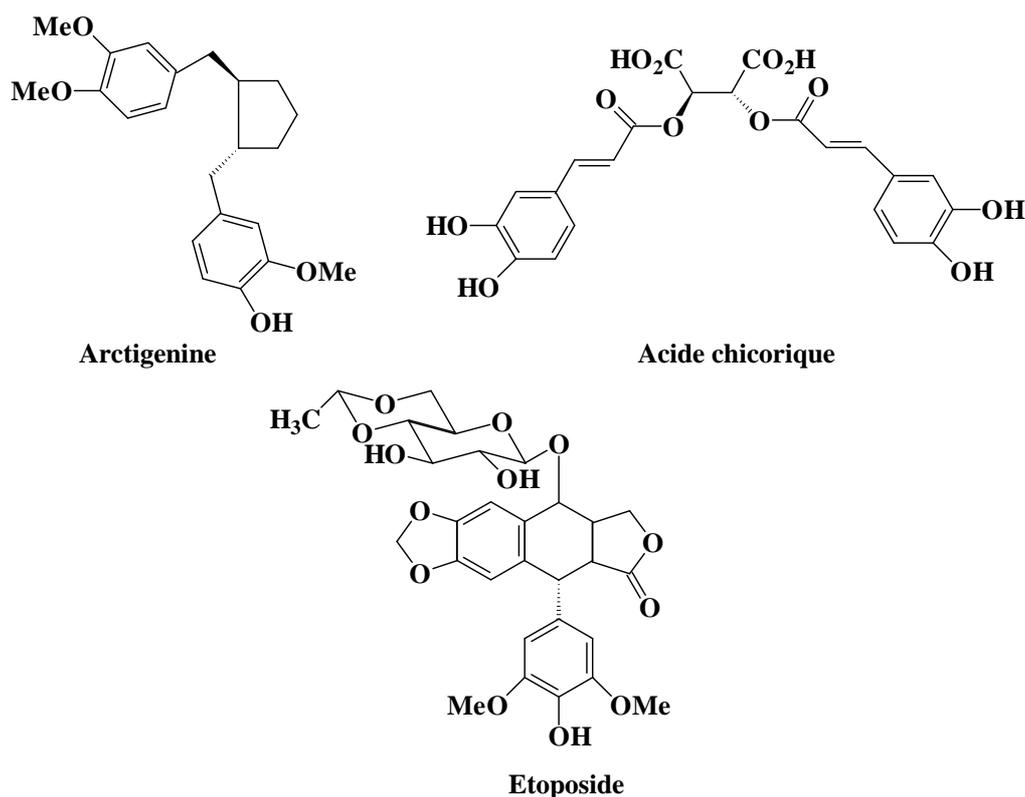


Schéma II.5 : inhibiteurs de l'intégrase

II.1.3.4. les oligonucléotides anti-gène ou antisens¹²

L'avantage des oligonucléotides sur les médicaments "classiques" est, *a priori*, leur grande spécificité. Ils peuvent se fixer directement sur un ADN proviral (on parle alors de stratégie anti-gène) ou interagir avec l'ARN pré-messager ou messager (on parle alors de stratégie antisens). Dans le premier cas, ils ajoutent un troisième brin aux deux brins complémentaires de l'ADN viral. Ils créent ainsi une structure en triple hélice qui est incompatible avec le processus même de la transcription. Dans le second cas, ils s'hybrident à l'ARN messager, transformant cette molécule simple brin en molécule double brin incapable de se traduire. Si l'ensemble de ces mécanismes commence à être élucidés *in vitro*, les applications au niveau cellulaire et *a fortiori in vivo* se heurtent à un certain nombre de problèmes, les principaux étant, le passage transmembranaire des oligonucléotides et leur dégradation avant qu'ils n'atteignent leur cible. Malgré tous ces problèmes, un certain nombre d'essais thérapeutiques sont en cours chez l'homme montrant la potentialité de ces nouveaux médicaments. Il est possible de protéger de différentes façons les oligonucléotides contre la dégradation par les nucléases cellulaires en modifiant leur squelette sucre phosphate ou en protégeant leurs extrémités et, en particulier, l'extrémité 3'. Certaines de ces modifications entraînent cependant une diminution de l'efficacité de l'oligonucléotide et l'apparition d'interactions non spécifiques avec les protéines cytoplasmiques.

II.1.3.5. les inhibiteurs de protéines Tat et Rev

Les protéines Tat (Trans-Activator of Transcription) et Rev (Regulation of expression of virions) sont indispensables au cycle viral du VIH. Elles contrôlent l'expression du génome viral par interaction avec des régions spécifiques de l'ARN viral. La protéine Tat, produite au tout début du cycle de réplication, est essentielle à l'expression de tous les gènes viraux. Son rôle principal se situe au niveau transcriptionnel en augmentant à la fois l'initiation de la transcription des gènes viraux et l'efficacité d'élongation des ARN transcrits. La protéine Rev quant à elle, transporte et stabilise les ARN messagers codant des protéines de structure et les enzymes virales.

En 1991, Hsu *et al.*¹³ ont décrit l'activité antivirale d'une molécule antagoniste de la fonction Tat (le Ro 5-3335). Les études chez l'animal ont orienté le développement d'un

¹² O.Pleskoff, *Science et Vie* Hors-série, **193**, 134-139 (1995).

¹³ M.C.Hsu ; M.Holly ; A.D.Schutt, *Science*, **254**, 1799-1802 (1991).

dérivé moins toxique : le Ro 24-7429 (schéma II.6). Ce dernier a été expérimenté chez l'homme puis abandonné en raison de sa faible efficacité et de sa toxicité.

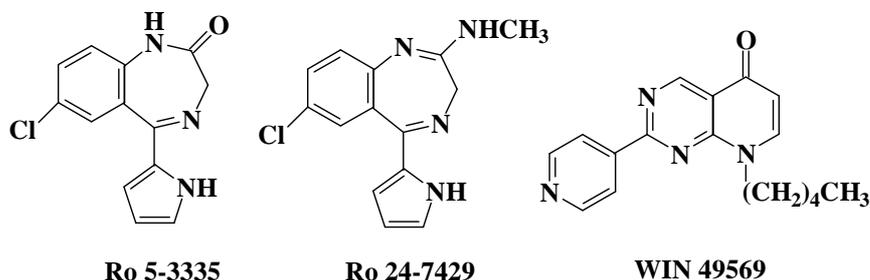


Schéma II.6 : inhibiteurs des protéines Tat et Rev

Comme inhibiteur de la protéine Rev, on citera le WIN 49569 qui présente une activité antivirale micromolaire (schéma II.6)¹⁴.

II.1.3.6. les inhibiteurs de la protéase

C'est une classe de médicaments qui interviennent après l'étape de l'intégration du génome virale dans l'ADN cellulaire, ayant pour fonction d'empêcher la maturation des protéines virales avant leur assemblage, brisant ainsi le cycle de multiplication du virus. Les inhibiteurs actuellement disponibles sont au nombre de six¹³ : le saquinavir, l'indinavir, le ritonavir, le nelfinavir, l'amprenavir et le lopinavir (schéma II.7)

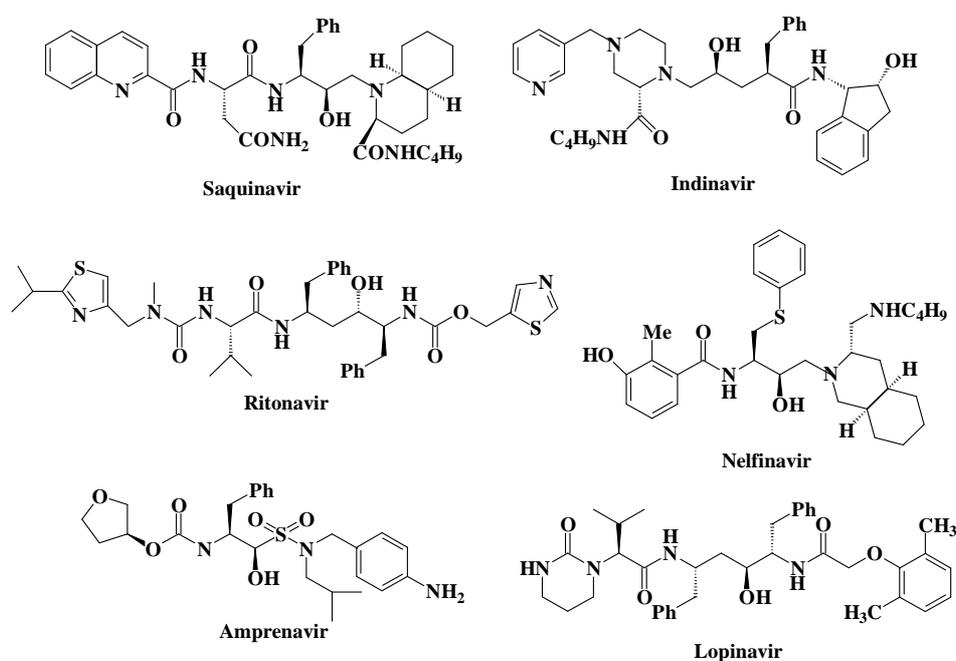


Schéma II.7: inhibiteurs de la protéase

¹⁴ E.DeClercq, *J. Med. Chem.*, **38**, 2491-2517 (1995).

Ces composés présentent des problèmes de biodisponibilité et d'élimination très rapide dans le sang.

II.1.3.7. la multithérapie

Le virus du sida a la capacité de changer continuellement de forme. C'est pourquoi, il est si difficile de mettre au point un médicament capable de l'éradiquer. Aujourd'hui, la seule solution efficace pour retarder la progression du virus consiste à le combattre sur plusieurs fronts. La thérapie combinatoire (l'usage de plusieurs molécules antivirales agissant à différentes étapes de la multiplication virale) présente deux avantages : elle permet de retarder l'émergence rapide du virus résistant et de réduire la toxicité du traitement car le dosage de chaque composé est réduit. Trois types de combinaisons de médicaments peuvent être envisagées :

- Combinaison de drogues qui interfèrent avec différentes protéines virales (ex : association d'inhibiteurs de la transcriptase inverse et de la protéase).
- Combinaison de drogues qui interagissent avec différents sites de la même protéine virale (ex : association d'inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques de la transcriptase inverse).
- Combinaison de drogues qui interagissent avec le même site de la même protéine virale (ex : association de plusieurs analogues nucléosidiques). Deux types d'associations ont été approuvées par le FDA (Federal Food Drug and Cosmetics Act): le Combivir® (AZT et 3TC) et le Trizivir® (AZT, 3TC et abacavir).

Nous venons de voir dans ce chapitre l'importance des analogues de nucléosides dans la lutte contre le VIH. Nous allons à présent voir leur utilisation dans la lutte contre l'Herpès.

II.2. LE VIRUS HERPES SIMPLEX

II.2.1. GENERALITES

Le virus herpes simplex (VHS) fait partie de la grande famille des *Herpesviridae*. Ces virus sont grandement disséminés dans la nature et plus de 130 membres ont été identifiés jusqu'à maintenant. Les virus herpétiques partagent certaines caractéristiques physiologiques telles que leur structure, un large génome d'ADN double brin, des traits généraux de leur cycle de répllication.... Neuf virus herpétiques humains (VHH) ont été isolés jusqu'à

maintenant (VHH-1 à 8; VHH-6A et 6B) et certaines particularités de leurs propriétés biologiques ont mené à leur subdivision en trois sous-familles :

- Les alphaherpès parmi lesquels on trouve l'Herpès Simplex 1 (HSV1), l'Herpès Simplex 2 (HSV2), et la Varicella (VZV).
- Les bêtaherpès parmi lesquels on trouve le cytomégalovirus (CMV), l'human herpes virus 6 (HHV6) et l'human herpes virus 7 (HHV7).
- Les gammaherpès aux quels appartiennent l'Epstein Barr virus (EBV), l'human herpes virus 8 (HHV8).

II.2.2. STRUCTURE DES VIRUS DE L'HERPES

Les virus herpétiques sont des virus enveloppés, à symétrie cubique, d'un diamètre relativement grand (environ 200 nm). Contrairement au HIV ce virus comporte un matériel génétique. Son génome est constitué d'un ADN double brin linéaire, enfermé dans une capsidie icosaédrique. Cette dernière est entourée par une enveloppe qui porte environ 12 types de glycoprotéines de surfaces différentes dont plusieurs sont impliquées dans l'attachement et la pénétration du virus dans la cellule hôte. Entre la capsidie et l'enveloppe, il y a un tégument qui comprend des protéines impliquées dans l'initiation précoce de la réplication virale (schéma II.8).

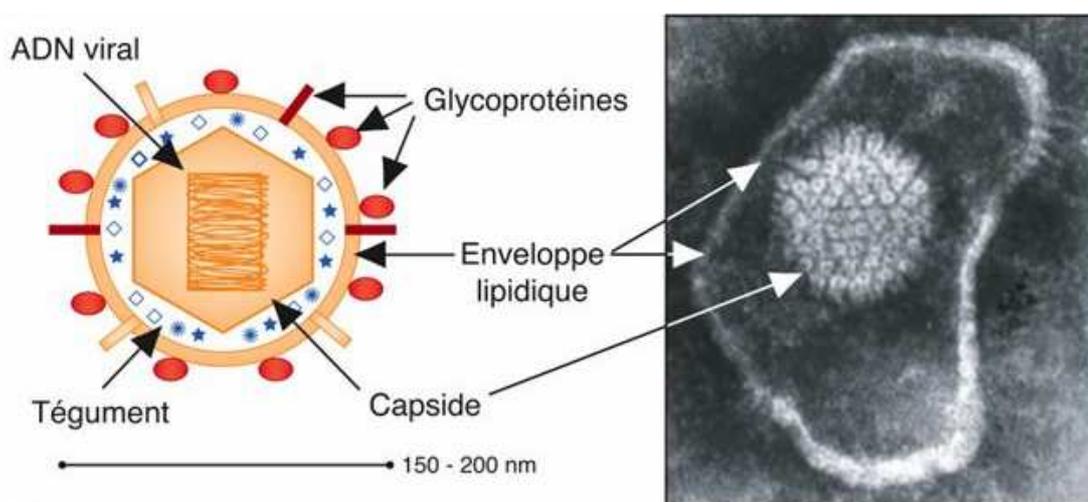


Schéma II.8: Structure de l'herpès simplex

II.2.3. CYCLE DE REPLICATION DE L'HERPES

L'infection productive d'une cellule par le VHS requiert plusieurs étapes clés incluant :

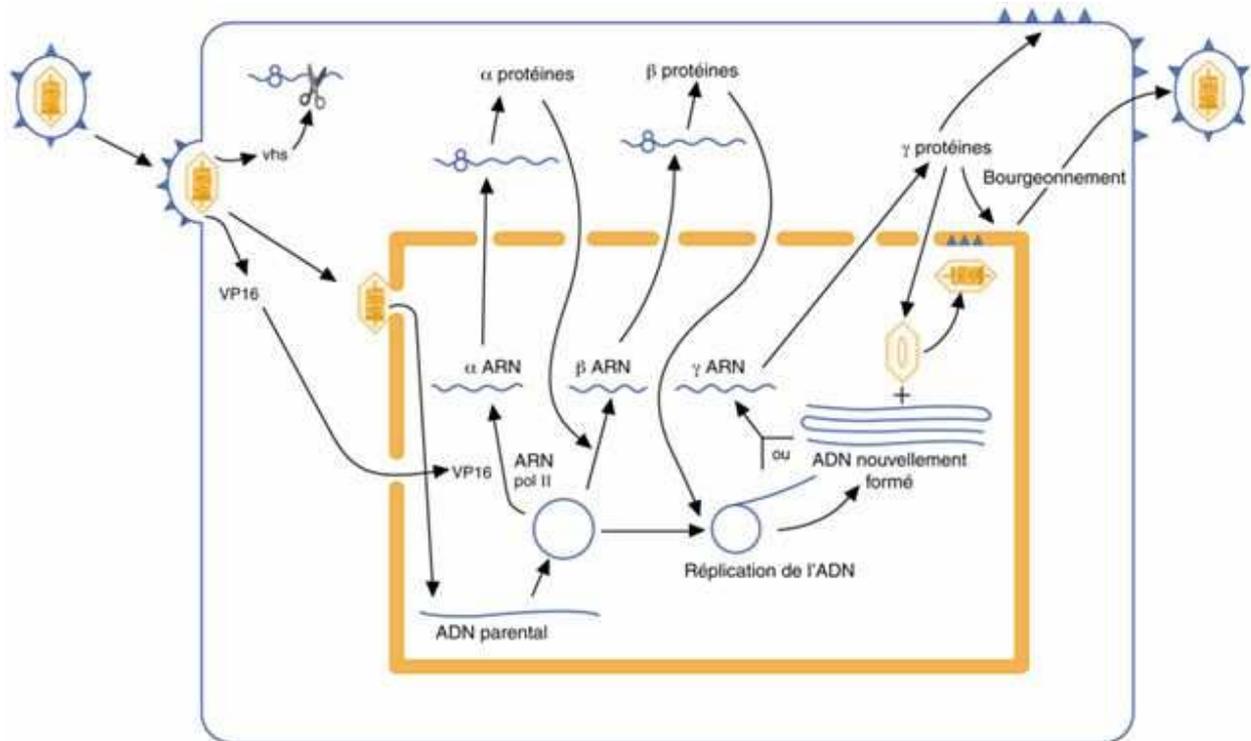


Schéma II.9: cycle de réplication du VHS dans une cellule hôte

- 1- l'attachement et l'entrée du virus : pour initier l'infection, le VHS doit s'attacher à des récepteurs présents à la surface des cellules et fusionner son enveloppe avec la membrane cellulaire. Les glycoprotéines de l'enveloppe du VHS assurent l'attachement et la pénétration du virus dans les cellules. L'attachement du virus est initié par l'interaction de la protéine gC et de la protéine CD35 de la surface cellulaire. Ensuite la pénétration est réalisée par fusion, fusion qui nécessite la protéine gB. La nucléocapside et les protéines du tégment sont alors libérées dans le cytoplasme de la cellule hôte.
- 2- l'expression des gènes viraux : les virus à ADN se servent de la cellule hôte de manière à exprimer leurs propres protéines, nécessaires à leur réplication et à leur prolifération. De façon générale, les virus expriment deux types de protéines ; les protéines non-structurales impliquées dans la réplication de l'ADN viral et les

protéines de structure qui forment le virion et une partie de l'enveloppe virale. Les gènes du VHS peuvent être classés en trois groupes selon leur apparition dans le temps:

- Les gènes alpha sont exprimés tout de suite après l'infection. Ils ne nécessitent pas la synthèse préalable de protéines virales. L'expression de ces gènes aboutit à la synthèse de protéines précoces trois heures après l'infection.
- Les gènes bêta ne peuvent s'exprimer qu'après la synthèse d'une protéine alpha (environ six heures après l'infection). Les protéines bêta comprennent des protéines régulatrices qui bloquent la synthèse des protéines alpha et stimulent celles des protéines gamma et des enzymes nécessaires à la réplication de l'ADN (thymidine-kinase et ADN polymérase).
- Les gènes gamma s'expriment sous la dépendance de la réplication de l'ADN viral. Ils permettent la synthèse de protéines gamma tardives (environ 12 heures après l'infection) qui constituent l'essentiel des protéines structurales.

- 3- Réplication de l'ADN : la réplication de l'ADN viral s'effectue dans des structures spécialisées formées dans le noyau de la cellule infectée, nommées compartiments de réplication. L'ADN linéaire viral nouvellement arrivé dans la cellule hôte se circularise à son entrée dans le noyau. La réplication de l'ADN est alors initiée à l'une des trois origines de réplication. La protéine de liaison d'origine UL9 se lie à des éléments spécifiques sur l'ADN viral et débute le désenroulement de l'ADN. UL9 recrute alors la protéine ICP8 (UL29), qui se lie à l'ADN simple brin. Ces deux protéines recrutent finalement les cinq autres protéines du complexe de réplication (UL5/UL52, UL8, UL30, UL42). Une réplication en mode thêta est alors initiée, pour ensuite passer au mode de réplication du cercle roulant.
- 4- L'assemblage et le bourgeonnement des virions : l'assemblage de la capsid virale requiert la synthèse de plusieurs protéines virales tardives. Les capsides vides sont alors chargées de l'ADN viral pour ainsi former la nucléocapside. Les nucléocapsides bourgeonnent ensuite de la membrane nucléaire interne d'où ils acquièrent une enveloppe et certaines protéines du tégument. La route suivante empruntée par les virions est encore controversée. Une des hypothèses propose que les virus enveloppés fusionnent avec la membrane nucléaire externe et que les nucléocapsides alors libérées dans le cytoplasme de la cellule sont ré-enveloppées lors du bourgeonnement. Ces virus ré-enveloppés sont alors déplacés à la surface de la cellule.

II.2.4. LES AGENTS ANTIHERPETIQUES

Un traitement antiviral idéal vise à cibler et inhiber le plus spécifiquement possible un événement de la réplication virale, sans pour autant influencer celle de la cellule hôte. L'attachement viral, l'entrée, la décapsidation, la synthèse protéique, la réplication de l'ADN, l'assemblage, et le bourgeonnement sont les points majeurs de la réplication du VHS et sont donc autant de cibles potentielles pour les antiviraux. Jusqu'à maintenant, cependant, les seuls antiviraux ayant démontré une efficacité contre le VHS et ayant une toxicité minimale et une présentation adéquate pour l'humain ont tous pour cible ultime l'ADN pol viral.

On peut classer les antiviraux disponibles pour le traitement de l'infection au VHS en deux classes distinctes :

➤ Les analogues de nucléosides acycliques : comprenant l'acyclovir, le pencyclovir, le gancyclovir et leur prodrogues (le valacyclovir et le famcyclovir). Ils constituent les traitements de premiers choix contre les infections au VHS. Les analogues de nucléosides phosphonates (ANP) qui incluent le cidofovir et l'adéfovir peuvent également être inclus dans cette classe. Cependant, ces derniers antiviraux ne sont pas encore approuvés pour le traitement de l'infection au VHS mais ont tout de même démontré une efficacité dans l'inhibition de la réplication du VHS (schéma II.10).

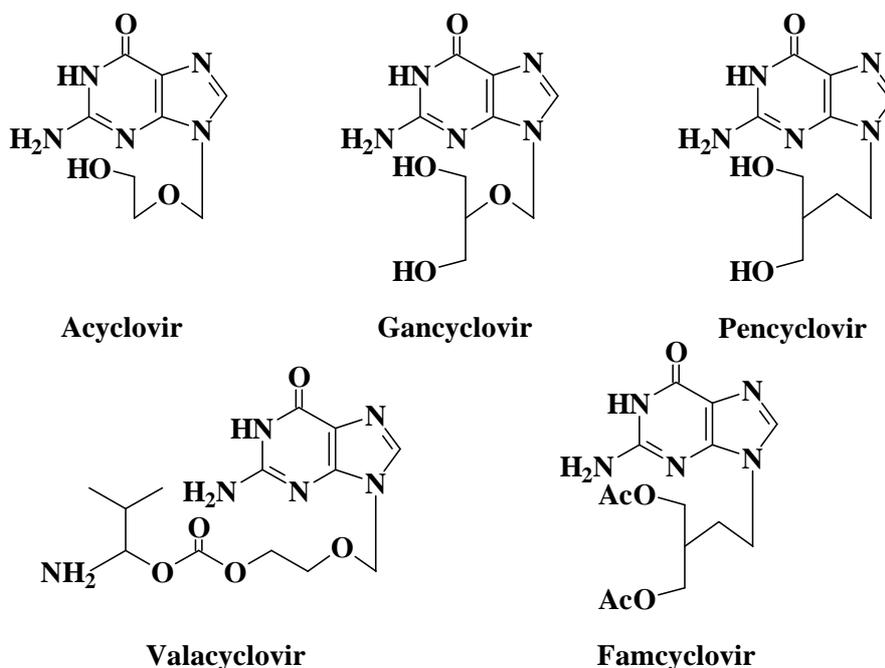


Schéma II.10: analogues de nucléosides acycliques.

➤ Les analogues des pyrophosphates inorganiques : ils constituent la deuxième classe d'antiviraux, et comprennent le foscarnet (FOS) qui est le traitement de seconde ligne dans le cas d'infections résistantes aux analogues des nucléosides. La structure de ces différents antiviraux est présentée sur le schéma II.11. Des molécules inhibant d'autres événements de la réplication du VHS sont également en développement.

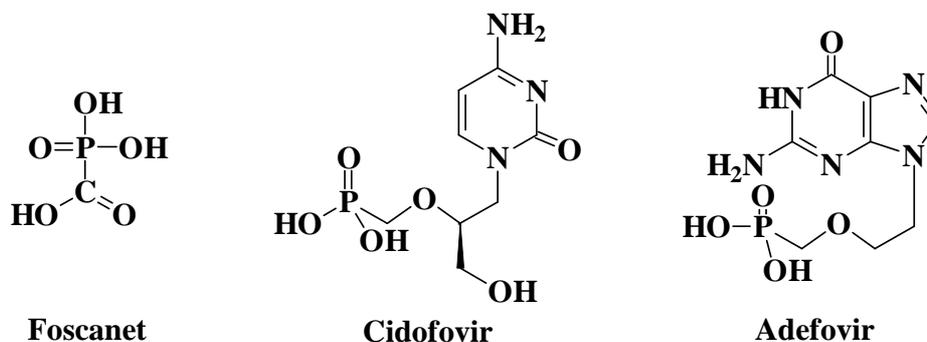


Schéma II.11: analogues des pyrophosphonates et de nucléosides phosphonates.

II.2.5. MODE D'ACTION DES AGENTS HERPETIQUES

➤ L'Acyclovir et ses dérivés : l'Acyclovir est un analogue de la 2'-désoxyguanosine. Sa découverte a été la plaque tournante du traitement des infections herpétiques et, depuis plusieurs années, l'Acyclovir et ses dérivés sont considérés comme le traitement de choix des infections au VHS-1, VHS-2 et au VZV. Il démontre une efficacité remarquable et est très peu toxique.

L'Acyclovir doit être sous sa forme triphosphorylée pour être actif (schéma II.12). Le premier groupement phosphate est préférentiellement conféré par la TK virale. La conversion en Acyclovir di- et triphosphate est catalysée par les kinases cellulaires. Sous sa forme active, l'Acyclovir-triphosphate entre en compétition avec le 2'-désoxyguanosine triphosphate en tant que substrat pour l'ADN pol virale. Suite à son insertion dans l'ADN en cours de réplication, la synthèse de l'ADN prend fin. En effet, l'Acyclovir ne possède pas le groupement 3'-hydroxyle nécessaire à la formation du lien 3'-5'-phosphodiester et est donc un terminateur de chaîne.

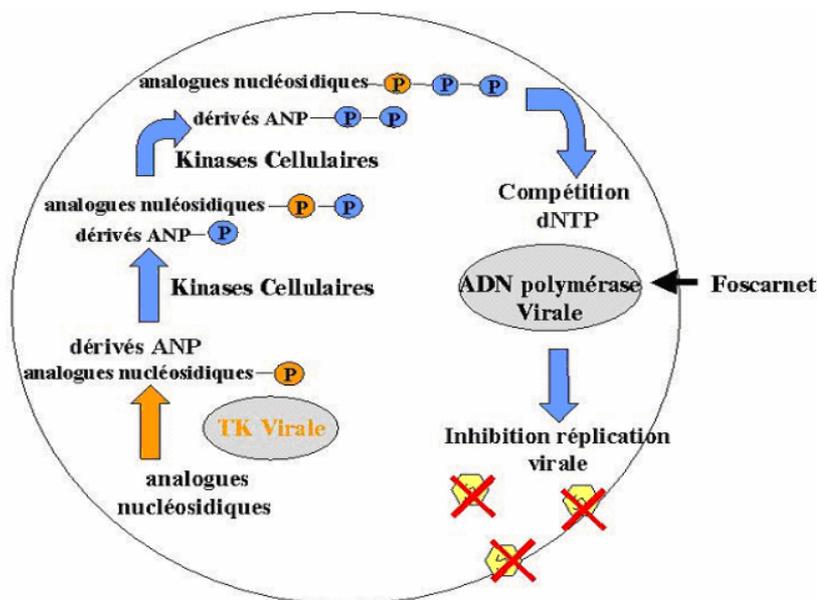


Schéma II.12: Mécanisme d'action des agents herpétiques

- Le foscarnet : c'est un analogue des pyrophosphates inorganiques (ppi) et diffère considérablement des analogues nucléosidiques décrits. Il ne requiert pas d'activation préalable par la TK virale ou par les TK cellulaires. C'est un inhibiteur non compétitif de l'ADN pol virale et n'est pas incorporé dans le brin d'ADN en cours d'élongation. Le foscarnet (FOS) bloque le site de liaison des ppi sur l'ADN pol et de ce fait, empêche le clivage des nucléosides triphosphates et le transfert des ppi sur l'ADN pol viral.
- Analogues de nucléosides phosphonates (ANP) : leur structure primaire comprend déjà un groupement phosphate. Ils n'ont pas besoin d'être phosphorylés pour être activés. Les kinases cellulaires les convertissent en leur forme diphosphate. Ils sont alors des inhibiteurs compétitifs de l'ADN pol viral.

II.3. OBJET DU TRAVAIL

Dans le cadre de l'élaboration de nucléosides modifiés abordé au Laboratoire de Chimie des Substance Naturelles, nous nous proposons de synthétiser, de caractériser et d'évaluer les potentialités antivirales d'analogues de nucléosides acycliques (schéma II.1.3).

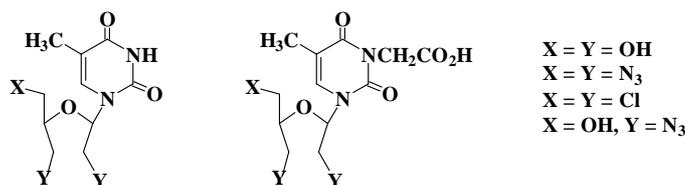


Schéma II.1.3: acyclonucléosides synthétisés

Afin de synthétiser ces quelques acyclonucléosides, nous avons adopté la stratégie représentée sur le schéma synthétique (II.1.4) suivant :

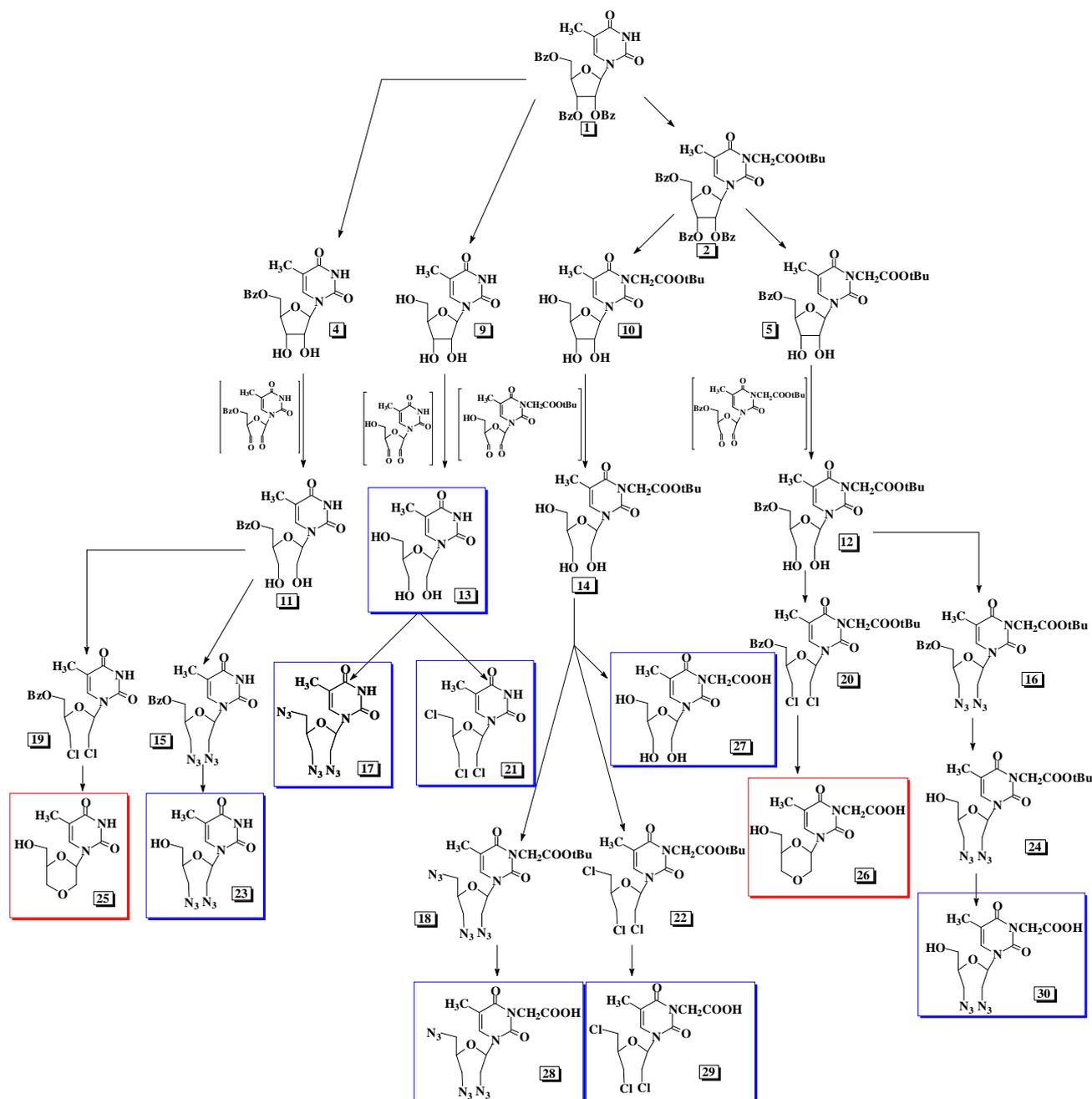


Schéma II.1.4: schéma synthétique

Une des étape clé de cette synthèse est la réaction de déprotection sélective des hydroxyles secondaires de la partie glucidique du nucléoside. Nous présenterons tout d'abord la mise au point d'une nouvelle méthode de débenzoylation sélective des hydroxyles secondaires puis nous détaillerons la préparation des acyclonucléosides.

CHAPITRE III
Débenzoylation sélective
des hydroxyles secondaires

III. DEPROTECTION SELECTIVES DES HYDROXYLES SECONDAIRES

La déprotection sélective des hydroxyles secondaires de la partie glucidique du nucléoside est l'une des étapes clés de la synthèse des acyclonucléosides. Il nous a semblé intéressant d'étudier les différents systèmes menant à cette déprotection.

III.1. ETAT DE LA QUESTION

Le substrat de départ est un nucléoside présentant trois fonctions alcools benzoylés. Il est nécessaire d'avoir des groupements hydroxyles en positions 2' et 3' libres et la fonction alcool primaire en position 5' protégée afin de ne pas interférer avec les réactions ultérieures. Pour obtenir le diol 2', 3' libre, tout en ayant un groupe protecteur sur la fonction en position 5', deux alternatives peuvent être envisagées :

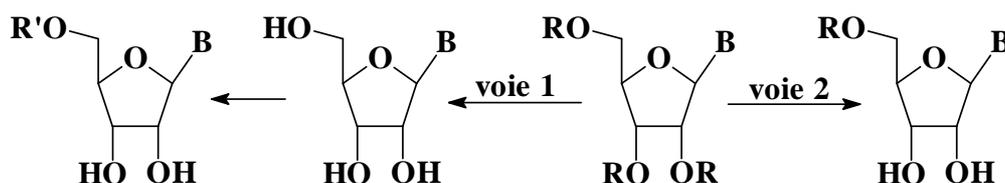


Schéma III.1 : Deux possibilités pour obtenir le diol 2',3' libre et l'hydroxyle 5' protégé

La première possibilité (voie 1) comporte deux étapes. Tout d'abord, les trois fonctions benzoyle sont éliminées, puis la fonction alcool primaire en position 5' est protégée sélectivement. Il s'agit de la méthode la plus couramment utilisée. La déprotection de tous les groupes hydroxyles¹⁵ s'effectue sous l'action du méthanolate de sodium ou de l'ammoniac en solution dans le méthanol, à température ambiante. Les co-produits du nucléoside déprotégé obtenus sont alors du benzoate de méthyle ou du benzamide. Plusieurs types de protection sélective peuvent alors être envisagés. Citons par exemple la silylation. Contrairement aux estérifications par le chlorure de benzoyle ou l'anhydride acétique, la silylation présente l'avantage d'être sélective lorsque le groupe silyle est assez volumineux : le tertio-butyldiphénylsilyle (TBDPS) ou le tertio-butyldiméthylsilyle (TBDMS) sont couramment rencontrés¹⁶.

¹⁵ A.Holy, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **37**, 4072 (1972).

¹⁶ a) E. J. Corey, A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**(17), 6190 (1972).

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

Une autre protection sélective consiste à trityler¹⁷ la fonction alcool primaire. Plusieurs groupements sont alors possibles : le trityle, c'est à dire le triphénylméthyle, le *para*-méthoxytrityle ainsi que les composés di et tri méthoxylés. La réaction de fixation se fait à température ambiante dans la pyridine. Ce groupe présente l'inconvénient de s'hydrolyser en milieu acide, toute réaction se faisant en milieu acide ou nécessitant un traitement acide n'est donc pas compatible avec ce type de groupe protecteur. Il est également nécessaire que le produit obtenu soit suffisamment stable pour pouvoir supporter une déprotection en milieu acide.

La seconde possibilité (voie 2) consiste à déprotéger sélectivement les diols en position 2', 3' par la méthode mise au point par Nishino et Coll¹⁸. Il s'agit de la même réaction que celle utilisée lors de la débenzoylation totale du sucre. Mais dans ce cas, le méthanolate de sodium n'est plus solubilisé dans le méthanol; il est mis en suspension dans un solvant anhydre dans lequel il n'est que partiellement soluble. Parmi les solvants testés, seuls les éthers cycliques (THF et le 1,4-dioxane) ont conduit à des résultats acceptables. Cette déprotection sélective a été appliquée à divers nucléosides : elle est originale et permet d'obtenir le nucléoside protégé en position 5' en une seule étape, mais nécessite d'opérer dans des conditions rigoureusement anhydres. La présence de traces d'eau entraîne la déprotection totale.

III.2. RESULTATS ET DISCUSSION

La voie 2 a été choisie (schéma III.1), car elle est réalisée en une seule étape. Nous avons tout d'abord utilisé la méthode de Nishino et coll¹⁸. Celle-ci est réalisée dans le THF en présence de méthanolate de sodium.

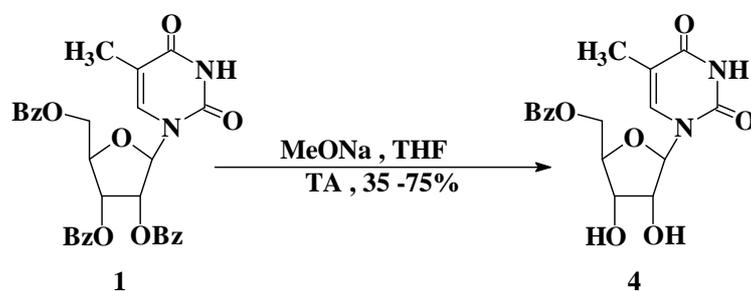


Schéma III.2 : Déprotection sélective par la méthode de Nishino et Coll .

¹⁷M. Smith, D.H. Rammner, I.H. Golberg, H.G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 430-440 (1962).

¹⁸S. I. Nishino, M.D., A. Rahman, H. Takamaru, Y. Ishido, *Tetrahedron*, **41**, 5503-5506 (1985).

La réalisation de plusieurs essais de déprotection sélective du nucléoside **1**, dans les mêmes conditions opératoires, conduit à des rendements variant de 35 à 75 %. La présence de traces d'eau conduit à une déprotection totale. En raison des contraintes opératoires et de la non reproductibilité de cette réaction, nous nous sommes attachés à mettre au point un processus moins complexe de débenzoylation sélective.

III.3. NOUVELLE METHODE DE DEBENZOYLATION SELECTIVE¹⁹

III.3.1. DEPROTECTION SELECTIVE EN SERIE FURANOSE

La débenzoylation par l'ammoniac dans le méthanol mène classiquement au nucléoside complètement déprotégé. L'étude fine de ce processus sur notre système nous a amené à observer que le composé débenzoylés en positions 2' et 3' se formait préalablement et suffisamment lentement pour être isolé. Nous avons alors cherché à mettre au point une réaction de déprotection sélective des hydroxyles secondaires, en présence d'une solution d'ammoniac 7M dans le méthanol (schéma III.3).

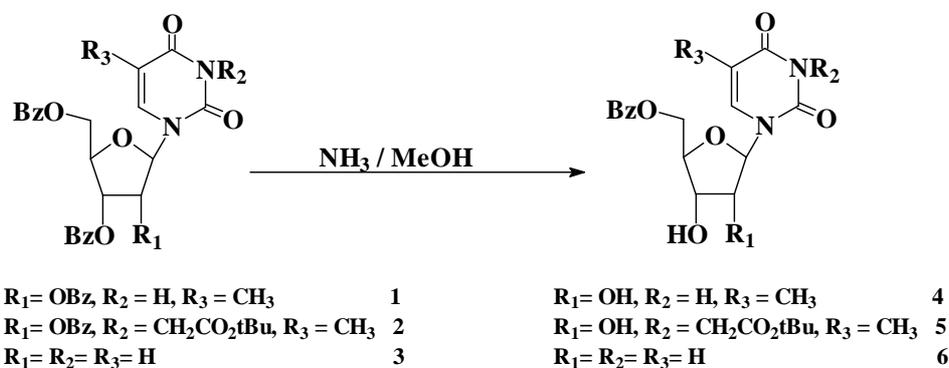


Schéma III.3 : Déprotection sélective

Cette réaction a été optimisée avec le composé **1** comme substrat de départ en faisant varier la quantité d'ammoniac, le temps de réaction et la température (tableau III.1). En suivant l'avancement de la réaction par ccm, on observe la formation des produits mono débenzoylés en positions 2' ou 3', et après quelques minutes l'apparition du composé di hydroxylé en 2' et 3'. Dès la formation du composé tri hydroxylé, la réaction est arrêtée. Cette méthode ne nécessite aucune précaution particulière ni aucun traitement. Une simple

¹⁹ R. Zerrouki; V. Roy; A. Hadj-Bouazza; P. Krausz, *J. Carbohydr. Chem.*, 2004, **23**, 299-303.

évaporation à froid permet d'éliminer le solvant et l'excès d'ammoniac. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Résultats de la réaction de déprotection sélective

Composé	NH ₃ ^a	Temps (h)	Température (°C)	Composé dihydroxylé (%)
<u>1</u>	50	12	22	<u>4</u> 12
	25	8	22	<u>4</u> 30
	25	6	- 15	<u>4</u> 66
<u>2</u>	25			<u>5</u> 68
<u>3</u>	25			<u>6</u> 65

a) nombre d'équivalents d'ammoniac par groupement hydroxyle secondaire.

Le meilleur résultat est obtenu en présence de 25 équivalents d'ammoniac par groupement hydroxyle secondaire, dans le méthanol, à - 15°C, au bout de 6 heures de réaction. Nous avons alors réalisé la déprotection sélective du composé **2**, dans les mêmes conditions opératoires. Le composé **5** a été isolé après purification par ccm préparative avec un rendement de 68 %. Appliqué à la débenzoylation sélective du 1-(3',5'-di-*O*-benzoyl-β-D-érythrophentofuranosyl) Uracile, on obtient le composé désiré avec un rendement de 65%.

III.3.2. CARACTERISATION SPECTRALE

Les spectres infrarouges des composés **4**, **5** et **6** présentent les bandes correspondant aux vibrations C=O de la base vers 1694 cm⁻¹, vers 1720 cm⁻¹ celle correspondant au C=O du groupement benzoyle et vers 2933 cm⁻¹ les C-H aromatiques. Les spectres montrent l'apparition d'une bande vers 3365 cm⁻¹ correspondant aux groupements hydroxyle. En outre, les principales bandes de vibration de la partie thymine sont présentes.

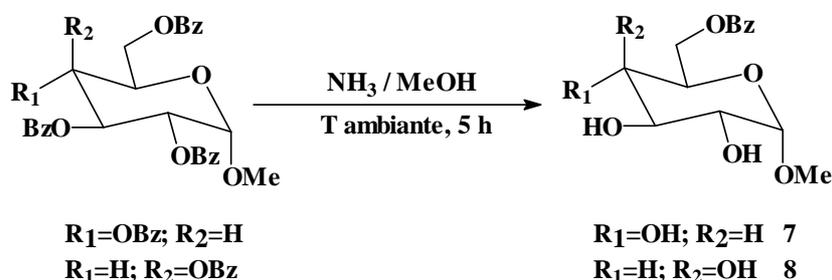
En RMN ¹H, la disparition de protons aromatiques confirme la disparition du ou des groupements benzoyle. Les données RMN du proton des composés **4**, **5** et **6** sont rassemblées dans le tableau III.2.

Tableau III.2: Données RMN ^1H des composés **4**, **5** et **6** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 4 (CD_3OD)	Composé 5 (CD_3OD)	Composé 6 (DMSO)
Base			
H-3	-	-	5,5 s
H-5	-	-	5,7 d (8)
H-6	7,35 d (1)	7,44 d (1)	7,72 d (8)
CH_3	1,59 d (1)	1,68 d (1)	-
Chaîne			
CH_2	-	4,54 s	-
CH_3	-	1,45 s	-
Sucre			
H-1'	5,88 d (4,4)	5,83 d (4)	6,28 dd(6,8-7,2)
H-2'a	4,26 t (4,4)	4,27 dd (4-5)	2,56 ddd(3,2-6,4-14,4)
H-2'b			2,64 dd(7,2-14,4)
H-3'	4,27 m	4,33 t (5)	4,41 m
H-4'	4,27 m	4,42 m	4,51 m
H-5'a	4,71 dd (2,9-12,2)	4,73 dd (2,4-12,4)	4,58 dd(5-11,6)
H-5'b	4,51 dd (4-12,2)	4,54 dd (4-12,4)	4,62 dd(4,8-11,6)
Benzoyle			
	7,4-8,10 m	7,5-8,05 m	7,8 m

III.3.3. DEPROTECTION SELECTIVE EN SERIE PYRANOSE

Afin de généraliser cette méthode originale, nous l'avons employée pour déprotéger sélectivement des glucides sous leur forme pyranose tels que le 1-méthyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranoside et le 1-méthyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D galactopyranoside.

**Schéma III.4 :** Déprotection sélective en série pyranose

Nous avons tout d'abord utilisé les conditions opératoires qui ont conduit aux meilleurs rendements en série furanose. A -15°C la cinétique de la réaction est très lente. On observe très peu d'évolution par ccm. Après variation des différents paramètres influençant la réaction, on obtient des rendements de 65% en utilisant 25 équivalents d'ammoniac par hydroxyle secondaire à température ambiante pendant 5 heures de réaction.

III.3.4. CARACTERISATION SPECTRALE

Les spectres IR des deux composés montrent l'apparition d'une bande vers 3365 cm^{-1} correspondant aux groupements hydroxyle. Le spectre RMN ^1H montre la disparition des protons aromatiques correspondant à trois groupements benzoyle. Les données RMN du proton des composés **7** et **8** sont rassemblées dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Données RMN ^1H des composés **7** et **8** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 7 ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1)	Composé 8 ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1)
Sucres		
H-1	4,69 d (3,7)	4,76 d (3,5)
H-2	3,45 dd(3,7-9,2)	3,83 dd(3,5-10,1)
H-3	3,67 t (9,2)	3,78 dd(3,1-10,1)
H-4	3,4 dd(1-9)	3,97 dd(0,9-3,1)
H-5	3,86 ddd(2,1-6-9,9)	4,13 ddd(0,9-4,9-7,5)
H-6a	4,45 dd(6-11,8)	4,48 dd(4,9-11,4)
H-6b	4,64 dd(2,1-11,8)	4,53 dd(7,5-11,4)
CH_3	3,42 s	3,41 s
Benzoyle		
H-3,5	7,47 td (1,5-7,5)	7,47 td (1,5-7,5)
H-4	7,6 tt (1,5-7,5)	7,6 tt (1,5-7,5)
H-2,6	8,04 dd (1,5-7,5)	8,04 dd (1,5-7,5)

III.4. CONCLUSION

Ces résultats mettent en évidence, pour la première fois, que l'utilisation d'une concentration bien définie d'ammoniac et d'une température spécifique de réaction permet la débenzoylation sélective des groupements hydroxyle secondaires. Cette méthode a été utilisée dans un premier temps en série furanose et généralisés en série pyranose. De plus elle ne nécessite aucune précaution particulière et peut être utilisé aisément pour la débenzoylation d'autres glucides.

CHAPITRE IV
Les acyclonucléosides

IV. SYNTHÈSE D'ACYCLONUCLEOSIDES

IV.1. INTRODUCTION

Comme nous l'avons montré au chapitre précédent, l'acyclovir est l'un des rares composés à présenter une action significative sur l'*herpès simplex*. Ce type de composés est réputé très peu cytotoxique vis à vis des cellules non infectées. A l'heure actuelle, on ne connaît que très peu de dérivés de l'acyclovir possédant un caractère antiviral reconnu. La recherche de composés, si possible plus actifs que ceux existant, constitue donc une étape importante dans le domaine de la chimie fine. De nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à la synthèse d'analogues de l'acyclovir de type acyclonucléoside. Ces analogues sont synthétisés par modification de la partie glucidique des nucléosides. Les 2', 3'-acyclonucléosides peuvent être considérés comme étant de la même famille que l'acyclovir car ils possèdent la fonction éther ainsi que le groupement 5'-hydroxyle (schéma IV.1).

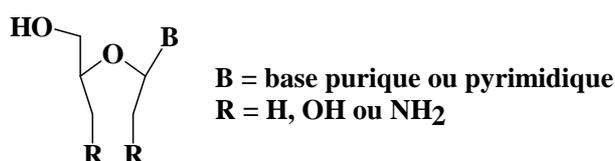


Schéma IV.1 : exemple de 2',3'-acyclonucléosides

Par rapport aux nucléosides, ils gardent le même squelette carboné et la chiralité du carbone anomérique, par contre ils perdent la rigidité de la partie glucidique puisqu'il n'y a plus de liaison entre les carbones 2' et 3'.

Pour notre part, nous présentons: la synthèse, la caractérisation structurale et l'évaluation antivirale de quelques analogues acycliques de nucléosides portant comme partie base, la thymine (schéma IV. 2).

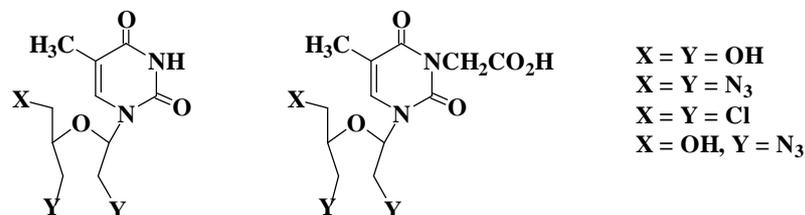


Schéma IV.2 : analogues acycliques de nucléosides

IV.2. SYNTHÈSE

IV.2.1. COUPLAGE DE LA BASE ET DU GLUCIDE

Une des étapes clés de la synthèse des nucléosides est le couplage de la base pyrimidine, purine ou autre, avec le glucide. Nous nous proposons d'abord de présenter brièvement quelques méthodes de couplage.

IV.2.1.1. Méthode de Fischer (ou Koenigs-Knorr) utilisant les sels de métaux lourds

Fischer et Helferich²⁰ 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.²¹ en 1948 pour obtenir l'adénosine et la guanosine. En 1951, Davoll et Lowy²² 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 IV.3):

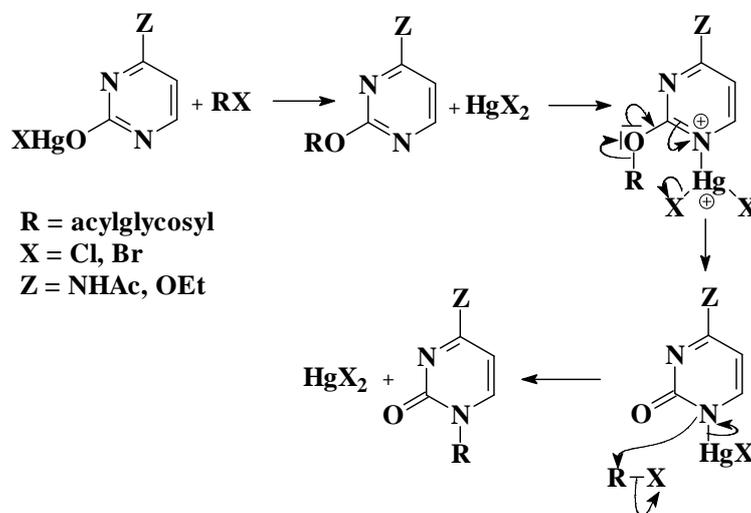


Schéma IV.3 : Méthode de couplage de Fischer

Cependant ces sels de métaux lourds présentent l'inconvénient d'être difficiles à éliminer et sont sources de toxicité.

²⁰ E. Fischer, B. Helferich, *Ber.*, **47**, 210 (1914).

²¹ J. Davoll, B. Lythgoe, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, 967 (1948).

²² J. Davoll, B. A. Lowy, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1650, (1951), J. J. Fox, N. Young, J. Davoll, G. B. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2117 (1956).

IV.2.1.2. Méthode de Hilbert et Johnson

Parallèlement à ces méthodes employant des sels de métaux lourds, Hilbert et Johnson²³ 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-dialcoxypyrimidines sur des halogénures acétylés, selon le mécanisme suivant (schéma IV.4) :

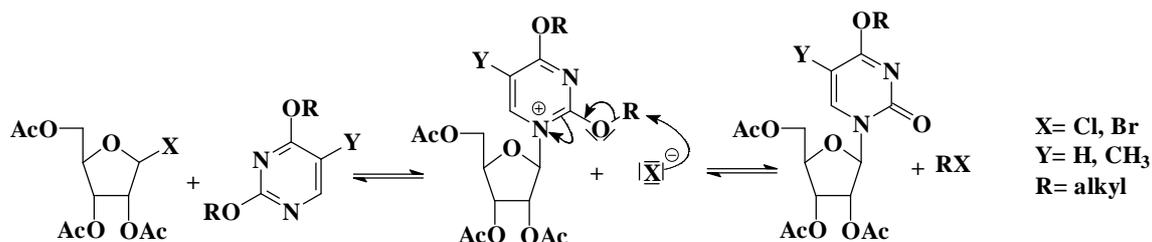


Schéma IV.4 : Méthode de couplage de Hilbert et Johnson

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 HgBr₂ 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.

IV.2.1.3. Méthode de Vorbrüggen

En remarquant que les catalyseurs de Friedel-Crafts permettent la conversion des 1-acyloxy sucres acétylés en leur dérivés 1-acétylés et 1-halogénés, Vorbrüggen et Coll²⁴ ont tenté la réaction avec des pyrimidines et des sucres *per*-acétylés ou 1-acétylé-2,3,5-tribenzoylés. 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 réalisés avec différents catalyseurs de Friedel et Crafts (ZnCl₂, TiCl₄, AlCl₃, SnCl₄ ou

²³ G. E. Hilbert, T. B. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 2001 (1930).

²⁴ a) U. Neidballa, N. Vorbrüggen, *J. Org. Chem.*, **39**, 3654 (1974).

b) U. Neidballa, N. Vorbrüggen, *J. Org. Chem.*, **39**, 3660 (1974).

c) U. Neidballa, N. Vorbrüggen, *J. Org. Chem.*, **39**, 3668 (1974).

$\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$), 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).

La quantité de catalyseur employée dépend de la nature du réactif glucidique utilisé : 0,25 éq. sont suffisants pour réaliser un couplage entre une base silylée et un sucre halogéné en position anomérique, alors que 0,75 à 1,5 éq. sont nécessaires dans le cas de sucres 1-O-méthyle ou 1-O-acétylé, ces derniers étant moins sensibles mais moins réactifs.

Le mécanisme de la réaction de glycosylation (schéma IV.5) met en jeu la participation du groupement en position 2 du sucre : le groupement acyloxy (acétylé ou benzoyle) 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 .

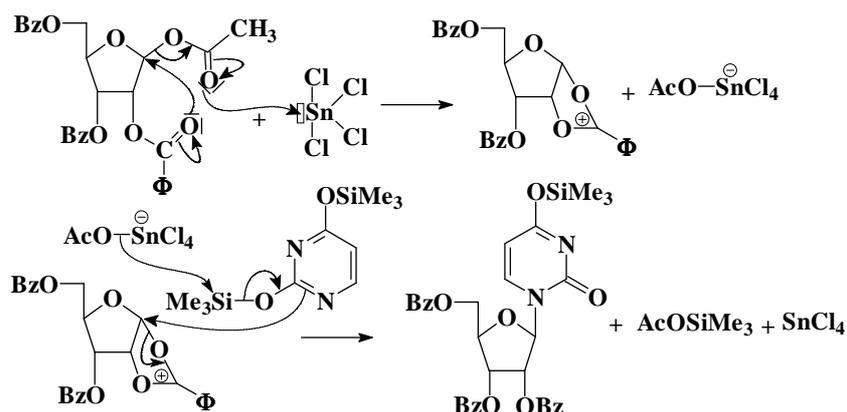


Schéma IV.5 : Mécanisme du couplage de Vorbrüggen appliqué aux bases pyrimidiques

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

- elle peut être appliquée non seulement aux pyrimidines et à leurs dérivés, mais aussi aux purines, aux thiazoles et à d'autres hétérocycles azotés ;
- 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-acétylés ou 1-O-méthylés plus stables et facile d'accès.

IV.2.1.4. Résultats et discussion

Pour réaliser le couplage de la thymine et du ribofuranose, nous avons opté pour la méthode de Vorbrüggen (schéma IV.6) en raison de sa facilité de mise en œuvre.

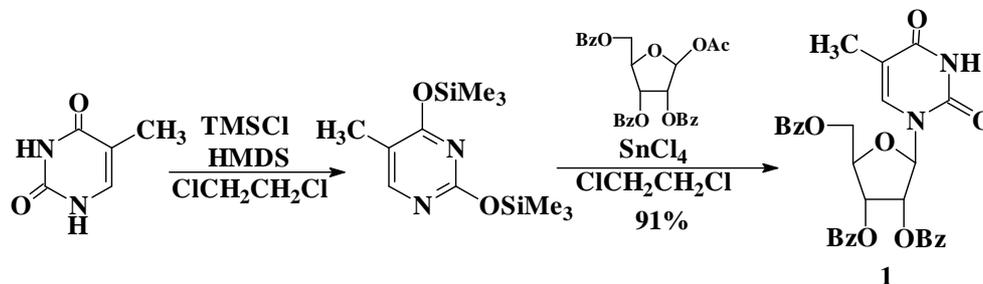


Schéma IV.6 : Couplage de la thymine et du ribofuranose

Nous avons tout d'abord réalisé la silylation de la base par un groupe triméthylsilyle, les agents silylants utilisés sont le 1,1,1,3,3,3-hexaméthylidisilazane (HMDS) et le chlorure de triméthylsilane (TMSCl). La silylation est réalisée dans un solvant : le 1,2-dichloroéthane qui a été choisi en raison de son point d'ébullition relativement haut (84°C) et sa compatibilité avec la suite de la réaction. Un excès de catalyseur est utilisé pour le couplage de manière à ce qu'il ne soit pas entièrement consommé par les restes des agents silylants.

La réaction de couplage est ensuite réalisée en intégrant le 1-O-acétyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranose, suivie du catalyseur le tétrachlorure d'étain, sous atmosphère d'argon. Après traitement et purification par chromatographie sur colonne, on obtient le produit désiré avec un rendement de 91%.

IV.2.1.5. Caractérisation spectrale

L'analyse spectroscopique de ce produit est conforme à la structure attendue. Le spectre infrarouge montre 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 correspondants aux vibrations C=O du carbonyle de la thymine à 1694 cm⁻¹ et du carbonyle des benzoyles à 1724 cm⁻¹, le signal correspondant aux C=C se trouve à 1603 cm⁻¹.

Le spectre RMN ¹H 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 12,12 Hz

caractéristique des protons géminés. Le proton H-1' résonne sous forme de doublet à 6,4 ppm. On note également la présence de tous les protons correspondant à la thymine (tableau IV.1).

Tableau IV.1 : Données RMN ^1H du composé **1** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 1 (CDCl_3)
Base	
H-3	8,8 s
H-6	7,16 d (1)
CH_3	1,6 d (1)
Sucre	
H-1'	6,43 d (6,4)
H-2'	5,75 t (6,2)
H-3'	5,91 dd (3,7-6)
H-4'	4,70 m
H-5'a	4,65 dd (3,4-12,1)
H-5'b	4,88 dd(2,5-12,1)
Benzoyle	
	7,35-8,2 m

IV.2.2. ALKYLATION DE LA THYMINE EN POSITION 3

La réaction d'alkylation en position 3 de la thymine a été réalisée d'après le processus mis au point par Eritja et Coll²⁵. (schéma IV.7)

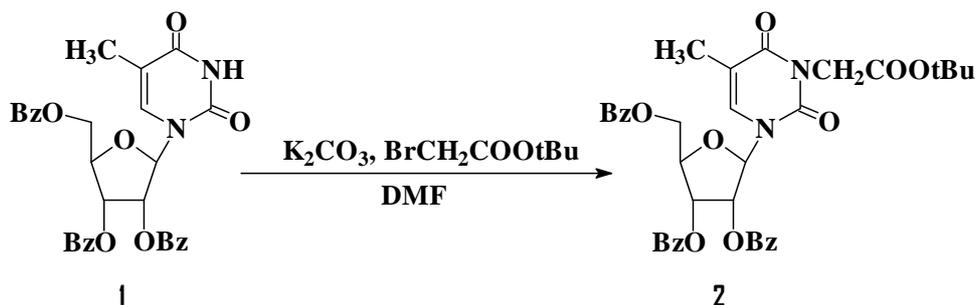


Schéma IV.7 : Alkylation en position 3 de la thymine

L'alkylation de la thymine est une réaction du type Williamson qui se fait en deux étapes, une réaction acido-basique dans un premier temps en mettant le produit **1** solubilisé

²⁵ E. Ferrer, A. Schevchenko, R. Eritja, *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 291-297 (2000).

dans le DMF anhydre en présence du K_2CO_3 . Puis en une substitution nucléophile du second ordre dans un deuxième temps et ce, en ajoutant le 2-bromoéthanoate de tertio-butyle, cette méthode permet d'obtenir le composé **2** avec un rendement quasi quantitatif (98%)

Caractérisation spectrale

Le spectre infrarouge de ce composé montre la disparition du signal du groupement N-H, ainsi que l'apparition d'une bande correspondant aux vibrations C=O du bras à 1667 cm^{-1} .

Le spectre RMN du proton montre la présence du CH_2 avec une non-équivalence des deux protons (4,52 et 4,58 ppm, $J = 16,5\text{ Hz}$) ainsi que la présence des CH_3 du tertio-butyle qui résonnent sous forme de singulet à 1,42 ppm, les déplacements des protons du sucre et de la base ne sont quasiment pas affectés par l'addition du bras. Les données RMN du proton sont rassemblées dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2 : Données RMN 1H du composé **2** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 2 ($CDCl_3$)
Base	
CH_3	1,64 sé
CH_3 (tBu)	1,42 s
H (CH_2)	4,52 d (16,5)
H (CH_2)	4,58 d (16,5)
H-6	7,20 sé
Sucre	
H-1'	6,45 d (6)
H-2'	5,75 t (6)
H-3'	5,93 dd (4,2-5,7)
H-4'	4,70 m
H-5'a	4,88 dd (2,4-12,2)
H-5'b	4,64 dd (3,3-12,2)
Benzoyles	7,34-8,2

IV.2.3. REACTIONS DE DEPROTECTION TOTALE DES HYDROXYLES

L'étape suivante est la déprotection totale des composés synthétisés précédemment. Celles-ci sont réalisées en milieu basique. Nous avons utilisé la méthode classique qui consiste à déprotéger les hydroxyles par transestérification dans le méthanol en présence de méthanolate de sodium.

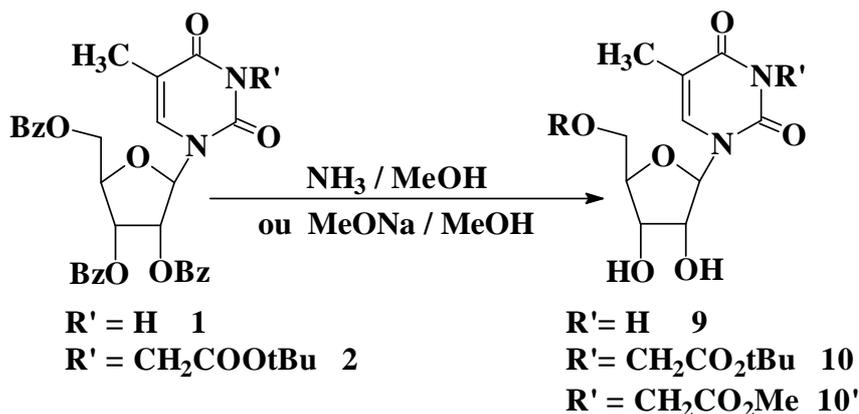
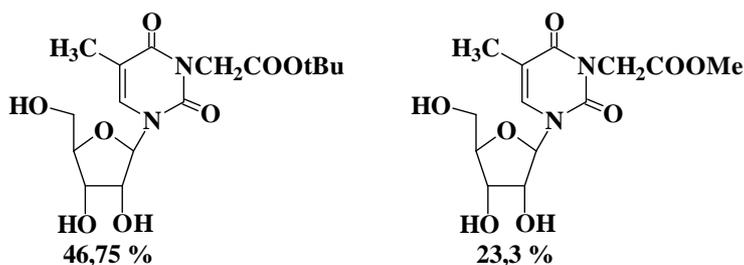


Schéma IV.8 : Réaction de déprotection totale

Dans le cas du composé **1**, la déprotection est totale au bout d'une heure et demie de réaction, on obtient le produit désiré avec un rendement de 98% en produit purifié.

La déprotection du composé **2** dans les mêmes conditions conduit à la formation de deux composés qui ont été caractérisés par RMN comme étant le produit attendu accompagné du produit de transestérification en position 3 sur la thymine.



Dans ce dernier essai nous avons donc opté pour la déprotection dans le méthanol en présence d'ammoniac même si cette réaction présente l'inconvénient d'être très lente puisque le temps de réaction est de 21 heures. Le rendement après purification est de 92%.

Caractérisation spectrale :

Le spectre infrarouge du composé **9** présente les bandes correspondantes aux vibrations C=O de la thymine vers 1694 cm⁻¹ et aux C-H aromatiques vers 2933 cm⁻¹. Bien entendu le

spectre n'a pas le signal du carbonyle du benzoate, et montre l'apparition d'une bande vers 3365 cm^{-1} correspondant aux groupements hydroxyles. En outre, les principales bandes de vibrations de la partie thymine sont présentes. Dans le cas du composé **10**, on remarque la présence des bandes déjà observées dans le spectre IR du composé **2** avec l'apparition de la bande hydroxyle à 3350 cm^{-1} et la disparition du signal du carbonyle du benzoate.

En RMN ^1H , la disparition des protons aromatiques confirme la disparition des groupements benzoyles. Les données RMN du proton des composés **9** et **10**, sont rassemblées dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3 : Données RMN ^1H des composés **9** et **10** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 9 (CD_3OD)	Composé 10 (CD_3OD)
Base		
H-3	-	-
H-6	7,83 q (1)	7,95 d (1)
CH_3	1,87 d (1)	1,91 d (1)
Chaîne		
CH_2	-	4,55 s
CH_3	-	1,46 s
Sucre		
H-1'	5,89 d(4,4)	5,90 d (4,4)
H-2'	4,19 dd(4,4-5,3)	4,26 † (4,6)
H-3'	4,15 dd (4-5,3)	4,35 † (4,6)
H-4'	3,98 ddd (2,7-3-4)	4 ddd(2,6-2,9-12,2)
H-5'a	3,73 dd(3-12,2)	3,75 dd (2,9-12,2)
H-5'b	3,84 dd(2,7-12,2)	3,87 dd (2,6-12,2)

IV.2.4. COUPURE OXYDANTE ET REDUCTION

La coupure oxydative et réduction est l'étape la plus délicate de cette synthèse en raison des nombreux paramètres gouvernant cette réaction. Généralement cette étape est effectuée par oxydation par l'acide *périodique* ou le *periodate*, suivie par une réduction au borohydrure de sodium.

L'analyse des résultats de la littérature montre que ces réactions sont effectuées en phase homogène^{26,27,28} ou hétérogène²⁹ avec des rendements n'excédant pas 68%. Ceux ci sont liés aux difficultés d'extraction du produit final. Cependant Sufrin et coll.³⁰ sont parvenus à effectuer l'oxydation et la réduction en une seule étape en déposant l'oxydant et le réducteur sur une résine par échange d'ions. Dans de telles conditions, les rendements ont été parfois supérieurs à 95%.

IV.2.4.1. Résultats et discussion

Nous avons appliqué la méthode de Sufrin et coll.³⁰, le substrat est solubilisé dans du méthanol auquel on additionne le *periodate* et le borohydrure de sodium sur résine. Le dialdéhyde est réduit au fur et à mesure de sa formation. Après purification par chromatographie, on obtient les composés **11**, **12**, **13** et **14** (schéma IV.9.)

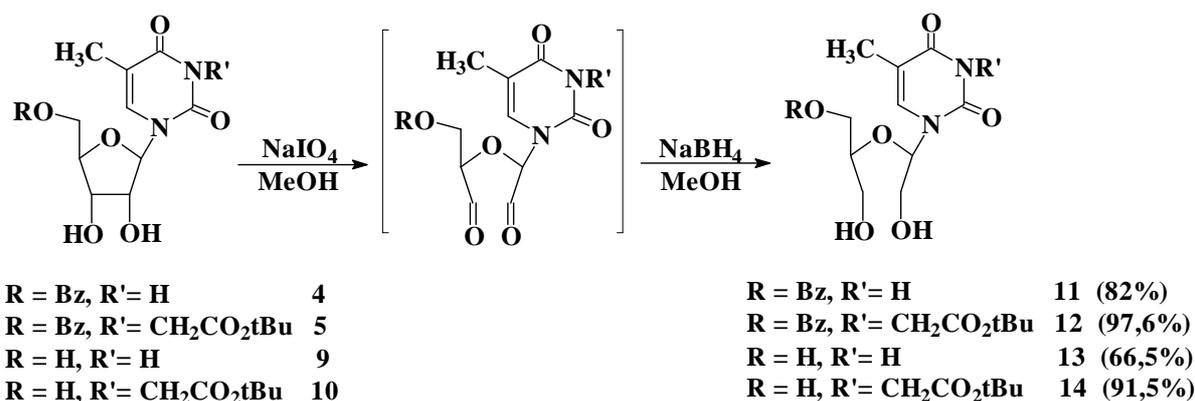


Schéma IV.9 : L'oxydation et la réduction du cycle furanose

IV.2.4.2. Caractérisation spectrale

Les spectres infrarouge des composés **11**, **12**, **13** et **14** sont comparables à ceux de leurs correspondants cycliques. Ils possèdent les vibrations C-H aliphatiques vers 2930 cm⁻¹, ainsi que les bandes hydroxyles vers 3390 cm⁻¹. En outre les principales bandes de vibrations de la partie thymine sont présentes.

²⁶ A.-F. Maggio, V.Boyer, A.-M. Aubertin, G. Obert, A. Kim, J.-L. Imbach, *Nucleosides & Nucleotides*, **10**, 1431 (1991)

²⁷ C. Périgaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2**, 677 (1992).

C. Périgaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach, *J. Chem. Soc. Perkin. I*, 1943 (1992)

²⁸ H. Furusho, T.Ogata, A.Kato, Y.Sato, T.Endo, A.Kaji, *Nucleosides Nucleotides*, **10**, 739 (1991)

²⁹ M. Bessodes, K. Antonakis, *Tetrahedron Lett*, **26**, 1305 (1985).

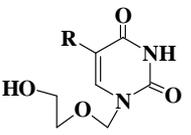
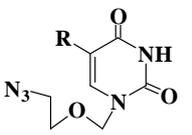
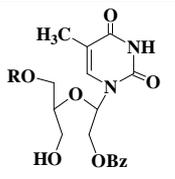
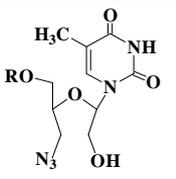
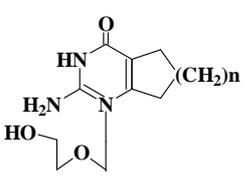
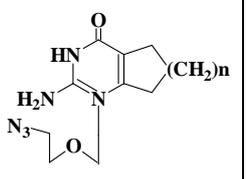
³⁰ J. R. Sufrin, A. J. Spiess, C. J. Marasco, S. L. Croft, D. Snowdon, V. Yardley, C.J. Bacchi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **5**, 1961 (1995).

Après oxydation et réduction, les spectres des composés **11**, **12**, **13** et **14** confirment la présence des deux protons H-2'a et b entre 3,67 et 3,81 ppm résonnant sous forme de double doublet avec des constantes de couplage $J_{1'-2'} \approx 5,5$ Hz et $J_{2'-a-2'-b} \approx 12$ Hz, de même pour les protons H-3'a et b qui résonnent entre 3,56 et 3,78 ppm sous forme de double doublet avec une constante de couplage $J_{3'-a-3'-b}$ de l'ordre de 12 Hz. Les données RMN du proton sont rassemblées dans le tableau IV.5.

IV.2.5. AZIDATION DES ACYCLONUCLEOSIDES

D'une manière générale, la synthèse consiste tout d'abord à fixer un groupement partant sur le groupement hydroxyle puis à effectuer sur ce composé une substitution nucléophile par un groupement azido. Le tableau IV.4 résume quelques méthodes de synthèses décrites dans la littérature.

Tableau IV.4 : Azidation: principaux résultats de la littérature

Produits de départ	Produits obtenus	Conditions expérimentales	Rendement	Référence
		1) TsCl/ pyridine 4°C 16 h 2) LiN ₃ (8éq.) / DMF 2h	56%	31
		(CF ₃ SO ₂) ₂ O/ collidine NaN ₃ / DMF	33%	32
		1) TsCl / pyridine T _{amb} 2) NaN ₃ /DMF 100°C 4h	23%	33

³¹ H.M.Abrams, L.Ho, S.H.Chu, *J. Med. Chem.*, **18**, 947 (1981)

³² A.F.Maggio, V.Boyer, A.M.Aubertin, G.Obert, A.Kirn, J.L.Imbach, *Nucleosides Nucleotides*, **10**,1431 (1991)

³³ J.Renault, D.Laduree, M.Robba, *Nucleosides Nucleotides*, **13**, 891 (1994).

Tableau IV.5 : Données RMN ¹H des composés **11**, **12**, **13** et **14** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 11 (CD₃OD)	Composé 12 (CD₃OD)	Composé 13 (CD₃OD)	Composé 14 (CD₃OD)
Base				
CH ₃	1,46 d (1)	1,58 d (1)	1,91 d (1,1)	1,93 d (1)
CH ₃ (tBu)	-	1,46 s	-	1,46 s
2H (CH ₂)	-	4,49 s	-	4,56 s
H-6	7,36 d (1)	7,4 d (1)	7,6 d (1,1)	7,65 q (1)
Ribosyle				
H-1'	5,95 t (5,7)	5,99 t (5,6)	5,96 t (5,5)	5,97 t (5,4)
H-2'a	3,78 dd (5,7-12)	3,67 dd(5,6-12)	3,70 dd (5,5-11,9)	3,69 dd (5,4-12)
H-2'b	3,65 dd (5,7-12)	3,81 dd(4,8-12)	3,80 dd (5,5-11,9)	3,77 dd (5,4-12)
H-3'a	3,68 dd (2,2-12,2)	3,75 dd(5,4-11,9)	3,69 m	3,63 dd (5-11,9)
H-3'b	3,67 dd (4-12,2)	3,78 dd(4,8-11,9)	3,68 dd (6,3-12,4)	3,56 dd (2,2-11,9)
H-4'	4,00 m	4,02 m	3,57 m	3,71 m
H-5'a	3,80 dd (4,8-12)	4,3 dd (3,1-12,1)	3,56 dd (5,3-12)	3,55 m
H-5'b	3,74 dd (5,3-12)	3,93 dd (3,1-12,1)	3,58 dd (5,4-12)	3,74 dd (3,9-11,6)
Benzoyles	7,40-8,10	7,40 - 7,95		

IV.2.5.1. Résultats et discussion

La méthode de Renault³³ (tosylation des composés **11** et **12** et azidation) n'a mené à aucune évolution lors de l'étape d'azidation. Nous avons alors réalisé les réactions d'azidation après métylation dans la pyridine anhydre en présence de quatre équivalents de chlorure de métyle à 0°C. Le mélange obtenu après traitement classique est utilisé tel quel. L'azidation est effectuée ensuite sur ce brut réactionnel dans le DMF à 100°C en présence d'azidure de sodium (15éq.) (schéma IV.10). Après deux heures la réaction est terminée, le mélange réactionnel est extrait au chloroforme puis purifié par ccm préparatives. Les rendements d'azidation obtenus sont acceptables par comparaison à ceux trouvés dans la littérature.

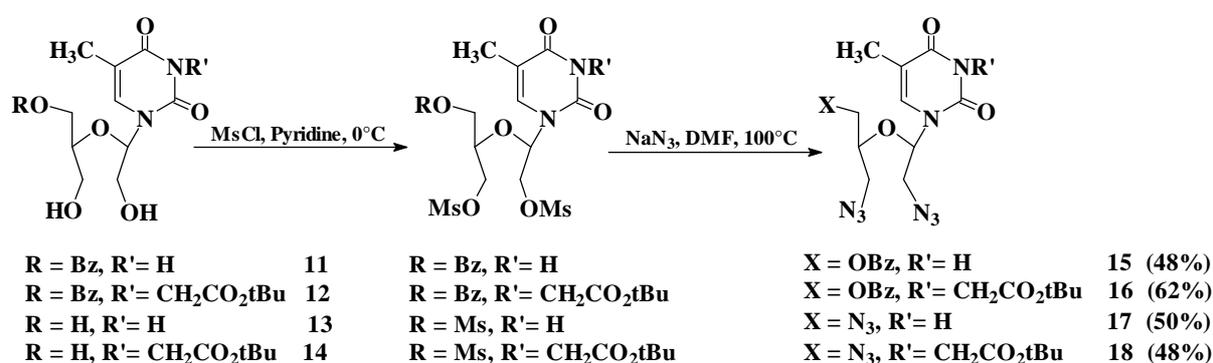


Schéma IV.10 : Réactions de métylation et d'azidation des groupements hydroxyle

IV.2.5.2. Caractérisation spectrale

L'analyse spectroscopique de ces produits est conforme aux structures attendues. Les spectres infra rouges présentent les bandes correspondantes aux vibrations C=O de la thymine vers 1690 cm⁻¹, avec disparition des bandes hydroxyles et l'apparition d'une bande vers 2104 cm⁻¹ correspondant au groupement azido.

Les données RMN du proton des composés **15**, **16**, **17** et **18** sont rassemblées dans le tableau IV.6.

Tableau IV.6 : Données RMN ¹H des composés **15**, **16**, **17** et **18** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 15 (CDCl ₃)	Composé 16 (CDCl ₃)	Composé 17 (CDCl ₃)	Composé 18 (CDCl ₃)
Base				
CH ₃	1,61 d (1)	1,61 d (1)	1,97 sé	1,98 d (1)
CH ₃ (tBu)	-	1,46 s	-	1,47 s
Ha (CH ₂)	-	4,50 d (16,5)	-	4,58 s (2H)
Hb (CH ₂)	-	4,54 d (16,5)	-	-
H-3	9,10 s	-	9,12 sé	-
H-6	7,14 q (1)	7,15 q (1,1)	7,27 sé	7,59 d (1)
Ribosyle				
H-1'	6,08 dd(5,1-5,8)	6,11 dd (4,7-6,4)	6,07 † (5,5)	6,10 † (5,8)
H-2'a	3,58 dd(5,8-12,8)	3,46 dd(4,7-13,1)	3,63 dd(5,4-13,2)	3,75 dd (6-13,1)
H-2'b	3,48 dd(5,1-12,8)	3,57 dd(6,4-13,1)	3,51 dd(5,5-13,2)	3,58 dd(5,8-13,1)
H-3'a	3,59 dd(4,1-12,8)	3,58 dd(5,8-13,1)	3,61dd(3-13,2)*	3,48 dd(5,5-13,2)*
H-3'b	3,70 dd(5-12,8)	3,70 dd(4,4-13,1)	3,46 dd(5,4-13,2)*	3,65 dd(4,2-13,2)*
H-4'	4,08 m	4,10 m	3,77 m	3,83 m
H-5'a	4,37 dd(4,8-12,5)	4,32 dd(3,3-12,2)	3,41 dd(7-13,2)*	3,41 m *
H-5'b	4,38 m	4,42 dd(6,6-12,2)	3,35 dd(4-13,2)*	3,41 m *
Benzoyles				
H aromatiques	7,3-8,07	7,26-7,93		

Ce résultat est également confirmé par spectrométrie de masse, les spectres de masse obtenus des composés **15**, **16**, **17** et **18** présentent le pic quasi-moléculaire correspondant à MNa^+ respectivement à m/z 437, 551, 358 et 472.

IV.2.6. CHLORATION DES ACYCLONUCLEOSIDES

D'une manière générale la réaction de chloration est réalisée en une seule étape, avec le chlorure de thionyle³⁴ et en modulant le solvant et la température de réaction. Les résultats obtenus avec le composé **12** sont rassemblés sur le tableau IV.7.

Tableau IV.7 : Etude de la réaction de chloration du composé **12**.

Essai	SOCl ₂	solvant	Température (°C)	Rendement %
1	4 éq. /OH	DMF	22	21 %
2	4 éq. /OH	DMF	0 (10mn) puis 22	19 %
3	5 éq. /OH	DMF	0 (10mn) puis 22	30%
4	5 éq. /OH	pyridine	0 (10mn) puis 22	45%

Les résultats optimum sont observés dans la pyridine en additionnant le chlorure de thionyle à 0°C pendant 10 minutes puis en laissant la température remonter à l'ambiante (essai 4). Afin d'améliorer ce rendement nous avons également réalisé cette transformation en deux étapes. Nous avons utilisé le produit mésylé formé à partir du composé **12** pour réaliser une substitution nucléophile dans le DMF, en présence de KCl. Après 24 heures de réaction, le mélange réactionnel est traité et le brut purifié. Le composé attendu est obtenu avec un rendement de 15 %.

Pour réaliser les chloration nous avons opté pour la première méthode, en une seule étape.

³⁴ V.Boucher, I.Stasik, D.Beaupère, R.Uzan, Carbohydr. Res, **300**, 139-142 (1997)

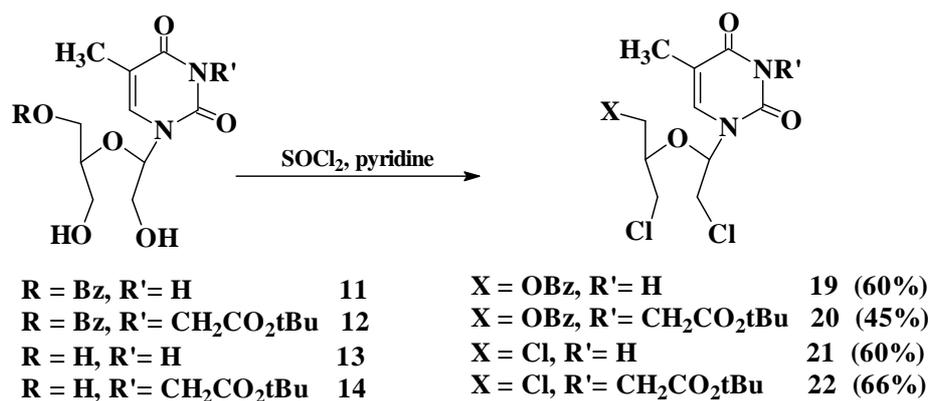


Schéma IV.11 : réactions de chloration

Les composés **19**, **20**, **21** et **22** sont obtenus après purification avec des rendements qui varient de 45% à 66%.

Caractérisation spectrale :

L'analyse spectroscopique de ces produits est conforme aux structures attendues. Les spectres infrarouges de ces composés présentent les principales bandes de vibrations de la partie thymine ainsi que les bandes de vibrations déjà observées dans les spectres des composés **11**, **12**, **13** et **14** avec la disparition des bandes hydroxyles.

Les attributions des signaux du spectre RMN du proton sont reportées sur le tableau III.8.

Les spectres de masse confirment qu'il s'agit bien des composés chlorés, le spectre de masse du composé **21** présente deux pics quasimoléculaires à m/z 315 et m/z 317 correspondants à $(M+H^+)$, de même pour le composé **22** qui présente deux pics à $m/z = 451$ et $m/z = 453$ correspondants à $(M+Na^+)$.

Tableau IV.8: Données RMN ¹H des composés **19**, **20**, **21** et **22** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 19 (CDCl ₃)	Composé 20 (CDCl ₃)	Composé 21 (CDCl ₃)	Composé 22 (CDCl ₃)
Base				
CH ₃	1,61 d (1)	1,60 d (1)	1,97 d (1)	1,98 sé
CH ₃ (tBu)	-	1,45 s	-	1,46 s
2H (CH ₂)	-	4,52 s	-	4,57 s
H-3	8,67 s	-	9,06 s	-
H-6	7,08 q (1)	7,10 q (1)	7,21 q (1,1)	7,23 sé
Ribosyle				
H-1'	6,12 t (6,1)	6,15 t (6)	6,09 d (6,4)	6,10 t (6,1)
H-2'a	3,63 dd(6,1-12)	3,64 dd(6-11,9)	3,78 dd(6,4-11,9)	3,77 dd(6,1-12)
H-2'b	3,79 dd(6,08-12)	3,73 dd(6-11,9)	3,66 dd(6,4-11,9)	3,67 dd(6,1-12)
H-3'a	3,75 dd(5,2-12,2)	3,77 m	3,31 m	3,72 dd(5-12,2)*
H-3'b	3,80 dd(5,5-12,2)	3,79 dd(5,5-12)	3,60 dd(6,2- 12)	3,76 dd(5,5-12,2)*
H-4'	4,19 m	4,18 m	3,98 m	3,97 m
H-5'a	4,43 dd(4-12,1)	4,39 dd(3,2-12,1)	3,65 dd(4,3-11,9)	3,61 dd(5,7-11,9)*
H-5'b	4,46 dd(6-12,1)	4,48 dd(7-12,1)	3,64 dd(5,5-11,9)	3,63 dd(1,3-11,9)*
Benzoyles				
H aromatiques	7,4-8	7,4-8		

IV.2.7. DEPROTECTION DU GROUPEMENT BENZOÏLE EN POSITION 5'

La déprotection des composés **15** et **16** est réalisée dans une solution méthanolique d'ammoniac (7M) à température ambiante (schéma IV.12).

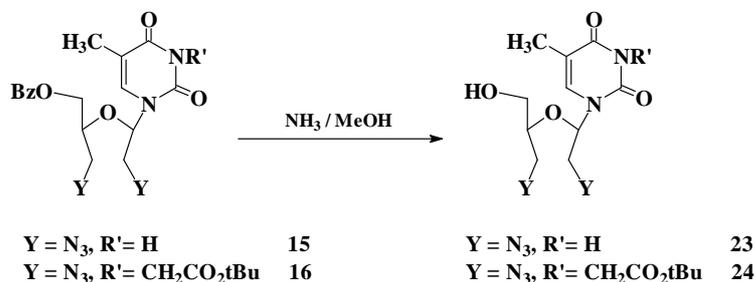


Schéma IV.12 : Déprotection de l'hydroxyle primaire

Les spectres IR des composés débenzoylés en position 5' montrent la disparition du signal du carbonyle du benzoate, et présentent une bande intense à 3300 cm^{-1} correspondant au groupement hydroxyle. En RMN du proton, la disparition des signaux des protons aromatiques ainsi que le blindage des protons H-5'a et b confirment la disparition du groupement benzoyle. Les données RMN du proton des composés **23** et **24** sont rassemblées dans le tableau IV.9.

Tableau IV.9: Données RMN ^1H des composés **23** et **24** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 23 (CD_3OD)	Composé 24 (CD_3OD)
Base		
CH_3	1,90 d (1,1)	1,94 d (1)
CH_3 (tBu)	-	1,46 s
2H (CH_2)	-	4,55 s
H-6	7,57 q (1,1)	7,64 q (1)
Ribosyle		
H-1'	6,04 d (6)	6,07 t (5,9)
H-2'a	3,72 dd(6-13,1)	3,73 dd(5,9-13)
H-2'b	3,43 dd(6-13,1)	3,46 dd(5,9-13)
H-3'a	3,62 dd(3,8-13)	3,63 dd(3,9-13,2)
H-3'b	3,55 dd(5,8-13)	3,51 dd(5,3-13,2)
H-4'	3,67 m	3,69 m
H-5'a	3,66 dd(3,8-12,8)	3,69 m
H-5'b	3,51 dd(5,5-12,8)	3,55 dd(3,4-12,4)

Ce résultat est également confirmé par la spectroscopie de masse, le spectre de masse du composé **23** présente le pic quasimoléculaire ($M+H^+$) à m/z 311 ainsi que le pic correspondant à ($M+NH_4^+$) à m/z 328, de même pour le composé **24** qui présente le pic quasimoléculaire ($M+H^+$) à m/z 425 ainsi que le pic correspondant à ($M+NH_4^+$) à m/z 442.

La déprotection du composé **19** dans la solution méthanolique d'ammoniac conduit au composé **25** résultant de la débenzoylation de l'hydroxyle primaire et d'une cyclisation intramoléculaire (schéma IV.13). La spectrométrie de masse présente deux pics à $m/z = 261$ et $m/z = 278$ correspondant respectivement à MH^+ et $(MNH_4)^+$. Ce résultat est également confirmé par la RMN 1H . La même cyclisation est remarqué lors de la réaction de déprotection du composé **20** (schéma IV.14).

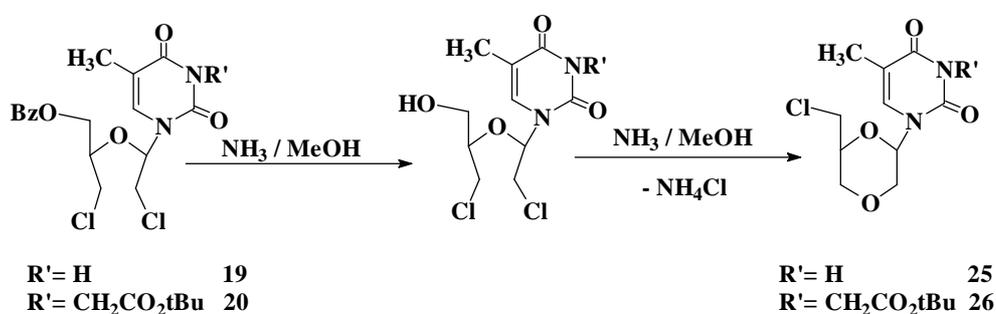


Schéma IV.13 : la cyclisation intramoléculaire.

IV.2.8. DEPROTECTION DE LA FONCTION ACIDE CARBOXYLIQUE

La fonction acide carboxylique a été déprotégée avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) à température ambiante²⁵ (schéma IV.14).

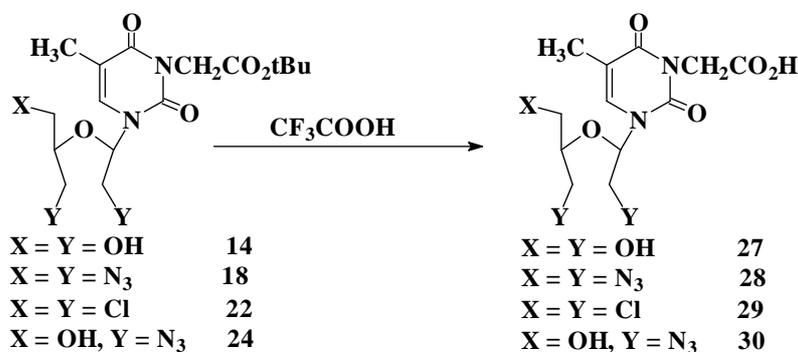


Schéma IV.14 : Déprotection de la fonction acide carboxylique

Le substrat de départ est mis en présence d'un large excès d'acide trifluoroacétique et à température ambiante. La réaction est suivie par ccm, une fois les produits de départ disparus, la réaction est arrêtée et le mélange évaporé après ajout d'éther éthylique. Les produits **27**, **28**, **29** et **30** sont obtenus après purification par ccm préparatives avec des rendements respectifs de 94%, 88%, 83% et 52%.

Caractérisation spectrale :

Les spectres IR de ces composés présentent la bande correspondant aux vibrations C=O de la fonction acide carboxylique vers 1670 cm^{-1} .

En RMN ^1H , la disparition des protons du tertibutyle confirme la déprotection de la fonction acide carboxylique. Les données RMN du proton des composés **27**, **28**, **29** et **30** sont rassemblées dans le tableau IV.10.

Tableau IV.10 : Données RMN ¹H des composés 27, 28, 29 et 30 [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 27 (CD ₃ OD)	Composé 28 (CD ₃ OD)	Composé 29 (CD ₃ OD)	Composé 30 (CD ₃ OD)
Base				
CH ₃	1,93 d (1,1)	1,97 s	1,95 d(1,2)	1,97 sé
H (CH ₂)	4,62 d (16,9)	4,60 s (2H)	4,68 d(16,9)	3,38 s (2H)
H (CH ₂)	4,67 d (16,9)	-	4,61 d(16,9)	-
H-6	7,65 q (1,1)	7,34 s	7,63 q(1,2)	7,56 sé
Ribosyle				
H-1'	5,97 t (5,4)	6,07 t(5,80)	6,14 dd(6-6,7)	6,07 t(4,2)
H-2'a	3,70 dd (5,4-11,9)	3,70 dd(5,8-13)	3,93 dd(6-11,9)	3,68 dd(4,2-12,5)
H-2'b	3,77 dd (5,4-11,9)	3,50 dd(5,8-13)	3,88 dd(6,7-11,9)	3,50 m
H-3'a	3,55 m	3,60 dd(4-13,1)	3,63 dd(6-12,1)	3,56 dd(3-13,5)
H-3'b	3,55 dd(4,6-11,4)	3,45 dd(5,5-13,1)	3,68 dd(4,4-12,1)	3,46 dd(4,8-13,5)
H-4'	3,64 m	3,80 m	4,07 m	3,69 m
H-5'a	3,68 m	3,38 m	3,83 dd(5,1-11,9)	3,70 m
H-5'b	3,68 m	3,38 m	3,79 dd(4,9-11,9)	3,54 m

CONCLUSION

Dans cette première partie, nous avons réalisé la synthèse et l'évaluation biologique d'acyclonucléosides préparés par modification de nucléosides.

Toutes les structures ont été construites à partir de la thymine. Des composés trihydroxylés, trichlorés, di ou triazidés, ont été synthétisés. Dans certains cas un groupement carboxyméthyle leur a été greffé au niveau de l'azote en position 3 de la base.

En outre, au cours de cette étude, nous avons mis au point une nouvelle méthode de déprotection sélective des hydroxyles secondaires de la partie glucidique, cette méthode a été utilisée dans un premier temps en série furanose et généralisée en série pyranose. Elle peut être aisément utilisée pour la débenzoylation sélective d'autres glucides. Tous les composés ont été synthétisés avec des rendements acceptables et sont complètement caractérisés par différentes méthodes physiques (IR, RMN, masse).

Les premiers essais d'inhibition de virus sur le virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1) ont été réalisés sur ces molécules (annexe I) à l'Institut de Virologie de la Faculté de Médecine de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg (unité INSERM 74), sous la direction du docteur Anne-Marie Aubertin. Si les premiers résultats se sont avérés décevants, nous espérons que ces composés présenteront une activité plus significative sur l'herpès simplex.

CHAPITRE V
Partie expérimentale

V. PARTIE EXPERIMENTALE

V.1. MESURES PHYSIQUES

Les températures de fusion T_f ont été déterminées au banc de Köfler et ne sont pas corrigées.

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés dans une cuve de 10 cm de longueur sur un polarimètre digital JASCO (DIP-370) à 21°C.

Les spectres IR ont été enregistrés sur un appareil Perkin Elmer 1310 sur des échantillons conditionnés en pastilles KBr. Les nombres d'ondes sont exprimés en cm^{-1} .

Les spectres RMN du proton ont été enregistrés sur un appareil Bruker DPX avec une fréquence de 400,13 MHz au service commun de RMN de l'université de Limoges. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm en prenant le tétraméthylsilane comme référence interne, les constantes de couplages sont mesurées en Hz. Les abréviations retenues sont s (singulet), d (doublet), dd (double-doublet), t (triplet), tt (triple-triplet), se (singulet élargi), m (multiplet).

Les spectres de masse en ionisation chimique ont été réalisés sur un appareil R-10-10 Nermag au Laboratoire de Chimie Organique Structurale de l'Université Pierre et Marie Curie- Paris VI.

V.2. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ANALYTIQUE

L'évolution des réactions ainsi que la pureté des produits sont contrôlées par cmc (silice déposée sur plaque d'aluminium Alufolien, gel de silice 60 F-254 Merck de 0,2 mm d'épaisseur). La révélation est assurée :

- soit par observation sous lampe UV à 254 nm ;
- soit par vaporisation d'une solution 6 N d'acide sulfurique suivie d'un chauffage à 200°C pour les composés glycosylés ;
- soit en combinant ces deux techniques.

Les éluants utilisés sont :

Éluant A : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$; 97/3; V/V

Éluant B : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$; 99/1; V/V

Éluant C : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$; 99,5/0,5; V/V

Éluant D : CH₂Cl₂/EtOH; 50/50; V/V

Éluant E : CH₂Cl₂/EtOH; 90/10; V/V

Éluant F : CH₂Cl₂/EtOH; 95/5; V/V

Éluant G : CH₂Cl₂/EtOH; 80/20; V/V

Éluant H : butanol/eau/acide acétique ; 50/25/25 ; V/V/V

Éluant I : CH₂Cl₂/EtOH; 98/2; V/V

Éluant J : CH₂Cl₂/EtOH; 96/4; V/V

Éluant K : CH₂Cl₂/MeOH; 90/10; V/V

V.3. CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVES

V.3.1. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE PREPARATIVE

Les chromatographies sur couche mince préparative sont effectuées sur plaques préparées au laboratoire à l'aide de 80 g de silice (Kieselgel 60PF245, Merck) gélifiées par addition de 210 ml d'eau déposée sur 6 plaques de verre (20x20), puis séchées à l'air libre pendant 24 heures et activées à 110°C pendant 2 heures.

V.3.2. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SILICE

Les différentes chromatographies ont été réalisées avec du gel de silice 60 (325 mesh, 20-45 microns, chromagel Merck).

V.4. REACTIFS ET SOLVANTS

L'origine des réactifs et solvants utilisés spécifiquement au cours de cette partie est présentée dans le tableau V.1.

Tableau V.1 : Réactifs et solvants utilisés

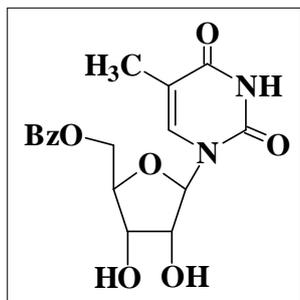
Réactifs et solvants	Origine
Acétone	Prolabo
1- <i>O</i> -acétyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -benzoyl-β-D-ribofuranose	Acros
Acétonitrile	Acros
Acide chlorhydrique	Prolabo
Acide sulfurique concentré	Prolabo
Acide acétique	SDS
Acide trifluoroacétique	Aldrich

Azidure de sodium	Aldrich
Carbonate de potassium	Acros
Chloroforme	SDS
Chlorure de mésyle	Acros
Chlorure de thionyle	Aldrich
Chlorure de triméthylsilane	Aldrich
Dichlorométhane	SDS
Diméthylformamide	SDS
Ethanol	SDS
Ethanol absolu	Prolabo
Ether de pétrole	SDS
1,1,1,3,3,3-Hexaméthylidisilazane	Aldrich
Méthanol	Fisher
Méthanolate de sodium dans le méthanol (0,5 M)	Acros
Periodate de sodium	Acros
Pyridine anhydre	Aldrich
Résine échangeuse d'ions H ⁺ Amberlyst IRN 77	Prolabo
Résine échangeuse d'ions Amberlyst A27	Aldrich
Solution méthanolique d'ammoniac (7N)	Acros
Tétrachlorure d'étain	Aldrich
Tétrahydruroborate de sodium	Prolabo
Thymine	Aldrich
Toluène	SDS

V.5. SYNTHÈSES

V.5.1. DEPROTECTION SELECTIVE DES HYDROXYLES SECONDAIRES

V.5.1.1. déprotection sélective en série furanose



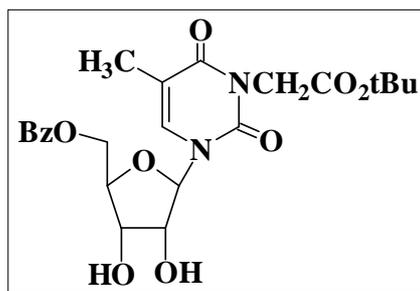
1-(5-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)thymine 4

Dans un ballon de 50 ml, on introduit 499 mg (0,875 mmol) de composé **1**, avec 6,25 ml de solution de NH_3 dans le méthanol (7 M, 50 éq.) et 10 ml de méthanol. On place le ballon à -15°C . On suit l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince dans l'éluant A. Après 6 heures de réaction, le mélange est évaporé à sec et le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur plaque en utilisant l'éluant A, on isole 210 mg de composé **4** sous forme de sirop (66%).

$R_f = 0.21$ (éluant A)

RMN ^1H (CDCl_3): voir *tableau III.2*.

IR : 3360 cm^{-1} (O-H), 2953 cm^{-1} (C-H), 1710 cm^{-1} (C=O benzoyle), 1670 cm^{-1} (C=O thym), 1265 cm^{-1} (C-O-C).



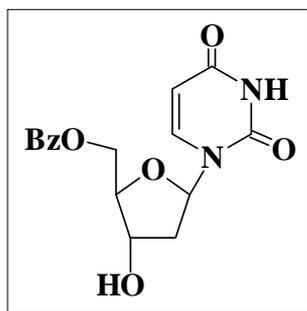
1-(5-O-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)-3-(*ter*-butoxycarbonylméthyl)thymine **5**

Le composé **5** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **4**, à partir de 200 mg (0,378 mmol) du produit **2**. On obtient le composé désiré sous forme de sirop avec un rendement de 68% (109 mg), après purification par ccm préparatives.

R_f = 0,5 (éluant A).

RMN ¹H (CDCl₃): voir *tableau III.2*.

IR (KBr): 3365 cm⁻¹ (OH), 2947 cm⁻¹ (C-H), 1711 cm⁻¹ (C=O benzoyle), 1665 cm⁻¹ (C=O thym), 1660 cm⁻¹ (C=O CO₂tBu), 1271 cm⁻¹ (C-O-C).



1-(5'-O-benzoyl- β -D-érythropentofuranosyl)Uracile **6**

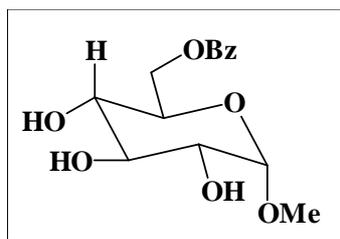
Le composé **6** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **4**, à partir de 876 mg (2 mmol) du produit **3** . On obtient le composé désiré avec un rendement de 65 %, après purification par ccm préparatives.

R_f = 0,4 (éluant A).

RMN ¹H (CDCl₃): voir *tableau III.2*.

IR (KBr): 3360 cm⁻¹ (OH), 3010 cm⁻¹ (C-H), 1720 cm⁻¹ (C=O benzoyle), 1680 cm⁻¹ (C=O thym), 1260 cm⁻¹ (C-O-C).

V.5.1.2. déprotection sélective en série pyranose



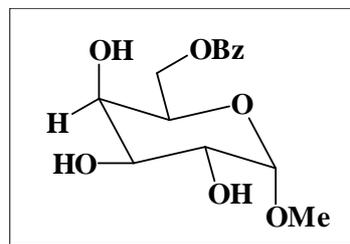
1-O-methyl-3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranoside **7**

Le composé **7** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **4**, à partir de 1,22 g (2 mmol) de 1-méthyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranoside. Dans ce cas la réaction dure 5 heures à température ambiante. On obtient le composé désiré avec un rendement de 65 %, après purification par ccm préparatives.

Rf = 0,40 (éluant K).

RMN ^1H (CDCl_3): voir *tableau III.3*.

IR (KBr): 3377 cm^{-1} (OH), 2937 cm^{-1} (C-H), 1728 cm^{-1} (C=O benzoyle), 1275 cm^{-1} (C-O-C).



1-O-methyl-3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-galactopyranoside **8**

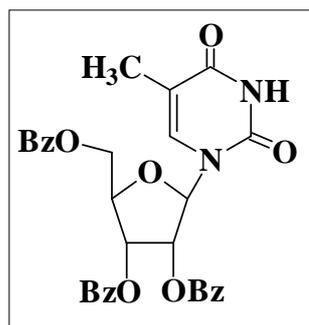
Le composé **8** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **5**, à partir de 1,22 g (2 mmol) de 1-méthyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D galactopyranoside. On obtient le composé désiré avec un rendement de 65 %, après purification par ccm préparatives.

Rf = 0,43 (éluant K).

RMN ^1H (CDCl_3): voir *tableau III.3*.

IR (KBr): 3379 cm^{-1} (OH), 2940 cm^{-1} (C-H), 1721 cm^{-1} (C=O benzoyle), 1271 cm^{-1} (C-O-C).

V.5.2. GLYCOSYLATION



1-(2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)thymine **1**

Dans un bicol de 100 ml surmonté d'un réfrigérant, sous atmosphère d'argon, on introduit 504 mg (4 mmol) de Thymine et 20 ml de 1,2-dichloroéthane. On ajoute 0,676 ml du 1,1,1,3,3,3-hexaméthylsilazane (HMDS, 3,2 mmol, 0,8 éq.) et 0,3 ml de chlorure de triméthylsilane (TMSCl, 3,2 mmol, 0,8 éq.) et on chauffe (80°C) ce mélange jusqu'à obtention d'une solution limpide (environ 3 h). On laisse refroidir, et d'autre part on dissout 2,016 g de 1-*O*-acétyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranose (4 mmol, 1 éq.) dans 20 ml de 1,2-dichloroéthane que l'on additionne au mélange réactionnel, puis on ajoute à l'aide d'une seringue 932 μ l de tétrachlorure d'étain (2 éq.). On suit l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince dans l'éluant A.

La réaction est arrêtée après 2 h, 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 2 fois avec 30 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 B. On isole 2,07g de composé **1** sous forme de cristaux (91%).

Tf = 92-94°C.

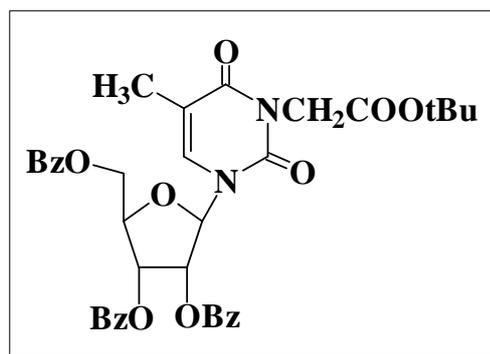
Rf = 0,53 (éluant A)

$[\alpha]_D^{22} = -21^\circ (c=1, \text{CHCl}_3)$

RMN ¹H (CDCl₃): voir *tableau IV.1*.

IR (KBr): 3186 cm⁻¹ (N-H), 3065 cm⁻¹ (C-H), 1724 cm⁻¹ (C=O des benzoyle), 1694 cm⁻¹ (C=O thym), 1603 cm⁻¹ (C=C), 1266 cm⁻¹ (C-O-C).

V.5.3. ALKYLATION DE LA THYMINE EN POSITION 3



1-(2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)-3-*ter*-butoxycarbonylméthyl-thymine **2**

Dans un bicol de 50 ml, on introduit 300 mg (0,53 mmol) du produit **1**, auquel on ajoute 10 ml de DMF et 725 mg de carbonate de potassium (K_2CO_3 10 éq., 5,26 mmol). Le bicol est placée sous atmosphère d'argon et agitation magnétique, puis on ajoute à l'aide d'une seringue 155 μ l du 2-bromoéthanoate de tertibutyle (2 éq.), 0,105 mmol), On suit l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince en utilisant l'éluant A. La réaction est arrêtée après 2 heures, le produit brut est filtré, et le carbonate de potassium est rincé avec du dichlorométhane, après évaporation on purifie par chromatographie sur plaques de silice en utilisant l'éluant C. On récupère 353 mg de composé **2** sous forme de sirop (98%).
Rf = 0,56 (éluant A)

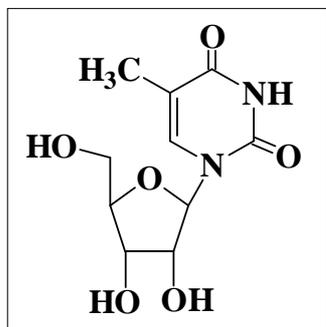
$[\alpha]_D^{22} = -64^\circ$ (c= 0,91, $CHCl_3$)

RMN 1H ($CDCl_3$): voir *tableau IV.2*

IR (KBr): 2973 cm^{-1} (C-H), 1728 cm^{-1} (C=O benzoyle), 1694 cm^{-1} (C=O thym), 1667 cm^{-1} (C=O CO_2tBu), 1599 cm^{-1} (C=C), 1266 cm^{-1} (C-O-C).

V.5.4. DEPROTECTION TOTALES DES HYDROXYLES

1. Déprotection par transestérification dans le méthanol en présence de méthanolate de sodium :



1-(β-D-ribofuranosyl)thymine **9**

Dans un ballon de 50 ml, on introduit 500 mg (0,88 mmol) du composé **1** puis 19 ml ml (50 éq.) d'une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (0,5 M), et on place l'ensemble sous agitation magnétique. On suit l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince dans l'éluant E. La réaction est arrêtée après 1,5 h, on neutralise le méthanolate de sodium avec de la résine acide, après filtration et évaporation le produit brut est purifié sur plaques de silice en utilisant l'éluant D. On isole 223 mg (98%) de composé **9**.

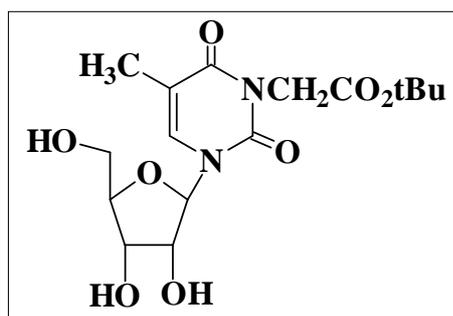
R_f = 0,54 (éluant E).

$[\alpha]_D^{22} = -13^\circ$ (c= 0.43, CH₃OH).

RMN ¹H (CD₃OD): voir *tableau IV.3*.

IR (KBr): 3365 cm⁻¹ (OH), 2933 cm⁻¹ (C-H), 1694 cm⁻¹ (C=O thym), 1650 cm⁻¹ (C=C).

2. Déprotection dans le méthanol en présence d'ammoniac :



3-ter-butoxycarbonylméthyl-1-(β-D-ribofuranosyl)thymine 10

Dans un ballon de 50 ml on introduit 109 mg (0,15 mmol) du composé **2**, et 1 ml d'une solution 7 M d'ammoniac dans le méthanol. On suit l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince dans l'éluant E.

La réaction est arrêtée après 21 h, le produit brut est purifié par chromatographie sur plaques de silice dans l'éluant E, on récupère 52 mg de composé **10** (92%).

R_f = 0,54 (éluant E)

RMN ¹H (CDCl₃): voir *tableau IV.3*.

IR (KBr): 3379 cm⁻¹ (OH), 2936 cm⁻¹ (C-H), 1703 cm⁻¹ (C=O de la thym), 1661 cm⁻¹ (C=O CO₂tBu), 1636 (C=C), 1240 cm⁻¹ (C-O-C).

V.5.5. COUPURE OXYDANTE ET REDUCTION

V.5.5.1. Préparation des réactifs

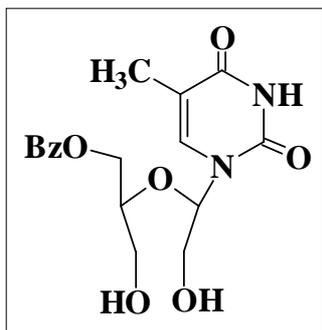
V.5.5.1.1. Résine *periodate*

Dans un becher de 600 ml on introduit 8,6 g de résine échangeuse d'ions Amberlyst A27, à laquelle on ajoute 10 g de *periodate* de sodium, puis 150 ml d'eau. L'ensemble est mis sous agitation mécanique pendant 4,5 h, après filtration sous vide, lavage à l'eau puis au méthanol la résine est séchée dans un dessiccateur à 50°C.

V.5.5.1.2. Résine borohydrure

Dans 256 ml d'eau, on introduit 5 g de tétrahydruoborate de sodium, qu'on laisse sous agitation mécanique pendant quelques minutes puis on ajoute 15,2 g de résine Amberlyst A27. On suit les mêmes étapes que pour la résine *periodate*.

V.5.5.2. Oxydation-réduction



1-[1-(1-*O*-benzoylmethyl-2-hydroxyethoxy)-2-hydroxyéthyl] thymine **11**

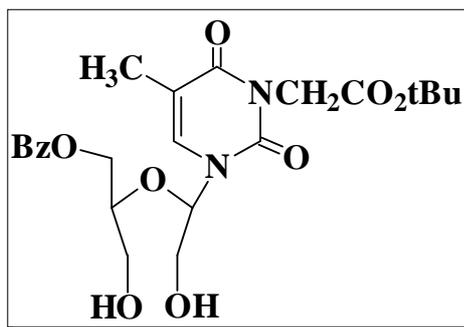
Dans un ballon de 50 ml, on introduit 239 mg (0,66 mmol) du produit **4** et 15 ml de méthanol, on ajoute 752 mg (10 éq.) de NaIO₄ sur résine et 752 mg (6 éq.) de NaBH₄ sur résine, et on place le ballon sous agitation magnétique lente.

On suit l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince en utilisant l'éluant E. La réaction est arrêtée après 5 jours, le produit brut est filtré, et la résine est rincée avec du méthanol, après évaporation, on purifie le brut réactionnel par chromatographie sur plaques (éluant E). On récupère 200 mg de composé **11** (82%).

R_f = 0.50 (éluant E).

RMN ¹H (CDCl₃): voir *tableau IV.5*.

IR(KBr): 3397 cm⁻¹ (O-H), 2935 (C-H), 1720 cm⁻¹ (C=O benzoyl), 1698 cm⁻¹ (C=O thym), 1270 cm⁻¹ (C-O-C).



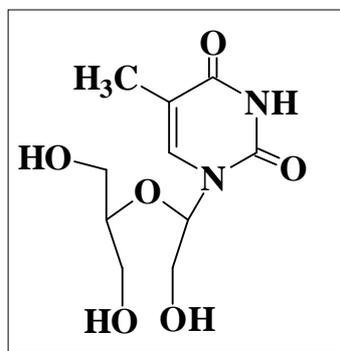
1-[(1-*O*-benzoyl-2-hydroxy éthoxy)-2-hydroxyéthyl]-3-*ter*-butoxycarbonylméthylthymine **12**

Le composé **12** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **11**. A partir de 169 mg (0,35 mmol) du composé **5**. Après purification par chromatographie sur plaques en utilisant l'éluant F, on obtient le composé **12** avec un rendement de 97,6%.

R_f = 0,63 (éluant F).

RMN ¹H (CD₃OD): voir *tableau IV.5*.

IR (KBr): 3399 cm⁻¹ (OH), 2930 cm⁻¹ (C-H), 1699 cm⁻¹ (C=O thym), 1641 cm⁻¹ (C=O CO₂tBu), 1271 cm⁻¹ (C-O-C).



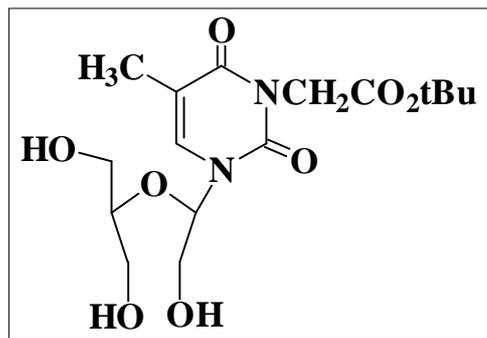
1-[1-(1,3-dihydroxy isopropoxy)-2-hydroxyéthyl] thymine **13**

Le composé **13** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **11**. A partir de 43 mg (0,16 mmol) du composé **9**. Après purification par chromatographie sur plaques en utilisant l'éluant G, on obtient le composé **13** avec un rendement de 66,5%.

R_f = 0,58 (éluant E)

RMN ¹H (CD₃OD): voir *tableau IV.5*.

IR (KBr): 3395 cm⁻¹ (OH), 2955 cm⁻¹ (C-H), 1673 cm⁻¹ (C=O thym), 1269 cm⁻¹ (C-O-C).



1-[1-(1,3-dihydroxy isopropoxy)-2-hydroxyethyl]-3-*ter*-butoxycarbonylméthylthymine **14**

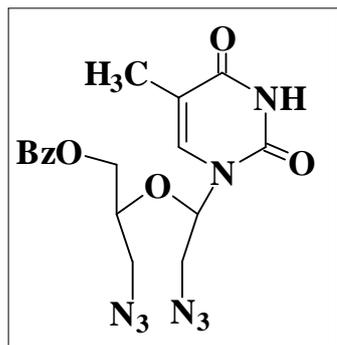
Le composé **14** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **11**. A partir de 102 mg (0,275 mmol) du composé **10**. Après purification par chromatographie sur plaques en utilisant l'éluant E, on obtient le composé **14** avec un rendement de 91,5%.

R_f = 0,46 (éluant E).

RMN ¹H (CD₃OD): voir *tableau IV.5*.

IR (KBr): 3420 cm⁻¹ (OH), 2927 cm⁻¹ (C-H), 1700 cm⁻¹ (C=O thym), 1636 cm⁻¹ (C=O CO₂tBu), 1251 cm⁻¹ (C-O-C).

V.5.6. AZIDATION

1-[1-(1-O-benzoylmethyl-2-azidoéthoxy)-2-azidoéthyl] thymine **15**

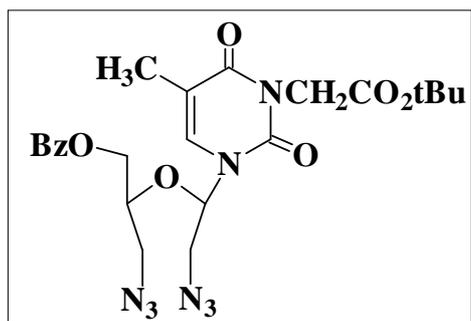
Dans un ballon de 50 ml, on introduit 110 mg du composé **11** (0,304 mmol) et 3,5ml de pyridine. Ce milieu réactionnel est placé à 0°C sous atmosphère d'argon et 8 éq. (0,248ml) de chlorure de mésyle lui sont ajoutés à l'aide d'une seringue. La réaction est arrêtée après 2 heures, le brut réactionnel est placé dans une ampoule à décanter, avec 20 ml d'une solution saturée de NaHCO₃, nécessaire pour atteindre un pH égale à 7. 30ml de chloroforme sont ensuite introduits, la phase organique est récupérée et la phase aqueuse est extraite 3 fois avec 15ml de chloroforme. Les 4 phases organiques sont rassemblées et lavées avec 10ml d'eau. La phase organique est récupérée, séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée à sec.

Le composé métylé obtenu 144 mg (0,276 mmol) est dissous dans 7 ml de DMF, le ballon est placé dans un bain d'huile à 100°C, et sous agitation magnétique, 269 mg (15 éq.) d'aziture de sodium lui sont additionnés. On laisse réagir pendant deux heure, ensuite le brut réactionnel est extrait 3 fois au chloroforme (20 ml). Les 3 phases organiques sont rassemblées et lavées avec 15 ml d'eau et, après séchage sur MgSO₄, filtration, puis évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie sur plaques de silice en utilisant l'éluant I, on obtient le composé **15** sous la forme d'une huile avec un rendement de 48% (60 mg).

R_f = 0.70 (éluant I).

RMN ¹H (CDCl₃): voir *tableau IV.6*.

IR(KBr): 2940 cm⁻¹ (C-H), 2108 cm⁻¹ (N₃), 1725 cm⁻¹ (C=O benzoyle), 1705 cm⁻¹ (C=O thym), 1650 cm⁻¹ (C=C), 1268 cm⁻¹ (C-O-C);



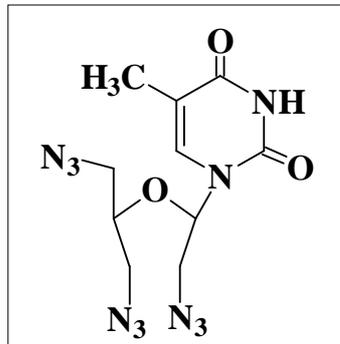
1-[1-(1-*O*-benzoylmethyl-2-azidoéthoxy)-2-azidoéthyl]-3-*tert*-butoxycarbonylmethyl thymine **16**

Le composé **16** est obtenu selon la même mode opératoire que le composé **15**. A partir de 119 mg (0.249 mmol) du composé **12**. Après purification par chromatographie sur couche mince en utilisant l'éluant I, on obtient le composé **16** avec un rendement de 62% (81mg).

$R_f = 0.50$ (éluant I).

RMN ^1H (CDCl_3): voir *tableau IV.6*.

IR(KBr) : 2925 cm^{-1} (C-H), 2107 cm^{-1} (N_3), 1728 cm^{-1} (C=O benzoyl), 1708 cm^{-1} (C=O thym), 1670 cm^{-1} (C=O CO_2tBu), 1651 cm^{-1} (C=C), 1271 cm^{-1} (C-O-C) .



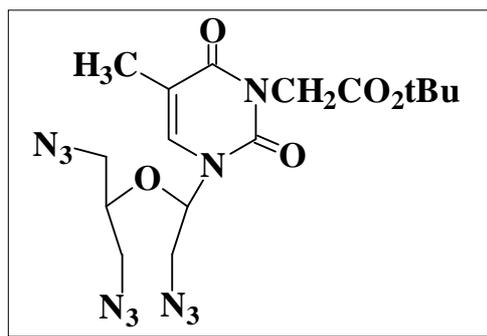
1-[1-(1,3-Azido isopropoxy) 2-Azidoéthyl] tThymine **17**

Le composé **17** est obtenu selon la même mode opératoire que le composé **15**. A partir de 329 mg (1 mmol) du composé **13**. Après purification par chromatographie sur plaques de silice en utilisant l'éluant I, on obtient le composé **17** avec un rendement de 50% (167mg).

$R_f = 0.56$ (éluant I)

RMN ^1H (CDCl_3): voir *tableau IV.6*.

IR(KBr) : 2103 cm^{-1} (N_3), 1693 cm^{-1} (C=O thym), 1651 cm^{-1} (C=C), 1265 cm^{-1} (C-O-C).



1-[1-(1,3-azidoisopropoxy)-2-azidoethyl]-3-tert-butoxycarbonylmethyl thymine 18

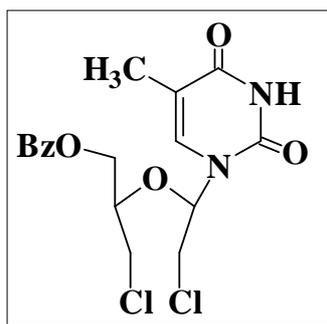
Le composé **18** est obtenu selon la même mode opératoire que le composé **15**. A partir de 635 mg (1,69 mmol) du composé **14**. Le composé **18** est récupéré sous forme d'huile avec un rendement de 48% (364 mg).

$R_f = 0.74$ (éluant I).

RMN ^1H (CDCl_3): voir *tableau IV.6*.

IR(KBr) : 2979 cm^{-1} (C-H), 2104 cm^{-1} (N_3), 1707 cm^{-1} (C=O thym), 1666 cm^{-1} (C=O CO_2tBu), 1651 cm^{-1} (C=C), 1258 cm^{-1} (C-O-C).

V.5.7. CHLORATION

1-[1-(1-*O*-benzoylmethyl-2-chloroéthoxy)-2-chloroéthyl] thymine **19**

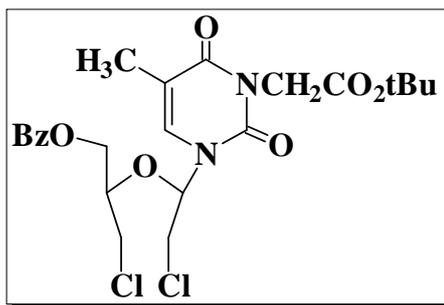
Dans un ballon de 25 ml, on introduit 206 mg (0,565 mmol) du composé **11** avec 3 ml de pyridine. Le ballon est placé sous atmosphère d'argon et agitation magnétique à 0°C, puis on ajoute à l'aide d'une seringue 0,329 ml de SOCl₂ goutte à goutte (4 éq. par OH), après 10 minutes on met le ballon à température ambiante, on suit l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince en utilisant l'éluant I.

La réaction est arrêtée après 3 jours, on rajoute au brut réactionnel 10 ml de toluène, après évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie sur plaques de silice en utilisant l'éluant I. On récupère 136 mg (60%) de composé **19** sous la forme d'une huile jaune.

R_f = 0.60 (éluant I).

RMN ¹H (CDCl₃): voir *tableau IV.8*.

IR(KBr) : 2950 cm⁻¹ (C-H), 1730 cm⁻¹ (C=O benzoyle), 1699 cm⁻¹ (C=O thym), 1650 cm⁻¹ (C=C), 1275 cm⁻¹ (C-O-C).



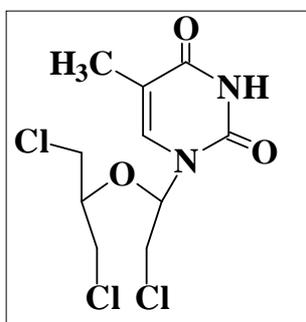
1-[1-(1-*O*-benzoylmethyl-2-chloroéthoxy)-2-chloroéthyl]-3-*tert*-butoxycarbonylmethyl thymine **20**

Le composé **20** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **19**. A partir de 90 mg (0.188 mmol) de composé **12**. Après purification (l'éluant I), on obtient le composé **20** avec un rendement de 45% (44 mg).

$R_f = 0.52$ (éluant I).

RMN ^1H (CDCl_3): voir *tableau IV.8*.

IR(KBr): 2955 cm^{-1} (C-H), 1725 cm^{-1} (C=O benzoyl), 1699 cm^{-1} (C=O thym), 1666 cm^{-1} (C=O CO_2tBu), 1651 cm^{-1} (C=C), 1270 cm^{-1} (C-O-C).



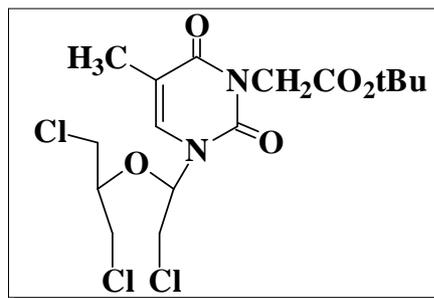
1-[1-(1,3-chloroisopropoxy)-2-chloroéthyl] thymine **21**

Le composé **21** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **19**. A partir de 103 mg (0.57 mmol) de composé **13**. Après purification par chromatographie sur plaques en utilisant l'éluant I, on obtient le composé **21** avec un rendement de 60% (87 mg).

$R_f = 0.5$ (éluant I).

RMN ^1H (CDCl_3): voir *tableau IV.8*.

IR(KBr) : 3185 cm^{-1} (N-H), 3043 cm^{-1} (C-H), 1688 cm^{-1} (C=O thym), 1650 cm^{-1} (C=C), 1260 cm^{-1} (C-O-C);



1-[1-(1,3-chloroisopropoxy)-2-chloroethyl]-3-*tert*-butoxycarbonylmethyl thymine **22**

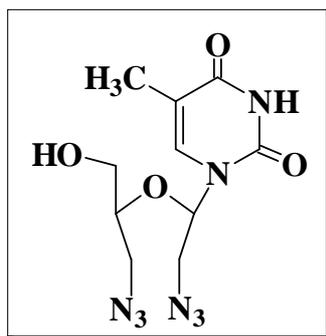
Le composé **22** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **19**. A partir de 103 mg (0.275 mmol) de composé **14**. Après purification par chromatographie sur couche mince en utilisant l'éluant E, on obtient le composé **22** avec un rendement de 66% (78 mg).

$R_f = 0.68$ (éluant I)

RMN ^1H (CDCl_3): voir *tableau IV.8*.

IR(KBr) : 2930 cm^{-1} (C-H), 1708 cm^{-1} (C=O thym), 1670 cm^{-1} (C=O CO_2tBu), 1650 cm^{-1} (C=C), 1255 cm^{-1} (C-O-C).

V.5.8. DEPROTECTION DU GROUPEMENT BENZOYLE EN POSITION 5'



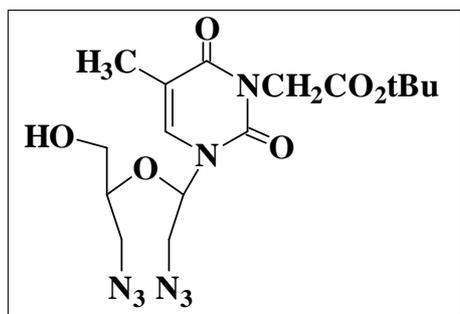
1-[1-(1-hydroxymethyl-2-azidoéthoxy)-2-azidoéthyl]thymine **23**

Dans un ballon de 25 ml on introduit 60 mg (0,145 mmol) du composé **15**, 3 ml de méthanol et 100 éq. (2ml) d'une solution 7M d'ammoniac dans le méthanol . L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince dans l'éluant F. La réaction est arrêtée après 1 semaine, le mélange est évaporé à sec et le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur plaques de silice en utilisant l'éluant E. on récupère 31 mg (70%) du composé **23**.

$R_f = 0.40$ (éluant F).

RMN ^1H (CDCl_3): voir *tableau IV.9*.

IR(KBr) : 3300 cm^{-1} (O-H), 2923 cm^{-1} (C-H), 2105 cm^{-1} (N_3), 1690 cm^{-1} (C=O thym), 1650 cm^{-1} (C=C), 1263 cm^{-1} (C-O-C).



1-[1-(1-hydroxymethyl-2-azidoéthoxy)-2-azidoéthyl]-3-tert-butoxycarbonylmethyl thymine **24**

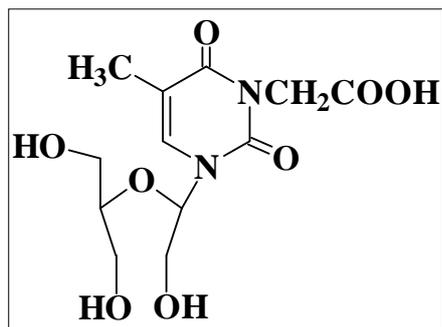
Le composé **24** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **23**. A partir de 116 mg (0.22 mmol) de composé **16**. Après purification par chromatographie sur plaques de silice en utilisant l'éluant I, on obtient le composé **24** avec un rendement de 80% (74 mg).

$R_f = 0.61$ (éluant I)

RMN ^1H (CDCl_3): voir *tableau IV.9*.

IR(KBr) : 3300 cm^{-1} (O-H), 2923 cm^{-1} (C-H), 2105 cm^{-1} (N_3), 1690 cm^{-1} (C=O thym), 1666 cm^{-1} (C=O CO_2tBu), 1650 cm^{-1} (C=C), 1255 cm^{-1} (C-O-C).

V.5.9. DEPROTECTION DE LA FONCTION ACIDE CARBOXYLIQUE



1-[1-(1,3-dihydroxy isopropoxy)-2-hydroxyethyl]-3-(carboxyméthyl)thymine 27

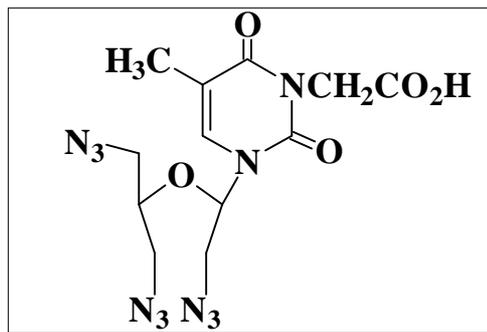
Dans un ballon de 50 ml, on introduit 31 mg (0,08 mmol) de composé **14** et 1 ml d'acide trifluoroacétique (TFA), on place l'ensemble sous agitation magnétique. On suit l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince en utilisant l'éluant E.

La réaction est arrêtée après 1 heure et 15 minutes, après évaporation le brut réactionnel est purifié par ccm en utilisant l'éluant H. On récupère 25 mg de composé **27** (94%).

R_f = 0,25 (éluant E)

RMN ¹H (CD₃OD): voir *tableau IV.10*.

IR (KBr): 3384 cm⁻¹ (OH), 2935 cm⁻¹ (C-H), 1696 cm⁻¹ (C=O thym), 1698 cm⁻¹ (C=O CO₂H), 1635 (C=C), 1255 cm⁻¹ (C-O-C).



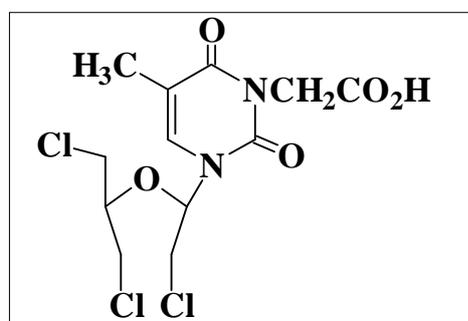
1-[1-(1,3-azido isopropoxy)-2-azidoethyl]-3-(carboxymethyl) thymine 28

Le composé **28** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **27**. A partir de 68 mg (0.151 mmol) de composé **18**. Après purification par chromatographie sur plaques de silice en utilisant l'éluant J, on obtient le composé **28** avec un rendement de 88% (52mg).

$R_f = 0.18$ (éluant I).

RMN ^1H (CD_3OD): voir *tableau IV.10*.

IR(KBr) : 3300 cm^{-1} (O-H), 2930 cm^{-1} (C-H), 2104 cm^{-1} (N_3), 1702 cm^{-1} (C=O thym), 1667 cm^{-1} (C=O CO_2H), 1644 cm^{-1} (C=C), 1288 cm^{-1} (C-O-C).



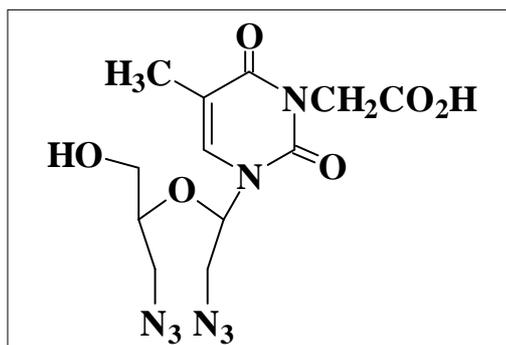
1-[1-(1,3-chloroisopropoxy)-2-chloroethyl]-3-carboxymethyl thymine 29

Le composé **29** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **27**. A partir de 25 mg (0.058 mmol) de composé **22**. Après purification par chromatographie sur plaques en utilisant l'éluant I, on obtient le composé **29** avec un rendement de 83% (18 mg).

$R_f = 0.25$ (éluant I).

RMN ^1H (CD_3OD): voir *tableau IV.10*.

IR(KBr) : 3310 cm^{-1} (O-H), 2927 cm^{-1} (C-H), 1704 cm^{-1} (C=O thym), 1667 cm^{-1} (C=O CO_2H), 1649 cm^{-1} (C=C), 1255 cm^{-1} (C-O-C).



1-[1-(1-hydroxyméthyl-2-azidoéthoxy)-2-azidoéthyl]-3-carboxyméthyl thymine 30

Le composé **30** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **27**. A partir de 40 mg (0.094 mmol) de composé **240**. Après purification par ccm en utilisant l'éluant I, on obtient le composé **26** avec un rendement de 52 % (18 mg).

$R_f = 0.40$ (éluant I).

RMN ^1H (CD_3OD): voir *tableau IV.10*

IR(KBr) : 3250 cm^{-1} (O-H), 2923 cm^{-1} (C-H), 2105 cm^{-1} (N_3), 1703 cm^{-1} (C=O thym), 1670 cm^{-1} (C=O CO_2H), 1650 cm^{-1} (C=C), 1265 cm^{-1} (C-O-C).

2^{ème} PARTIE

Analogues pyrimidiques du chlorambucil

CHAPITRE I

Le Cancer, les anticancéreux

Et les agents alkylants

Mise au Point Bibliographique

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

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. Suivant le type et les degrés d'évolution du cancer, les traitements anticancéreux incluent, 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 l'acide 4-[4-bis(2-chloroethyl)aminophényl]butyrique appelé couramment le Chlorambucil (CLB).

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 :

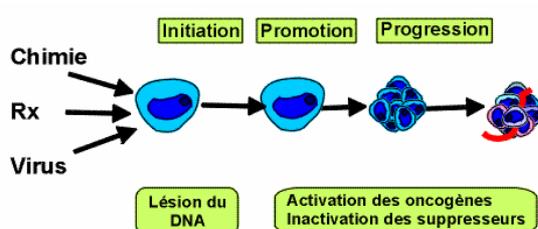


Schéma I.1 : Schéma général des premières étapes de la cancérisation

On peut distinguer schématiquement, trois étapes (schéma I.1):

- **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 CHIMIOThERAPIE ET LES AGENTS ANTICANCEREUX

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 ANTIMETABOLITES

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 (le 5-FU, la cytarabine et la cladribine) (schéma I.2)

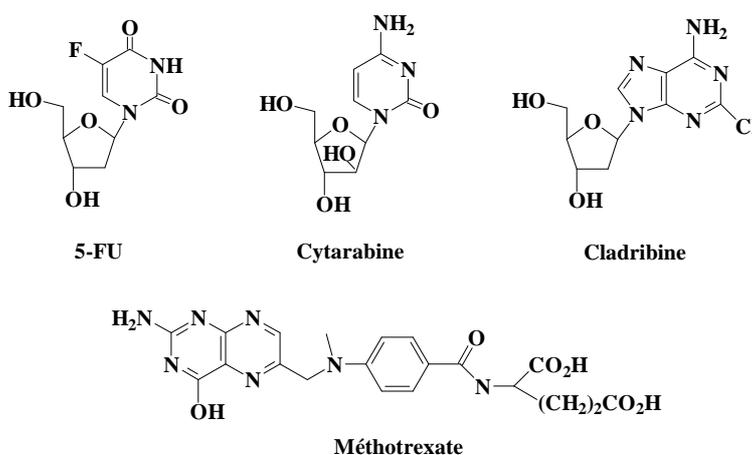


Schéma I.2 : exemples d'antimétabolites

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 appelés microtubules. Ces derniers sont les principaux constituants du fuseau mitotique, qui contribue à la séparation des chromosomes, lors de la mitose (d'où leur nom d'*agents antimiotiques*).

Les agents antimiotiques 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 I.3).

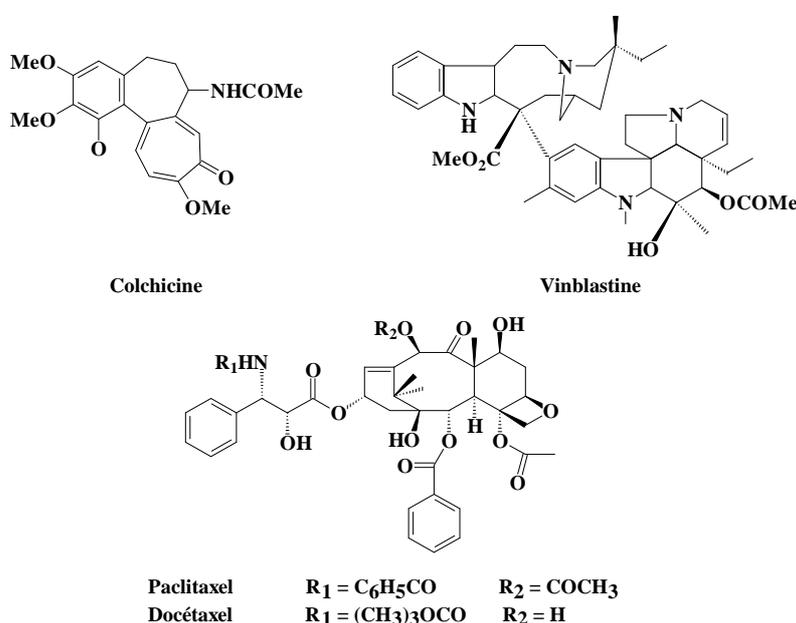


Schéma I.3 : les agents antimiotiques

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 scindants. Ils agissent sur la duplication ou la transcription de l'ADN ou encore cassent celui-ci (scindants).

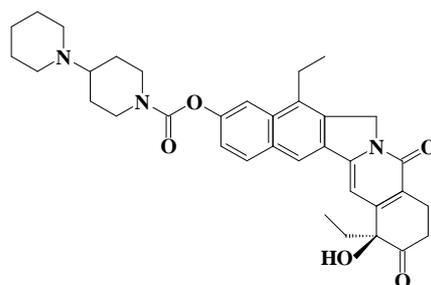
I.2.3.1. les inhibiteurs de la topoisomérase I et II³⁵

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

³⁵ Kirkiacharian, S. *Guide de la Chimie Thérapeutique*, Ellipse : Paris, 519-550 (1996).

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 I.4).

Ces produits sont relativement nouveaux, assez toxiques et leur place réelle dans la panoplie thérapeutique n'est pas encore parfaitement définie.

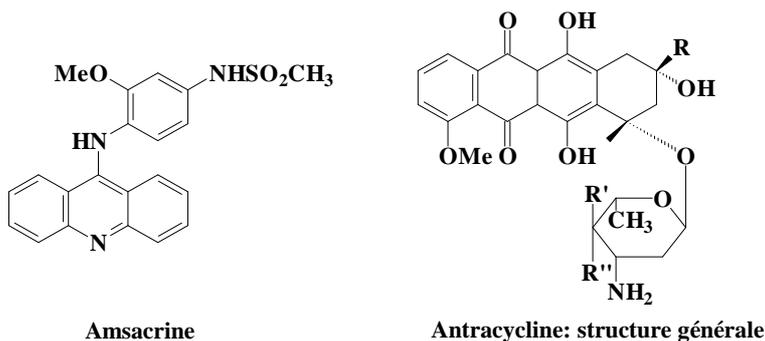


Irinocétan

Schéma I.4 : exemple d'inhibiteur de la topoisomérase I.

I.2.3.2. les agents intercalants¹:

Ce sont des produits polycycliques plans, qui inhibent la réplication de l'ADN en s'intercalent 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 (schéma I.5).



Amsacrine

Antracycline: structure générale

Schéma I.5 : 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 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 dérivés de la moutarde à l'azote, les nitroso-urées et les sels de platine.

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-nitroso-urées, les plus utilisées sont la carmustine et la fotémustine.

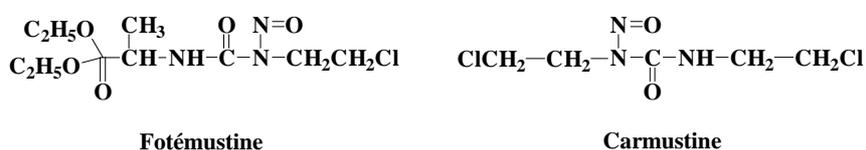


Schéma I.6: exemple de nitroso-urées.

I.2.3.3.2. les sels de platine

Le cisplatine ou cisplatine, 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.

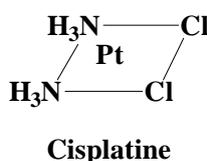


Schéma I.7: exemple de sels de platine.

I.3. GENERALITES SUR LES DERIVEES DE LA MOUTARDE A L'AZOTE

Le premier agent anticancéreux a été découvert accidentellement, du fait des propriétés leucopéniantes d'un gaz de combat : le gaz moutarde (schéma I.8) échappé d'un navire américain en 1942, lors du bombardement de Bari.

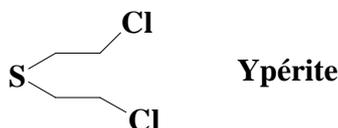


Schéma I.8 : le gaz à moutarde ou Ypérite.

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 méthylié « la chlorméthine » (schéma I.9).

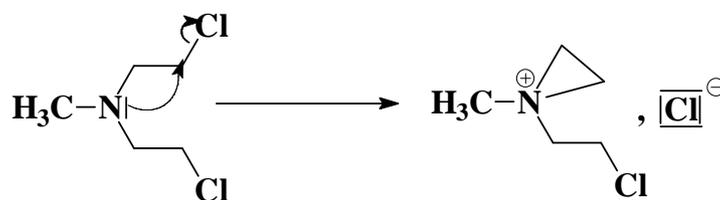


Schéma I.9 : la chlorméthine.

Ce produit constitue le représentant de base de la famille des agents alkylants.

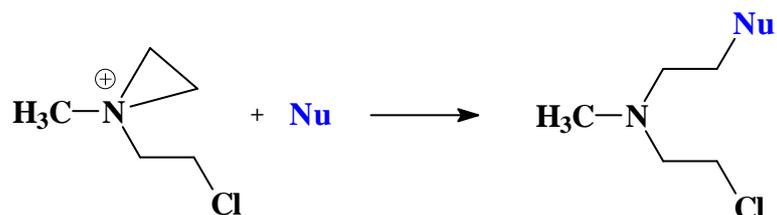
I.3.1. MECANISME D'ACTION DANS L'ORGANISME

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



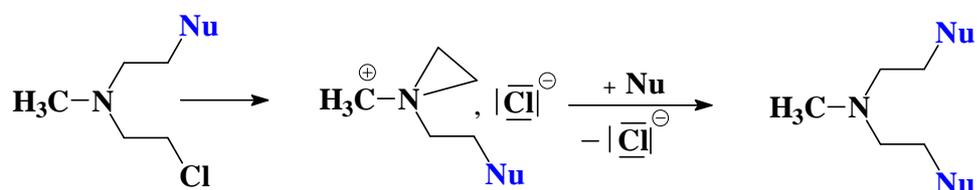
On a donc une substitution nucléophile intramoléculaire qui aboutit à un composé cyclisé cationique. Cette structure est appelée éthylène-immonium. C'est cette forme qui

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 une 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...).

De plus, il est intéressant de noter que cette réaction peut se poursuivre avec la deuxième chaîne.



On a donc greffé deux chaînes alkyle sur deux centres nucléophiles, ce 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 alkylants peuvent réagir, avec par exemple l'azote en position 7 d'une 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 réplication ou de la transcription (schéma I.10).

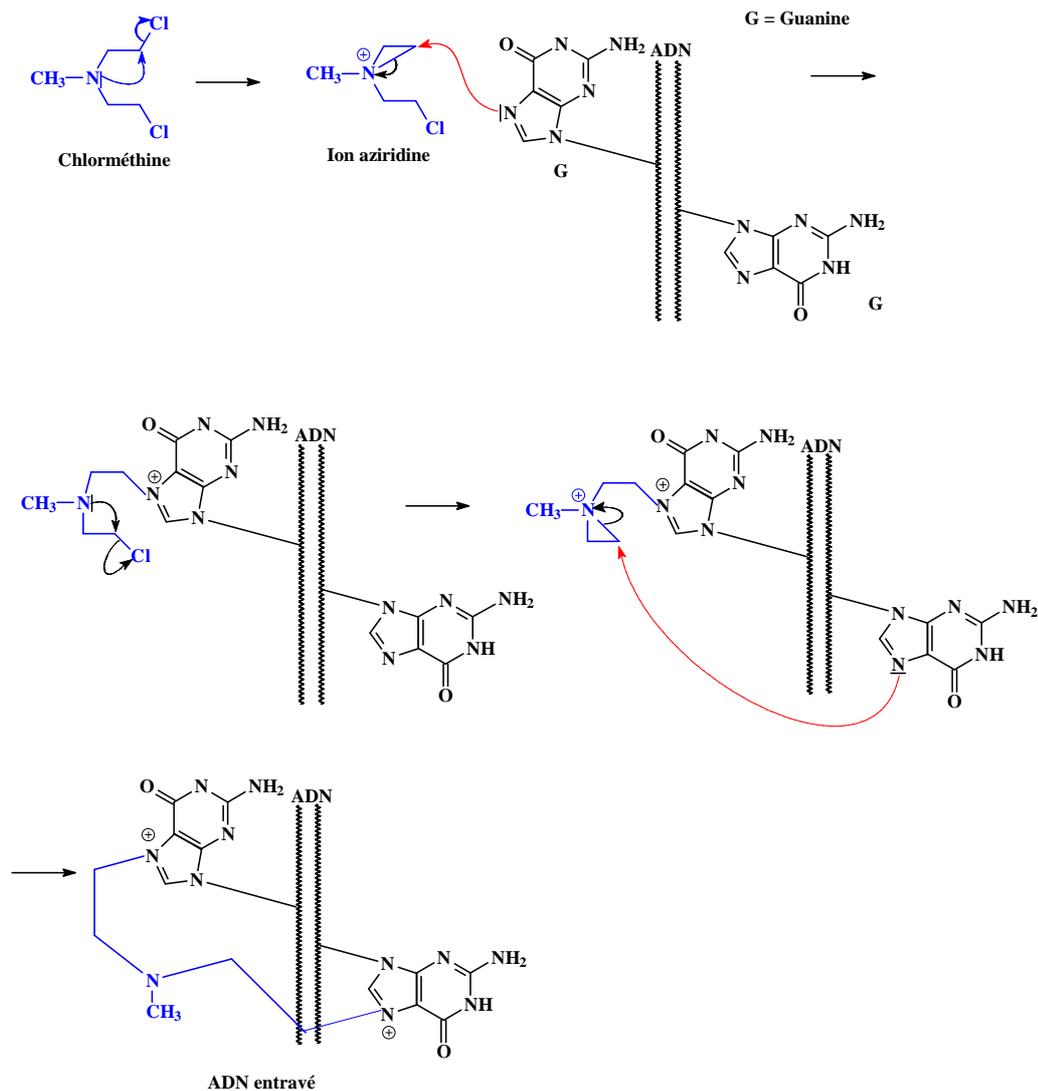


Schéma I.10 : Premier^r modèle d'alkylation de l'ADN par la chlorméthine

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 I.11).

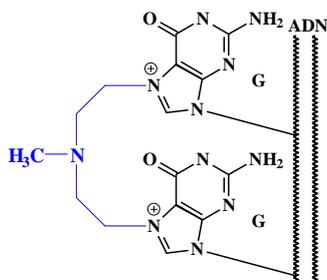


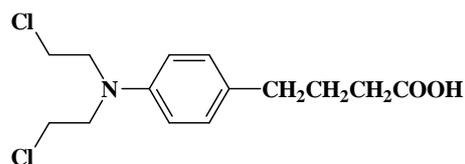
Schéma I.11 : 2^{ème} modèle d'alkylation de l'ADN par la chlorméthine.

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 immonium 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.

I.3.2. LE CHLORAMBUCIL

Dans les années 50, Ross et coll.³⁶ ont synthétisé un analogue arylé de la chlorméthine, l'acide 4-[4-bis(2-chloroéthyl)aminophényl] butyrique appelé couramment chlorambucil (CLB) en greffant le groupe actif bis-(β-chloroéthyl) amine sur un support aromatique.



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

Dans ce cas le noyau aromatique aura tendance à entraîner dans son système de résonance les atomes présentant des doublets. Par conséquent, le doublet de l'azote devient de moins en moins disponible pour le phénomène de cyclisation (rencontré dans la chlorméthine). On diminue, donc, la vitesse de formation de l'ion éthylène-immonium, ce qui entraîne une diminution de la réactivité du produit. Ceci se traduit par un meilleur effet pharmacologique : l'effet peut s'exercer à plus longue distance et est plus sûr. Connors et coll³⁷. ont démontré que le métabolite majeur du chlorambucil était issu d'une β-oxydation de la chaîne butyrique :

³⁶ J.L. Everett, J.J. Roberts, W.C.J. Ross, *J. Chem. Soc.*, 2386 (1953).

³⁷ A. McLean, A.D. Newell, G. Baker and T. Connors, *Biochem. Pharmacol*, **29**, 2039 (1980).

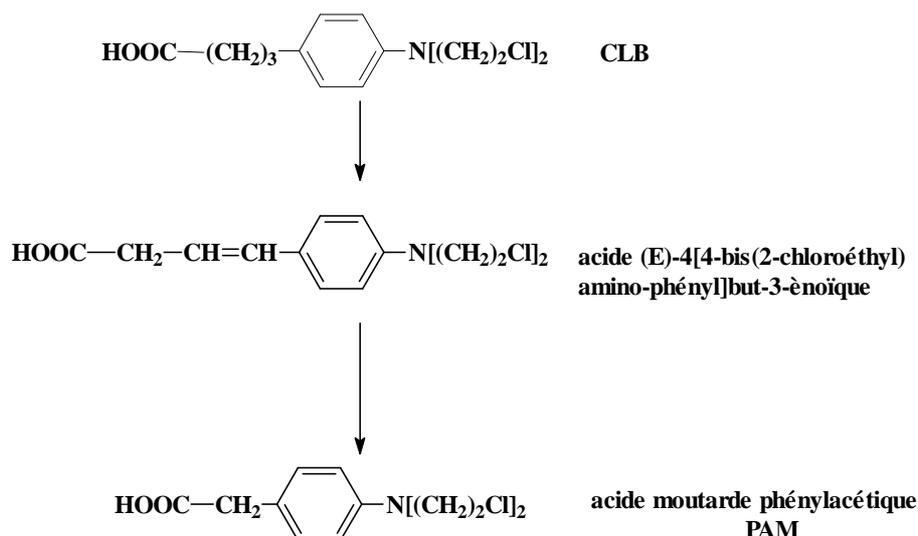


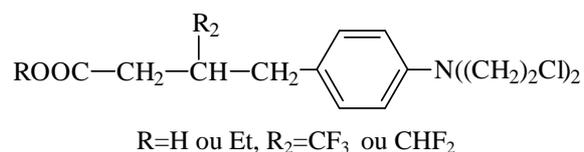
Schéma I.12 : voie de métabolisation du CLB

Ces auteurs ont démontré que bien que l'acide moutarde phénylacétique (PAM) possède une forte activité antitumorale, il présente aussi une haute toxicité vis-à-vis des tissus sains. C'est pour cela que de nombreux analogues ont déjà été synthétisés dans le but de diminuer la toxicité de ce métabolite.

I.3.3. RETROSPECTIVES DES ANALOGUES DU CHLORAMBUCIL

Afin de diminuer la toxicité du métabolite du chlorambucil (CLB), les recherches se sont principalement axées sur deux facteurs :

- Une modification de la chaîne butyrique pour rendre la β -oxydation impossible une fois le CLB assimilée par l'organisme. Ceci est rendu possible en substituant le carbone en position β de la chaîne alkyle et ce par exemple par un groupement fluoré comme l'ont fait Tatlow et coll^{38,39}.



³⁸ J.C.Tatlow, M.Markou, P.L.Coe, journal of Fluorine Chemistry, 89 (2), 183-188 (1998).

³⁹ J.C.Tatlow, M.Markou, P.L.Coe, journal of Fluorine Chemistry, 84 (2), 113-118 (1997).

- En augmentant la spécificité des analogues pour les cellules cancéreuses en greffant sur le CLB un groupement glucidique :

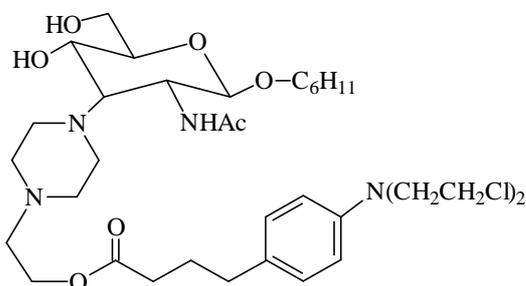


Schéma I.13 : analogue glycosylés du chlorambucil

I.4. FINALITE DU TRAVAIL

Nos efforts se sont orientés vers l'élaboration d'analogues du chlorambucil, en substituant le groupement phényle par un synthon naturel. Le groupe actif bis-(β-chloroéthyle) amine sera greffé sur la thymine qui est une base azotée de la famille des pyrimidines entrant, entre autres, dans la structure des acides nucléiques. Nous fixerons par la suite ce groupement sur la fonction acide carboxylique formant ainsi une fonction amide.

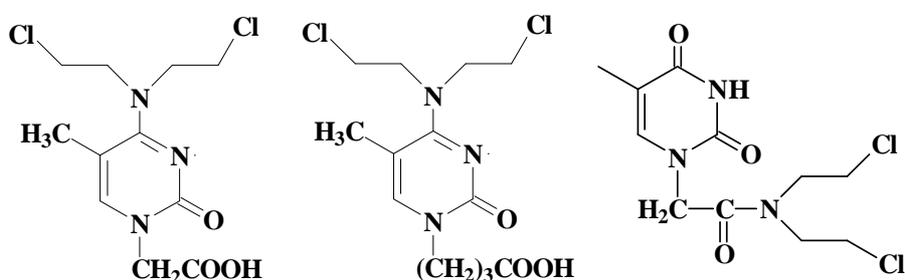
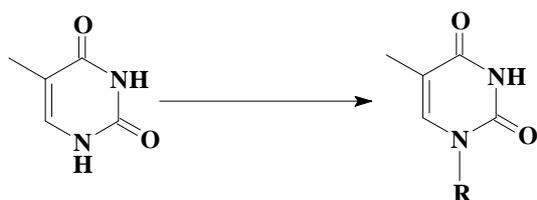


Schéma I.14 : analogues du chlorambucil.

L'élaboration de telles structures débute par une alkylation régiosélective de la thymine au niveau de la position 1.



CHAPITRE II

Alkylation de la Thymine

II. ALKYLATION DE LA THYMINE

L'alkylation de la thymine est une réaction complexe en raison des problèmes de régiosélectivité liés à la présence de deux azotes et deux oxygènes.

II.1. MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE :

A la différence des bases puriques, l'alkylation des bases pyrimidiques reste relativement inexploree.

En 1968, dans le cadre de leurs travaux visant à synthétiser des analogues de dinucléotides reliés par une chaîne alkyle, *Brown et coll.*⁴⁰, réalisaient la synthèse de la N-1-propylthymine, soit par action du bromopropane sur la thymine en présence d'un léger excès de carbonate de potassium, soit par action d'un large excès de bromopropane sur la thymine préalablement silylée (schéma II.2).

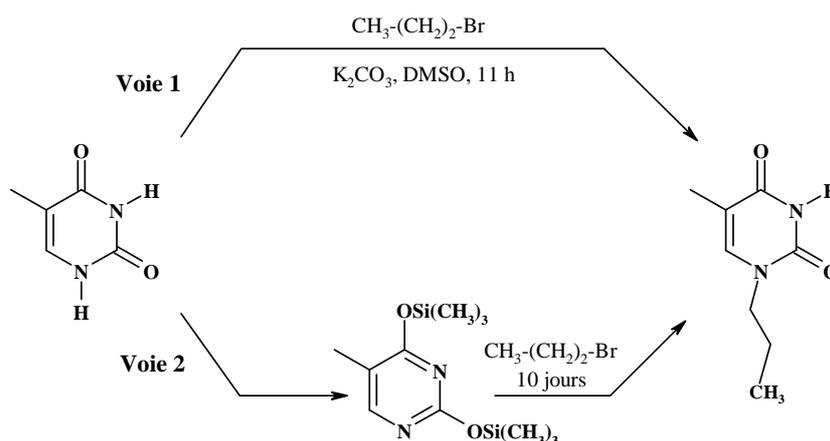


Schéma II.2 : Synthèse de la N-1-propylthymine

Selon le protocole expérimental utilisé, la N-1-propylthymine est obtenue avec des rendements, pour la voie 1 de 44% et pour la voie 2 de 45%. Par contre, le remplacement du bromopropane par le 1,3-dibromopropane ou le 1,6-dibromohexane, a conduit par la voie 2, aux produits de N-1 alkylation avec des rendements de l'ordre de 70%. Ces deux méthodes permettent une réaction régiosélective avec uniquement une monoalkylation sur l'azote en position 1. Toutes ces réactions donnent des rendements plus modestes avec l'uracile (de l'ordre de 30%).

⁴⁰ D. T. Browne; J. Eisinger; N. J. Leonard, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 7302 (1968).

En 1980, *Sasaki et coll.*⁴¹ ont réalisé l'alkylation de l'uracile soit par le 1,3-dibromopropane selon la méthode de Browne et coll., soit par le benzoate de chlorobutyle (schéma II.3).

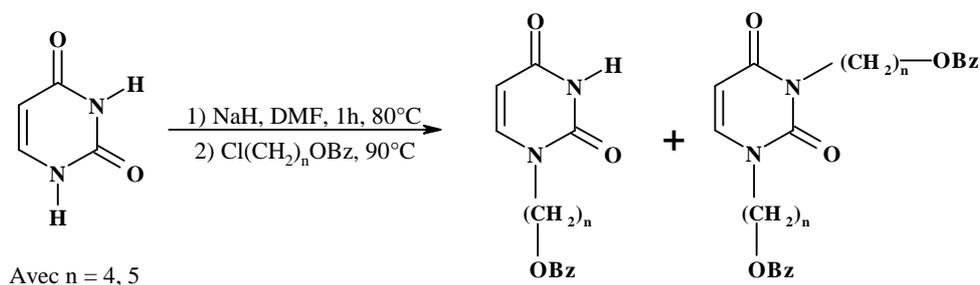


Schéma II.3 : Alkylation selon la méthode de Sasaki et coll.

Cette réaction est réalisée en deux étapes, tout d'abord l'uracile est mise en présence d'hydrure de sodium (0,7 éq.) dans le DMF, puis après refroidissement, le chloroalkylbenzoate (0,6 éq.) est ajouté. Dans tous les cas, on observe la formation de deux produits qui correspondent aux composés N-1 alkylé et N-1,N-3 dialkylés, avec un rendement de l'ordre de 54% pour le composé monoalkylé et 31% pour le composé dialkylé. De plus, quelle que soit la longueur de la chaîne fixée, le produit de monoalkylation est majoritaire. Dans le cas de la chaîne à cinq carbones, on observe une meilleure sélectivité (N-1 alkylé / N-1,N-3 dialkylé = 4,2), mais aussi une diminution du rendement global puisque celui-ci passe de 85 à 42%.

Avec un protocole quasiment identique, *Pedersen et coll.*⁴² ont réalisé l'alkylation de dérivés de la thymine par l'acétate de bromobutyle (schéma II.4).

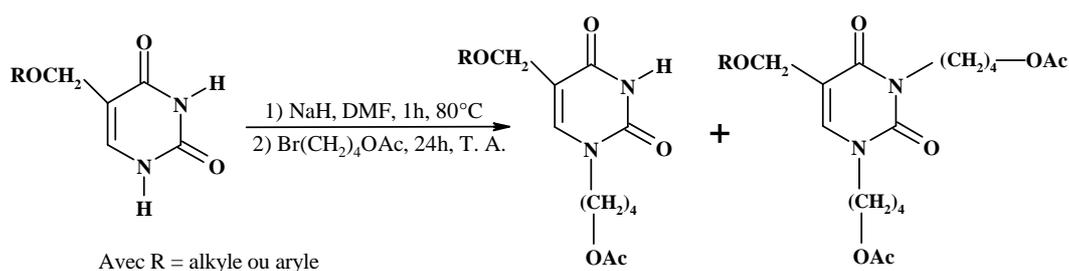


Schéma II.4 : Exemples de dérivés synthétisés

Comme Sasaki, ils ont obtenu un mélange de composés N-1 substitué et N-1,N-3 disubstitués. Les différents produits sont isolés avec des rendements allant de 9 à 28% pour

⁴¹ T. Sasaki; K. Minamoto; T. Suzuki; S. Yamashita, *Tetrahedron*, **36**, 865 (1980).

⁴² A. E. S. Abdel-Megied; M. S. Motawia; E. B. Pedersen; C. M. Nielsen, *Heterocycles*, **34**, 713 (1992).

les disubstitués et de 17 à 55% pour les monosubstitués, avec un rendement global optimal de 64%.

En 2000, Ferrer et coll.²⁵, ont réalisé l'alkylation de la thymine par le bromoéthanoate de tertiobutyle à température ambiante dans le DMF en présence de 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène (DBU) qui est une base forte non nucléophile.

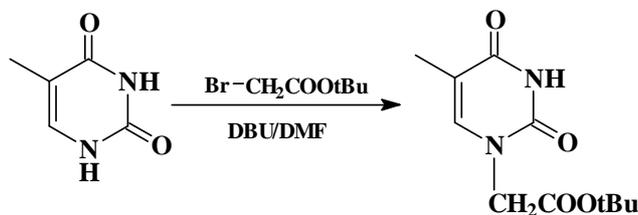


Schéma II.5 : alkylation de Ferrer et Coll.

Le composé résultant de la N-1 alkylation est isolé avec un rendement de 81%.

II. 2. STRATEGIE ET RESULTATS

Pour réaliser l'alkylation, nous avons tout d'abord utilisé la méthode de Ferrer et coll. Les premiers essais ont été réalisés avec le bromobutanoate d'éthyle. La thymine non protégée est dissoute dans le DMF puis on ajoute 1,1 éq. De DBU. Le bras bromé (1,1 éq.) solubilisé dans le DMF est alors additionné goutte à goutte au mélange réactionnel.

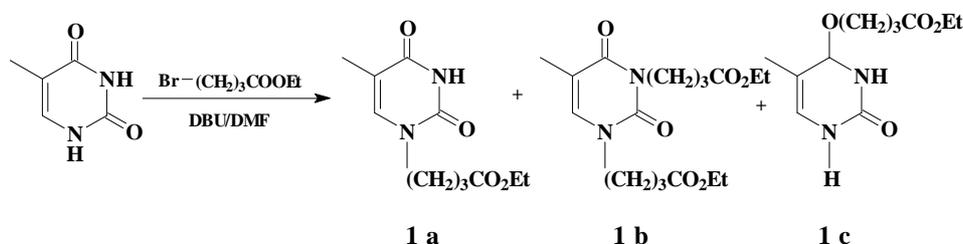


Schéma II.6 : réactions d'alkylation selon Ferrer et coll.

Outre le produit N-1 alkylé **1a** (19%) recherché, deux autres composés se forment, résultant de la double alkylation **1b** (37%) et de la O-alkylation **1c** (8%). L'augmentation du temps de réaction ou de la concentration du dérivé bromé n'a conduit à aucune amélioration.

Le rendement en composé **1a** étant modeste nous avons dans un deuxième temps utilisé la méthode de Pedersen et coll. La thymine réagit d'abord avec l'hydrure de sodium dans le DMF puis on ajoute progressivement le dérivé halogéné. L'influence de différents facteurs tels que le mode d'activation, la longueur de la chaîne ou la nature du dérivé halogéné, sur la sélectivité a alors été appréhendée.

II.2.1. ACTIVATION PAR CHAUFFAGE CLASSIQUE

Une mise au point de l'alkylation de la thymine réalisée dans notre laboratoire⁴³, a montré que l'utilisation d'un excès du dérivé halogéné augmente le rendement en composé N-1 alkylé. On fait réagir, dans un premier temps sous argon, dans le DMF anhydre à reflux, la thymine avec 2 équivalents d'hydrure de sodium. Dans un deuxième temps on ajoute 2,3 équivalents d'halogénure d'alkyle. Après 48 heures de réaction, nous obtenons les composés **1a**, **1b** et **1c** avec des rendements de 27%, 36% et 5% respectivement. Pour améliorer ce système, tant du point de vue de la régiosélectivité que du rendement et de la cinétique, nous avons utilisé l'activation par irradiation micro-ondes.

II.2.2. SYNTHÈSE PAR ACTIVATION MICRO-ONDES

L'apport de la technologie micro-ondes en chimie se traduit essentiellement par une diminution des temps de réaction et des réactions secondaires. Suivant les cas, une augmentation des rendements, une pureté accrue et une meilleure sélectivité peuvent être obtenues⁴⁴.

II.2.2.1. Origine du chauffage des matériaux sous activation micro-onde :

Aux effets purement thermiques des micro-ondes peuvent s'ajouter des effets propres au rayonnement, impliquant dans un premier temps une meilleure homogénéité du chauffage et une vitesse de montée en température accrue.

Rappelons que l'énergie quantique (E) mise en jeu est reliée à la longueur d'onde utilisée par la loi de PLANCK.

$$E = h c / \lambda$$

où h, c et λ désignent respectivement la constante de Planck, la vitesse de la lumière et la longueur d'onde de la réaction.

Pour un rayonnement de longueur d'onde $\lambda=12.2$ cm, l'énergie (0,3 cal/mol) est insuffisante pour exciter les molécules et rompre les liaisons. L'échauffement d'un produit par rayonnement micro-ondes ne peut donc résulter que d'interactions onde-matière.

⁴³ P. Grandjean, R. Benhaddou, R. Granet, P. Krausz, *Tetrahedron Lett*, **38** (35), 6185-6188 (1997).

⁴⁴ A. Loupy, *C. R. Chimie*, **7**, 103 (2004).

Les molécules polaires ont la propriété de s'orienter dans le sens d'un champ électrique (phénomène de polarisation dipolaire). En l'absence de celui-ci, les dipôles sont orientés au hasard, aucune direction n'est privilégiée et les molécules ne sont soumises qu'au mouvement brownien (schéma II A). Sous l'effet d'un champ électrique continu, chaque dipôle est soumis à une force électrique qui tend à l'orienter dans la direction de celui-ci (schéma II.7, B). Dans le cas d'un courant alternatif (schéma II.7, C), le champ électrique change de sens à chaque alternance. Les dipôles, ayant tendance toujours à suivre la direction de celui-ci, changent d'orientation. Cette caractéristique permet de les agiter, d'où la friction des molécules et un échauffement interne qui peut être très intense sous l'effet d'une onde de forte puissance (jusqu'à 10°C par seconde). Il s'ensuit un chauffage de « l'intérieur » avec une répartition finale de température plus régulière qu'en chauffage classique.

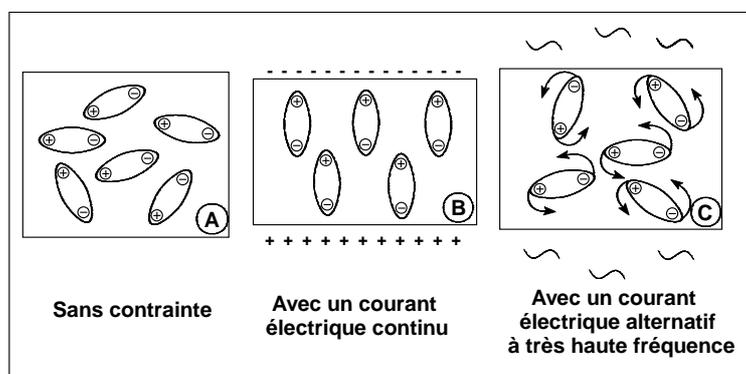


Schéma II.7 : Influence du champ électrique sur un produit diélectrique

II.2.2.2. Influences des micro-ondes sur les grandeurs d'activation

Un processus cinétique étudié en fonction de la température est caractérisé par la loi d'Arrhenius.

$$k = A \exp -(\Delta G / RT)$$

où k , A et ΔG^\ddagger désignent respectivement la constante de vitesse, le facteur pré exponentiel d'Arrhénius et l'enthalpie libre d'activation, celle-ci peut se décomposer en deux termes.

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

où ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger désignent respectivement l'enthalpie d'activation et l'entropie d'activation. On peut envisager deux hypothèses quant à l'influence possible des micro-ondes

sur ces paramètres réactionnels. Tout d'abord, l'hypothèse de la section efficace qui fait référence à la probabilité de chocs moléculaires efficaces : celle-ci serait accentuée sous champ micro-ondes par le mouvement forcé des entités réactives polaires présentes dans le milieu. On joue ainsi sur le facteur pré-exponentiel A, car les chocs moléculaires permettant le franchissement de la barrière d'activation deviennent plus nombreux. L'autre hypothèse, est l'entropie, qui fait référence essentiellement aux réactions rapides. Les micro-ondes induiraient un positionnement favorisé des réactifs en vue de la formation de l'état de transition. Ce positionnement favorisé, amènerait une diminution de l'entropie de l'état initial (mouvement ordonné) et ainsi une augmentation de l'entropie d'activation (on diminue alors l'enthalpie libre d'activation).

Au niveau de la sélectivité, cette hypothèse pourrait justifier une sélectivité différente sous activation micro-onde en orientant préférentiellement une entité réactive ou un groupe fonctionnel.

II.2.2.3. Résultats de l'activation micro-ondes

Nous avons étudié la réaction d'alkylation de la thymine avec le bromobutanoate d'éthyle en faisant varier la quantité d'hydrure de sodium, de dérivé bromé, la température et la puissance d'activation (schéma II.8).

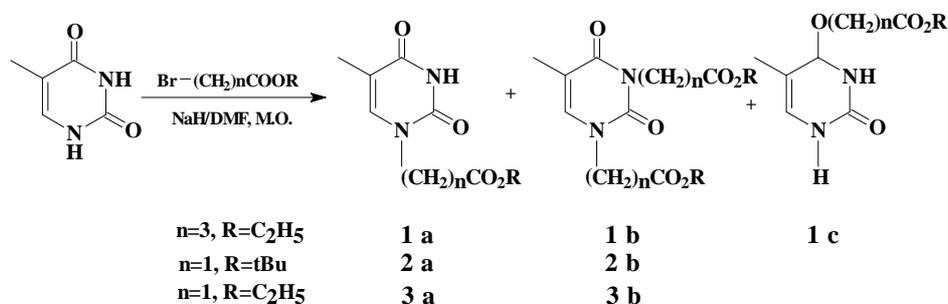


Schéma II.8 :réactions d'alkylation de la thymine par activation micro-ondes

Les différents essais ont été menés à partir de 6 mmol de thymine, solubilisée dans le DMF anhydre, l'hydrure de sodium est ajouté puis le tout est activé par micro-ondes. On injecte ensuite le dérivé bromé puis on active à nouveau. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau II.1.

Tableau II.1: Etude de l'alkylation par activation micro-onde

Essais	NaH (éq.)	Br(CH ₂) ₃ COOEt	Temps activation	1a (%)	1b (%)
1	1.1	1.1	6x(3min, 60°C, 100W)	20	17
2	1.1	1.5	6x(3min, 60°C, 100W)	17	25
3	1.1	2.3	6x(3min, 60°C, 100W)	15	30
4	2	2.3	6x(3min, 60°C, 100W)	15	35
5	1.1	1.1	6x(3min, 100°C, 200W)	28	21
6	1.1	1.1	6x(3min, 100°C, 250W)	34	18

Une analyse de ces essais montre que le résultat optimum est obtenu avec 1,1 équivalents de NaH et de dérivé bromé (Tableau II.1, essai 6). L'augmentation de la température et de la puissance permettent l'obtention du composé N-1 alkylé avec un rendement de 34 % accompagné de 18% de composé di-alkylé. Par rapport au chauffage classique, la N-1 alkylation est favorisée, de plus l'obtention d'une quantité beaucoup moins importante de composé dialkylé facilite la purification du mélange.

Nous avons ensuite réalisé la même réaction en faisant varier la nature de l'agent alkylant. Une première étude avec le bromoéthanoate d'éthyle a permis de confirmer les conditions optimum de cette réaction (tableau II.2, essai 5). Nous avons ensuite réalisé l'alkylation avec le bromoéthanoate de tertio-butyle dans les conditions optimum. (tableau II.2, essai 6).

Tableau II. 2: Etude de l'influence de l'encombrement stérique

Essais	RBr (éq.)	NaH (éq.)	Temps activation	N-1 alkylé	N-1,N-3 dialkylé
1	BrCH ₂ COOEt (1.1)	1.1	3x(3min, 100°C, 100W)	46	15
2	BrCH ₂ COOEt (2.2)	2.3	3x(3min, 100°C, 100W)	40	22
3	BrCH ₂ COOEt (3)	3	3x(3min, 100°C, 100W)	37	25
4	BrCH ₂ COOEt (1.1)	1.1	6x(3min, 100°C, 100W)	54	12
5	BrCH ₂ COOEt (1.1)	1.1	2x(3min, 100°C, 250W)	74	10
6	BrCH ₂ COOtBu (1.1)	1.1	2x(3min, 100°C, 250W)	75	0

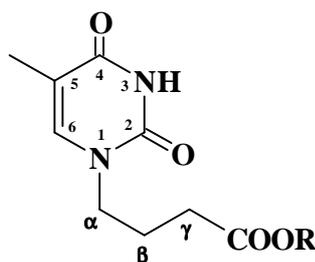
On remarque encore que, dans le cas du bromoéthanoate d'éthyle, le meilleur rendement (74%) est également obtenu avec 1,1 équivalent d'hydruure de sodium et 1,1 équivalent de

dérivé bromé à 100°C avec une puissance d'irradiation de 250W. La présence du groupement attracteur CO₂R en position α du CH₂ portant le brome augmente la réactivité, le rendement en produit monoalkylé passe de 34% à 74%.

Dans les mêmes conditions le remplacement du groupement éthyle par le groupement tertibutyle conduit à la formation sélective du composé résultant de la N-1 alkylation avec un rendement de 75%. Il semble donc que l'apport d'une gêne stérique après la première alkylation au niveau de la position N-1 rend plus difficile, même impossible la deuxième alkylation.

Enfin des essais complémentaires ont montré que la nature de l'halogène (Cl, Br, I) porté par l'agent alkylant initial n'avait pas d'influence notable sur l'alkylation tant sur le plan de la sélectivité que sur le plan des rendements.

II.2.2.4. Caractérisation spectrale



La structure des différents composés a été déterminée par spectroscopie IR et RMN ¹H. Le spectre IR présente une bande large à 3100 cm⁻¹ correspondant à la vibration NH, une bande à 1720 cm⁻¹ correspondant au carbonyle du groupement ester et à 1700 cm⁻¹ un signal des carbonyles de la thymine. Les signaux correspondant aux CH de la chaîne alkylée se trouvent comme attendu à 2900 cm⁻¹ et ceux correspondant à la double liaison C=C à 1670 cm⁻¹.

Les spectres RMN du proton montrent la présence du CH₂ (α) pour les trois composés. Ainsi que la présence des C₂H₅ pour les composés **1a** et **3a**. Le groupement tertibutyle du composé **2a** résonne sous forme de singulet à 1,48 ppm. Les données RMN du proton sont rassemblées dans le tableau II.3.

Tableau II.3: Données RMN ¹H des composés **1a**, **2a** et **3a** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 1a (CDCl ₃)	Composé 2a (DMSO)	Composé 3a (DMSO)
Base			
H-3	9,07 s	11,34 s	11,30 s
H-6	7,03 d (0,5)	7,48 d (1,1)	7,48 se
CH ₃	1,92 se	1,75 d (1,1)	1,76 se
Chaîne			
H- α	3,77 t (7,2)	4,34 s	4,45 s
H- β	2,01 q (7,1)	~	~
H- γ	2,38 t (7,0)	~	~
O-CH ₂ -CH ₃	4,15 q (7,1)	~	4,14 q (7,1)
O-CH ₂ -CH ₃	1,27 t (7,1)	~	1,21 t (7,1)
tBu	~	1,41 s	~

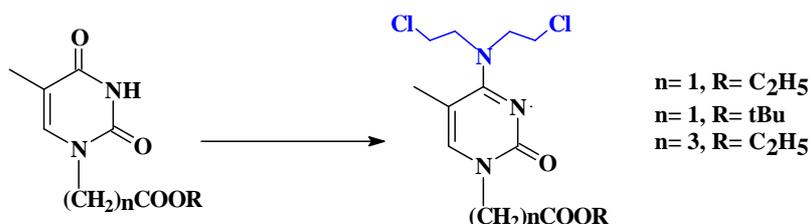
CHAPITRE III

**Transformation du carbonyle
en position 4 de la Thymine**

III. TRANSFORMATION DU CARBONYLE EN POSITION 4 DE LA THYMINE

III.1. INTRODUCTION

La seconde étape de cette synthèse consiste en la transformation du groupement carbonyle en bis-(β -chloroéthyl) amine:



Plusieurs auteurs ont réalisé ce type de transformation en deux étapes, la première consiste à fixer un bon groupement nucléofuge en position 4 de la thymine alkylée. La deuxième étape étant une substitution nucléophile permettant de fixer soit le groupement bis(β -chloroéthyl)-amine, ou diéthanolamine.

Cette transformation est possible du fait des formes tautomères présentées par la thymine (schéma III.1). La forme (b) est la plus couramment rencontrée mais les deux autres formes sont possibles avec une probabilité plus grande pour la forme (c).

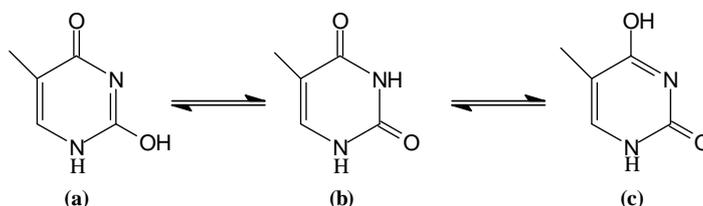


Schéma III.1: tautomérie de la thymine

Pour effectuer ces transformations, plusieurs voies de synthèse ont été développées, dont nous décrivons quelque-unes.

Grunder-Klotz et al.⁴⁵ ont transformé l'uracile en cytosine en utilisant la mésométrie de l'uracile pour fixer sur l'oxygène en position 4, un bon nucléofuge, le mésithylènesulfonyle, qui est très encombré et est donc sélectif de cette position. La molécule ainsi obtenue peut réagir avec l'azidure de sodium dans le DMF, conduisant alors au dérivé possédant un groupe azido en position 4. celui-ci est réduit pour former l'amine (schéma III.2).

⁴⁵ E.Grunder-Klotz, G.Just, *Nucleosides Nucleotides*, **13** (9), 1829 (1994).

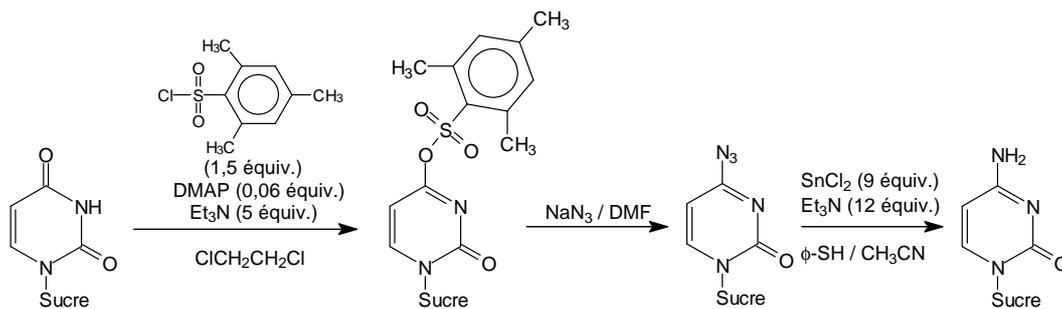


Schéma III.2: formation de la cytidine à partir de l'uridine par substitution nucléophile

A. A.-H. Abdel-Rahman et al.⁴⁶ ont substitué le groupement carbonyle en position 4 de la thymidine protégée par le 1-pyrenylmethylamine. Cette transformation a été effectuée par formation de l'intermédiaire triazolylé dans l'acétonitrile, en présence de triazole, triéthylamine et POCl_3 . Une substitution nucléophile par le chlorhydrate de 1-pyrènemethylamine (RNH_2) est ensuite réalisée dans le DMF à 80°C en présence de triéthylamine et permet d'obtenir le produit avec un rendement de 77% (schéma III.3)

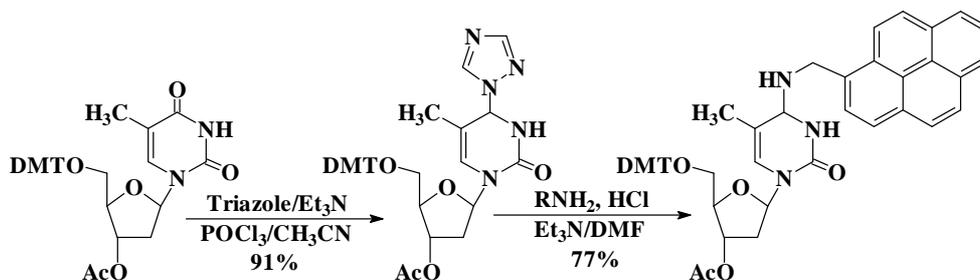


Schéma III.3: transformation du carbonyle en amine secondaire par une 4-triazoloylation

La fixation de l'unité triazolique suit le processus classique présenté sur le schéma III.4 :

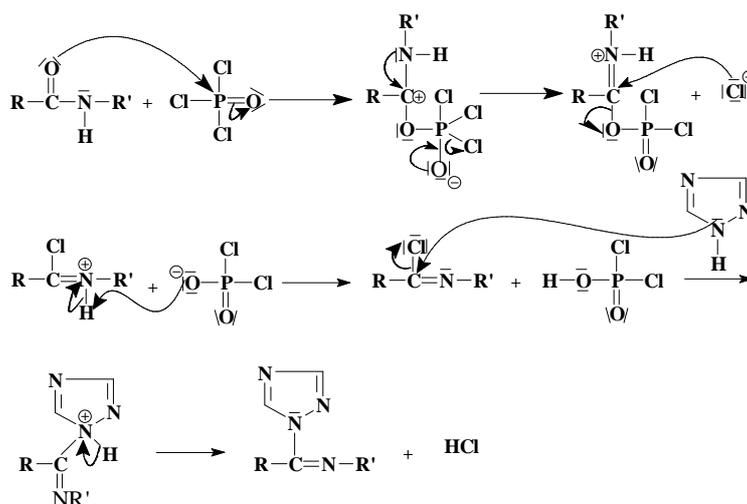


Schéma III.4 : mécanisme de la réaction de triazoloylation

⁴⁶A.A.-H Abdel-Rahman, O.M.Ali, E.B Pedersen, *Tetrahedron*, **52** (48),15311-15324 (1996).

L'uridine peut être transformée en cytidine par l'intermédiaire d'une 4-thiouridine. En effet, Starrett et al.⁴⁷ ont rapporté que le pentasulfure de phosphore P_2S_5 pouvait transformer la fonction carbonyle en position 4 de l'uridine en fonction thiocarbonyle qui, après ammonolyse, conduit à la cytidine. Cependant, ces auteurs ont aussi montré que P_2S_5 ne conduit pas toujours au thioamide désiré. Une alternative à P_2S_5 est le réactif de Lawesson. Il s'agit du 2,4-bis-(4-méthoxyphényl)-1,3-dithia-2,4-diphosphétane-2,4-disulfide que nous noterons R.L. par la suite. Ce réactif permet de nombreuses réactions de thionation⁴⁸, et en particulier la réaction de conversion en thiocétone⁴⁹ ou en thiocarboxamides⁵⁰ des composés oxygénés correspondants. Une fois les thiocétones formées, celles-ci peuvent être converties en amines primaires par réaction avec l'ammoniac dans le méthanol. Cette réaction peut s'appliquer au cas des dérivés de l'uridine comme l'ont décrit Starrett et coll.; on peut le résumer par le schéma III.5.

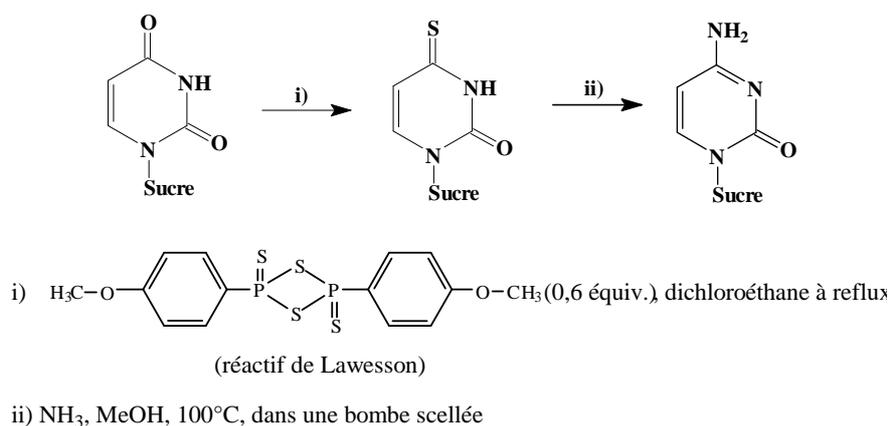


Schéma III.5 : formation de la cytidine par l'intermédiaire d'une thiouridine

Un mécanisme de l'étape de thionation est proposé sur le schéma III.6.

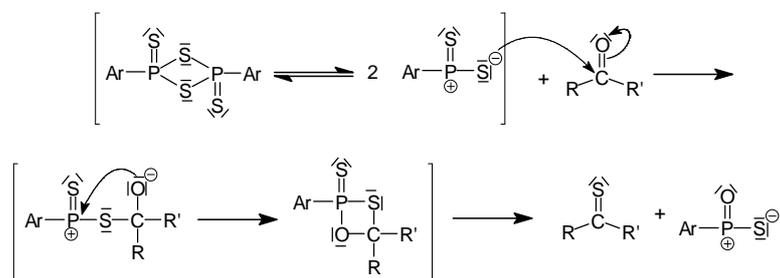


Schéma III.6 : mécanisme de la réaction de thionation

⁴⁷J.E.Starrett,Jr, D.R. Tortolani, D.C.Baker, M.T.Omar, A.K.Hebblar, J.A.Wos, J.C.Martin, M.M.Mansuri, *Nucleosides Nucleotides*, **9** (7), 885 (1990).

⁴⁸M.P. Cava, M.I. Levinson, *Tetrahedron*, **41** (22), 5061 (1985).

⁴⁹B.S. Pedersen, S. Sheibye, N.Y. Nilsson, S-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **87** (3), 223 (1978).

⁵⁰S. Sheibye, B. S. Pedersen, S.-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **87** (3), 229 (1978).

III.2. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Nous avons mis en oeuvre ces trois méthodes pour fixer le groupement actif Bis (β -chloroethyl) amine. Dans un premier temps, la substitution nucléophile développée par Grunder-Klotz a été appliquée. Pour cela nous avons fait réagir le chlorure de mésitylène sulfonyle sur la 1-éthoxycarbonylméthyl-thymine afin de fixer ce groupe sur l'hydroxyle en position 4, l'équilibre étant déplacé ainsi vers la forme tautomère (c) (schéma III.1).

L'intermédiaire formé, une substitution nucléophile par le Bis (β -chloroethyl) amine est réalisée dans le DMF en présence de triéthylamine.

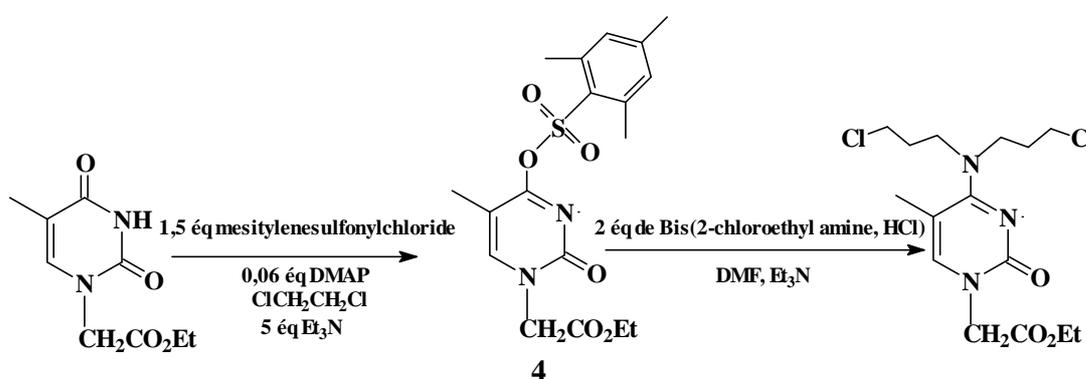


Schéma III.7 : passage par le groupement mésitylènesulfonyle

Bien que lente (4 jours en moyenne, à température ambiante), la réaction de fixation du groupement mésitylènesulfonyle conduit au composé intermédiaire avec un rendement de 56%.

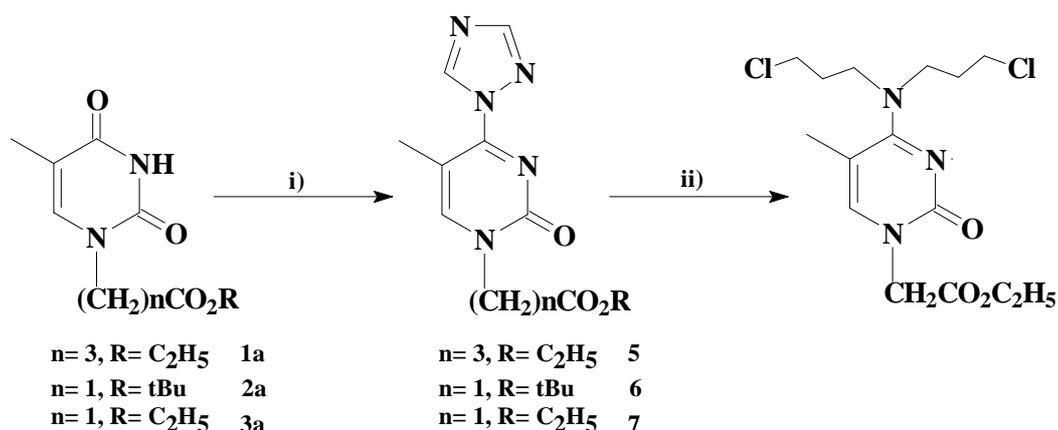
En spectroscopie RMN du proton, la présence du groupement mésitylènesulfonyle est confirmée par l'apparition d'un singulet intégrant pour 6 protons vers 2,73 ppm correspondant aux deux groupements CH_3 en position ortho, et d'un singulet correspondant au CH_3 en position para vers 2,29 ppm ainsi que d'un singulet intégrant pour 2 protons dans la zone de résonance des protons aromatiques (tableau III.1).

Tableau III.1: Données RMN ^1H du composé **4** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 4 (CDCl_3)
Base	
H-6	7,31 d (0,8)
CH_3	2,04 d (0,8)
Mésitylènesulfonyle	
H-Ar	6,95 s
2 CH_3 (ortho)	2,73 s
CH_3 (para)	2,29 sé
Chaîne	
H- α	4,47 s
O- $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_3	4,20 q (7,16)
	4,25 q (7,16)
O- CH_2 - $\underline{\text{CH}_3}$	1,26 t (7,16)

Les essais de fixation du groupement bis (β -chloroethyl) amine n'ont pas conduit au composé attendu. L'augmentation du temps de réaction, de la température ou de la quantité de réactif n'a pas induit d'amélioration.

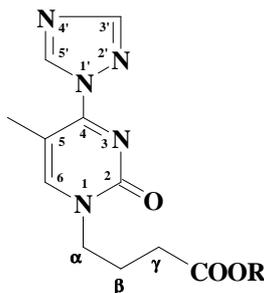
Nous avons alors procédé à la transformation par la méthode proposée par A.A.-H.Abdel-Rahman et al. par l'intermédiaire d'une triazolylolation de la thymine alkylée. L'étape de substitution nucléophile étant réalisée comme précédemment (schéma III.8).



- i) triazole (9,6 éq), POCl_3 (2 éq), acétonitrile à 0°C et 9,2 éq Et_3N
 puis on ajoute le composé dissout dans de l'acétonitrile
- ii) 2 eq de Bis(2-chloroethyl amine, HCl), DMF, 35 eq Et_3N

Schéma III.8 : passage par le groupement triazolyle

Le triazole est mis en présence de POCl_3 , d'acétonitrile et de triéthylamine à 0°C . On laisse remonter la température du mélange réactionnel à l'ambiante, avant d'ajouter la thymine alkylée. En suivant l'avancement de la réaction par ccm, on observe la formation du composé triazolylé au bout de quelques minutes de réaction. Dès la disparition du produit de départ, la réaction est arrêtée par évaporation après ajout de triéthylamine et d'eau. Après traitement, le produit triazolylé est isolé avec un rendement quasi-quantitatif.



Après triazoloylation, les spectres RMN ^1H des composés **5**, **6** et **7** confirment la présence des deux protons H-3' et H-5' respectivement à 8,12 et 9,29 résonnant sous forme de singulet. Les attributions des autres signaux sont reportées sur le tableau III.2.

Tableau III.2: Données RMN ^1H des composés **5**, **6** et **7** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 5 (CDCl_3)	Composé 6 (DMSO)	Composé 7 (DMSO)
Base			
H-6	7,71 s	8,34 se	8,26 s
CH_3	2,46 s	2,30	2,30 se
Triazol			
H-3'	8,12 s	9,34 s	8,37 s
H-5'	9,29 s	8,38 s	9,32 s
Chaîne			
H- α	4,04 t (7,1)	4,62 s	4,78 s
H- β	2,15 qt (7,1)	-	-
H- γ	2,43 t (7,1)	-	-
$\text{O}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_3$	4,15 q (7,1)	-	4,18 q (7,1)
$\text{O}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_3}$	1,27 t (7,1)	-	1,23 t (7,1)
tBu	-	1,44 s	-

Les spectres de masse des composés **5**, **6** et **7** présentent le pic quasimoléculaire correspondant à MH^+ respectivement à m/z 291, 291 et 263 confirmant ces structures.

Les essais d'amination des composés **5**, **6** et **7** sont réalisés dans le DMF en présence de deux équivalents de chlorhydrate de bis-(β -chloroéthyl)-amine, et d'un large excès de triéthylamine. Plusieurs essais ont été effectués soit par chauffage classique soit par activation micro-ondes. Malgré les différentes conditions réactionnelles testées, nous ne sommes pas parvenus aux composés attendus.

Nous nous sommes alors tournés vers la méthode proposée par Starrett et al. Par l'intermédiaire d'une thionation de la thymine. Nous avons fait réagir la thymine alkylée avec 1,5 équivalents de réactif de lawesson (R. L.) dans le dichloroéthane à reflux.

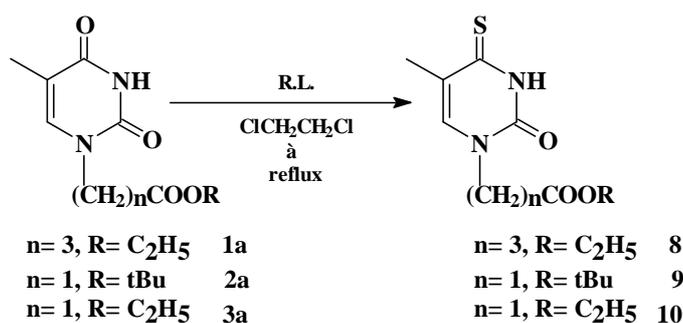


Schéma III.9 : synthèse des 4-thiothymines alkylées

Le temps de réaction varie en fonction du substrat. Après évaporation du solvant et purification, nous obtenons les dérivés soufrés avec de bons rendements (tableau III.3).

Tableau III.3 : Résultats de la réaction de thionation par voie classique

<i>composés</i>	<i>Temps de réaction</i>	<i>Rendements</i>
8	7h30	94%
9	6h	84%

Afin de réduire le temps de réaction, des essais par activation micro-ondes ont été réalisés. De la même façon, le composé alkylé est dissout dans le dichloroéthane en présence

de 1,5 équivalents de réactif de Lawesson. Le mélange réactionnel est ensuite activé au micro-onde. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau III.4.

Tableau III.4 : Résultats de la réaction de thionation par activation micro-ondes

<i>composé</i>	<i>Activation</i>	<i>Rendement</i>
8	16x(2mn 80°C 350 Watt)	99%
9	16x(2mn 80°C 350 Watt)	85%
10	21x(2mn 80°C 350 Watt)	92 %

Les essais par activation micro-ondes se sont avérés très satisfaisants, nous avons alors opté pour la synthèse de la 4-thiothymine alkylée par cette voie.

Les spectres RMN du carbone confirment la présence du soufre. On retrouve les pics correspondants au C=S vers 190 ppm pour les trois composés. Les données RMN du proton des composés **8**, **9** et **10** sont rassemblées dans le tableau III.5.

Tableau III.5: Données RMN ^1H des composés **8**, **9** et **10** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 8 (CDCl_3)	Composé 9 (CDCl_3)	Composé 10 (CDCl_3)
Base			
H-3	9,9 s	10,02 s	9,98 s
H-6	7,06 s	6,98 d (0,8)	6,97 d (0,8)
CH ₃	2,10 s	2,10 d (0,8)	2,10 d (0,8)
Chaîne			
H- α	3,80 t (7)	4,37 s	4,60 s
H- β	2,04 m	-	-
H- γ	2,38 t (6,8)	-	-
O- <u>CH₂</u> -CH ₃	4,15 q (7)	-	4,26 q (7,1)
O-CH ₂ - <u>CH₃</u>	1,27 t (7)	-	1,31 t (7,1)
tBu	-	1,49 s	-

Ces résultats sont également confirmés par spectrométrie de masse, les spectres de masse des composés **8**, **9** et **10** présentent le pic quasi-moléculaire correspondant à MH^+ respectivement à m/z 257, 257 et 229.

Afin de réaliser l'étape d'amination, plusieurs essais de fixation du groupement bis (β -chloroéthyl) amine sur les composés **8**, **9** et **10** ont été réalisés, en faisant varier le solvant (DMF, pyridine ou mélange des deux) et le mode d'activation (chauffage classique ou activation micro-ondes). Nous avons reproduit les essais plusieurs fois en variant les paramètres opératoire.

Aucun des trois intermédiaires n'a conduit aux composés attendus. Face à cet échec, nous avons essayé de réaliser cette transformation en deux étapes à partir de la 1-(éthoxycarbonylméthyl)-4-thiothymine. Dans un premier temps, une substitution nucléophile par la diéthanolamine est réalisée, puis les hydroxyles sont substitués par des chlores en utilisant le chlorure de thionyle comme agent de chloration.

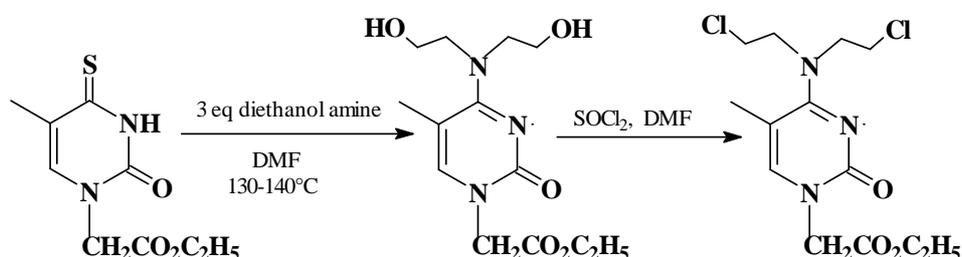


Schéma III.10 : fixation de la diéthanolamine

Nous avons commencé par appliquer le système le plus couramment rencontré, soit dans le DMF en maintenant le milieu réactionnel à une température de 130°C. Malheureusement aucune évolution n'a été constatée, même en faisant varier le mode d'activation. Nous avons alors utilisé le méthanol comme solvant, et la réaction a été menée à reflux suivant la méthode développée par Starrett et al.

Contrairement à nos attentes, la diéthanolamine ne s'est pas fixée en position 4 de la thymine. L'attaque du nucléophile s'est dirigée préférentiellement vers le carbonyle de la fonction ester pour donner une fonction amide, avec un rendement de 74%.

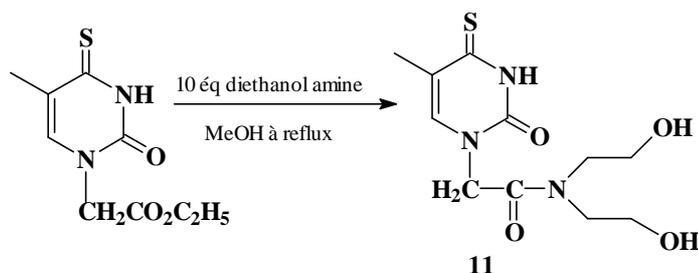


Schéma III.11 : fixation de la diéthanolamine par la méthode de Starrett et al.

En RMN ^1H on constate effectivement la disparition du singulet correspondant au CH_3 du groupement alkyle ainsi que le quadruplet correspondant aux deux protons du CH_2 . On observe aussi l'apparition de 4 triplets entre 3,52 et 3,77 ppm correspondant aux 4 CH_2 de la diéthanolamine (tableau III.6).

Le spectre RMN du carbone confirme la présence du soufre. On retrouve le pic correspondant au $\text{C}=\text{S}$ à 193 ppm. Ce résultat est également confirmé par la spectroscopie de masse, le spectre de masse du composé **11** présente le pic quasimoléculaire ($\text{M}+\text{H}^+$) à m/z 288 ainsi que le pic correspondant à ($\text{M}+\text{NH}_4^+$) à m/z 305.

L'étape suivante est la substitution des hydroxyles par des chlores. Cette réaction est réalisée dans la pyridine en additionnant le chlorure de thionyle à 0°C pendant 10 minutes puis en laissant la température remonter à l'ambiante.

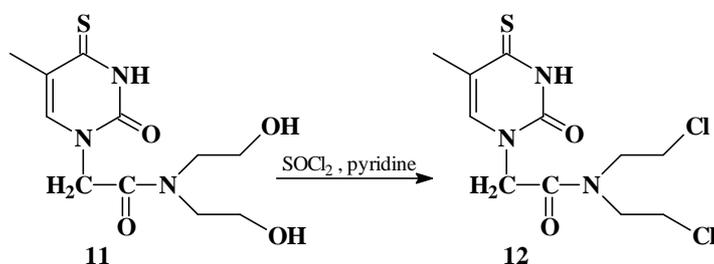


Schéma III.12 : Chloration des hydroxyles

Le suivi de la réaction par ccm montre l'apparition de plusieurs produits au cours de la réaction. Nous avons alors réalisé cette transformation en 2 étapes, tout d'abord la fixation du groupement mésyle dans la pyridine puis une réaction de substitution nucléophile permet de fixer le chlore.

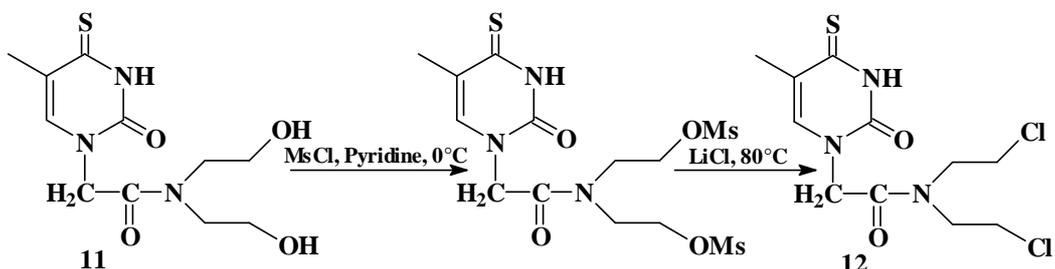


Schéma III.13 : substitution des hydroxyles par des chlores

Le produit mésylé formé à partir du composé **11** est utilisé tel quel sans purification pour réaliser la chloration dans la pyridine, en présence de 12 équivalents de chlorure de

lithium. Après 5 heures de réaction, le mélange réactionnel est évaporé puis purifié par chromatographie. Le composé attendu est obtenu avec un rendement de 25 %.

Le spectre infra rouge du composé **12** montre bien la disparition des bandes hydroxyles vers 3340 cm^{-1} .

En RMN du proton, l'introduction des chlores n'a pas affecté les déplacements chimiques des protons. Les attributions des signaux sont reportées sur le tableau III.6. Le spectre de masse confirme qu'il s'agit bien du composé dichloré, il présente deux pics quasi-moléculaires à m/z 324, m/z 326 et m/z 328 correspondants à $(M+H^+)$.

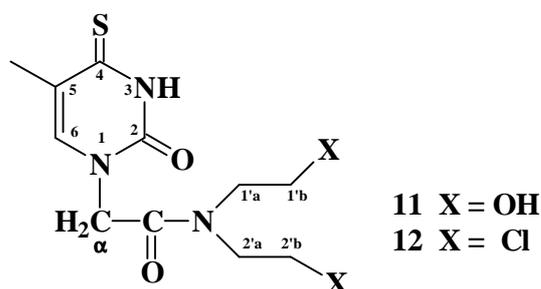


Tableau III.6: Données RMN ^1H des composés **11** et **12** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 11 (CD_3OD)	Composé 12 (CD_3OD)
Base		
H-6	7,31 d (0,8)	7,29 d (1)
CH_3	2,05 d (0,8)	2,03 d (1)
Chaîne		
H- α	4,79 s	4,80 s
H-1'a	3,59 t (5,3)	3,57 t (5,4)
H-1'b	3,77 t (5,3)	3,80 t (5,4)
H-2'a	3,52 t (5,7)	3,53 t (5,7)
H-2'b	3,70 t (5,7)	3,72 t (5,7)

Nous avons procédé, par la suite, à la synthèse du N,N-di-(2-hydroxyéthyl)-2-(thymine-1-yl)-acétamide. Pour cela nous avons reproduit les mêmes conditions opératoires utilisées pour la synthèse du N,N-di-(2-hydroxyéthyl)-2-(4-thiothymine-1-yl)-acétamide, soit attaque de la diethanolamine sur le carbonyle de l'ester, puis substitution des deux hydroxyles par des

chlores, en utilisant comme substrat de départ la 1-éthoxycarbonylmethyl-thymine (schéma III.14)

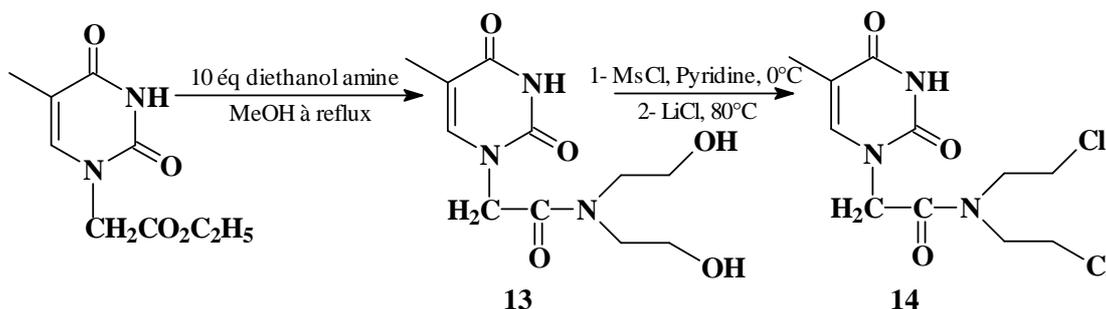


Schéma III.14 : synthèse du 1-bis-(β-chloroéthyl)aminecarbonylmethyl-thymine

Les composés **13** et **14** sont obtenus après purification avec des rendements de 75 % et 28%.

La caractérisation par RMN ^1H des composés **13** et **14** confirme les structures attendues, les données obtenues sont rassemblées dans le tableau III.7.

Tableau III.7 : Données RMN ^1H des composés **13** et **14** [δ ppm (J Hz)]

Attributions	Composé 13 (CD_3OD)	Composé 14 (CD_3OD)
Base		
H-6	7,17 d (1)	7,22 q (1)
CH_3	1,91 d (1)	2,01 d (1)
Chaîne		
H- α	4,73 s	4,78 s
H-1'a	3,57 d (5,2)	3,58 t (5,3)
H-1'b	3,79 d (5,2)	3,80 (5,3)
H-2'a	3,53 d (5,48)	3,57 (5,6)
H-2'b	3,74 d (5,48)	3,77 (5,6)

Ces résultats sont également confirmés par spectrométrie de masse, les spectres de masse des composés **13** et **14** présentent le pic quasi-moléculaire correspondant à MH^+ à m/z 272 pour le composé **13** et pour le composé dichloré (**14**) à m/z 308, m/z 310 et m/z 312.

CONCLUSION

Dans cette seconde partie nous avons réalisé la mise au point de l'alkylation de la thymine par activation micro-ondes, avec différentes chaînes afin d'étudier l'influence de la longueur de cette dernière et celle de la présence d'un encombrement stérique sur la sélectivité. La thymine alkylée est ensuite utilisée pour synthétiser une famille d'analogues du chlorambucil. Malgré les multiples essais de fixation du groupement bis-(β -chloroéthyl)-amine en position 4 de la thymine alkylée, nous n'avons pas pu obtenir les analogues souhaités. Seules les molécules issues de l'attaque nucléophile sur le carbonyle de l'ester ont été obtenues.

Des tests biologiques de l'activité de ces deux nouvelles molécules seront réalisés au laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire de l'université Paris XIII par le professeur Michel Kraemer.

CHAPITRE IV

Partie expérimentale

IV. PARTIE EXPERIMENTALE

IV.1. REACTIFS ET SOLVANTS

L'origine des réactifs et solvants utilisés spécifiquement au cours de cette partie est présentée dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1 : Réactifs et solvants utilisés

Réactifs et solvants	Origine
Acétate d'éthyle	SDS
Acétone	Acros
Acétonitrile	SDS
Bromobutanoate d'éthyle	Aldrich
Bromoéthanoate d'éthyle	Aldrich
Bromobuthanoate de <i>tertio</i> -butyle	Aldrich
Chlorhydrate de bis-(β -chloroéthyl) amine	Aldrich
Chloroforme	SDS
Chlorure de mésitylenesulfonyle	Aldrich
Chlorure de thionyle	Aldrich
Diethanolamine	Acros
1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène (DBU)	Aldrich
4-diméthylaminopyridine	Acros
Diméthylformamide	Acros
Ethanol	SDS
Ether de pétrole	SDS
Hydrure de sodium	Aldrich
Méthanol	Fisher
Réactif de Lawesson	Aldrich
POCl ₃	Acros
Pyridine anhydre	Aldrich
Thymine	Aldrich
Triazole	Aldrich
Triéthylamine	Acros
Toluène	SDS

IV.2. METHODES ET MATERIELS

Les méthodes et matériels de purification et d'analyse sont les mêmes que celles décrites dans la 1^{ème} partie.

Les divers éluants utilisés sont :

éluant A : éther de pétrole/toluène/acétone ; 4/4/3 ; v/v/v

éluant B : CHCl₃.

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

éluant D : chloroforme/éthanol ; 90/10 ; v/v

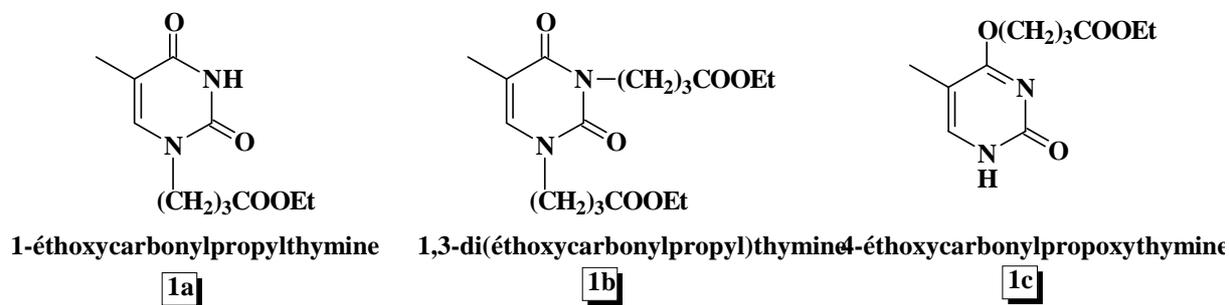
éluant E : chloroforme/éthanol ; 50/50 ; v/v

IV.3. FOUR MICRO-ONDES

L'activation micro-onde a été réalisée par un réacteur multimode de laboratoire Milestone Ethos 1600[®] d'une puissance maximale de 1000 W, piloté par ordinateur et pouvant être asservi en puissance ou en température (la température est lue par une sonde de type fibre optique).

IV. 4. SYNTHÈSE

IV.4.1. REACTION D'ALKYLATION



IV.4.1.1. Alkylation par chauffage classique en présence de DBU

Dans un bicol de 100 ml on introduit 2 g (15,8 mmol) de thymine que l'on dissout dans 50 ml de DMF anhydre. On ajoute alors 2.6 ml (1,1 éq.) de 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène (DBU) à l'aide d'une seringue. Une fois la réaction placée sous argon, sous agitation magnétique et à température ambiante, on injecte goutte à goutte 3.4 ml (1,5 éq.) de 4-bromobutanoate d'éthyle solubilisé dans 1 ml de DMF. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince dans l'éluant A. Après 4h de réaction, le mélange réactionnel est évaporé à sec, redissous dans 60 ml d'AcOEt puis placé dans une ampoule à décanter avec 40 ml d'eau. Après agitation, on récupère la phase organique et on extrait la phase aqueuse avec 2 fois 30 ml d'AcOEt. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄, filtrée puis le solvant est évaporé. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice en utilisant un gradient de solvant (acétone/éther de pétrole).

On récupère 816 mg (19%) du composé **1a**, 2.054 g (37%) du composé **1b** et 302 mg (8%) du composé **1c**.

IV.4.1.2. Alkylation par chauffage classique en présence de NaH

Dans un bicol de 100 mL, on introduit 756 mg de thymine (6 mmol) et 480 mg de NaH à 60% en suspension dans l'huile (12 mmol) solubilisé dans 40 ml de DMF anhydre. Le milieu réactionnel est placé sous agitation magnétique et sous atmosphère d'argon, à 100°C pendant 4 heures. Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante. On ajoute alors 2ml (13,8 mmol) de 4-bromobutanoate d'éthyle. Après deux heures sous agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est chauffé à 100°C pendant 48 heures. La réaction est arrêtée et le DMF évaporé. L'huile obtenue est reprise dans un mélange AcOEt /H₂O puis la

phase aqueuse extraite avec 2 x 30 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et le solvant évaporé. Après purification par chromatographie sur colonne de silice (avec un gradient d'éluant d'éther de pétrole et d'acétone), les composés **1a**, **1b** et **1c** avec des rendements de 27%, 36% et 5% respectivement.

IV.4.1.3. Alkylation par irradiation micro-ondes

A 378 mg de thymine (3 mmol) sont ajoutés, 132 mg d'hydrure de sodium (3,3 mmol, 1,1 éq.) dans le DMF (12 ml), le mélange réactionnel est irradié par activation micro-ondes pendant 9 min (3x3min; 100°C, P: 250W).

Le 4-bromobutanoate d'éthyle (0,476 mL, 1,1 éq.) est ensuite additionné au brut réactionnel et le tout est activé pendant 18 minutes (6x3mn; 100°C; P: 250W). Après purification, le composé **1a** est isolé avec un rendement de 34% (245 mg) et le composé **1b** avec un rendement de 18% (191 mg).

1a (solide blanc) ; Rf = 0.24 (éluant A) Tf = 133°C

RMN ^1H (CDCl_3): voir *tableau II.3*.

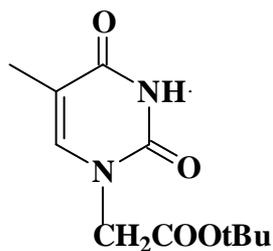
RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ =172.6 (-COO) ; 164.2 (C-4) ; 150.9 (C-2) ; 140.4 (C-6) ; 110.9 (C-5) ; 60.8 (C- α) ; 47.6 (O- CH_2 - CH_3) ; 30.7 (C- γ) ; 24.2 (C- β) ; 14.2 (O- CH_2 - CH_3) ; 12.3 (CH_3 -thym).

1b (huile translucide) ; Rf = 0.54 (éluant A)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ =7.06 (1H, d, J=1 Hz, H-6) ; 6.14 (2H, q, J=7.1 Hz, COO- CH_2 - CH_3) ; 6.11 (2H, q, J=7.1 Hz, COO- CH_2 - CH_3) ; 4.01 (2H, t, J=7.1 Hz, H- α) ; 3.79 (2H, t, J=7.2 Hz, H- α) ; 2.37 (4H, m, H- γ) ; 2.01 (2H, qt, J=7.6 Hz, H- β) ; 1.97 (2H, qt, J=7.6 Hz, H- β) ; 1.92 (3H, d, J=1 Hz, CH_3 -thym) ; 1.27 (3H, t, J=7.2 Hz, COO- CH_2 - CH_3) ; 1.25 (3H, t, J=7.2 Hz, COO- CH_2 - CH_3)

1c (solide blanc) ; Rf = 0.36 (éluant A) Tf = 102°C

RMN ^1H (CDCl_3) : δ =10 (1H, s, -NH) ; 7.05 (1H, s, H-6) ; 4.13 (2H, q, J=7.1 Hz, COO- CH_2 - CH_3) ; 4.00 (2H, t, J=7.0 Hz, H- α) ; 2.37 (2H, t, J=7.6 Hz, H- γ) ; 1.99 (2H, qt, J=7.3 Hz, H- β) ; 1.92 (3H, s, CH_3 -thym) ; 1.25 (3H, t, J=7.1 Hz, COO- CH_2 - CH_3)



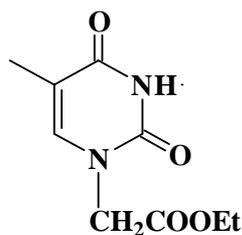
1-ter-butoxycarbonylméthyl-thymine 2a

Le composé **2a** est synthétisé par activation micro-ondes, selon le même mode opératoire utilisé pour la synthèse du composé **1a**. A partir des mêmes quantités de réactifs. Dans ce cas le temps d'irradiation après ajout de 0,496 ml (1,1 éq.) de bromoéthanoate de tertio-butyle est de 6 min. Après purification sur colonne de silice, on recueille 540 mg de composé **2a** (75%).

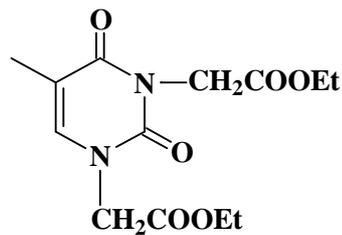
2a (solide blanc) ; Rf = 0.2 (éluant A) Tf = 193°C

RMN ¹H (DMSO) : voir *tableau II.3*.

RMN ¹³C (DMSO) : δ=167.27 (-COO) ; 164.2 (C-4) ; 150.91 (C-2) ; 141.7 (C-6) ; 108.34 (C-5) ; 81.75 (-C(CH₃)₃) ; 48.98 (C-α) ; 27.65 (-C(CH₃)₃) ; 11.85 (CH₃-thym).



1-éthoxycarbonylméthylthymine

3a

1,3-di(éthoxycarbonylméthyl)-thymine

3b

La réaction est réalisée par irradiation micro-ondes, selon le même mode opératoire utilisé pour la synthèse du composé **1a**. A partir de 756 mg de thymine (6 mmol), 264 mg d'hydrure de sodium (1,1 éq.) et 20 ml de DMF. Après ajout du bromoéthanoate d'éthyle (0,750 ml, 1,1 éq.) le temps d'irradiation est de 6 minutes (2x3mn; 100°C; P: 250W). Après purification sur colonne de silice, on obtient 999 mg de composé **3a** (74%) et 178 mg de composé **3b** (10%).

3a (solide blanc) ; Rf = 0.21 (éluant A) Tf = 166°C

RMN ¹H (DMSO) : voir *tableau II.3*.

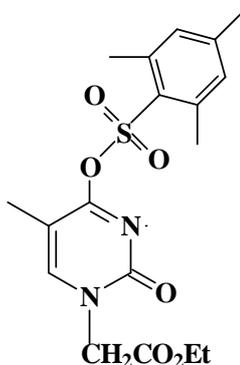
RMN ¹³C (DMSO) : δ=168.07 (-COO) ; 164.15 (C-4) ; 150.82 (C-2) ; 141.43 (C-6) ; 108.44 (C-5) ; 60.98 (O-CH₂-CH₃) ; 48.30 (C-α) ; 13.89 (CH₃-thym) ; 11.71 (O-CH₂-CH₃).

3b (huile translucide) ; Rf = 0.48 (éluant A)

RMN ¹H (DMSO) : δ=7.5 (1H, q, J= 1 Hz, H-6) ; 6,11 (2H, q, J=7,1 Hz, COO-CH₂-CH₃) ; 5,9 (2H, q, J=7,1 Hz, COO-CH₂-CH₃) ; 4,65 (2H, s, H-α) ; 4,47 (2H, s, H-α), 1,77 (3H, d, J=1 Hz, CH₃-thym) ; 1,27 (3H, t, J=7,1 Hz, COO-CH₂-CH₃) ; 1,23 (3H, t, J=7,1 Hz, COO-CH₂-CH₃).

IV.4.2. TRANSFORMATION DU CARBONYLE EN POSITION 4 DE LA THYMINE

IV.4.2.1. Passage par le groupement mésitylènesulfonyl



1-(éthoxycarbonylméthyl)-4-(O-mésitylènesulfonyl)thymine **4**

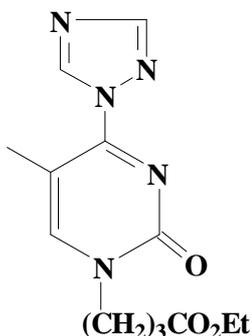
Dans un ballon de 50 ml, 200 mg (0,943 mmol) de composé **3a** sont introduits avec 2 éq. (412 mg) de chlorure de mésitylènesulfonyl, 0,06 éq. de DMAP (7mg) et 20 ml de dichloroéthane. On place le ballon sous atmosphère d'argon et agitation magnétique, et à l'aide d'une seringue on ajoute 5éq. de triéthylamine (0,655 ml). La réaction est arrêtée après 4 jours, le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice, on récupère 207 mg de composé **4** (56%).

Rf = 0.75 (éluant B).

RMN ¹H (CDCl₃) : voir *tableau III.1*.

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ=167.22 (-COO) ; 166.55 (C-4) ; 154.19 (C-2) ; 147.37 (C-6) ; 131.92 (C-Bz) ; 104.45 (C-5) ; 62.22 (O-CH₂-CH₃) ; 48.61 (C-α) ; 22.75 (2 CH₃-*para*) ; 21.15 (CH₃-*ortho*) ; 14.05 (O-CH₂-CH₃) ; 12.15 (CH₃-thym).

IV.4.2.2. Passage par le groupement triazolyle



1-(éthoxycarbonylpropyl)-4-(1,2,4-triazolyl)thymine **5**

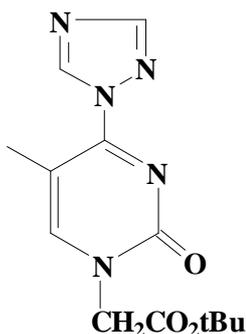
Dans un ballon de 50ml, on introduit 1,034 g de triazole (9,6 éq.), 0,285 ml de POCl₃ (2éq.) et 21 ml d'acétonitrile. On place le ballon sous agitation magnétique à 0°C, et on ajoute goutte à goutte 2 ml de triéthylamine (9,2éq.). 367 mg du produit **1a** sont alors rajoutés à température ambiante. On suit l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince dans l'éluant C. Après 2 h de réaction, on ajoute au brut réactionnel 1,4 ml de triéthylamine et 0,3 ml d'eau, au bout de 10 min le mélange est évaporé à sec.

Le brut réactionnel est placé dans une ampoule à décanter avec 4 ml d'une solution basique saturée de NaHCO₃ et 50 ml de chloroforme, on récupère la phase organique et on extrait la phase aqueuse avec 25 ml de chloroforme. Les deux phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO₄. Après filtration et évaporation du solvant, le composé **5** est obtenu avec un rendement quasi-quantitatif.

R_f = 0.42 (éluant C)

RMN¹H(CDCl₃): voir *tableau III.2*.

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ=172.6 (-COO); 158.2 (C-4); 154.82 (C-2); 153.47 (C-3'); 151.03 (C-6); 105.9 (C-5); 145.07 (C-5'); 60.85 (O-CH₂-CH₃); 50.33 (C-α); 30.67 (C-γ); 24 (C-β); 16.93 (CH₃-thym); 14.2 (O-CH₂-CH₃).



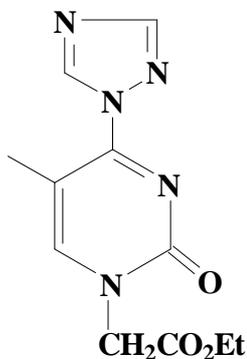
1-(*ter*-butoxycarbonylméthyl)-4-(1,2,4-triazolyl)thymine **6**

Le composé **6** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **5**, à partir de 921 mg (3,838 mmol) du produit **2a**. On obtient le composé désiré sous forme d'une huile jaune avec un rendement quasi-quantitatif.

R_f = 0.47 (éluant C).

RMN ¹H (CDCl₃): voir *tableau III.2*.

RMN ¹³C (DMSO) : δ=172.6 (-COO); 158.2 (C-4); 153.8 (C-6); 153.59 (C-2); 153.43 (C-3'); 145.34 (C-5'); 104.29 (C-5); 82.16 (-C(CH₃)₃); 51.6 (C-α); 27.64 (-C(CH₃)₃); 15.72 (CH₃-thym).



1-(éthoxycarbonylméthyl)-4-(1,2,4-triazolyl)thymine **7**

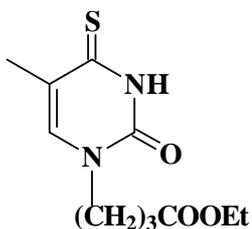
Le composé **7** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **5**, à partir de 550 mg (2,596 mmole) du produit **3a**. On obtient le composé désiré avec un rendement quasi-quantitatif.

R_f = 0.40 (éluant C)

RMN ¹H (DMSO): voir *tableau III.2*.

RMN ¹³C (DMSO): δ=166.43 (-COO); 158.35 (C-4); 153.73 (C-3'); 153.33 (C-2); 146.78 (C-6); 145.25 (C-5'); 104.41 (C-5); 61.27 (O-CH₂-CH₃); 50.49 (C-α); 15.59 (CH₃-thym); 13.89 (O-CH₂-CH₃).

IV.4.2.3. Réaction de thionation



1-(éthoxycarbonylpropyl)-4-thiothymine **8**

IV.4.2.1. Par chauffage classique:

Dans un bicol surmonté d'un réfrigérant, on introduit 240 mg (1 mmol) de composé **1a** ainsi que 625 mg de réactif de Lawesson (1,5 éq.). 12 mL de dichloroéthane sont ensuite ajoutés pour solubiliser le tout. Le mélange réactionnel est alors mis sous argon et sous agitation magnétique. L'ensemble est porté à reflux. L'avancement de la réaction est suivi par CCM dans l'éluant B. Au bout de 7h30, la réaction est arrêtée, le solvant est évaporé et le brut réactionnel est purifié sur plaques préparatives de gel de silice (éluant C). On obtient 240 mg de composé **8** correspondant à un rendement de 93%.

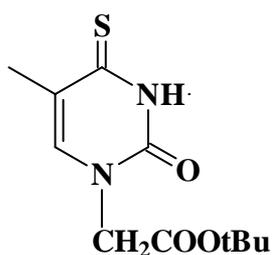
IV.4.2.2. Par activation micro-ondes:

Dans un bicol, on introduit 200mg (0.833 mmol) de composé **1a**, 520 mg de réactif de Lawesson (1,5 éq.) et 12 mL de dichloroéthane. Le mélange réactionnel est irradié par activation micro-ondes pendant 32 minutes (16x2mn; 80°C; P: 350W). Après purification sur colonne de silice, le composé **8** est isolé avec un rendement de 99% (253mg).

8 (solide jaune) ; Rf (éluant C) = 0.59 Tf = 153°C

RMN ¹H (CDCl₃) : voir *tableau III.5*.

RMN ¹³C (CDCl₃): δ=192 (C-4); 170.6 (-COO); 156.2 (C-2); 148.04 (C-6); 106 (C-5); 61.03 (O-CH₂-CH₃); 49.7 (C-α); 30.7 (C-γ); 23.76 (C-β); 16.8 (CH₃-thym); 14.3 (O-CH₂-CH₃).



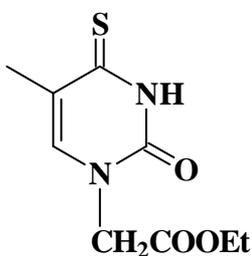
1-(*ter*-butoxycarbonylméthyl)-4-thiothymine **9**

Nous appliquons le mode opératoire décrit pour la synthèse du composé **8**, par activation micro-ondes. En faisant réagir cette fois 380 mg (1.58 mmol) de composé **2a** dissous dans 29 mL de dichloroéthane avec 990 mg (1.5 éq.) de réactif de Lawesson. Après purification sur colonne de silice (éluant : B), on récupère 344 mg de composé **9** correspondant à un rendement de 85%.

9 (solide jaune) ; Rf (éluant C) = 0.74 Tf = 66°C

RMN ¹H (CDCl₃) : voir *tableau III.5*.

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 191.0 (C-4) ; 166.0 (-COO) ; 148.4 (C-2) ; 136.9 (C-6) ; 119.3 (C-5) ; 83.8 (-C(CH₃)₃) ; 49.6 (C-α) ; 28.0 (-C(CH₃)₃) ; 17.0 (CH₃-thym).



1-(éthoxycarbonylméthyl)-4-thiothymine **10**

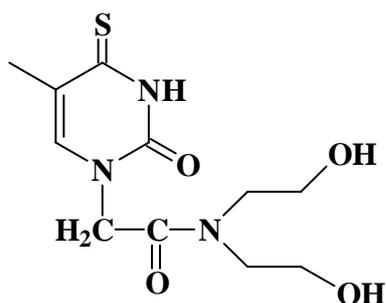
Nous appliquons le mode opératoire décrit pour la synthèse du composé **8** par activation micro-ondes. En faisant réagir 700 mg (3,3 mmol) de composé **3a** dissous dans 50 mL de dichloroéthane avec 2,065 g (1.5 éq.) de réactif de Lawesson. Le mélange réactionnel est irradié 42 minutes. Après purification sur colonne de silice (éluant : B), on récupère 694 mg de composé **10** correspondant à un rendement de 92%.

10 (solide jaune) ; Rf (éluant C) = 0.70 Tf = 144°C

RMN ¹H (CDCl₃) : voir *tableau III.5*.

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 191 (C-4) ; 166.94 (-COO) ; 148.3 (C-2) ; 136.63 (C-6) ; 119.58 (C-5) ; 62.44 (O-CH₂-CH₃) ; 49.07 (C-α) ; 17.02 (CH₃-thym) ; 14.11 (O-CH₂-CH₃).

IV.4.5. FIXATION DE LA DIETHANOLAMINE

N,N-di-(2-hydroxyéthyl)-2-(4-thiothymine-1-yl)acétamide **11**

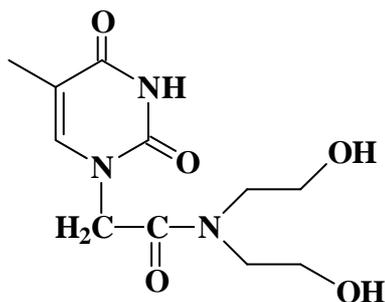
Dans un bicol de 25 ml surmonté d'un réfrigérant, sous atmosphère d'argon, on introduit 310 mg (1,36 mmol) de composé **10** et 8 ml de méthanol. On ajoute 1,304 ml de diethanol amine (10 éq.) et on chauffe à 60°C. Après 3 h de réaction, le produit brut est recueilli et purifié par chromatographie sur colonne de silice (avec un gradient d'éluant de dichlorométhane et d'éthanol). On récupère 289 mg de composé **11** sous forme de cristaux jaunes (74%).

Tf = 175°C.

Rf = 0.49 (éluant E)

RMN ¹H (CD₃OD): voir *tableau III.6*.

RMN ¹³C (CD₃OD) : δ=193.2 (C-4); 169.3 (-CON); 151.0 (C-2); 140.0 (C-6); 120.1 (C-5); 60.5 (C-2'a et C-2'b); 51.8 (C-1'a); 50.5 (C-α et C-2'a); 17.1 (CH₃-thym).



N,N-di-(2-hydroxyéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide **13**

Le composé **13** est obtenu selon le même mode opératoire que le composé **11**. A partir de 203 mg (0,957 mmol) de composé **3a**, 0,92 ml de diéthanol amine et 6 ml de méthanol . Après purification par chromatographie sur colonne de silice, on obtient le composé **13** avec un rendement de 75% (196 mg).

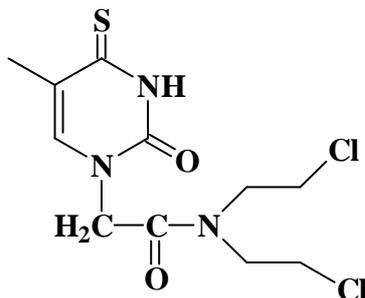
Tf = 190°C.

R_f = 0.52 (éluant E)

RMN ¹H (CD₃OD): voir *tableau III.7*.

RMN ¹³C (CD₃OD) : δ=168.8 (-CON); 166.1 (C-4); 152.4 (C-2); 142.7 (C-6); 110.8 (C-5); 60.1 (C-2'b) ; 59.9 (C-2'a) ; 51.4 (C-1'a); 50.1 (C-2'a); 49.3 (C-α); 12.2 (CH₃-thym).

IV.4.6. CHLORATION DES HYDROXYLES

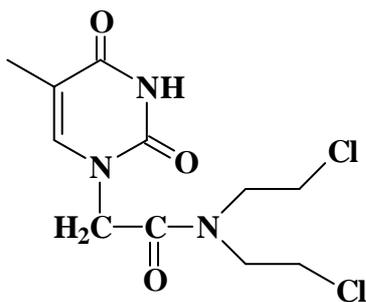


N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(4-thiothymine-1-yl)acétamide 12

Dans un ballon de 25 ml, on introduit 136 mg (0,475 mmol) du composé **11** avec 5 ml de pyridine. Le milieu réactionnel est placé à 0°C sous atmosphère d'argon et 6 éq. (0,22 ml) de chlorure de mésyle lui sont ajoutés à l'aide d'une seringue. Après 2 h de réaction, le ballon est placé dans un bain d'huile à 80°C, sous agitation magnétique et 241 mg (12 éq.) de chlorure de lithium lui sont additionnés. La réaction est arrêtée après 5 h, on rajoute au brut réactionnel 8 ml de toluène, après évaporation, le produit est purifié par chromatographie sur colonne en utilisant un gradient de solvant (dichlorométhane/éthanol), on obtient le composé **12** avec un rendement de 25% (39 mg).

$R_f = 0,45$ (éluant C).

RMN ^1H (CD_3OD): voir *tableau III.6*.



N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide **14**

Le même mode opératoire que celui utilisé pour la synthèse du composé **12** est appliqué pour celle du produit **14**. A partir de 80 mg (0,295 mmol), 0,137 ml de chlorure de mesyle, 5 ml de pyridine et 150 mg de chlorure de lithium. On obtient après purification sur colonne de silice 26 mg (28%) de composé **14**.

$R_f = 0,41$ (éluant C).

RMN ^1H (CD_3OD): voir *tableau III.7*.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'agents antiviraux et anticancéreux.

Dans une première partie, nous avons induit une nouvelle famille d'acyclonucléosides. Lors de cette synthèse, une nouvelle méthode originale de débenzoylation sélective des hydroxyles secondaires de la partie glucidique des nucléosides a été mise au point. La méthode a été généralisée pour être appliquée à d'autres glucides.

Si les résultats des premiers essais d'inhibition de virus sur le virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1) se sont avérés négatifs, nous pensons avoir induit une famille assez large de nouveaux composés dont la modulation des différents paramètres structuraux permettra de parvenir à des molécules biologiquement actives. Il n'est par ailleurs pas exclus que ces composés présentent une activité plus significative sur l'herpès simplex.

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux analogues pyrimidiques du chlorambucil. Ces derniers peuvent réagir comme des agents alkylants en créant un lien chimique fort avec les bases de l'ADN lors de la division cellulaire. Dans cette partie nous avons étudié l'influence de l'activation micro-ondes sur le rendement et la sélectivité de certaines réactions clef de ces synthèses complexes.

Ce travail illustre donc des approches nouvelles quant aux méthodes de déprotection ainsi que des fonctionnalisations régiosélectives associées à l'utilisation de méthodes d'activation non conventionnelles tels que les micro-ondes.

Annexes

ANNEXE 1 - ESSAIS BIOLOGIQUES

Première partie

Les acyclonucléosides ont été évalués pour leur activité anti-HIV-1 sur les cellules CEM-SS et les cellules MT4.

I. LA MULTIPLICATION DE HIV-1 DANS LES CELLULES CEM-SS

La multiplication de HIV-1 (souche LAI) dans les cellules CEM-SS (infectées avec 20 TICD50) est évaluée, après 5 jours de culture, par dosage de la transcriptase inverse dont l'activité traduit la présence de virus relargués dans le surnageant de culture. Les composés testés sont ajoutés après l'adsorption du virus dans le milieu de culture.

L'effet toxique des composés sur les cellules CEM-SS non infectées est apprécié par la réaction colorimétrique (MTT) basée sur la capacité des cellules vivantes à réduire le bromure de 3-(4,5-diméthyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium en formazan après 5 jours d'incubation en présence de différentes concentrations en composé.

Les molécules sont mises en solution, selon les cas, dans le DMSO, le méthanol ou l'eau. Dans les expériences, la concentration du solvant est toujours inférieure ou égale à 1%. La production de virus, dans les cultures incubées en présence de différentes concentrations du composé est comparée à celle des cultures incubées en présence de concentrations en solvant identiques.

II. LA MULTIPLICATION DE HIV-1 DANS LES CELLULES MT4

La multiplication de HIV-1 (souche HTLV IIIB) dans les cellules MT4 (cellules T4 transformées par le HTLV-1) est suivie par l'effet cytopathogène induit par le virus. Les cellules sont infectées avec une dose de HIV-1 produisant, après 5 jours de culture, une diminution du virus dans le milieu de culture à différentes concentrations.

La viabilité des cellules est mesurée par la réaction colorimétrique (MTT). La quantité de formazan produite est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

III. RESULTATS

Tableau III.1: Résultats des tests biologiques

composés	CEM-SS		MT-4	
	EC50a	CC50b	EC50a	CC50b
13	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$
17	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$
21	$> CC_{50}$	$> 7.6. 10^{-1}$	$> CC_{50}$	$> 1. 10^{-1}$
23	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> CC_{50}$	$> 7.8 10^{-2}$
25	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$
27	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$
28	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$
29	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$
30	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$	$> 1. 10^{-1}$

a- Concentration Effective à 50% (mg/mL) ou concentration requise pour inhiber la réplication de HIV-1 de 50%.

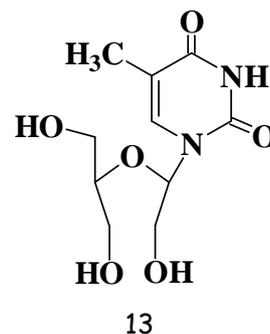
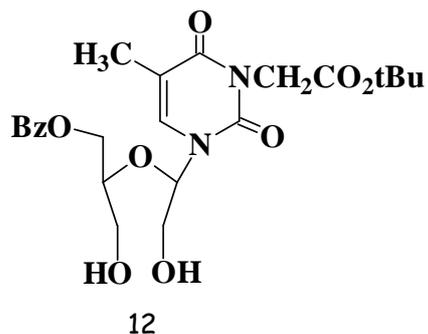
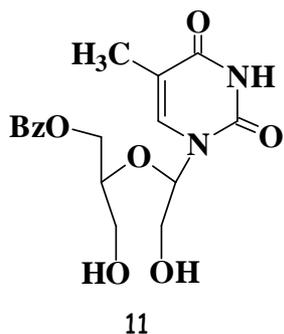
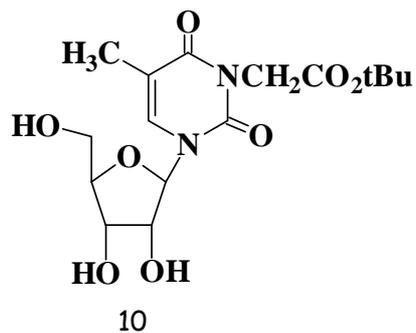
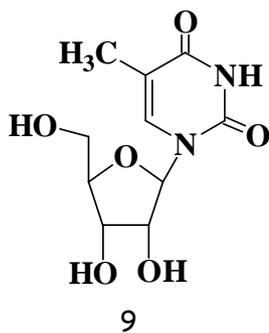
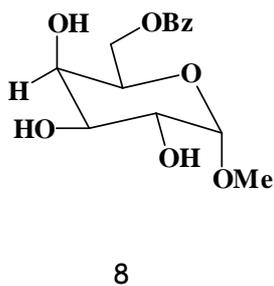
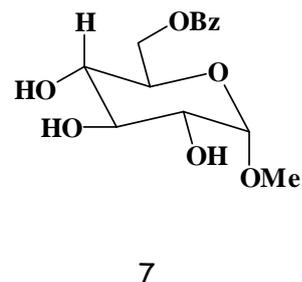
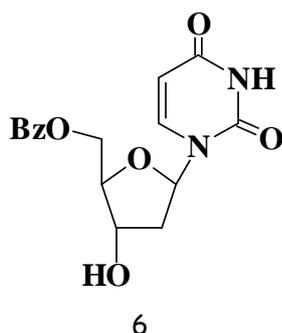
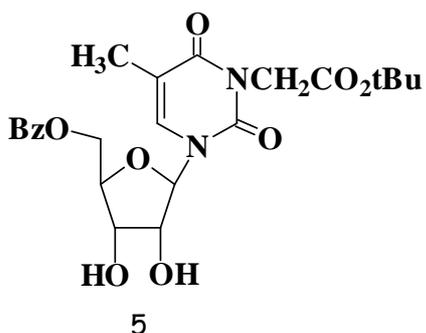
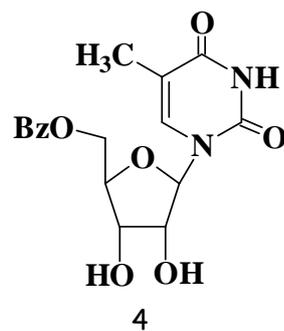
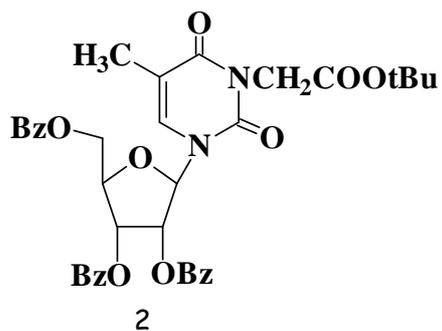
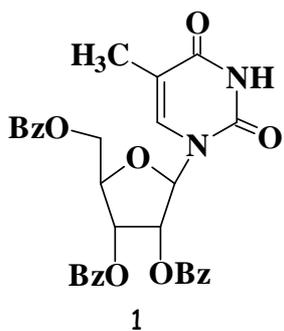
b- Concentration cytotoxique à 50% (mg/mL) ou concentration requise pour réduire la viabilité des cellules infectées de 50%.

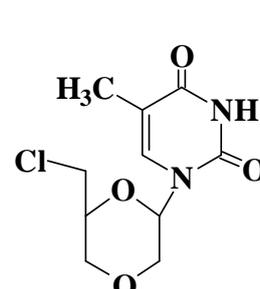
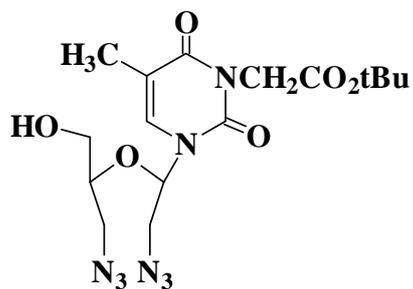
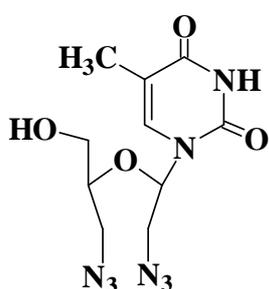
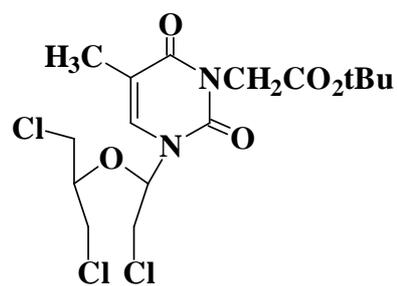
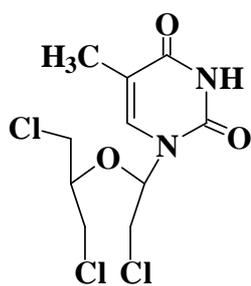
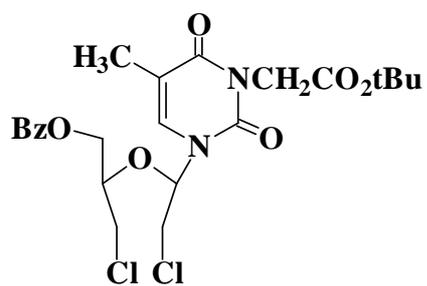
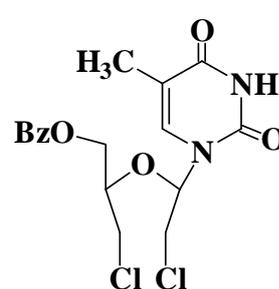
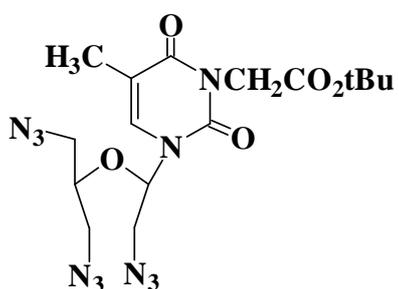
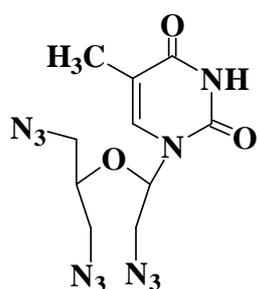
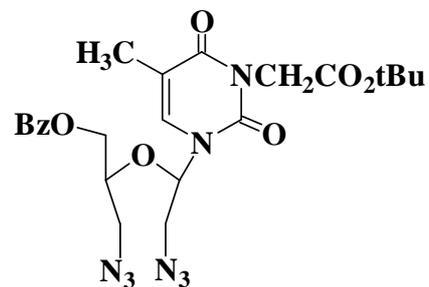
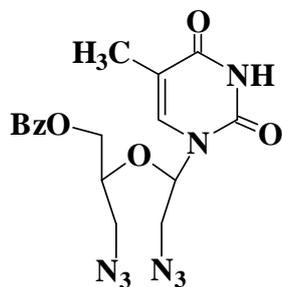
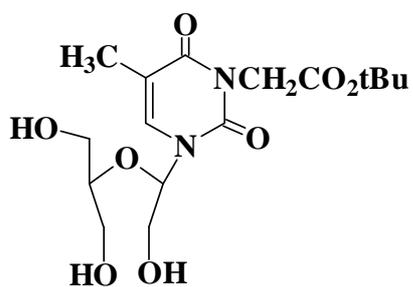
IV. CONCLUSION

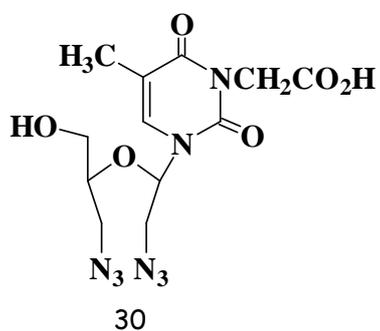
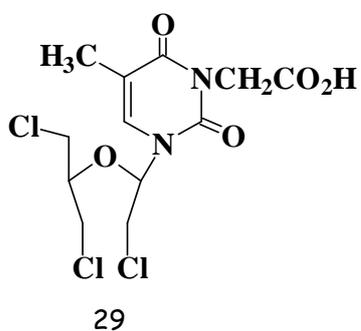
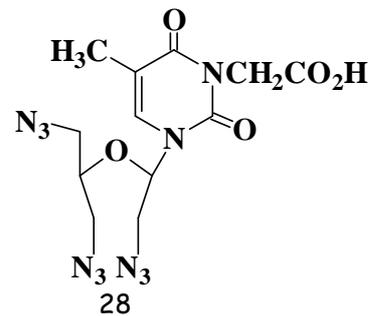
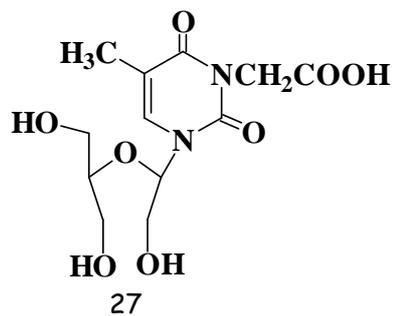
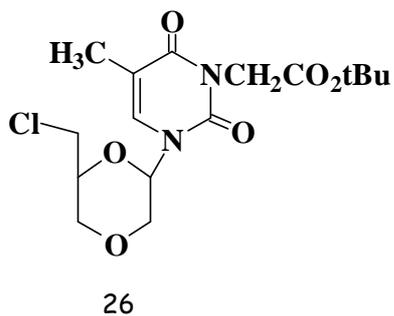
Cette famille d'acyclonucléosides n'a pas montré d'activité biologique anti-HIV.

ANNEXE 2
STRUCTURES DES COMPOSES SYNTHETISES
AU COURS DE CE TRAVAIL

1^{ère} PARTIE







2^{ème} PARTIE

