



THÈSE DE DOCTORAT

N° d'ordre 2009-24

*présentée à la Faculté des Sciences et Techniques
pour obtenir le grade de*

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Spécialité : Chimie Appliquée-Chimie des Substances Naturelles

par

Romain Lucas

Synthèse d'analogues d'oligonucléotides à visées thérapeutiques

sous la direction du Professeur Rachida Zerrouki
soutenue publiquement le 15 juillet 2009 devant un Jury composé de :

L. Agrofoglio, Professeur, Université d'Orléans	<i>Rapporteur</i>
J. Xie, Professeur, ENS Cachan	<i>Rapporteur</i>
H. Gérard, Maître de conférences, Université Paris VI	<i>Examineur</i>
C. Policar, Professeur, ENS Paris	<i>Examineur</i>
P. Krausz, Professeur, Université de Limoges	<i>Examineur</i>
R. Zerrouki, Professeur, Université de Limoges	<i>Examineur</i>
M. Guilloton, Professeur, Université de Limoges	<i>Invité</i>
C. Zerrouki, Maître de conférences, CNAM, Paris	<i>Invité</i>



THÈSE DE DOCTORAT

N° d'ordre 2009-24

*présentée à la Faculté des Sciences et Techniques
pour obtenir le grade de*

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Spécialité : Chimie Appliquée-Chimie des Substances Naturelles

par

Romain Lucas

Synthèse d'analogues d'oligonucléotides à visées thérapeutiques

sous la direction du Professeur Rachida Zerrouki
soutenue publiquement le 15 juillet 2009 devant un Jury composé de :

L. Agrofoglio, Professeur, Université d'Orléans	<i>Rapporteur</i>
J. Xie, Professeur, ENS Cachan	<i>Rapporteur</i>
H. Gérard, Maître de conférences, Université Paris VI	<i>Examineur</i>
C. Policar, Professeur, ENS Paris	<i>Examineur</i>
P. Krausz, Professeur, Université de Limoges	<i>Examineur</i>
R. Zerrouki, Professeur, Université de Limoges	<i>Examineur</i>
M. Guilloton, Professeur, Université de Limoges	<i>Invité</i>
C. Zerrouki, Maître de conférences, CNAM, Paris	<i>Invité</i>

Ce manuscrit est l'aboutissement de trois années de recherches menées au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'Université de Limoges.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers le Professeur Pierre Krausz qui m'a fait l'honneur de m'accueillir au sein de son laboratoire. Il m'a permis de présenter ce travail, et a accepté d'être le Président du jury de ma thèse. Merci à vous M. Krausz pour m'avoir permis de réaliser ces travaux de recherche, pour lesquels vos conseils, remarques et suggestions ont été un réel enrichissement scientifique. Merci également pour m'avoir conseillé dans mes démarches professionnelles, mais aussi pour tous les jeux de mots que vous m'avez enseignés et qui ont grandement enrichi mon vocabulaire.

Que les Professeurs Joanne Xie et Luigi Agrofolgio trouvent ici l'expression de ma plus haute considération et de ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens aussi à remercier les Professeurs Clotilde Policar, Hélène Gérard, Michel Guilloton et le Docteur Chouki Zerrouki qui ont aussi spontanément accepté de participer à mon jury de soutenance.

Il est de ces rares personnes qui, au delà de leur patience, de leur intelligence et de leur sagesse, savent allier la rigueur de l'encadrement et la communication du plaisir du travail. Mais il est encore plus rare que la dite personne présente un soutien permanent durant n'importe quelle épreuve, des conseils pédagogiques, scientifiques, dans les relations humaines, une passion transmise en un seul regard, un dévouement permanent pour ses étudiants, de l'humour... Cette personne n'est autre que le Professeur Rachida Zerrouki, ma directrice de thèse, que je remercie pour m'avoir encadré durant ces trois années. Tu m'as appris tant de choses, qu'une thèse entière ne suffirait pas pour te remercier.

Je remercie les Professeurs Hélène Gérard et Olivier Parisel. Je leur suis reconnaissant pour m'avoir accueilli très chaleureusement dans le Laboratoire de Chimie Théorique de l'Université Paris VI. Grâce à vous, j'ai pu renouer avec les calculs, et ce, sept ans après le premier stage que j'avais effectué en Laboratoire, sous votre encadrement, et qui m'avait donné goût à la recherche. Merci à Hélène pour m'avoir également aidé lors de la rédaction de la partie concernant la chimie théorique de la thèse, pour sa bonne humeur et son dynamisme permanent.

Un grand merci au Docteur Chouki Zerrouki, pour sa gentillesse, sa patience, mais aussi pour m'avoir permis d'allier physique, chimie organique, humour, et pauses cafés uniques. Merci également à Najla Fourati et Jean-Marie Fournion pour leur accueil au sein du CNAM, pour leurs conseils et leur amabilité sans limites.

Je tiens à remercier le Docteur Yves Champavier, pour son accueil chaleureux perpétuel, et ses interprétations de spectre remarquables.

Je souhaiterais également remercier les Docteurs Vincent Sol et Robert Granet, pour leurs conseils et leur aide, notamment sur l'aboutissement du travail de Master 2 Recherche.

Je remercie tous les membres du LCSN : Vincent Chaleix, Michelle Constantin, Karine Cléries, Valérie, Sylvie, mais aussi tous les biologistes, dont Vincent Gloaguen, Caroline le Morvan, Guy Costa, Philippe Bressolier et Bernard Verneuil.

Un grand merci à Olivier Douteau et Saverio Callea, qui m'ont fait confiance pendant ces années, et qui ont été d'un grand soutien.

Je tiens à remercier tous les doctorants pour les bons moments passés ensemble : Virginie, Carmen, François, Yannick, Géraldine, Florian, Cédric, Loïc, Marc... Je remercie aussi Aline et Naïma, deux personnes précieuses à mes yeux, tant par leur gentillesse, que par le rayon de soleil permanent qu'elles vous transmettent.

Je remercie Cyril et Nicolas, deux amis qui sont toujours là lorsque l'on a besoin d'eux.

Je tiens à remercier évidemment Karine Teste, ma coloc de labo, pour tous ses conseils, son énergie, son dynamisme, sa bonne humeur, et ses crises de fou rire, qui m'encourageaient dans mes blagues.

Merci aux trois Master 2 Benjamin, Pierre-Antoine, et Pierre-Henri. Vous m'avez supporté et soutenu pendant la dernière année de thèse. Chapeau bas en charentaises !!

Merci à Julien, pour tous les fous rires, pour les moments passés au laboratoire, et au sport.

Je souhaite remercier tous mes proches amis, en particulier Jean-Jacques C., Alexandre C., Axel, Mickaël, Marlène, Alexandre L., Marie, pour leur soutien permanent et pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci Claire, pour avoir été là, à mes côtés, pendant ces trois années, pour m'avoir réconforté et soutenu.

Je remercie mes soeurs, véritable socle de confiance, d'amour, d'écoute et de conseils.

Je remercie ma famille et en particulier mes grands parents qui m'ont toujours soutenu.

Je remercie mes parents, mes modèles, pour leurs conseils, leur soutien, leur gentillesse, et pour leur amour.

Abréviations et acronymes

A	Adénine	DME	Diméthyléther
Ac	Acétyle	DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
ADN	Acide désoxyribonucléique	DMSO	Diméthylsulfoxyde
<i>Ar</i>	Aryle	E	Electrophile
<i>ar</i>	Aromatique	éq.	Equivalent
ARN	Acide ribonucléique	Et	Ethyle
ARNm	Acide ribonucléique messager	EP	Ether de pétrole
		G	Guanine
Asc. Na	Ascorbate de sodium	HEPES	"2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine]ethanesulfonic acid"
AZT	3'-Azido-3'-désoxythymidine		
B3LYP	"3-Parameter hybrid Becke exchange/Lee-Yang-Parr correlation functional"	h	Heure
<i>t</i> -Bu	<i>Tert</i> -butyle	HMBC	"Heteronuclear multiple bond correlation"
C	Cytosine	HRMS	"High-resolution mass spectrometry"
<i>i</i> -C- <i>j</i>	Ether-couronne (<i>i</i> -couronne- <i>j</i>)	Hz	Hertz
CCM	Chromatographie sur couche mince	IES	Ionisation par électrospray
Cg-DNA	"Click generated DNA"	IL	"Ionic liquid"
Coll.	Collaborateurs	IR	Infrarouge
Cp*	Pentaméthylcyclopentadiényle	<i>IR</i>	Intermédiaire réactionnel
		IUPAC	"International Union of Pure and Applied Chemistry"
CuAAC	"Copper(I)-catalysed azide-alkyne cycloaddition"	J	Constante de couplage (spectroscopie de RMN)
d ^{<i>i</i>}	Deutérié <i>i</i> fois	K	Kelvin
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide	L	Ligand
DCU	Dicyclohexylurée	LANL2DZ	"Los alamos national laboratory 2-double-z"
DFT	"Density functional theory"	litt.	Littérature
DIFO	"Difluorinated cyclooctyne"	LNA	"Locked nucleic acid"
DIPEA	Diisopropyléthylamine	Me	Méthyle
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Diméthylamino)pyridine	MO	Micro-ondes
		min	Minute
		<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge

N.O.	Nombre d'oxydation
Ph	Phényle
PNA	"Peptide nucleic acid"
ppm	Partie(s) par million
PPTS	"Pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate"
Py	Pyridine
R ⁱ	Substituant chimique
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RSV	"Rous sarcoma virus"
SAW	"Surface acoustic wave"
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
S _N 2	Substitution nucléophile bimoléculaire
T	Thymine
TA	Température ambiante
TBAF	"Tetrabutylammonium fluoride"
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyle
TBTA	Tris-(benzyltriazolyméthyl)amine
TEC	"Thiol-ene coupling"
Tf	Température de fusion
THF	Tétrahydrofurane
TID	Transducteurs interdigitaux
Ts	<i>p</i> -Toluènesulfonyle (tosyle)
TS	Etat de transition
U	Uracile
US	Ultra-sons
UV	Ultra-violet
VIH-1	Virus d'immunodéficience humaine 1
VIH-2	Virus d'immunodéficience humaine 2
vis	Visible

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
<hr/>	
I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
<hr/>	
Chapitre 1 : Biochimie, acides nucléiques et thérapies	5
1.1. Les acides nucléiques	5
1.1.1. Définitions et structures	6
1.1.1.1. Les nucléosides	6
1.1.1.2. Les nucléotides	7
1.1.1.3. Les oligonucléotides/polynucléotides	7
1.1.2. L'ADN et l'ARN	8
1.2. Oligonucléotides : agents thérapeutiques	9
1.2.1. Virus et rétrovirus	9
1.2.1.1. Structure	10
1.2.1.2. Le virus du SIDA	10
1.2.2. Des agents antiviraux conventionnels vers les analogues d'oligonucléotides	11
1.2.3. Les analogues d'oligonucléotides à visées thérapeutiques	12
Chapitre 2 : "Click chemistry"	15
2.1. La genèse de la "click chemistry"	15
2.2. Les cycloadditions 1,3-dipolaires : cas particulier des azotures et alcynes	17
2.3. Azotures et alcynes vrais : quand le cuivre(I) y met son grain de sel...	18
2.4. Le lien triazole	21
Chapitre 3 : Objet du travail	25
<hr/>	
II ALKYLATION REGIOSELECTIVE DE NUCLEOSIDES	27
<hr/>	
Chapitre 1 : Mise au point de l'alkylation régiosélective de nucléosides	29
1.1. Nécessité de réactions régiosélectives	29
1.2. Alkylation régiosélective de la thymidine	30
1.2.1. Alkylation régiosélective	30

1.2.1.1.	Préparation de la 5'- <i>O-tert</i> -butyldiméthylsilylthymidine .	31
1.2.1.2.	Allylation de la 5'- <i>O-tert</i> -butyldiméthylsilylthymidine . .	31
1.2.1.3.	Alkylation utilisant d'autres agents alkylants	35
Chapitre 2 : Etude de l'origine de la régiosélectivité		37
2.1.	Influence du solvant	37
2.2.	Etude de l'intermédiaire réactionnel	39
2.2.1.	Chélation ?	39
2.2.1.1.	Etude de l'effet des éthers-couronne sur la réaction de propargylation	39
2.2.1.2.	Caractérisation des composés propargylés	41
2.2.1.3.	Validation de la régiosélectivité avec la 2'-désoxyuridine .	43
2.2.2.	Etude de la participation de l'oxygène en position 5'	45
2.2.2.1.	Protection des positions 3' de la thymidine et de la 2'- <i>O</i> -désoxyuridine	46
2.2.2.2.	Propargylation et éther couronne	46
2.2.3.	Proposition de mécanisme	47
Chapitre 3 : Etude théorique de l'alkylation régiosélective de nucléosides pyrimidiques		49
3.1.	Nécessité de modèles	49
3.1.1.	Choix d'une approche quantique	49
3.1.2.	Simplification des substrats de départ	50
3.1.3.	Validation du petit modèle	51
3.1.4.	Solvants explicites et implicites	52
3.2.	Modélisation de la réactivité sur le petit modèle	52
3.2.1.	Réactivité sur le petit modèle en phase gaz	52
3.2.2.	Modélisation implicite de la solvataion	54
3.2.2.1.	Structure de l'intermédiaire déprotoné	54
3.2.2.2.	Modification du chemin réactionnel	55
3.2.3.	Modélisation explicite du solvant	57
3.2.3.1.	Prise en compte de l'échange solvant/MeBr	57
3.2.3.2.	Evaluation du nombre de molécules de solvant sur Na ⁺ .	58
3.2.3.3.	Evaluation du nombre de molécules de solvant sur [MNa] .	59
3.3.	Chélation de Na ⁺ par le sucre : utilisation du grand système	59
3.3.1.	Chélation en phase gaz	60
3.3.2.	Chélation en solvataion implicite	60
3.4.	Conclusion	61

III SYNTHÈSE D'UNE NOUVELLE FAMILLE D'ANALOGUES D'OLIGONUCLEOTIDES	63
Chapitre 1 : Synthèse d'oligonucléosides	65
1.1. Synthèse d'un dimère de thymidine par "click chemistry"	65
1.1.1. Rétrosynthèse du dimère de thymidine	65
1.1.2. Résultats et discussions	66
1.1.2.1. Méthodes d'halogénations sélectives	66
1.1.2.2. Nouvelle méthode de chloration sélective	67
1.1.2.3. Proposition de mécanisme	69
1.1.2.4. Préparation de la 5'-azido-5'-désoxythymidine	70
1.1.2.5. Préparation de la thymidine chlorée et propargylée	71
1.1.2.6. Nouvelle voie de préparation du précurseur chloré et pro- pargylé	72
1.1.3. Synthèse du dimère de thymidine	73
1.1.3.1. Rétrosynthèse de la dithymidine silylée	73
1.1.3.2. Résultats et discussions	74
1.1.3.3. Essais de fonctionnalisation : vers le trimère...	77
1.2. Nouvelle stratégie de synthèse	77
1.2.1. Résultats et discussions	78
1.2.1.1. Synthèse des précurseurs tosylé-propargylé et azidé	78
1.2.1.2. Synthèse du dinucléoside tosylé	80
1.2.1.3. Vers un pentanucléoside	81
Chapitre 2 : Synthèse sur support solide	85
2.1. Stratégie de synthèse	85
2.2. Synthèse d'oligothymidines sur support solide	86
2.2.1. Synthèse du précurseur succinylé	86
2.2.2. Fixation de la 3'-O-succinyl-5'-O-tosylthymidine sur support solide	87
2.2.3. Synthèse du tétramère de thymidine	88
Chapitre 3 : Tests de complémentarité des oligonucléosides	91
3.1. La technologie des ondes acoustiques de surface (SAW : "Surface acoustic wave"). Objectif : complémentarité	91
3.2. Conception des SAW biosenseurs	92
3.3. Détection d'hybridation d'oligonucléotides naturels	94
3.4. Tests de complémentarité ADN naturels/Cg-DNA	95
CONCLUSION GENERALE	99

IV PARTIE EXPERIMENTALE	101
Chapitre 1 : Matériel	103
1.1. Réactifs et solvants	103
1.2. Chromatographie	105
1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique	105
1.2.2. Chromatographie sur couche mince préparative	105
1.2.3. Chromatographie sur colonne	105
1.2.4. Chromatographie éclair automatisée	105
1.3. Analyses	105
1.3.1. Température de fusion	105
1.3.2. Pouvoir rotatoire	106
1.3.3. Spectroscopie de RMN	106
1.3.4. Spectroscopie infrarouge	106
1.3.5. Spectroscopie UV-vis	106
1.3.6. Spectrométrie de masse	106
1.4. Ultra-sons et micro-ondes	107
1.4.1. Cuve à ultra-sons	107
1.4.2. Micro-ondes	107
Chapitre 2 : Synthèse	109
2.1. Conventions	109
2.1.1. Nomenclature	109
2.1.2. Modes opératoires	109
2.2. Produits/Synthèses/Caractéristiques	109
BIBLIOGRAPHIE	167
ANNEXES	173

Introduction générale

Les codes font partie intégrante de notre vie : codes bancaires, codes juridiques, passeports biométriques etc. Il en est un qui nous décrit parfaitement, comme individu unique, le code génétique. Ce dernier peut être parfois altéré, notamment par des virus, qui le modifient et provoquent des dommages importants au niveau de l'ADN et de l'ARN. La conception de médicaments permettant de cibler spécifiquement ces acides nucléiques défectueux est alors d'un grand secours. Plusieurs thérapies ont été mises en place, utilisant de courtes séquences d'oligonucléotides, afin d'inhiber la multiplication des virus. Parmi celles existantes, une a particulièrement attiré notre attention, la thérapie antisens. L'objectif de celle-ci est d'administrer des oligonucléotides (ou analogues), spécifiques d'une séquence d'ARN viral, empêchant sa traduction ultérieure, et donc la propagation du virus.

Dans le cadre du programme de recherche sur les analogues d'oligonucléotides du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'Université de Limoges, nous décrivons les premiers résultats obtenus pour la synthèse d'un analogue d'oligonucléotides, possédant comme lien internucléosidique une unité 1,2,3-triazolique. L'inertie de la fonction triazole vis-à-vis des dégradations métaboliques et l'absence de toxicité devraient permettre de générer de nouveaux analogues d'intérêts thérapeutiques.

L'un des précurseurs de la synthèse de cet analogue d'oligonucléotides nécessite une fonctionnalisation régiosélective de la thymidine. Dans un premier temps une étude fondamentale de l'alkylation régiosélective de deux nucléosides pyrimidiques est décrite, accompagnée de calculs théoriques (DFT), dont les premiers résultats seront présentés.

Suite à cette étude nous avons abordé la réaction de couplage, utilisant la "click chemistry". Différents systèmes (activation, catalyseur de cuivre (I), solvant) ont été utilisés afin d'optimiser la cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne terminal et un azoture, dans le cas du couplage de deux thymidines fonctionnalisées. Nous avons ensuite synthétisé un di-, tri-, tétra- et pentanucléoside grâce à l'activation par irradiations micro-ondes.

Une étude de la complémentarité des di- tri- et tétramères synthétisés a été mise en place en utilisant des biocapteurs exploitant les ondes acoustiques de surfaces.

Enfin nous avons mis au point la synthèse de la tétrathymidine sur support solide.

Première partie

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Biochimie, acides nucléiques et thérapies

Les thérapies utilisant de courtes séquences d'oligonucléotides ont vu le jour en 1978.^{1,2} Zamecnik et Stephenson ont montré, par l'intermédiaire de courtes séquences d'ADN, la possibilité d'inhiber spécifiquement la réplication du virus de sarcome de Rous (RSV). Différentes stratégies thérapeutiques mettant en jeu les analogues d'oligonucléotides se sont alors mises en place. Afin de comprendre le rôle de ces dernières, il convient de décrire de manière approfondie les acides nucléiques.

1.1 Les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des composés connus des chimistes depuis le XIX^e siècle. Leur nom provient des noyaux des cellules dont ils étaient isolés initialement. Il a été démontré depuis, leur existence dans le cytoplasme et dans d'autres organites cellulaires (mitochondries). A la fin du XIX^e siècle, leur constitution était élucidée : les acides nucléiques possèdent de longues chaînes polymériques de nucléotides, comportant des sucres, des bases azotées et de l'acide phosphorique. Il a fallu attendre la première moitié du XX^e siècle pour différencier, l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN). La preuve expérimentale que les acides nucléiques contiennent l'information génétique transmissible de génération en génération a été établie dans les années 40. Ils jouent ainsi un rôle fondamental dans la vie et la prolifération des cellules animales, végétales et microbiennes. Les acides nucléiques renferment, en effet, dans la séquence de leurs nucléotides, le patrimoine héréditaire de chaque individu et le code génétique permettant à chaque cellule "mère", de se diviser en deux cellules "filles", en tous points identiques.

Nous nous proposons tout d'abord de décrire la structure des nucléosides et nucléotides, éléments constitutifs des acides nucléiques à savoir l'ADN et l'ARN.

1.1.1 Définitions et structures

1.1.1.1 Les nucléosides

Les nucléosides sont des molécules d'origine naturelle, constituants de base des acides nucléiques. Ils résultent de l'union d'une base azotée (purique ou pyrimidique) et d'une partie glucidique (le ribose pour l'ARN, le désoxyribose pour l'ADN) reliées par une liaison carbone-azote (Figure 1.1).

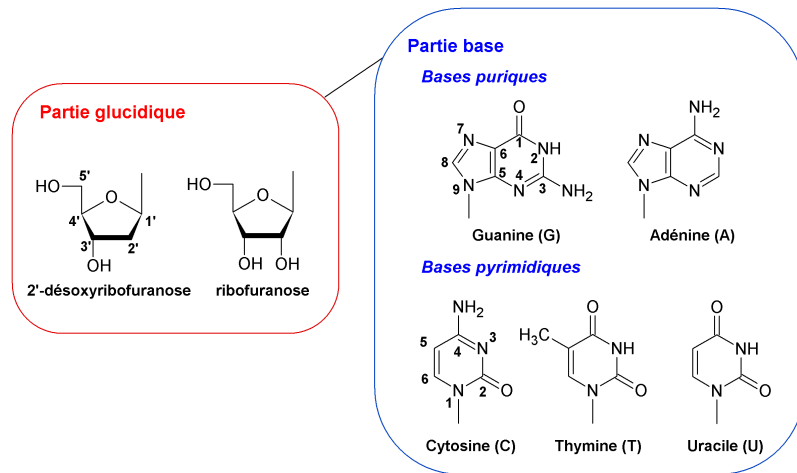


FIGURE 1.1 : Structure générale d'un nucléoside

Les nucléosides ont un rôle primordial dans le domaine du vivant ainsi que les nombreuses interactions qui existent avec les molécules biologiques (protéines, glycosides etc.) (Figure 1.2).*

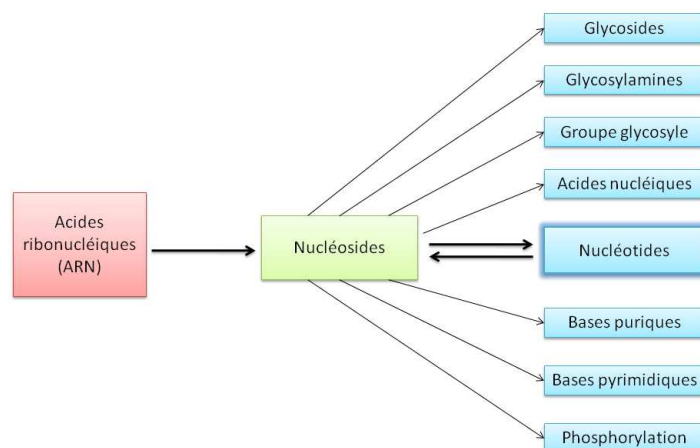


FIGURE 1.2 : Niveau 1 sur 3 d'arborescence des nucléosides (IUPAC)

*, <http://goldbook.iupac.org/N04253.html>

1.1.1.2 Les nucléotides

Les nucléotides sont formés par phosphorylation des nucléosides. On appelle nucléotide chaque motif complet, comportant un groupe phosphate, une unité glucidique et une base azotée (Figure 1.3).

La liaison entre l'hydroxyle en position 5' de l'ose et l'acide phosphorique (H_3PO_4) est une liaison ester. Si un autre nucléotide vient, par l'intermédiaire d'un hydroxyle libre de l'acide phosphorique, se fixer à l'hydroxyle de la position 3' cette fois, une nouvelle réaction d'estérification mènera au dinucléotide correspondant.

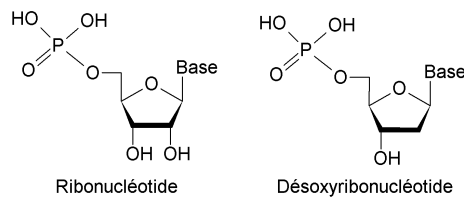


FIGURE 1.3 : Ribo- et déoxyribonucléotide

La reproduction de cette étape n fois, pour n suffisamment grand, conduira alors à un polymère de nucléotides ou polynucléotide.

1.1.1.3 Les oligonucléotides/polynucléotides

Les oligonucléotides ou polynucléotides sont des macromolécules constituées par l'enchaînement de plusieurs nucléosides, reliés entre eux par une liaison 3',5'-phosphodiester (Figure 1.4).

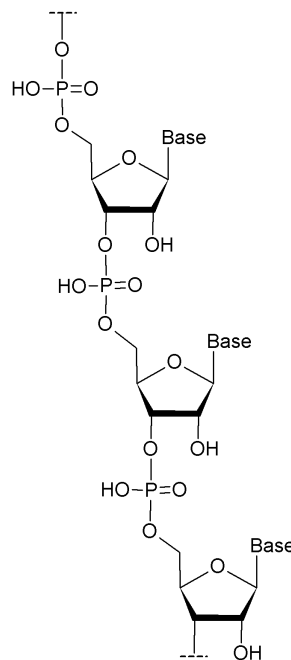


FIGURE 1.4 : Structure d'oligonucléotides

L'acide phosphorique ayant engagé deux fonctions acides dans les liaisons dites "phosphodiester", la troisième fonction acide de H_3PO_4 reste libre et induit donc les propriétés acides des "acides" nucléiques ADN et ARN.

1.1.2 L'ADN et l'ARN

La structure spatiale de l'ADN a été élucidée pour la première fois en 1953 par J. D. Watson et F. H. C. Crick.^{3,4}, à partir de l'observation des travaux de R. E. Franklin et M. Wilkins.^{5,6} Ils ont montré que l'ADN est un haut polymère linéaire formé de deux brins hélicoïdaux, antiparallèles et complémentaires, reliés par des liaisons hydrogène (Figure 1.5). Ces observations ont posé les bases de la biochimie génétique et de la biologie moléculaire moderne.

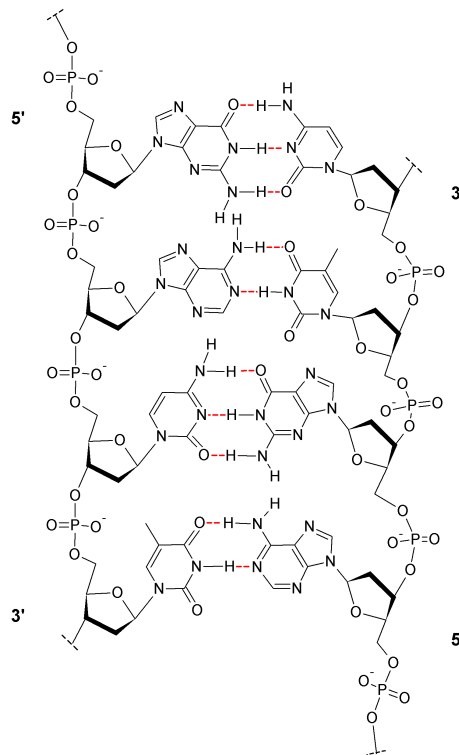


FIGURE 1.5 : Structure de l'ADN

Les deux squelettes pentose-phosphate se trouvent sur les bordures extérieures 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 la double hélice, l'adénine s'associe toujours à la thymine, et la guanine à la cytosine. Ceci a pour conséquence d'orienter en sens opposé les deux chaînes polynucléotidiques (brins antiparallèles). La séquence des acides aminés de chaque protéine, et la séquence nucléotidique de chaque molécule d'ARN dans une cellule, sont déterminées par celle de l'ADN cellulaire. Un segment d'ADN qui contient l'information nécessaire pour la synthèse d'un produit biologique fonctionnel est appelé gène. Afin de propager l'information génétique dans toutes les cellules, la nature permet la réplication de la molécule d'ADN. La réplication consiste

à copier la totalité de l'information contenue dans le génome d'un organisme vivant. Le processus se déroule selon un mode semi-conservatif, c'est-à-dire que la molécule mère donne un de ses brins à chaque molécule fille, qui est complété par une chaîne nouvellement synthétisée. Le processus de réplication suppose une séparation des deux brins par la rupture des liaisons hydrogène entre les bases (G/C et A/T) (Figure 1.6).[†]

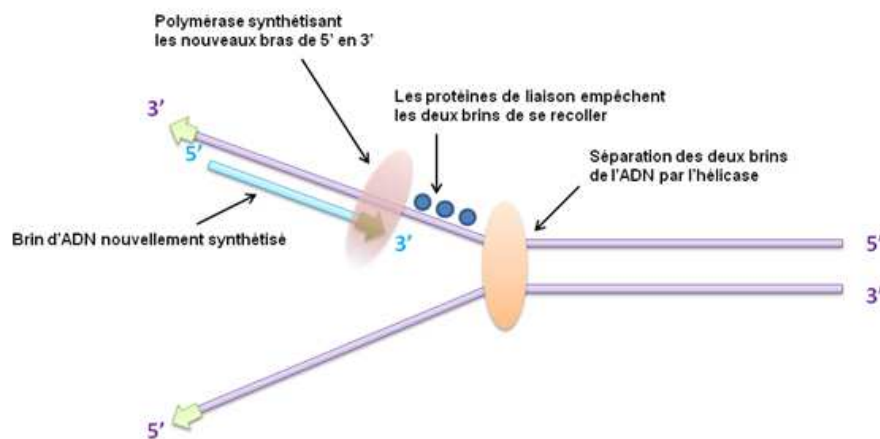


FIGURE 1.6 : Réplication de l'ADN

L'expression de l'information génétique contenue dans un segment d'ADN passe toujours par la formation d'une molécule d'ARN : l'ARN messager (ARNm). Au cours d'un phénomène appelé transcription, un système enzymatique (l'ARN polymérase) convertit l'information génétique d'un segment d'ADN en un brin d'ARN, dont la séquence est complémentaire de celle d'un des brins de l'ADN. L'ARNm, obtenu après maturation de l'ARN pré-messager dans le noyau, est ensuite exporté dans le cytosol pour la traduction ultérieure, qui permettra la construction de chaînes polypeptidiques aboutissant à la synthèse de protéines. Toutefois, le chemin inverse, passage de l'ARNm du cytosol vers le noyau, existe aussi et se trouve souvent associé à la pénétration d'un virus dans la cellule.

1.2 Oligonucléotides : agents thérapeutiques

Avant d'entrer dans la description des différents agents thérapeutiques existant et surtout faisant intervenir les oligonucléotides modifiés (analogues d'oligonucléotides), il convient de présenter les agents infectieux qu'ils combattent : les virus et rétrovirus.

1.2.1 Virus et rétrovirus

Les virus sont à l'origine de nombreuses maladies chez l'homme. Ce sont des agents infectieux plus petits que les bactéries, qui possèdent les acides nucléiques les plus courts (quelques milliers à quelques dizaines de milliers de nucléotides). Les rétrovirus sont,

[†]. http://www.bio.espci.fr/scolarite/c_BIO/mol/mol12.htm

quant à eux, des virus à ARN qui, pour se multiplier, devront s'intégrer sous forme d'ADN proviral, le provirus, dans celui de la cellule hôte, pour ensuite s'exprimer pendant toute la vie active de la cellule. Ils doivent ainsi parasiter une cellule hôte en y introduisant leur matériel génétique. Ils utilisent ensuite la machinerie cellulaire de cette cellule, afin de produire leurs propres protéines et ainsi se multiplier. La figure 1.7 représente le cycle de reproduction du rétrovirus.

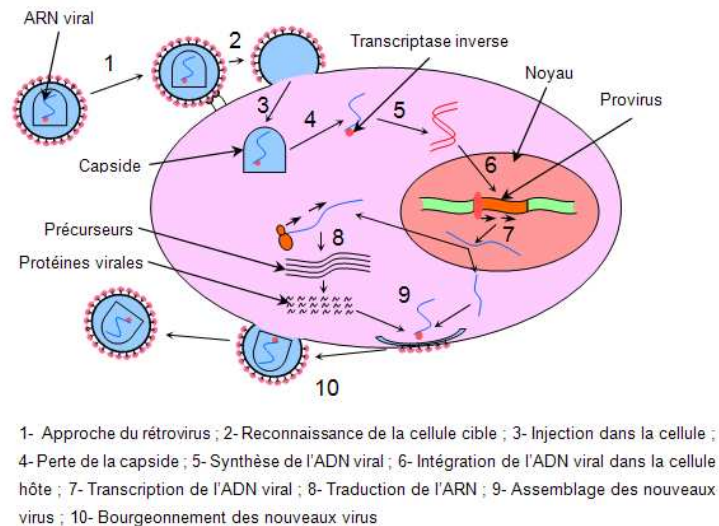


FIGURE 1.7 : Fonctionnement d'un rétrovirus

1.2.1.1 Structure

La structure des virus est très simple. Ils sont constitués de particules nommées virions possédant :

- une molécule d'acide nucléique de faible poids moléculaire, qui est soit de l'ADN, soit de l'ARN. On peut alors distinguer :
 - les virus à ADN tel que le virus de l'hépatite B ;
 - les virus à ARN, comme le virus de l'hépatite A, de la poliomyélite ou de la grippe.
- une coque protéique ou capsid qui protège l'acide nucléique contre les attaques enzymatiques ;
- parfois une enveloppe protéique (cas notamment des rétrovirus).

Parmi les différents virus existants, notre attention s'est portée sur le VIH-1 (virus d'immunodéficience humaine 1), qui est à l'origine du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), maladie décrite pour la première fois en 1981.

1.2.1.2 Le virus du SIDA

Deux virus sont en fait responsables du sida, le VIH-1 et le VIH-2. Ils présentent une structure très similaire et font partie de la famille des rétrovirus. Comme un ARN simple

brin ne peut pas s'intégrer dans un ADN double brin, l'ARN doit obligatoirement être transformé en ADN. Un enzyme spécifique viral, la rétrotranscriptase inverse (RT), découverte par H. M. Temin et D. Baltimore,⁷ catalyse la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire de l'ARN viral. Ce même enzyme dégrade le brin d'ARN de l'hybride ARN-ADN ainsi formé et le remplace par le brin d'ADN complémentaire. La double hélice d'ADN est alors incorporée dans le génome de la cellule-hôte. Dans certaines conditions, un tel génome viral intégré et dormant devient actif, puis est transcrit pour donner naissance à de nouveaux virus. Une régulation des gènes s'avère donc nécessaire. Elle peut être effectuée notamment grâce à des oligonucléotides spécifiques.

1.2.2 Des agents antiviraux conventionnels vers les analogues d'oligonucléotides

Les agents antiviraux conventionnels ont pour cible en général la modulation de l'activité des protéines. Par exemple l'interféron augmente l'expression des protéines cellulaires à action antivirale. L'activité des protéines virales peut aussi être une cible. C'est le cas notamment des analogues de nucléosides tels que l'AZT (3'-azido-3'-désoxythymidine) qui interfère avec l'activité des ARN polymérases virales. Toutefois, le manque de spécificité de ces agents thérapeutiques a conduit les chercheurs à se tourner, depuis une trentaine d'années, vers l'emploi de séquences nucléotidiques. Plusieurs stratégies d'utilisation des oligonucléotides ont été envisagées (Figure 1.8).⁸

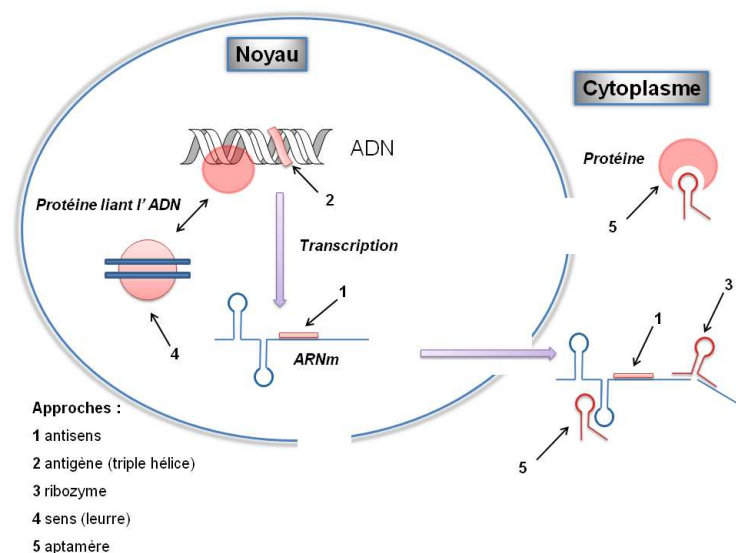


FIGURE 1.8 : Stratégies d'utilisation d'oligonucléotides en tant qu'agents thérapeutiques

D'une part les séquences nucléotidiques peuvent cibler l'ADN en double brin (approche antigène, 2 sur la figure 1.8) grâce à la formation d'une triple hélice,⁹ et ce afin d'inhiber la transcription du gène. La formation de la triple hélice se fait par fixation d'un troisième brin oligodésoxyribonucléotidique sur l'ADN. Cette fixation est rendue possible par des liaisons hydrogène, par appariements de base de type Hoogsteen.¹⁰

D'autre part les oligonucléotides peuvent cibler l'ARN en simple brin. C'est l'approche "antisens".¹¹ Un oligonucléotide spécifique du gène ou de l'ARN se lie alors à l'ARNm, empêchant sa traduction (approche antisens, 1 sur la figure 1.8).¹² Dans certains cas l'agent de liaison peut être un ribozyme, molécule d'ARN catalytique, spécifiquement conçue pour couper l'ARN transcrit (approche ribozyme, 3 sur la figure 1.8).

Les séquences nucléotidiques peuvent aussi cibler certaines protéines si ces dernières possèdent une affinité spécifique pour une séquence d'ADN ou d'ARN (approche sens ou leurre, 4 sur la figure 1.8).^{13,14}

Enfin les oligonucléotides peuvent être sélectionnés sur la base d'une affinité structurale envers une cible protéique¹⁵ ou un ARN¹⁶ (approche aptamère, 5 sur la figure 1.8).

Les différentes possibilités d'utilisation des oligonucléotides naturels en tant qu'agents thérapeutiques s'avèrent donc prometteuses. Toutefois des problèmes majeurs dus aux dégradations dans les fluides biologiques ont conduit à la conception d'analogues d'oligonucléotides, présentant des modifications chimiques au niveau de la liaison phosphodiester, du sucre et de la base.

1.2.3 Les analogues d'oligonucléotides à visées thérapeutiques

Les oligonucléotides à visées thérapeutiques sont de courtes séquences de nucléotides (10-30 nucléotides), dont la stabilité est renforcée en remplaçant les liaisons phosphodiester par des liaisons plus résistantes, leur donnant un temps de demi-vie beaucoup plus long. En effet, ils sont rapidement dégradés *in vivo* par des enzymes, les exonucléases, puis sont éliminés de la circulation par filtration rénale. C'est dans le but d'augmenter la résistance de ces liaisons vis-à-vis de ces enzymes, que des modifications de la liaison internucléosidique phosphodiester ont été réalisées (Figure 1.9).

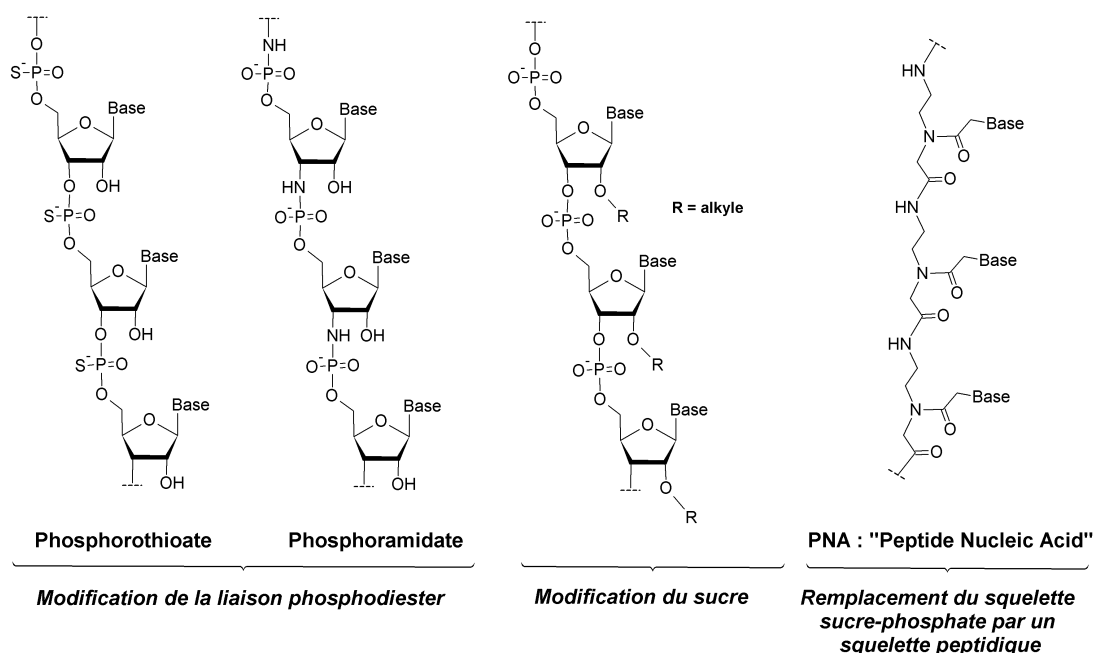


FIGURE 1.9 : Exemples de modifications d'oligonucléotides

Parmi les nombreuses modifications permettant de synthétiser des analogues d'oligonucléotides, nous pouvons citer le remplacement du groupe phosphodiester par le phosphorothioate, le phosphoramidate, ou par des liens internucléosidiques zwitterioniques.^{17,18} La partie sucre peut également être modifiée, par ajout en position 2' d'un groupe alkyle ou un substituant 2-aminoéthyle afin de permettre une meilleure stabilisation lors de la formation de triple hélice.^{19,20} Des travaux ont été effectués sur le changement de base. Les bases naturelles ont été substituées par des groupes de type naphthalène,²¹ ou par une unité cationique morpholinoamidine.²² Enfin, parmi les exemples de modifications, on peut citer les "peptide nucleic acids" (PNA), où le squelette sucre-phosphate est remplacé par un squelette peptidique, mais aussi les "locked nucleic acids" (LNA), analogues d'oligonucléotides qui possèdent au moins un monomère nucléosidique avec un furanose bicyclique, par jonction des positions 2' et 4' à l'aide d'un pont méthylène (Figure 1.10).²³⁻²⁵

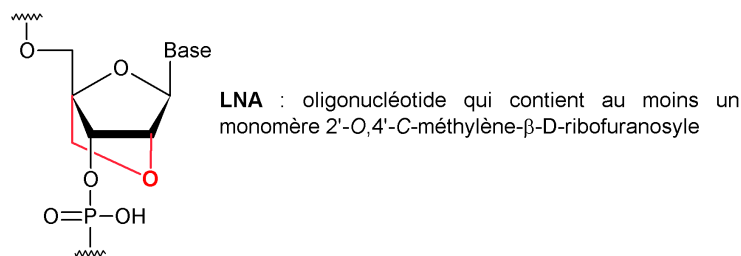


FIGURE 1.10 : Structure chimique et définition des LNA

Ces deux derniers exemples ont montré de nombreuses applications dans des buts diagnostiques et thérapeutiques, grâce à l'affinité surprenante de ces oligomères lors

de l'hybridation avec des ARN simples brins complémentaires, et des ADN simples ou doubles brins complémentaires.

La synthèse de polymères de nucléosides nécessite plusieurs étapes réactionnelles. C'est pour cela que nous nous sommes intéressés à l'utilisation de réactions rapides pouvant aboutir de manière aisée et avec de bons rendements, à des couplages internucléosidiques efficaces. La réaction qui a attiré toute notre attention a été la cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne terminal et un azoture, catalysée par le cuivre au nombre d'oxydation I.

Les oligomères souhaités possèdent ainsi, comme lien internucléosidique, une unité triazolique (Figure 1.11).

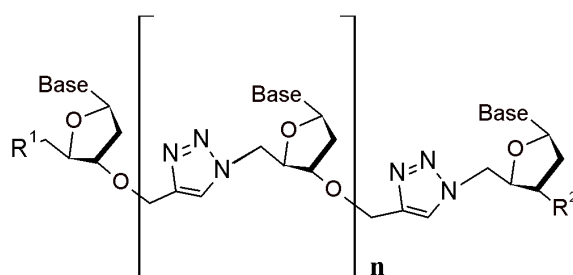


FIGURE 1.11 : Oligonucléosides possédant une unité triazolique en tant qu'espaceur

La réaction de cycloaddition utilisée, dont la version catalysée a été découverte récemment, fait partie d'une grande famille de réactions associée à un concept novateur : la "click chemistry".^{26,27}

Chapitre 2

"Click chemistry"

La synthèse d'édifices complexes, tels que les analogues d'oligonucléotides, nécessite des réactions avec des rendements élevés associés à des temps très courts, ainsi que des modes opératoires simples, minimisant les étapes de purifications. Il ne restait plus qu'à associer un concept à ce type de réactions...

2.1 La genèse de la "click chemistry"

Lors de la synthèse d'un édifice, d'une "charpente" moléculaire, une des étapes clés en chimie organique est la création de liaisons carbone-carbone ou carbone-hétéroatome. Les électrons vont ainsi cimenter les briques d'atomes pour former le squelette de chaque composé organique. Si l'on examine le fonctionnement de la nature, il apparaît une nette préférence, d'un point de vue énergétique, pour la formation de liaisons C-X-C, avec X un hétéroatome ou groupe d'hétéroatomes (Figure 2.1).

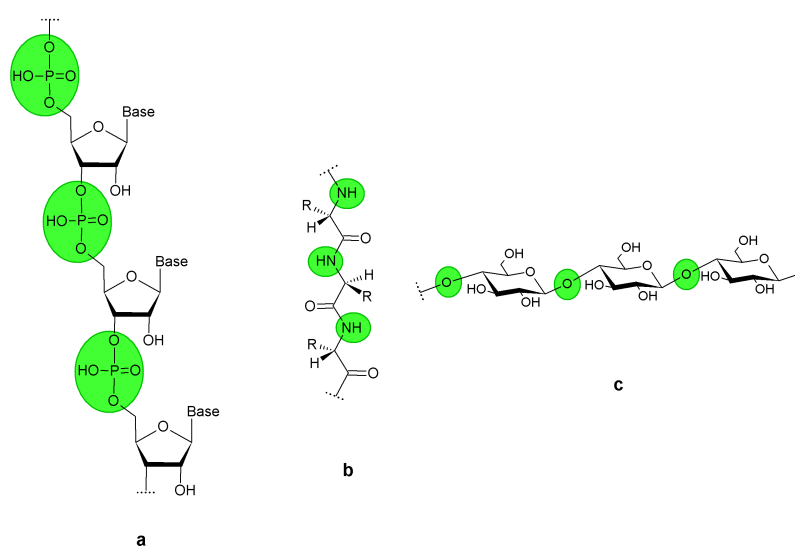


FIGURE 2.1 : Exemples de polymères du vivant possédant un lien hétéroatomique entre chaque unité répétitive : **a** ARN, **b** polypeptide, **c** cellulose

C'est en partie de cette observation que naquit, grâce à K. B. Sharpless et coll. le concept original de "click chemistry" en 2001.²⁶ L'idée maîtresse est de générer rapidement et aisément ("click") des molécules à partir de petites unités organiques fonctionnalisées, telles que des alcynes, et ce avec un lien de type hétéroatomique, sorte de béton armé (Figure 2.2).

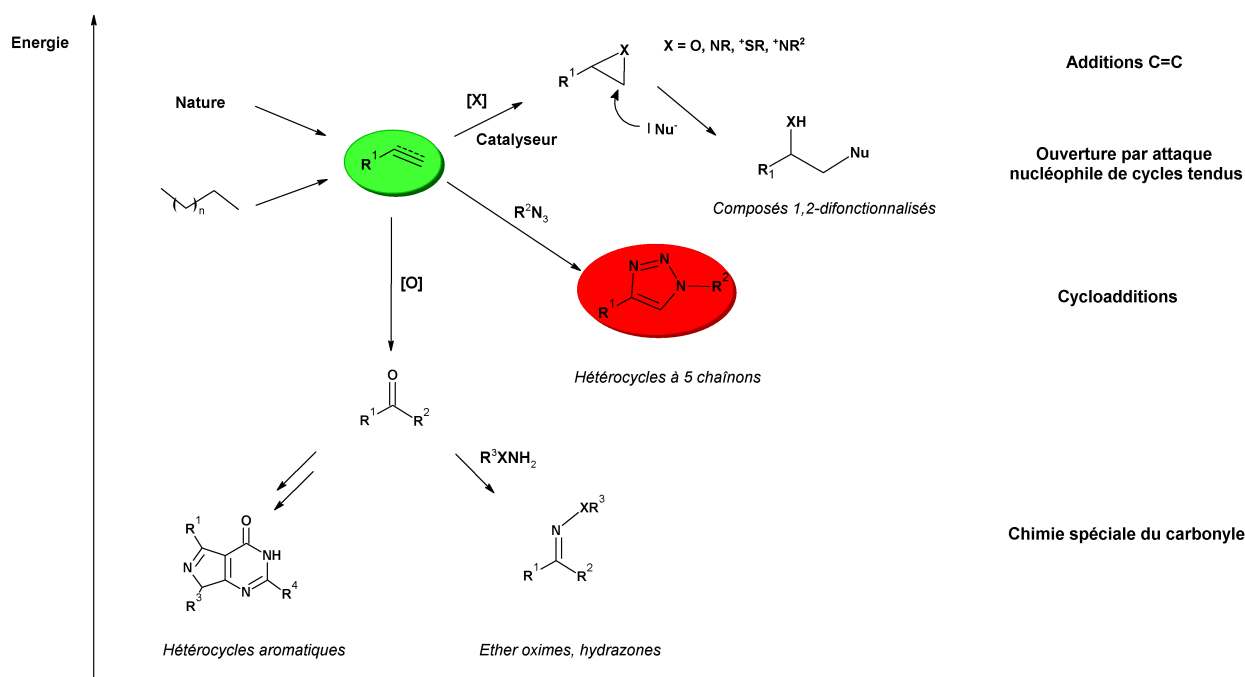


FIGURE 2.2 : Réactions types de "click chemistry"²⁸

Les applications de la "click chemistry", avec plus de 1300 publications parues à ce jour, recouvrent de vastes domaines.* Elles concernent la chimie thérapeutique, les sciences des matériaux, la biochimie, la chimie macrocyclique etc. La construction de composés nécessite, et le terme "click" n'est pas anodin, une efficacité certaine et rapidité.^{26,28} La dite réaction doit ainsi vérifier plusieurs critères généraux :

- être de large portée, et donner de bons rendements ;
- respecter le principe d'économie d'atomes ;
- générer des sous-produits inoffensifs qui pourront être éliminés par des méthodes non-chromatographiques ;
- être stéréospécifique.

D'autres conditions concernant les modes opératoires doivent aussi être prises en compte :

- des conditions simples de réalisation (inertie vis-à-vis de l'oxygène et de l'eau) ;
- l'utilisation de matériels et réactifs facilement disponibles ;
- l'absence de solvant ou l'utilisation de solvants verts ;
- une isolation simple du produit par cristallisation ou distillation.

Outre ces critères, il ne faut pas oublier l'objectif premier : créer une liaison entre un atome

*. <http://www.scripps.edu/chem/sharpless/click.html>

de carbone et un hétéroatome. Ainsi, un grand panachage de réactions va permettre d'atteindre ce but (Figure 2.2) :

- les additions sur les liaisons multiples carbone-carbone (époxydation, dihydroxylation, addition de Michael etc.);
- les réactions faisant intervenir la fonction carbonyle (type non-aldol) telles que la formation d'urée, thiourée, hétérocycles aromatiques etc. ;
- les substitutions nucléophiles, et en particulier, celles faisant entrer en jeu une ouverture d'hétérocycles électrophiles tendus (époxydes, aziridines, ions épisulfoniures, etc.);
- enfin les cycloadditions d'espèces insaturées (Diels-Alder), et surtout les réactions de cycloadditions 1,3-dipolaires.

On peut noter qu'à l'instar de Monsieur Jourdain qui faisait de la prose sans le savoir, beaucoup de chimistes réalisaient de la chimie "click" avant la création du concept lui-même. L'importance de la chimie "click" s'est notamment exprimée à la faveur de la découverte d'une nouvelle réaction qui correspondait remarquablement aux critères énoncés précédemment. Ainsi, parmi tous les exemples précités, la réaction de "click chemistry" qui a connu un essor considérable ces dernières années est la cycloaddition 1,3-dipolaire, et plus précisément la cycloaddition [3+2] entre un alcyne terminal et un azoture.

2.2 Les cycloadditions 1,3-dipolaires : cas particulier des azotures et alcynes

Parmi les cycloadditions 1,3-dipolaires, nous nous sommes intéressés à la cycloaddition de Huisgen entre un azoture et un alcyne terminal (Figure 2.3).²⁹

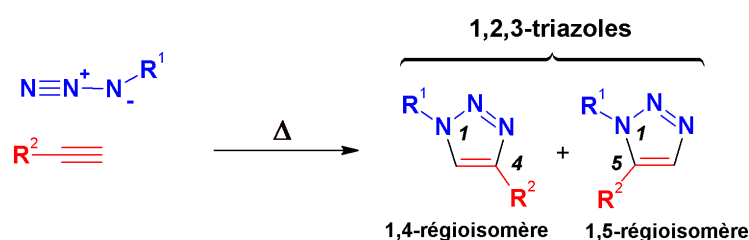


FIGURE 2.3 : Cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne vrai et un azoture

Cette réaction, qui connaît actuellement une avancée remarquable, a cependant rebuté la chimie thérapeutique à la fin du XX^e siècle, notamment en raison de l'existence d'une certaine "azidophobie". Cependant les composés azidés (en particulier aliphatiques) sont remarquablement stables, notamment vis-à-vis de la dimérisation et de l'hydrolyse. Ce composé dipolaire présente, en effet, une inertie envers de nombreux produits chimiques réactifs tels que le dioxygène, l'eau, et une partie du système complexe de molécules hautement fonctionnalisées que constitue une cellule vivante.³⁰ La cycloaddition thermique

[3+2] entre un azoture et un alcyne conduit à un mélange de deux produits majoritaires : les 1,4- et 1,5-régioisomères (Figure 2.3). Le groupe chimique formé entre les deux substituants R^1 et R^2 est nommé 1,2,3-triazole. Les avantages liés à un tel espaceur, seront développés par la suite. L'absence de régiosélectivité couplée à des temps de réaction longs, nécessitant des températures élevées, a limité l'intérêt porté à la cycloaddition. Parfois une régiosélectivité apparaissait mais seulement dans le cas de composés alcynes terminaux hautement déficients en électrons.

2.3 Azotures et alcynes vrais : quand le cuivre(I) y met son grain de sel...

En 2002, deux laboratoires indépendants ont découvert l'effet du cuivre au nombre d'oxydation I sur la réaction de cycloaddition précédemment décrite.³¹⁻³³ La formation exclusive du 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué a lieu alors à température ambiante et jusqu'à 10 millions de fois plus vite. La réaction est nommée CuAAC ("copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition") soit la cycloaddition entre un azoture et un alcyne catalysée par le cuivre (I). Un des premiers exemples de chimie "click", mettant en jeu la tournure de cuivre, montre la simplicité et l'efficacité du processus (Figure 2.4).

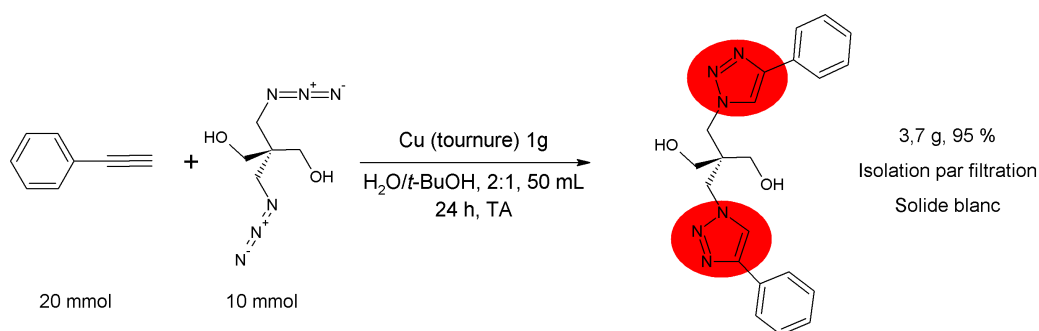


FIGURE 2.4 : Exemple de réaction "click chemistry"^{28,32}

En effet, après 24 h de réaction, il suffit de retirer les fils de cuivres, puis de filtrer, le produit organique ayant précipité dans le milieu réactionnel. Différents sels de cuivre aux nombres d'oxydations (N.O.) 0, I, ou II peuvent aussi être utilisés pour catalyser la réaction de Huisgen (Tableau 2.1), associés à des solvants organiques ou non.³⁴

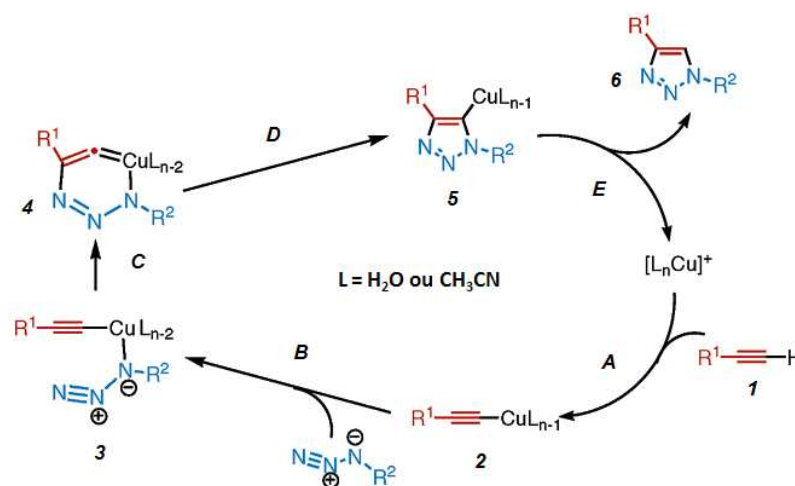
Tableau 2.1 : Exemples de systèmes catalytiques pour la CuAAC

N.O. du Cuivre	Sels ou métaux	Agent réducteur	Base/sel	Solvant
0	Tournure, Nanoparticules, Nanoclusters	-	Chlorure de triéthylammonium	<i>t</i> -BuOH/H ₂ O, EtOH/H ₂ O, H ₂ O
I	CuI, Cu(CH ₃ CN) ₄ PF ₆ , CuBr(PPh ₃) ₄ , CuIP(OEt) ₃	-	Triéthylamine, DIPEA, 2,6-lutidine	THF, DMF, CH ₂ Cl ₂ , Acétonitrile
II	CuSO ₄ , Cu(OAc) ₂	Ascorbate de sodium, Cuivre (0)		<i>t</i> -BuOH/H ₂ O, EtOH/H ₂ O, H ₂ O

L'ascorbate de sodium ou le cuivre métallique peuvent être utilisés pour réduire le cuivre (II) en cuivre (I), espèce catalytiquement active. De plus, la tolérance vis-à-vis de la température, sur un large domaine de pH et dans une grande variété de solvants, ne rendent la réaction que plus attrayante.

Enfin, les temps de réactions ont été largement diminués (quelques minutes voire secondes) sans affecter les rendements grâce à l'utilisation de l'activation par irradiations micro-ondes.³⁵

Afin de mieux saisir le rôle catalytique du cuivre lors de la réaction de cycloaddition et notamment l'orientation vers le 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué, un mécanisme a été proposé, d'après des calculs de chimie théorique, utilisant l'acétonitrile ou l'eau comme solvant (Figure 2.5).³⁶

FIGURE 2.5 : Premier mécanisme hypothétique de la "click chemistry" catalysée par le cuivre³⁶

Des modélisations moléculaires sur les complexes Cu-acétylure indiquent que le mécanisme concerté est fortement défavorisé comparé à un mécanisme par étapes. Dans le mécanisme proposé, le ligand L est l'acétonitrile. La première étape A est la formation du

complexe Cu-anion alcynyle **2** par échange de ligand, l'acétylure pouvant être déprotoné par une base. Cette première étape a été étayée par des études préliminaires sur l'insertion du cuivre Cu(I) dans les alcynes terminaux ainsi que par l'absence de réactivité des alcynes internes. L'azoture remplace ensuite un autre ligand pour donner le complexe **3** dans l'étape *B*. L'azote terminal attaque alors le carbone C2 de l'acétylide pour conduire au métallacycle **4** à six chaînons non usuel, avec du cuivre au nombre d'oxydation (III). Une contraction de cycle donne un dérivé triazole-cuivre **5**. Le triazole final **6** est obtenu par protonation.

Le profil réactionnel présenté est valable pour les solvants eau et acétonitrile (Figure 2.6).³⁶

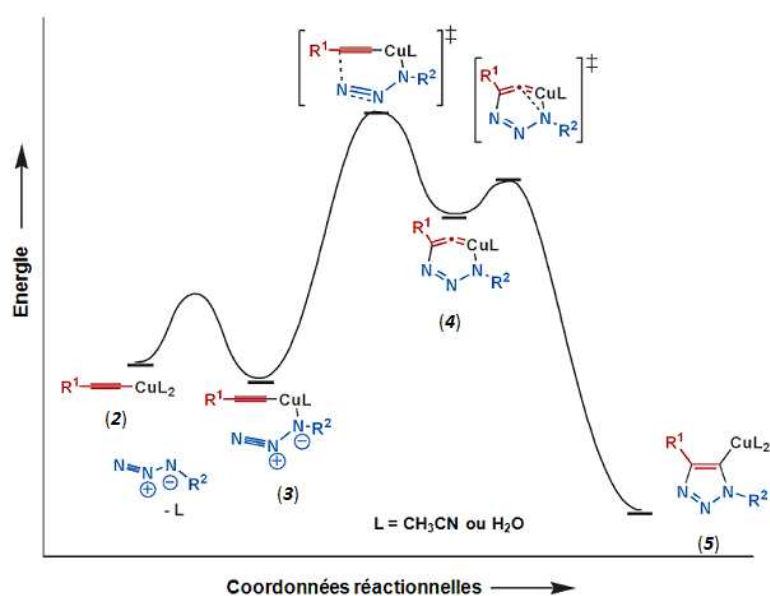
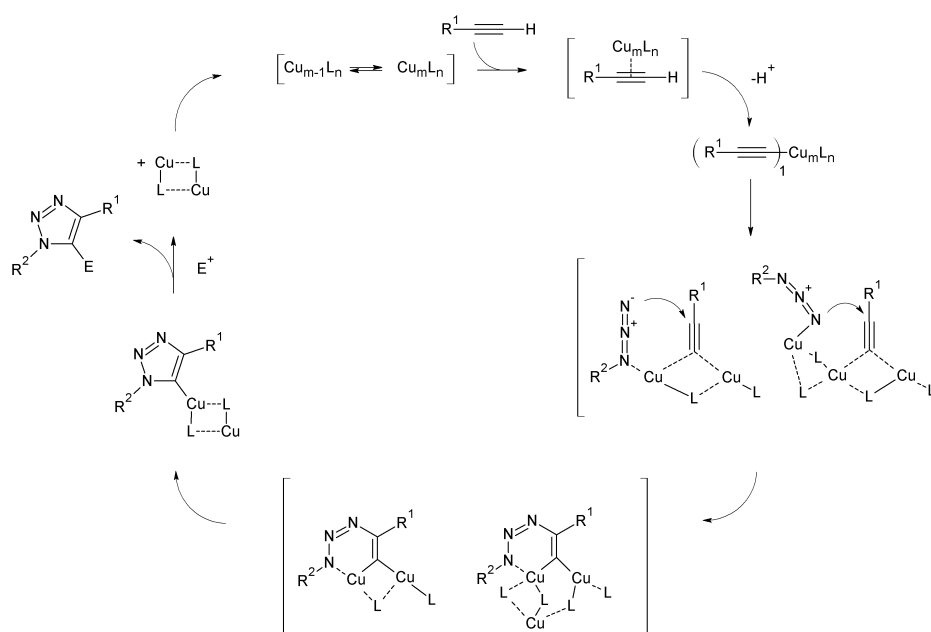


FIGURE 2.6 : Diagramme énergétique³⁶

Il met en évidence les intermédiaires réactionnels et plusieurs états de transition (étapes *C* et *D*) du mécanisme décrit précédemment. D'autres mécanismes ont été proposés, d'après des études cinétiques, et font intervenir des composés dinucléaires du cuivre.³⁷ Le plus récent des mécanismes proposés a tenu compte notamment des preuves structurales tirées de la base de données cristallographiques de Cambridge ("Cambridge Crystal Database").³⁴ Il suggère que l'acétylénure et l'azoture ne sont pas nécessairement liés au même atome de cuivre (Figure 2.7).

FIGURE 2.7 : Mécanisme plausible pour la CuAAC³⁴

2.4 Le lien triazole

La fonction 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué formée au cours de la cycloaddition est stable vis-à-vis de l'hydrolyse acide ou basique, et subsiste dans des conditions oxydantes et réductrices. De plus, elle s'avère être relativement résistante aux dégradations métaboliques tout en ne posant pas de problèmes particuliers de toxicité.^{38,39}

Il ne faut pas oublier que les composés comportant le groupe triazole 1,4-disubstitué ne sont pas nouveaux, plus de 7000 molécules possédant cet hétérocycle substitué sur les positions 1 et 4 ont été répertoriées avant la découverte de la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre (I). Parmi elles, on peut citer par exemple le tazobactame (Figure 2.8),⁴⁰ un inhibiteur de la β -lactamase, et des analogues de nucléosides pyrimidiques utilisés en tant qu'agents antiviraux (la partie triazole mimant la base) ou comme alkylants en chimiothérapie du cancer.

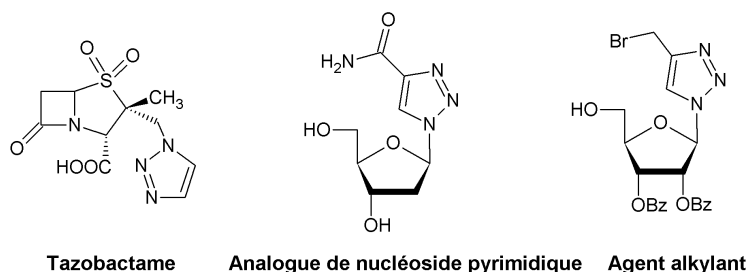


FIGURE 2.8 : Exemples de structures synthétisées avant l'utilisation de la cycloaddition CuAAC

Les domaines d'application des composés 1,4-disubstitués sur le triazole sont nombreux en chimie thérapeutique : biomimétisme pour les peptides, oligonucléotides, synthèse rapide d'homodimères, d'hétérodimères en tant que fragments de base de médicaments, chimie des lipides, chimie des sucres, bioconjugaison, immobilisation de ligands, macrocycles etc.⁴¹

Une particularité de l'hétérocycle triazole réside notamment dans son aptitude à mimer la liaison peptidique. Comme il apparaît sur la figure 2.9, le triazole est une sorte d'amide étendu. Ainsi, outre la similarité de polarité (moment dipolaire de 3,7-4 Debye pour la *N*-méthylacétamide, 5 Debyes pour le triazole), les sites accepteurs et donneurs de liaisons H sont orientés identiquement. Cette similarité est de surcroît accentuée par la capacité de certains oligomères de triazole 1,4-disubstitué à mimer la structure de brins β .⁴²

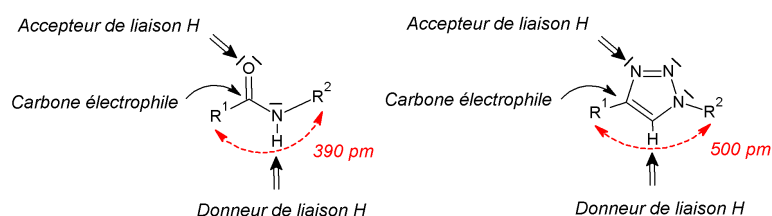


FIGURE 2.9 : Biomimétisme de la fonction 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué

Actuellement de nouveaux additifs sont utilisés dans la réaction de cycloaddition catalysée par le cuivre afin de réduire les concentrations de métal, tout en augmentant l'efficacité de la réaction (Figures 2.10 et 2.11).

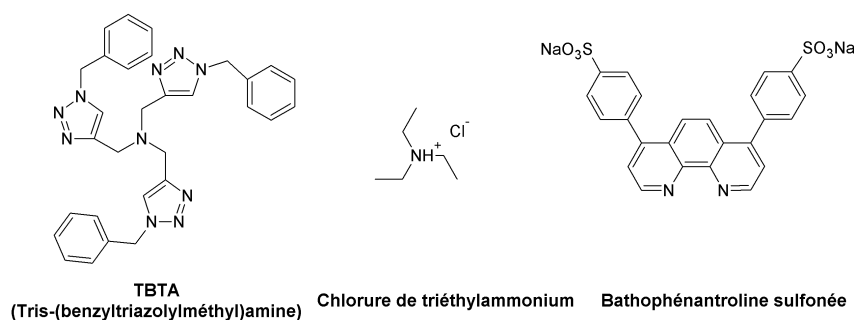


FIGURE 2.10 : Nouveaux additifs utilisés

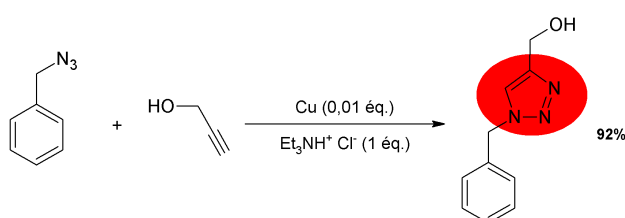


FIGURE 2.11 : Exemple de réaction utilisant comme additif le chlorure de triéthylammonium

Le cuivre étant un poison de nombre de cellules ou d'organismes vivants, la mise au point de réactions "click" sans cuivre a été envisagée.^{43,44} Ainsi certains dérivés acétyléniques comme les cyclooctynes difluorés ("difluorinated cyclooctyne" : DIFO) permettent d'effectuer la cycloaddition 1,3-dipolaire en l'absence de cuivre (Figure 2.12). Les cyclooctynes présenteraient ainsi un intérêt prometteur dans le domaine de l'imagerie médicale par fluorescence.

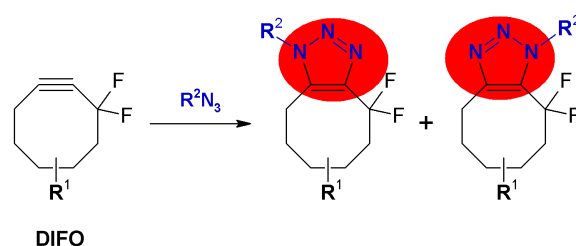


FIGURE 2.12 : Cycloaddition [3+2] avec des cyclooctynes difluorés

Le régioisomère 1,5-triazole a été obtenu grâce à un catalyseur à base de ruthénium ($\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$). A la différence du cuivre, ce catalyseur permet aussi d'obtenir des cycloadditions 1,3-dipolaires utilisant des alcynes internes.^{45,46} Il est important de préciser qu'une des améliorations majeures de la CuAAC devra concerner le problème de stabilité des azotures dans le milieu biologique. En effet, les thiols présents dans les cellules sont de bons réducteurs des azotures, ce qui parasite le labelling *in vivo*.

Enfin, une nouvelle réaction "click" a récemment été introduite : le couplage thiol-ène (Figure 2.13).⁴⁷ Le couplage thiol-ène (TEC : "Thiol-Ene Coupling") n'a été que récemment qualifié de "thio-click" par son utilisation appréciée en chimie radicalaire des polymères, et plus récemment dans le domaine des dendrimères. Par ailleurs, un de ses grands avantages est l'absence de métaux de transition, ce qui suggère une grande utilité pour la bioconjugaison.⁴⁸

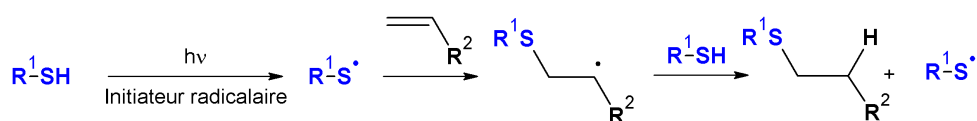


FIGURE 2.13 : Réaction radicalaire thiol-ène

Ces six dernières années, l'essor de la "click chemistry" a été impressionnant. La variante de la cycloaddition 1,3-dipolaire d'Huisgen entre un azoture et un alcyne terminal catalysée par le cuivre, a été et reste encore le pilier du concept "click". Les molécules ainsi générées couvrent des domaines variés en chimie, avec des applications considérables dans le domaine thérapeutique, et, de ce fait, par le lien qu'elles créent entre la chimie et la biologie, confèrent à la "click chemistry" un caractère interdisciplinaire.⁴¹ Toutefois il ne faut pas oublier que la "click chemistry" n'est pas un outil de remplacement, notamment dans le domaine de la chimie pharmaceutique, mais plutôt un complément, une extension qui accélère les processus d'optimisation et de découverte.

La cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre (I) se présente donc comme une réaction de premier choix pour la synthèse rapide et efficace de nouvelle famille d'analogues d'oligonucléotides à visées thérapeutiques.

Chapitre 3

Objet du travail

Dans le cadre des travaux réalisés au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, nous nous sommes intéressés à la synthèse par "click chemistry" d'analogues oligonucléotides, et plus particulièrement d'oligothymidines dans un premier temps (Figure 3.1). La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire ("click chemistry") permet de remplacer l'espaceur phosphodiester par une unité triazolique, plus robuste, notamment vis-à-vis des dégradations enzymatiques.

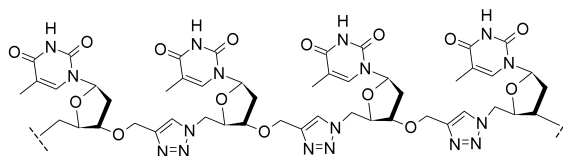


FIGURE 3.1 : Analogue d'oligonucléotide

La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire devant se réaliser entre une fonction azoture et une fonction alcyne terminale, la stratégie de synthèse comprend, dans un premier temps, des étapes de protection/fonctionnalisation avant de relier deux thymidines (Figure 3.2).

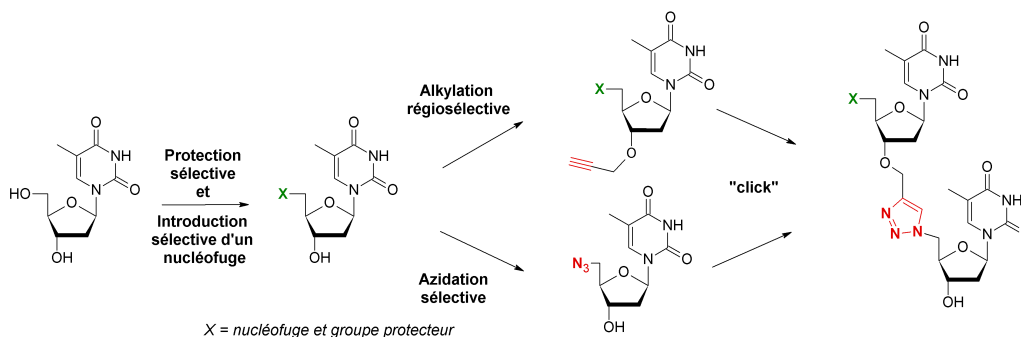


FIGURE 3.2 : Stratégie de synthèse

Une des étapes de cette synthèse a fait l'objet d'une étude plus poussée : l'alkylation régiosélective permettant de générer la thymidine propargylée en position 3' (Figure 3.3). La modélisation moléculaire nous a apporté, par l'intermédiaire de calculs de chimie quantique, des réponses sur la régiosélectivité observée.

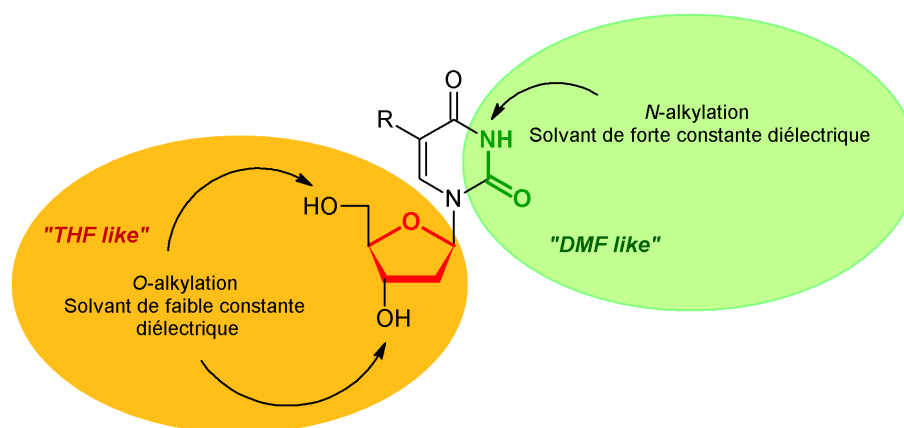


FIGURE 3.3 : Alkylation régiosélective

Enfin, la complémentarité des oligomères synthétisés avec des brins naturels a été étudiée par une méthode non usuelle, mise au point au Laboratoire de Physique du Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM) de Paris, méthode basée sur la génération et la détection d'ondes acoustiques de surface (SAW : "surface acoustic wave").

Deuxième partie

**ALKYLATION REGIOSELECTIVE
DE NUCLEOSIDES**

Chapitre 1

Mise au point de l'alkylation régiosélective de nucléosides

Les nucléosides sont des molécules à réactivité complexe, en raison du nombre de sites potentiellement réactifs. En particulier, la thymidine et ses dérivés sont des substrats clefs pour la synthèse de composés biologiques intéressants, de part leurs nombreuses applications dans le domaine de la biologie moléculaire.⁴⁹ L'une des origines de la multiréactivité de ces composés relève de leur structure qui résulte de l'union d'une partie glucidique et d'une base azotée. Les problèmes de régiosélectivité se trouvent donc nécessairement accrus.

1.1 Nécessité de réactions régiosélectives

La source potentielle d'agents thérapeutiques obtenue à partir des nucléosides justifie l'étude approfondie des problèmes de régiosélectivité souvent rencontrés. En effet, après quelques modifications, les nucléosides peuvent mener à des composés intéressants du point de vue thérapeutique. Ainsi, parmi les plus connus nous pouvons citer la 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT), la 2',3'-didéhydrodidésoxythymidine (d4T) et la 2',3'-didésoxycytidine. Associés à d'autres analogues, ils sont utilisés dans la trithérapie anti VIH. On peut noter que le passage de la thymidine ou de la cytidine à ces agents thérapeutiques, nécessite une modification régiosélective de l'hydroxyle en position 3', et ce, sans affecter la partie base (Figure 1.1).

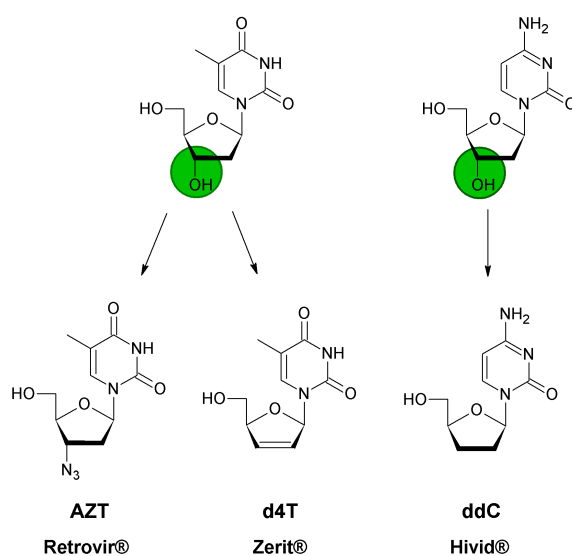


FIGURE 1.1 : Agents thérapeutiques anti VIH

De plus, l'insertion des nucléosides dans des structures polymériques (analogues d'oligonucléotides) requiert l'utilisation de protections et de fonctionnalisations sélectives. Comme nous l'avons mentionné précédemment, dans le cas de la thymidine, les positions 3' et 5' de la partie glucidique et celle de l'azote en position 3 de la base devront être différenciées en terme de réactivité. La nécessité de mise en place de modifications régiosélectives des nucléosides nous a ainsi conduit à une étude approfondie de leur alkylation.

1.2 Alkylation régiosélective de la thymidine

Dans le but d'obtenir rapidement et efficacement des oligonucléosides, nous nous sommes intéressés à la réactivité de la thymidine protégée en position 5'. Les premiers essais d'alkylation régiosélective ont été effectués en utilisant comme agent alkylant le bromure d'allyle ($\text{BrCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$). Cette étude a débuté au laboratoire dans le cadre de la synthèse d'analogues d'oligonucléotides par métathèse des oléfines.^{50,51} L'alkylation est réalisée en deux étapes. La première consiste en la déprotonation du nucléoside par l'hydrure de sodium. La seconde est une substitution nucléophile, en présence du bromure d'allyle, qui conduit au nucléoside allylé.

1.2.1 Allylation régiosélective

L'allylation régiosélective nécessite, dans un premier temps, la protection sélective de l'hydroxyle en position 5' de la thymidine.

1.2.1.1 Préparation de la 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine

La protection de la position 5' est effectuée classiquement par l'introduction d'un groupe encombrant (trityle⁵² ou silyle⁵³) sur le carbone primaire de la partie glucidique. Dans notre cas, nous avons choisi le groupe *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS). La réaction est réalisée dans la pyridine, pendant 10 h, à température ambiante, en présence de 1,5 équivalents de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle et d'une quantité catalytique de 4-(*N,N*-diméthylamino)pyridine (DMAP). Le composé silylé **1** est obtenu après purification avec un rendement de 98% (Figure 1.2).

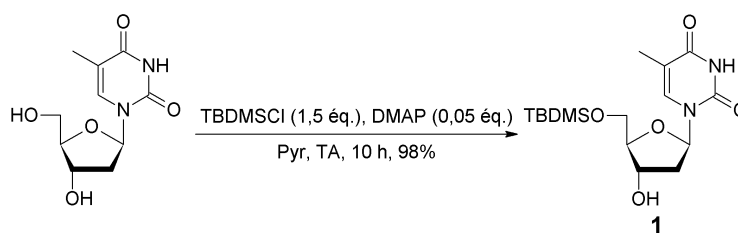


FIGURE 1.2 : Synthèse de la thymidine silylée en position 5'

L'analyse du spectre de RMN du proton nous confirme la fixation du groupe TBDMS par l'apparition de deux singulets, correspondant au *tert*-butyle (*t*-Bu) à 0,88 ppm et aux deux groupes méthyle à 0,08 ppm. La spectrométrie de masse confirme la structure par la présence d'un pic correspondant à l'espèce ionisée $[MH]^+$ à m/z 357,2.

1.2.1.2 Alkylation de la 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine

Si l'on considère la forme tautomère prédominante de la partie base thymine du nucléoside **1** protégé en position 5', deux sites nucléophiles pourront intervenir lors de l'étape d'alkylation (Figure 1.3) :

- l'azote en position 3 de la base ;
- l'oxygène de l'hydroxyle en position 3' de la partie glucidique.

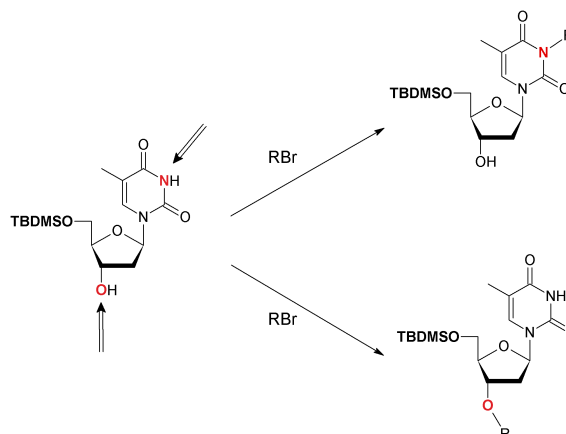


FIGURE 1.3 : Sites nucléophiles de la thymidine silylée en position 5'

Suivant les conditions opératoires utilisées, une régiosélectivité a pu être observée (Figure 1.4).⁵⁴ La réaction est activée par sonication.

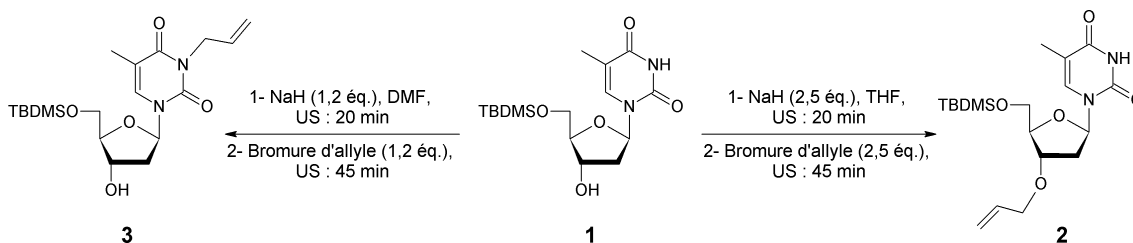


FIGURE 1.4 : 3'-O et 3-N-alkylation de la thymidine protégée en position 5'

La sonochimie fait partie des méthodes non conventionnelles en chimie organique.⁵⁵ La chimie sous ultra-sons est régie par des phénomènes de cavitation, et permet, à température ambiante, de diminuer considérablement le temps réactionnel tout en conservant des rendements très satisfaisants. L'hydroxyle en position 3' peut être allylé sélectivement selon la méthode de Chattopadhyaya et coll.⁵⁶, en utilisant l'activation par sonication. Dans une première étape, le composé silylé **1** est mis en présence de 2,5 équivalents d'hydrure de sodium dans le THF, puis la réaction est activée pendant 20 minutes. L'hydrure de sodium permet la formation de l'anion alcoolate en position 3', qui va, dans un second temps, subir une réaction de Williamson avec 2,5 équivalents de bromure d'allyle. Après purification, le composé **2** est obtenu avec un rendement de 95%.

L'utilisation de seulement 1,2 équivalents d'hydrure de sodium et de bromure d'allyle dans le DMF mène à une régiosélectivité en faveur du produit 3-N-allylé **3** avec un rendement de 95%.

Les structures des thymidines protégées en positions 5' et allylées en positions 3'-O **2** ou 3-N **3** ont été élucidées par spectroscopie de RMN du proton qui montre notamment, dans le DMSO d⁶, les signaux correspondants aux hydrogènes acides de l'azote (NH) à 11,36 ppm et de l'oxygène (OH) à 5,31 ppm, des composés **2** et **3**, respectivement (Figure 1.5).

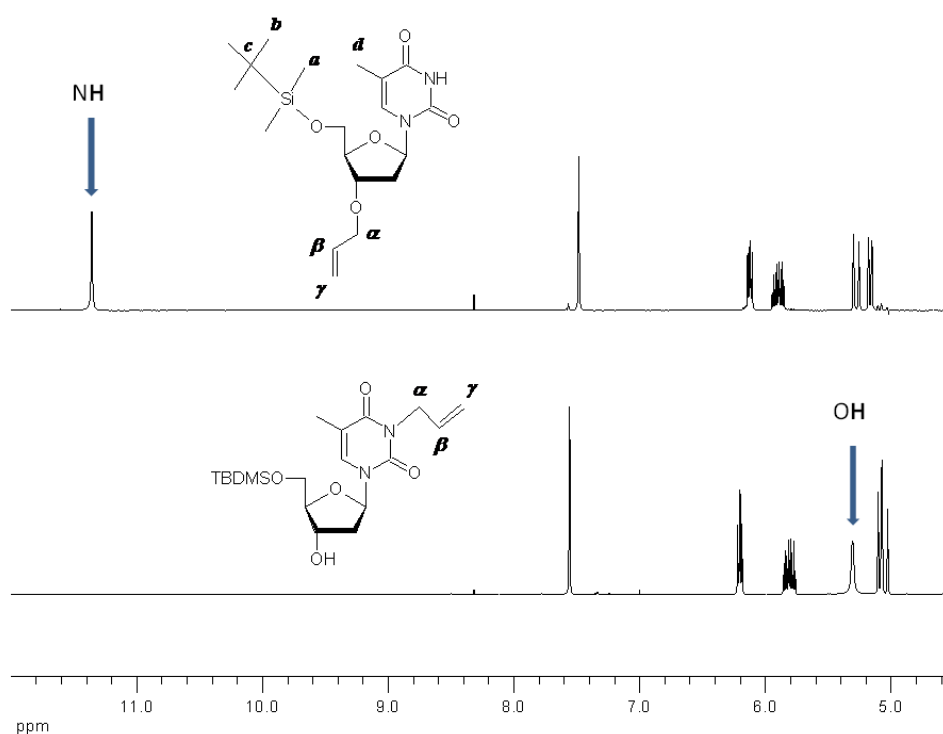


FIGURE 1.5 : Comparaison des spectres de RMN ^1H des composés allylés

Les couplages longues distances observés par expériences HMBC entre $\text{C}_{3'}/\text{H}_{3'}$ et $\text{H}_{\alpha}/\text{C}_{\alpha'}$, ainsi qu'entre H_{α} et C_2/C_4 confirment la structure des deux composés (Tableau 2.3, page suivante).

Le passage du THF au DMF provoque donc un changement de réactivité de la thymidine protégée en position 5'. Le THF induit ainsi la formation de produit *O*-allylé, tandis que le DMF oriente la réaction vers la formation exclusive de composé *N*-allylé.

L'activation par irradiations micro-ondes a également été utilisée. En effet, les micro-ondes peuvent présenter entre autres, comme avantages, des diminutions de durée de réaction significatives, la possibilité d'effectuer des synthèses respectant les concepts de chimie verte et aussi d'améliorer ou changer la sélectivité d'une réaction.⁵⁵

Concernant l'alkylation régiosélective, le procédé est très ressemblant à l'activation par ultrasons. Dans le cas de la 3-*N*-allylation, la thymidine protégée en position 5' est activée une première fois dans le DMF (2 min, 200 W, 40 °C) et en présence de quantité quasi stoechiométrique d'hydrure de sodium. Le bromure d'allyle est ensuite ajouté et le mélange est à nouveau irradié (4 min, 200 W, 40 °C). Après purification, le composé *N*-allylé **3** est obtenu avec un rendement de 96%. En utilisant un réacteur micro-ondes scellé adapté, l'allylation conduite cette fois dans le THF avec un excès d'hydrure de sodium et de bromure d'allyle mène avec un rendement quasi quantitatif au produit 3'-*O*-allylé **2** (99%). L'activation par irradiations micro-ondes a donc permis de décroître les temps de réaction tout en conservant la régiosélectivité.

Tableau 1.1 : Données de RMN des composés 2 et 3 dans le DMSO d^6 (400 MHz pour le proton)

Position	Composé 2			Composé 3		
	δ_C	δ_H (mult ; J en Hz)	HMBC	δ_C	δ_H (mult ; J en Hz)	HMBC
1'	83,9	6,12 (dd ; 5,8 ; 8,5)	C ₂ , C _{3'} , C ₆	84,9	6,20 (dd ; 6,3 ; 7,5)	C ₂ , C _{3'} , C ₆
2'	36,3	2,10 (ddd ; 6,0 ; 8,5 ; 13,7)	C _{1'} , C _{3'} , C _{4'}	39,6	2,08 (ddd ; 6,0 ; 7,5 ; 13,3)	C _{1'} , C _{3'} , C _{4'}
		2,26 (ddd ; 1,8 ; 5,8 ; 13,7)	C _{1'} , C _{3'} , C _{4'}		2,15 (ddd ; 3,1 ; 6,3 ; 13,3)	C _{1'} , C _{3'} , C _{4'}
3'	78,6	4,07 (m)	C _{1'} , C _{4'} , C _{5'} , C _{α}	70,3	4,21 (m)	C _{1'}
OH	-	-	-	-	5,31 (s _{él})	-
4'	84,1	3,98 (m)	C _{3'} , C _{5'}	86,9	3,84 (m)	C _{3'} , C _{5'}
5'	63,3	3,74 (dd ; 3,9 ; 11,3)	C _{3'} , C _{4'}	63,1	3,73 (dd ; 3,7 ; 11,3)	C _{3'} , C _{4'}
		3,78 (dd ; 4,1 ; 11,3)	C _{3'} , C _{4'}		3,80 (dd ; 3,1 ; 11,3)	C _{3'} , C _{4'}
a	-5,5	0,08 (s)	C _a , C _c	-5,5	0,07 (s)	C _a , C _c
		0,09 (s)	C _a , C _c		0,08 (s)	C _a , C _c
b	25,7	0,89 (s _{él})	C _b , C _c	25,7	0,88 (s _{él})	C _b , C _c
c	18,0	-	-	17,9	-	-
2	150,4	-	-	150,0	-	-
NH	-	11,36 (s _{él})	C ₂ , C ₄	-	-	-
4	163,6	-	-	162,2	-	-
5	109,5	-	-	108,4	-	-
6	135,4	7,49 (d ; 0,7)	C _{1'} , C ₂ , C ₄ , C ₅ , C _d	134,2	7,56 (d ; 1,0)	C _{1'} , C ₂ , C ₄ , C ₅ , C _d
d	12,2	1,78 (s _{él})	C ₄ , C ₅ , C ₆	12,2	1,83 (d ; 1,0)	C ₄ , C ₅ , C ₆
α	69,1	4,01 (d ; 5,3)	C _{3'} , C _{β} , C _{γ}	42,4	4,40 (d _{él} ; 5,4)	C ₂ , C ₄ , C _{β} , C _{γ}
β	134,9	5,90 (ddd ; 5,3 ; 10,4 ; 17,1)	C _{α}	132,3	5,81 (ddd ; 5,4 ; 10,5 ; 17,2)	C _{α}
γ	116,6	5,17 (dd ; 1,6 ; 10,4)	C _{α} , C _{β}	116,5	5,05 (dd ; 1,5 ; 17,2)	C _{α} , C _{β}
		5,28 (dd ; 1,6 ; 17,1)	C _{α} , C _{β}		5,09 (dd ; 1,5 ; 10,5)	C _{α} , C _{β}

1.2.1.3 Alkylation utilisant d'autres agents alkylants

Dans l'optique de généraliser cette méthode, d'autres dérivés bromés ont été utilisés. Les résultats (temps d'activation par irradiations micro-ondes et rendements) sont résumés sur la figure 1.6.

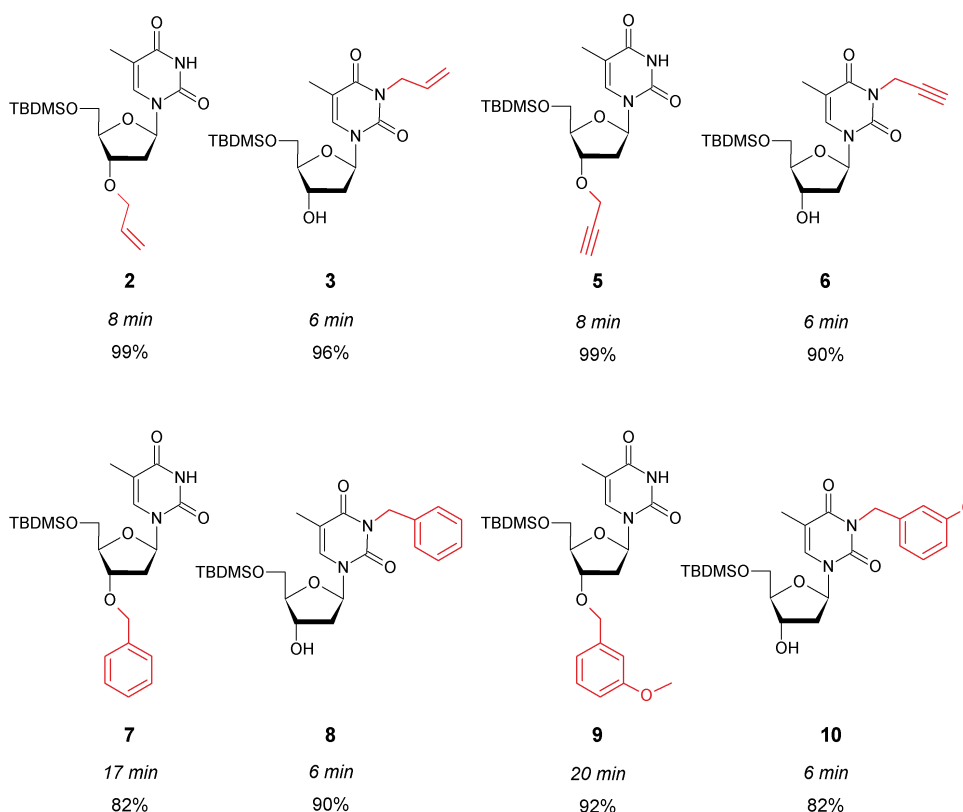


FIGURE 1.6 : Synthèse par micro-ondes de 5'-O-tert-butyltriméthylsilylthymidines 3'-O et 3-N-alkylées

Les groupes propargyle, benzyle et *m*-méthoxybenzyle ont été utilisés. La méthodologie a donc permis de protéger ou fonctionnaliser sélectivement les positions 3-N ou 3'-O de la thymidine, avec de très bons rendements (82% à 99%) associés à des temps de réactions très courts (8 à 20 min). Une méthode rapide et efficace d'alkylation régiosélective de la thymidine a donc été mise en place. Des essais d'alkylation réalisés en utilisant des dérivés chlorés ne mènent à aucune évolution de la réaction, même après plusieurs heures.

L'analyse de ces résultats montre clairement l'influence fondamentale de la nature du solvant sur la régiosélectivité. C'est ce que nous nous proposons d'approfondir au chapitre suivant.

Chapitre 2

Etude de l'origine de la régiosélectivité

La dépendance surprenante, vis-à-vis du solvant, de la régiosélectivité de l'alkylation de la 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine nous a conduit dans un premier temps à nous intéresser à plusieurs solvants de natures différentes (moment dipolaire/constante diélectrique). Le temps de réaction en utilisant l'activation par irradiations micro-ondes étant très court, toutes les réactions d'alkylations, développées dans ce chapitre, ont été activées par ultra-sons afin de suivre la cinétique de formation des produits.

2.1 Influence du solvant

L'étude de l'influence du solvant sur la régiosélectivité de la réaction d'allylation a été réalisée en utilisant le dioxane, le dichlorométhane, le 1,2-dichloroéthane, le diméthylsulfoxyde et bien sûr le THF et le DMF (Figure 2.1 et Tableau 2.1). L'évolution de la réaction a été suivie par chromatographie sur couche mince.

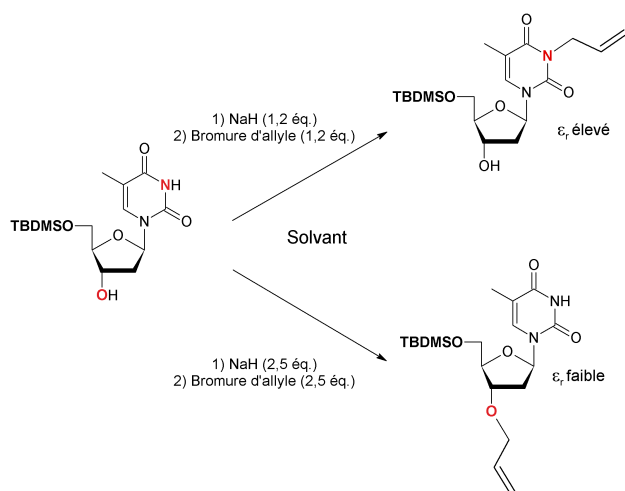


FIGURE 2.1 : Allylation régiosélective de la thymidine protégée en position 5'

Tableau 2.1 : Influence du solvant sur la régiosélectivité de l'alkylation

Solvant (ϵ_r^a)	Réactifs NaH/RBr (ϵ_q)	Activation par sonication (1 ^{ère} /2 ^{ème}) (min)	2 3'-O-allylé (%)	3 3-N-allylé (%)	4 diallylé (%)
Dioxane (2,21)	2,5/2,5	20/45	83	0	0
THF (7,58)	2,5/2,5	20/45	95	0	0
CH ₂ Cl ₂ (8,93)	2,5/2,5	20/90	87	0	0
ClCH ₂ CH ₂ Cl (10,56)	2,5/2,5	20/180	35	0	3
DMF (37)	2,5/2,5	20/20	0	10	80
DMF (37)	1,2/1,2	20/20	0	95	0
DMSO (46,7)	1,2/1,2	20/20	0	96	0

^a Constante diélectrique

L'analyse de ce tableau montre une dépendance de la régiosélectivité vis-à-vis de la constante diélectrique des solvants. En effet pour des solvants dont la constante diélectrique est inférieure à 10, le produit 3'-O-allylé est obtenu exclusivement. L'utilisation de dichloroéthane oriente la réaction vers une 3'-O-allylation, avec un rendement de seulement 35%, malgré un temps de réaction de plus de trois heures. Dans le cas de constantes diélectriques plus élevées (DMSO, DMF), et en présence de quantité quasi stoechiométrique de chaque réactif, on obtient uniquement la thymidine 3-N-allylée. On peut noter que l'excès d'hydrure de sodium et de bromure d'allyle, dans le DMF, conduit à une dialkylation avec un rendement de 80%. Le lien intime entre la constante diélectrique des solvants et la régiosélectivité de l'alkylation nous a conduits à émettre deux hypothèses, pouvant expliquer la réactivité observée. Les deux structures hypothétiques sont représentées sur la figure 2.2.

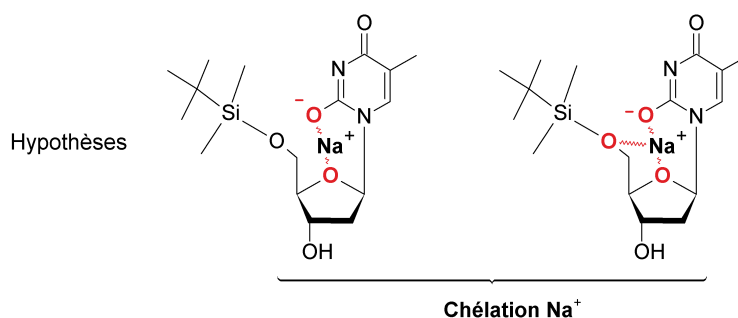


FIGURE 2.2 : Hypothèses d'intermédiaires réactionnels pouvant expliquer la régiosélectivité observée

Après la réaction de l'hydrure, le contre-ion sodium pourrait jouer un rôle primordial. En effet l'oxygène de la forme tautomère déprotonée anionique pourrait chélater le cation sodium, tout comme l'oxygène du cycle désoxyribofuranose. Un cycle à six chaînons serait alors créé, laissant envisageable la participation à la chélation de l'oxygène en position 5'.

Notre travail s'est donc porté sur la validation d'une des deux formes hypothétiques avancées.

2.2 Etude de l'intermédiaire réactionnel

2.2.1 Chélation ?

Afin de mettre en évidence le rôle chélatant ou non de l'atome de sodium, une série d'expériences a été effectuée en présence d'éther couronne, qui, piégeant le cation associé, pourrait démontrer l'implication ou non de ce dernier dans la régiosélectivité observée. Dans la suite de ce chapitre toutes les réactions d'alkylations seront effectuées avec le bromure de propargyle comme agent alkylant.

2.2.1.1 Etude de l'effet des éthers-couronne sur la réaction de propargylation

Nous avons débuté l'étude de l'effet des éthers-couronne sur la réaction de propargylation en utilisant la 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (Figure 2.3).

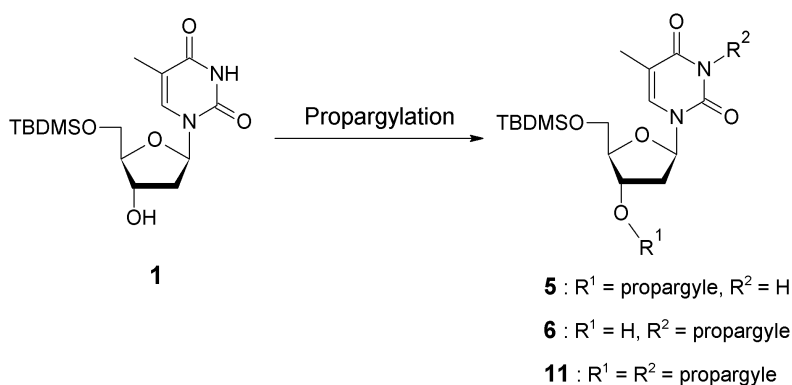


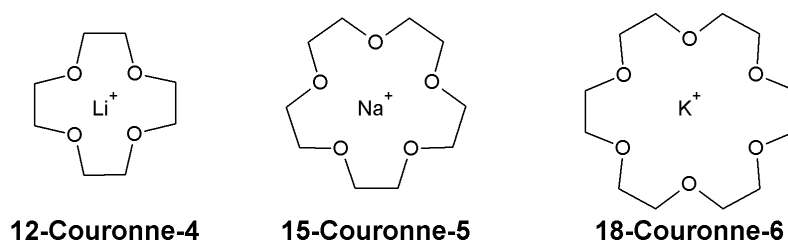
FIGURE 2.3 : Propargylation sélective de la 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine

Dans les mêmes conditions que précédemment dans le THF, c'est à dire 2,5 équivalents d'agent alkylant et d'hydrure de sodium (Tableau 2.2, essai 1), la présence d'éther-couronne, et donc le piégeage du cation sodium, conduit à une dialkylation avec un rendement de 89% (Tableau 2.2, essai 2).

L'essai montre donc l'effet du cation Na⁺ dans l'intermédiaire réactionnel hypothétique. En effet, le sodium piégé par l'excès de 15-couronne-5 (Figure 2.4), ne masque plus la réactivité de l'azote de la base, d'où la double alkylation.

Tableau 2.2 : Effets des éthers-couronne et des hydrures sur la réaction de propargylation

Essai	XH, RBr ^a (éq.)	Solvant	Ether couronne i-C-j (éq.)	5 (%)	6 (%)	11 (%)
1	X = Na (2,5)	THF	-	100	-	-
2	X = Na (2,5)	THF	15-C-5 (3,5)	-	-	89
3	X = Na (1,5)	THF	-	28	-	-
4	X = Na (1,2)	THF	-	-	-	-
5	X = Na (1,2)	THF	15-C-5 (1,2)	-	73	-
6	X = Na (1,2)	DMF	-	-	90	-
7	X = Na (1,2)	DMF	15-C-5 (1,2)	-	100	-
8	X = Li (2,5)	THF	-	-	-	-
9	X = Li (2,5)	THF	12-C-4 (3,5)	-	-	-
10	X = K (2,5)	THF	-	-	-	-
11 ^b	X = K (2,5)	THF	18-C-6 (3,5)	-	-	50

^a Cf. Figure 2.3^b Deux produits minoritaires **11a** et **11b** sont obtenus**FIGURE 2.4 :** Ethers-couronne associés aux cations Li^+ , Na^+ et K^+

Des essais supplémentaires (essais 3 à 7) ont été conduits afin de confirmer le rôle chélaté du cation sodium. Ainsi, l'utilisation d'une quantité quasi stoechiométrique de NaH et de bromure de propargyle dans le THF et en présence d'éther-couronne exalte de nouveau la nucléophilie de l'azote, et conduit uniquement au produit 3-N-alkylé avec un rendement de 73%. Tout se passe comme si l'on travaillait fictivement dans le DMF, sans éther-couronne.

La réaction de propargylation dans le THF, avec une quantité quasi stoechiométrique d'agent alkylant et d'hydrure (Tableau 2.2, essai 4), ne montre aucune évolution même après quelques jours, ce qui est en accord avec la participation du sodium. En effet, la nucléophilie de l'azote de la base étant masquée par le sodium, et l'hydroxyle de la position 3' du sucre étant peu nucléophile, n'ayant pu être déprotoné, les deux sites ne sont pas réactifs.

L'utilisation de seulement 1,5 équivalents d'hydrure et de bromure de propargyle (Tableau 2.2, essai 3) permet d'obtenir 28% de composé 3'-O-propargylé.

Tous ces résultats confirment donc l'hypothèse d'un intermédiaire réactionnel mettant en jeu une chélation du sodium.

D'autres essais ont été menés avec deux hydrures alcalins : LiH et KH. Tout d'abord on remarque que l'hydrure de lithium (LiH) en présence ou non d'éther-couronne ne mène à aucune évolution de la réaction (Tableau 2.2, essais 8 et 9). Pour l'hydrure de potassium (KH), les résultats ont été pour le moins inattendus. Le produit majoritaire observé en présence d'hydrure et d'éther couronne est, comme dans le cas de l'hydrure de sodium, le produit de dialkylation (Tableau 2.2, essai 11). Cependant deux produits minoritaires sont aussi obtenus. L'analyse par spectroscopie de RMN du proton nous montre que le premier, la 3-*N*,3'-*O*,5'-*O*-tri(prop-2-ynyl)thymidine **11a**, résulte de la désilylation de la position 5' suivie de sa propargylation. Le second produit minoritaire est la 3'-*O*,5'-*O*-di-*tert*-butyldiméthylsilyl-3-*N*-(prop-2-ynyl)thymidine **11b**. Une réaction de transposition internucléosidique a donc eu lieu, expliquant le groupe TBDMS supplémentaire pour le composé **11b** (Figure 2.5).

La structure de ces produits a été déterminée par spectroscopie de RMN.

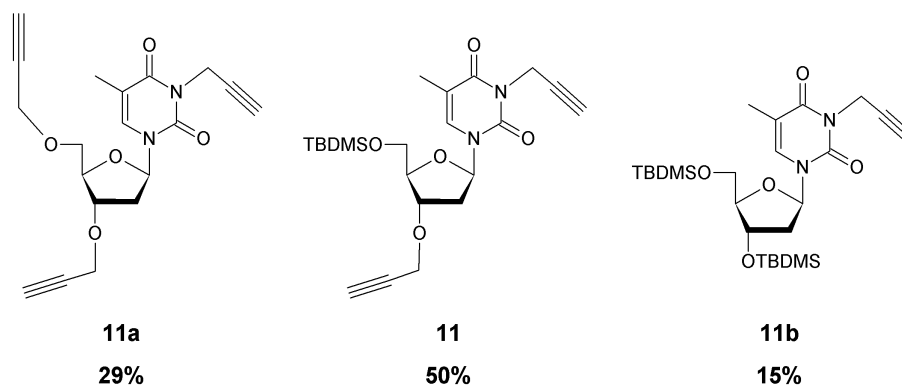


FIGURE 2.5 : Produits secondaires observés dans le cas KH/18-couronne-6

L'essai réalisé en absence d'éther-couronne n'a montré aucune évolution même après plusieurs heures de sonication (Tableau 2.2, essai 10).

2.2.1.2 Caractérisation des composés propargylés

Les composés ont été caractérisés par spectroscopie de RMN HMBC notamment. La preuve de fixation du groupe propargyle en position 3-*N* ou sur l'oxygène en position 3' peut être établie grâce aux corrélations entre le proton et le carbone sur la carte 2D de chaque composé (Figure 2.6).

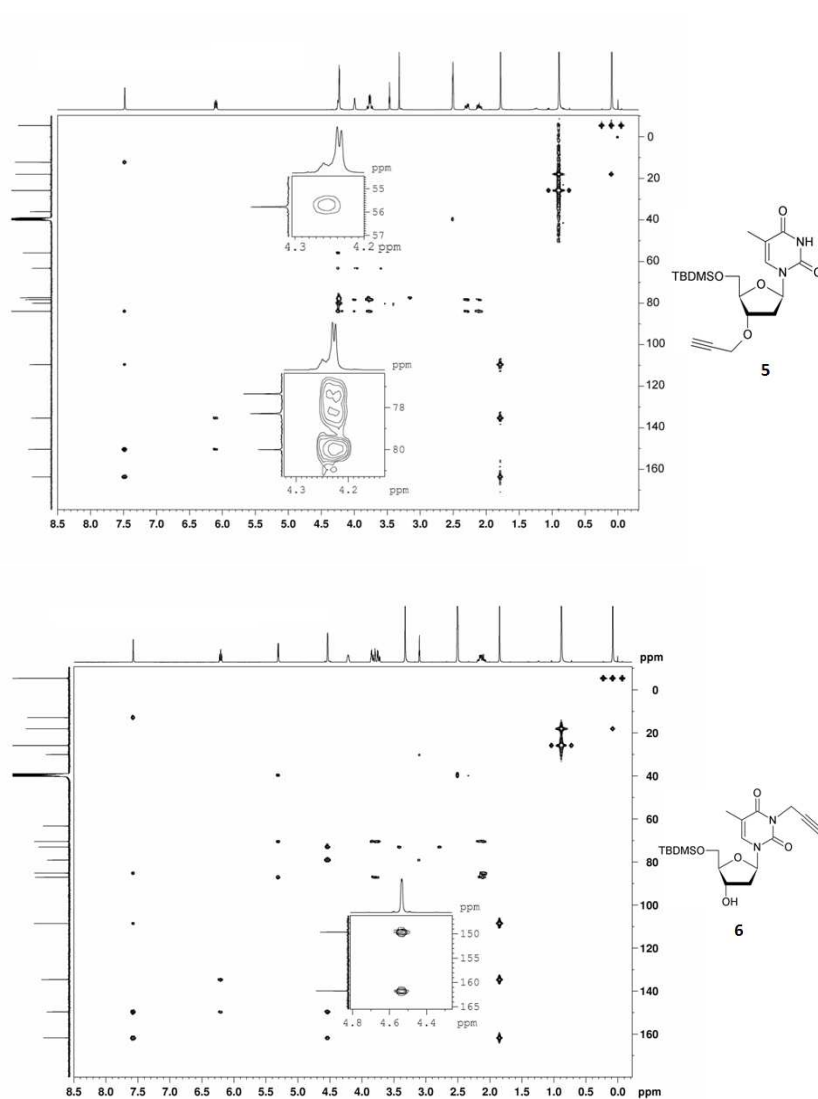


FIGURE 2.6 : Spectre HMBC ^{13}C - ^1H dans le cas des composé 5 (spectre du dessus) et 6

D'une part, concernant le composé 5, le couplage entre les protons (CH_2) du propargyle à 4,25 et 4,20 ppm avec le carbone $\text{C}_{3'}$ à 78,2 ppm prouve la fixation du propargyle sur l'oxygène de l'hydroxyle en position 3'.

D'autre part, concernant le composé 6, on peut noter le couplage des protons (CH_2) du groupe propargyle (à 4,51 et 4,55 ppm) avec les carbones C_2 (149,6 ppm) et C_4 (161,7 ppm) de la base, prouvant la fixation sur la position 3.

Les dérivés 11a et 11b, produits secondaires dans le cas de l'essai avec KH et le 18-couronne-6, ont été caractérisés par spectroscopie de RMN (Tableau 2.3)

Tableau 2.3 : Données de RMN des composés **11a** et **11b** dans le DMSO d^6 (400 MHz)

Position	Composé 11a	Composé 11b
	δ_H (mult ; J en Hz)	δ_H (mult ; J en Hz)
Thymidine		
1'	6,17 (dd ; 6,0 ; 8,1)	6,19 (dd ; 6,2 ; 7,3)
2'	2,36 (ddd ; 2,0 ; 6,0 ; 13,8)	2,23 (dt ; 7,3 ; 13,2)
	2,17 (ddd ; 6,6 ; 8,1 ; 13,8)	2,13 (ddd ; 3,2 ; 6,2 ; 13,2)
3'	4,07 (m)	4,38 (m)
4'	4,15 (m)	3,82 (m)
5'	3,70 (dd ; 3,4 ; 10,5)	3,77 (dd ; 4,2 ; 11,3)
	3,63 (dd ; 4,0 ; 10,5)	3,71 (dd ; 3,9 ; 11,3)
Si-CH ₃ (3'-O et 5'-O)	-	0,09 (s)
	-	0,08 (s)
<i>t</i> -Bu (3'-O et 5'-O)	-	0,89 (s)
	-	0,88 (s)
6	7,69 (d ; 0,8)	7,53 (d ; 0,9)
CH ₃ (thymine)	1,78 (d ; 0,8)	1,85 (d ; 0,9)
Propargyles		
3-N-CH ₂	4,53 (d_{el} ; 2,1)	4,53 (m)
5'-O-CH ₂	4,25 ^a (m)	-
3'-O-CH ₂	4,24 ^a (m)	-
CH (3-N)	3,11 (t_{el} ; 2,4)	3,10 (t_{el} ; 2,4)
CH (5'-O)	3,52 ^a (t ; 2,3)	-
CH (3'-O)	3,49 ^a (t ; 2,3)	-

^a Valeurs interchangeable

Afin de valider les résultats observés dans le cas de la thymidine, nous avons étudié l'alkylation d'un deuxième nucléoside pyrimidique, la 2'-désoxyuridine.

2.2.1.3 Validation de la régiosélectivité avec la 2'-désoxyuridine

La première réaction de protection sélective de l'hydroxyle primaire de la 2'-désoxyuridine est similaire à celle décrite dans le cas de la thymidine. Elle est réalisée dans la pyridine à température ambiante, en présence de 1,5 équivalents de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle et d'une quantité catalytique de DMAP (0,05 éq.), pendant 10 h. La 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxyuridine (**12**) est obtenue après purification avec un rendement de 91% (Figure 2.7).

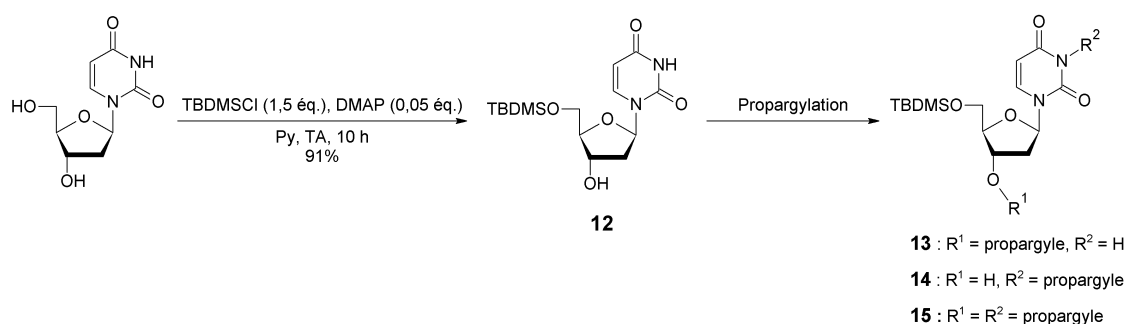


FIGURE 2.7 : Protection puis propargylation sélective de la 2'-désoxyuridine

L'analyse du spectre de RMN du proton nous indique, comme dans le cas de la thymidine, la fixation du groupe TBDMS par l'apparition de deux singulets, un correspondant au *t*-Bu à 0,87 ppm et un autre signal attribuable aux deux groupes méthyles à 0,07 ppm. La spectrométrie de masse confirme la structure par la présence d'un pic correspondant à l'espèce ionisée [MH]⁺ à *m/z* 343,0.

La 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxyuridine est ensuite alkylée en présence de bromure de propargyle et mène, suivant les conditions opératoires, aux composés 3'-*O*-alkylé **13**, 3-*N*-alkylé **14** ou 3-*N*,3'-*O*-dialkylé **15** (Tableau 2.4).

Tableau 2.4 : Propargylation de la 2'-désoxyuridine protégée en position 5'

NaH, RBr ^a (éq.)	Solvant	15-C-5 ^b (éq.)	13 ^c (%)	14 ^c (%)	15 (%)
2,5	THF	-	55	-	-
2,5	THF	3,5	-	-	82
1,2	THF	-	-	-	-
1,2	DMF	-	-	94	-

^a R = propargyle

^b Cf. Figure 2.4

^c Cf. Figure 2.7

Dans le cas du THF, on observe de nouveau que l'ajout de 3,5 équivalents de 15-couronne-5 conduit, en présence de 2,5 équivalents de NaH et de bromure de propargyle, au composé dialkylé avec un rendement de 82%. Sans éther-couronne la régiosélectivité usuelle est conservée : 55% de 2'-désoxyuridine protégée est alkylée sur l'oxygène en position 3' uniquement. Une quantité quasi-stoichiométrique d'hydrure de sodium et d'agent alkylant, sans éther-couronne, ne mène à aucune évolution comme précédemment. Dans le cas du DMF, sans éther-couronne, la sélectivité obtenue est identique à celle observée dans le cas de la thymidine, 94% de 2'-désoxyuridine étant alkylée sur l'azote en position 3 de la base.

Les produits **13**, **14** et **15** ont été caractérisés par spectroscopie de RMN du proton, et les corrélations ¹H-¹³C en HMBC affirment les positions d'alkylation respectives. La spec-

trométrie de masse confirme les structures des trois composés (cf. partie expérimentale, chapitre 2).

Les résultats d'alkylation sont donc conformes à ceux obtenus avec la thymidine protégée et restent en accord avec l'hypothèse faisant intervenir le cation sodium.

Après avoir confirmé la participation du sodium et la formation d'un intermédiaire présentant une chélation avec celui-ci, suite à la première étape de déprotonation, nous nous sommes intéressés plus exactement à la chélation et nous avons étudié la participation ou non de l'oxygène en position 5' de la partie glucidique.

2.2.2 Etude de la participation de l'oxygène en position 5'

Pour déterminer la participation ou non de l'oxygène en position 5' du furanose, il reste à discriminer les deux hypothèses faisant intervenir l'ion Na^+ (Figure 2.8).

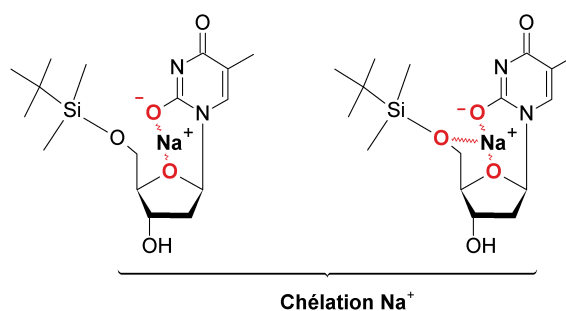


FIGURE 2.8 : Hypothèses de chélation

Dans le cas où le doublet de l'oxygène en position 5' participerait effectivement à la chélation, la forme anionique de l'hydroxyle de la partie glucidique déprotégée en position 5' interviendrait forcément, empêchant l'alkylation de cette position (Figure 2.9).

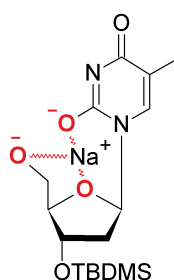


FIGURE 2.9 : Participation à la chélation de l'oxygène de l'hydroxyle en position 5'

Nous avons préparé la thymidine et la 2'-désoxyuridine protégées en position 3' afin d'étudier leur alkylation en position 5'.

2.2.2.1 Protection des positions 3' de la thymidine et de la 2'-O-désoxyuridine

La synthèse de la thymidine et de la 2'-désoxyuridine protégées en position 3' s'effectue en deux étapes (Figure 2.10) :

- tout d'abord une disilylation en présence de 2,2 équivalents de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle, 4,0 équivalents d'imidazole et 2,2 équivalents de nitrate d'argent dans un mélange 1 : 1 de DMF/THF, et ce pendant 3 h ;
- la thymidine disilylée **16** et la 2'-désoxyuridine disilylée **17** sont obtenues avec des rendements respectifs de 98% et 64%. Elles sont ensuite déprotégées sélectivement en position 5' en présence de *p*-toluènesulfonate de pyridinium (PPTS) dans le méthanol anhydre pendant 22 heures. La 3'-*O-tert*-butyldiméthylsilylthymidine **18** et la 3'-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxyuridine **19** sont obtenues avec des rendements respectifs de 73% et 60%.

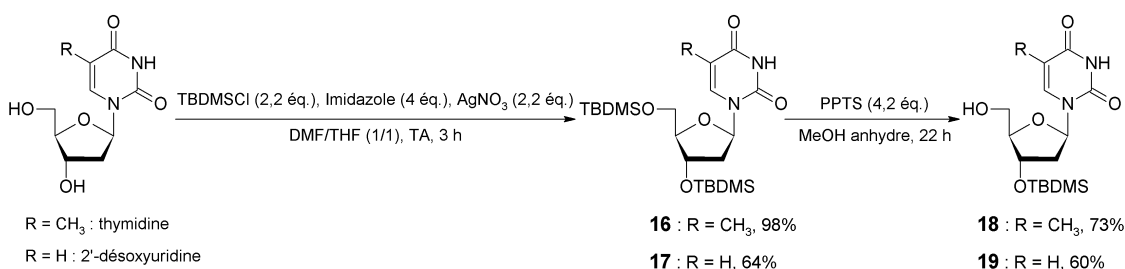


FIGURE 2.10 : Monoprotection de l'hydroxyle en position 3'

Les composés **16** à **19** ont été caractérisés par spectroscopie de RMN du proton. On observe l'apparition des signaux caractéristiques du proton de l'hydroxyle en position 5' à 5,07 ppm pour le composé **18** et 5,05 ppm pour le composé **19**. La spectrométrie de masse confirme la structure des quatre composés (cf. partie expérimentale, chapitre 2).

2.2.2.2 Propargylation et éther couronne

Les composés **18** et **19** ont été alors propargylés régiosélectivement dans les mêmes conditions que précédemment.

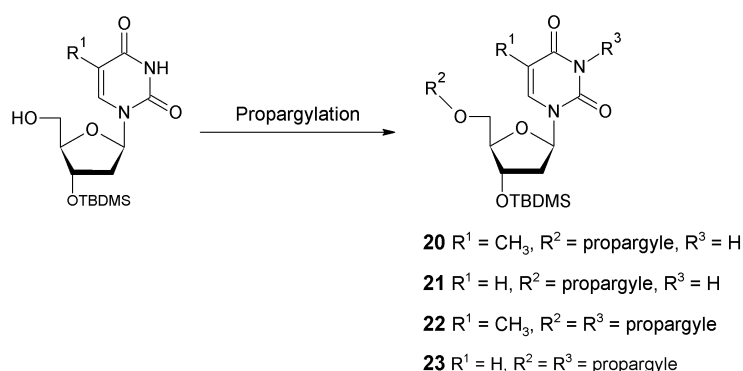


FIGURE 2.11 : Propargylations sélectives

Dans le cas de la thymidine comme dans celui de la 2'-désoxyuridine, on constate une alkylation régiosélective de l'oxygène de la position 5', dans le THF, et ce avec des rendements variant de 62% à 63% (Tableau 2.5).

Tableau 2.5 : Propargylation de la 2'-désoxyuridine et de la thymidine protégées en position 3'

NaH, RBr ^a (éq.)	15-C-5 ^b (éq.)	20 (21)^c (%)	22 (23)^c (%)
2,5	-	63 (62)	-
2,5	3,5	-	82 (60)
1,2	-	-	-

^a R = propargyle

^b Cf. Figure 2.4

^c Cf. Figure 2.11

L'ajout de 3,5 équivalents de 15-couronne-5 conduit aux composés dipropargylés **22** et **23**. Enfin, la réaction conduite sans éther couronne et en présence d'une quantité stoechiométrique de réactifs ne mène de nouveau à aucune réaction. La facilité de propargylation de l'oxygène en position 5' montre donc qu'il ne chélate pas le sodium. L'intermédiaire, faisant intervenir uniquement la chélation du sodium par l'oxygène du cycle furanose et l'oxygène de la forme tautomère déprotonée de la base pyrimidique, correspond aux résultats expérimentaux obtenus.

2.2.3 Proposition de mécanisme

Les résultats d'alkylation obtenus avec les nucléosides protégés en position 3' nous ont permis de proposer un mécanisme réactionnel. Ce mécanisme (Figure 2.12) est décrit dans le cas d'un solvant de faible constante diélectrique.

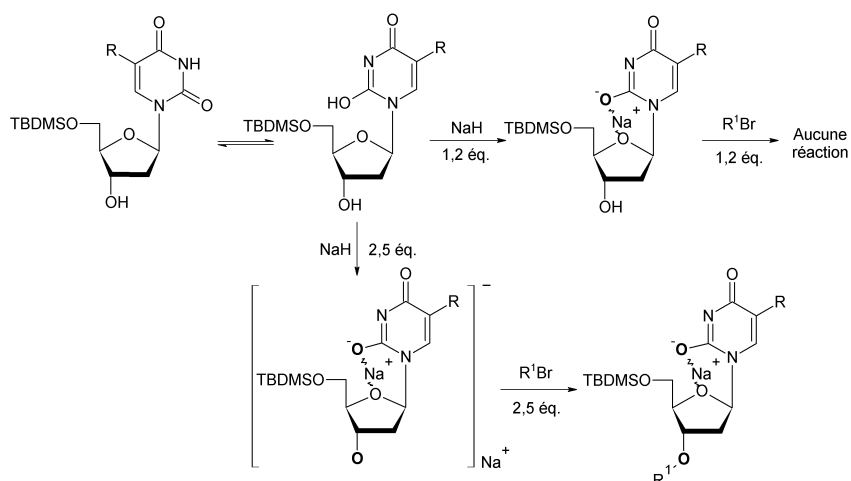


FIGURE 2.12 : Proposition de mécanisme dans le cas du THF montrant la formation du composé 3'-O alkylé

Nous nous sommes intéressés à l'intermédiaire réactionnel afin d'effectuer de la diffraction des rayons X, pour confirmer sa structure. La 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine a été mise en présence d'hydrure de sodium (1,2 éq.) et activée par sonication pendant 20 minutes. Le milieu réactionnel est alors évaporé à sec à TA. Plusieurs essais de recristallisation n'ont pas abouti. Nous nous sommes ainsi tournés vers une étude théorique de la réactivité, afin de valider l'hypothèse avancée.

Chapitre 3

Etude théorique de l'alkylation régiosélective de nucléosides pyrimidiques

La modélisation a été réalisée sous la direction du Dr Hélène Gérard au Laboratoire de Chimie Théorique (LCT) de l'Université Pierre et Marie Curie à Paris.

L'étude bibliographique montre que l'interaction entre le cation sodium et les acides nucléiques a été examinée dans le cas d'édifices nucléosidiques neutres. Ces études ont concerné notamment l'évolution de la liaison *N*-glycosidique, et de la conformation de la partie glucidique, en phase gaz, dans le cas d'interactions de la cytidine et de la 2'-désoxycytidine avec les cations Li^+ , Na^+ et K^+ .⁵⁷ D'autres travaux de chimie quantique, couplés à la spectrométrie de masse, traitent des affinités du cation sodium avec les bases nucléiques ou les nucléosides, et ce en phase gaz.⁵⁸⁻⁶⁰ Afin de comprendre la régiosélectivité observée lors de la réaction d'alkylation de nucléosides pyrimidiques, nous avons utilisé des modèles simplifiés notés **M-H**. Ces derniers miment le nucléoside, la base ou une partie de la base. Nous avons donc considéré la stabilité de divers intermédiaires obtenus après déprotonation par NaH pour former **[M-Na]**. L'étude des chemins de réaction a également été entreprise. L'influence du solvant sera systématiquement établie dans chacun des cas.

3.1 Nécessité de modèles

3.1.1 Choix d'une approche quantique

Le choix d'une méthode de calcul est un préliminaire indispensable à toute modélisation théorique. Les interactions ADN-cation peuvent être décrites en mécanique moléculaire par des champs de forces spécifiques adaptés. La méthode est peu coûteuse et permettrait de faire des calculs sur des systèmes de grande taille. Cependant les champs de forces sont paramétrés pour des bases neutres et non chargées négativement. Le système

que nous étudions mettant en jeu une paire d'ion, le champ de forces ne sera vraisemblablement pas adapté. De plus la régiosélectivité peut être induite non par la structure de l'intermédiaire mais par sa réactivité. Il est donc préférable de réaliser l'étude en utilisant une méthode quantique de représentation des électrons. Les calculs théoriques présentés ont été effectués à l'aide du programme *Gaussian 03*,⁶¹ par la méthode de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) au niveau B3LYP.⁶²⁻⁶⁴ La base utilisée est la base polarisée 6-31+G**. En effet, le système étudié étant une paire d'ion, l'utilisation d'orbitales diffuses est nécessaire pour représenter correctement l'anion. La nature des extrema (minimum ou état de transition) a été déterminée par le calcul et l'analyse des fréquences et des modes normaux de vibration. Enfin la modélisation de composés bromés nous a conduits à utiliser un pseudopotentiel afin de modéliser l'effet de l'important cortège électronique des électrons de coeur. Le pseudopotentiel LANL2DZ et la base associée ont été utilisés. Une orbitale *d* diffuse est ajoutée afin de prendre en compte correctement les paires libres et le caractère anionique des intermédiaires et états de transition.

3.1.2 Simplification des substrats de départ

Afin de réduire le coût en temps de calcul, la 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine **1** et la 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxyuridine **12** ont été remplacées par un grand modèle (Figure 3.1).

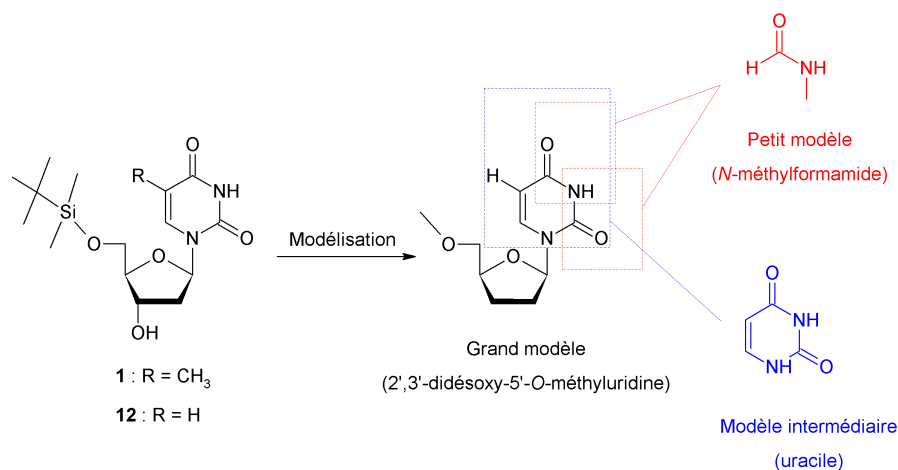


FIGURE 3.1 : Simplification structurale des deux nucléosides silylés en position 5'

La fonction protectrice *tert*-butyldiméthylsilyle a été remplacée par un groupe méthyle, qui devrait mimer le groupe silylé en diminuant notablement les temps de calculs. D'autre part le groupe hydroxyle de la position 3' du ribofuranose a été retiré. En effet nous avons cherché à expliquer la réactivité ou non de l'azote en position 3 de la base, suivant les conditions opératoires (cf. chapitres précédents). La présence du groupe hydroxyle en position 3' ne s'avérait pas indispensable. Le grand modèle choisi a donc été la 2',3'-didésoxy-5'-*O*-méthyluridine. Il a été utilisé pour examiner les modes de chélation possibles du nucléoside avec Na⁺. L'uracile a ensuite constitué un modèle intermédiaire

(en poids moléculaire) dans le but de comparer la réactivité d'un nucléoside à celle de sa base seule correspondante. Du fait du grand nombre de conformations et de la nécessité de représenter le solvant, le *N*-méthylformamide *s-trans* a été choisi pour étudier les chemins réactionnels et s'est révélé être un bon candidat comme petit modèle dans le but de mimer la réactivité de l'azote en position 3 de la thymidine ou de la 2'-désoxyuridine.

3.1.3 Validation du petit modèle

Des optimisations de géométrie en phase gaz nous indiquent que le sodium se coordine en η^3 avec le petit modèle sous sa forme déprotonée (Figure 3.2).

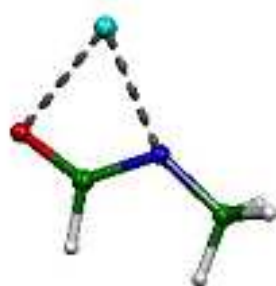


FIGURE 3.2 : Géométrie optimisée du petit modèle déprotoné chélatant le sodium en η^3

Deux modes de chélation ont pu être mis en évidence sur l'uracile en accord avec la littérature.⁵⁹ Les deux modes de coordination de l'uracile sont : η^3 en "haut" et η^3 en "bas" (Figure 3.3).

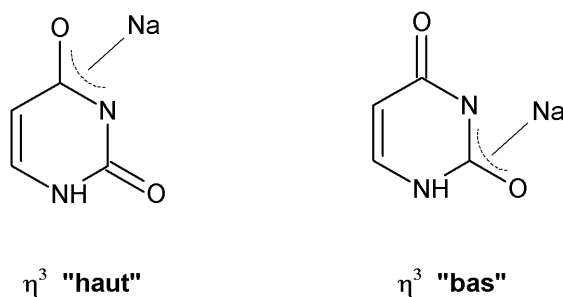


FIGURE 3.3 : Deux modes de chélation observés dans le cas de l'uracile

Les calculs nous indiquent que la coordination en "haut" est préférée par 2,7 kcal.mol⁻¹. D'autre part on peut observer une similarité structurale, lors de la chélation, entre le petit modèle et le modèle intermédiaire (Tableau 3.1).

Tableau 3.1 : Comparaison des géométries optimisées en phase gaz entre le petit modèle (PM) et le modèle intermédiaire (MI). Les distances sont en Å

Modèles	d(NaO)	d(OC)	d(CN)	d(NNa)
PM	2,19	1,28	1,32	2,25
MI (η^3 "en haut")	2,23	1,27	1,37	2,23
MI (η^3 "en bas")	2,26	1,27	1,34	2,23

Celle-ci nous permet de confirmer la possibilité d'utiliser le petit modèle pour étudier le mécanisme d'alkylation. A l'échelle théorique, parmi les hypothèses les plus plausibles, la régiosélectivité peut être gouvernée par la capacité coordinante du sodium, les effets stériques, ou la constante diélectrique. Nous avons choisi de considérer dans un premier temps l'influence du solvant sur la réactivité du petit modèle.

3.1.4 Solvants explicites et implicites

L'effet du solvant utilisé sur la régiosélectivité de l'alkylation nous a conduits à étudier l'impact du solvant lors des optimisations théoriques. Deux types de modélisation pour le solvant peuvent être pris en compte : explicite ou implicite. Dans le cas explicite, les molécules de solvants sont ajoutées au système modélisé dont elles augmentent la taille. On cherche alors à déterminer le nombre de molécules qui vont pouvoir se chélater à notre système en les ajoutant une par une. La réactivité proprement dite est étudiée sur le système ainsi défini. Dans le cas des solvants explicites, le THF a été remplacé par le diméthyléther (DME), ce dernier étant moins "cher" et stériquement proche. Dans le cas de solvant implicite, ce dernier est traité comme un continuum diélectrique avec une constante définie dans lequel une cavité est réalisée pour immerger la molécule.⁶⁵ Pour l'étude des solvants implicites, le DMF n'étant pas implémenté dans *Gaussian*, nous avons utilisé le DMSO qui existe par défaut.

Dans un premier temps nous avons entrepris d'étudier la réactivité sur le petit modèle : le *N*-méthylformamide.

3.2 Modélisation de la réactivité sur le petit modèle

Les chloroalcanes étant non réactifs, nous avons utilisé comme agent alkylant le bromure de méthyle. La réactivité a tout d'abord été étudiée sur le petit modèle en phase gaz. Dans toute la suite de l'étude, les optimisations seront effectuées avec la forme déprotonée du petit modèle.

3.2.1 Réactivité sur le petit modèle en phase gaz

Dans une première étape, le bromure de méthyle est coordonné au sodium. Le modèle limite de réaction utilisé a été la S_N2 .⁶⁶⁻⁶⁸ Quatre chemins réactionnels ont alors été envisagés :

- la *N*- ou la *O*-alkylation ;
- le passage par un état de transition (*TS*) de type Walden (avec inversion) ou par un transfert du méthyle avec rétention de configuration.

Les différents *IR*, *TS* et produits obtenus dans le cas de la *N*-alkylation sont représentés sur la figure 3.4.

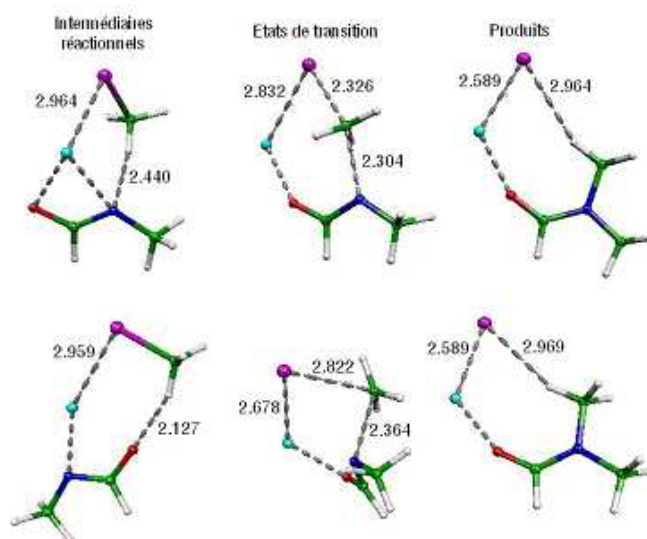


FIGURE 3.4 : Représentation des différents états énergétiques dans le cas de la *N*-alkylation avec inversion (en haut) ou rétention (en bas). Distances caractéristiques en Å

Dans les intermédiaires réactionnelles formés lors de la pré-coordination de CH_3Br , on constate que l'agent alkylant se place dans le plan du système η^3 avec une liaison hydrogène non classique entre le méthyle du bromure de méthyle et l'azote (l'oxygène) dans le cas de la *N*-alkylation avec inversion (avec rétention respectivement). Le passage à l'état de transition nécessite la rupture de la coordination η^3 de Na^+ , qui n'est plus coordonné qu'à l'oxygène (dans le cas de la *N*-alkylation) ou à l'azote (dans le cas de la *O*-alkylation). Dans le produit de réaction, la coordination de Na^+ au petit modèle est simplement η^1 : aucune interaction ne se fait avec la paire libre de l'azote située hors du plan.

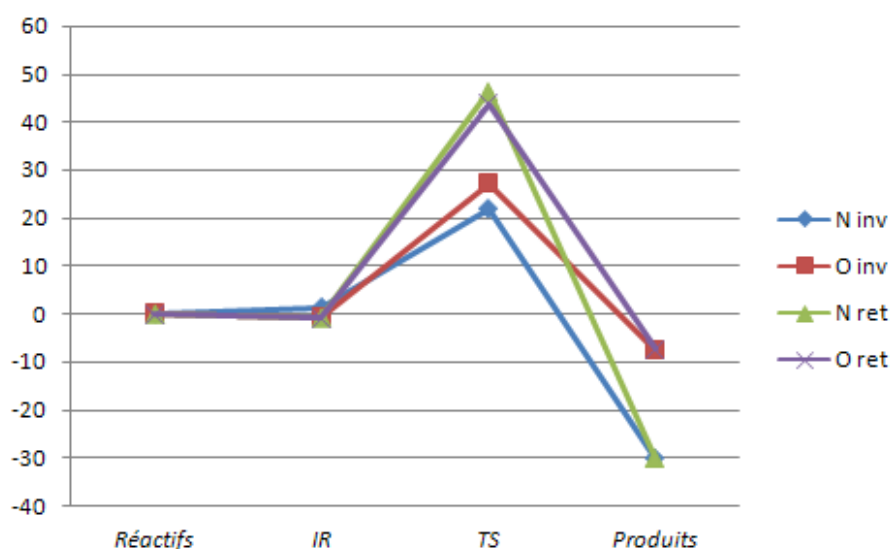


FIGURE 3.5 : Diagramme d'enthalpie libre (kcal.mol^{-1}) des quatre chemins réactionnels envisagés

Les profils des chemins réactionnels des quatre possibilités d'approche sont représentés figure 3.5. On constate que la *N*-alkylation est très favorisée thermodynamiquement comparée à la *O*-alkylation. D'autre part, la réaction passant par un état de transition de type Walden est préférée cinétiquement par plus de 10 kcal.mol^{-1} pour la *O*- et la *N*-alkylation, avec le même ordre de grandeur. En conséquence, la réaction d'alkylation passe uniquement par un chemin de type "inversion de Walden" avec inversion de configuration. En outre, la sélectivité pour la *N*-alkylation s'explique de la façon suivante. Du fait de la faible valeur de l'enthalpie libre de réaction pour la *O*-alkylation, son enthalpie libre d'activation est très proche dans le sens direct et dans le sens indirect : la réaction de *O*-alkylation est donc réversible. En revanche la *N*-alkylation n'est pas réversible car elle est très exothermique. En phase gaz, le produit de réaction cinétique ou thermodynamique est calculé comme étant un produit de *N*-alkylation (comme celui obtenu expérimentalement). Il est obtenu par un mécanisme de type Walden assisté par Na^+ .

Suite à ces premiers résultats, nous nous sommes concentrés sur l'influence du solvant sur la réactivité avec le petit modèle.

3.2.2 Modélisation implicite de la solvation

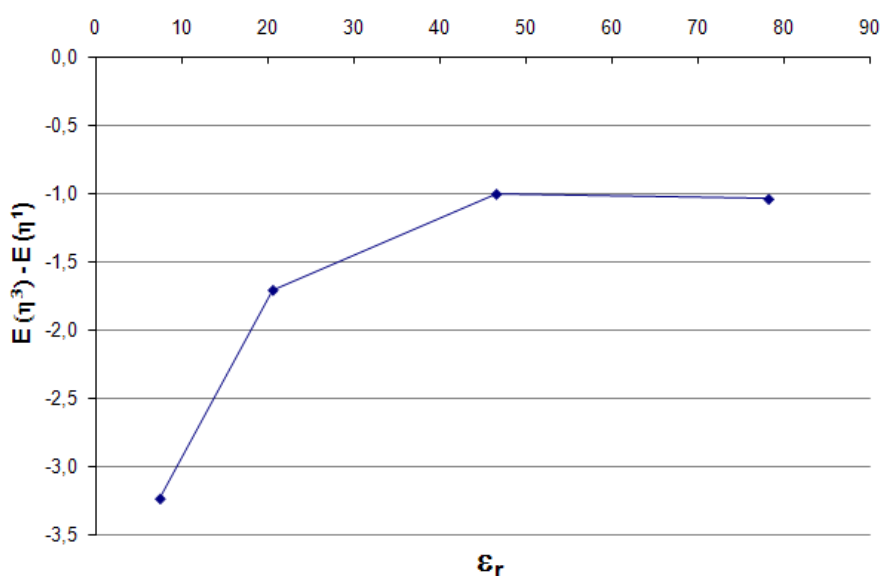
3.2.2.1 Structure de l'intermédiaire déprotoné

La structure de l'intermédiaire réactionnel déprotoné a été calculée pour plusieurs solvants (Tableau 3.2).

Tableau 3.2 : Solvants associés à leur constante diélectrique pour la solvataion implicite

Solvants	Constante diélectrique (ϵ_r)
H ₂ O	79,39
DMSO	46,7
Acétone	20,7
THF	7,58
Chlorobenzène	5,62
Chloroforme	4,9
Heptane	1,92

Une seule forme de l'intermédiaire a pu être optimisée dans le vide où le cation sodium se coordine en η^3 . Cette seule forme est également obtenue dans les solvants de ϵ_r inférieure à 7,58 (Figure 3.6). Quand la constante augmente, il est possible d'optimiser une forme linéaire η^1 coordonnée uniquement à l'oxygène en plus de la forme η^3 . Cette nouvelle forme apparaît pour le THF. Elle est également obtenue pour tous les solvants utilisés de ϵ_r supérieure. La forme η^3 reste cependant la plus stable et l'on atteint un palier vers -1 kcal.mol⁻¹. Il apparaît donc que la constante diélectrique du solvant peut jouer un rôle sur la formation des formes coordonnées en η^1 , et donc sur les états de transition décrits dans la figure 3.5. L'influence d'une représentation implicite de la solvataion sur le chemin réactionnel a donc été examinée par la suite.

FIGURE 3.6 : Diagramme de la différence en énergie (kcal.mol⁻¹) entre les formes η^3 et η^1 en fonction de la constante diélectrique du solvant

3.2.2.2 Modification du chemin réactionnel

Les états de transition de N- et O-alkylation avec ou sans rétention de configuration ont été localisés dans le cas de la solvataion implicite. Dans le cas de la rétention de

configuration, les états de transition nous indiquent peu de changements concernant la géométrie (Figure 3.7).

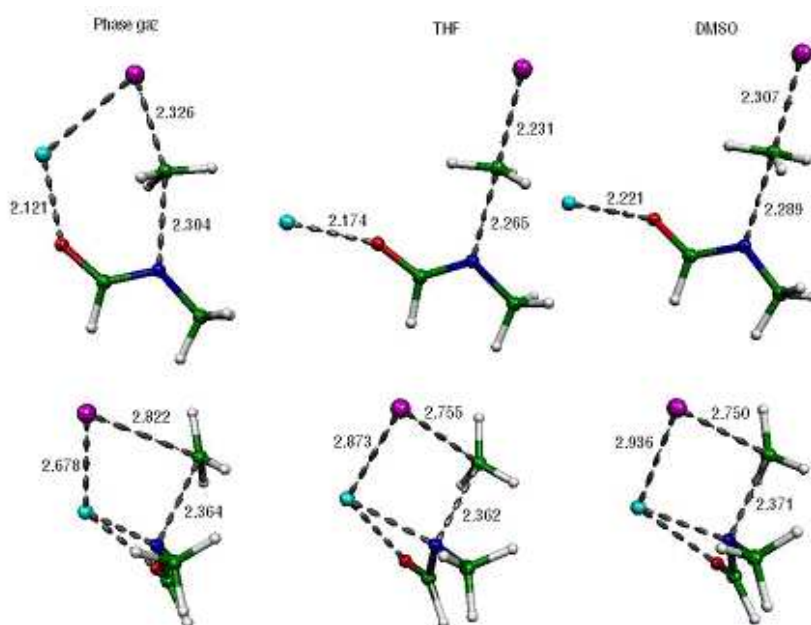


FIGURE 3.7 : Représentation des différents états énergétiques en fonction du solvant dans le cas de la N-alkylation avec inversion (en haut) ou rétention (en bas). Distances caractéristiques en Å

La structure η^3 de la coordination de Na^+ au système OCN est conservée, et les variations des paramètres géométriques restent mineurs. Le seul effet majeur est l'allongement de la distance de la liaison Na-Br lorsque la constante diélectrique du solvant augmente. Pour les états de transition avec inversion de configuration, la structure géométrique est complètement différente. En effet, on observe la disparition de la liaison entre le brome et le sodium lorsque l'on ajoute le continuum. Une structure linéaire est préférée comme dans le cas d'une $\text{S}_{\text{N}}2$ classique sans précoordination : le sodium est coordonné en forme η^1 . De plus on retrouve la distance de liaison Na-Br qui augmente avec la constante diélectrique du solvant. Les distances des liaisons Br-C et N-C sont diminuées comparées à la phase gaz, ce qui est compatible avec la disparition de l'interaction Na-Br et donc l'activation électrophile par Na^+ . Cependant ces mêmes distances augmentent lorsque l'on passe du THF au DMSO. En effet, le DMSO, plus dissociant, permet des distances plus grandes dans l'état de transition.

Une étude a été entreprise sur les différences énergétiques des états de transition par rapport aux produits séparés les plus stables (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Enthalpies libres des états de transition par rapport aux réactifs séparés (kcal.mol^{-1})

TS	Phase Gaz	THF	DMSO
N inv	10,5	11,1	16,1
O inv	15,5	19,5	24,4
N ret	36,3	43,4	48,4
O ret	34,1	43,9	48,8

On constate que l'augmentation de la constante diélectrique va de pair avec une hausse de la barrière d'activation des S_N . La réaction est donc de plus en plus défavorisée lorsque le solvant devient plus polaire. Cette évolution apparaît en contradiction avec la régiosélectivité observée expérimentalement. En effet la *N*-alkylation devrait être observée dans un solvant polaire et dissociant tel que le DMF.

La solvation implicite joue donc un rôle important sur le chemin réactionnel de la S_N . Dans le nucléoside, l'environnement constitué du solvant et du sucre va cependant nous contraindre à effectuer une reproduction explicite du solvant pour examiner la compétition entre les deux modes de chélation. Il convient donc dans un premier temps de confronter les résultats obtenus avec ceux utilisant une représentation explicite.

3.2.3 Modélisation explicite du solvant

3.2.3.1 Prise en compte de l'échange solvant/MeBr

Dans le cadre d'un modèle implicite de la solvation, et si l'on veut modéliser un mécanisme avec activation électrophile par Na^+ , la première étape de la réaction d'alkylation, suite à la déprotonation, est l'échange d'une molécule de solvant par le bromure de méthyle. Le modèle le plus simple pour décrire cette insertion est d'utiliser la représentation explicite d'une seule molécule de solvant. Celle-ci est décoordinée afin de permettre l'entrée de CH_3Br (Figure 3.8).

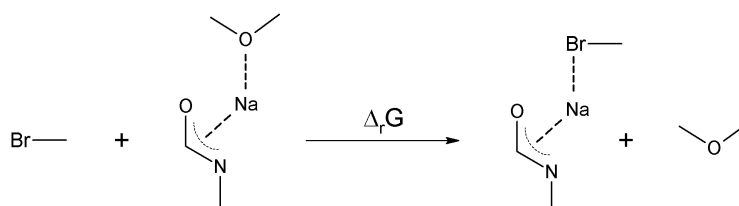


FIGURE 3.8 : Réaction d'échange du solvant DME par le bromure de méthyle

Dans le cas où il n'y a pas de solvant explicite supplémentaire sur le cation sodium, on trouve des enthalpies libres de coordination assez défavorables (Tableau 3.4).

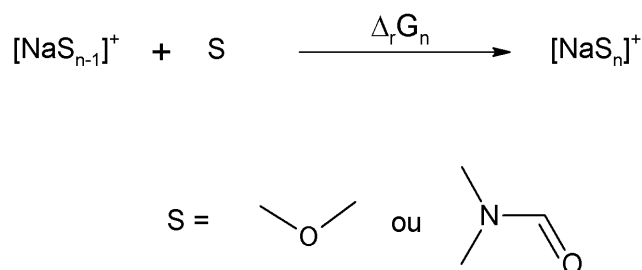
Tableau 3.4 : Enthalpies libres des réactions d'échange avec MeBr (kcal.mol^{-1})

Solvants	$\Delta_r G$
DME	5,0
DMF	9,7

Les enthalpies d'échange MeBr-solvants nous indiquent que l'agent alkylant remplace difficilement le DME ou le DMF. Ces valeurs sont en accord avec les résultats en solvation implicite : la pré-coordination de CH_3Br à Na^+ ne semble pas possible et la réaction doit se faire sans activation électrophile. Afin de représenter correctement le cation sodium dans les systèmes étudiés par la suite, nous avons cherché à déterminer, dans le cas du sodium seul, le nombre de molécules de solvant pouvant entourer le cation sodium.

3.2.3.2 Evaluation du nombre de molécules de solvant sur Na^+

Le nombre de molécules pouvant coordonner le sodium a été établi en phase gaz en examinant l'enthalpie libre des réactions présentées dans la figure 3.9.

**FIGURE 3.9 :** Réaction de coordination des solvants DME et DMF à Na^+

Les résultats indiquent que l'on peut coordonner jusqu'à au moins 3 molécules de DME sur le cation sodium (Tableau 3.5). Dans le cas du DMF, les énergies de coordination sont plus favorables que pour le DME.

Tableau 3.5 : Enthalpies libres des états de transition par rapport aux réactifs séparés (kcal.mol^{-1})

Enthalpies libres de coordination	DME	DMF
$\Delta_r G_1$	-19,9	-33,4
$\Delta_r G_2$	-15,1	-23,3
$\Delta_r G_3$	-7,9	en cours
$\Delta_r G_4$	en cours	en cours

La possibilité de coordination sur Na^+ s'avère faisable jusqu'à au moins deux molécules de solvants pour le DMF et trois molécules pour le DME. Des calculs en cours nous renseigneront sur la possibilité d'élargissement de la sphère de coordination.

3.2.3.3 Evaluation du nombre de molécules de solvant sur [MNa]

Le nombre de molécules pouvant coordiner le sodium a également été étudié en phase gaz sur le système [MNa] (Figure 3.10).

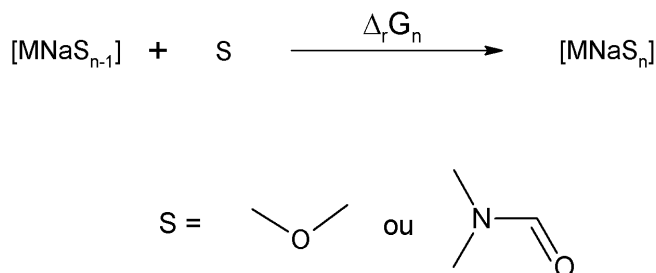


FIGURE 3.10 : Réaction de coordination des solvants DME et DMF à [MNa]

Les enthalpies de coordination obtenues sont beaucoup plus faibles que celles dans le cas de la coordination de Na^+ seul. Elles nous indiquent que la seconde molécule de solvant est flexible (Tableau 3.6). D'un point de vue explicite, le sodium pourrait être entouré par le petit système M^- et deux molécules de solvants, dont une pourrait être substituée par le bromure de méthyle.

Tableau 3.6 : Enthalpies libres des états de transition par rapport aux réactifs séparés (kcal.mol^{-1})

Enthalpies libres de coordination	DME	DMF
$\Delta_r G_1$	-3,7	-8,4
$\Delta_r G_2$	0,4	-1,7
$\Delta_r G_3$	+3,7	en cours

Ces premiers résultats de modélisation explicite du solvant nous montrent que l'on peut coordiner des fonctions éther. Ceci nous permet d'analyser qualitativement le type de structures attendues sur le système complet. Si le sodium reste coordonné à la partie anionique, seules une ou deux coordinations supplémentaires de fonctions éther sont attendues, trois potentiellement dans le DMF. S'il se décoordine de la partie anionique, on pourra atteindre jusqu'à la coordination de trois fonctions éthers. Il convient donc d'examiner la compétition entre une interaction du sodium avec le solvant et avec la partie sucre lors de l'étude du grand système.

3.3 Chélation de Na^+ par le sucre : utilisation du grand système

Les calculs menés sur le grand système ont été d'abord établis en phase gaz et en solvants implicites. Différents types de chélation ont été envisagés, mettant en jeu l'oxygène du furanose, les deux positions chélatantes en η^3 de la base, et l'oxygène du groupe protecteur méthoxyle.

3.3.1 Chélation en phase gaz

Les calculs effectués en phase gaz nous indiquent que la forme ouverte du nucléoside serait préférée pour chélater le sodium avec une différence d'énergie de 7 kcal.mol^{-1} (Figures 3.11 et 3.12).

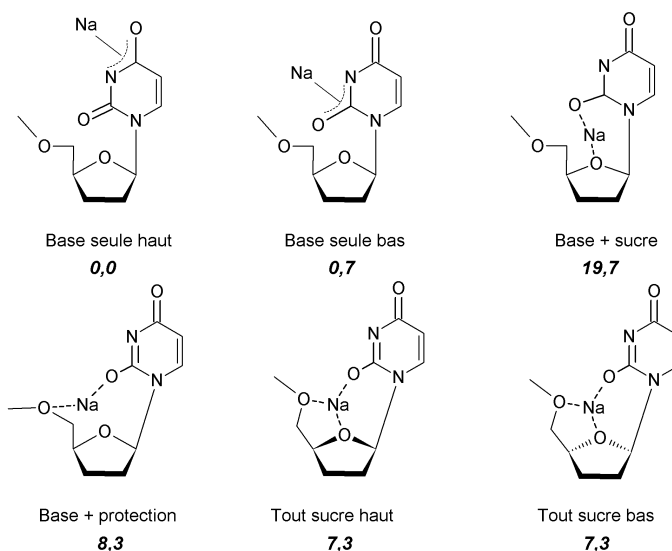


FIGURE 3.11 : Représentation schématique des différentes structures de chélation de Na^+ envisagées en phase gaz et énergies relatives des formes optimisées (kcal.mol⁻¹)

La participation du sucre paraît donc moins évidente en première approche. Il semble donc que la formation d'une structure où Na^+ interagit simultanément avec la partie base anionique et le sucre soit trop fortement contrainte stériquement pour être stabilisée en énergie.

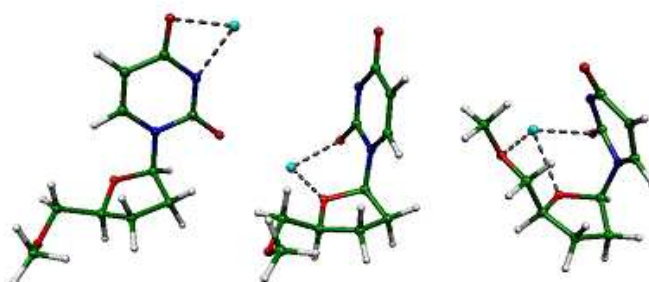


FIGURE 3.12 : Formes ouverte (gauche) et fermée (droite et centre) du grand modèle chélatant le sodium

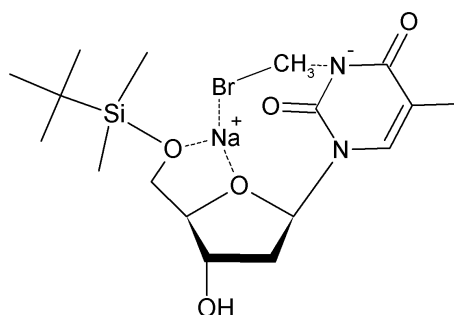
3.3.2 Chélation en solvation implicite

L'impact de la solvation sur ces structures a été examiné en utilisant une approche implicite de la solvation. Les structures de la Figure 3.11 ont été optimisées à nouveau dans deux solvants implicites : le THF et le DMSO. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.7.

Tableau 3.7 : Effets de la solvation implicite sur l'énergie relative (kcal.mol^{-1}) des différentes structures de la figure 3.11

Nom des structures	E(vide)	E(THF)	E(DMSO)
base seule haut	0,0	0,0	0,0
base seule bas	0,7	0,9	0,5
base + sucre	19,7	7,1	3,6
base + protection	8,3	10,1	Non obtenue
tout sucre haut	7,3	4,9	2,9
tout sucre bas	7,3	4,1	2,0

En phase gaze ou dans les solvants DMSO et THF, les structures faisant intervenir la base seule sont plus stables (jusqu'à 20 kcal.mol^{-1} de différence). L'écart énergétique s'affaiblit dans le cas du DMSO, et ce quelque soit la forme considérée. Quand on augmente la constante diélectrique du solvant, on constate donc une stabilisation des interactions du cation sodium avec le sucre et le groupe protecteur, puisque l'on diminue les distorsions en allongeant les distances $\text{Na-O}_{\text{furanose}}$. Il semble donc que la présence d'un solvant plus dissociant permet de décrocher Na^+ de la base tout en le laissant attachée à la partie sucre : un état de transition où CH_3Br est lié au Na^+ pourrait être envisagé (Figure 3.13). Les calculs sur cet état de transition sont en cours de réalisation.

**FIGURE 3.13 :** Etat de transition plausible

3.4 Conclusion

Les calculs utilisant la DFT entrepris en solvation implicite nous ont conduits, dans le cas du petit modèle, à un lien entre la constante diélectrique des solvants et la barrière énergétique des chemins réactionnels empruntés lors de la réaction $\text{S}_{\text{N}}2$ avec le bromure de méthyle. L'effet observé est inverse de celui obtenu expérimentalement lors de la comparaison entre le THF et le DMSO. L'utilisation d'une représentation explicite de la coordination a indiqué l'existence de structures à plus fort nombre de coordination sur Na^+ dans le cas du DMF, et donc a priori stériquement plus encombrées. Le passage à l'étude du grand système met notamment en évidence une interdépendance de la stabilité relative des différentes formes contre-intuitives, puisque les formes les moins coordonnées

sont défavorisées par l'utilisation de solvant à plus forte constante diélectrique. Ce comportement a pu être relié à l'augmentation de la distance de liaison Na-O_{furano} avec la constante diélectrique du solvant, qui permet de libérer les contraintes stériques. Un état de transition, mettant en jeu une triple chélation du sodium avec deux atomes d'oxygène et un atome de brome (lors de l'entrée du réactif) dans le cas des solvants les plus encombrés et les plus coordinants (DMF ou DMSO), inaccessible dans le THF, pourrait alors expliquer la régiosélectivité observée expérimentalement.

Troisième partie

**SYNTHESE D'UNE NOUVELLE
FAMILLE D'ANALOGUES
D'OLIGONUCLEOTIDES**

Chapitre 1

Synthèse d'oligonucléosides

Nous nous sommes intéressés à la synthèse d'oligomères de thymidine, avec une unité triazolique comme espaceur, que nous avons nommés "click generated DNA" (Cg-DNA). La fonctionnalisation des oxygènes en position 3' et 5' de la thymidine permet de générer les deux précurseurs azoture et alcyne.

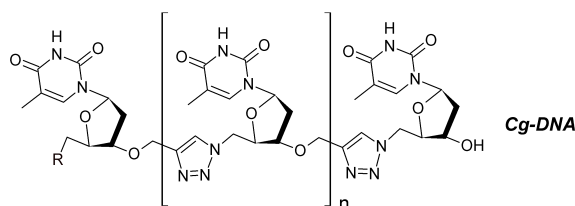


FIGURE 1.1 : Oligothymidine avec une unité 1,2,3-triazolique comme espaceur

1.1 Synthèse d'un dimère de thymidine par "click chemistry"

Dans un premier temps, nous avons étudié la synthèse de dinucléosides en utilisant la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre (I).

1.1.1 Rétrosynthèse du dimère de thymidine

Dans le but d'obtenir un dimère de thymidine, deux synthons pyrimidiques précurseurs sont nécessaires (Figure 1.2), le premier portant un azoture sur le carbone 5' **27**, le second correspondant au composé propargylé sur l'oxygène en position 3' **28**.

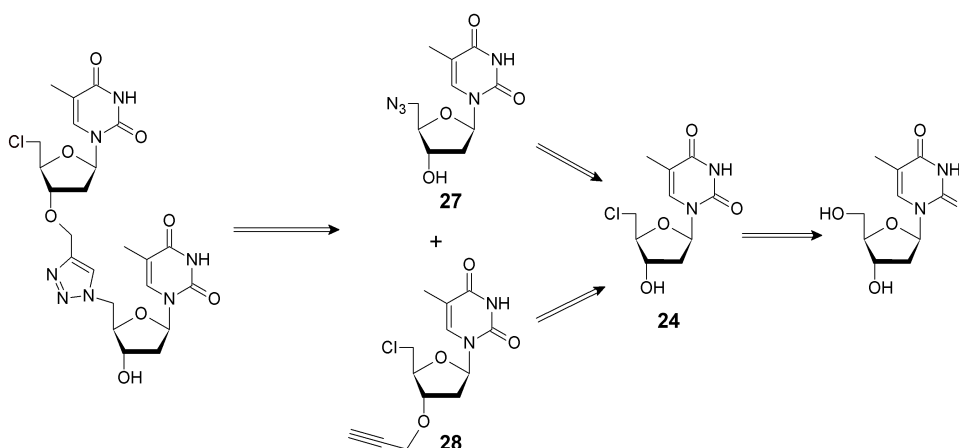


FIGURE 1.2 : Rétrosynthèse du dimère chloré en position 5'

Nous avons choisi comme substrat de départ la thymidine chlorée **24**. Ainsi le composé **27** peut être synthétisé par azidation, le composé **28** par propargylation sélective. Une réaction de "click chemistry", entre ces deux dérivés **27** et **28**, permettrait alors d'obtenir le dimère de thymidine chloré en position 5'.

1.1.2 Résultats et discussions

La première étape consiste à synthétiser le précurseur chloré en position 5' de la thymidine **24**. Sa préparation nous a permis d'introduire une nouvelle méthode rapide et efficace de chloration sélective de nucléosides pyrimidiques.

1.1.2.1 Méthodes d'halogénations sélectives

La conversion d'alcools en halogénures correspondants est une des transformations les plus décrites en synthèse organique.⁶⁹ Parmi les méthodes récentes d'halogénéation de fonctions alcools, nous pouvons citer notamment :

- le système SOX_2/DMF , avec X halogène, pour l'halogénéation sélective des pentono-1,4-lactones (Figure 1.3);^{70,71}
- le (chloro-phénylthio-méthylène)diméthylammonium (CPMA) pour l'halogénéation sélective d'alcools primaires (Figure 1.3);⁷²
- les systèmes $\text{KI}/\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ou ZrCl_4/NaI pour l'iodation sélective;^{73,74}
- des catalyseurs à base d'indium (InCl_3);⁷⁵
- les liquides ioniques diphenylphosphinites ("IL-OPPh₂") pour la bromation sélective d'alcools, triméthylsilyles ou éthers tétrahydropyranyles (Figure 1.3);⁷⁶
- le polyméthylhydroxysilane combiné au diiode pour l'iodation des alcools benzyliques primaires et secondaires (Figure 1.3).⁷⁷

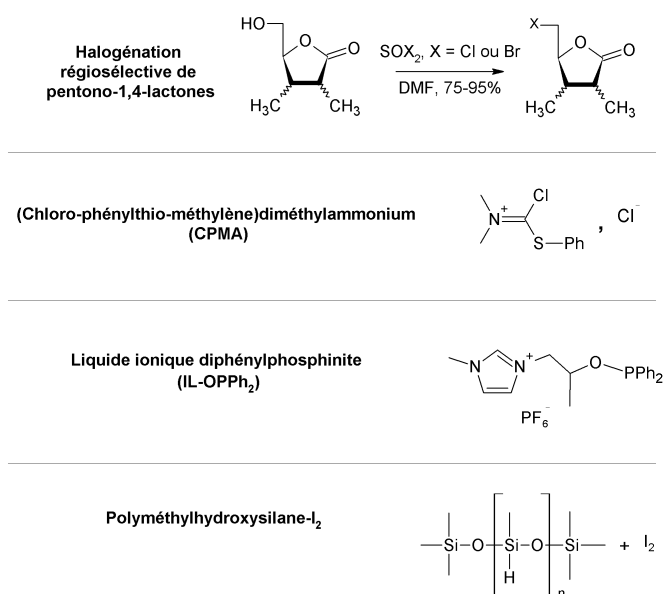


FIGURE 1.3 : Exemples de réaction ou réactifs pour l'halogénéation d'alcools

Toutefois, peu de méthodes sont décrites pour l'halogénéation et notamment la chloration sélective de groupes hydroxyles primaires, en particulier dans les nucléosides.

1.1.2.2 Nouvelle méthode de chloration sélective

Nous nous sommes intéressés à la chloration sélective du groupe hydroxyle primaire de nucléosides pyrimidiques (Figure 1.4).⁷⁸

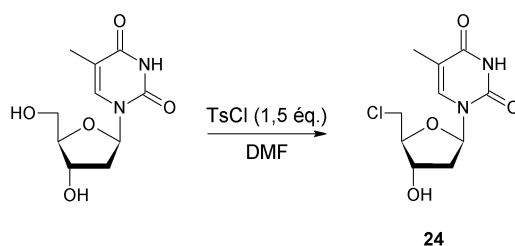


FIGURE 1.4 : Chloration sélective de la thymidine

Le premier composé synthétisé est la 5'-chloro-5'-désoxythymidine **24**. La chloration de la thymidine par le chlorure de tosyloxy (1,5 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide (8 mL) à 80 °C, et ce durant 5 h, donne après évaporation et purification par chromatographie éclair le produit souhaité avec un rendement de 70% (Tableau 1.1, essai 1).

Tableau 1.1 : Résultats de la chloration sélective de la thymidine

Essai	Activation ^a	Temps de réaction	Rendement
1	Chauffage classique	5 h	70%
2	Micro-ondes	1 min	85%

^a Conditions : MO : 300 W, 80 °C ; cf Figure 1.4

Dans le cas de l'activation par irradiations micro-ondes, la thymidine disparaît complètement après seulement une minute à 300 W et 80 °C. Le composé **24** est alors obtenu avec un rendement de 85% (Tableau 1.1, essai 2).

La structure de la 5'-chloro-5'-désoxythymidine a été établie par spectroscopie de RMN et confirmée par la spectrométrie de masse. Le spectre montre notamment la présence des espèces protonées $[MH]^+$ à m/z 261,1 et m/z 263,1 dues aux isotopes du chlore.

Afin de confirmer la méthode, nous avons appliqué la même réaction à deux autres composés pyrimidiques (Figure 1.5).

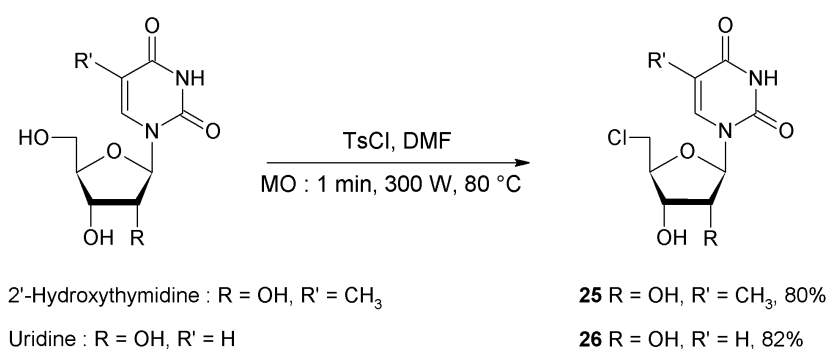


FIGURE 1.5 : Chloration sélective de nucléosides pyrimidiques

La chloration de la 2'-hydroxythymidine dans les mêmes conditions d'activation par irradiations micro-ondes donne le composé **25** avec un rendement de 80% (Tableau 1.2, essai 1). La spectrométrie de masse montre à nouveau la présence des espèces ionisées $[MH]^+$ à m/z 277,0 et m/z 279,0 ainsi que $[MNH_4]^+$ à m/z 294,0 et m/z 296,0.

Tableau 1.2 : Résultats de la chloration sélective de nucléosides pyrimidiques

Essai ^a	Produit de chloration	Rendement
1	25	80%
2	26	82%

^a Conditions : MO : 1 min, 300 W, 80 °C ; cf Figure 1.5

Le composé **26** est obtenu à partir de l'uridine avec un rendement de 82% (Tableau 1.2, essai 2). Les ions moléculaires $[MH]^+$ et $[MNH_4]^+$ sont à nouveau observés (m/z 263,0 et m/z 265,0, m/z 280,0 et m/z 282,0).

Outre le faible temps de réaction par activation micro-ondes, un des intérêts de la chloration sélective décrite ci-dessus est l'absence de traitement du brut réactionnel (simple évaporation) et l'obtention d'un produit unique, le nucléoside 5'-chloro-5'-désoxypyrimidique correspondant.

Après avoir montré la reproductibilité de cette chloration sélective, nous nous sommes intéressés, dans un second temps, à l'étude mécanistique.

1.1.2.3 Proposition de mécanisme

Le mécanisme que nous proposons est discuté dans le cas de la thymidine. En accord avec McCormick et coll.,⁷⁹ et par analogie avec la réaction de Vilsmeier-Haack, la première étape du mécanisme correspond à la formation du chlorure de *O*-(*p*-toluènesulfonyl)-*N,N*-diméthylacetimmonium **A** (Figure 1.6). La deuxième étape consisterait en l'attaque de l'anion chlorure sur le carbone électrophile du groupe immonium, provoquant ainsi le départ de l'ion tosylate. L'hydroxyle primaire de la thymidine réagit, à son tour, sur le même carbone de l'immonium, conduisant, après substitution nucléophile du chlorure sur le carbone de la position 5' de la thymidine, et régénération du DMF, à la 5'-chloro-5'-désoxythymidine **24**.

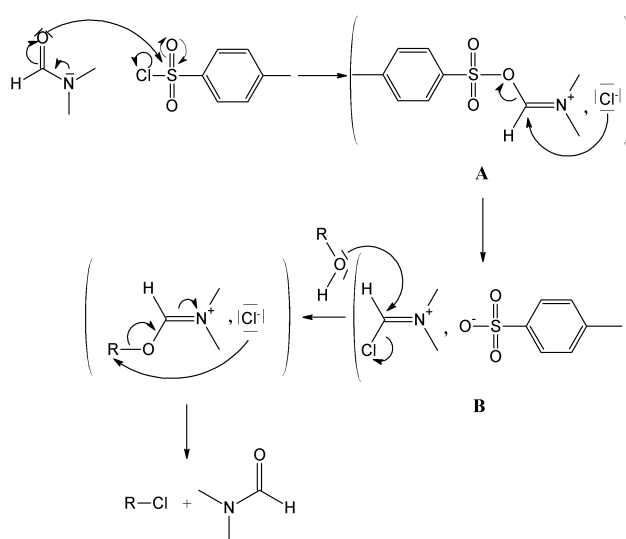


FIGURE 1.6 : Mécanisme proposé de la chloration sélective

Dans l'optique de confirmer ce mécanisme, et afin de montrer la formation de l'intermédiaire **B**, nous avons mis en présence le chlorure de tosylate et le DMF. Une activation par irradiations micro-ondes a été ensuite effectuée durant 1 min à 300 W et 80 °C. Après évaporation, le produit a été analysé. La spectroscopie de RMN du proton et du carbone confirme la structure du sel d'immonium **B** (Tableau 1.3).

Tableau 1.3 : Analyse du spectre de RMN de l'intermédiaire réactionnel

Attribution	^1H δ (ppm) multiplicité (J(Hz))	^{13}C δ (ppm)
H-C=N ⁺	8,34 s	165,1
C _{4ar}	-	141,8
C _{1ar}	-	139,0
C _{ar} -H ₂ et C _{ar} -H ₆	7,72 d (8,0)	126,2
C _{ar} -H ₃ et C _{ar} -H ₅	7,17 d (8,0)	129,2
H ₃ C-N ⁺	3,14 s	39,1 ^a
H ₃ C-N ⁺	3,00 s	33,6 ^a
H ₃ C-Ar	2,35 s	21,4

^a Valeurs interchangeables

Le mécanisme proposé semble donc cohérent de part la mise en évidence de l'intermédiaire réactionnel **B**. La chloration sélective, rapide et avec un bon rendement nous a ainsi permis de continuer la synthèse vers le dimère de thymidine.

1.1.2.4 Préparation de la 5'-azido-5'-désoxythymidine

Le précurseur azidé **27** est synthétisé à partir de la 5'-chloro-5'-désoxythymidine **24** à l'aide d'une réaction de substitution nucléophile (Figure 1.7).

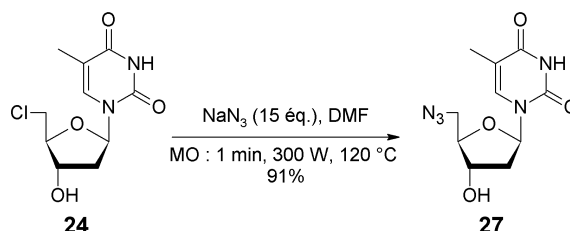


FIGURE 1.7 : Synthèse de la 5'-azido-5'-désoxythymidine

La réaction est effectuée dans le DMF en présence d'un large excès d'azoture de sodium. Une seule minute d'activation par irradiations micro-ondes permet la transformation totale du produit de départ. Après évaporation à sec, puis purification, on obtient le composé azidé **27** avec un rendement de 91%. La 5'-chloro-5'-désoxythymidine et la 5'-azido-5'-désoxythymidine présentent le même rapport frontal en CCM.⁸⁰ Toutefois la révélation sur CCM des fonctions azido a été réalisée à l'aide du système $\text{PPh}_3/\text{Et}_2\text{O}/\text{ninhydrine}$ (Figure 1.8).

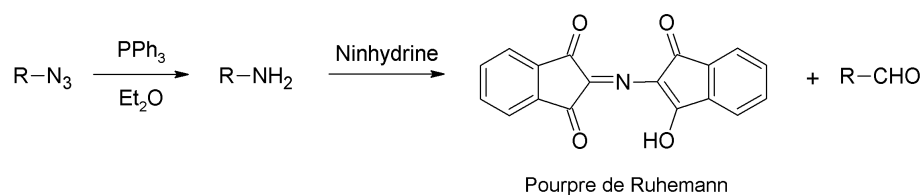


FIGURE 1.8 : Révélation de la fonction azoture de la thymidine

La première étape de cette révélation est une réduction de Staudinger qui transforme l'azoture en amine primaire.^{81,82} Il s'en suit une réaction avec la ninhydrine qui, en présence de chauffage (plaque chauffante), forme le pourpre de Ruhemann. La fonction amine, à la différence de la fonction chlorure, est révélée sélectivement, ce qui montre la formation du composé azidé.

Par comparaison avec le dérivé chloré, le spectre de RMN du proton indique un léger blindage des hydrogènes en position 5' de 3,87 et 3,78 à 3,58 et 3,53 ppm. La spectroscopie infrarouge montre l'apparition d'une bande de vibration à 2104 cm^{-1} caractéristique du groupe azido ($-\text{N}_3$).

1.1.2.5 Préparation de la thymidine chlorée et propargylée

Le second précurseur **29** est obtenu par propargylation sélective du composé **24** selon la méthode précédemment décrite, en utilisant l'activation par sonication (Figure 1.9).

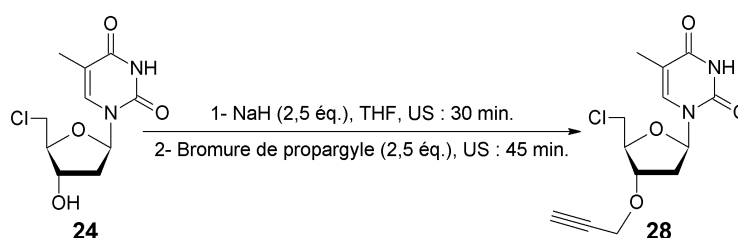


FIGURE 1.9 : Essai de synthèse du précurseur propargylé

Dans une première étape le composé chloré **24** est mis en présence de 2,5 équivalents d'hydrure de sodium dans le THF, puis la réaction est activée pendant 30 minutes. L'hydrure de sodium génère ainsi l'alcoolate correspondant en position 3', qui va, dans un second temps, subir une réaction de Williamson avec 2,5 équivalents de bromure de propargyle (cf chapitre 1, partie II). Toutefois, des activations successives, et l'ajout de 2,5 équivalents supplémentaires de bromure de propargyle, n'ont conduit à aucune évolution visible par CCM. Plusieurs essais ont été réalisés sans aucune amélioration.

Cette réaction conduisant à des résultats décevants, une modification de la stratégie de synthèse a été alors envisagée pour préparer le précurseur **28**. L'utilisation du substrat silylé et propargylé **5**, déjà synthétisé précédemment, est une autre voie envisageable pour la synthèse du composé **28**.

1.1.2.6 Nouvelle voie de préparation du précurseur chloré et propargylé

Le synthon de départ est la 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine propargylée en position 3' **5**, dont la synthèse a été développée lors des chapitres 1 et 2, concernant l'alkylation régiosélective. La déprotection de la position 5', suivie d'une chloration sélective de l'hydroxyle, peut ainsi mener à la 5'-chloro-5'-désoxy-3'-*O*-(prop-2-ynyl)thymidine **28** (Figure 1.10).

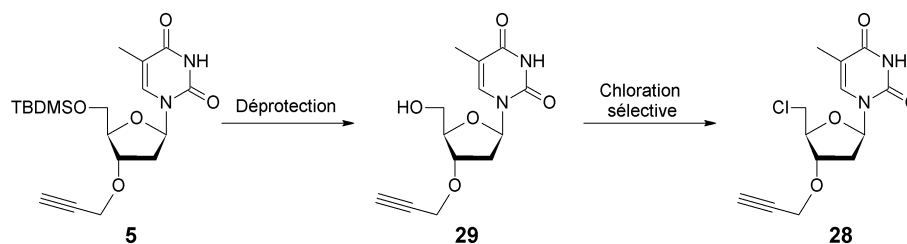


FIGURE 1.10 : Nouvelle voie de préparation du composé **28**

1.1.2.6.1 Déprotection de l'hydroxyle en position 5'

La déprotection du composé **5** libère l'hydroxyle primaire en position 5' (Figure 1.11).

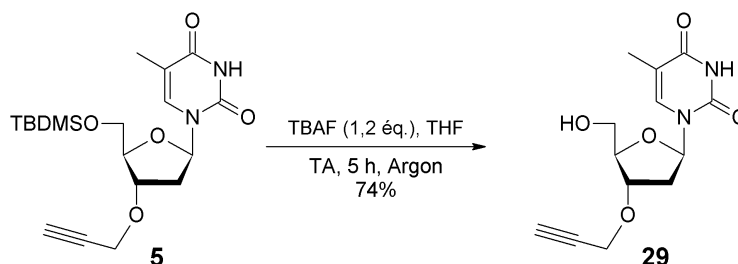


FIGURE 1.11 : Synthèse de la 3'-*O*-propargylthymidine

Le fluorure de tétrabutylammonium (1,2 équ.) dans le THF ajouté au composé silylé **5**, conduit, au bout de 5 h, et après purification, à la thymidine propargylée **29** avec un rendement de 74%.

Le spectre de RMN du proton indique l'apparition du proton de l'hydroxyle primaire sous forme de triplet à 5,12 ppm conjointement à la disparition des signaux caractéristiques du *tert*-butyldiméthylsilyle. La spectrométrie de masse confirme la structure du composé **29** ($[MNa]^+$ m/z 303,1).

1.1.2.6.2 Préparation de la 5'-chloro-5'-désoxy-3'-*O*-(prop-2-ynyl)thymidine

La chloration de la position 5' du composé **29** permet la formation de la 5'-chloro-5'-désoxy-3'-*O*-(prop-2-ynyl)thymidine **28** (Figure 1.12).

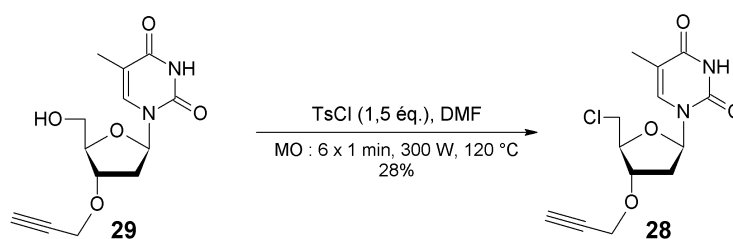


FIGURE 1.12 : Second essai de synthèse de la thymidine chlorée et propargylée

Celle-ci est réalisée, comme précédemment, dans le DMF en présence de 1,2 équivalents de chlorure de tosylo.

Après six activations, la CCM indique la présence persistante de nucléoside de départ. Une évaporation à sec, suivie d'une purification sur plaques de silice, conduisent au composé souhaité **28** avec un rendement faible de 28%.

L'analyse, par spectroscopie de RMN du proton dans le DMSO d_6 , met en évidence l'apparition à 3,47 ppm d'un proton acétylénique, à 4,22 ppm les deux protons méthyléniques (CH_2) et surtout la disparition du proton alcoolique, confirmant la fixation du groupe propargyle sur cette position. La spectroscopie infrarouge montre la présence d'une bande d'absorption caractéristique des alcynes (2120 cm^{-1}). Enfin la spectrométrie de masse confirme la structure avec un pic $[MNa]^+$ à m/z 321,1.

La variation des conditions opératoires n'a pas permis d'améliorer le rendement de la réaction. Nous avons alors envisagé d'utiliser la 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-3'-*O*-(prop-2-ynyl)thymidine **5** précédemment synthétisée. La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire peut être ensuite réalisée entre ce dernier composé et la thymidine azidée **27**. L'étape de chloration est alors effectuée, dans un second temps, sur le dimère déprotégé en position 5'.

1.1.3 Synthèse du dimère de thymidine

1.1.3.1 Rétrosynthèse de la dithymidine silylée

Le cheminement de la synthèse du dimère est similaire au précédent (Figure 1.13). La protection sélective de la position 5' de la thymidine reste l'unique différence. Après la propargylation sélective de la thymidine protégée **1**, les précurseurs **27** et **5** donnent le dimère 5'-*O*-silylé, lequel peut être ultérieurement déprotégé pour aboutir à la dithymidine avec un espaceur triazole (Figure 1.13).⁷⁸

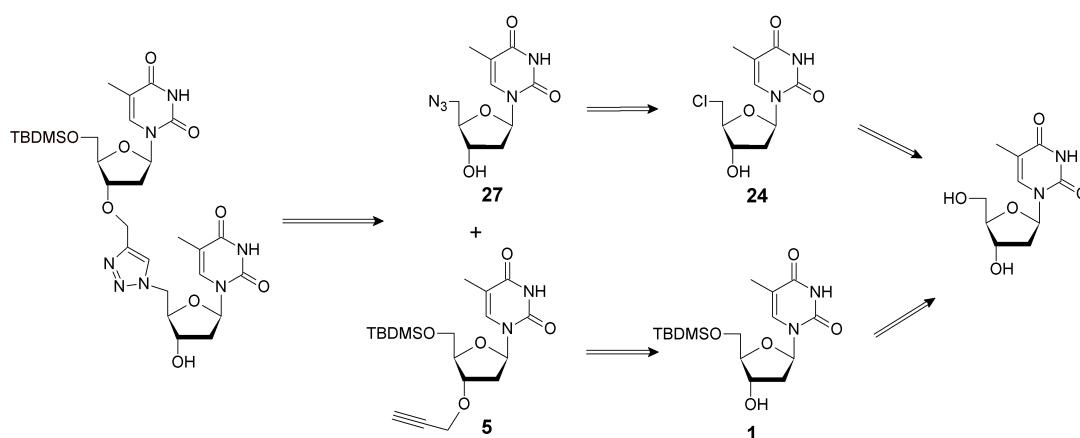


FIGURE 1.13 : Rétrosynthèse du dimère de thymidine silylé

1.1.3.2 Résultats et discussions

La synthèse des deux précurseurs **27** et **5** ayant été décrite précédemment, nous allons présenter l'étape clef de formation du triazole internucléosidique : la cycloaddition 1,3-dipolaire.

1.1.3.2.1 Synthèse de la dithymidine silylée par cycloaddition 1,3-dipolaire

Une étude de l'étape de cycloaddition 1,3-dipolaire entre les deux précurseurs **5** et **27** a été effectuée en utilisant deux systèmes de "click chemistry" (Figure 1.14) :

- L'iodure de cuivre (CuI) avec de la diisopropyléthylamine (DIPEA) dans le DMF.³³
- Le sulfate de cuivre pentahydraté (CuSO₄, 5H₂O) dans le mélange 1 : 1 H₂O/EtOH en présence d'un réducteur : l'ascorbate de sodium (Asc. Na).²⁶

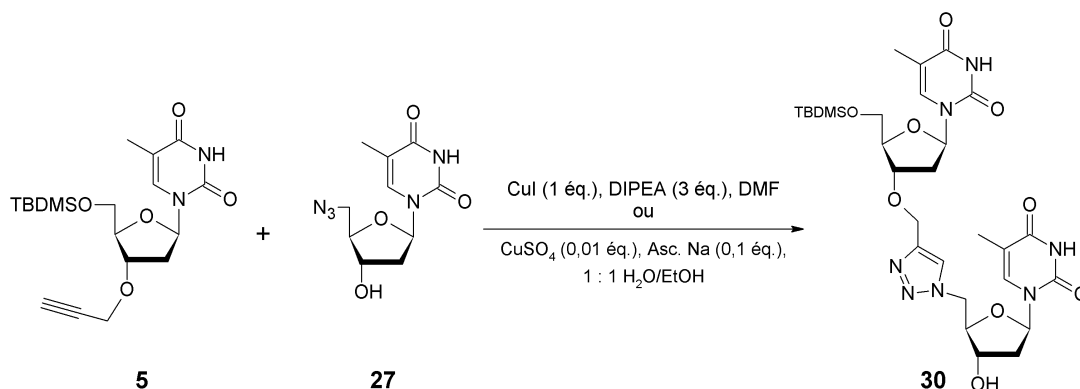


FIGURE 1.14 : "Click chemistry" vers la dithymidine

Le chauffage classique et l'activation micro-ondes ont été utilisés dans les deux cas. Les résultats (temps de réaction et rendements) sont résumés dans le tableau 1.4.

Tableau 1.4 : Résultats de la cycloaddition 1,3-dipolaire

Système de "click chemistry"	Activation	Temps de réaction	Rendement (%)
Système 1	TA	24 h	36
CuI (1 éq.),	TA	72 h	36
DIPEA (3 éq.),	80 °C	5 h	61
DMF	MO : 200 W, 80 °C	1 min	66
	MO : 200 W, 80 °C	3 min	85
Système 2	TA	24 h	40
CuSO ₄ (0,01 éq.),	TA	72 h	44
Asc. Na (0,1 éq.)	80 °C	5 h	80
H ₂ O/EtOH	MO : 200 W, 80 °C	1 min	62
	MO : 200 W, 80 °C	3 min	80

Avec le système 1 comportant l'iodure de cuivre, le meilleur rendement est obtenu avec l'activation par irradiations micro-ondes en seulement trois minutes (85%). Lorsque la réaction est conduite à température ambiante, la CCM montre l'apparition d'un produit secondaire en plus du composé attendu **30**.

La dithymidine silylée **30** a été caractérisée par spectroscopie de RMN du proton en particulier. L'hydrogène du triazole apparaît sous forme d'un singulet caractéristique à 8,09 ppm. Le spectre de RMN du carbone nous indique l'apparition de deux signaux à 143,7 et 124,7 correspondant aux deux carbones du triazole. La spectrométrie de masse confirme la structure ($[MH]^+$ m/z 662,3).

Des analyses par spectroscopie de RMN et spectrométrie de masse du produit secondaire concordent avec une structure hypothétique dinucléaire de cuivre (Figure 1.15), structure déjà décrite dans la littérature comme étant un intermédiaire réactionnel instable.^{36,83}

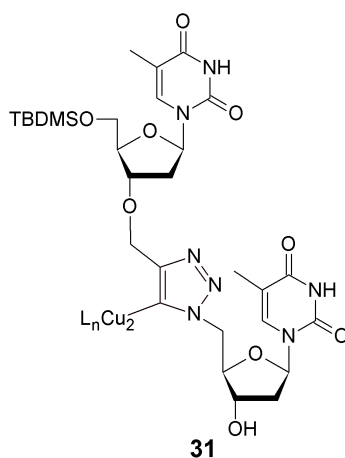


FIGURE 1.15 : Structure hypothétique du produit secondaire

Sur le spectre de RMN, l'hydrogène du triazole à 8,09 ppm a disparu. De plus, le si-

gnal du carbone correspondant est déplacé de 124,7 ppm pour **30** à 147,3 ppm dans le cas du composé **31**. Ce déblindage pourrait s'expliquer par l'effet électroattracteur du cuivre. L'analyse en spectrométrie de masse confirme la présence de deux atomes de cuivre dans la structure (m/z 787,5). Enfin après six mois à température ambiante, l'analyse par CCM nous indique que le produit secondaire a évolué vers le composé **30**, avec une augmentation de l'intensité UV de la tache du produit correspondant et la disparition quasi totale du composé **31**.

Le système 2, utilisant le sulfate de cuivre, donne un unique composé, le dimère souhaité. Les résultats nous indiquent, d'une part, qu'à température ambiante et quelque soit le temps de réaction, le rendement n'excède pas 44%. D'autre part pour une température de 80 °C, le meilleur des rendements obtenus est de 80% pour 5 heures de réaction. L'utilisation de l'activation par irradiation micro-ondes a permis d'atteindre aussi un rendement de 80%, et ce, en seulement 3 minutes de réaction.

Même si le meilleur rendement de réaction "click" est obtenu dans le cas de l'activation par irradiations micro-ondes avec le système 1 (85%), l'utilisation de solvants verts combinée à l'absence de formation de produits secondaires nous a conduits à préférer le système 2 pour la suite de la synthèse.

1.1.3.2.2 Déprotection de la dithymidine silylée

L'étape suivante consiste à déprotéger la dithymidine silylée **30** (Figure 1.16).

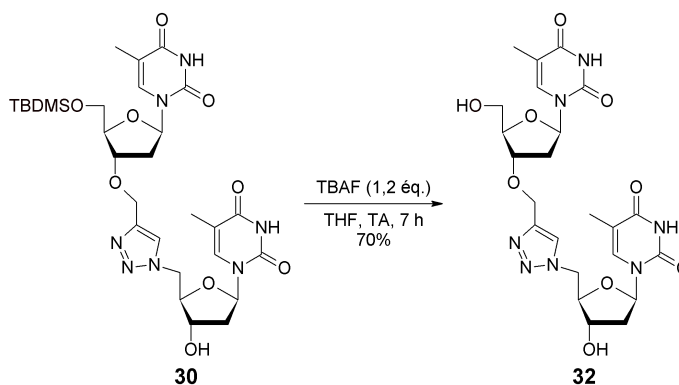


FIGURE 1.16 : Déprotection de la dithymidine silylée

Le fluorure de tétrabutylammonium (1,2 éq.), dans le THF, ajouté au dimère silylé **30** conduit, au bout de 7 h de réaction et après purification, à la dithymidine déprotégée **32** avec un rendement de 70%.

Le spectre de RMN du proton nous indique l'apparition du proton de l'hydroxyle primaire à 5,12 ppm conjointement à la disparition des signaux caractéristiques du *tert*-butyldiméthylsilyle. La spectrométrie de masse confirme la structure du composé **32** ($[MH]^+$ m/z 547,3).

1.1.3.3 Essais de fonctionnalisation : vers le trimère...

Deux voies sont *a priori* possibles pour synthétiser le trimère à partir de la dithymidine **32**. La première consiste à propargyler la fonction hydroxyle secondaire en position 3' du dimère protégé **30** (Figure 1.17).

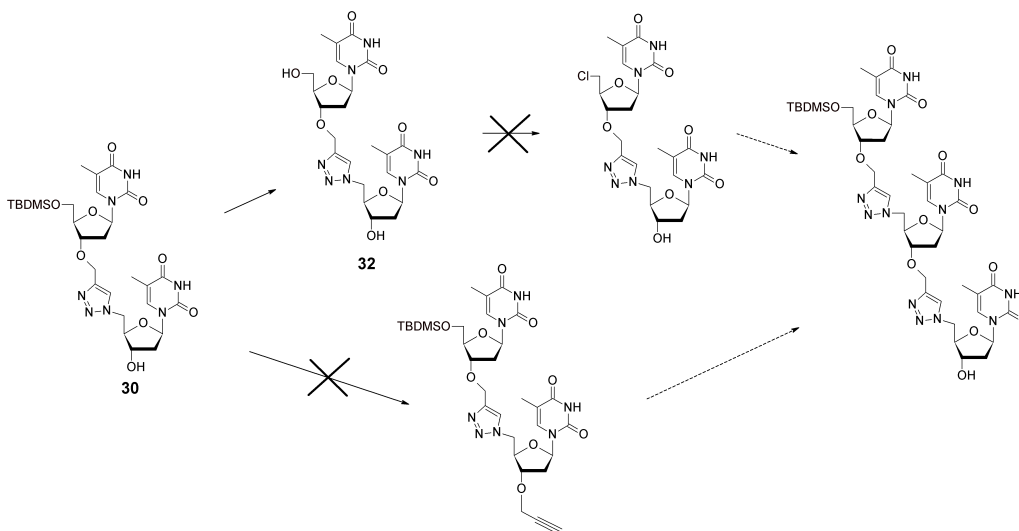


FIGURE 1.17 : Evolution vers le trimère protégé

Ceci permettrait de faire croître l'oligomère dans la direction 5'→3'. L'autre possibilité consisterait en la chloration du dimère déprotégé **32**. Après azidation et "click", le trimère se trouverait généré dans le sens 3'→5'. Dans l'optique d'une fonctionnalisation du dimère en position 3' et en position 5', la possibilité de les coupler deux à deux, pour générer le tétramère, serait envisageable.

La propargylation par sonication de la position 3' du dimère protégé **30**, ne montre, par CCM, aucune évolution même après plusieurs heures de réaction (Figure 1.17). L'utilisation d'un excès de bromure de propargyle n'a pas donné d'amélioration. Comme la propargylation, la chloration de la position 5' de la dithymidine déprotégée **32** dans le DMF, en présence d'excès de chlorure de tosyl, ne présente aucune évolution même après plusieurs activations micro-ondes.

Les essais de fonctionnalisation du dimère n'ayant pas donné satisfaction, nous nous sommes orientés vers une nouvelle stratégie de synthèse.

1.2 Nouvelle stratégie de synthèse

Dans cette nouvelle stratégie, nous avons choisi un autre groupe nucléofuge pour remplacer le chlore pouvant jouer un rôle de protection : le tosyl. La figure 1.18 décrit le cheminement adopté pour l'obtention d'un pentanucléoside à partir des précurseurs azidé **27** et tosylé-propargylé **34**.

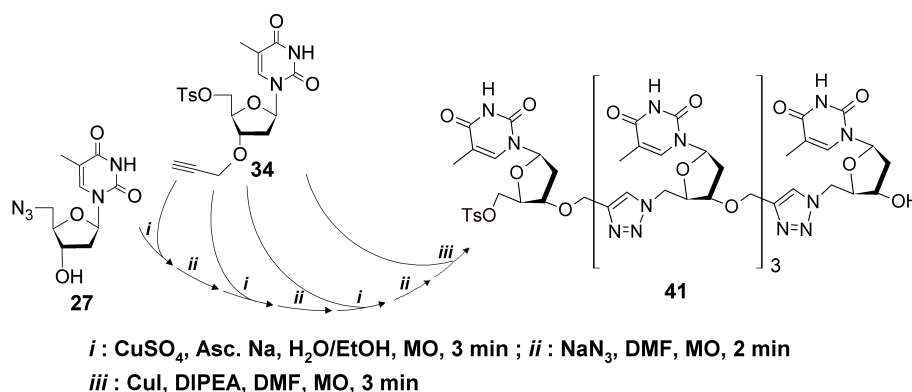


FIGURE 1.18 : Stratégie de synthèse du pentanucléoside

Les deux synthons clés **27** et **34** permettront une croissance de l'oligonucléoside dans le sens 3'→5'. Une azidation puis cycloaddition 1,3-dipolaire successives permettront d'ajouter une brique nucléosidique à l'édifice.

1.2.1 Résultats et discussions

Avant d'explicitier les étapes successives d'azidations et de cycloadditions 1,3-dipolaire, qui constituent la base de la nouvelle stratégie, il convient de décrire la synthèse des deux synthons clés, la 3'-O-propargyl-5'-O-tosylthymidine **34** et la 5'-azido-5'-désoxythymidine **27**.

Nous avons choisi de préparer le composé **27** à partir de la thymidine tosylée **33**, afin de mettre au point la substitution du groupe tosylo par l'azoture. Cette étape est, en effet, une des réactions clés pour la synthèse de l'oligonucléoside.

1.2.1.1 Synthèse des précurseurs tosylé-propargylé et azidé

La synthèse des deux précurseurs **27** et **34** nécessite la préparation de la 5'-O-tosylthymidine comme le montre la figure 1.19.

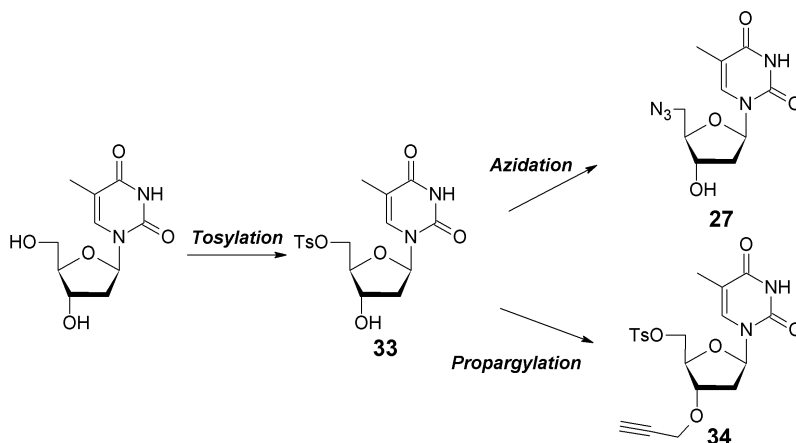


FIGURE 1.19 : Synthèse des deux précurseurs

1.2.1.1.1 Préparation de la 5'-O-tosylthymidine

Le groupe tosylé a été choisi car, d'une part, il permet la protection de la position 5' de la thymidine lors de la propargylation, d'autre part, il possède un caractère nucléofuge qui sera utile pour la synthèse de la 5'-azido-5'-désoxythymidine **27**. La réaction de tosylation est réalisée en présence de 1,2 équivalents de chlorure de *p*-toluènesulfonylé (TsCl) dans la pyridine à 0 °C (Figure 1.20).^{18,84}

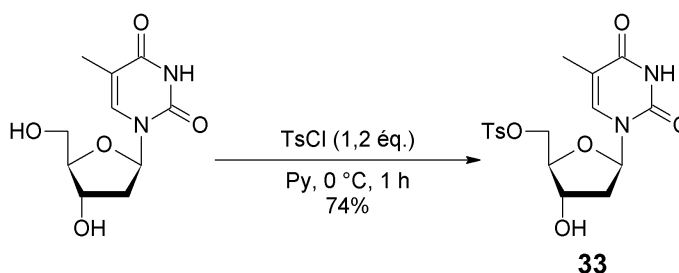


FIGURE 1.20 : Tosylation de la thymidine

Après 1 h sous agitation, la CCM montre que la réaction est terminée. Le composé **33** est obtenu après purification avec un rendement de 74%.

L'analyse du spectre de RMN du proton montre comme attendu la présence de quatre protons aromatiques entre 7,47 ppm et 7,79 ppm ainsi que les trois protons du méthyle à 2,41 ppm, confirmant la fixation du groupe tosylé. Les signaux correspondants aux protons de la thymidine sont également observés. La spectrométrie de masse confirme la structure du composé souhaité : $[MNa]^+$ à m/z 419,1.

1.2.1.1.2 Synthèse de la 3'-O-propargyl-5'-O-tosylthymidine

Le substrat est préparé par propargylation du composé **33** en utilisant la méthode décrite précédemment en deux étapes (Figure 1.21), réaction de l'hydruire puis addition du bromure de propargyle. On obtient le composé **34** avec un rendement quasi quantitatif.

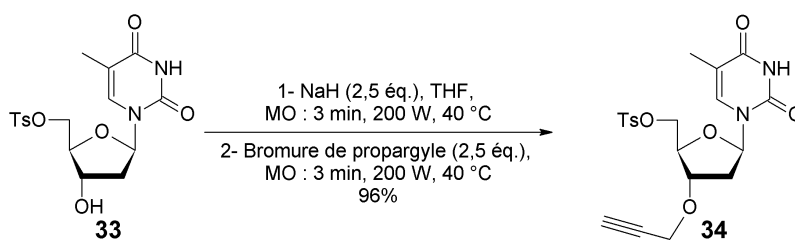


FIGURE 1.21 : Synthèse de la thymidine tosylée propargylée

La structure du composé a été identifiée par spectroscopie de RMN du proton et du carbone. La spectrométrie de masse confirme la structure attendu par la présence d'un pic $[MH]^+$ à m/z 435,2.

1.2.1.1.3 Synthèse de la 5'-azido-5'-désoxythymidine

La réaction d'azidation est effectuée dans le DMF en présence de 15 équivalents d'azoture de sodium. La réaction est activée par irradiation micro-ondes et conduit, après purification, au composé **27** avec un rendement de 91% (Figure 1.22).

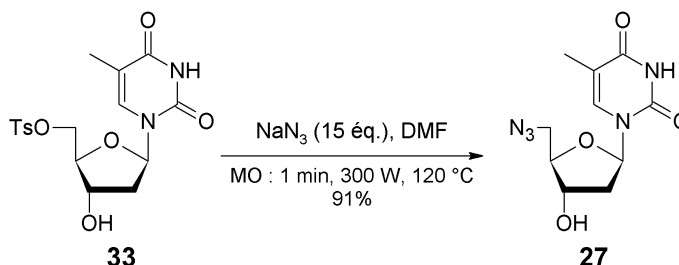


FIGURE 1.22 : Azidation de la 5'-O-tosylthymidine

A la différence de l'azidation de la thymidine chlorée **24**, les rapports frontaux des composés **27** et **34** sont légèrement différents, permettant le suivi réactionnel par CCM.

1.2.1.2 Synthèse du dinucléoside tosylé

Les deux précurseurs **27** et **34** sont couplés par réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen, catalysée par le cuivre (I), assistée par micro-ondes. Le sel de cuivre utilisé pour cette réaction est le sulfate de cuivre CuSO_4 (0,06 équivalents). Le couplage de la 3'-O-propargyl-5'-O-tosylthymidine **34** et de la 5'-azido-5'-désoxythymidine **27** se fait dans le mélange eau/éthanol en présence d'ascorbate de sodium (0,6 équivalents) comme réducteur du cuivre (Figure 1.23).

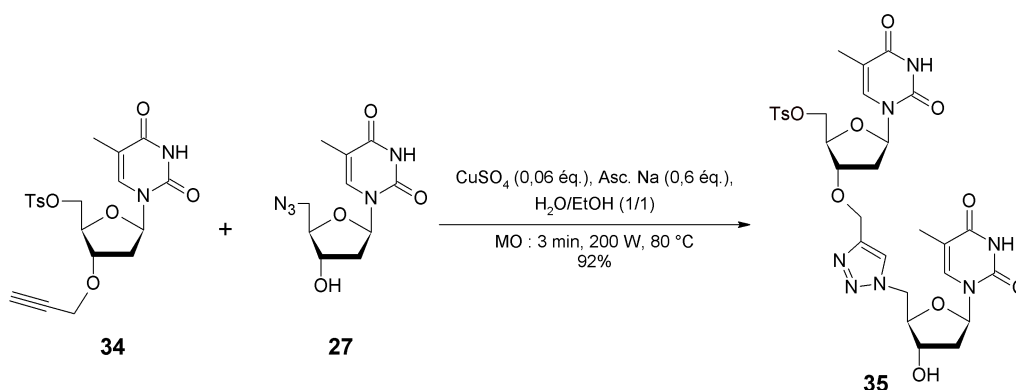


FIGURE 1.23 : Synthèse de la dithymidine tosylée

Après trois minutes d'activation (200 W, 80 °C), la CCM indique que la réaction est terminée. Une simple extraction au THF conduit au produit pur avec un rendement de 92%.

L'analyse par spectroscopie de RMN du proton montre un signal à 8,08 ppm, correspondant au proton du groupe triazole, quatre protons aromatiques entre 7,47 ppm et 7,79

ppm et le méthyle (2,40 ppm) du tosylo. Les signaux de la thymine et du désoxyribose sont dédoublés confirmant la présence de deux nucléosides. La spectroscopie de RMN du carbone montre deux signaux à 143,6 ppm et 124,7 ppm correspondant aux carbones du groupe triazole. La spectrométrie de masse présente le pic $[MNa]^+$ m/z 724,3, confirmant la structure du produit.

1.2.1.3 Vers un pentanucléoside

Pour obtenir le pentanucléoside **41** (Figure 1.18), les étapes d'azidation et de couplage des dérivés dimère, trimère, tétramère azidés avec le dérivé propargylé **34** sont répétées. La synthèse de ce composé se fait ainsi unité par unité.

1.2.1.3.1 Synthèse du trinucleoside

La préparation du trinucleoside tosylé **37** nécessite, dans un premier temps, la fixation du groupe azido en position 5' du dinucleoside, puis le couplage du produit obtenu avec le composé propargylé **34** (Figure 1.24).

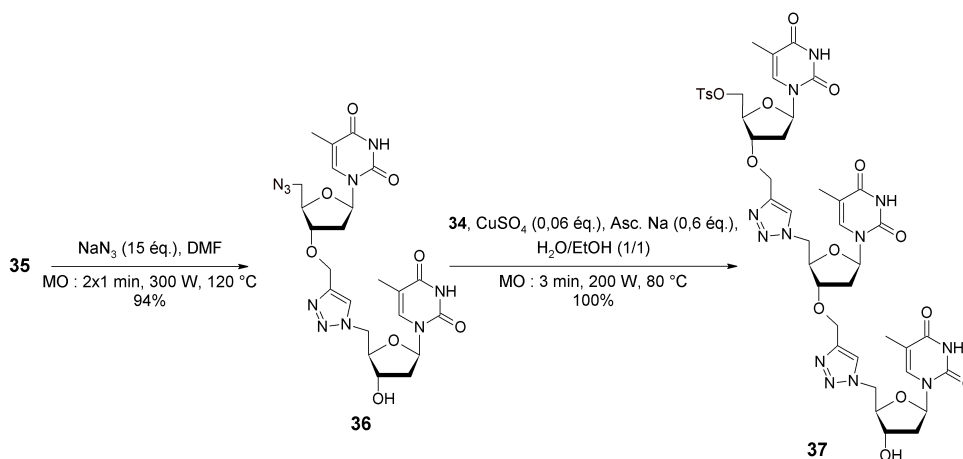


FIGURE 1.24 : Synthèse du trinucleoside tosylé

La réaction d'azidation est réalisée selon le même mode opératoire utilisé précédemment pour la préparation du composé **27** à partir de la thymidine tosylée **33**. Le dinucleoside azidé **36** est obtenu avec un rendement de 94%. Le couplage de ce dernier avec le composé clef **34** par cycloaddition 1,3-dipolaire donne le trinucleoside **37** avec un rendement quantitatif, après une simple extraction.

L'analyse par spectroscopie de RMN du proton, montre pour le composé **36**, la disparition des protons aromatiques du groupe tosylo, et l'analyse par spectroscopie infrarouge révèle une bande d'absorption à 2103 cm^{-1} , caractéristique du groupe azido. Le pic $[MNa]^+$ m/z 595,3 en spectrométrie de masse confirme la structure du produit.

Concernant le spectre de RMN du proton du composé **37**, il révèle la présence de protons aromatiques du groupe tosylo entre 7,46 ppm et 7,79 ppm, et deux protons des

groupes triazoles à 8,11 ppm et 8,09 ppm. On observe également les signaux correspondant aux trois nucléosides. La spectroscopie de RMN du carbone montre deux signaux à 143,7 ppm et 143,6 ppm appartenant aux carbones quaternaires du groupe triazole, et deux signaux à 124,6 ppm et 124,7 ppm correspondant aux carbones C-H de ce même groupe. Enfin la spectrométrie de masse confirme la structure de la molécule en révélant le pic $[MH]^+$ à m/z 1007,4.

1.2.1.3.2 Synthèse du tétranucléoside

L'azidation du trinucléoside **37**, suivie de la réaction de "click chemistry" entre celui-ci et le composé **34**, conduit au tétranucléoside **39** (Figure 1.25).

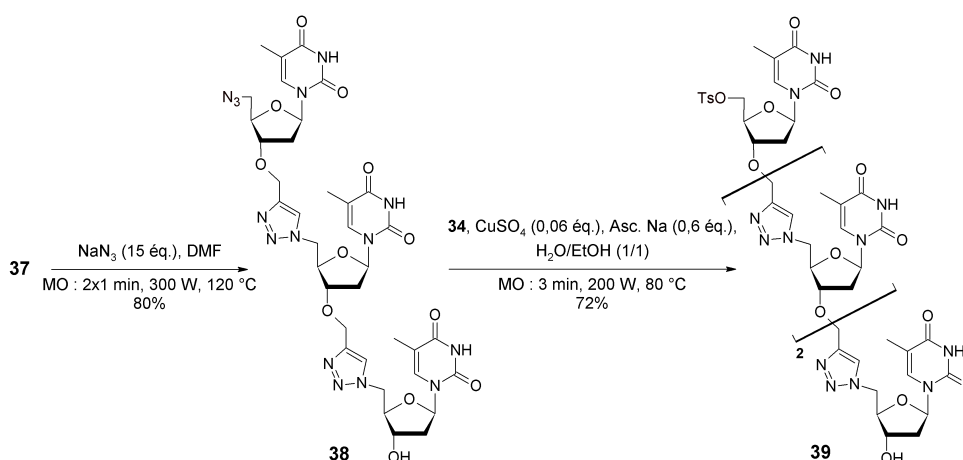


FIGURE 1.25 : Synthèse du tétranucléoside

La fixation du groupe azido conduit au composé **38** avec un rendement de 80%. Les conditions de couplage restent inchangées pour obtenir le tétranucléoside **39** avec un rendement de 72%. Ce dernier précipite dans le mélange eau/éthanol, une simple filtration et lavage avec le THF permettant de l'isoler pur.

Les structures des composés **38** et **39** ont été déterminées par spectroscopie de RMN, infrarouge et par spectrométrie de masse. En résumé, le spectre de RMN du proton et du carbone 13 du composé **39** montrent la présence du groupe tosyloxy, des trois triazoles et des quatre nucléosides. Cette structure est confirmée par spectrométrie de masse par la présence du pic à m/z à 1334,0 correspondant à l'espèce ionisée $[\text{MNa}]^+$.

1.2.1.3.3 Synthèse du pentanucléoside

Pour la synthèse du pentanucléoside **41**, on procède une dernière fois aux réactions d'azidation et de cycloaddition 1,3-dipolaire (Figure 1.26).⁸⁵

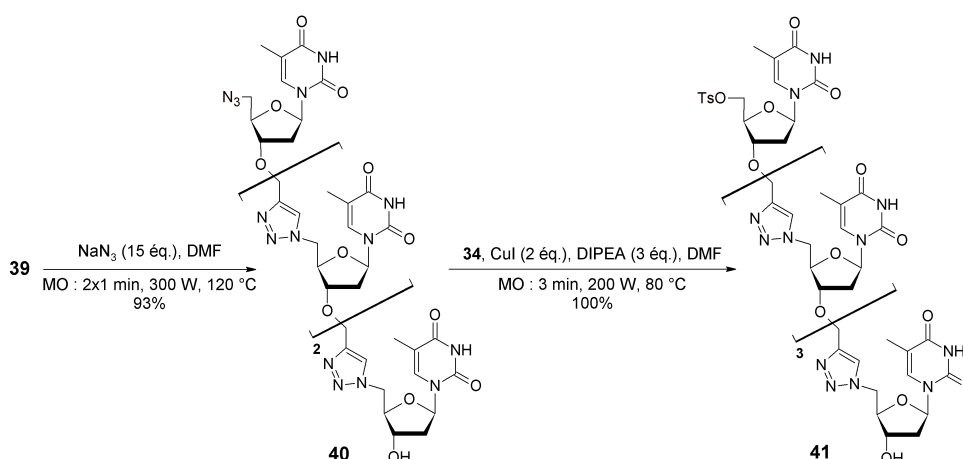


FIGURE 1.26 : Synthèse du pentanucléoside

La réaction d'azidation conduit au tétramère azidé **40** avec un rendement de 93%. Ce tétranucléoside azidé étant insoluble dans l'eau, les conditions de "click chemistry" utilisées précédemment ont été modifiées. Le couplage a donc été effectué selon Kashyap et coll.⁸⁶ dans le DMF en présence de deux équivalents d'iodure de cuivre et trois équivalents de DIPEA. Une simple précipitation dans l'eau permet d'isoler le composé **41** après séchage avec un rendement quantitatif.

Enfin, comme précédemment, ces composés ont également été analysés par spectroscopie de RMN, infrarouge et par spectrométrie de masse, confirmant la présence de cinq unités nucléosidiques et de quatre groupes triazoles pour **41**. Le rendement global de la synthèse à partir du précurseur azoture **27** est de 46% pour un temps de réaction total de 18 minutes en utilisant l'activation par irradiations micro-ondes.

Après avoir montré la faisabilité des réactions d'azidation et de cycloaddition du monomère au pentamère de thymidine, les bons rendements obtenus nous ont conduits à nous intéresser à la synthèse sur support solide afin de préparer des analogues d'oligonucléotides.

Chapitre 2

Synthèse sur support solide

Le VIH, comme de nombreux virus, subit un grand nombre de mutations entre chacune de ses répliquions. Il est donc difficile d'appliquer des stratégies ciblant spécifiquement ce virus. Cependant T. Hiratou et coll.⁸⁷ ont montré qu'une forme de ce virus est régulièrement retrouvée parmi les différentes mutations, c'est le VIH-1, dont une partie de la séquence est représentée ci-dessous. Dans le but de synthétiser des analogues d'oligonucléotides pouvant avoir des utilités en thérapie antisens, nous nous sommes intéressés à la séquence complémentaire du VIH-1.

Séquence polypurique VIH-1
5'-AAAAGAAAAGGGGGGA-3'
Séquence polypyrimidique anti VIH-1
3'-TTTTCTTTCCCCCT-5'

Un des motifs de cette séquence est la répétition de la base thymine (TTTT). A partir de la stratégie mise au point au chapitre précédent, nous avons travaillé à la synthèse d'une partie de la séquence anti VIH-1. Pour cela, la synthèse sur support solide, introduite par R. B. Merrifield en 1963,⁸⁸ a été utilisée. La résine Tentagel (T-NH₂) a été choisie, dans le but d'effectuer un accrochage sur le support avec un lien amide.

2.1 Stratégie de synthèse

La synthèse sur support solide nécessite de fonctionnaliser au préalable la thymidine. La fonctionnalisation se fait classiquement par acylation du groupe hydroxyle en position 3' par l'anhydride succinique.⁸⁹⁻⁹¹ La stratégie de synthèse choisie est décrite sur la figure 2.1.

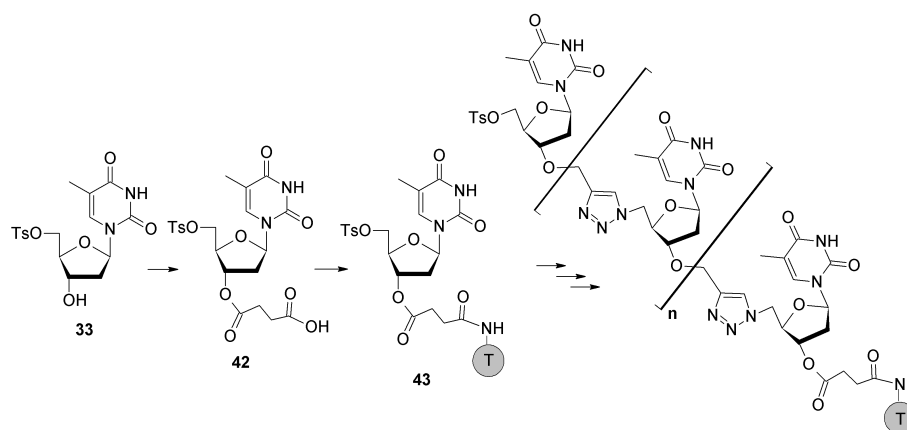


FIGURE 2.1 : Stratégie de synthèse sur support solide

2.2 Synthèse d'oligothymidines sur support solide

Nous avons utilisé la méthode décrite par Lönnberg et coll..⁸⁹ La première étape est la préparation la thymidine succinylée **42** à partir du dérivé tosylé déjà synthétisé **33**.

2.2.1 Synthèse du précurseur succinylé

La 3'-O-succinyl-5'-O-tosylthymidine **42** est synthétisée à partir de la 5'-O-tosylthymidine **33** (Figure 2.2)

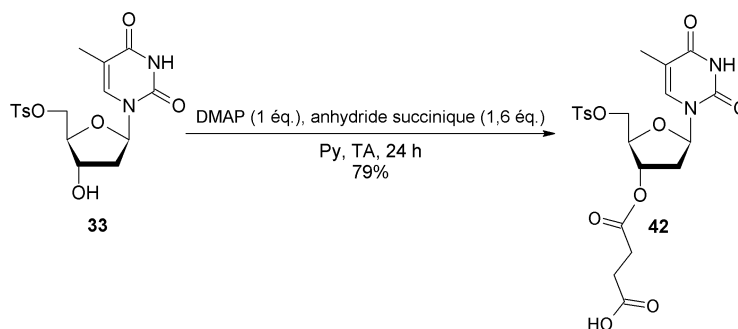


FIGURE 2.2 : Acylation de la thymidine 5'-O-tosylée

La 5'-O-tosylthymidine est dissoute dans la pyridine, on ajoute un équivalent de DMAP et 1,6 équivalents d'anhydride succinique. L'ensemble est mis sous agitation et sous atmosphère inerte pendant 24 h. Le produit est ensuite traité avec de l'acide citrique et lavé à l'eau. Le dérivé **42** est obtenu avec un rendement de 79%. Ce composé a été analysé par spectroscopie de RMN du proton. Celle-ci montre la disparition du proton de l'hydroxyle en position 3', l'apparition de quatre protons du groupe succinyle à 2,51 ppm ainsi que la présence du proton de la fonction acide à 12,29 ppm. La spectrométrie de masse confirme la structure du composé **42** ($[MNa]^+$ m/z 519,1).

2.2.2 Fixation de la 3'-O-succinyl-5'-O-tosylthymidine sur support solide

La fixation de la 3'-O-succinyl-5'-O-tosylthymidine sur résine est réalisée en deux étapes. Tout d'abord, on procède à l'activation de la fonction acide carboxylique à l'aide du *p*-nitrophénol (Figure 2.3).⁸⁹

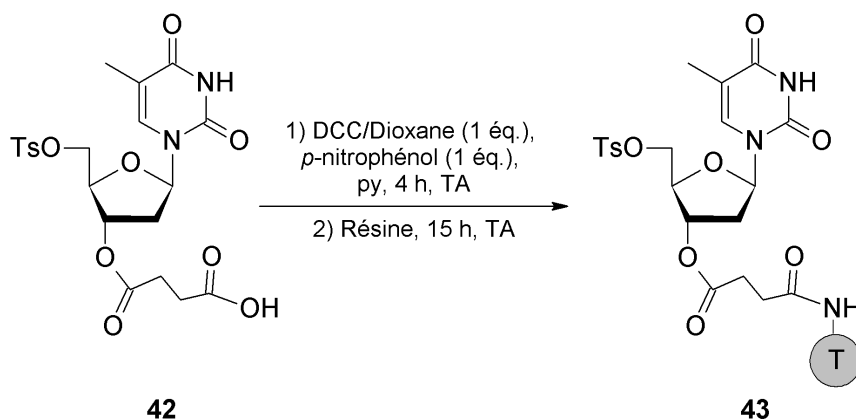


FIGURE 2.3 : Fixation sur support solide

Le composé 42 est mis en présence d'une quantité stoechiométrique de *p*-nitrophénol et de DCC dans un mélange dioxane/pyridine, pendant 4 h. Le DCC active la fonction acide de la 3'-O-succinyl-5'-O-tosylthymidine. Une fois activée, le *p*-nitrophénol réagit sur celle-ci pour donner un ester plus réactif. Le DCC nécessaire à la réaction est transformé alors en dicyclohexylurée (DCU) et précipite dans le milieu réactionnel. Elle est alors filtrée et éliminée. La résine préalablement gonflée est ajoutée au substrat activé qui réagit avec la fonction amine pour former une liaison amide entre le composé et le support. Après 15 heures de réaction, la résine est lavée, avec successivement du DMF, du dioxane, du méthanol et enfin de l'éther diéthylique. Après séchage, on détermine l'augmentation de masse. Elle correspond à un rendement de fixation de 50%.

La vérification du rendement obtenu précédemment est réalisée par décrochage de la thymidine tosylée en milieu basique, suivie d'un dosage par spectroscopie UV. Une courbe d'étalonnage a été réalisée auparavant à 265 nm. Cette longueur d'onde correspond à l'absorption de la base du composé tosylé. La courbe de tendance linéaire représente l'absorbance en fonction des concentrations variables de thymidine tosylée (Figure 2.4).

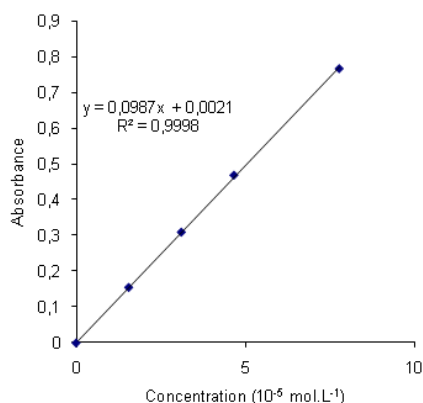


FIGURE 2.4 : Courbe étalon de l'absorbance de la 5'-O-tosylthymidine **33** à 265 nm

Cette courbe, en accord avec la loi de Beer-Lambert, permet de déterminer la concentration d'une solution de thymidine tosylée donnée, après avoir relevé son absorbance spécifique. En effet, l'absorbance est reliée à la concentration de manière linéaire par le coefficient d'extinction molaire ($\epsilon=98700 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). La solution de thymidine tosylée décrochée de la résine par l'ammoniac méthanolique, présente une absorbance de 0,23 correspondant à une concentration de $2,3.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. On détermine alors le taux de fixation qui est de 43%.

Après avoir confirmé une fixation de la thymidine tosylée sur le support solide de l'ordre de 50%, nous sommes passés à la synthèse du tétramère de thymidine.

2.2.3 Synthèse du tétramère de thymidine

A partir de la thymidine tosylée fixée sur résine (composé **43**) nous avons synthétisé un tétranucléoside pyrimidique (Figure 2.5). Nous nous sommes appuyés sur le taux de fixation calculé précédemment afin de travailler en excès de réactifs pour les réactions d'azidation et de couplage.

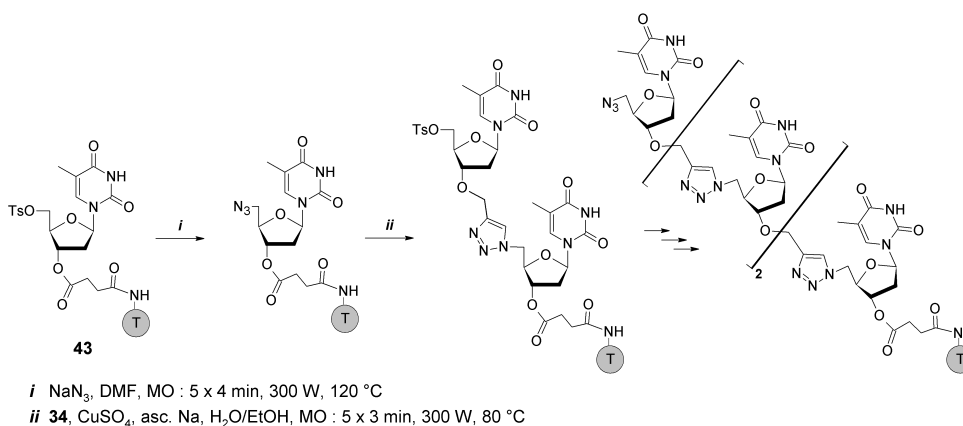


FIGURE 2.5 : Synthèse du tétramère de thymidine sur support

L'azidation du composé **43** est réalisée dans le DMF, par activation micro-ondes (300 W, 120 °C) en présence de 32 équivalents d'azoture de sodium. La résine est ensuite rincée puis séchée au dessiccateur pendant 4 h. L'azidation est suivie de la réaction de "click chemistry" entre le produit azidé et le composé propargylé **34**. Celle-ci est effectuée dans un mélange eau/éthanol, en présence de sulfate de cuivre (0,23 éq.) et d'ascorbate de sodium (1,36 éq.). Après 15 minutes d'activation (300 W, 120 °C), la résine est lavée, filtrée et séchée. Les réactions d'azidation et de couplage sont répétées jusqu'à l'obtention du tétramère. Le tétramère obtenu est décroché en milieu basique, filtré, évaporé et séché au dessiccateur, puis analysé par spectrométrie de masse. L'analyse par spectrométrie de masse montre la présence de pics majoritaires à m/z 900,3 ($[MNa]^+$) et m/z 1205,4 ($[MNa]^+$) correspondant respectivement au trimère et au tétramère de thymidine azidés.

La première approche de synthèse d'analogues d'oligonucléotides utilisant le support solide s'est révélée intéressante. Dans le but de synthétiser une courte séquence anti VIH-1, des travaux concernant la fixation de la cytidine sur la thymidine sont actuellement effectués (cf. la séquence anti VIH-1, page 79).⁸⁷ Une étude de la complémentarité des brins synthétiques avec les séquences virales pourra alors être entreprise.

Chapitre 3

Tests de complémentarité des oligonucléosides

La détection de la complémentarité entre un ADN simple brin modifié ou non et son brin complémentaire (ADN ou ARN) est un des enjeux actuels de la biochimie génétique. Des techniques usuelles ont été mises en place, afin de mettre en évidence l'hybridation de type Watson-Crick entre deux brins d'acides nucléiques. Une des plus couramment utilisées est la méthode des températures de fusion (T_m) qui met en évidence, par spectroscopie UV, l'hybridation-déshybridation d'un ADN simple brin modifié avec un autre simple brin ADN ou ARN, et ce en fonction de la température.^{92,93}

D'autres méthodes de détection ont vu récemment le jour, appartenant à une grande famille de détecteurs, sensibles aux phénomènes biologiques : les biosenseurs.⁹⁴⁻⁹⁶ Parmi eux les biosenseurs utilisant les ondes acoustiques de surface font partie intégrante des technologies récentes et prometteuses en matière de bio-détection.

3.1 La technologie des ondes acoustiques de surface (SAW : "Surface acoustic wave"). Objectif : complémentarité

Les oligonucléotides non-naturels précédemment synthétisés ("Click generated" ADN : Cg-DNA) doivent être complémentaires de brins naturels si l'on souhaite les utiliser en tant qu'agents thérapeutiques antisens par exemple (Figure 3.1).

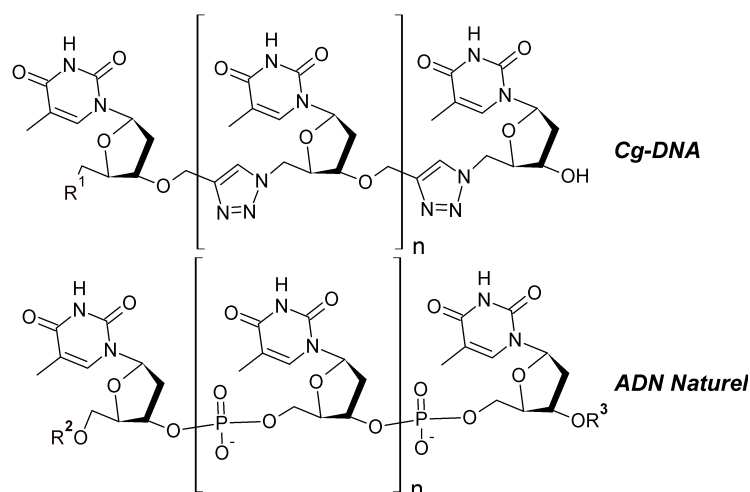


FIGURE 3.1 : Comparaison entre l'ADN naturel et les simples brins oligothymidines Cg-DNA

Afin d'évaluer la complémentarité entre les brins synthétisés et naturels, nous avons utilisé un capteur SAW ("Surface Acoustic Wave") en collaboration avec le Dr Chouki Zerrouki du Laboratoire de Physique situé au Conservatoire National des Arts et Métiers à Paris. L'idée est de créer dans un matériau piézoélectrique des ondes acoustiques de surface et de suivre la variation de leurs propriétés de propagation (amplitude et/ou phase), suite à un changement physique, chimique ou biologique du milieu extérieur. Dans notre cas, de simples brins d'oligonucléotides naturels (oligonucléotides sondes), possédant une fonction thiol 5' terminale, sont greffés de manière covalente sur une fine couche d'or déposée sur le matériau piézoélectrique. Le capteur biologique ainsi obtenu est sélectif, dans la mesure où seuls des oligonucléotides cibles complémentaires des sondes, peuvent donner lieu à une hybridation, provoquant une variation de fréquence (d'amplitude et/ou de phase) de l'onde acoustique.

3.2 Conception des SAW biosenseurs

Parmi les biosenseurs disponibles, les plus prometteurs sont ceux capables de décorréler les effets dus à la variation de la masse déposée sur leur surface, de ceux liés à la viscosité des couches fluidiques superficielles.^{97,98} Le biosenseur (Figure 3.2) que nous avons utilisé est constitué d'une ligne à retard fabriquée sur un substrat piézoélectrique de tantalate de lithium (LiTaO₃).

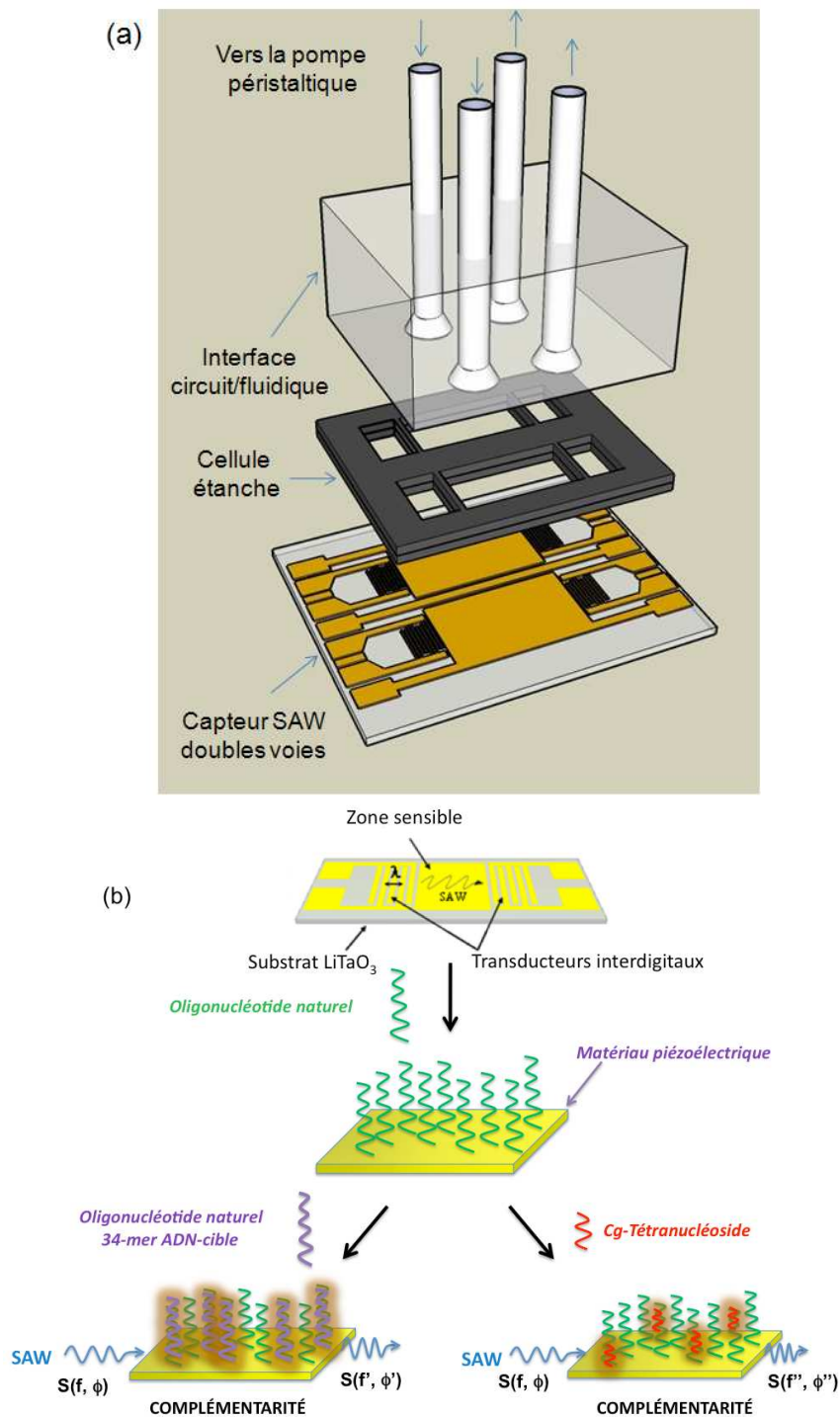


FIGURE 3.2 : Représentation schématique a) d'un senseur SAW avec la cellule étanche et l'interface fluïdique pour une utilisation en milieu liquide ; b) du principe de reconnaissance entre brins complémentaires (naturels et synthétisés)

Les transducteurs interdigitaux (TID) constitués d'une couche d'or sur chrome (20 nm/80 nm de Cr/Au) sont structurés avec une périodicité de 40 μm qui correspond à une fréquence opérationnelle de 104 MHz. Pour une utilisation optimale des dispositifs

SAW en phase liquide, la zone sensible de détection a été métallisée (fines couches Cr/ Au de 20/80 nm) pour les rendre insensibles aux ions, et favoriser la propagation des ondes acoustiques de surface.⁹⁹ L'énergie acoustique est confinée près de la surface du substrat, rendant le biosenseur hautement sensible aux variations ayant lieu dans le milieu de propagation, à l'interface solide-liquide. Les effets de température et de pression sont annulés grâce à une configuration de l'oscillateur de type double lignes à retard : les lignes à retard utilisées sont insérées dans la boucle de rétroaction de deux amplificateurs radio-fréquences indépendants. Dans cette configuration, le paramètre mesuré est la différence en fréquence entre les deux lignes : la ligne référence et la ligne de mesure. Le suivi en fonction du temps de la variation de cette différence de fréquence, nous permettra ainsi de discuter de la complémentarité ou non des brins d'acides nucléiques.

3.3 Détection d'hybridation d'oligonucléotides naturels

Une étape préalable avant de tester les oligonucléotides synthétisés, est de fonctionnaliser le capteur en greffant des brins ADN sondes sur sa zone sensible (zone centrale en or entre les peignes interdigités). Vient ensuite le test de la réponse du biocapteur réalisé, pour des brins complémentaires (ADN cibles naturels). C'est sur la base de cette réponse que pourra se faire la comparaison avec les essais sur les oligonucléotides synthétisés. Les séquences de brin d'ADN sondes et cibles ont été choisies de manière à générer pour chaque sonde, quatre fois la séquence -AAAA-, et ainsi pouvoir tester les oligothymidines (n=0 à 2, Figure 3.1). La première étape a été la fixation des ADN sondes sur le support. Les ADN sondes et cibles utilisés sont les suivants :

ADN sonde : H-S-(CH₂)₆-5'-CCC CTT TTA AAA CAC TAA AAG GTC CTA AAA ACC
TAA AAA CCT-3'

ADN cible : 5'-AGG TTT TTA GGT TTT TAG GAC CTT TTA GTG TTT T-3'

La zone sensible du biosenseur a été dans un premier temps lavée avec une solution piranha (98% H₂SO₄/30% H₂O₂ 3 :1, V/V) pendant 30 minutes. Elle est ensuite rincée avec de l'eau bidistillée. Une cellule de rétention est placée sur la zone sensible (Figure 3.2 (a)) pour une utilisation en milieu liquide. Toutes les mesures sont réalisées à la température de 25 °C, selon le principe de reconnaissance schématisé par la figure 3.2 (b). Une solution de chlorure de sodium est injectée à l'aide d'une pompe péristaltique dans la cellule de rétention (placée sur la zone sensible, cf. figure 3.2(a)) avec un débit constant de 0,19 mL/min. Après stabilisation du signal, les ADN sondes sont introduits dans le circuit fluidique et leur greffage sur l'or est ainsi suivi en fonction du temps (Figure 3.3).

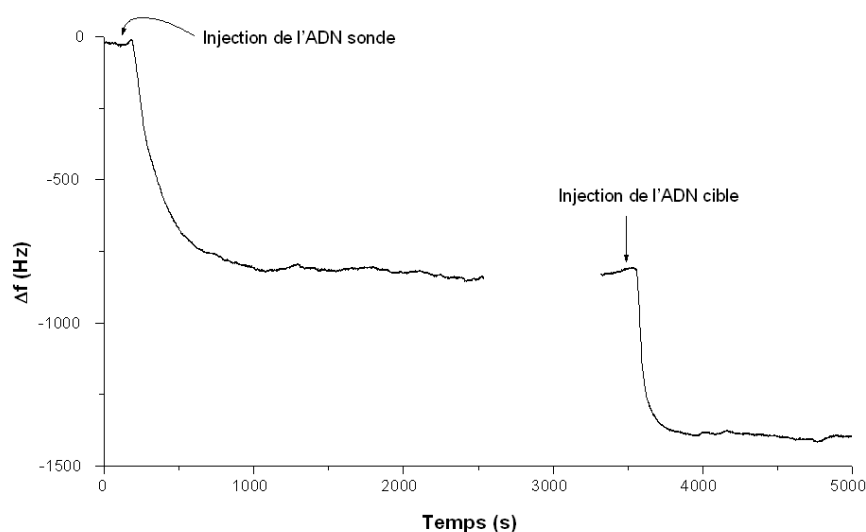


FIGURE 3.3 : Suivi de la variation de fréquence en fonction du temps, lors du greffage des ADN sondes sur le capteur et de leur hybridation avec les ADN cibles naturels

Dans notre cas, l'accrochage des sondes a provoqué un décalage de fréquence : $\Delta f_{sonde} = (840 \pm 12)$ Hz. Cette étape réussie, la solution de chlorure de sodium est drainée puis remplacée par une solution d'HEPES (acide 2-[4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine]éthanesulfonique). Les ADN cibles sont alors injectés dès que la différence fréquentielle s'est stabilisée. Là aussi, un temps de stabilisation est nécessaire avant d'injecter les ADN cibles et suivre l'hybridation (Figure 3.3). Celle-ci est plus rapide (de l'ordre de 500 s) que le greffage des sondes (environ 1000 s) et conduit également à un décalage de fréquence $\Delta f_{cible} = (590 \pm 10)$ Hz avec une cinétique caractéristique.

A partir de ce stade, aucun changement de fréquence n'a pu être observé après une injection supplémentaire d'ADN cibles (sans régénération), signe de l'absence de brins ADN sondes libres accessibles. Pour une réutilisation du capteur (régénération), nous avons procédé à un "lavage" du SAW avec une solution d'hydroxyde de sodium à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (en circuit ouvert), suivi d'un rinçage avec de l'eau déionisée bidistillée.

3.4 Tests de complémentarité ADN naturels/Cg-DNA

Pour tester la complémentarité entre les ADN sondes et les di- tri- et tétranucléosides, nous avons utilisé le même capteur (après régénération) et procédé de la même façon que pour les ADN naturels. Les essais menés avec les différents analogues d'oligonucléotides sont regroupés sur la figure 3.4.

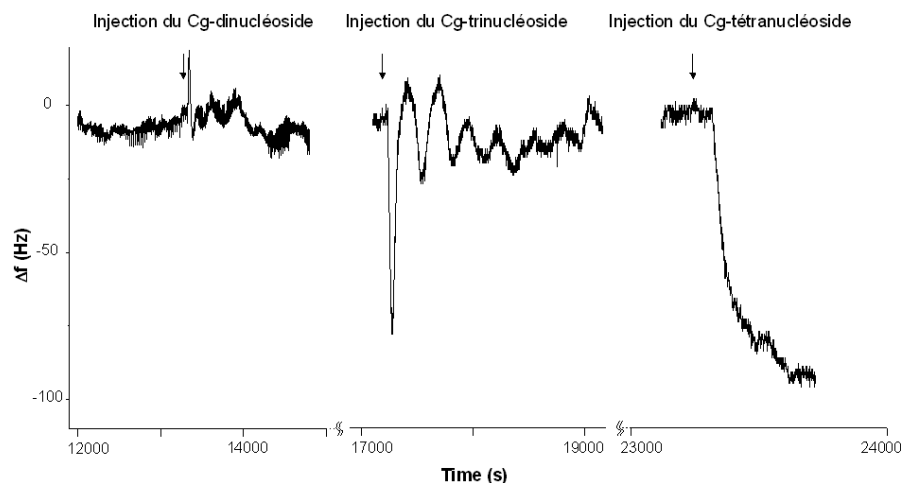


FIGURE 3.4 : Variation de fréquence en fonction du temps après injection des di- tri- et tétrathymidines

Pour le Cg-dinucléotide, l'injection produit quelques oscillations mais aucune variation fréquentielle n'est observée. Dans le cas des Cg-trinucléotides, on observe également la présence d'oscillations bien plus importantes, sans pour autant conduire à une variation de fréquence après amortissement (compte tenu des incertitudes de mesures). Ses oscillations amorties sont probablement dues aux liaisons instables en dépit de l'affinité naturelle entre l'adénine et la thymine. Pour vérifier que le phénomène observé n'était pas dû à l'introduction des différentes solutions dans le circuit fluidique, nous avons procédé à des injections des mêmes volumes d'HEPES, qui n'ont produit aucun effet comparable. Par contre, l'injection du Cg-tétranucléotide a provoqué un décalage en fréquence de $\Delta f_{T_2} = (96 \pm 3)$ Hz, montrant sa complémentarité par rapport à l'ADN naturel sonde. Pour nous assurer qu'il y a bien eu hybridation, nous avons injecté une quantité supplémentaire de l'ADN naturel cible, et aucune variation du signal de sortie du capteur n'a été enregistrée. De plus, si on s'intéresse à la cinétique, caractéristique de l'hybridation de l'ADN, on remarque qu'elle est similaire dans les deux cas : brins ADN naturels cibles et Cg-oligonucléotides. Ceci est parfaitement illustré par la figure 3.5, où nous avons porté sur le même graphique le suivi de l'hybridation en fonction du temps pour les ADN naturels (après une première et seconde régénération du capteur) et les Cg-tétranucléotides.

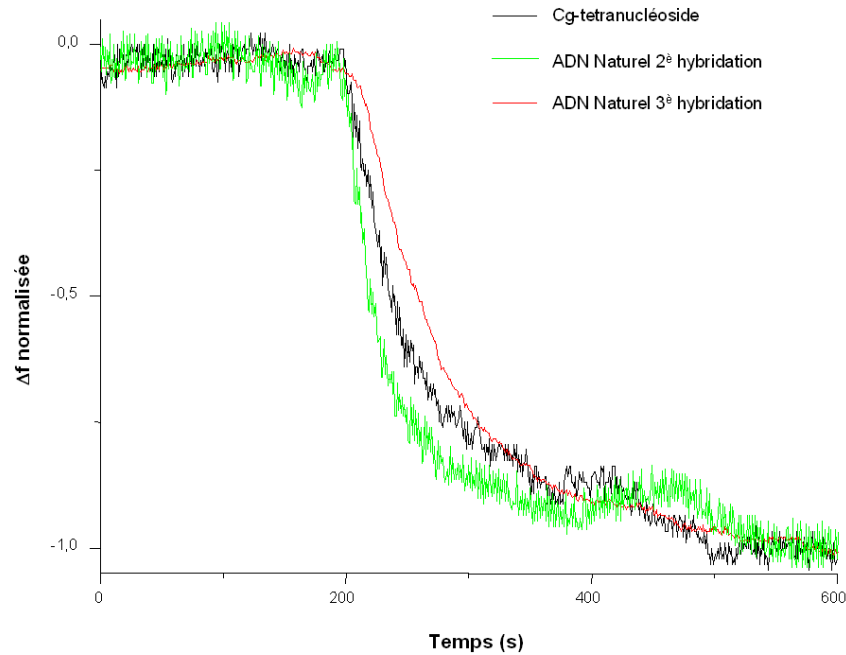


FIGURE 3.5 : Comparaison de la cinétique d'hybridation entre le Cg-tétranucléotide et l'ADN naturel

Quant à la différence en fréquence entre Δf_{T_2} (96 Hz) et Δf_{cible} (590 Hz) elle est en grande partie due à l'efficacité limitée des régénérations successives, puisque les déplacements en fréquence diminuent au cours des hybridations répétées ($\Delta f_{cible} = 296$ Hz et 191 Hz pour la deuxième et troisième hybridation). Notons toutefois que de nouveaux essais de régénérations des capteurs SAW ont montré la possibilité d'une réutilisation des capteurs jusqu'à une dizaine de fois, avec une perte d'efficacité cumulée inférieure à 40%, en augmentant de façon significative les temps de lavage (et rinçage).¹⁰⁰

Pour appuyer les différentes constatations énoncées, nous avons déterminé pour chaque expérience le taux d'hybridation r qui représente le pourcentage de brins ADN cibles qui se sont hybridés par rapport au nombre de brins sondes disponibles. Il est estimé à partir des décalages de fréquence après greffage Δf_{sonde} et après hybridation Δf_{cible} .

$$r = \frac{\Delta f_{cible} \times \Delta M_{sonde}}{\Delta f_{sonde} \times \Delta M_{cible}}$$

avec M_{sonde} et M_{cible} , les masses molaires des sondes et cibles respectivement.

Pour le greffage des ADN sondes on trouve $\Delta f_{sonde} = 840$ Hz. Pour les différentes hybridations d'ADN naturels, on trouve : $\Delta f_{cible} = 590$ Hz, 296 Hz et 191 Hz. Pour le Cg-tétranucléoside : $\Delta f_{T_2} = 96$ Hz. Les taux d'hybridation sont, pour les trois hybridations successives, 88%, 44% et 28% pour l'ADN naturel. Concernant le tétranucléoside, on obtient 29%. On trouve ainsi une valeur comparable, pour le cas de la troisième hybridation, à celle trouvée dans le cas des Cg-tétranucléotide.

Les essais de complémentarité nous ont donc permis pour la première fois de mettre en évidence l'hybridation entre un brin naturel d'oligonucléotide et un analogue de tétranucléotide généré par "click chemistry". En dépit d'un nombre d'atomes internucléosidiques supérieur au cas du lien phosphodiester, il semble qu'il y est suffisamment d'espace et de flexibilité dans le cas du tétramère pour permettre une hybridation avec les bases complémentaires adénines de l'ADN naturel correspondant.

Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous avons entrepris, dans une première partie, l'étude de l'alkylation régiosélective de nucléosides pyrimidiques protégés en position 5' ou 3', à l'aide de différents dérivés bromés. La première étape est une déprotonation effectuée en présence d'hydrure de sodium. L'espèce anionique formée présente, dans des solvants de faible constante diélectrique, une possible chélation du sodium. L'utilisation d'éthers-couronne a confirmé le rôle du sodium sur l'orientation de la réaction. Des calculs utilisant la DFT ont permis d'étudier la stabilité de différents intermédiaires réactionnels et états de transition sur des modèles simplifiés. Une structure mettant en jeu une triple chélation du sodium avec deux atomes d'oxygènes et un atome de brome justifierait la régiosélectivité observée. L'étude théorique de la réactivité de cette structure est en cours.

Dans une seconde partie, nous avons décrit la synthèse de nouveaux analogues d'oligonucléotides. La nécessité de fonctionnaliser sélectivement les nucléosides nous a conduits à mettre en place une nouvelle méthode de chloration sélective de la position 5' de nucléosides pyrimidiques. La synthèse d'un dimère de thymidine a ensuite été effectuée à l'aide d'une réaction de "click chemistry" : la cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne terminal et un azoture catalysée par le cuivre (I) (CuAAC). Différents modes d'activation ont été utilisés. L'activation par irradiations micro-ondes a permis de diminuer considérablement le temps réactionnel tout en conservant de très bons rendements. Après optimisation de la réaction de couplage, nous avons synthétisé de courtes séquences d'oligonucléotides non naturels, possédant une unité triazolique en remplacement de la liaison phosphodiester classique. L'activation par irradiations micro-ondes, et la mise au point de purification par de simples extractions/précipitations, nous a permis de synthétiser rapidement et avec de bons rendements un pentamère de thymidine. Des agents chromophores (porphyrines) ou des systèmes nanoparticulaires pourront, par la suite, être greffés sur ces structures oligonucléosidiques, dans des buts diagnostiques ou de vectorisation médicamenteuse.

Pour l'élaboration de séquences plus longues de types anti VIH-1, l'utilisation de la synthèse sur support solide a été entreprise. Des résultats encourageants ont été obtenus dans le cas d'un tétramère de thymidine. La synthèse d'oligomères de plus grandes tailles est en cours de réalisation.

La complémentarité des oligomères synthétisés (Cg-DNA) avec des séquences naturelles a été évaluée grâce à un biosenseur SAW. Les résultats montrent une hybridation effective à partir de quatre unités nucléosidiques. Les oligomères synthétisés par "click chemistry" ouvrent donc de nouvelles perspectives pour les thérapies antisens.

Quatrième partie

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 1

Matériel

1.1 Réactifs et solvants

L'origine des réactifs et solvants utilisés au cours de ce travail est présentée dans les tableaux 1.1 et 1.2. Tous ces composés sont utilisés tels quels après avoir contrôlé leur pureté et notamment l'absence d'eau par IR. La pureté indiquée est la pureté minimale garantie par le fournisseur.

Tableau 1.1 : *Solvants utilisés*

Solvants	Pureté	Origine
Acétate d'éthyle	99%	SDS
Acétone	99%	Prolabo
Chloroforme	99,9%	SDS
1,2-Dichloroéthane	99%	Aldrich
Dichlorométhane	99,9%	Alfa Aesar
<i>N,N</i> -Diméthylformamide	99,8%	Aldrich
Diméthylsulfoxyde	99,8%	Acros
Dioxane	99,5%	Aldrich
Ethanol absolu	99%	VWR
Ether de pétrole	pur	VWR
Ether diéthylique	99,99%	VWR
HEPES	99%	Acros
Méthanol	99,99%	Aldrich
Pyridine	99,8%	Aldrich
<i>tert</i> -Butanol	99,5%	Fluka
Tétrahydrofurane	99,7%	Alfa Aesar
Toluène	99,8%	SDS
Triéthylamine	99,5%	Carlo Erba

Tableau 1.2 : Réactifs utilisés

Réactifs	Pureté	Origine
Anhydride succinique	99%	Fluka
Ascorbate de sodium	98%	Aldrich
Ammoniac méthanolique (7 mol.L ⁻¹)	-	Acros
Azoture de sodium	99,5%	Aldrich
Bromure d'allyle	99%	Aldrich
Bromure de propargyle (80% dans le toluène)	-	Acros
Chlorure d'ammonium	99,5%	Aldrich
Bromure de benzyle	98%	Aldrich
Bromure de <i>m</i> -méthoxybenzyle	98%	Aldrich
Chlorure de sodium	99%	Alfa Aesar
Chlorure de <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle	97%	Alfa Aesar
Chlorure de tosyle	99%	Aldrich
2'-Désoxyuridine	99%	Aldrich
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide	99%	Acros
Diisopropyléthylamine	99,5%	Aldrich
4-(<i>N,N</i> -Diméthylamino)pyridine	99%	Acros
Ether-couronne 12-C-4	97%	Acros
Ether-couronne 15-C-5	98%	Acros
Ether-couronne 18-C-6	99%	Acros
Fluorure de tétrabutylammonium (1 mol.L ⁻¹ , THF)	99%	Acros
Hydruure de lithium	98%	Acros
Hydruure de potassium (35%, dispersion dans huile minérale)	-	Acros
Hydruure de sodium (60%, dispersion dans huile minérale)	-	Aldrich
Imidazole	99%	Aldrich
Iodure de cuivre	98%	Acros
<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine	99%	Aldrich
Ninhydrine	99,5%	Merck
Nitrate d'argent	99%	Aldrich
<i>p</i> -Nitrophénol	99%	Alfa Aesar
Résine Tentagel TNH ₂	-	Fluka
Sulfate de cuivre pentahydraté	98%	Acros
Sulfate de magnésium	99%	SDS
Sulfate de sodium	99%	Acros
<i>p</i> -Toluènesulfonate de pyridinium	98%	Acros
Thymidine	99%	Alfa Aesar
Triphénylphosphine	99%	Alfa Aesar
Uridine	99%	Acros

1.2 Chromatographie

1.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique

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

- Observation sous ultraviolet
- Vaporisation d'une solution (6 mol.L⁻¹) d'acide sulfurique suivie d'un chauffage dans le cas des produits comportant une partie osidique
- Vaporisation de PPh₃ suivi de ninhydrine puis chauffage, dans le cas des composés azidés

Les divers éluants utilisés sont précisés au cours du chapitre synthèse, juste après chaque protocole expérimental. Les rapports indiqués sont volumiques.

1.2.2 Chromatographie sur couche mince préparative

Une couche uniforme de silice de 2 mm d'épaisseur (Kieselger 60 PF₂₅₄ Merck) est déposée sur des plaques de verre (20 cm × 20 cm), puis est activée à 100 °C durant deux heures.

1.2.3 Chromatographie sur colonne

Le support utilisé est de la silice (60 ACC, 20-40 μm, SDS). Les colonnes sont équilibrées dans le système d'élution. Tous les bruts réactionnels solides à purifier sont dissous dans un minimum de solvant ou fixés sur florisil. Ils sont ensuite introduits en tête de colonne. L'élution des composés peut-être accélérée à l'aide d'une légère surpression d'air comprimé (chromatographie "flash"). L'éluant est dans la plupart des cas fractionné pour atteindre un gradient optimal de séparation, et récupérer ainsi le produit pur désiré.

1.2.4 Chromatographie éclair automatisée

Le combi-flash[®] utilisé est de la marque "Teledyne Isco", il permet l'utilisation de solvants à des débits allant de 5 à 100 mL/min (± 5%), avec une pression maximale de 3,45 bar. L'usage du combi-flash[®] permet de réguler en temps réel les proportions de chacun des solvants. Cet appareil permet également la détection UV instantanée ainsi qu'une séparation des produits en fonction de leur absorbance. Dans ce cas, il est utilisé à une longueur d'onde de 254 (± 5 nm).

1.3 Analyses

1.3.1 Température de fusion

Les températures de fusion (T_f) sont déterminées à l'aide d'un appareil à point de fusion digital électrothermique (série IA9000).

1.3.2 Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires spécifiques $[\alpha]_D^T$ sont mesurés sur un polarimètre ADP220 pour la raie D du sodium dans une cuve de 5 cm de longueur. Ces mesures ont été effectuées à température ambiante dans un solvant approprié. Les concentrations indiquées sont en g/100 mL.

1.3.3 Spectroscopie de RMN

Les spectres de RMN ont été réalisés sur un appareil Bruker DPX-400 avec une fréquence de 400 MHz pour le proton (^1H) et de 100 MHz pour le carbone (^{13}C). Les déplacements chimiques δ sont donnés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage J sont données en Hertz (H). Les abréviations utilisées, non précisées au début du manuscrit pour des raisons de clarté, sont :

- **s** : singulet
- **s_{él}** : singulet élargi
- **d** : doublet
- **t** : triplet
- **q** : quadruplet
- **dd** : double doublet
- **ddd** : double double doublet
- **dt** : double triplet
- **td** : triplet dédoublé
- **m** : multiplet

1.3.4 Spectroscopie infrarouge

Les spectres IR sont réalisés sur un appareil Perkin Elmer 1000 sur des échantillons déposés sur pastille de NaCl. Les nombres d'onde sont exprimés en cm^{-1} .

1.3.5 Spectroscopie UV-vis

Les spectres UV-Visible ont été réalisés sur un spectrophotomètre UV-vis à double faisceau Perkin Elmer Lambda 25 piloté par le logiciel UVWinlab. Tous les spectres sont effectués à l'aide de cellules de quartz de 1 cm de trajet optique. La longueur d'onde correspondant à l'absorption maximale (λ_{max}) est exprimée en nanomètre (nm) et les coefficients d'absorption en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

1.3.6 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse par ionisation chimique (IC) et par ionisation par électrospray (IES) ont été réalisés sur un appareil R30-10 Nermag au Laboratoire de Synthèse, Structure et Fonction de Molécules Bioactives de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI). L'agent ionisant dans le cas de l'ionisation chimique est le gaz ammoniac NH_3 .

1.4 Ultra-sons et micro-ondes

1.4.1 Cuve à ultra-sons

Les activations par ultra-sons ont été réalisées à l'aide d'une cuve à ultrason LEO-80 avec une fréquence de 46 kHz et de puissance 30 W. Toutes les réactions sont conduites dans un ballon, immergé dans la cuve remplie d'eau (équilibre de température à 40 °C).

1.4.2 Micro-ondes

Les irradiations micro-ondes ont été effectuées au moyen d'un four micro-ondes de laboratoire (Milestone, Ethos 1600 Microsynth). La température est mesurée à l'aide d'un thermomètre à fibre optique (ATC-FO)/Ethos. La durée, la puissance et la température peuvent être ajustées par ordinateur au moyen d'un logiciel de contrôle.

Chapitre 2

Synthèse

2.1 Conventions

Afin de permettre une lecture plus aisée du manuscrit, diverses conventions ont été utilisées notamment pour simplifier des écritures en nomenclature.

2.1.1 Nomenclature

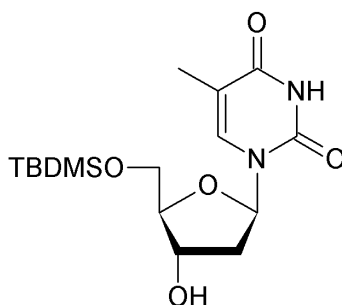
Dans le but d'éviter la nomenclature systématique, une nomenclature semi-triviale a été adoptée pour les nucléosides. Le suffixe précise le nom du nucléoside et toutes les modifications (désoxygénations, ajouts de groupes protecteurs, fonctionnalisations) sont indiquées par les préfixes usuels, aux positions définies dans le chapitre 1, partie 1, suivant les recommandations de l'IUPAC*. A partir des trinuécléosides, une nomenclature simplifiée est utilisée. Le nom de l'oligomère simplifié (trithymidine, tétrathymidine ou pentathymidine) est précédé du groupe fonctionnalisant la position 5' terminale. Les positions des substituants aromatiques sont numérotées dans l'ordre croissant à partir de la position ipso, la position ortho (numérotée 2) étant définie par le substituant nucléosidique considéré prioritaire. Les positions α , β et γ sont définies à partir du nucléoside (cf Figure 1.5, chapitre 1, deuxième partie). Les lettres majuscules A,B,C etc. sont attribuées aux nucléosides, et ce, de bas en haut, suivant la convention biochimiste de représentation de ces derniers.

2.1.2 Modes opératoires

Lorsque plusieurs modes opératoires ont été effectués pour la synthèse d'un même composé (excepté pour les composés **2** et **30**), celui menant au rendement maximum est décrit dans la partie synthèse.

2.2 Produits/Synthèses/Caractéristiques

*. http://old.iupac.org/reports/provisional/abstract04/favre_310305.html

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

Dans un ballon de 100 mL, la thymidine (2,500 g; 10,33 mmol) est solubilisée dans la pyridine anhydre (30 mL) avec 63 mg de 4-(*N,N*-diméthylamino)pyridine (0,05 éq.; 0,52 mmol). La solution est placée sous argon, puis 2,336 g de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (1,5 éq.; 15,49 mmol) sont ajoutés. Le mélange est mis sous agitation 10 h à température ambiante. La solution est ensuite évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie éclair en utilisant un gradient d'éluants de CHCl₃/EtOH (98/2) à CHCl₃/EtOH (95/5). Le produit pur **1**, solide blanc, est obtenu avec un rendement de 98% (3,603 g).

Rf = 0,44 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

$[\alpha]_D^{22} = +7$ (c = 1,0; CHCl₃).

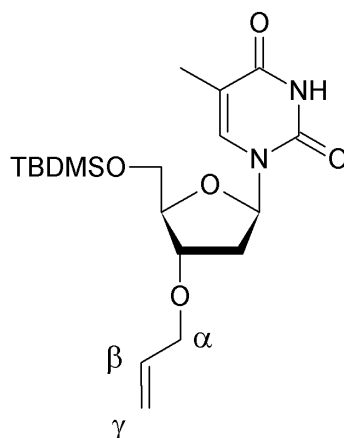
IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1669 (C=C), 1701 (C=O), 2928 (C_{alkyle}-H), 3056 (C_{ar}-H), 3547 (O-H).

Tf : 200 °C ; litt.¹⁰¹ 198-200 °C.

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 11,31 (s, 1H, N-H), 7,47 (d, 1H, J_{H₆,CH₃} = 0,7 Hz, H₆), 1,77 (d, 3H, J_{CH₃,H₆} = 0,7 Hz, CH₃) ; *désoxyribose* : 6,17 (dd, 1H, J = 6,3 Hz, J = 7,6 Hz, H_{1'}), 5,26 (s, 1H, OH), 4,20 (m, 1H, H_{3'}), 3,89 (dd, 1H, J = 3,2 Hz, J = 11,0 Hz, H_{5'a}), 3,81 (m, 1H, H_{4'}), 3,79 (dd, 1H, J = 3,3 Hz, J = 11,0 Hz, H_{5'b}), 2,08 (ddd, 1H, J = 3,0 Hz, J = 6,3 Hz, J = 13,2 Hz, H_{2'a}), 2,05 (ddd, 1H, J = 5,8 Hz, J = 7,6 Hz, J = 13,2 Hz, H_{2'b}) ; **TBDMS** : 0,88 (s, 9H, *t*-Bu), 0,08 (s, 6H, (CH₃)₂).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 163,7 (C₄), 150,4 (C₂), 135,5 (C₆), 109,4 (C₅), 12,2 (CH₃) ; *désoxyribose* : 86,8 (C_{4'}), 83,8 (C_{1'}), 70,5 (C_{3'}), 63,3 (C_{5'}), 39,4 (C_{2'}) ; **TBDMS** : 25,8 (C-CH₃), 18,0 (C-CH₃), -5,4 (Si-CH₃).

MS (IC) : *m/z* 357,2 ([MH]⁺), 380,2 ([MNa]⁺).

3'-O-allyl-5'-O-tert-butyl-diméthylsilylthymidine (2)**Méthode A (ultra-sons) :**

Dans un bicol de 50 mL, à une solution de thymidine 5'-O-silylée (1,647 g ; 4,63 mmol) dans le THF (24 mL), sont ajoutés 463 mg de NaH dispersé dans une huile minérale à 60% (2,5 éq. ; 11,58 mmol). Le mélange est activé par sonication pendant 20 minutes. Le bromure d'allyle (2,5 éq. ; 1250 μ L ; 11,58 mmol) est ensuite additionné et le mélange est activé par ultra-sons pendant 45 minutes. Un traitement de la réaction est effectué avec 20 mL de NH_4Cl , extraction avec 2×60 mL de chloroforme puis lavage avec 20 mL d'eau. Après évaporation du solvant, le brut réactionnel est purifié par chromatographie éclair (éluant CHCl_3/EP (9/1) à CHCl_3). Le produit **2** est isolé sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 95% (1,757 g).

Méthode B (micro-ondes) :

Dans un réacteur micro-ondes adapté, à une solution de thymidine 5'-O-silylée (1,270 g ; 3,57 mmol) dans le THF (15 mL), sont ajoutés 357 mg de NaH (2,5 éq. ; 8,15 mmol) et le mélange est activé par irradiations micro-ondes pendant 2 minutes (200 W, 40 °C). Le bromure d'allyle (2,5 éq. ; 960 μ L ; 8,92 mmol) est ensuite additionné et le mélange est activé par irradiations micro-ondes pendant 4 minutes (200 W, 40 °C). Un traitement de la réaction est effectué avec 15 mL de NH_4Cl , extraction avec 2×45 mL de chloroforme puis lavage avec 15 mL d'eau. Après évaporation du solvant, le brut réactionnel est purifié par chromatographie éclair (éluant CHCl_3/EtP (9/1) à CHCl_3). Le produit **2** est isolé sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 99% (1,413 g).

Rf = 0,44 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (95/5)).

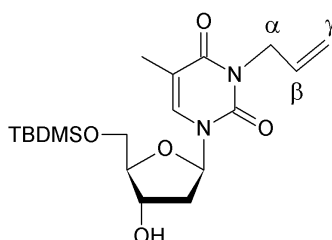
$[\alpha]_D^{22} = +28$ (c = 3,5 ; CHCl_3).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1632 (C=C), 1696 (C=O), 2931 (C_{alkyle}-H), 3068 (C_{ar}-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 11,36 (s_{él}, 1H, N-H), 7,49 (d, 1H, J_{H₆,CH₃} = 0,7 Hz, H₆), 1,78 (s_{él}, 3H, CH₃); *désoxyribose* : 6,12 (dd, 1H, J = 5,8 Hz, J = 8,5 Hz, H_{1'}), 4,07 (m, 1H, H_{3'}), 3,98 (m, 1H, H_{4'}), 3,78 (dd, 1H, J = 4,1 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'a}), 3,74 (dd, 1H, J = 3,9 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'b}), 2,26 (ddd, 1H, J = 1,8 Hz, J = 5,8 Hz, J = 13,7 Hz, H_{2'a}), 2,10 (ddd, 1H, J = 6,0 Hz, J = 8,5 Hz, J = 13,7 Hz, H_{2'b}); *TBDMS* : 0,89 (s_{él}, 9H, *t*-Bu), 0,09 (s, 6H, CH_{3a}), 0,08 (s, 6H, CH_{3b}); *allyle* : 5,90 (ddd, 1H, J = 5,3 Hz, J = 10,4 Hz, J = 17,1 Hz, H_β), 5,28 (dd, 1H, J = 1,6 Hz, J = 17,1 Hz, H_{γ1}), 5,17 (dd, 1H, J = 1,6 Hz, J = 10,4 Hz, H_{γ2}), 4,01 (d, 2H, J = 5,3 Hz, H_α).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 163,6 (C₄), 150,4 (C₂), 135,4 (C₆), 109,5 (C₅), 12,2 (CH₃); *désoxyribose* : 84,1 (C_{4'}), 83,9 (C_{1'}), 78,6 (C_{3'}), 63,3 (C_{5'}), 36,3 (C_{2'}); *TBDMS* : 25,7 (C-CH₃), 18,0 (C-CH₃), -5,5 (Si-CH₃); *allyle* : 134,9 (C_β), 116,6 (C_γ), 69,1 (C_α).

HRMS (IES) : calculée pour C₁₉H₃₂N₂NaO₅Si [MNa]⁺ : 419,1973 ; trouvée : 419,1977.

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

Exceptés le solvant (DMF), le nombre d'équivalents en hydrure et agent alkylant (1,2 éq. au lieu de 2,5 éq.), le protocole d'alkylation est identique à la méthode **B** décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**). A partir de 100 mg de 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (0,28 mmol), le produit pur **3** est isolé sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 96% (107 mg).

Rf = 0,79 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

$[\alpha]_D^{23} = +2$ (c = 1,0; CHCl₃).

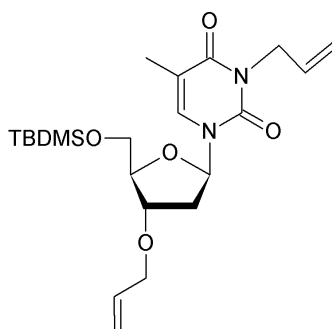
IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1632 (C=C), 1696 (C=O), 2931 (C_{alkyle}-H), 3068 (C_{ar}-H), 3547 (O-H).

Tf : 164 °C.

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 7,56 (d, 1H, J_{H₆,CH₃} = 1,0 Hz, H₆), 1,83 (d, 3H, J_{CH₃,H₆} = 1,0 Hz, CH₃); *désoxyribose* : 6,20 (dd, 1H, J = 6,3 Hz, J = 7,5 Hz, H_{1'}), 5,31 (s_{él}, 1H, OH), 4,21 (m, 1H, H_{3'}), 3,84 (m, 1H, H_{4'}), 3,80 (dd, 1H, J = 3,1 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'a}), 3,73 (dd, 1H, J = 3,7 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'b}), 2,15 (ddd, 1H, J = 3,1 Hz, J = 6,3 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'a}), 2,08 (ddd, 1H, J = 6,0 Hz, J = 7,5 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'b}); *TBDMS* : 0,88 (s_{él}, 9H, *t*-Bu), 0,08 (s, 6H, CH_{3a}), 0,07 (s, 6H, CH_{3b}); *allyle* : 5,81 (ddd, 1H, J = 5,4 Hz, J = 10,5 Hz, J = 17,2 Hz, H_β), 5,09 (dd, 1H, J = 1,5 Hz, J = 10,5 Hz, H_{γ1}), 5,05 (dd, 1H, J = 1,5 Hz, J = 17,2 Hz, H_{γ2}), 4,40 (d_{él}, 2H, J = 5,4 Hz, H_α).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 162,2 (C₄), 150,0 (C₂), 134,2 (C₆), 108,4 (C₅), 12,8 (CH₃); *désoxyribose* : 86,9 (C_{4'}), 84,9 (C_{1'}), 70,3 (C_{3'}), 63,1 (C_{5'}), 39,6 (C_{2'}); *TBDMS* : 25,7 (C-CH₃), 17,9 (C-CH₃), -5,5 (Si-CH₃); *allyle* : 132,3 (C_β), 116,5 (C_γ), 42,4 (C_α).

HRMS (IES) : calculée pour C₁₉H₃₂N₂NaO₅Si [MNa]⁺ : 419,1973 ; trouvée : 419,1974.

3-*N*,3'-*O*-diallyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (4)

Excepté le solvant (DMF), le protocole d'alkylation est identique à la méthode **A** décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**). A partir de 100 mg de 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (0,28 mmol), le produit pur **4** est isolé sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 80% (98 mg).

Rf = 0,70 (CHCl₃/EtOH (8/2)).

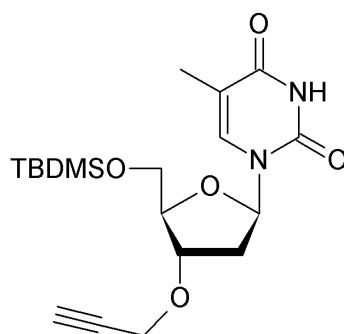
$[\alpha]_D^{23} = +10$ (c = 1,0; CHCl₃).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1630 (C=C), 1696 (C=O), 2932 (C_{alkyle}-H), 3070 (C_{ar}-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 7,57 (d, 1H, J_{H₆,CH₃} = 0,9 Hz, H₆), 1,84 (d, 3H, J_{CH₃,H₆} = 0,9 Hz, CH₃) ; *désoxyribose* : 6,16 (dd, 1H, J = 6,1 Hz, J = 8,0 Hz, H_{1'}), 3,14 (m, 1H, H_{3'}), 3,91 (m, 1H, H_{4'}), 3,79 (dd_{él}, 1H, J = 3,5 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'a}), 3,75 (dd, 1H, J = 3,8 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'b}), 2,34 (ddd, 1H, J = 1,8 Hz, J = 6,1 Hz, J = 13,8 Hz, H_{2'a}), 2,12 (ddd_{él}, 1H, J = 6,1 Hz, J = 8,0 Hz, J = 13,8 Hz, H_{2'b}) ; *TBDMS* : 0,89 (s, 9H, *t*-Bu), 0,08 (s, 6H, (CH₃)₂) ; *N*-allyle : 5,82 (ddd, 1H, J = 5,2 Hz, J = 10,6 Hz, J = 17,2 Hz, H_β), 5,10 (dd, 1H, J = 1,3 Hz, J = 10,6 Hz, H_{γ1}), 5,04 (dd, 1H, J = 1,3 Hz, J = 17,2 Hz, H_{γ2}), 4,38 (d_{él}, 2H, J = 5,2 Hz, H_α) ; *O*-allyle : 5,90 (ddd, 1H, J = 5,3 Hz, J = 10,4 Hz, J = 17,1 Hz, H_β), 5,27 (dd, 1H, J = 1,7 Hz, J = 10,4 Hz, H_{γ1}), 5,16 (dd, 1H, J = 1,7 Hz, J = 17,1 Hz, H_{γ2}), 4,03 (d, 2H, J = 5,3 Hz, H_α).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 162,0 (C₄), 149,8 (C₂), 134,1 (C₆), 108,5 (C₅), 12,7 (CH₃) ; *désoxyribose* : 84,1 (C_{4'}), 84,0 (C_{1'}), 78,4 (C_{3'}), 63,2 (C_{5'}), 36,1 (C_{2'}) ; *TBDMS* : 25,7 (C-CH₃), 17,9 (C-CH₃), -5,6 (Si-CH₃) ; *O*-allyle : 134,7 (C_β), 116,5 (C_γ), 69,1 (C_α) ; *N*-allyle : 132,1 (C_β), 116,6 (C_γ), 42,3 (C_α).

HRMS (IES) : calculée pour C₂₂H₃₆N₂NaO₅Si [MNa]⁺ : 459,6063 ; trouvée : 459,6054.

5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-3'-*O*-(prop-2-ynyl)thymidine (5)

Le protocole d'alkylation est identique à la méthode **A** décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**). A partir de 1,000 g de 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (2,81 mmol), le produit pur **5** est isolé sous forme d'une huile jaune avec un rendement quantitatif (1,107 g).

Rf = 0,53 (CHCl₃/EtOH (95/5)).

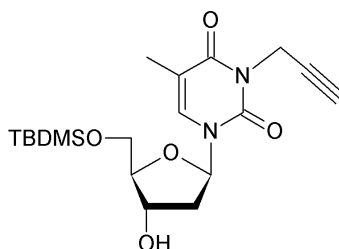
$[\alpha]_D^{27} = +39$ (c = 9,0; CHCl₃).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1686 (C=C), 1700 (C=O), 2118 (C≡C), 2930 (C_{alkyle}-H), 3040 (C_{ar}-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 11,34 (s_{él}, 1H, N-H), 7,48 (d, 1H, J_{H₆,CH₃} = 0,8 Hz, H₆), 1,78 (d, 3H, J_{CH₃,H₆} = 0,8 Hz, CH₃); *désoxyribose* : 6,10 (dd, 1H, J = 5,7 Hz, J = 8,7 Hz, H_{1'}), 4,24 (m, 1H, H_{3'}), 3,99 (m, 1H, H_{4'}), 3,79 (dd, 1H, J = 4,3 Hz, J = 11,2 Hz, H_{5'a}), 3,74 (dd, 1H, J = 3,7 Hz, J = 11,2 Hz, H_{5'b}), 2,28 (ddd, 1H, J = 1,6 Hz, J = 5,7 Hz, J = 13,7 Hz, H_{2'a}), 2,10 (ddd, 1H, J = 6,0 Hz, J = 8,7 Hz, J = 13,7 Hz, H_{2'b}); *TBDMS* : 0,89 (s, 9H, *t*-Bu), 0,09 (s, 6H, (CH₃)₂); *propargyle* : 4,25 (dd, 1H, J = 2,3 Hz, 16,0 Hz, -CH₂-), 4,20 (dd, 1H, J = 2,4 Hz, J = 16,0 Hz, -CH₂-), 3,47 (t_{él}, 1H, J = 2,4 Hz, H_{alcyne}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 163,5 (C₄), 150,3 (C₂), 135,3 (C₆), 109,5 (C₅), 12,2 (CH₃); *désoxyribose* : 83,8 (C_{4'}), 83,8 (C_{1'}), 78,2 (C_{3'}), 63,1 (C_{5'}), 35,9 (C_{2'}); *TBDMS* : 25,7 (C-CH₃), 17,9 (C-CH₃), -5,6 (Si-CH₃); *propargyle* : 79,9 (C_{alcyne}), 77,3 (CH_{alcyne}), 55,7 (CH₂).

HRMS (IES) : calculée pour C₁₉H₃₀N₂NaO₅Si [MNa]⁺ : 417,1816 ; trouvée : 417,1818.

5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-3-*N*-(prop-2-ynyl)thymidine (6)

Exceptés le solvant (DMF), le nombre d'équivalents en hydrure et agent alkylant (1,2 éq. au lieu de 2,5 éq.), le protocole d'alkylation est identique à la méthode **B** décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**). A partir de 356 mg de 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (1,00 mmol), le produit pur **6** est isolé sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 90% (354 mg).

Rf = 0,44 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

$[\alpha]_D^{27} = +10$ (c = 1,0; CHCl₃).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1688 (C=C), 1700 (C=O), 2122 (C≡C), 2929 (C_{alkyle}-H), 3649 (O-H).

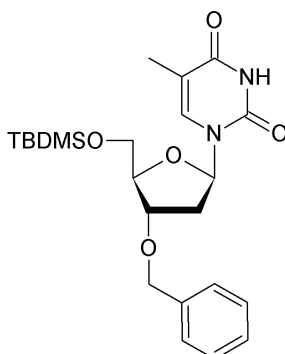
Tf : 108 °C.

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 7,57 (d, 1H, J_{H₆,CH₃} = 0,7 Hz, H₆), 1,84 (d, 3H, J_{CH₃,H₆} = 0,7 Hz, CH₃); *désoxyribose* : 6,20 (dd, 1H, J = 6,3 Hz, J = 7,3 Hz, H_{1'}), 4,21 (m, 1H, H_{3'}), 3,85 (m, 1H, H_{4'}), 3,80 (dd, 1H, J = 3,0 Hz, J = 11,4 Hz, H_{5'a}), 3,73 (dd, 1H, J = 3,8 Hz, J = 11,4 Hz, H_{5'b}), 2,16 (ddd, 1H, J = 3,1 Hz, J = 6,3 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'a}), 2,09 (ddd, 1H, J = 6,5 Hz, J = 7,3 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'b}); *TBDMS* : 0,88 (s, 9H, *t*-Bu), 0,07 (s, 6H, (CH₃)₂); *propargyle* : 4,55 (dd, 1H, J = 2,4 Hz, 15,6 Hz, -CH₂-), 4,51 (dd, 1H, J = 2,3 Hz, J = 15,6 Hz, -CH₂-), 3,10 (t_{ét}, 1H, J = 2,4 Hz, H_{alcyne}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 161,7 (C₄), 149,6 (C₂), 134,6 (C₆), 108,5 (C₅), 12,8 (CH₃); *désoxyribose* : 87,0 (C_{4'}), 85,1 (C_{1'}), 70,4 (C_{3'}), 63,2 (C_{5'}), 39,6 (C_{2'}); *TBDMS* : 25,8 (C-CH₃), 18,0 (C-CH₃), -5,6 (Si-CH₃); *propargyle* : 79,0 (C_{alcyne}), 73,0 (CH_{alcyne}), 30,0 (CH₂).

HRMS (IES) : calculée pour C₁₉H₃₀N₂NaO₅Si [MNa]⁺ : 417,1816 ; trouvée : 417,1819.

3'-O-benzyl-5'-O-tert-butylidiméthylsilylthymidine (7)



Le protocole d'alkylation est identique à la méthode **B** décrite pour la synthèse de la 3'-O-allyl-5'-O-tert-butylidiméthylsilylthymidine (**2**). A partir de 178 mg de 5'-O-tert-butylidiméthylsilylthymidine (0,50 mmol), le produit pur **7** est isolé sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 82% (182 mg).

Rf = 0,60 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

$[\alpha]_D^{22} = +33$ (c = 3,0; CHCl₃).

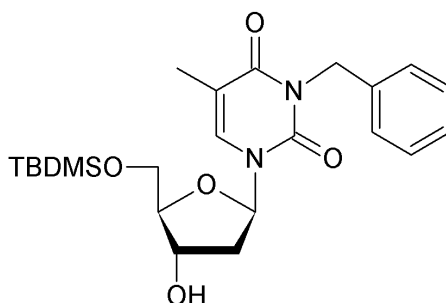
IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1647 (C=C), 1710 (C=O), 2935 (C_{alkyle}-H), 3050 (C_{ar}-H), 3175 (N-H).

Tf : 70 °C.

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 11,36 (s, 1H, N-H), 7,49 (d, 1H, $J_{H_6,CH_3} = 0,8$ Hz, H₆), 1,78 (s_{él}, 3H, CH₃); *désoxyribose* : 6,15 (dd, 1H, J = 5,7 Hz, J = 8,6 Hz, H_{1'}), 4,12 (ddd, 1H, J = 1,7 Hz, J = 3,7 Hz, J = 6,0 Hz, H_{3'}), 4,06 (m, 1H, H_{4'}), 3,78 (dd, 1H, J = 4,2 Hz, J = 11,2 Hz, H_{5'a}), 3,72 (dd, 1H, J = 3,8 Hz, J = 11,2 Hz, H_{5'b}), 2,33 (ddd, 1H, J = 1,7 Hz, J = 5,7 Hz, J = 13,5 Hz, H_{2'a}), 2,12 (ddd, 1H, J = 6,0 Hz, J = 8,6 Hz, J = 13,5 Hz, H_{2'b}); *TBDMS* : 0,86 (s, 9H, *t*-Bu), 0,06 (s, 6H, CH_{3a}), 0,05 (s, 6H, CH_{3b}); *benzyle* : 7,37 (m, 2H, H_{Ar3&5}), 7,35 (m, 2H, H_{Ar2&6}), 7,31 (m, 1H, H_{Ar4}), 4,56 (d, 1H, J = 14,0 Hz, H_α), 4,53 (d, 1H, J = 14,0 Hz, H_α).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 163,5 (C₄), 150,3 (C₂), 135,3 (C₆), 109,4 (C₅), 12,1 (CH₃); *désoxyribose* : 84,0 (C_{4'}), 83,9 (C_{1'}), 78,5 (C_{3'}), 63,2 (C_{5'}), 36,2 (C_{2'}); *TBDMS* : 25,6 (C-CH₃), 17,9 (C-CH₃), -5,6 (Si-CH₃), *benzyle* : 137,9 (C_{Ar1}), 128,2 (C_{Ar3&5}), 127,5 (C_{Ar2&6}), 127,4 (C_{Ar4}), 70,0 (C_α).

HRMS (IES) : calculée pour C₂₃H₃₄N₂NaO₅Si [MNa]⁺ : 469,2129 ; trouvée : 469,2133.

3-*N*-benzyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (8)

Exceptés le solvant (DMF), le nombre d'équivalents en hydrure et agent alkylant (1,2 éq. au lieu de 2,5 éq.), le protocole d'alkylation est identique à la méthode **B** décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**). A partir de 178 mg de 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (0,50 mmol), le produit pur **8** est isolé sous forme d'une huile transparente avec un rendement de 90% (199 mg).

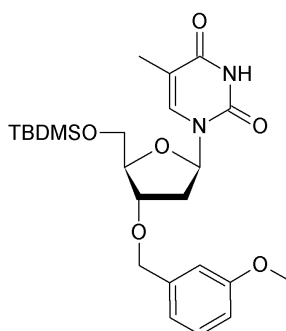
Rf = 0,72 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1648 (C=C), 1705 (C=O), 2938 (C_{alkyle}-H), 3060 (C_{ar}-H), 3400 (O-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 7,58 (s_{él}, 1H, H₆), 1,84 (s_{él}, 3H, CH₃); *désoxyribose* : 6,20 (dd, 1H, J = 6,3 Hz, J = 7,3 Hz, H_{1'}), 5,30 (d, 1H, J = 4,1 Hz, OH), 4,21 (m, 1H, H_{3'}), 3,84 (m, 1H, H_{4'}), 3,80 (dd, 1H, J = 3,1 Hz, J = 11,4 Hz, H_{5'a}), 3,73 (dd, 1H, J = 3,8 Hz, J = 11,4 Hz, H_{5'b}), 2,16 (ddd, 1H, J = 3,2 Hz, J = 6,3 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'a}), 2,09 (ddd, 1H, J = 6,3 Hz, J = 7,3 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'b}); *TBDMS* : 0,88 (s, 9H, *t*-Bu), 0,07 (s, 6H, (CH₃)₂); *benzyle* : 7,37 (m, 2H, H_{Ar3&5}), 7,36 (m, 2H, H_{Ar2&6}), 7,30 (m, 1H, H_{Ar4}), 4,94 (d, 1H, J = 14,5 Hz, H_α), 4,90 (d, 1H, J = 14,5 Hz, H_α).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 162,3 (C₄), 150,0 (C₂), 134,5 (C₆), 108,5 (C₅), 12,8 (CH₃); *désoxyribose* : 87,0 (C_{4'}), 85,0 (C_{1'}), 70,4 (C_{3'}), 63,1 (C_{5'}), 39,6 (C_{2'}); *TBDMS* : 25,7 (C-CH₃), 18,0 (C-CH₃), -5,5 (Si-CH₃), *benzyle* : 137,5 (C_{Ar1}), 128,5 (C_{Ar3&5}), 127,1 (C_{Ar2&6}), 127,0 (C_{Ar4}), 42,5 (C_α).

HRMS (IES) : calculée pour C₂₃H₃₄N₂NaO₅Si [MNa]⁺ : 469,2129 ; trouvée : 469,2135.

5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-3'-*O*-*m*-méthoxybenzylthymidine (9)

Le protocole d'alkylation est identique à la méthode **B** décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**). A partir de 200 mg de 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (0,56 mmol), le produit pur **9** est isolé sous forme d'une huile transparente avec un rendement de 92% (246 mg).

Rf = 0,46 (CHCl₃/EtOH (95/5)).

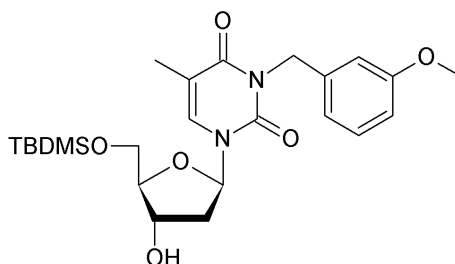
$[\alpha]_D^{22} = +15$ (c = 3,0; CHCl₃).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1649 (C=C), 1715 (C=O), 2935 (C_{alkyle}-H), 3062 (C_{ar}-H), 3171 (N-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 11,34 (s, 1H, N-H), 7,47 (d, 1H, $J_{H_6,CH_3} = 0,7$ Hz, H₆), 1,77 (s_{él}, 3H, CH₃) ; *désoxyribose* : 6,15 (dd, 1H, $J = 5,8$ Hz, $J = 8,4$ Hz, H_{1'}), 4,10 (m, 1H, H_{3'}), 4,05 (m, 1H, H_{4'}), 3,77 (dd, 1H, $J = 4,1$ Hz, $J = 11,3$ Hz, H_{5'a}), 3,72 (dd, 1H, $J = 3,7$ Hz, $J = 11,3$ Hz, H_{5'b}), 2,32 (ddd, 1H, $J = 1,6$ Hz, $J = 5,8$ Hz, $J = 13,6$ Hz, H_{2'a}), 2,11 (ddd, 1H, $J = 6,0$ Hz, $J = 8,4$ Hz, $J = 13,6$ Hz, H_{2'b}) ; *TBDMS* : 0,86 (s, 9H, *t*-But), 0,05 (s, 6H, CH_{3a}), 0,04 (s, 6H, CH_{3b}) ; *m*-méthoxybenzyle : 7,27 (dd_{él}, 1H, $J = 7,7$ Hz, $J = 8,1$ Hz, H_{Ar5}), 6,91 (dd_{él}, 1H, $J = 1,0$ Hz, $J = 8,1$ Hz, H_{Ar6}), 6,90 (d_{él}, 1H, $J = 1,0$ Hz, H_{Ar2}), 6,86 (dd_{él}, 1H, $J = 1,5$ Hz, $J = 7,7$ Hz, H_{Ar4}), 4,53 (d, 1H, $J = 14,3$ Hz, H_α), 4,50 (d, 1H, $J = 14,3$ Hz, H_α), 3,75 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 163,6 (C₄), 150,4 (C₂), 135,4 (C₆), 109,5 (C₅), 12,2 (CH₃) ; *désoxyribose* : 84,1 (C_{4'}), 84,0 (C_{1'}), 78,6 (C_{3'}), 63,3 (C_{5'}), 36,3 (C_{2'}) ; *TBDMS* : 25,7 (C-CH₃), 17,9 (C-CH₃), -5,5 (Si-CH₃), *m*-méthoxybenzyle : 159,3 (C_{Ar3}), 139,6 (C_{Ar1}), 129,4 (C_{Ar5}), 119,7 (C_{Ar6}), 113,1 (C_{Ar2}), 113,0 (C_{Ar4}), 69,9 (C_α), 55,0 (CH₃).

HRMS (IES) : calculée pour C₂₄H₃₆N₂NaO₆Si [MNa]⁺ : 499,2235 ; trouvée : 499,2240.

5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-3-*N*-*m*-méthoxybenzylthymidine (10)

Exceptés le solvant (DMF), le nombre d'équivalents en hydrure et agent alkylant (1,2 éq. au lieu de 2,5 éq.), le protocole d'alkylation est identique à la méthode **B** décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**). A partir de 200 mg de 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (0,56 mmol), le produit pur **10** est isolé sous forme d'une huile transparente avec un rendement de 82% (219 mg).

Rf = 0,62 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

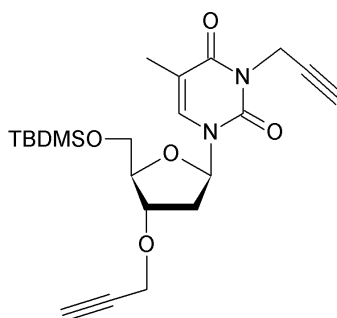
$[\alpha]_D^{25} = + 8$ (c = 7,0; CHCl₃).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1650 (C=C), 1705 (C=O), 2936 (C_{alkyle}-H), 3060 (C_{ar}-H), 3352 (O-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 7,58 (s_{él}, 1H, H₆), 1,85 (s_{él}, 3H, CH₃); *désoxyribose* : 6,21 (dd, 1H, J = 6,3 Hz, J = 7,2 Hz, H_{1'}), 4,21 (m, 1H, H_{3'}), 3,84 (m, 1H, H_{4'}), 3,80 (dd, 1H, J = 3,1 Hz, J = 11,4 Hz, H_{5'a}), 3,73 (dd, 1H, J = 3,8 Hz, J = 11,4 Hz, H_{5'b}), 2,16 (ddd, 1H, J = 3,3 Hz, J = 6,3 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'a}), 2,10 (ddd, 1H, J = 6,1 Hz, J = 7,2 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'b}); *TBDMS* : 0,88 (s, 9H, *t*-Bu), 0,07 (s, 6H, (CH₃)₂); *m*-*méthoxybenzyle* : 7,21 (dd, 1H, J = 7,6 Hz, J = 8,9 Hz, H_{Ar5}), 6,81 (s_{él}, 1H, H_{Ar2}), 6,81 (m, 1H, H_{Ar4}), 6,80 (d_{él}, 1H, J = 7,6 Hz, H_{Ar6}), 4,98 (d, 1H, J = 14,6 Hz, H_α), 4,94 (d, 1H, J = 14,6 Hz, H_α), 3,72 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 162,5 (C₄), 150,3 (C₂), 134,4 (C₆), 108,5 (C₅), 12,8 (CH₃); *désoxyribose* : 86,9 (C_{4'}), 85,0 (C_{1'}), 70,3 (C_{3'}), 63,1 (C_{5'}), 39,5 (C_{2'}); *TBDMS* : 25,7 (C-CH₃), 17,9 (C-CH₃), -5,5 (Si-CH₃), *m*-*méthoxybenzyle* : 159,1 (C_{Ar3}), 138,5 (C_{Ar1}), 129,3 (C_{Ar5}), 119,5 (C_{Ar6}), 113,6 (C_{Ar2}), 112,2 (C_{Ar4}), 54,9 (CH₃), 43,5 (C_α).

HRMS (IES) : calculée pour C₂₄H₃₆N₂NaO₆Si [MNa]⁺ : 499,2235 ; trouvée : 499,2240.

5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-3-*N*,3'-*O*-di(prop-2-ynyl)thymidine (11)

Le protocole d'alkylation est identique à la méthode **B** décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**), excepté l'ajout de 3,5 équivalents de 15-couronne-5 (350 μ L pour 0,5 mmol de 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine). A partir de 178 mg de 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (0,50 mmol), le produit pur **11** est isolé sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 89% (192 mg).

Rf = 0,65 (CHCl₃/EtOH (98/2)).

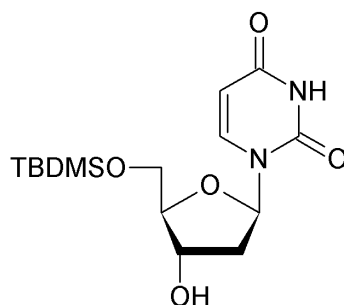
$[\alpha]_D^{27} = +15$ (c = 1,0; CHCl₃).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1689 (C=C), 1702 (C=O), 2119 (C≡C), 2930 (C_{alkyle}-H), 3038 (C_{ar}-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 7,58 (d, 1H, J_{H₆,CH₃} = 0,9 Hz, H₆), 1,85 (d, 3H, J_{CH₃,H₆} = 0,9 Hz, CH₃); *désoxyribose* : 6,14 (dd, 1H, J = 5,8 Hz, J = 8,4 Hz, H_{1'}), 4,26 (m, 1H, H_{3'}), 4,03 (m, 1H, H_{4'}), 3,80 (dd, 1H, J = 4,0 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'a}), 3,76 (dd, 1H, J = 3,8 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'b}), 2,36 (ddd, 1H, J = 1,8 Hz, J = 5,8 Hz, J = 13,9 Hz, H_{2'a}), 2,16 (ddd_{él}, 1H, J = 6,1 Hz, J = 8,4 Hz, J = 13,9 Hz, H_{2'b}); *TBDMS* : 0,89 (s, 9H, *t*-Bu), 0,09 (s, 6H, (CH₃)₂); *N*-propargyle : 4,55 (dd, 1H, J = 2,4 Hz, 17,1 Hz, -CH₂-), 4,51 (dd, J = 2,4 Hz, J = 17,1 Hz, -CH₂-), 3,10 (t_{él}, 1H, J = 2,5 Hz, H_{alcyne}); *O*-propargyle : 4,24 (d_{él}, 2H, J = 2,4 Hz, -CH₂-), 3,47 (t_{él}, 1H, J = 2,4 Hz, H_{alcyne}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 161,6 (C₄), 149,6 (C₂), 134,4 (C₆), 108,6 (C₅), 12,7 (CH₃); *désoxyribose* : 85,1 (C_{1'}), 84,1 (C_{4'}), 78,1 (C_{3'}), 63,1 (C_{5'}), 36,1 (C_{2'}); *TBDMS* : 25,7 (C-CH₃), 17,9 (C-CH₃), -5,6 (Si-CH₃); *O*-propargyle : 79,9 (C_{alcyne}), 77,3 (CH_{alcyne}), 55,7 (CH₂); *N*-propargyle : 78,9 (C_{alcyne}), 72,9 (CH_{alcyne}), 30,0 (CH₂).

MS (IC) : m/z 433,1 ([MH]⁺), 455,3 ([MNa]⁺), 471,0 ([MK]⁺).

5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxyuridine (**12**)

Le protocole d'alkylation est identique à celui décrit pour la synthèse de la 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**1**). A partir de 446 mg de 2'-désoxyuridine (1,95 mmol), le produit pur **12** est isolé sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 91% (609 mg).

Rf = 0,44 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

$[\alpha]_D^{29} = +17$ (c = 2,6; CHCl₃).

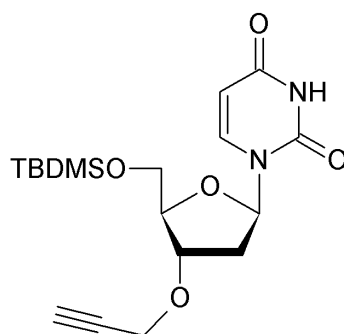
IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1683 (C=C), 1702 (C=O), 2937 (C_{alkyle}-H), 3055 (C_{ar}-H), 3420 (O-H).

Tf : 128 °C ; litt.¹⁰¹ 127-129 °C.

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : uracile : 11,30 (s_{él}, 1H, N-H), 7,75 (d, 1H, J_{H₆,H₅} = 8,1 Hz, H₆), 5,57 (d, 1H, J_{H₅,H₆} = 8,1 Hz, H₅) ; désoxyribose : 6,14 (t_{él}, 1H, J = 6,3 Hz, H_{1'}), 4,19 (m, 1H, H_{3'}), 3,82 (m, 1H, H_{4'}), 3,78 (dd, 1H, J = 3,3 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'a}), 3,72 (dd, 1H, J = 3,5 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'b}), 2,15 (ddd, 1H, J = 3,6 Hz, J = 6,2 Hz, J = 13,2 Hz, H_{2'a}), 2,06 (ddd, 1H, J = 2,4 Hz, J = 6,4 Hz, J = 13,2 Hz, H_{2'b}) ; TBDMS : 0,87 (s, 9H, *t*-Bu), 0,07 (s, 6H, (CH₃)₂).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : uracile : 163,0 (C₄), 150,3 (C₂), 140,1 (C₆), 101,6 (C₅) ; désoxyribose : 86,9 (C_{4'}), 84,3 (C_{1'}), 70,1 (C_{3'}), 63,0 (C_{5'}), 39,8 (C_{2'}) ; TBDMS : 25,8 ((C-CH₃)), 17,9 (C-CH₃), -5,6 (Si-CH_{3a}), -5,5 (CH_{3b}).

MS (IC) : m/z 343,0 ([MH]⁺), 365,0 ([MNa]⁺), 685,0 ([M₂H]⁺), 706,9 ([M₂Na]⁺).

5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxy-3'-*O*-(prop-2-ynyl)uridine (**13**)

Le protocole d'alkylation est identique à la méthode **A** décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**). A partir de 60 mg de 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxyuridine (0,18 mmol), le produit pur **13** est isolé sous forme d'une huile transparente avec un rendement de 55% (38 mg).

Rf = 0,63 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

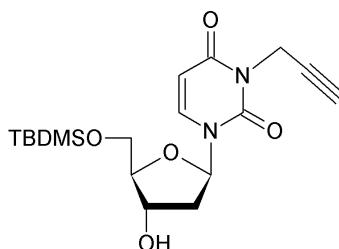
$[\alpha]_D^{20} = +55$ (c = 2,7; CHCl₃).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1690 (C=C), 1722 (C=O), 2121 (C≡C), 2930 (C_{alkyle}-H), 3041 (C_{ar}-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : uracile : 11,34 (s_{él}, 1H, NH), 7,74 (d, 1H, J_{H₆,H₅} = 8,1 Hz, H₆), 5,61 (d, 1H, J_{H₅,H₆} = 8,1 Hz, H₅); désoxyribose : 6,08 (dd, 1H, J = 5,9 Hz, J = 8,0 Hz, H_{1'}), 4,24 (m, 1H, H_{3'} et CH₂_{propargyle}), 4,01 (m, 1H, H_{4'}), 3,77 (dd, 1H, J = 4,1 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'a}), 3,73 (dd, 1H, J = 3,6 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'b}), 2,33 (ddd, 1H, J = 2,3 Hz, J = 5,9 Hz, J = 13,9 Hz, H_{2'a}), 2,12 (ddd, 1H, J = 6,2 Hz, J = 8,0 Hz, J = 13,9 Hz, H_{2'b}); TBDMS : 0,88 (s, 9H, *t*-Bu), 0,08 (s, 6H, (CH₃)₂); propargyle : 4,24 (m, 3H, -CH₂- et H_{3'}), 3,46 (t_{él}, 1H, J = 2,4 Hz, H_{alcyne}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : uracile : 162,9 (C₄), 150,3 (C₂), 139,9 (C₆), 101,8 (C₅); désoxyribose : 84,3 (C_{1'}), 84,1 (C_{4'}), 78,1 (C_{3'}), 63,1 (C_{5'}), 36,4 (C_{2'}); TBDMS : 25,7 ((C-CH₃)), 17,9 (C-CH₃), -5,6 (Si-CH_{3a}), -5,5 (Si-CH_{3b}); propargyle : 79,9 (C_{alcyne}), 77,4 (CH_{alcyne}), 55,8 (CH₂).

MS (IC) : *m/z* 381,4 ([MH]⁺), 403,4 ([MNa]⁺), 419,4 ([MK]⁺), 761,5 ([M₂H]⁺), 783,3 ([M₂Na]⁺).

5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxy-3-*N*-(prop-2-ynyl)uridine (**14**)

Exceptés le solvant (DMF), le nombre d'équivalents en hydrure et agent alkylant (1,2 éq. au lieu de 2,5 éq.), le protocole d'alkylation est identique à la méthode **A** décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**). A partir de 42 mg de 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxyuridine (0,12 mmol), le produit pur **14** est isolé sous forme d'une huile transparente avec un rendement de 94% (44 mg).

Rf = 0,70 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

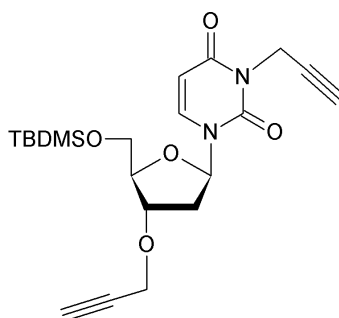
$[\alpha]_D^{21} = +18$ (c = 1,0; CHCl₃).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1689 (C=C), 1720 (C=O), 2120 (C≡C), 2926 (C_{alkyle}-H), 3050 (C_{ar}-H), 3620 (O-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : uracile : 7,85 (d, 1H, J_{H₆,H₅} = 8,1 Hz, H₆), 5,77 (d, 1H, J_{H₅,H₆} = 8,1 Hz, H₅) ; désoxyribose : 6,17 (t_{él}, 1H, J = 6,5 Hz, H_{1'}), 5,33 (d, 1H, J = 3,9 Hz, OH), 4,21 (m, 1H, H_{3'}), 3,86 (m, 1H, H_{4'}), 3,80 (dd, 1H, J = 3,2 Hz, J = 11,4 Hz, H_{5'a}), 3,73 (dd, 1H, J = 3,5 Hz, J = 11,4 Hz, H_{5'b}), 2,21 (ddd, 1H, J = 3,7 Hz, J = 6,5 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'a}), 2,10 (dt, 1H, J = 6,5 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'b}) ; TBDMS : 0,88 (s, 9H, *t*-Bu), 0,07 (s, 6H, (CH₃)₂) ; propargyle : 4,53 (dd, 1H, J = 2,4 Hz, 17,2 Hz, -CH₂-), 4,48 (dd, 1H, J = 2,5 Hz, J = 17,2 Hz, -CH₂-), 3,11 (t_{él}, 1H, J = 2,4 Hz, H_{alcyne}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : uracile : 160,9 (C₄), 149,7 (C₂), 139,1 (C₆), 100,6 (C₅) ; désoxyribose : 87,1 (C_{4'}), 85,5 (C_{1'}), 70,0 (C_{3'}), 62,9 (C_{5'}), 40,0 (C_{2'}) ; TBDMS : 25,8 (C-CH₃), 18,0 (C-CH₃), -5,6 (Si-CH_{3a}), -5,5 (Si-CH_{3b}) ; propargyle : 78,9 (C_{alcyne}), 73,0 (CH_{alcyne}), 29,7 (CH₂).

MS (IC) : *m/z* 381,4 ([MH]⁺), 403,4 ([MNa]⁺), 419,4 ([MK]⁺), 761,5 ([M₂H]⁺), 783,3 ([M₂Na]⁺).

5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxy-3-*N*,3'-*O*-di(prop-2-ynyl)uridine (15)

Le protocole d'alkylation est identique à la méthode **B** décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**), excepté l'ajout de 3,5 équivalents d'éther couronne 15-C-5 (90 μ L pour 0,13 mmol de 2'-désoxyuridine 5'-*O*-silylée). A partir de 44 mg de 5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxyuridine (0,13 mmol), le produit pur **15** est isolé sous forme d'une huile transparente avec un rendement de 82% (44 mg).

Rf = 0,85 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

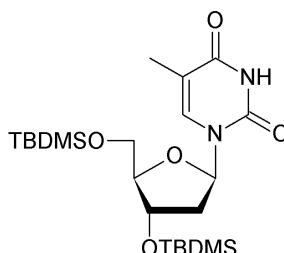
$[\alpha]_D^{22} = +20$ (c = 3,3; CHCl₃).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1690 (C=C), 1721 (C=O), 2119 (C≡C), 2930 (C_{alkyle}-H), 3042 (C_{ar}-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : uracile : 7,84 (d, 1H, $J_{H_6, H_5} = 8,1$ Hz, H₆), 5,81 (d, 3H, $J_{H_5, H_6} = 8,1$ Hz, H₅); désoxyribose : 6,12 (dd, 1H, $J = 6,0$ Hz, $J = 7,7$ Hz, H_{1'}), 4,26 (dd_{él}, 1H, $J = 2,5$ Hz, $J = 5,4$ Hz, H_{3'}), 4,05 (m, 1H, H_{4'}), 3,80 (dd, 1H, $J = 4,1$ Hz, $J = 11,3$ Hz, H_{5'a}), 3,74 (dd, 1H, $J = 3,5$ Hz, $J = 11,3$ Hz, H_{5'b}), 2,41 (ddd, 1H, $J = 2,5$ Hz, $J = 6,0$ Hz, $J = 13,8$ Hz, H_{2'a}), 2,17 (ddd, 1H, $J = 6,1$ Hz, $J = 7,7$ Hz, $J = 13,8$ Hz, H_{2'b}); TBDMS : 0,88 (s, 9H, *t*-Bu), 0,08 (s, 6H, (CH₃)₂); *N*-propargyle : 4,53 (dd, 1H, $J = 2,4$ Hz, 17,0 Hz, -CH₂-), 4,48 (dd, 1H, $J = 2,5$ Hz, $J = 17,0$ Hz, -CH₂-), 3,12 (t_{él}, 1H, $J = 2,4$ Hz, H_{alcyne}); *O*-propargyle : 4,23 (d_{él}, 1H, $J = 2,2$ Hz, 2H, -CH₂-), 3,48 (t_{él}, 1H, $J = 2,2$ Hz, H_{alcyne}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : uracile : 160,9 (C₄), 149,7 (C₂), 139,0 (C₆), 100,8 (C₅); désoxyribose : 85,6 (C_{1'}), 84,4 (C_{1'}), 77,9 (C_{3'}), 63,0 (C_{5'}), 36,6 (C_{2'}); TBDMS : 25,7 (C-CH₃), 17,9 (C-CH₃), -5,5 (Si-CH_{3a}), -5,6 (Si-CH_{3b}); *O*-propargyle : 80,0 (C_{alcyne}), 77,4 (CH_{alcyne}), 55,9 (CH₂); *N*-propargyle : 78,9 (C_{alcyne}), 73,0 (CH_{alcyne}), 29,7 (CH₂).

MS (IC) : m/z 419,1 ([MH]⁺), 441,2 ([MNa]⁺), 858,6 ([M₂Na]⁺).

3'-O,5'-O-di(*tert*-butyldiméthylsilyl)thymidine (16)

Dans un ballon de 100 mL, on introduit 2,500 g (10,33 mmol) de thymidine qui est dissous dans 30 mL d'un mélange DMF/THF (1 : 1). On ajoute 2,813 g (4,0 éq.) d'imidazole, 3,861 g (2,2 éq.) de nitrate d'argent et 3,425 g (2,2 éq.) de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et atmosphère inerte. La réaction est suivie par CCM et stoppée au bout de 3 heures. Le mélange réactionnel est alors filtré sur disque fritté, repris dans 60 mL d'acétate d'éthyle, puis lavé avec 3×4 mL d'eau, séché sur MgSO₄, et évaporé. La purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/EP (9/1) à CHCl₃) conduit au produit pur **16**, sous forme d'un solide blanc, avec un rendement de 98% (4,757 g).

Rf = 0,75 (CHCl₃/EtOH (95/5)).

$[\alpha]_D^{22} = +12$ (c = 2,0; CHCl₃).

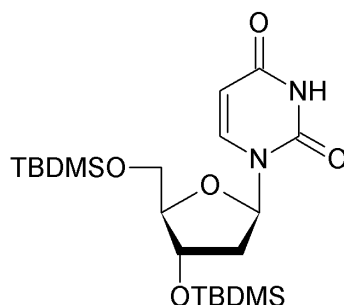
IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1698 (C=O), 2929 (C_{alkyle}-H), 3053 (C_{ar}-H).

Tf : 128 °C ; litt.¹⁰¹ 127-129 °C.

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 11,32 (s_{él}, 1H, N-H), 7,43 (d, 1H, J_{H₆,CH₃} = 0,9 Hz, H₆), 1,78 (d, 3H, J_{CH₃,H₆} = 0,9 Hz, CH₃) ; *désoxyribose* : 6,15 (dd, 1H, J = 6,2 Hz, J = 7,7 Hz, H_{1'}), 4,36 (dt, 1H, J = 2,9 Hz, J = 5,8 Hz, H_{3'}), 3,78 (m, 1H, H_{4'}), 3,76 (dd, 1H, J = 4,1 Hz, J = 11,0 Hz, H_{5'a}), 3,70 (dd, 1H, J = 3,6 Hz, J = 11,0 Hz, H_{5'b}), 2,19 (ddd, 1H, J = 5,8 Hz, J = 7,7 Hz, J = 13,4 Hz, H_{2'a}), 2,07 (ddd, 1H, J = 2,9 Hz, J = 6,2 Hz, J = 13,4 Hz, H_{2'b}) ; *TBDMS* : 0,89 (s, 9H, *t*-Bu_a), 0,88 (s, 9H, *t*-Bu_b), 0,09 (s, 6H, (CH_{3a})₂), 0,08 (s, 6H, (CH_{3b})₂).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 163,5 (C₄), 150,3 (C₂), 135,5 (C₆), 109,4 (C₅), 12,2 (CH₃) ; *désoxyribose* : 86,6 (C_{4'}), 83,6 (C_{1'}), 71,9 (C_{3'}), 62,6 (C_{5'}), 39,0 (C_{2'}) ; *TBDMS* : 25,7 (C-CH_{3a}), 25,6 (C-CH_{3b}), 17,9 (C-CH_{3a}), 17,6 (C-CH_{3b}), -5,6 (Si-CH_{3a}), -5,0 (Si-CH_{3b}), -4,9 (Si-CH_{3c}).

HRMS (IES) : calculée pour C₂₂H₄₂N₂NaO₅Si₂ [MNa]⁺ : 493,2524 ; trouvée : 493,2532.

3'-O,5'-O-di(*tert*-butyldiméthylsilyl)-2'-désoxyuridine (17)

Le protocole de protection est identique à la méthode décrite pour la synthèse de la 3'-O,5'-O-di(*tert*-butyldiméthylsilyl)thymidine (16). A partir de 684 mg de 2'-désoxyuridine (3,00 mmol), le produit pur 17 est isolé sous forme d'une huile transparente avec un rendement de 64% (870 mg).

Rf = 0,51 (EP / AcOEt (5/5)).

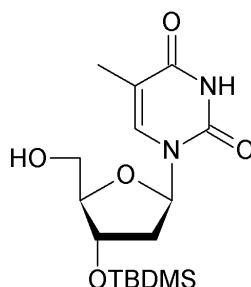
$[\alpha]_D^{24} = +35$ (c = 3,3 ; CHCl₃).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1710 (C=O), 2930 (C-H), 3055 (C_{ar}-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : uracile : 11,37 (s_{él}, 1H, N-H), 7,74 (d, 1H, J_{H₆,H₅} = 8,1 Hz, H₆), 5,62 (d, 1H, J_{H₅,H₆} = 8,1 Hz, H₅) ; désoxyribose : 6,17 (t, 1H, J = 6,4 Hz, H_{1'}), 4,41 (ddd_{él}, 1H, J = 4,0 Hz, J = 6,1 Hz, J = 6,8 Hz, H_{3'}), 3,83 (m, 1H, H_{4'}), 3,81 (dd, 1H, J = 4,1 Hz, J = 11,0 Hz, H_{5'a}), 3,73 (dd, 1H, J = 3,2 Hz, J = 11,0 Hz, H_{5'b}), 2,25 (dd_{él}, 1H, J = 6,4 Hz, J = 13,2 Hz, H_{2'a}), 2,17 (ddd, 1H, J = 4,0 Hz, J = 6,4 Hz, J = 13,2 Hz, H_{2'b}) ; TBDMS : 0,92 (s, 9H, *t*-Bu_a), 0,91 (s, 9H, *t*-Bu_b), 0,12 (s, 6H, (CH_{3a})₂), 0,11 (s, 6H, (CH_{3b})₂).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : uracile : 163,0 (C₄), 150,3 (C₂), 140,1 (C₆), 101,7 (C₅) ; désoxyribose : 86,6 (C_{4'}), 84,0 (C_{1'}), 71,4 (C_{3'}), 62,3 (C_{5'}), 39,5 (C_{2'}) ; TBDMS : 25,7 ((C-CH_{3a})), 25,6 (C-CH_{3b}), 17,9 (C-CH_{3a}), 17,7 (C-CH_{3b}), -5,6 (Si-CH_{3a}), -5,5 (Si-CH_{3b}), -5,0 (Si-CH_{3c}).

HRMS (IES) : calculée pour C₂₁H₄₀N₂NaO₅Si₂ [MNa]⁺ : 479,2368 ; trouvée : 479,2377.

3'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (18)

Dans un ballon de 25 mL, on introduit 500 mg (1,06 mmol) de produit **16** dans 8 mL de méthanol anhydre et 1,123 g (4,2 éq.) de paratoluènesulfonate de pyridinium (PPTS). Le milieu réactionnel est mis sous agitation et sous atmosphère d'argon. Après 22 heures de réaction, le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans 20 mL d'acétate d'éthyle et lavé trois fois avec 2 mL d'eau puis séché sur MgSO_4 , filtré et évaporé. Le produit brut obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 73% (276 mg) est utilisé tel quel par la suite. Une partie du brut est purifiée afin d'établir les caractéristiques physicochimiques.

Rf = 0,60 (AcOEt/EP (98/2)).

$[\alpha]_D^{22} = +20$ (c = 3,2; CHCl_3).

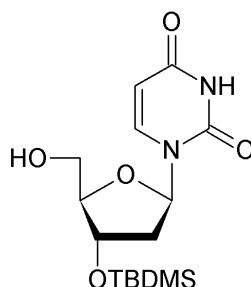
IR : ν_{max} (cm^{-1}) : 1700 (C=O), 2925 (C-H), 3050 (C_{ar} -H), 3550 (O-H).

Tf : 94 °C ; litt.¹⁰¹ 93-94 °C.

RMN ^1H (DMSO, d^6) : *thymine* : 11,28 (s $_{\text{él}}$, 1H, N-H), 7,66 (d, 1H, $J_{\text{H}_6, \text{CH}_3} = 0,9$ Hz, H_6), 1,78 (d, 3H, $J_{\text{CH}_3, \text{H}_6} = 0,9$ Hz, CH_3) ; *désoxyribose* : 6,15 (dd, 1H, $J = 6,1$ Hz, $J = 7,8$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 5,07 (s $_{\text{él}}$, 1H, OH), 4,41 (dt, 1H, $J = 2,9$ Hz, $J = 5,8$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 3,75 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3,70 (d $_{\text{él}}$, 1H, $J = 11,8$ Hz, $\text{H}_{5'b}$), 3,58 (d $_{\text{él}}$, 1H, $J = 11,8$ Hz, $\text{H}_{5'a}$), 2,18 (ddd, 1H, $J = 5,8$ Hz, $J = 7,8$ Hz, $J = 13,4$ Hz, $\text{H}_{2'a}$), 2,07 (ddd, 1H, $J = 2,9$ Hz, $J = 6,1$ Hz, $J = 13,4$ Hz, $\text{H}_{2'b}$) ; *TBDMS* : 0,89 (s, 9H, *t*-Bu), 0,08 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2$).

RMN ^{13}C (DMSO, d^6) : *thymine* : 163,6 (C_4), 150,4 (C_2), 135,9 (C_6), 109,3 (C_5), 12,2 (CH_3) ; *désoxyribose* : 87,2 ($\text{C}_{4'}$), 83,6 ($\text{C}_{1'}$), 72,1 ($\text{C}_{3'}$), 60,9 ($\text{C}_{5'}$), 39,5 ($\text{C}_{2'}$) ; *TBDMS* : 25,6 (C- CH_3), 17,6 (C- CH_3), -4,9 (Si- CH_3).

HRMS (IES) : calculée pour $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{NaO}_5\text{Si}$ $[\text{MNa}]^+$: 379, 1659 ; trouvée : 379,1669.

3'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxyuridine (19)

Le protocole de protection est identique à la méthode décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (18). A partir de 450 mg de 2'-désoxyuridine disilylée (0,99 mmol), le produit pur **19** est isolé sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 60% (203 mg).

Rf = 0,49 (AcOEt/EtOH (98/2)).

$[\alpha]_D^{22} = +60$ (c = 3,3; CHCl₃).

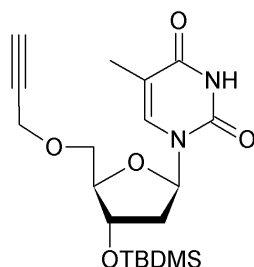
IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1710 (C=O), 2930 (C-H), 3048 (C_{ar}-H), 3545 (O-H).

Tf : 205 °C ; litt.¹⁰¹ 205-207 °C.

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : uracile : 11,29 (s_{él}, 1H, N-H), 7,82 (d, 1H, J_{H₆,H₅} = 8,1 Hz, H₆), 5,64 (d, 1H, J_{H₅,H₆} = 8,1 Hz, H₅) ; désoxyribose : 6,14 (dd, 1H, J = 6,3 Hz, J = 7,0 Hz, H_{1'}), 5,05 (t_{él}, 1H, J = 6,6 Hz, OH), 4,41 (m, 1H, H_{3'}), 3,77 (m, 1H, H_{4'}), 3,58 (dd_{él}, 1H, J = 4,6 Hz, J = 12,1 Hz, H_{5'a}), 3,52 (dd_{él}, 1H, J = 4,3 Hz, J = 12,1 Hz, H_{5'b}), 2,16 (ddd, 1H, J = 6,3 Hz, J = 7,0 Hz, J = 13,2 Hz, H_{2'a}), 2,08 (ddd, 1H, J = 3,3 Hz, J = 6,3 Hz, J = 13,2 Hz, H_{2'b}) ; TBDMS : 0,87 (s, 9H, *t*-Bu), 0,08 (s, 6H, (CH₃)₂).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : uracile : 163,0 (C₄), 150,3 (C₂), 140,4 (C₆), 101,8 (C₅) ; désoxyribose : 87,3 (C_{4'}), 83,9 (C_{1'}), 71,9 (C_{3'}), 60,8 (C_{5'}), 39,7 (C_{2'}) ; TBDMS : 25,6 (C-CH₃), 17,6 (C-CH₃), -5,0 (Si-CH_{3a}), -4,9 (Si-CH_{3b}).

HRMS (IES) : calculée pour C₁₅H₂₆N₂NaO₅Si [MNa]⁺ : 365,4520 ; trouvée : 365,4518.

3'-O-tert-butyl-diméthylsilyl-5'-O-(prop-2-ynyl)thymidine (20)

Le protocole d'alkylation est identique à la méthode **A** décrite pour la synthèse de la 3'-O-allyl-5'-O-tert-butyl-diméthylsilylthymidine (**2**). A partir de 43 mg de 3'-O-tert-butyl-diméthylsilylthymidine **18** (0,12 mmol), le produit pur **20** est isolé sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 63% (30 mg).

Rf = 0,36 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

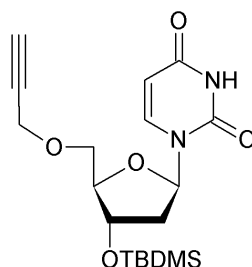
IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1690 (C=C), 1701 (C=O), 2119 (C≡C), 2930 (C_{alkyle}-H), 3041 (C_{ar}-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 11,24 (s_{él}, 1H, N-H), 7,56 (d, 1H, J_{H₆,CH₃} = 0,8 Hz, H₆), 1,80 (s_{él}, 3H, CH₃); *désoxyribose* : 6,16 (dd, 1H, J = 6,3 Hz, J = 7,1 Hz, H_{1'}), 4,39 (m, 1H, H_{4'}), 4,24 (m, 1H, H_{3'}), 3,67 (dd, 1H, J = 3,3 Hz, J = 10,5 Hz, H_{5'a}), 3,60 (dd, 1H, J = 4,0 Hz, J = 10,5 Hz, H_{5'b}), 2,19 (ddd, 1H, J = 6,3 Hz, J = 7,1 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'a}), 2,06 (ddd, 1H, J = 3,2 Hz, J = 6,3 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'b}); *TBDMS* : 0,88 (s, 9H, *t*-Bu), 0,09 (s, 6H, (CH₃)₂); *propargyle* : 4,25 (dd, 1H, J = 2,3 Hz, 16,0 Hz, -CH₂-), 4,20 (dd, 1H, J = 2,1 Hz, J = 16,0 Hz, -CH₂-), 3,50 (t_{él}, 1H, J = 2,2 Hz, H_{alcyne}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 163,7 (C₄), 150,4 (C₂), 135,8 (C₆), 109,6 (C₅), 12,3 (CH₃); *désoxyribose* : 85,1 (C_{4'}), 83,9 (C_{1'}), 72,3 (C_{3'}), 69,1 (C_{5'}), 39,4 (C_{2'}); *TBDMS* : 25,7 (C-CH₃), 17,7 (C-CH₃), -4,9 (Si-CH_{3a}), -4,8 (Si-CH_{3b}); *propargyle* : 79,9 (C_{alcyne}), 77,6 (CH_{alcyne}), 57,9 (CH₂).

HRMS (IES) : calculée pour C₁₉H₃₀N₂NaO₅Si [MNa]⁺ : 417,1816 ; trouvée : 417,1822.

3'-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxy-5'-O-(prop-2-ynyl)uridine (21)



Le protocole d'alkylation est identique à la méthode **A** décrite pour la synthèse de la 3'-O-allyl-5'-O-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**). A partir de 100 mg de 3'-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2'-désoxyuridine **19** (0,29 mmol), le produit pur **21** est isolé sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 62% (69 mg).

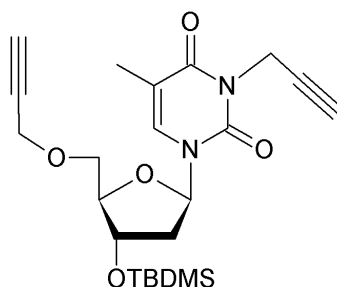
Rf = 0,71 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1699 (C=O), 2122 (C≡C), 2920 (C_{alkyle}-H) 3041 (C_{ar}-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : uracile : 11,31 (s_{él}, 1H, N-H), 7,69 (d, 1H, J_{H₆,H₅} = 8,1 Hz, H₆), 5,62 (d, 1H, J_{H₅,H₆} = 8,1 Hz, H₅) ; désoxyribose : 6,14 (t_{él}, 1H, J = 6,5 Hz, H_{1'}), 4,38 (m, 1H, H_{3'}), 3,89 (m, 1H, H_{4'}), 3,64 (dd, 1H, J = 3,7 Hz, J = 10,6 Hz, H_{5'a}), 3,59 (dd, 1H, J = 4,4 Hz, J = 10,6 Hz, H_{5'b}), 2,19 (dt, 1H, J = 6,5 Hz, J = 13,1 Hz, H_{2'a}), 2,09 (ddd, 1H, J = 3,9 Hz, J = 6,5 Hz, J = 13,1 Hz, H_{2'b}) ; TBDMS : 0,87 (s, 9H, *t*-But), 0,08 (s, 6H, (CH₃)₂) ; propargyle : 4,20 (d_{él}, 2H, J = 2,1 Hz, -CH₂-), 3,50 (t_{él}, 1H, J = 2,1 Hz, H_{alcyne}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : uracile : 163,1 (C₄), 150,4 (C₂), 140,4 (C₆), 101,9 (C₅) ; désoxyribose : 85,1 (C_{4'}), 84,1 (C_{1'}), 72,1 (C_{3'}), 68,9 (C_{5'}), 39,3 (C_{2'}) ; TBDMS : 25,7 (C-CH₃), 17,7 (C-CH₃), -4,9 (Si-CH_{3a}), -4,8 (Si-CH_{3b}) ; propargyle : 79,9 (C_{alcyne}), 77,4 (CH_{alcyne}), 55,8 (CH₂).

HRMS (IES) : calculée pour C₁₈H₂₈N₂NaO₅Si [MNa]⁺ : 403,1705 ; trouvée : 403,1710.

3'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-3-*N*,5'-*O*-di(prop-2-ynyl)thymidine (22)

Le protocole d'alkylation est identique à la méthode **B** décrite pour la synthèse de la 3'-*O*-allyl-5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (**2**), excepté l'ajout de 3,5 équivalents de 15-couronne-5 (56 μ L pour 0,08 mmol de 3'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine **18**). A partir de 30 mg de 3'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine (0,08 mmol), le produit pur **22** est isolé sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 82% (27 mg).

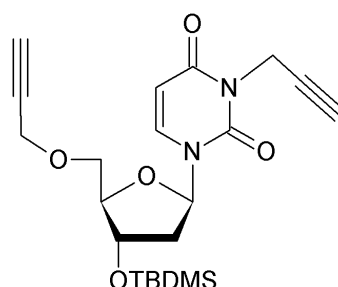
Rf = 0,73 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1700 (C=O), 2118 (C≡C), 2940 (C_{alkyle}-H) 3050 (C_{ar}-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 7,66 (d, 1H, J_{H₆,CH₃} = 0,9 Hz, H₆), 1,87 (d, 3H, J_{CH₃,H₆} = 0,9 Hz, CH₃) ; *désoxyribose* : 6,20 (t_{él}, 1H, J = 6,6 Hz, H_{1'}), 4,41 (dt, 1H, J = 3,3 Hz, J = 6,2 Hz, H_{3'}), 3,93 (m, 1H, H_{4'}), 3,69 (dd, 1H, J = 4,0 Hz, J = 10,6 Hz, H_{5'a}), 3,62 (dd, 1H, J = 4,1 Hz, J = 10,6 Hz, H_{5'b}), 2,23 (ddd, 1H, J = 6,2 Hz, J = 6,9 Hz, J = 13,6 Hz, H_{2'a}), 2,12 (ddd, 1H, J = 3,3 Hz, J = 6,4 Hz, J = 13,6 Hz, H_{2'b}) ; *TBDMS* : 0,88 (s, 9H, *t*-Bu), 0,09 (s, 6H, (CH₃)₂) ; *N*-*propargyle* : 4,55 (dd, 1H, J = 2,4 Hz, 16,8 Hz, -CH₂-), 4,51 (dd, 1H, J = 2,5 Hz, J = 16,8 Hz, -CH₂-), 3,10 (t_{él}, 1H, J = 2,4 Hz, H_{alcyne}) ; *O*-*propargyle* : 4,25 (dd, 1H, J = 2,3 Hz, J = 15,9 Hz, -CH₂-), 4,21 (dd, 1H, J = 2,4 Hz, J = 15,9 Hz, -CH₂-), 3,51 (t_{él}, 1H, J = 2,4 Hz, H_{alcyne}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 161,7 (C₄), 149,7 (C₂), 134,9 (C₆), 108,7 (C₅), 12,9 (CH₃) ; *désoxyribose* : 85,3 (C_{1'}), 85,0 (C_{4'}), 72,2 (C_{3'}), 68,9 (C_{5'}), 39,6 (C_{2'}) ; *TBDMS* : 25,6 (C-CH₃), 17,6 (C-CH₃), -5,0 (Si-CH_{3a}), -4,9 (Si-CH_{3b}) ; *O*-*propargyle* : 79,9 (C_{alcyne}), 77,6 (CH_{alcyne}), 57,9 (CH₂) ; *N*-*propargyle* : 79,0 (C_{alcyne}), 73,0 (CH_{alcyne}), 30,0 (CH₂).

HRMS (IES) : calculée pour C₂₂H₃₂N₂NaO₅Si [MNa]⁺ : 455,1972 ; trouvée : 455,1977.

3'-O-tert-butyl-diméthylsilyl-2'-désoxy-3-N,5'-O-di(prop-2-ynyl)uridine (23)

Le protocole d'alkylation est identique à la méthode **B** décrite pour la synthèse de la 3'-O-allyl-5'-O-tert-butyl-diméthylsilylthymidine (**2**), excepté l'ajout de 3,5 équivalents de 15-couronne-5 (195 μ L pour 0,28 mmol de 3'-O-tert-butyl-diméthylsilyl-2'-désoxyuridine). A partir de 100 mg de 3'-O-tert-butyl-diméthylsilylthymidine (0,28 mmol), le produit pur **23** est isolé sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 60% (56 mg).

Rf = 0,73 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

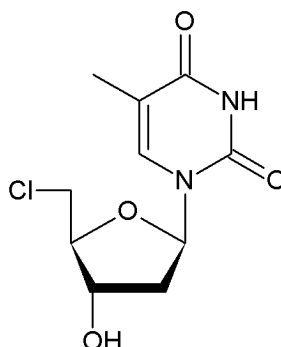
IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1700 (C=O), 2120 (C \equiv C), 2924 (C_{alkyle}-H) 3040 (C_{ar}-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : uracile : 7,92 (d, 1H, $J_{H_6,H_5} = 8,2$ Hz, H₆), 5,83 (d, 1H, $J_{H_5,H_6} = 8,2$ Hz, H₅), ; désoxyribose : 6,17 (t_{él}, 1H, $J = 6,7$ Hz, H_{1'}), 4,42 (m, 1H, H_{3'}), 3,81 (m, 1H, H_{4'}), 3,71 (m, 1H, H_{5'a}), 3,60 (m, 1H, H_{5'b}), 2,21 (ddd, 1H, $J = 6,1$ Hz, $J = 6,7$ Hz, $J = 13,2$ Hz, H_{2'a}), 2,14 (ddd, 1H, $J = 3,7$ Hz, $J = 6,7$ Hz, $J = 13,2$ Hz, H_{2'b}); TBDMS : 0,88 (s, 9H, *t*-Bu), 0,09 (s, 6H, (CH₃)₂); *N*-propargyle : 4,52 (dd, 1H, $J = 2,3$ Hz, 16,8 Hz, -CH₂-), 4,51 (dd, 1H, $J = 2,2$ Hz, $J = 16,8$ Hz, -CH₂-), 3,11 (t_{él}, 1H, $J = 2,4$ Hz, H_{alcyne}); *O*-propargyle : 4,21 (m, 2H, -CH₂-), 3,51 (t_{él}, 1H, $J = 2,4$ Hz, H_{alcyne}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : uracile : 160,9 (C₄), 149,7 (C₂), 139,2 (C₆), 100,9 (C₅); désoxyribose : 85,5 (C_{1'}), 85,2 (C_{4'}), 78,9 (C_{3'}), 69,8 (C_{5'}), 39,7 (C_{2'}); TBDMS : 25,7 (C-CH₃), 17,7 (C-CH₃), -4,9 (Si-CH_{3a}), -4,8 (Si-CH_{3b}); *O*-propargyle : 78,9 (C_{alcyne}), 77,7 (CH_{alcyne}), 57,9 (CH₂); *N*-propargyle : 79,0 (C_{alcyne}), 73,0 (CH_{alcyne}), 29,8 (CH₂).

HRMS (IES) : calculée pour C₂₁H₃₀N₂NaO₅Si [MNa]⁺ : 441,1816 ; trouvée : 441,1835.

5'-chloro-5'-désoxythymidine (24)



Dans un bicol de 25 mL, la thymidine (500 mg ; 2,07 mmol) est dissoute dans le DMF (8 mL) avec 590 mg de chlorure de tosylate (1,5 éq. ; 3,10 mmol). Après activation par irradiations micro-ondes pendant 1 minute (300 W, 80 °C), la conversion totale de la thymidine est observée par CCM. Le mélange est évaporé à sec sous pression réduite. Il est ensuite purifié par chromatographie éclair à l'aide d'un gradient d'éluant de CHCl₃ à CHCl₃/EtOH (9/1). Le produit pur est isolé sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 85% (458 mg).

Rf = 0,38 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

$[\alpha]_D^{22} = +16$ (c = 1,0 ; MeOH).

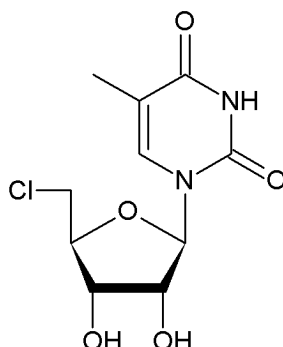
IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 773 (C-Cl), 1649 (C=C), 1722 (C=O), 3358 (O-H).

Tf : 204 °C.

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 11,32 (s, 1H, N-H), 7,48 (d, 1H, $J_{H_6,CH_3} = 0,6$ Hz, H₆), 1,79 (s_{él}, 3H, CH₃) ; *désoxyribose* : 6,22 (dd, 1H, J = 6,6 Hz, J = 7,6 Hz, H_{1'}), 5,47 (d, 1H, J = 4,3 Hz, OH), 4,24 (m, 1H, H_{3'}), 3,92 (td, 1H, J = 3,3 Hz, J = 5,2 Hz, H_{4'}), 3,87 (dd, 1H, J = 5,8 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'a}), 3,78 (dd, 1H, J = 5,4 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'b}), 2,25 (ddd, 1H, J = 6,7, J = 7,6 Hz, J = 13,7 Hz, H_{2'a}), 2,19 (ddd, 1H, J = 3,3, J = 6,6 Hz, J = 13,7 Hz, H_{2'b}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 163,6 (C₄), 150,4 (C₂), 135,9 (C₆), 109,8 (C₅), 12,1 (CH₃) ; *désoxyribose* : 85,3 (C_{4'}), 83,8 (C_{1'}), 71,2 (C_{3'}), 44,7 (C_{5'}), 38 (C_{2'}).

MS (IC) : m/z 261,1 et 263,1 ([MH]⁺), 283,2 et 285,2 ([MNa]⁺), 543,2 et 545,2 ([M₂Na]⁺), 803,1 et 805,1 ([M₃Na]⁺).

5'-chloro-5'-désoxy-2'-hydroxythymidine (25)

Le protocole de chloration est identique à celui décrit pour la synthèse de la 5'-chloro-5'-désoxythymidine (**24**). A partir de 500 mg de 2'-hydroxythymidine¹⁰² (1,94 mmol), le produit pur **25** est isolé sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 80% (429 mg).

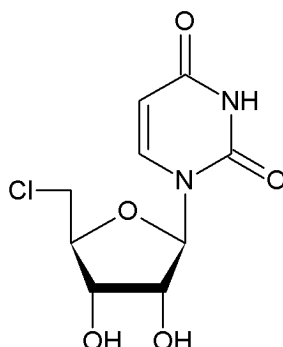
Rf = 0,41 (CHCl₃/EtOH (8/2)).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 770 (C-Cl), 1655 (C=C), 1719 (C=O), 3361 (O-H).

RMN ¹H (CD₃OD, d⁴) : *thymine* : 7,54 (q, 1H, $J_{H_6,CH_3} = 0,9$ Hz, H₆), 1,88 (d, $J_{H_6,CH_3} = 0,9$ Hz, 3H, CH₃); *ribose* : 5,87 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz, H_{1'}), 4,22 (t, 1H, $J = 5,0$ Hz, H_{2'}), 4,16 (m, 1H, H_{3'}), 4,14 (m, 1H, H_{4'}), 3,91 (dd, 1H, $J = 3,5$ Hz, $J = 12,2$ Hz, H_{5'a}), 3,82 (dd, 1H, $J = 3,8$ Hz, $J = 12,2$ Hz, H_{5'b}).

RMN ¹³C (CD₃OD, d⁴) : *thymine* : 166,4 (C₄), 152,7 (C₂), 138,2 (C₆), 111,9 (C₅), 12,6 (CH₃); *ribose* : 90,9 (C_{1'}), 84,5 (C_{4'}), 74,8 (C_{2'}), 45,6 (C_{5'}).

MS (IC) : m/z 277,0 et 279,0 ([MH]⁺), 294,0 et 296,0 ([MNH₄]⁺).

5'-chloro-5'-désoxyuridine (26)

Le protocole de chloration est identique à celui décrit pour la synthèse de la 5'-chloro-5'-désoxythymidine (**24**). A partir de 500 mg d'uridine (2,05 mmol), le produit pur **26** est isolé sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 82% (441 mg).

Rf = 0,30 (CHCl₃/EtOH (95/5)).

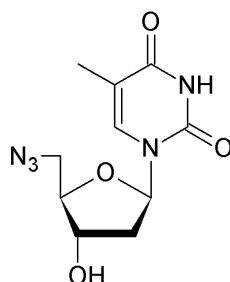
IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 775 (C-Cl), 1649 (C=C), 1722 (C=O), 3360 (O-H).

RMN ¹H (CD₃OD, d⁴) : uracile : 7,71 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H₆), 5,74 (d, 3H, J = 8,1 Hz, H₅) ; ribose : 5,88 (d, 1H, J = 5,0 Hz, H_{1'}), 4,23 (t, 1H, J = 5,0 Hz, H_{2'}), 4,17 (m, 1H, H_{4'}), 4,10 (t, 1H, J = 5,0 Hz, H_{3'}), 3,89 (dd, 1H, J = 3,8 Hz, J = 12,0 Hz, H_{5'a}), 3,81 (dd, 1H, J = 4,3 Hz, J = 12,0 Hz, H_{5'b}).

RMN ¹³C (CD₃OD, d⁴) : uracile : 166,1 (C₄), 152,4 (C₂), 142,5 (C₆), 103,2 (C₅) ; ribose : 91,2 (C_{1'}), 84,6 (C_{4'}), 75,0 (C_{2'}), 45,5 (C_{5'}).

MS (IC) : m/z 263,0 et 265,0 ([MH]⁺), 280,0 et 282,0 ([MNH₄]⁺).

5'-azido-5'-désoxythymidine (27)



Dans un bicol de 25 mL, la 5'-chloro-5'-désoxythymidine **24** (100 mg ; 0,38 mmol) est traitée avec 375 mg d'azoture de sodium (15 éq. ; 5,77 mmol) dans le DMF (8 mL). Après activation par irradiations micro-ondes (300 W, 120 °C, 1 min), une conversion du produit chloré en produit azidé est observée avec des rapports frontaux similaires, mais le traitement des CCM par PPh₃/Et₂O (réduction de -N₃ en -NH₂) puis par la ninhydrine et enfin chauffage, révèle la présence du produit souhaité. Le mélange réactionnel est ensuite évaporé à sec sous pression réduite. Une purification par chromatographie éclair (CHCl₃/MeOH (85/15)) permet d'obtenir le produit pur sous forme d'un solide blanc et avec un rendement de 91% (92 mg).

Rf = 0,38 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

$[\alpha]_D^{22} = +72$ (c = 1,0 ; DMSO).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1645 (C=C), 1690 (C=O), 2104 (N₃), 3366 (O-H).

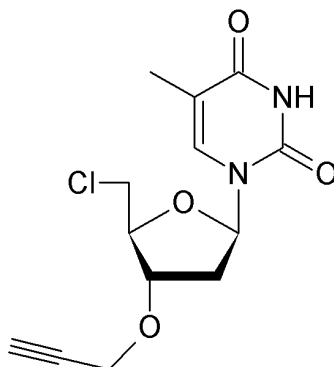
Tf : 164 °C ; litt.¹⁰³ 164-166,5 °C.

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 11,32 (s_{él}, 1H, N-H), 7,49 (s_{él}, 1H, H₆), 1,79 (s_{él}, 3H, CH₃) ; *désoxyribose* : 6,20 (t_{él}, 1H, J = 7,0 Hz, H_{1'}), 5,41 (d, 1H, J = 3,7 Hz, OH), 4,19 (dt, 1H, J = 3,7 Hz, J = 6,9 Hz, H_{3'}), 3,85 (m, 1H, H_{4'}), 3,58 (dd, 1H, J = 5,2 Hz, J = 13,0 Hz, H_{5'a}), 3,53 (dd, 1H, J = 5,3 Hz, J = 13,0 Hz, H_{5'b}), 2,25 (dt, 1H, J = 6,9 Hz, J = 13,7 Hz, H_{2'a}), 2,09 (ddd, 1H, J = 3,7 Hz, J = 6,8 Hz, J = 13,7 Hz, H_{2'b}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 163,7 (C₄), 150,5 (C₂), 136,1 (C₆), 109,8 (C₅), 12,1 (CH₃) ; *désoxyribose* : 85,3 (C_{4'}), 83,8 (C_{1'}), 70,7 (C_{3'}), 51,7 (C_{5'}), 38,1 (C_{2'}).

MS (IC) : *m/z* 268,1 ([MH]⁺), 290,1 ([MNa]⁺), 306,1 ([MK]⁺), 535,3 ([M₂H]⁺), 557,2 ([M₂Na]⁺), 824,3 ([M₃Na]⁺).

5'-chloro-5'-désoxy-3'-O-(prop-2-ynyl)thymidine (28)



Le mode opératoire décrit est celui de la chloration sélective de la position 5' à partir de la 3'-O-(prop-2-ynyl)-thymidine (29) dont le protocole est décrit page suivante.

Le protocole de chloration est identique à celui décrit pour la synthèse de la 5'-chloro-5'-désoxythymidine (24). Six activations d'une minute chacune, à 300 W et 80 °C ont été nécessaires. De plus l'addition de 1,2 éq. de chlorure de tosylé supplémentaires a été effectuée après la troisième activation. Partant de 80 mg (0,29 mmol) de 3'-O-(prop-2-ynyl)thymidine (29), le produit pur 28 est isolé par chromatographie sur plaque préparative (CHCl₃/EtOH (95/5)) sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 28% (24 mg).

Rf = 0,62 (CHCl₃/EtOH (95/5)).

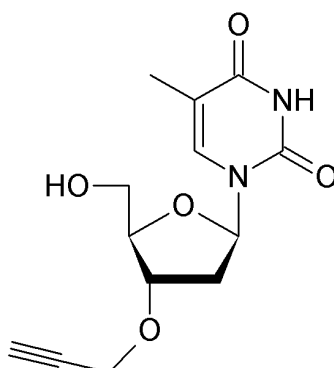
IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1705 (C=O), 2120 (C≡C), 2950 (C_{alkyle}-H) 3060 (C_{ar}-H).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 11,36 (s_{él}, 1H, N-H), 7,51 (d, 1H, J_{H₆,CH₃} = 0,8 Hz, H₆), 1,79 (s_{él}, 3H, CH₃); *désoxyribose* : 6,15 (dd, 1H, J = 6,8 Hz, J = 7,9 Hz, H_{1'}), 4,26 (m, 1H, H_{3'}), 4,12 (m, 1H, H_{4'}), 3,89 (dd, 1H, J = 5,9 Hz, J = 11,5 Hz, H_{5'a}), 3,82 (dd, 1H, J = 5,6 Hz, J = 11,5 Hz, H_{5'b}), 2,31 (m, 2H, H_{2'}); *propargyle* : 4,22 (d, 2H, J = 2,3 Hz, -CH₂-), 3,47 (t_{él}, 1H, J = 2,3 Hz, H_{alcyne}).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 163,6 (C₄), 150,4 (C₂), 135,8 (C₆), 109,9 (C₅), 12,1 (CH₃); *désoxyribose* : 84,1 (C_{1'}), 82,6 (C_{4'}), 79,9 (C_{3'}), 43,4 (C_{5'}), 34,8 (C_{2'}); *propargyle* : 78,9 (C_{alcyne}), 77,5 (CH_{alcyne}), 56,1 (CH₂).

MS (IC) : *m/z* 321,1 ([MNa]⁺), 619,0 ([M₂Na]⁺).

3'-O-(prop-2-ynyl)-thymidine (29)



Dans un ballon de 25 mL, la thymidine silylée propargylée 5 (584 mg; 1,48 mmol) est solubilisée dans le THF anhydre (5 mL) avec 1,78 mL de fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) (1,2 éq.; 1,78 mmol). Après agitation à température ambiante pendant cinq heures sous argon, la solution est concentrée à l'évaporateur rotatif puis purifiée par chromatographie éclair avec un gradient d'éluant de CHCl_3 à $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (98/2). Le produit pur est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 74% (307 mg).

Rf = 0,46 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (9/1)).

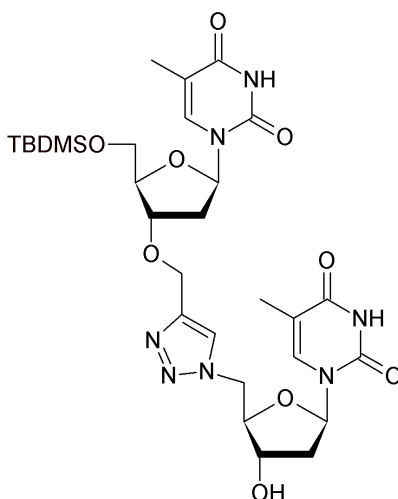
IR : ν_{max} (cm^{-1}) : 1710 (C=O), 2960 ($\text{C}_{\text{alkyle}}\text{-H}$) 3070 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{-H}$), 3490 (O-H).

RMN ^1H (DMSO, d^6) : thymine : 11,30 ($s_{\text{él}}$, 1H, N-H), 7,69 (d, 1H, $J_{\text{H}_6, \text{CH}_3} = 0,8$ Hz, H_6), 1,78 ($s_{\text{él}}$, 3H, CH_3); désoxyribose : 6,10 (dd, 1H, $J = 5,8$ Hz, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 5,12 (t, 1H, $J = 5,2$ Hz, OH), 4,25 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 3,94 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3,61 (dd $_{\text{él}}$, 1H, $J = 4,8$ Hz, $J = 11,8$ Hz, $\text{H}_{5'a}$), 3,56 (dd $_{\text{él}}$, 1H, $J = 4,6$ Hz, $J = 11,8$ Hz, $\text{H}_{5'b}$), 2,26 (ddd, 1H, $J = 1,9$ Hz, $J = 5,8$ Hz, $J = 13,9$ Hz, $\text{H}_{2'a}$), 2,13 (ddd $_{\text{él}}$, 1H, $J = 5,8$ Hz, $J = 8,5$ Hz, $J = 13,9$ Hz, $\text{H}_{2'b}$); propargyle : 4,23 (dd, 1H, $J = 2,3$ Hz, $J = 16,8$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 4,19 (dd, 1H, $J = 2,4$ Hz, $J = 16,8$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3,47 ($t_{\text{él}}$, 1H, $J = 2,3$ Hz, H_{alcyne}).

RMN ^{13}C (DMSO, d^6) : thymine : 163,7 (C_4), 150,5 (C_2), 135,9 (C_6), 109,6 (C_5), 12,3 (CH_3); désoxyribose : 84,5 ($\text{C}_{1'}$), 83,8 ($\text{C}_{4'}$), 80,2 ($\text{C}_{3'}$), 61,5 ($\text{C}_{5'}$), 34,8 ($\text{C}_{2'}$); propargyle : 78,7 (C_{alcyne}), 77,3 ($\text{CH}_{\text{alcyne}}$), 55,9 (CH_2).

MS (IC) : m/z 303,1 ($[\text{MNa}]^+$), 583,2 ($[\text{M}_2\text{Na}]^+$).

4-[(5'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl)thymidin-3'-yl)méthyl]-1-(5'-désoxythymidin-5'-yl)-1*H*-1,2,3-triazole
(30)



Le mode opératoire ci-dessous est décrit dans le cas du chauffage classique et de l'utilisation du système CuSO_4 , Asc. Na, $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (1/1).

Dans un bicol de 25 mL, à une solution du composé propargylé **5** (174 mg ; 0,44 mmol) et du composé azidé **27** (118 mg ; 0,44 mmol) dans le mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (4/4 mL) sont additionnés 1 mg de sulfate de cuivre pentahydraté (0,01 éq. ; 4 μmol) et 40 μL d'ascorbate de sodium (0,1 éq. ; 40 μmol) à température ambiante. Le mélange est alors porté à 80 °C pendant 5 h. Après extraction avec 4 \times 20 mL de chloroforme, le solide résiduel de l'évaporation du solvant est purifié par chromatographie éclair en utilisant un gradient d'éluant de $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (9/1) à $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (8/2) pour obtenir le 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 80% (234 mg).

Rf = 0,30 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (8/2)).

IR : ν_{max} (cm^{-1}) : 1700 (C=O), 2965 ($\text{C}_{\text{alkyle}}\text{-H}$) 3063 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{-H}$), 3550 (O-H).

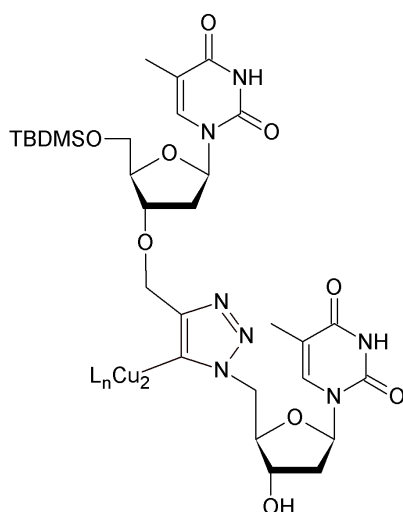
RMN ^1H (DMSO, d^6) : *thymines* : 11,34 (s, 1H, NH_B), 11,30 (s, 1H, NH_A), 7,48 (s, 1H, H_{6B}), 7,36 (s, 1H, H_{6A}), 1,80 (s, 3H, A-CH_3), 1,78 (s, 3H, B-CH_3); *désoxyriboses* : 6,17 (t, 1H, $J = 7,0$ Hz, $\text{H}_{1'A}$), 6,11 (dd, 1H, $J = 5,8$ Hz, $J = 8,4$ Hz, $\text{H}_{1'B}$), 5,50 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, OH), 4,72 (dd, 2H, $J = 4,3$, $J = 14,3$ Hz, $\text{H}_{5'A}$), 4,61 (dd, 2H, $J = 7,7$ Hz, $J = 14,3$ Hz, $\text{H}_{5'A}$), 4,29 (m, 1H, $\text{H}_{3'A}$), 4,16 (m, 1H, $\text{H}_{3'B}$), 4,08 (m, 1H, $\text{H}_{4'A}$), 4,00 (m, 1H, $\text{H}_{4'B}$), 3,76 (dd, 1H, $J = 3,9$ Hz, $J = 11,3$ Hz, $\text{H}_{5'B}$), 3,71 (dd, 1H, $J = 3,7$ Hz, $J = 11,3$ Hz, $\text{H}_{5'B}$), 2,28 (ddd, 1H, $J = 1,3$ Hz, $J = 5,8$ Hz, $J = 13,5$ Hz, $\text{H}_{2'B}$), 2,18 (dt, 1H, $J = 6,8$ Hz, $J = 13,7$ Hz, $\text{H}_{2'A}$), 2,10 (ddd, 1H, $J = 3,3$ Hz, $J = 8,4$ Hz, $J = 13,5$ Hz, $\text{H}_{2'B}$), 2,08 (ddd, 1H, $J = 3,0$ Hz, $J = 7,0$ Hz, $J = 13,7$ Hz,

H_{2'A}); TBDMS : 0,85 (s, 9H, *t*-Bu), 0,07 (s, 3H, CH_{3a}), 0,06 (s, 3H, CH_{3b}); espaceur : 8,09 (s, 1H, H_{triazole}), 4,58 (s, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : thymines : 163,6 (C_{4A}, C_{4B}), 150,4 (C_{2A}, C_{2B}); thymines : 136 (C_{6A}), 135,4 (C_{6B}), 109,8 (C_{5A}), 109,5 (C_{5B}), 12,2 (_BCH₃), 12,0 (_ACH₃); désoxyriboses : 84,0 (C_{1'A}, C_{1'B}, C_{4'A}, C_{4'B}), 78,7 (C_{3'B}), 70,7 (C_{3'A}), 63,2 (C_{5'B}), 51,2 (C_{5'A}), 37,9 (C_{2'A}), 36,3 (C_{2'B}); TBDMS : 25,7 (C-CH₃), 17,9 (C-CH₃), -5,5 (Si-CH₃); espaceur : 143,7 (C_{triazole}), 124,7 (CH_{triazole}), 61,7 (CH₂).

MS (IC) : *m/z* 662,3 ([MH]⁺), 684,3 ([MNa]⁺).

Intermédiaire réactionnel (31)



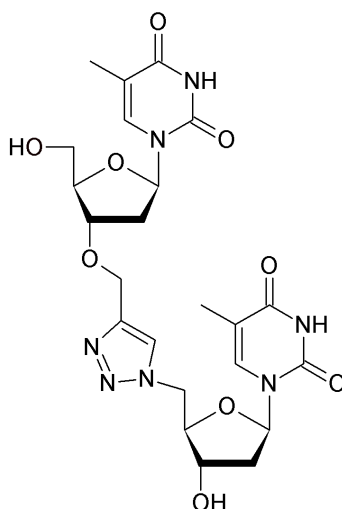
Rf = 0,55 (CHCl₃/EtOH (8/2)).

RMN ¹H (DMSO, d⁶) : thymines : 11,31 (s, 2H, NH), 7,48 (s, 1H, H_{6B}), 7,44 (s, 1H, H_{6A}), 1,80 (s, 3H, _ACH₃), 1,78 (s, 3H, _BCH₃); désoxyriboses : 6,14 (t, 1H, J = 6,9 Hz, H_{1'A}), 6,12 (dd, 1H, J = 5,8 Hz, J = 8,5 Hz, H_{1'B}), 5,52 (d, 1H, J = 4,4 Hz, OH), 4,72 (dd, 2H, J = 4,6 Hz, J = 14,5 Hz, H_{5'A}), 4,62 (dd, 2H, J = 7,7 Hz, J = 14,5 Hz, H_{5'A}), 4,37 (m, 1H, H_{3'A}), 4,14 (m, 1H, H_{4'A}), 4,01 (m, 1H, H_{4'B}), 3,76 (dd, 1H, J = 3,9 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'B}), 3,71 (dd, 1H, J = 3,7 Hz, J = 11,3 Hz, H_{5'B}), 2,29 (ddd, 1H, J = 1,3 Hz, J = 5,8 Hz, J = 14,2 Hz, H_{2'B}), 2,27 (dt, 1H, J = 6,9 Hz, J = 13,5 Hz, H_{2'A}), 2,15 (ddd, 1H, J = 6,0 Hz, J = 8,5 Hz, J = 14,2 Hz, H_{2'B}), 2,10 (ddd, 1H, J = 3,7 Hz, J = 6,9 Hz, J = 13,5 Hz, H_{2'A}); TBDMS : 0,86 (s, 9H, *t*-Bu), 0,07 (s, 3H, CH_{3a}), 0,06 (s, 3H, CH_{3b}); espaceur : 4,53 (s, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : thymines : 163,6 (C_{4A}, C_{4B}), 150,3 (C_{2A}, C_{2B}), 136,2 (C_{6A}), 135,3 (C_{6B}), 109,6 (C_{5A}), 109,5 (C_{5B}), 12,2 (_BCH₃), 12,1 (_ACH₃); désoxyriboses : 84,0 (C_{1'A}, C_{1'B}, C_{4'A}, C_{4'B}), 78,5 (C_{3'B}), 63,2 (C_{5'B}), 70,8 (C_{3'A}), 51,8 (C_{5'A}), 37,9 (C_{2'A}), 36,3 (C_{2'B}); TBDMS : 25,8 (C-CH₃), 17,9 (C-CH₃), -5,5 (Si-CH₃); espaceur : 147,3 (C_{triazole}-Cu), 86,0 (C_{triazole}), 61,8 (CH₂).

MS (IC) : *m/z* 787,5.

1-(5'-désoxythymidin-5'-yl)-4-[(thymidin-3'-yl)méthyl]-1H-1,2,3-triazole (32)



Dans un ballon de 25 mL, le dimère silylé **30** (300 mg ; 0,45 mmol) est solubilisé dans le THF anhydre (5 mL) avec 545 μ L de fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) (1,2 éq. ; 0,54 mmol). Après agitation à température ambiante pendant sept heures sous argon, la solution est concentrée par évaporation à l'évaporateur rotatif puis purifiée par chromatographie éclair avec un gradient d'éluant de CHCl_3 à $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (7/3). Le produit pur est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 70% (173 mg).

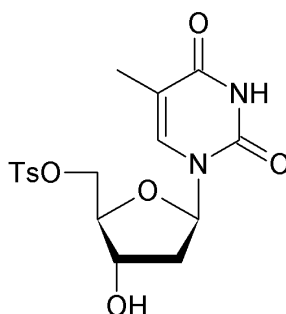
Rf = 0,19 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (8/2)).

RMN ^1H (DMSO, d^6) : *thymines* : 11,29 (s, 2H, NH), 7,70 (s, 1H, H_{6B}), 7,35 (s, 1H, H_{6A}), 1,80 (s, 3H, ACH_3), 1,78 (s, 3H, BCH_3) ; *désoxyriboses* : 6,17 (t, 1H, $\text{J} = 7,0$ Hz, $\text{H}_{1'A}$), 6,11 (dd, 1H, $\text{J} = 5,9$ Hz, $\text{J} = 8,4$ Hz, $\text{H}_{1'B}$), 5,52 (s, 1H, OH), 5,12 (s $_{\text{él}}$, 1H, OH), 4,72 (dd, 1H, $\text{J} = 4,5$ Hz, $\text{J} = 14,3$ Hz, $\text{H}_{5'A}$), 4,61 (dd, 1H, $\text{J} = 7,4$ Hz, $\text{J} = 14,3$ Hz, $\text{H}_{5'A}$), 4,29 (m, 1H, $\text{H}_{3'A}$), 4,22 (m, 1H, $\text{H}_{3'B}$), 4,08 (m, 1H, $\text{H}_{4'A}$), 3,96 (m, 1H, $\text{H}_{4'B}$), 3,57 (m, 2H, $\text{H}_{5'B}$), 2,25 (ddd, 1H, $\text{J} = 1,5$ Hz, $\text{J} = 5,9$ Hz, $\text{J} = 13,5$ Hz, $\text{H}_{2'B}$), 2,18 (dt, 1H, $\text{J} = 6,8$ Hz, $\text{J} = 13,7$ Hz, $\text{H}_{2'A}$), 2,10 (ddd, 1H, $\text{J} = 3,3$ Hz, $\text{J} = 8,4$ Hz, $\text{J} = 13,5$ Hz, $\text{H}_{2'B}$), 2,09 (ddd, 1H, $\text{J} = 3,0$ Hz, $\text{J} = 7,0$ Hz, $\text{J} = 13,7$ Hz, $\text{H}_{2'A}$) ; *espaceur* : 8,11 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 4,57 (s, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C (DMSO, d^6) : *thymines* : 163,7 (C_{4A} , C_{4B}), 150,4 (C_{2A} , C_{2B}) ; *thymines* : 136,1 (C_{6A}), 136,0 (C_{6B}), 109,8 (C_{5A}), 109,9 (C_{5B}), 12,3 (BCH_3), 12,0 (ACH_3) ; *désoxyriboses* : 84,6 ($\text{C}_{4'B}$), 84,0 ($\text{C}_{1'A}$, $\text{C}_{1'B}$, $\text{C}_{4'A}$), 79,1 ($\text{C}_{3'B}$), 70,8 ($\text{C}_{3'A}$), 61,5 ($\text{C}_{5'B}$), 51,2 ($\text{C}_{5'A}$), 37,9 ($\text{C}_{2'A}$), 36,3 ($\text{C}_{2'B}$) ; *espaceur* : 143,9 ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 124,7 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 61,8 (CH_2).

MS (IES) : m/z 547,3 ($[\text{MH}]^+$), 570,3 ($[\text{MNa}]^+$).

5'-O-tosylthymidine (33)



Dans un ballon de 100 mL, on dissout 3 g (12,29 mmol) de thymidine dans 24 mL de pyridine anhydre à 0 °C, puis on ajoute 2,83 g (1,2 éq. ; 14,87 mmol) de chlorure de tosyloxy. Après 1 h de réaction à 0 °C, la CCM montre que la réaction n'évolue plus. Le milieu réactionnel est alors évaporé, la pyridine étant azéotropée trois fois au toluène. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie éclair (gradient d'éluant de CH₂Cl₂ à CH₂Cl₂/EtOH (9/1)). Le produit tosylé **33** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 74% (3,633 g).

Rf = 0,30 (CHCl₃/EtOH (9/1)).

$[\alpha]_D^{26} = +24$ (c = 10⁻²; acétone).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1363 (SO₂), 1645 (C=C), 1721 (C=O), 2934 (C_{alkyle}-H), 3042 (C_{ar}-H), 3175 (N-H), 3369 (O-H).

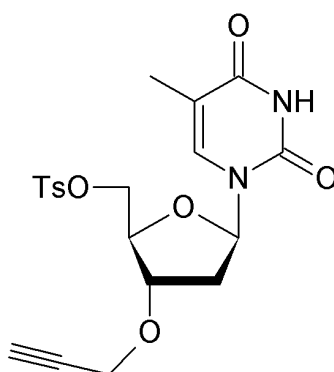
Tf : 163 °C ; litt.¹⁰⁴ 160-164 °C.

RMN¹H (DMSO, d⁶) : *thymine* : 11,31 (s, 1H, N-H), 7,38 (s, 1H, H₆), 1,77 (s, 3H, CH₃) ; *désoxyribose* : 6,15 (t, 1H, J = 6,8 Hz, H_{1'}), 5,42 (s_{él}, 1H, OH), 4,26 (dd, 1H, J = 3,0 Hz, J = 10,7 Hz, H_{5'a}), 4,17 (dd, 1H, J = 5,8 Hz, J = 10,7 Hz, H_{5'b}), 4,16 (m, 1H, H_{3'}), 3,86 (m, 1H, H_{4'}), 2,15 (dt, 1H, J = 6,8 Hz, J = 13,5 Hz, H_{2'a}), 2,08 (ddd, 1H, J = 4,2 Hz, J = 6,8 Hz, J = 13,5 Hz, H_{2'b}) ; *tosyle* : 7,79 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H₂, H₆), 7,47 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H₃, H₅), 2,41 (s, 3H, CH₃).

RMN¹³C (DMSO, d⁶) : *thymine* : 163,6 (C₄), 150,3 (C₂), 135,9 (C₆), 109,8 (C₅), 12,1 (CH₃) ; *désoxyribose* : 84,0 (C_{1'}), 83,2 (C_{4'}), 70,1 (C_{3'}), 69,9 (C_{5'}), 38,3 (C_{2'}) ; *tosyle* : 145,1 (C₁), 132,1 (C₄), 130,2 (C₃, C₅), 127,6 (C₂, C₆), 21,1 (CH₃).

MS (IC) : *m/z* 419,1 ([MNa]⁺), 815,2 ([M₂Na]⁺).

3'-O-propargyl-5'-O-tosylthymidine (34)



Dans un réacteur approprié, on introduit dans un premier temps 1,011 g du produit **33** (2,55 mmol), 15 mL de THF et 2,5 équivalents (255 mg ; 6,38 mmol) d'hydrure de sodium. Le mélange est activé par irradiations micro-ondes pendant trois minutes (200 W, 40 °C). Le bromure de propargyle (2,5 éq. ; 690 μ L ; 6,38 mmol) est alors additionné et le mélange est à nouveau activé pendant trois minutes (200 W, 40 °C). Après addition de 40 mL de NH_4Cl , le mélange est extrait avec 2×40 mL de chloroforme suivi d'un lavage avec 40 mL d'eau. La phase organique extraite est évaporée puis le brut réactionnel est purifié par chromatographie éclair (gradient d'éluant de CH_2Cl_2 à $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (9/1)), le composé **34** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 96% (1,064 g).

Rf = 0,50 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (9/1)).

$[\alpha]_D^{26} = +28$ ($c = 10^{-2}$; CHCl_3).

IR : ν_{max} (cm^{-1}) : 1361 (SO_2), 1688 (C=C), 2120 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 3040 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{-H}$).

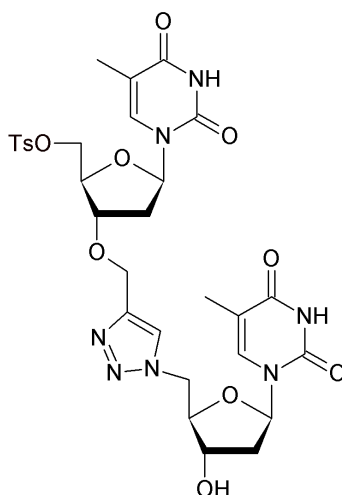
Tf : 40-41 °C.

RMN ^1H (DMSO, d^6) : *thymine* : 11,34 (s $_{\text{él}}$, 1H, N-H), 7,41 (d, 1H, $J_{\text{H6,CH}_3} = 0,8$ Hz, H_6), 1,77 (s $_{\text{él}}$, 3H, CH_3) ; *désoxyribose* : 6,08 (dd, 1H, $J = 6,5$ Hz, $J = 7,7$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 4,27 (dd, 1H, $J = 3,6$ Hz, $J = 10,9$ Hz, $\text{H}_{5'a}$), 4,25 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 4,21 (dd, 1H, $J = 5,5$ Hz, $J = 10,9$ Hz, $\text{H}_{5'b}$), 4,08 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 2,29 (ddd, 1H, $J = 6,3$ Hz, $J = 7,7$ Hz, $J = 14,2$ Hz, $\text{H}_{2'a}$), 2,22 (ddd, 1H, $J = 6,3$ Hz, $J = 6,5$ Hz, $J = 14,2$ Hz, $\text{H}_{2'b}$) ; *tosyle* : 7,79 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H_2, H_6), 7,48 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H_3, H_5), 2,40 (s, 3H, CH_3) ; *propargyle* : 4,18 (d, 2H, $J = 2,3$ Hz, CH_2), 3,47 (t, 1H, $J = 2,3$ Hz, C-H).

RMN ^{13}C (DMSO, d^6) : 163,5 (C_4), 150,3 (C_2), 135,7 (C_6), 109,5 (C_5), 84,3 ($\text{C}_{1'}$), 80,6 ($\text{C}_{4'}$), 77,8 ($\text{C}_{3'}$), 69,9 ($\text{C}_{5'}$), 35,3 ($\text{C}_{2'}$), 11,9 (CH_3) ; *tosyle* : 145,1 (C_4), 131,2 (C_1), 130,1 (C_3, C_5), 127,5 (C_2, C_6), 21,0 (CH_3) ; *propargyle* : 79,9 (C), 77,4 (CH), 56,2 (CH_2).

MS (IC) : m/z 435,2 ($[MH]^+$), 457,2 ($[MNa]^+$), 891,3 ($[M_2Na]^+$).

1-(5'-désoxythymidin-5'-yl)-4-[(5'-*O*-tosylthymidin-3'-yl)méthyl]-1*H*-1,2,3-triazole
(35)



Dans un bicol de 25 mL, on introduit 490 mg (1,13 mmol) de thymidine tosylée propargylée **34**, 317 mg (1,05 éq. ; 1,19 mmol) du composé azidé **27**, 4 mL d'éthanol, 17 mg (0,06 éq. ; 68 μL) de sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) dissous dans 4 mL d'eau et 680 μL (0,6 éq. ; 680 μmol) d'ascorbate de sodium à 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. La réaction est activée par irradiation micro-ondes pendant trois minutes (200 W, 80 °C). On réalise alors un traitement du brut réactionnel par deux extractions au THF (2 \times 30 mL). La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 , filtrée puis le solvant évaporé. On récupère le produit **35** sous forme d'un solide blanc soit un rendement de 92% (741 mg).

Rf = 0,35 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (8/2)).

IR : ν_{max} (cm^{-1}) : 1363 (SO_2), 1691 (C=C), 3651 (O-H).

Tf : 153-155 °C

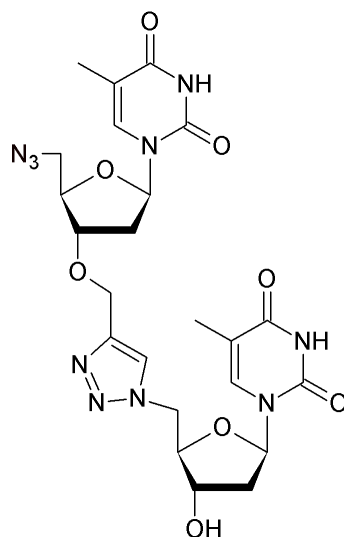
RMN ^1H (DMSO, d^6) : *thymines* : 11,33 (s, 1H, NH), 11,30 (s, 1H, NH), 7,40 (s, 1H, J = 0,8 Hz, $\text{H}_{6\text{B}}$), 7,34 (s, 1H, J = 0,9 Hz, $\text{H}_{6\text{A}}$), 1,79 (d, 3H, J = 0,9 Hz, ${}_{5\text{A}}\text{CH}_3$), 1,77 (d, 3H, J = 0,8 Hz, ${}_{5\text{B}}\text{CH}_3$) ; *désoxyriboses* : 6,16 ($t_{\text{él}}$, 1H, J = 6,7 Hz, $\text{H}_{1'\text{A}}$), 6,09 (dd, 1H, J = 6,7 Hz, J = 7,4 Hz, $\text{H}_{1'\text{B}}$), 5,50 (d, 1H, J = 4,4 Hz, OH), 4,71 (dd, 1H, J = 4,4 Hz, J = 14,2 Hz, $\text{H}_{5'\text{A}}$), 4,61 (dd, 1H, J = 7,6 Hz, J = 14,2 Hz, $\text{H}_{5'\text{A}}$), 4,28 (dd, 1H, J = 3,4 Hz, J = 10,7 Hz, $\text{H}_{5'\text{B}}$), 4,27 (m, 1H, $\text{H}_{3'\text{A}}$), 4,22 (dd, 1H, J = 5,5 Hz, J = 10,7 Hz, $\text{H}_{5'\text{B}}$), 4,17 ($dt_{\text{él}}$, 1H, J = 3,0 Hz, J = 5,7 Hz, $\text{H}_{3'\text{B}}$), 4,09 (m, 1H, $\text{H}_{4'\text{B}}$), 4,07 (m, 1H, $\text{H}_{4'\text{A}}$), 2,23 (m, 2H, $\text{H}_{2'\text{B}}$), 2,17 ($dt_{\text{él}}$, 1H, J = 6,7 Hz, J = 13,5 Hz, $\text{H}_{2'\text{A}}$), 2,10 ($ddd_{\text{él}}$, 1H, J = 3,9 Hz, J = 6,7 Hz, J = 13,5 Hz, $\text{H}_{2'\text{A}}$) ; *espaceur* : 8,08

(s, 1H, H_{triazole}), 4,54 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, CH_2), 4,51 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, CH_2); *tosyle* : 7,79 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H_2, H_6), 7,47 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H_3, H_5), 2,40 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO, d^6) : *thymines* : 163,6 (C_{4A}, C_{4B}), 150,4 (C_{2A} ou C_{2B}), 150,3 (C_{2A} ou C_{2B}), 136,1 (C_{6A}), 135,8 (C_{6B}), 109,8 (C_{5A}, C_{5B}), 12,1 ($_{5A}\text{CH}_3$ ou $_{5B}\text{CH}_3$), 12,0 ($_{5A}\text{CH}_3$ ou $_{5B}\text{CH}_3$); *désoxyriboses* : 84,3 ($C_{1'B}$), 84,0 ($C_{1'A}$ ou $C_{4'A}$), 83,9 ($C_{1'A}$ ou $C_{4'A}$), 80,8 ($C_{4'B}$), 78,3 ($C_{3'B}$), 70,7 ($C_{3'A}$), 70,1 ($C_{5'B}$), 51,2 ($C_{5'A}$), 37,9 ($C_{2'A}$), 35,6 ($C_{2'B}$); *espaceur* : 143,6 (C_{triazole}), 124,7 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 62,1 (CH_2); *tosyle* : 145,2 (C_4), 132,1 (C_1), 130,2 (C_3, C_5), 127,6 (C_2, C_6), 21,1 (CH_3).

MS (IC) : m/z 724,3 ($[\text{MNa}]^+$).

4-[(5'-azidothymidin-3'-yl)méthyl]-1-(5'-désoxythymidin-5'-yl)-1H-1,2,3-triazole
(36)



La réaction d'azidation est réalisée selon la méthode utilisée précédemment pour la préparation du composé **27**. Le dimère tosylé **35** (273 mg ; 389 μmol) et 380 mg d'azote de sodium (15 eq. , 5,84 mmol) sont ajoutés dans 8 mL de DMF. La réaction est activée 2×1 minute à 300 W et 120 °C. Après évaporation à sec du DMF, 10 mL d'eau sont ajoutés au brut réactionnel, puis deux extractions avec chacune 40 mL de THF sont effectuées. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée, puis le solvant est évaporé. Nous obtenons le produit désiré **36** sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 94% (208 mg).

Rf = 0,29 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (8/2)).

IR : ν_{max} (cm^{-1}) : 1694 (C=O), 2103 (N_3), 3050 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{-H}$).

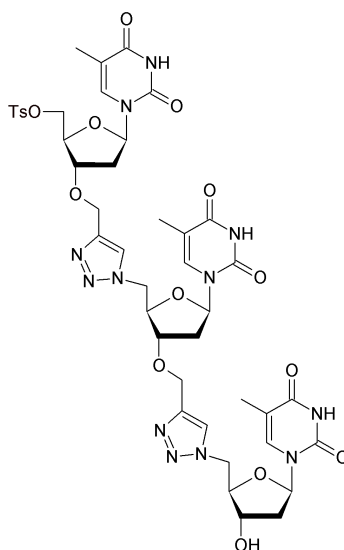
Tf : 197-199 °C

RMN ^1H (DMSO, d^6) : *thymines* : 11,30 (s, 2H, 2NH), 7,44 ($\text{s}_{\text{él}}$, 1H, $\text{H}_{6\text{B}}$), 7,29 ($\text{s}_{\text{él}}$, 1H, $\text{H}_{6\text{A}}$), 1,78 ($\text{s}_{\text{él}}$, 6H, $_{5\text{A}}\text{CH}_3$, $_{5\text{B}}\text{CH}_3$) ; *désoxyriboses* : 6,20 ($\text{t}_{\text{él}}$, 1H, $J = 7,0$ Hz, $\text{H}_{1'\text{A}}$), 6,18 ($\text{dd}_{\text{él}}$, 1H, $J = 6,3$ Hz, $J = 8,3$ Hz, $\text{H}_{1'\text{B}}$), 5,50 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, OH), 4,71 (dd, 1H, $J = 4,3$ Hz, $J = 14,4$ Hz, $\text{H}_{5'\text{A}}$), 4,61 (dd, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 14,4$ Hz, $\text{H}_{5'\text{A}}$), 4,28 ($\text{dt}_{\text{él}}$, $J = 3,7$ Hz, $J = 6,6$ Hz, $\text{H}_{3'\text{A}}$), 4,15 ($\text{dt}_{\text{él}}$, 1H, $J = 2,5$ Hz, $J = 5,3$ Hz, $\text{H}_{3'\text{B}}$), 4,07 (m, 1H, $\text{H}_{4'\text{A}}$), 4,03 (m, 1H, $\text{H}_{4'\text{B}}$), 3,60 (dd, 1H, $J = 6,2$ Hz, $J = 13,2$ Hz, $\text{H}_{5'\text{B}}$), 3,55 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz, $J = 13,2$ Hz, $\text{H}_{5'\text{B}}$), 2,22 (m, 2H, $\text{H}_{2'\text{B}}$), 2,16 ($\text{dt}_{\text{él}}$, 1H, $J = 6,9$ Hz, $J = 13,5$ Hz, $\text{H}_{2'\text{A}}$), 2,07 (ddd, 1H, $J = 3,8$ Hz, $J = 6,9$ Hz, $J = 13,5$ Hz, $\text{H}_{2'\text{A}}$) ; *espaceur* : 8,11 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 4,61 (d, 1H, $J = 11,9$ Hz, CH_2), 4,58 (d, 1H, $J = 11,9$ Hz, CH_2).

RMN ^{13}C (DMSO, d^6) : *thymines* : 163,6 ($\text{C}_{4A}, \text{C}_{4B}$), 150,3 ($\text{C}_{2A}, \text{C}_{2B}$), 135,7 (C_{6A}), 135,5 (C_{6B}), 109,8 ($\text{C}_{5A}, \text{C}_{5B}$), 12,5 ($_{5A}\text{CH}_3$ ou $_{5B}\text{CH}_3$), 12,4 ($_{5A}\text{CH}_3$ ou $_{5B}\text{CH}_3$); *désoxyriboses* : 84,1 ($\text{C}_{1'A}$ ou $\text{C}_{1'B}$), 84,0 ($\text{C}_{1'A}$ ou $\text{C}_{1'B}$), 83,8 ($\text{C}_{4'A}$), 81,9 ($\text{C}_{4'B}$), 79,1 ($\text{C}_{3'B}$), 70,8 ($\text{C}_{3'A}$), 52,0 ($\text{C}_{5'B}$), 51,3 ($\text{C}_{5'A}$), 38,0 ($\text{C}_{2'A}$), 35,4 ($\text{C}_{2'B}$); *espaceur* : 143,7 ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 124,8 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 62,1 (CH_2).

MS (IC) : m/z 595,3 ($[\text{MNa}]^+$).

Trithymidine tosylée (37)



Dans un bicol de 25 mL, on introduit 357 mg (0,62 mmol) de dimère azidé **36**, 257 mg (0,95 éq. ; 0,59 mmol) de composé **34**, 4 mL d'éthanol, 9 mg (0,06 éq. ; 37 μ mol) de sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) dissous dans 4 mL d'eau et 370 μ L (0,6 éq. ; 0,37 mmol) d'ascorbate de sodium à 1 mol.L⁻¹. La réaction est activée 3 minutes à 200 W et 80 °C. Après traitement avec une solution saturée de NH_4Cl (10 mL) et deux extractions au chloroforme, on sèche la phase organique sur MgSO_4 puis on filtre et on évapore à sec. Le trimère tosylé **37** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement quantitatif (597 mg).

Rf = 0,31 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (7/3)).

IR : ν_{max} (cm⁻¹) : 1364 (SO_2), 1686 (C=O), 3055 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{-H}$).

Tf : 170-173 °C

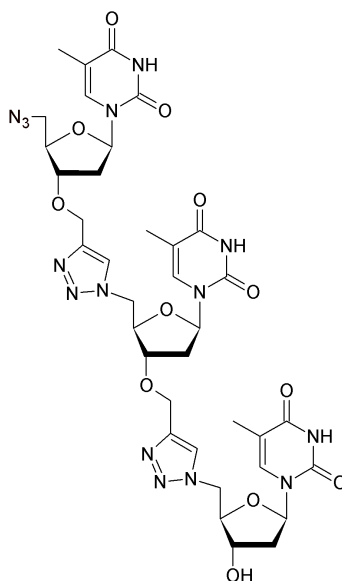
RMN ¹H (DMSO, d⁶) : thymines : 11,33 (s_{él}, 2H, 2NH), 11,30 (s_{él}, 1H, NH), 7,41 (s_{él}, 1H, H_{6B}), 7,39 (s_{él}, 1H, H_{6C}), 7,34 (s_{él}, 1H, H_{6A}), 1,79 (s_{él}, 9H, 3CH₃) ; désoxyriboses : 6,17 (t_{él}, 1H, J = 7,0 Hz, H_{1'A}), 6,11 (t_{él}, 1H, J = 6,8 Hz, H_{1'C}), 6,09 (t_{él}, 1H, J = 6,5 Hz, H_{1'B}), 5,50 (d, 1H, J = 4,3 Hz, OH), 4,72 (dd, 1H, J = 4,4 Hz, J = 14,3 Hz, H_{5'A} ou H_{5'B}), 4,71 (dd, 1H, J = 4,2 Hz, J = 14,1 Hz, H_{5'A} ou H_{5'B}), 4,64 (dd, 1H, J = 7,1 Hz, J = 14,3 Hz, H_{5'A} ou H_{5'B}), 4,62 (dd, 1H, J = 6,3 Hz, J = 14,1 Hz, H_{5'A} ou H_{5'B}), 4,35-4,25 (m, 3H, H_{3'A}, H_{3'B}, H_{4'B}), 4,26 (m, 1H, H_{5'C}), 4,20 (dd, 1H, J = 5,5 Hz, J = 10,9 Hz, H_{5'C}), 4,17 (m, 1H, H_{3'C}), 4,11-4,06 (m, 2H, H_{4'A}, H_{4'C}), 2,35-2,05 (m, 6H, H_{2'A}, H_{2'B}, H_{2'C}) ; espaceurs : 8,11 (s, 1H, H_{triazole}), 8,09 (s, 1H, H_{triazole}), 4,59 (d, 1H, J = 12,6 Hz, A-BCH₂), 4,56 (d, 1H, J = 12,6 Hz,

$A-BCH_2$), 4,55 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz, $B-CCH_2$), 4,52 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz, $B-CCH_2$); *tosyle* : 7,79 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H_2, H_6), 7,46 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H_3, H_5), 2,40 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO, d^6) : *thymines* : 163,6 (C_{4A}, C_{4B}, C_{4C}), 150,4 (2C : C_{2A} ou C_{2B} ou C_{2C}), 150,3 (1C : C_{2A} ou C_{2B} ou C_{2C}), 136,0 (2C : C_{6A} ou C_{6B} ou C_{6C}), 135,8 (1C : C_{6A} ou C_{6B} ou C_{6C}), 109,9 (1C : C_{5A} ou C_{5B} ou C_{5C}), 109,8 (2C : C_{5A} ou C_{5B} ou C_{5C}), 12,1 (3 CH_3); *désoxyriboses* : 84,4 ($C_{1'B}$ ou $C_{1'C}$), 84,3 ($C_{1'B}$ ou $C_{1'C}$), 84,0 ($C_{1'A}$), 83,9 ($C_{4'A}$), 81,5 ($C_{4'B}$), 80,8 ($C_{4'C}$), 79,0 ($C_{3'B}$), 78,3 ($C_{3'C}$), 70,7 ($C_{3'A}$), 70,1 ($C_{5'C}$), 51,3 ($C_{5'A}$ ou $C_{5'B}$), 51,2 ($C_{5'A}$ ou $C_{5'B}$), 37,9 ($C_{2'A}$), 35,6 ($C_{2'B}$), 35,1 ($C_{2'C}$); *espaceurs* : 143,7 ($C_{triazole}$), 143,6 ($C_{triazole}$), 124,7 ($CH_{triazole}$), 124,6 ($CH_{triazole}$), 62,1 (2 CH_2); *tosyle* : 145,2 (C_4), 132,1 (C_1), 130,2 (C_3, C_5), 127,6 (C_2, C_6), 21,1 (CH_3).

MS (IC) : m/z 1007,4 ($[MH]^+$), 1029,3 ($[MNa]^+$), 1045,3 ($[MK]^+$).

Trithymidine azidée (38)



Dans un bicol de 25 mL, on introduit 145 mg (0,14 mmol) de trimère tosylé **37**, auxquels on ajoute 140 mg (15 éq. ; 2,16 mmol) d'azidure de sodium dans 8 mL de DMF. La réaction est activée 2×1 minute à 300 W et 120 °C. Après évaporation à sec du solvant, on dissout le brut réactionnel dans 30 mL de THF, puis on ajoute 15 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite trois fois avec 30 mL de THF. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et le solvant évaporé. Le trimère **38** est isolé sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 80% (101 mg).

Rf = 0,21 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (7/3)).

IR : ν_{max} (cm^{-1}) = 1686 (C=O), 2103 (N_3), 3360 (O-H).

Tf : 240-242 °C.

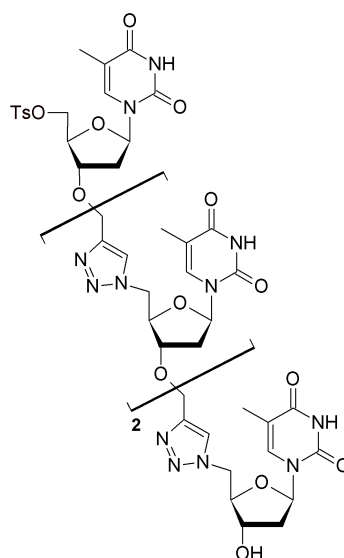
RMN ^1H (DMSO, d^6) : thymines : 11,31 (s, 3H, 3NH), 7,52 (d, 1H, $J = 0,7$ Hz, $\text{H}_{6\text{B}}$), 7,41 (d, 1H, $J = 0,6$ Hz, $\text{H}_{6\text{C}}$), 7,35 (d, 1H, $J = 0,7$ Hz, $\text{H}_{6\text{A}}$), 1,80 ($\text{s}_{\text{él}}$, 3H, ${}_{5\text{A}}\text{CH}_3$ ou ${}_{5\text{B}}\text{CH}_3$ ou ${}_{5\text{C}}\text{CH}_3$), 1,79 ($\text{s}_{\text{él}}$, 6H, ${}_{5\text{A}}\text{CH}_3$ ou ${}_{5\text{B}}\text{CH}_3$ ou ${}_{5\text{C}}\text{CH}_3$); désoxyriboses : 6,16 ($\text{dd}_{\text{él}}$, 1H, $J = 7,0$ Hz, $J = 7,8$ Hz, $\text{H}_{1'\text{A}}$ ou $\text{H}_{1'\text{B}}$), 6,14 ($\text{dd}_{\text{él}}$, 1H, $J = 6,7$ Hz, $J = 8,4$ Hz, $\text{H}_{1'\text{A}}$ ou $\text{H}_{1'\text{B}}$), 6,11 ($\text{t}_{\text{él}}$, 1H, $J = 6,7$ Hz, $\text{H}_{1'\text{C}}$), 5,51 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, OH), 4,73 (dd, 1H, $J = 4,2$ Hz, $J = 14,3$ Hz, $\text{H}_{5'\text{B}}$), 4,70 (m, 2H, $\text{H}_{5'\text{A}}$, $\text{H}_{5'\text{B}}$), 4,62 (dd, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 14,6$ Hz, $\text{H}_{5'\text{A}}$), 4,32 (m, 1H, $\text{H}_{4'\text{B}}$), 4,30 (m, 1H, $\text{H}_{3'\text{B}}$), 4,29 (m, 1H, $\text{H}_{3'\text{A}}$), 4,17 ($\text{dt}_{\text{él}}$, 1H, $J = 2,7$ Hz, $J = 5,7$ Hz, $\text{H}_{3'\text{C}}$), 4,09 (m, 1H, $\text{H}_{4'\text{A}}$), 4,05 (m, 1H, $\text{H}_{4'\text{C}}$), 3,59 (dd, 1H, $J = 6,2$ Hz, $J = 13,1$ Hz, $\text{H}_{5'\text{C}}$), 3,55 (dd, 1H, $J = 5,2$ Hz, $J = 13,1$ Hz, $\text{H}_{5'\text{C}}$), 2,35-2,23 (m, 4H, $\text{H}_{2'\text{B}}$, $\text{H}_{2'\text{C}}$), 2,19 (m, 1H, $\text{H}_{2'\text{A}}$), 2,11 (ddd, 1H, $J = 3,9$ Hz, $J = 6,7$ Hz, $J = 13,4$ Hz, $\text{H}_{2'\text{A}}$); espaceurs : 8,14 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 8,10 (s,

1H, H_{triazole}), 4,61 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, $A-B\text{CH}_2$), 4,58 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, $A-B\text{CH}_2$), 4,58 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, $B-C\text{CH}_2$), 4,55 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, $B-C\text{CH}_2$).

RMN ^{13}C (DMSO, d^6) : thymines : 163,6 (C_{4A} , C_{4B} , C_{4C}), 150,5 (1C : C_{2A} ou C_{2B} ou C_{2C}), 150,4 (2C : C_{2A} ou C_{2B} ou C_{2C}), 136,0 (C_{6A} , C_{6B} , C_{6C}), 109,9 (2C : C_{5A} ou C_{5B} ou C_{5C}), 109,8 (1C : C_{5A} ou C_{5B} ou C_{5C}), 12,1 (3 CH_3) ; désoxyriboses : 84,4 ($C_{1'C}$), 84,2 ($C_{1'B}$), 84,0 ($C_{1'A}$), 83,9 ($C_{4'A}$), 82,1 ($C_{4'C}$), 81,5 ($C_{4'B}$), 79,0 ($C_{3'B}$ ou $C_{3'C}$), 78,9 ($C_{3'B}$ ou $C_{3'C}$), 70,7 ($C_{3'A}$), 51,9 ($C_{5'C}$), 51,3 ($C_{5'A}$ ou $C_{5'B}$), 51,2 ($C_{5'A}$ ou $C_{5'B}$), 37,9 ($C_{2'A}$), 35,2 ($C_{2'B}$ ou $C_{2'C}$), 35,0 ($C_{2'B}$ ou $C_{2'C}$) ; espaceurs : 143,8 (C_{triazole}), 143,6 (C_{triazole}), 124,7 (2 $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 62,1 (CH_2), 62,0 (CH_2).

MS (IC) : m/z 900,3 ($[\text{MNa}]^+$).

Tétrathymidine tosylée (39)



Dans un bicol de 25 mL, on introduit 331 mg (0,38 mmol) de trimère azidé **38**, 153 mg (0,95 éq. ; 0,35 mmol) de composé propargylé **34**, 4 mL d'éthanol, 6 mg (0,06 éq. ; 22 μmol) de sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) dissous dans 4 mL d'eau et 220 μL (0,6 éq. ; 220 μmol) d'ascorbate de sodium à 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. La réaction est activée 3 minutes à 300 W et 80 °C. Le produit désiré précipite dans le milieu, puis est lavé avec du THF. Le tétramère tosylé **39** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 72% (337 mg).

Rf = 0,11 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (7/3)).

IR : ν_{max} (cm^{-1}) = 1363 (SO_2), 1698 ($\text{C}=\text{O}$), 3056 ($\text{C}_{\text{ar}}-\text{H}$).

Tf : 197-199 °C.

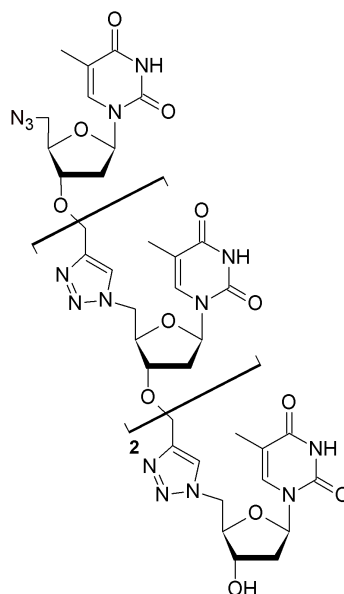
RMN ^1H (DMSO, d^6) : *thymines* : 11,34 ($s_{\text{él}}$, 3H, 3NH), 11,31 ($s_{\text{él}}$, 1H, NH), 7,41 ($s_{\text{él}}$, 1H, $\text{H}_{6\text{B}}$), 7,40 ($s_{\text{él}}$, 1H, $\text{H}_{6\text{C}}$ ou $\text{H}_{6\text{D}}$), 7,39 ($s_{\text{él}}$, 1H, $\text{H}_{6\text{C}}$ ou $\text{H}_{6\text{D}}$), 7,35 ($s_{\text{él}}$, 1H, $\text{H}_{6\text{A}}$), 1,79 ($s_{\text{él}}$, 9H, $_{5\text{A}}\text{CH}_3$, $_{5\text{C}}\text{CH}_3$, $_{5\text{D}}\text{CH}_3$), 1,77 ($s_{\text{él}}$, 3H, $_{5\text{B}}\text{CH}_3$); *désoxyriboses* : 6,17 ($t_{\text{él}}$, 1H, $J = 7,0$ Hz, $\text{H}_{1'\text{A}}$), 6,10 ($t_{\text{él}}$, 2H, $J = 6,9$ Hz, $\text{H}_{1'\text{B}}$ et/ou $\text{H}_{1'\text{C}}$ et/ou $\text{H}_{1'\text{D}}$), 6,07 ($t_{\text{él}}$, 1H, $J = 6,5$ Hz, $\text{H}_{1'\text{B}}$ ou $\text{H}_{1'\text{C}}$ ou $\text{H}_{1'\text{D}}$), 5,52 (d, 1H, $J = 4,3$ Hz, OH), 4,73 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz, $J = 14,5$ Hz, $\text{H}_{5'\text{B}}$ ou $\text{H}_{5'\text{C}}$), 4,72 (dd, 1H, $J = 4,2$ Hz, $J = 14,0$ Hz, $\text{H}_{5'\text{A}}$), 4,70 (m, 2H, $\text{H}_{5'\text{B}}$ ou $\text{H}_{5'\text{C}}$), 4,65 (dd, 1H, $J = 7,4$ Hz, $J = 14,4$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'\text{B}}$ ou $\text{H}_{5'\text{C}}$), 4,62 (dd, 1H, $J = 6,6$ Hz, $J = 14,0$ Hz, $\text{H}_{5'\text{A}}$), 4,35-4,25 (m, 5H, $\text{H}_{3'\text{A}}$, $\text{H}_{3'\text{B}}$, $\text{H}_{4'\text{B}}$, $\text{H}_{3'\text{C}}$, $\text{H}_{4'\text{C}}$), 4,26 (m, 1H, $\text{H}_{5'\text{D}}$), 4,21 (dd, 1H, $J = 5,5$ Hz, $J = 10,9$ Hz, $\text{H}_{5'\text{D}}$), 4,17 (m, 1H, $\text{H}_{3'\text{D}}$), 4,11-4,06 (m, 2H, $\text{H}_{4'\text{A}}$, $\text{H}_{4'\text{D}}$), 2,35-2,15 (m, 8H, $\text{H}_{2'\text{A}}$, $\text{H}_{2'\text{B}}$, $\text{H}_{2'\text{C}}$, $\text{H}_{2'\text{D}}$); *espaceurs* : 8,12 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 8,11 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazole}}$),

8,10 (s, 1H, H_{triazole}), 4,57 (m, 4H, A-BCH₂, B-CCH₂), 4,54 (d, 1H, J = 12,6 Hz, C-DCH₂), 4,51 (d, 1H, J = 12,6 Hz, C-DCH₂); *tosyle* : 7,79 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H₂, H₆), 7,46 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H₃, H₅), 2,39 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymines* : 163,6 (1C : C_{4A} ou C_{4B} ou C_{4C} ou C_{4D}), 163,5 (3C : C_{4A} ou C_{4B} ou C_{4C} ou C_{4D}), 150,3 (C_{2A}, C_{2B}, C_{2C}, C_{2D}), 135,9 (C_{6A}, C_{6C}, C_{6D}), 135,7 (C_{6B}), 109,8 (C_{5A}, C_{5B}, C_{5C}, C_{5D}), 12,0 (4CH₃); *désoxyriboses* : 84,3 (2C : C_{1'B} ou C_{1'C} ou C_{1'D}), 84,2 (1C : C_{1'B} ou C_{1'C} ou C_{1'D}), 83,9 (C_{1'A}), 83,8 (C_{4'A}), 81,4 (C_{4'B}, C_{4'C}), 80,8 (C_{4'D}), 78,9 (C_{3'B}, C_{3'C}), 78,2 (C_{3'D}), 70,6 (C_{3'A}), 70,0 (C_{5'D}), 51,2 (2C : C_{5'A} ou C_{5'B} ou C_{5'C}), 51,1 (1C : C_{5'A} ou C_{5'B} ou C_{5'C}), 37,8 (C_{2'A}), 35,5 (C_{2'B}), 35,0 (C_{2'C}, C_{2'D}); *espaceurs* : 143,6 (2C : C_{triazole}), 143,5 (C_{triazole}), 124,7 (CH_{triazole}), 124,6 (2C : CH_{triazole}), 62,0 (3CH₂); *tosyle* : 145,1 (C₄), 131,9 (C₁), 130,1 (C₃, C₅), 127,5 (C₂, C₆), 20,7 (CH₃).

MS (IES) : *m/z* 1334,0 ([MNa]⁺).

Tétrathymidine azidée (40)



La réaction d'azidation est réalisée selon la méthode utilisée précédemment pour la préparation du composé **27**. Le tétramère tosylé **39** (107 mg ; 0,08 mmol) et 80 mg d'azoture de sodium (15 éq. ; 1,22 mmol) sont ajoutés dans 8 mL de DMF. La réaction est activée 2×1 minute à 300 W et 120 °C. Après évaporation à sec du DMF, on ajoute 40 mL de CHCl_3 au brut réactionnel et 10 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite avec 2×20 mL de THF. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis le solvant évaporé. Nous obtenons le produit désiré **40** sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 93% (89 mg).

Rf = 0,67 (MeOH).

IR : ν_{max} (cm^{-1}) : 1645 (C=C), 1690 (C=O), 2103 (N_3).

Tf : 240 °C.

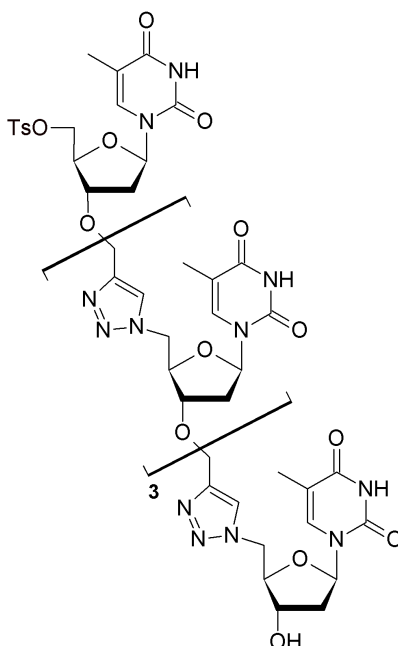
RMN ^1H (DMSO, d^6) : thymines : 11,32 (s_{él}, 4H, 4NH), 7,52 (s_{él}, 1H, H_{6B}), 7,40 (s_{él}, 2H, H_{6C}, H_{6D}), 7,35 (s_{él}, 1H, H_{6A}), 1,80 (s_{él}, 6H, $^5\text{CCH}_3$, $^5\text{DCH}_3$), 1,79 (s_{él}, 6H, $^5\text{ACH}_3$, $^5\text{BCH}_3$); désoxyriboses : 6,17 (dd_{él}, 1H, J = 6,9 Hz, J = 7,0 Hz, H_{1'A}), 6,13 (t_{él}, 1H, J = 7,2 Hz, H_{1'B} ou H_{1'C} ou H_{1'D}), 6,10 (t_{él}, 2H, J = 7,1 Hz, H_{1'B} et/ou H_{1'C} et/ou H_{1'D}), 5,52 (s_{él}, 1H, OH), 4,75-4,65 (m, 5H, H_{5'A} ou H_{5'B} ou H_{5'C}), 4,62 (dd, 1H, J = 7,6 Hz, J = 14,6 Hz, H_{5'A}), 4,35-4,26 (m, 5H, H_{3'A}, H_{3'B}, H_{4'B}, H_{3'C}, H_{4'C}), 4,17 (dt_{él}, 1H, J = 2,8 Hz, J = 5,6 Hz, H_{3'D}), 4,09 (m, 1H, H_{4'A}), 4,05 (m, 1H, H_{4'D}), 3,59 (dd, 1H, J = 6,3 Hz, J = 13,0 Hz, H_{5'D}), 3,55 (dd, 1H, J = 4,6 Hz, J = 13,0 Hz, H_{5'D}), 2,34-2,22 (m, 6H, H_{2'B}, H_{2'C}, H_{2'D}), 2,19 (dd_{él}, 1H, J = 7,1 Hz, J = 13,3 Hz, H_{2'A}), 2,11 (m, 1H, H_{2'A}); espaceurs : 8,14 (s, 1H, H_{triazole}), 8,12

(s, 1H, H_{triazole}), 8,10 (s, 1H, H_{triazole}), 4,60 (d, 2H, $J = 12,2$ Hz, $A-BCH_2$ ou $B-CCH_2$ ou $C-BCH_2$), 4,58 (d, 4H, $J = 12,2$ Hz, $A-BCH_2$ ou $B-CCH_2$ ou $C-BCH_2$).

RMN ^{13}C (DMSO, d^6) : : *thymines* : 163,6 (C_{4A} , C_{4B} , C_{4C} , C_{4D}), 150,5 (1C : C_{2A} ou C_{2B} ou C_{2C} ou C_{2D}), 150,4 (3C : C_{2A} ou C_{2B} ou C_{2C} ou C_{2D}), 136,1 (C_{6A} , C_{6B} , C_{6C} , C_{6D}), 109,9 (C_{5A} , C_{5B} , C_{5C} , C_{5D}), 12,1 ($4CH_3$); *désoxyriboses* : 84,5 (2C : $C_{1'B}$ ou $C_{1'C}$ ou $C_{1'D}$), 84,2 (1C : $C_{1'B}$ ou $C_{1'C}$ ou $C_{1'D}$), 84,0 ($C_{1'A}$), 83,9 ($C_{4'A}$), 82,1 ($C_{4'D}$), 81,6 ($C_{4'B}$, $C_{4'C}$), 79,0 ($C_{3'B}$, $C_{3'C}$), 78,9 ($C_{3'D}$), 70,7 ($C_{3'A}$), 51,9 ($C_{5'D}$), 51,2 (2C : $C_{5'A}$ ou $C_{5'B}$ ou $C_{5'C}$), 51,1 (1C : $C_{5'A}$ ou $C_{5'B}$ ou $C_{5'C}$), 37,9 ($C_{2'A}$), 35,2 (1C : $C_{2'B}$ ou $C_{2'C}$ ou $C_{2'D}$), 35,1 (2C : $C_{2'B}$ ou $C_{2'C}$ ou $C_{2'D}$); *espaceurs* : 143,8 (C_{triazole}), 143,7 (C_{triazole}), 143,6 (C_{triazole}), 124,8 (CH_{triazole}), 124,7 (2C : CH_{triazole}), 62,1 (2C : CH_2), 62,0 (CH_2).

MS (IES) : m/z 1205,4 ($[MNa]^+$).

Pentathymidine tosylée (41)



Dans un bicol de 25 mL, on dissout 33 mg (28 μmol) de tétramère azidé **40** avec 12 mg (0,95 éq. ; 26 μmol) de composé propargylé **34** dans 8 mL de DMF. On ajoute ensuite 11 mg (2 éq. ; 56 μmol) de iodure de cuivre (CuI) et 15 μL (3 éq. ; 84 μmol) de diisopropyléthylamine. La réaction est activée 3 minutes à 200 W et 120 °C. On ajoute 10 mL d'eau dans le mélange réactionnel, le produit précipite, puis il est rincé avec du THF et séché. On récupère 44 mg de pentamère tosylé **41** avec un rendement quantitatif.

Rf = 0,40 (MeOH).

IR : ν_{max} (cm^{-1}) : 1366 (SO_2), 1690 (C=O), 3055 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{-H}$).

Tf : 277 °C.

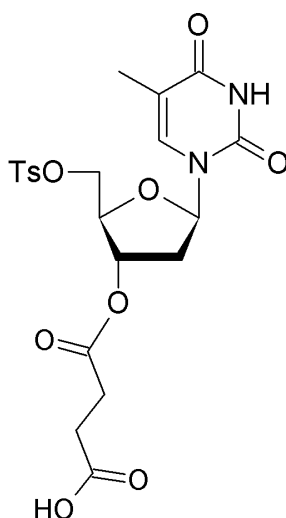
RMN ^1H (DMSO, d^6) : *thymines* : 11,33 ($s_{\text{él}}$, 5H, 5NH), 7,47 ($s_{\text{él}}$, 1H, $\text{H}_{6\text{A}}$ ou $\text{H}_{6\text{B}}$ ou $\text{H}_{6\text{C}}$ ou $\text{H}_{6\text{D}}$ ou $\text{H}_{6\text{E}}$), 7,38 ($s_{\text{él}}$, 3H, $\text{H}_{6\text{A}}$ ou $\text{H}_{6\text{B}}$ ou $\text{H}_{6\text{C}}$ ou $\text{H}_{6\text{D}}$ ou $\text{H}_{6\text{E}}$), 7,33 ($s_{\text{él}}$, 1H, $\text{H}_{6\text{A}}$ ou $\text{H}_{6\text{B}}$ ou $\text{H}_{6\text{C}}$ ou $\text{H}_{6\text{D}}$ ou $\text{H}_{6\text{E}}$), 1,79 ($s_{\text{él}}$, 15H, $5\text{A}\text{CH}_3$, $5\text{B}\text{CH}_3$, $5\text{C}\text{CH}_3$, $5\text{D}\text{CH}_3$, $5\text{E}\text{CH}_3$); *désoxyriboses* : 6,16 ($t_{\text{él}}$, 2H, $J = 7,0$ Hz, $\text{H}_{1'\text{A}}$ ou $\text{H}_{1'\text{B}}$ ou $\text{H}_{1'\text{C}}$ ou $\text{H}_{1'\text{D}}$ ou $\text{H}_{1'\text{E}}$), 6,10 ($t_{\text{él}}$, 3H, $J = 6,9$ Hz, $\text{H}_{1'\text{A}}$ ou $\text{H}_{1'\text{B}}$ ou $\text{H}_{1'\text{C}}$ ou $\text{H}_{1'\text{D}}$ ou $\text{H}_{1'\text{E}}$), 5,56 ($d_{\text{él}}$, 1H, $J = 2,0$ Hz, OH), 4,74-4,58 (m, 8H, $\text{H}_{5'\text{A}}$, $\text{H}_{5'\text{B}}$, $\text{H}_{5'\text{C}}$, $\text{H}_{5'\text{D}}$), 4,38-4,20 (m, 9H, $\text{H}_{3'\text{A}}$, $\text{H}_{3'\text{B}}$, $\text{H}_{4'\text{B}}$, $\text{H}_{3'\text{C}}$, $\text{H}_{4'\text{C}}$, $\text{H}_{3'\text{D}}$, $\text{H}_{4'\text{D}}$, $\text{H}_{5'\text{E}}$), 4,17 (m, 1H, $\text{H}_{3'\text{E}}$), 4,10-4,07 (m, 2H, $\text{H}_{4'\text{A}}$, $\text{H}_{4'\text{E}}$), 2,30-2,09 (m, 10H, $\text{H}_{2'\text{A}}$, $\text{H}_{2'\text{B}}$, $\text{H}_{2'\text{C}}$, $\text{H}_{2'\text{D}}$, $\text{H}_{2'\text{E}}$); *espaces* : 8,12 ($s_{\text{él}}$, 3H, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 8,09 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 4,58 (m, 8H, A-BCH_2 , B-CH_2 , C-DCH_2 , D-ECH_2); *tosyle* : 7,78 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H_2 ,

H₆), 7,48 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H₃, H₅), 2,39 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO, d⁶) : *thymines* : 163,7 (C_{4A}, C_{4B}, C_{4C}, C_{4D}, C_{4E}), 150,4 (C_{2A}, C_{2B}, C_{2C}, C_{2D}, C_{2E}), 136,1 (C_{6A}, C_{6B}, C_{6C}, C_{6D}, C_{6E}), 109,9 (C_{5A}, C_{5B}, C_{5C}, C_{5D}, C_{5E}), 12,1 (5CH₃); *désoxyribooses* : 84,5 (2C : C_{1'B} ou C_{1'C} ou C_{1'D}), 84,4 (1C : C_{1'B} ou C_{1'C} ou C_{1'D}), 84,1 (C_{1'A}, C_{1'E}), 83,9 (C_{4'A}), 81,5 (C_{4'B}, C_{4'C}, C_{4'D}, C_{4'E}), 79,1 (1C : C_{3'B} ou C_{3'C} ou C_{3'D} ou C_{3'E}), 79,0 (3C : C_{3'B} ou C_{3'C} ou C_{3'D} ou C_{3'E}), 70,7 (C_{3'A}), 67,0 (C_{5'E}), 51,3 (3C : C_{5'A} ou C_{5'B} ou C_{5'C} ou C_{5'D}), 51,2 (1C : C_{5'A} ou C_{5'B} ou C_{5'C} ou C_{5'D}), 37,9 (C_{2'A}), 35,1 (C_{2'B}, C_{2'C}, C_{2'D}, C_{2'E}); *espaceurs* : 143,7 (2C : C_{triazole}), 143,6 (2C : C_{triazole}), 124,8 (CH_{triazole}), 124,7 (3C : CH_{triazole}), 62,1 (3CH₂), 61,7 (1CH₂); *tosyle* : 145,2 (C₄), 132,2 (C₁), 130,2 (C₃, C₅), 127,6 (C₂, C₆), 20,8 (CH₃).

MS (IES) : *m/z* 1639,0 ([MNa]⁺).

3'-O-succinyl-5'-O-tosylthymidine (42)



Dans un ballon de 5 mL, sous atmosphère inerte (Argon), 364 mg de 5'-O-tosylthymidine (0,9 mmol) sont dissous dans la pyridine (1,6 mL). Le DMAP (112 mg, 1 éq., 0,9 mmol) et l'anhydride succinique (174 mg, 1,6 éq., 1,7 mmol) sont ajoutés, puis le mélange est placé sous agitation magnétique pendant 24 heures. On additionne ensuite 200 μL d'eau. Après 1 heure de réaction, le mélange réactionnel est évaporé à sec et la pyridine azéotropée trois fois au toluène. Le brut réactionnel est dissous dans 80 mL de CH_2Cl_2 , lavé 3 fois à l'acide citrique à 10% dans l'eau (3×20 mL) puis lavé avec 30 mL d'eau. La phase organique est alors séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée à sec. Le produit est obtenu avec un rendement de 79% (361 mg).

Rf = 0,54 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (8/2)).

$[\alpha]_D^{23} = +10$ ($c = 1,0$; CHCl_3).

IR : ν_{max} (cm^{-1}) : 1702 (C=O), 3033 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{-H}$), 3181 (O-H).

Tf : 83 °C.

RMN ^1H (DMSO, d^6) : *thymine* : 11,37 (s, 1H, N-H), 7,42 (d, 1H, $J = 1,2$ Hz, H_6), 1,78 ($s_{\text{él}}$, 3H, CH_3) ; *désoxyribose* : 6,14 (dd, 1H, $J = 6,4$ Hz, $J = 7,4$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 5,12 (ddd, $J = 2,4$ Hz, $J = 3,2$ Hz, $J = 7,4$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 4,32 (dd, 1H, $J = 3,21$ Hz, $J = 10,8$ Hz, $\text{H}_{5'a}$), 4,25 (dd, 1H, $J = 6,0$ Hz, $J = 10,8$ Hz, $\text{H}_{5'b}$), 4,10 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 2,38 (dt, 1H, $J = 7,4$ Hz, $J = 14,8$ Hz, $\text{H}_{2'b}$), 2,25 (ddd, 1H, $J = 2,4$ Hz, $J = 6,4$ Hz, $J = 14,6$ Hz, $\text{H}_{2'a}$) ; *tosyle* : 7,79 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H_2 , H_6), 7,46 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H_3 , H_5), 2,41 (s, 3H, CH_3) ; *succinyle* : 12,29 ($s_{\text{él}}$, 1H, COOH), 2,51 (m, 4H, $-(\text{CH}_2)_2-$).

RMN ^{13}C (DMSO, d^6) : *thymine* : 163,6 (C_4), 150,4 (C_2), 135,9 (C_6), 109,9 (C_5), 12,1 (CH_3); *désoxyribose* : 84,3 ($\text{C}_{1'}$), 80,7 ($\text{C}_{4'}$), 73,6 ($\text{C}_{3'}$), 69,9 ($\text{C}_{5'}$), 40,1 ($\text{C}_{2'}$); *tosyle* : 145,2 (C_1), 131,9 (C_4), 130,2 (C_3 , C_5), 127,6 (C_2 , C_6), 21,1 (CH_3); *succinyle* : 173,3 ($\text{C}=\text{O}_{\text{acide}}$), 171,8 ($\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$), 28,7 ($\text{C}_\alpha\text{H}_2$), 28,6 (C_βH_2).

MS (IES) : m/z 519,1 ($[\text{MNa}]^+$), 1015,2 ($[\text{M}_2\text{Na}]^+$).

Synthèse sur support solide

3'-O-succinyl-5'-O-tosylthymidine sur support solide (43)

Dans un ballon de 5 mL, on dissout 219 mg (0,4 mmol) de 3'-O-succinyl-5'-O-tosylthymidine et 61 mg (1 éq.) de *p*-nitrophénol, dans un mélange dioxane/pyridine (160 μL / 40 μL) anhydre. On ajoute ensuite goutte à goutte une solution de 91 mg (1 éq.) de DCC dissous dans 300 μL de dioxane anhydre. La réaction est conduite pendant 4 h à température ambiante, sous agitation et sous argon. La *N,N'*-dicyclohexylurée formée, précipite dans le ballon, puis le mélange réactionnel est filtré et le solide lavé avec 1 mL de dioxane. Le filtrat est ensuite mis à réagir avec 221 mg (0,2 éq., 88,4 μmol) de résine Tentagel-NH₂ (400 $\mu\text{mol/g}$) gonflée dans un mélange DMF/ Et₃N (280 μL /60 μL). On laisse agiter (agitateur axial rotatif) pendant 15 h. Après séchage, on récupère 242 mg de solide, soit une augmentation de masse de 21 mg, ce qui correspond à un rendement de fixation de la 5'-O-tosylthymidine de 50%.

Vérification du pourcentage de fixation par spectroscopie UV :

Un échantillon de 39 mg de résine est prélevé. Le décrochage de la thymidine est effectué dans 1 mL d'ammoniac méthanolique, puis la quantité de thymidine dans la solution est dosée par spectroscopie UV. L'absorbance mesurée est de 0,23 ce qui correspond d'après la droite étalon ($\epsilon = 98700 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) à une concentration de $2,3\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, soit un taux de fixation de 43%.

5'-azido-5'-désoxy-3'-O-succinylthymidine sur support solide

Protocole général d'azidation sur support :

La résine est placée dans un bicol de 25 mL, en présence de 8 mL de DMF, de 93 mg (32 éq.) d'azoture de sodium sous agitation magnétique lente. Le mélange réactionnel subit 5 activations micro-ondes (4 min, 300 W, 120 °C). Il est ensuite lavé avec 3 mL de DMF, 4 \times 4 mL d'eau distillée, 2 \times 8 mL de MeOH et 2 \times 8 mL d'Et₂O. La résine est ensuite placée au dessiccateur (204 mg).

Dithymidine tosylée sur support solide

Protocole général de couplage par "click chemistry" sur support :

La 3'-O-propargyl-5'-O-tosylthymidine (4,2 éq., 81 mg, 0,18 mmol) est dissoute dans 4 mL d'éthanol, le sulfate de cuivre (2,5 mg, 0,23 éq., 0,01 mmol) est dissous dans 4 mL d'eau. On mélange ces deux solutions dans un bicol de 25 mL, puis on ajoute la résine

(204 mg) et 60 μL d'ascorbate de sodium (1,36 eq. , 0,06 mmol, 1 mol.L^{-1}). L'ensemble est mis sous agitation magnétique lente. Le milieu réactionnel est activé par micro-ondes (5 \times 3 min, 300 W, 80 $^{\circ}\text{C}$). La résine est ensuite lavée avec de l'eau, du CHCl_3 , MeOH, Et_2O , et placée au dessiccateur (191 mg).

Dithymidine azidée sur support solide

Le protocole d'azidation est identique à celui décrit pour la synthèse de la 5'-azido-5'-désoxy-3'-O-succinylthymidine sur support solide. On obtient 154 mg de résine après séchage.

Trithymidine tosylée sur support solide

Le protocole de couplage est identique à celui décrit pour la synthèse de la dithymidine sur support solide. On obtient 144 mg de résine après séchage.

Trithymidine azidée sur support solide

Le protocole d'azidation est identique à celui décrit pour la synthèse de la 5'-azido-5'-désoxy-3'-O-succinylthymidine sur support solide. On obtient 129 mg de résine après séchage.

Tétrathymidine tosylée sur support solide

Le protocole de couplage est identique à celui décrit pour la synthèse de la dithymidine sur support solide. On obtient 119 mg de résine après séchage.

Tétrathymidine azidée sur support solide

Le protocole d'azidation est identique à celui décrit pour la synthèse de la 5'-azido-5'-désoxy-3'-O-succinylthymidine sur support solide. On obtient 104 mg de résine après séchage.

Décrochage

La résine est placée dans un ballon de 5 mL en présence de 2 mL d'ammoniac méthanolique (7 mol.L^{-1}). L'ensemble est mis sous agitation et chauffé, une nuit, $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Le mélange est ensuite filtré et évaporé à sec. La masse de produit sec décroché est de 2 mg. L'analyse par spectrométrie de masse montre la présence de pics majoritaire à m/z 900,3 ($[\text{MNa}]^+$) et m/z 1205,4 ($[\text{MNa}]^+$) correspondant respectivement au trimère et au tétramère de thymidine azidés.

Bibliographie

- [1] Zamecnik, P. C. ; Stephenson, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 280–284.
- [2] Stephenson, M. L. ; Zamecnik, P. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 285–288.
- [3] Watson, J. D. ; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 964–967.
- [4] Crick, F. H. C. ; Watson, J. D. *Proc. Roy. Soc. (A)* **1954**, *223*, 80–96.
- [5] Franklin, R. E. ; Gosling, R. G. *Acta Cryst.* **1953**, *6*, 673–677.
- [6] Fuller, W. *Nature* **2003**, *424*, 876–878.
- [7] Temin, H. H. ; Baltimore, D. *Advan. Virus. Res.* **1972**, *17*, 129–186.
- [8] Robbins, I. ; Bastide, L. ; Lebleu, B. *Rev. Fr. Lab.* **1998**, *305*, 59–63.
- [9] Leumann, C. J. ; Buchini, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 717–726.
- [10] Giovannangeli, C. ; Helene, C. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 431–421.
- [11] Carmichael, G. G. ; Kumar, M. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 1415–1434.
- [12] Gewirtz, A. M. ; Jen, K. Y. *Stem Cells* **2000**, *18*, 307–319.
- [13] Sullenger, B. A. ; Gallardo, H. F. ; Ungers, G. E. ; Gilboa, E. *Cell.* **1990**, *63*, 601–608.
- [14] Sullenger, B. A. ; Gallardo, H. F. ; Ungers, G. E. ; Gilboa, E. *J. Virol.* **1991**, *65*, 6811–6816.
- [15] Toulme, J. J. ; Giege, R. *Med. Sci. Res.* **1998**, *14*, 155–156.
- [16] Toulme, J. J. ; Tivenez, R. L. ; Boiziau, C. ; Dausse, E. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1997**, *36*, 39–41.
- [17] Kurreck, J. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628–1644.
- [18] Kochetkova, S. V. ; Timofeev, E. N. ; Korobeinikova, E. A. ; Kolganova, N. A. ; Florentiev, V. L. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 10287–10292.
- [19] Puri, N. ; Majumdar, A. ; Cuenoud, B. ; Natt, F. ; Martin, P. ; Boyd, A. ; Miller, P. S. ; Seidman, M. M. *Biochemistry* **2002**, *41*, 7716–7724.

- [20] Buchini, S. ; Leumann, C. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 3152–3168.
- [21] Ren, R. X.-F. ; Chaudhuri, N. C. ; Paris, P. L. ; Rumney, S. ; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671–7678.
- [22] Perez-Rentero, S. ; Alguacil, J. ; Robles, J. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1171–1179.
- [23] Vester, B. ; Wengel, J. *Biochemistry* **2004**, *43*, 13233–13240.
- [24] Elmen, J. ; Thonberg, H. ; Ljungberg, K. ; Frieden, M. ; Westergaard, M. ; Xu, Y. ; Wahren, B. ; Liang, Z. ; Orum, H. ; Koch, T. ; Wahlestedt, C. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 439–447.
- [25] Zhou, C. ; Liu, Y. ; Andaloussi, M. ; Badgujar, N. ; Plashkevych, O. ; Chattopadhyaya, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 118–134.
- [26] Kolb, H. C. ; Finn, M. G. ; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [27] Lucas, R. ; Zerrouki, R. ; Krausz, P. *Actualité Chimique* **2009**, sous presse.
- [28] Kolb, H. C. ; Sharpless, K. B. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128–11137.
- [29] Huisgen, R. ; Knorr, R. ; Mobius, L. ; Szeimies, G. *Chem. Ber.* **1965**, *98*, 4014–4021.
- [30] Saxon, E. ; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
- [31] Tornoe, C. W. ; Meldal, M. *Peptidotriazoles : Copper(I)-catalysed 1,3-dipolar cycloadditions on solid-phase* ; American Peptide Society and Kluwer Academic Publishers, 2001.
- [32] Rostovtsev, V. V. ; Green, L. G. ; Fokin, V. V. ; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [33] Tornoe, C. W. ; Christensen, C. ; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [34] Meldal, M. ; Tornoe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.
- [35] Appukkutan, P. ; Dehaen, W. ; Fokin, V. V. ; der Eycken, E. V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4223–4225.
- [36] Himo, F. ; Lovell, T. ; Hilgraf, R. ; Rostovtsev, V. V. ; Noodleman, L. ; Sharpless, K. B. ; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210–216.
- [37] Rodinov, V. O. ; Fokin, V. V. ; Finn, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2210–2215.
- [38] Whiting, M. ; Muldoon, J. ; Lin, Y. C. ; Silverman, S. M. ; Lindstron, W. ; Olson, A. J. ; Kolb, H. C. ; Finn, M. G. ; Sharpless, K. B. ; Elder, J. H. ; Fokin, V. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1435–1439.

- [39] Tornoe, C. W.; Sanderson, S. J.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Meldal, M. J. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 312–324.
- [40] Micetich, R. G.; Maiti, S. N.; Spevak, P.; Hall, T. W.; Yamabe, S.; Ishida, N.; Tanaka, M.; Yamasaki, T.; Nakai, A.; Ogawa, K. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1469–1474.
- [41] Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278–308.
- [42] Angelo, G. N.; Arora, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17134–17135.
- [43] Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [44] Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486–11493.
- [45] Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998–15999.
- [46] Majireck, M. M.; Weinreb, S. M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8680–8683.
- [47] Dondoni, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2–5.
- [48] Jonkheijm, P.; Weinrich, D.; Köhn, M.; Engelkamp, H.; Christianen, P. C. M.; Kuhlmann, J.; Maan, J. C.; Nüsse, D.; Schroeder, H.; Wacker, R.; Breinbauer, R.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4421–4424.
- [49] Martin, D. S.; Stolfi, R. L.; Sawyer, A. C.; Rabindranath, N.; Spiegelman, S.; Young, C. W.; Woodcock, T. *Cancer* **1980**, 117–1128.
- [50] Colombeau, L.; Zerrouki, R.; Krausz, P.; Champavier, Y. *Lett. Org. Chem.* **2005**, *2*, 613–615.
- [51] Roy, V.; Zerrouki, R.; Krausz, P. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, *24*, 289–301.
- [52] Smith, M.; Rammler, D. H.; Goldberg, I. H.; Khorana, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430–440.
- [53] Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190–6191.
- [54] Teste, K.; Colombeau, L.; Hadj-Bouazza, A.; Lucas, R.; Zerrouki, R.; Krausz, P.; Champavier, Y. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1490–1495.
- [55] Loupy, A.; Haudrechy, A. *Effets de milieu en synthèse organique*; Masson, 1996.
- [56] Wu, J. C.; Xi, Z.; Gioeli, C.; Chattopadhyaya, J. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2237–2254.
- [57] Tehrani, Z. A.; Fattahi, A.; Pourjavadi, A. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 771–779.

- [58] Rodgers, M. T. ; Armentrout, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8548–8558.
- [59] Russo, N. ; Toscano, M. ; Grand, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10272–10279.
- [60] Rochut, S. ; Pepe, C. ; Paumard, J.-P. ; Tabet, J.-C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1686–1692.
- [61] Frisch, M. J. et al. *Gaussian 03 and Revision C.02* ; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
- [62] Lee, C. ; Yang, W. ; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
- [63] Miehlich, B. ; Savin, A. ; Stoll, H. ; Preuss, H. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *157*, 200–206.
- [64] Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- [65] Cossi, M. ; Scalmani, G. ; Rega, N. ; Barone, V. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 43–54.
- [66] Deng, L. ; Branchadell, V. ; Ziegler, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10645–10656.
- [67] Streitwieser, A. ; Choy, G. S. C. ; Abu-Hasanayn, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5013–5019.
- [68] Martnez, A. G. ; Vilar, E. T. ; Barcina, J. O. ; Cerero, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *70*, 10236–10246.
- [69] Larock, R. C. *Comprehensive Organic Transformations* ; John Wiley and Sons, 1999.
- [70] Bouchez, V. ; Stazik, I. ; Beaupère, D. ; Uzan, R. *Carbohydr. Res.* **1997**, *300*, 139–142.
- [71] Bouchez, V. ; Stazik, I. ; Beaupère, D. ; Uzan, R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *44*, 7733–7736.
- [72] Gomez, L. ; Gellibert, F. ; Wagner, A. ; Mioskowski, C. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6049–6052.
- [73] Bandgar, B. P. ; Sadavarte, V. S. ; Uppalla, L. S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 951–953.
- [74] Firouzabadi, H. ; Iranpoor, N. ; Jafarpour, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7451–7454.
- [75] Yasuda, M. ; Yamasaki, S. ; Onishi, Y. ; Baba, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7186–7187.
- [76] Iranpoor, N. ; Firouzabadi, H. ; Azadi, R. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5531–5534.
- [77] Das, B. ; Holla, H. ; Srinivas, Y. ; Chowdhury, N. ; Bandgar, B. P. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3201–3204.
- [78] Lucas, R. ; Neto, V. ; Bouazza, A. H. ; Zerrouki, R. ; Granet, R. ; Krausz, P. ; Champavier, Y. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 1004–1007.
- [79] McCormick, C. L. ; Dawsey, T. R. ; Newman, K. J. *Carbohydr. Res.* **1990**, *208*, 183–191.

- [80] Robins, M. J. ; Dobozevski, B. ; Nilsson, B. L. ; Peterson, M. A. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 69–86.
- [81] Tian, W. Q. ; Wang, Y. A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4299–4308.
- [82] Lin, F. L. ; Hoyt, H. M. ; Halbeek, H. V. ; Bergman, R. G. ; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686–2695.
- [83] Bock, V. D. ; Hiemstra, H. ; Maarseveen, J. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51–68.
- [84] Wang, H. ; Cheng, C. ; Zheng, H. ; Liu, X. ; Fang, C. ; Xu, S. ; Zhao, Y. *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 432–433.
- [85] Lucas, R. ; Zerrouki, R. ; Granet, R. ; Krausz, P. ; Champavier, Y. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5467–5471.
- [86] Hotha, S. ; Kashyap, S. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 364–367.
- [87] Hiratou, T. ; Tsukahara, S. ; Miyano-Kurosaki, N. ; Takai, K. ; Yamamoto, N. ; Takaku, H. *FEBS Lett.* **1999**, *456*, 186–190.
- [88] Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [89] Katajisto, J. ; Heinonen, P. ; Lönnberg, H. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7609–7615.
- [90] Reddy, P. M. ; Bruice, T. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1281–1285.
- [91] Jain, M. L. ; Bruice, T. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7333–7346.
- [92] Rychlik, W. ; Rhoads, R. E. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 8543–8551.
- [93] Kibbe, W. A. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W43–W46.
- [94] Drummond, T. G. ; Hill, M. G. ; Barton, J. K. *Electrochem. DNA Sens.* **2003**, *21*, 1192–1199.
- [95] Homola, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 528–539.
- [96] Alivisatos, P. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 47–52.
- [97] Mitsakakis, K. ; Tserepi, A. ; Gizeli, E. *Microelectron. Eng.* **2008**, doi : 10.1016/j.mee.2008.12.063.
- [98] Tsortos, A. ; Papadakis, G. ; Mitsakakis, K. ; Melzak, K. A. ; Gizeli, E. *Biophys. J. BioFAST* **2008**, doi :10.1529/biophysj.107.119271.
- [99] Harding, G. L. ; Du, J. *Smart Mater. Struct.* **1997**, *6*, 716–720.
- [100] Zerrouki, C. ; Fourati, N. ; Fougion, J. M. ; Lazerges, M. ; Pernele, C. *Sens. Actuators B :Chem* **2009**, soumis.

-
- [101] Moharram, S. ; Zhou, A. ; Wiebe, L. I. ; Knaus, E. E. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1840–1846.
- [102] Hadj-Bouazza, A. ; Zerrouki, R. ; Krausz, P. ; Laumond, G. ; Aubertin, A. M. ; Champavier, Y. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, *24*, 1249–1263.
- [103] Yamamoto, I. ; Sekine, M. ; Hata, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 306–310.
- [104] Gogoi, K. ; Gunjal, A. D. ; Phalgune, U. D. ; Kumar, V. A. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2697–2700.

Annexes

Annexe 1

Publications scientifiques

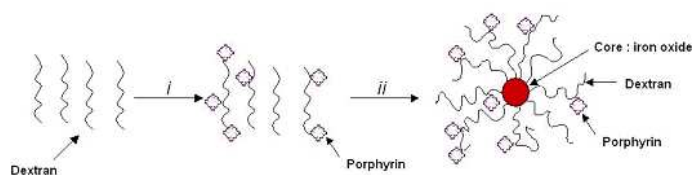
e-Polymers 2007, 089, 1-8

Synthesis and cellular uptake of superparamagnetic dextran-nanoparticles with porphyrinic motifs grafted by esterification

Romain Lucas, Robert Granet, Vincent Sol, Caroline Le Morvan, Clotilde Policar, Eric Rivière, Pierre Krausz

Abstract

This paper describes new superparamagnetic nanoparticles bearing dextran-grafted porphyrins with effective cellular uptake properties. They average 110 nm in diameter and are composed of a 5 nm iron oxide core coated with protoporphyrin-grafted dextrans. These particles show good magnetic properties, are avidly incorporated into cultured cancer cell lines, and thus present a great potential for cellular imaging and photodynamic therapy applications.

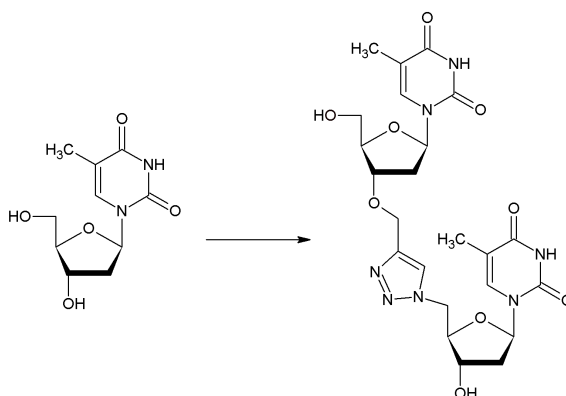


Tetrahedron Lett. **2008**, *49*, 1004-1007*Microwave-assisted synthesis of a triazole-linked 3'-5' dithymidine using click chemistry*

Romain Lucas, Virginie Neto, Amel Hadj Bouazza, Rachida Zerrouki, Robert Granet, Pierre Krausz, Yves Champavier

Abstract

Synthesis of triazole-linked 3'-5' thymidine dimer making use of 1,3-dipolar cycloaddition is described. The azido-precursor was obtained by regioselective chlorination of thymidine, followed by azidation. The second precursor, a propargyl derivative, was obtained by selective 3'-O-alkylation of thymidine. Two "Click Systems" were compared in order to obtain the desired dimer. These reactions were performed by microwave irradiation.

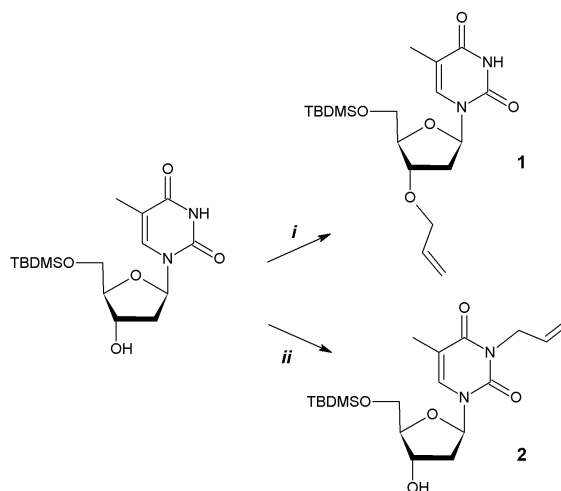


Carbohydr. Res. **2008**, *343*, 1490-1495*Solvent-controlled regioselective protection of 5'-O-protected thymidine*

Karine Teste, Ludovic Colombeau, Amel Hadj-Bouazza, Romain Lucas, Rachida Zerrouki, Pierre Krausz, Yves Champavier

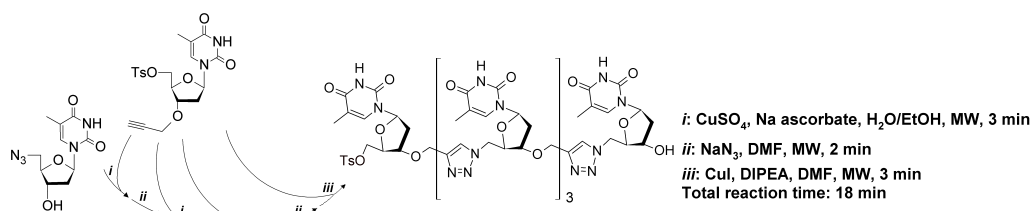
Abstract

This paper describes an efficient procedure for selective 3'-O- or 3-N-protection of 5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilylthymidine, depending on the use of aprotic polar solvents with low or high dielectric constant, respectively. These syntheses were activated by either ultrasound or microwaves. Several alkyl bromides offer a convenient route to prepare 3'-*O*- or 3-*N*-protected and functionalized thymidine derivatives.



Tetrahedron 2008, 64, 5467-5471*A rapid efficient microwave-assisted synthesis of a 3',5'-pentathymidine by copper(I)-catalysed [3+2] cycloaddition**Romain Lucas, Rachida Zerrouki, Robert Granet, Pierre Krausz, Yves Champavier***Abstract**

Starting from 5'-*O*-tosylthymidine, sequential azidation and Cu-catalysed [3+2] azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition led to the formation of a 3',5'-pentathymidine in high yield. The whole process needed only work-up/precipitation steps and was completed within just 18 minutes, thanks to microwave activation.

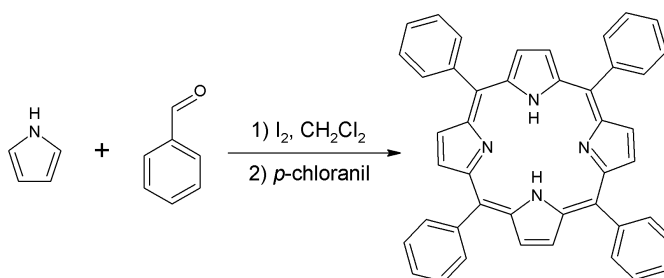


Tetrahedron Lett. **2008**, 49, 5537-5539*A facile and rapid iodine-catalyzed meso-tetraphenylporphyrin synthesis using microwave activation*

Romain Lucas, Julien Vergnaud, Karine Teste, Rachida Zerrouki, Vincent Sol, Pierre Krausz

Abstract

This Letter describes a rapid, easy and efficient one-pot procedure for tetraphenylporphyrin synthesis using iodine-catalysis and microwave activation. Commercial pyrrole, benzaldehyde and dichloromethane were being used as such, without prior distillation.



Actualité chimique 2009, 335, 5-9

And if everything was as easy as a "Click"

Romain Lucas, Rachida Zerrouki, Pierre Krausz

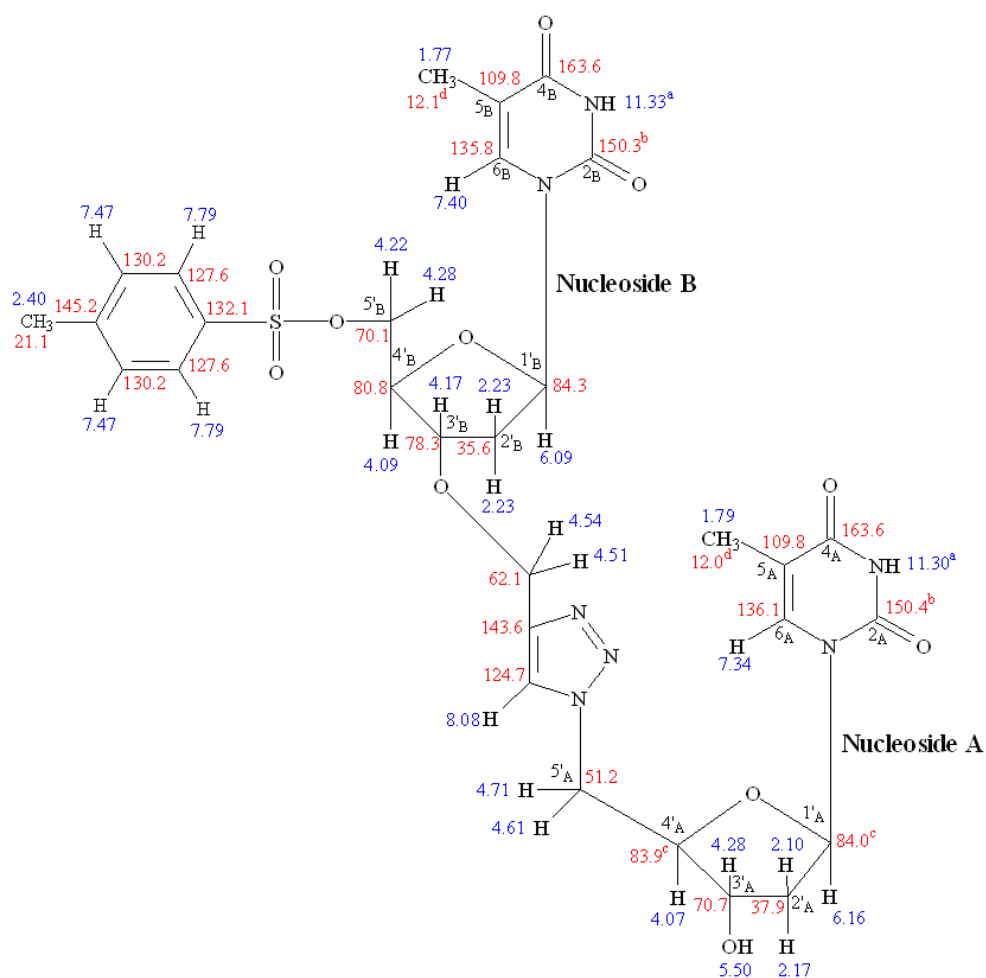
Abstract

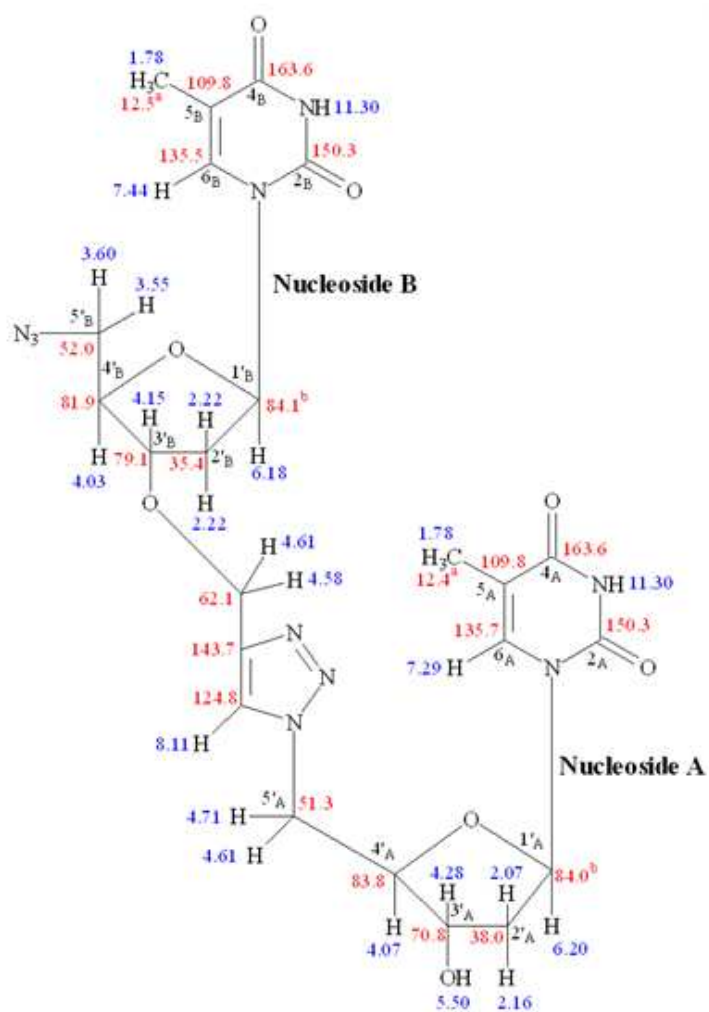
Since 2002, "Click Chemistry" has conquered synthesis world. This chemical philosophy, concerning rapid, efficient, selective and versatile reactions, has permitted to open new opportunities, particularly in creating new medicinal compounds. The Cu(I)-catalyzed variant of the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition between terminal alkynes and azides is the most famous "Click Reaction". Its main applications, depending on 1,2,3-triazoles generated, concern notably bioconjugation, polymer and materials science, and drug discovery.

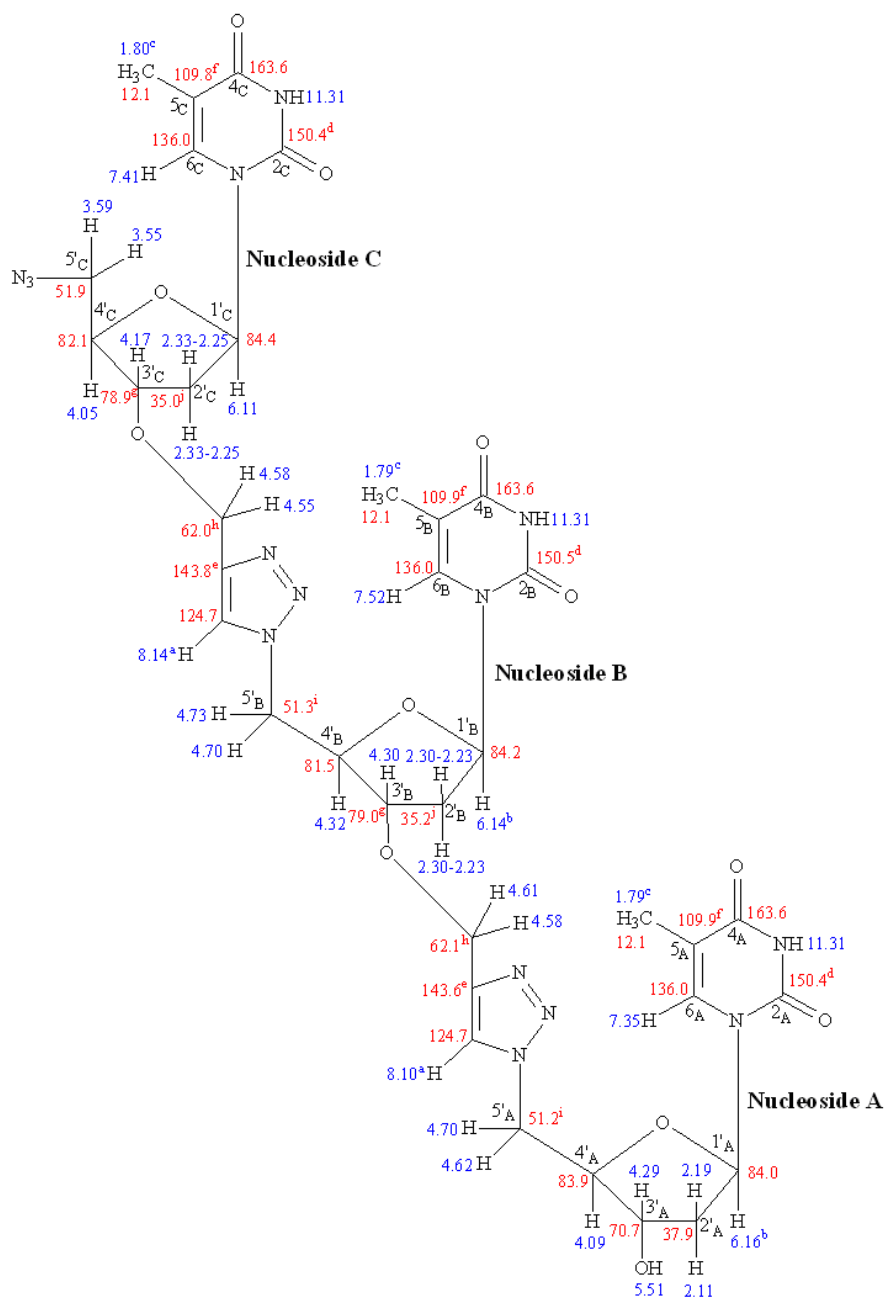
Annexe 2

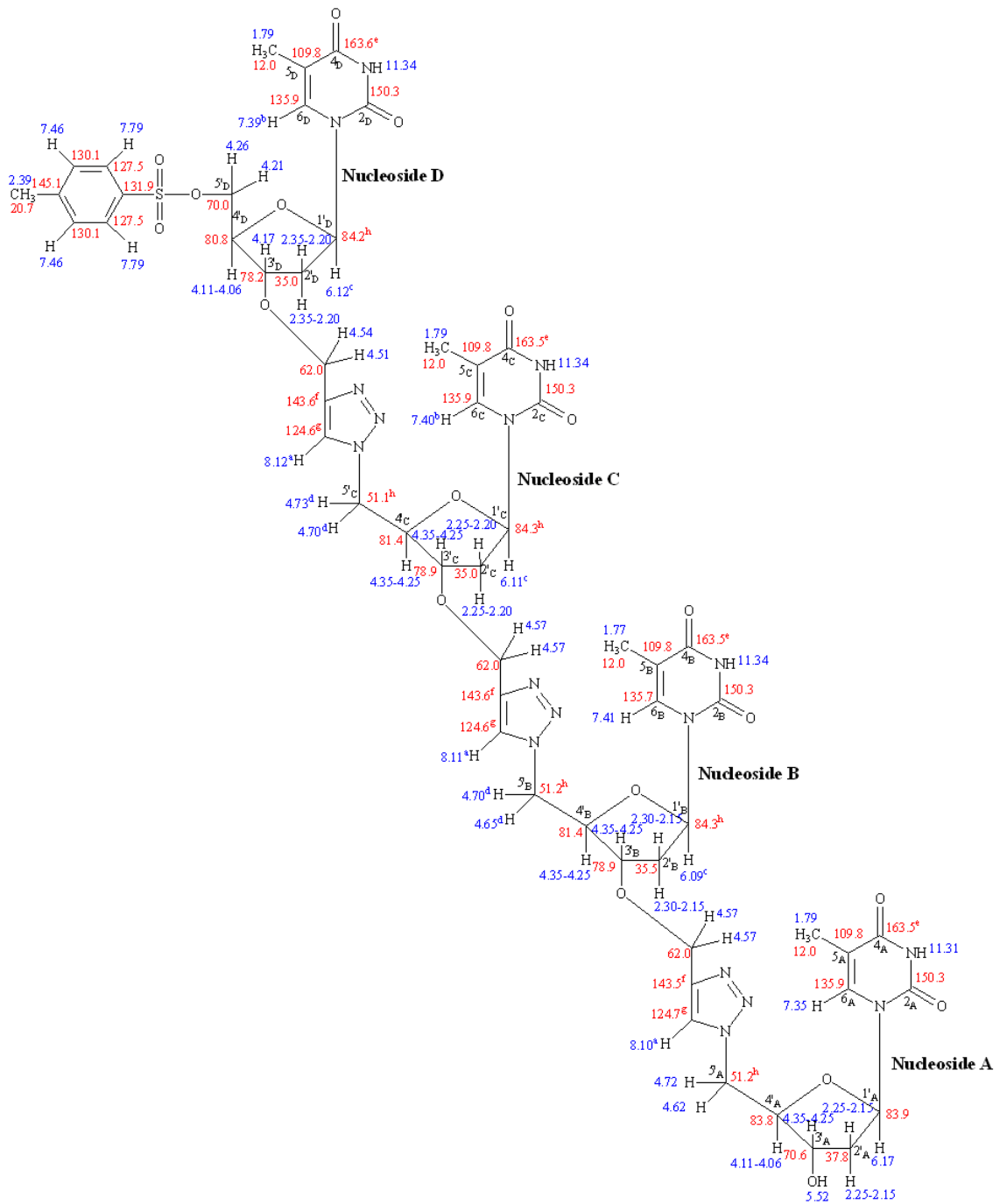
RMN schématique des molécules 35 à 41

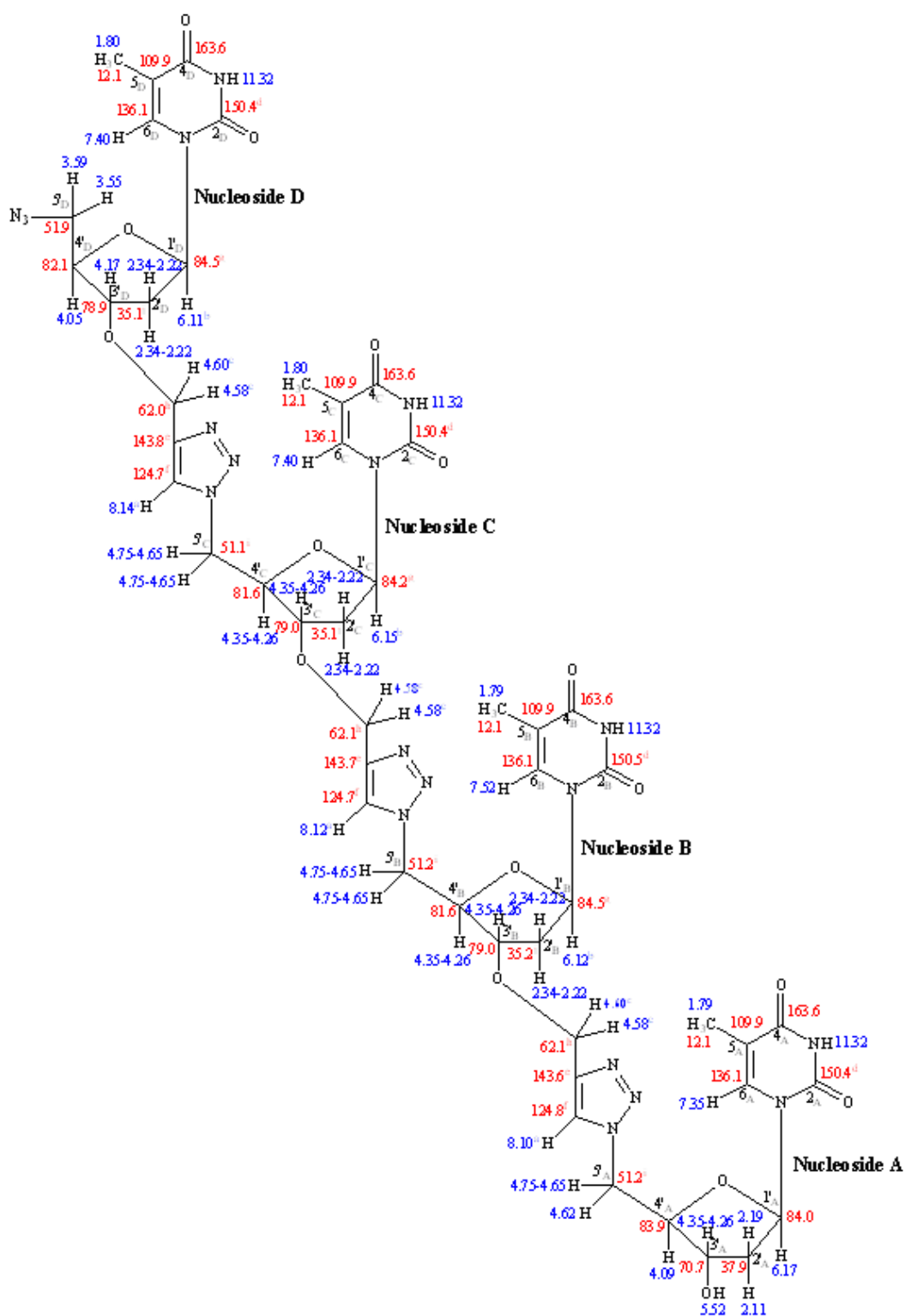
Les molécules 35 à 41 sont représentées, accompagnées des déplacements chimiques du proton (en bleu) et du carbone (en rouge) correspondants. Les valeurs de déplacements chimiques, assignées en exposant par des lettres minuscules (a à j), peuvent être interchangées.

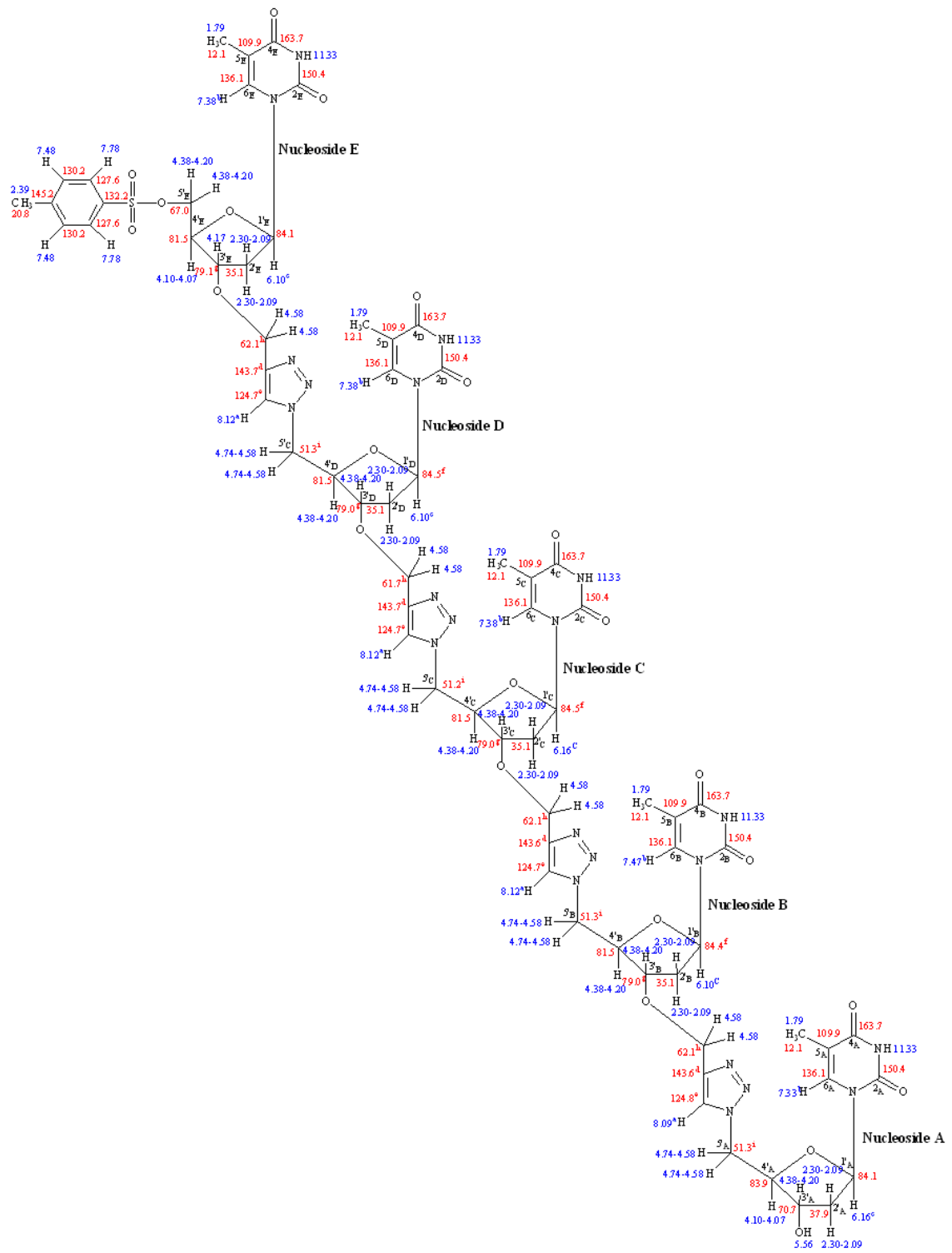












Résumé

Au travers de ce manuscrit, nous présentons la synthèse d'une nouvelle famille d'analogues d'oligonucléotides pyrimidiques. Dans un premier temps, l'alkylation régiosélective de nucléosides pyrimidiques, en présence d'hydrure de sodium, est décrite. Les effets combinés de la faible constante diélectrique et d'une possible chélation du sodium sont étudiés afin de comprendre, notamment à l'aide de calculs utilisant la DFT, les surprenants résultats d'alkylations. Dans un second temps, nous avons synthétisé de nouveaux analogues d'oligonucléotides générés par "click chemistry" (Cg-DNA), en partant d'un nucléoside clef. La méthode a été ensuite transférée à la synthèse sur support solide. Les structures de tous les produits ont été déterminées par différentes méthodes spectroscopiques. Enfin un biosenseur à ondes acoustiques de surface (SAW) a été utilisé et montre la complémentarité d'un tétramère de Cg-DNA synthétisé avec un oligonucléotide naturel.

Abstract

The synthesis of a new family of oligonucleotide analogues from pyrimidine bases is described. First, the solvent-dependent regioselective alkylation of pyrimidine nucleosides, using sodium hydride, is presented. Thanks notably to DFT calculations, the joined effects of low dielectric constant and possible sodium chelation by pyrimidine nucleosides are discussed in order to understand these unexpected results. Secondly, we were interested in the combined effects of click chemistry and microwave activation on the synthesis of oligonucleosides (Cg-DNA). Furthermore, the transfer to solid-phase synthesis gave interesting preliminary results. Structures of all products were determined by spectroscopic techniques. Finally, a surface acoustic wave sensor (SAW) has been used to probe DNA hybridization, gave very interesting results and opened new perspectives in nucleic acid research.