Université de Limoges | FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

LCSN

THÈSE DE DOCTORAT

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
Benjamin BOËNS

SYNTHÈSE ET ÉVALUATION BIOLOGIQUE DE MOUTARDES À L'AZOTE À MOTIFS PYRIMIDIQUES, PURIQUES ET TRIAZOLIQUES

sous la direction du Professeur Rachida Zerrouki
soutenue publiquement le 26 novembre 2012 devant un Jury composé de :

Véronique Bellosta, Professeur, ESPCI Paris	*Rapporteur*
Luigi Agrofoglio, Professeur, Université d'Orléans	*Rapporteur*
Tan-Sothea Ouk, Maître de Conférences, Université de Limoges	*Examinateur*
Rachida Zerrouki, Professeur, Université de Limoges	*Examinateur*
Patrick Trouillas, Maître de Conférences, Université de Limoges	*Invité*

« La culpabilité ne s'attache qu'à celui qui demeure ignorant quand il a une chance d'apprendre. »

Frank Herbert

REMERCIEMENTS

La thèse est une grande aventure scientifique et humaine. Je remercie donc toutes les personnes qui ont fait de ces trois années, passées au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'Université de Limoges, un moment inoubliable.

Je tiens à remercier le Professeur Pierre Krausz pour son accueil au sein de son laboratoire. Merci à vous pour vos conseils scientifiques, vos remarques, vos suggestions pertinentes et vos nombreux traits d'esprits. Je remercie aussi le nouveau directeur du laboratoire, le Professeur Vincent Sol, qui a su reprendre le flambeau.

Mes remerciements et ma profonde considération vont au Professeur Véronique Bellosta et au Professeur Luigi Agrofoglio qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

S'il ne fallait remercier qu'une seule personne pour ces formidables trois années de thèse, c'est Rachida Zerrouki, directrice de thèse et amie. Vous avez su me transmettre son savoir et sa passion de la recherche pendant sept années. J'ai appris tant de choses, tant de qualités à vos côtés que je serais incapable d'en faire une liste exhaustive ! Encore merci à vous pour ces si précieux conseils, pour tout le temps et le soutien apportés, pour les joies et les peines partagées, pour d'inoubliables moments de vie, pour d'épiques batailles sur l'infrarouge, et j'en oublie. Ce maigre paragraphe ne suffisant pas à exprimer toute ma gratitude et mon profond respect, je vous le dis encore ... Merci !

Un grand merci au Docteur Tan-Sothea Ouk qui a su m'amener aux joies de la biologie cellulaire. Merci à toi pour ta patience, ta pédagogie, ta gentillesse et ta disponibilité, j'ai beaucoup appris au sein de l'IUT Génie biologique grâce à toi. Je tiens aussi à saluer l'équipe de l'IUT : Naïma, pour avoir guidé mes premiers pas en biologie, Philippe et son caractère unique, Romain pour sa bonne humeur, et Karine la super-technicienne.

Je tiens aussi à remercier le docteur Patrick Trouillas pour avoir su me faire comprendre un brin de chimie théorique au grand novice que j'étais. Merci pour toutes ces discussions enrichissantes dans ce coin de la faculté de Pharmacie. Et merci aussi à Florent Di Meo, dit le « chimicien » en tongs, pour avoir pris du temps à m'expliquer certains concepts, une bière en main !

Je tiens à remercier le Docteur Yves Champavier, pour sa disponibilité et la qualité irréprochable de ses analyses ainsi que Catherine Ouk, pour sa patience, sa gentillesse et tout son travail concernant la cytométrie en flux.

Merci à Pierre-Antoine et Pierre-Henri, durant ces trois années, même si la vie prend bien des tournures. Merci aux « anciens », Julien, Karine, Cyril, Nicolas, Jean-Pierre, Cédric mais surtout Romain, dont l'aide joyeuse et sautillante est toujours un bonheur ! Merci aux « nouveaux », Oliver,

dit le « P'tit Gros », Manu, et son saucisson au chocolat et tous les autres du LCSN : Ahmad, Jean-Kerim, Marc-Arthur, Hélène, les deux Amandine, Benji, Lamia, Anaïs et beaucoup d'autres ! Merci à vous tous pour les moments de rigolades, qui ont fait de ce labo un endroit si particulier !

Merci aux autres membres du LCSN : Guy Costa, Sabine Lhernould, Vincent Chaleix, Robert Granet, Michelle Constantin, Sylvie Laval.

Merci à Anne-Laure, amie de toujours, pour ses conseils, son support, son réconfort et cette amitié inébranlable ! Merci à Pascal, pour ces discussions embuées de bière, et à Françoise, pour sa bonne humeur et sa gentillesse !

Je remercie cette éternelle bande de copains, les célèbres Zoltans, pour tous ces moments de joies et d'allégresses durant toutes ces années. Pour cette amitié qui montre le nord, encore merci !

Je remercie toute ma famille, mon frère et surtout mes parents, pour tout leur soutien, leur gentillesse et leur amour, qui ont fait de moi ce que je suis.

ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

Ac	Acétyle
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Alk	Alkyle
Ar	Aromatique
ARN	Acide Ribonucléique
B3LYP	Becke Three Paramaters Lee-Yang-Parr
B3P86	Becke Three Paramaters Perdew 86
BHandHLYP	Becke-Half and Half Lee-Yang-Parr
Bn	Benzyle
BOP	hexafluorophosphate de benzotriazolyloxy-tri-(diméthylamino)phosphonium
CAM-B3LYP	Coulomb-Attenuating Method B3LYP
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CI_{50}	Concentration inhibitrice médiane
CLB	Chlorambucil
ClEU	3-(2-chloroéthyl)uridine
CMF	Cytométrie en Flux
Coll.	Collaborateurs
CuAAC	Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DEA	Diéthanolamine
DFT	Density Functional Theory

DMAc	Diméthylacétamide
DMF	*N,N*-Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxide
EP	Ether de Pétrole
éq.	équivalents
Et	Ethyle
FAPY	Formamido-pyrimidine
h	Heures
HF	Hartree-Fock
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HRMS	High-Resolution Mass Spectrometry
IR	Infrarouge
J	Constante de couplage
LCAO	Linear Combination of Atomic Orbital
litt.	Littérature
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
LNH	Lymphome non-hodgkinien
M	Mole par litre ou Molaire
M.O.	Micro-Ondes
m/z	Rapport masse sur charge
min	Minutes
MM	Myélome multiple
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium

Mult	Multiplicité
NaAsc	Ascorbate de Sodium
PCM	Polarizable Continuum Model
ppm	Partie par million
PyBOP	Hexafluorophosphate de benzotriazolyloxy-tri-(pyrrolidino)phosphonium
Pyr	Pyridine
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
T.A.	Température Ambiante
tBu	*Tert*-butyle
Tf	Température de fusion
TFA	Acide Trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Tétraméthylsilane
Ts	Tosyle
UV	Ultraviolet
V	Volume

TABLES DES MATIÈRES

INTRODUCTION GENERALE **1**

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **3**
1.1. Introduction 4
1.2. Le cancer 4
1.2.1. Les premières étapes de cancérisation 5
1.2.2. Les caractéristiques des cellules cancéreuses 5
1.3. Structure et fonctions de l'ADN 6
1.3.1. Structure de l'ADN 6
1.3.2. Cycle cellulaire et réplication de l'ADN 8
1.4. Agents anticancéreux et chimiothérapie 9
1.4.1. Les antimétabolites 9
1.4.2. Les alcaloïdes de plantes et dérivés 11
1.4.2.1. Les poisons du fuseau mitotique 11
1.4.2.2. Les inhibiteurs de topoisomérase 11
1.4.3. Les antibiotiques cytotoxiques 12
1.4.3.1. Les anthracyclines 13
1.4.3.2. La bléomycine 13
1.4.3.3. La mitomycine C 15
1.4.4. Les agents alkylants 15
1.4.4.1. Les sels de platine 15
1.4.4.2. Les nitroso-urées 16
1.4.4.3. Les moutardes à l'azote 17
1.4.4.3.1. Du gaz de combat au premier agent anticancéreux de synthèse 17
1.4.4.3.2. Mécanisme d'action dans l'organisme 18
1.4.4.3.3. Les dérivés des moutardes à l'azote 20
1.4.4.3.4. Les récentes avancées 24
1.5. Finalité du travail 29

II. ETUDE DE LA SYNTHESE D'UN DERIVE PYRIMIDIQUE DE MOUTARDE À L'AZOTE **31**
2.1. Alkylation de l'uracile 33
2.2. Etude de la réaction d'amidation directe 34
2.2.1. Mise au point de la réaction d'amidation 34
2.2.2. Généralisation de la réaction d'amidation 36
2.2.2.1. Synthèse de la *N*-propargyléthanolamine 37
2.2.2.2. Résultats de la réaction d'amidation 38
2.2.3. Etude de modélisation moléculaire 40

2.2.3.1. Notions théoriques 40
2.2.3.2. Méthodologie 45
2.2.3.3. Etude conformationnelle des composés synthétisés 47
2.3. Synthèse de la moutarde à l'azote dérivée de l'uracile 51
2.4. Conclusion 51

III. SYNTHESE DE MOUTARDES À L'AZOTE À MOTIFS PURIQUES 53
3.1. Synthèse de moutardes à l'azote à partir des 6-chloropurines. 55
3.1.1. Fixation de la diéthanolamine en position 6 55
3.1.2. Chloration des intermédiaires dihydroxylés 59
3.1.2.1. Chloration de la 6-((bis-2-hydroxyéthyl)amino)purine 59
3.1.2.2. Chloration de la 2-amino-6-((bis-2-hydroxyéthyl)amino)purine 60
3.2. Synthèse appliquée aux purines *N-9* alkylées 62
3.2.1. Alkylation régiosélective des 6-chloropurines 62
3.2.2. Fixation de diéthanolamine en position 6 65
3.2.3. Chloration et déprotection des composés alkylés 66
3.3. Conclusion 67

IV. ELABORATION DE MOUTARDES À L'AZOTE GENEREES PAR « CLICK CHEMISTRY » 69
4.1. Rappels sur le concept de Click Chemistry 70
4.2. Stratégie de synthèse 71
4.3. Première étape : *N*-alkylation de la diéthanolamine 72
4.4. Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre(I) 74
4.4.1. Couplage entre la *N*-propargyldiéthanolamine et l'azoture de benzyle 74
4.4.2. Choix des composés azoturés 75
4.4.3. Synthèses des composés azoturés 76
4.4.2.1. Synthèse du 1-azido-1-désoxy-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-β-D-glucopyranose 76
4.4.2.2. Synthèse du 1-azido-1-désoxy-2,3,5-tri-*O*-acétyl-β-D-ribofuranose 77
4.4.2.3. Synthèse de la 3-azido-7-hydroxycoumarine 77
4.4.2.4. Synthèse de la 3'-*O*-acétyl-5'-azidothymidine 78
4.4.3. Réactions de couplage de la N-propargyldiéthanolamine et des composés azoturés 80
4.5. Etape finale de chloration 83
4.5.1. Etude de la réaction de chloration 83
4.5.1.1. Chloration par le système $SOCl_2$ / Pyridine 83
4.5.1.2. Chloration par la méthode de Appel 85
4.5.1.3. Chloration via un intermédiaire mésylé 86
4.5.1.4. Chloration par utilisation d'une variante de la réaction de Vilsmeier-Haack 86
4.5.2. Chloration des composés générés par réaction de « Click Chemistry » 87
4.5.3. Déprotection des composés acétylés 88

4.6. Conclusion 88

V. EVALUATIONS BIOLOGIQUES DE MOUTARDES A L'AZOTES A MOTIFS PURIQUES PYRIMIDIQUES OU TRIAZOLIQUES 91
5.1. Molécules testées 92
5.2. Choix des lignées cellulaires testées 93
5.2.1. Cellules JURKAT 93
5.2.2. Cellules K562 93
5.2.3. Cellules U266 93
5.2.4. Cellules A431 93
5.3. Effets des molécules testées sur la viabilité cellulaire 94
5.4. Impact sur le cycle cellulaire 95
5.4.1. Cytométrie en flux - Principe 95
5.4.2. Impact sur le cycle des cellules JURKAT 97
5.4.3. Impact sur le cycle des cellules K562 98
5.4.4. Impact sur le cycle des cellules U266 99
5.4.5. Impact sur le cycle des cellules A431 100
5.4.6. Discussion 100
5.5. Conclusion 102

CONCLUSION GÉNÉRALE 104

VI. PARTIE EXPERIMENTALE 105
6.1. Synthèse organique 106
6.1.1. Réactifs et solvants 106
6.1.2. Chromatographie 108
6.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique 108
6.1.2.2. Chromatographie sur couche mince préparative 109
6.1.2.3. Chromatographie éclair automatisée 109
6.1.3. Analyses 109
6.1.3.1. Température de fusion 109
6.1.3.2. Spectroscopie de RMN 109
6.1.3.3. Spectroscopie Infra-rouge 110
6.1.3.4. Spectroscopie UV-Visible 110
6.1.3.5. Spectroscopie de Fluorescence 110
6.1.3.6. Spectrométrie de Masse Basse Résolution 110
6.1.3.7. Spectrométrie de Masse Haute Résolution 110
6.1.4. Appareillages Ultrasons et Micro-ondes 111
6.1.4.1. Cuve à ultrasons 111
6.1.4.2. Four à micro-ondes 111
6.1.5. Produits / Synthèses / Caractéristiques 112
6.2. Evaluation biologique 159
6.2.1. Molécules testées 159
6.2.2. Matériels biologiques 160
6.2.2.1. Lignées cellulaires 160
6.2.2.2. Culture cellulaire 160
6.2.2.3. Etude *in vitro* 160

ANNEXES 163

INTRODUCTION GENERALE

Le cancer est une des causes majeures de décès dans le monde. On estime à plus de 11 millions de personnes diagnostiquées avec un cancer et cette maladie est à l'origine de plus de 7,6 millions de décès en 2008, soit 13% de la mortalité mondiale. En France, cette maladie est la seconde cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires. Malgré les nombreuses avancées de la médecine dans la lutte contre le cancer, cette maladie reste toutefois un problème sanitaire majeur. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le cancer comme « un terme général s'appliquant à un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme ». C'est cette grande diversité qui explique, en partie, la difficulté à trouver un remède universel et efficace. Actuellement, il existe trois modalités principales de traitement des cancers : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. C'est ce dernier mode de traitement qui a retenu notre attention et plus particulièrement une classe d'agents chimiothérapeutiques : les moutardes à l'azote. Ces agents anticancéreux créent un lien chimique fort entre les bases de l'ADN. Ce dernier étant altéré, la cellule ne peut pas se répliquer, entraînant ainsi le suicide de la cellule.

Dans le cadre du programme de recherche sur les agents anticancéreux du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'Université de Limoges, nous proposons la synthèse de nouvelles moutardes à l'azote. Dans un premier temps, nous avons réalisé la synthèse d'une moutarde à l'azote dérivée d'une base nucléique de l'ADN, l'uracile. Par la suite, de nouvelles structures ont été synthétisées à partir de bases puriques, la 6-chloropurine et la 2-amino-6-chloropurine. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'élaboration d'une nouvelle famille de moutardes à l'azote à motifs triazoliques. Le groupement bis-(2-chloroéthyle)amine est lié à diverses molécules d'intérêts biologiques par un lien triazole, permettant une grande variabilité de ce type de structure.

Par la suite, l'activité biologique de ces structures variées sera testée vis-à-vis de plusieurs lignées de cellules cancéreuses.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. INTRODUCTION.

C'est au cours du XXème siècle que les connaissances autour du cancer se sont développées. A la fin des années 1940, les premiers traitements de chimiothérapie ont permis de lutter dans un premier temps contre cette maladie. La découverte de la structure de l'ADN (acide désoxyribonucléique) en 1953 par Watson et Crick et les avancées technologiques de ces dernières années (génomique, biologie cellulaire…) ont permis d'améliorer la compréhension de cette maladie.

Dans ce chapitre introductif, nous nous proposons de décrire, dans un premier temps, le cancer et ses caractéristiques, puis nous passerons en revue les différentes classes d'agents anticancéreux existants, et tout particulièrement celle des moutardes à l'azote. Enfin, nous finirons par les avancées récentes concernant cette classe de composés.

1.2. LE CANCER.

La principale caractéristique du cancer est «la prolifération rapide de cellules anormales ». En effet, certaines cellules échappent à toute régulation et acquièrent des caractéristiques biologiques les rendant « immortelles ».

1.2.1. Les premières étapes de cancérisation.

La transformation de cellules normales de l'organisme en cellules cancéreuses résulte d'un processus lent, comprenant de nombreuses étapes. On distingue généralement trois étapes majeures.

La première étape d'**initiation** correspond à une lésion rapide et irréversible de l'ADN après exposition à un carcinogène. On peut diviser ces carcinogènes en trois types :

- Physiques : les rayonnements ultraviolets ou les rayonnements ionisants,
- Chimiques : l'arsenic, l'amiante, le benzène,
- Biologiques : certains virus (papillomavirus, virus d'Epstein-Barr ...), bactéries ou parasites.

Durant la deuxième étape de **promotion**, une série d'autre modifications génétiques réversibles, cette fois, ont lieu, et donnent à certaines cellules-fille de la cellule initiée la capacité de se multiplier plus vite. Cette étape aboutit à une lésion précancéreuse qui est ensuite exposée de façon prolongée à une substance qui l'entretient et la stabilise.

L'étape de **progression** correspond au passage des cellules précancéreuses aux cellules malignes qui se reproduisent et ont la capacité d'envahir les autres tissus.

1.2.2. Les caractéristiques des cellules cancéreuses.

Les cellules cancéreuses ont acquis, au cours de la phase de progression, six caractéristiques essentielles qui se manifestent par une croissance maligne (Figure 1.1) : l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, l'insensibilité aux facteurs anti-prolifératifs, l'insensibilité à l'apoptose, un potentiel réplicatif illimité, une angiogenèse soutenue, et enfin la dernière l'invasion et la métastase.[1]

1 D. Hanahan, R.A. Weinberg, Cell **2000**, *100*, 57-70.

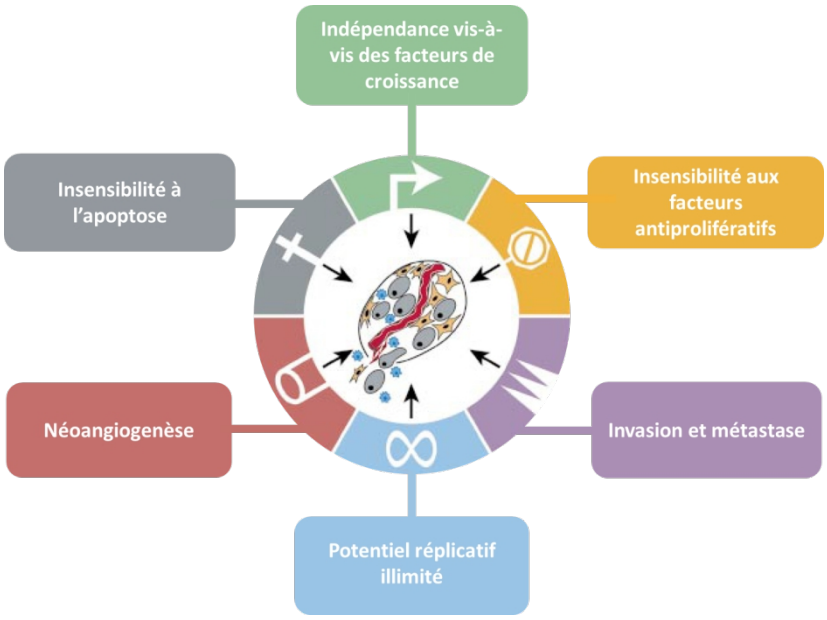


Figure 1.1 *: Capacités acquises des cellules cancéreuses.*

L'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance et l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs sont des capacités importantes puisqu'elles rendent les cellules tumorales totalement indépendantes du tissu qui les environne. Elles peuvent ainsi initier continuellement leur division cellulaire tout en ignorant les mécanismes de contrôle de la prolifération. Cette expansion sans limite résulte de leur capacité à résister aux mécanismes de mort programmée ou apoptose. En effet, dans le cas de cellules saines, l'apoptose est déclenchée lorsque des anormalités surviennent, telles que des dommages dans l'ADN, l'hypoxie ou l'attrition cellulaire. De plus, l'apoptose peut être déclenchée par des facteurs extérieurs, généralement émis par d'autres cellules du tissu ou par le système immunitaire. Dans le cas des cellules cancéreuses, ces signaux sont ignorés.

Enfin, les cellules cancéreuses ont un potentiel réplicatif illimité, contrairement aux cellules saines dont le potentiel réplicatif est estimé à une cinquantaine de divisions.

Ces capacités rendent les cellules cancéreuses immortelles, leur multiplication échappant à tout contrôle. Dans le cas de tumeurs solides, cette prolifération soutenue nécessite un apport important en oxygène et en nutriments, en provenance du système sanguin. Les cellules cancéreuses vont alors initier la croissance de néo-vaisseaux, au voisinage de la tumeur : la néoangiogenèse tumorale. Ce phénomène est initié par la surexpression de facteurs de croissance (VEGF, FGF ...) par les cellules tumorales et conduit à la vascularisation importante de la tumeur.

Ces conditions remplies, la tumeur primaire peut désormais croître et s'étendre selon deux phénomènes : l'invasion et la métastase. Dans le premier cas, des cellules cancéreuses

s'étendent et se développent dans les tissus sains proches. Dans le second cas, des cellules issues de cette tumeur primaire peuvent migrer, s'implanter sur d'autres tissus, pour y proliférer. Ces deux mécanismes permettent aux cellules cancéreuses d'« échapper » à l'attrition cellulaire apparaissant inévitablement dans une masse tumorale importante. Dans une grande majorité des cas, l'invasion locale et le phénomène métastasique sont responsables de la mort du patient.[2]

1.3. STRUCTURE ET FONCTIONS DE L'ADN.

L'ADN, contenu dans le noyau de la cellule eucaryote, est une macromolécule essentielle, qui est le support de l'hérédité et le dépositaire de l'information génétique de chaque individu. La découverte de sa structure et de ses fonctions ont été primordiales dans la compréhension des mécanismes qui régissent les cellules.

1.3.1. Structure de l'ADN.

L'ADN est une macromolécule linéaire formée par un enchaînement en double hélice de deux chaînes appelées brins.[3] Ces deux brins sont constitués d'un enchaînement de nucléosides. Les nucléosides sont constitués d'une partie glucidique et d'une base purique ou pyrimidique (Figure 1.2).

2 M.B. Sporn, *The Lancet*, **1996**, *347*, 1377-1381

3 a) J.D. Watson, F.H.C. Crick, , *Nature,***1953**, *171*, 964-967
b) F.H.C. Crick, J.D. Watson, *Proc. Roy. Soc. (A)*, **1954**, *223*, 80-96

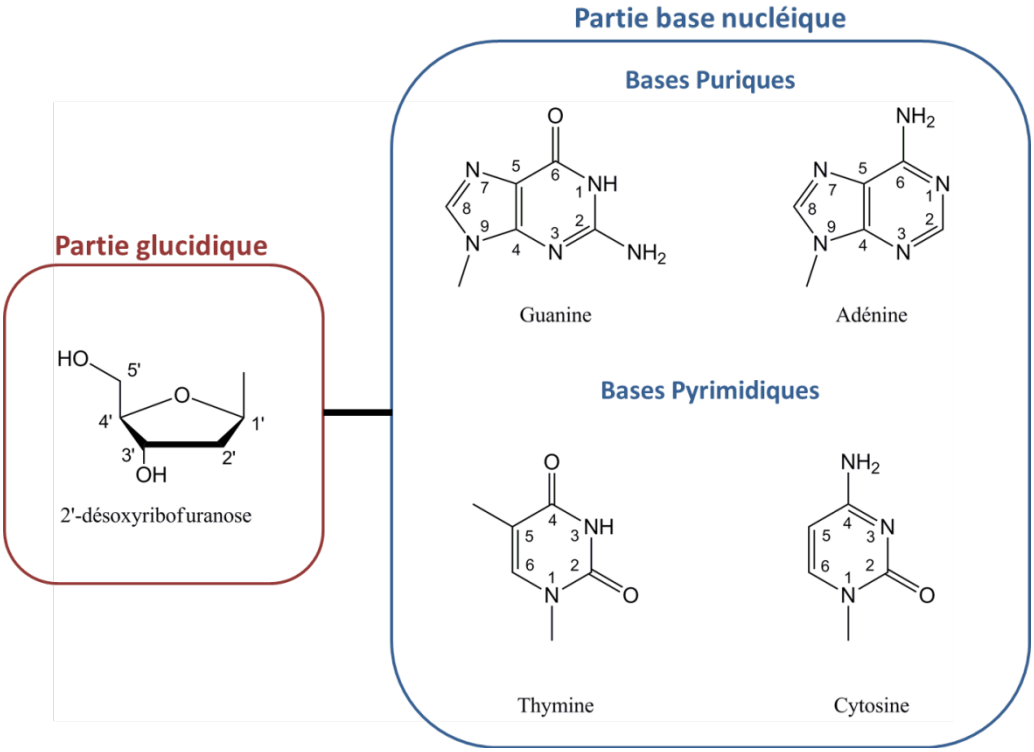


Figure 1.2 *: Structure générale des nucléosides.*

Ces nucléosides sont reliés entre eux par des liaisons 3',5'-phosphodiesters. Des liaisons hydrogènes entre les deux brins d'ADN permettent de maintenir la cohésion de la double hélice et assurent la complémentarité des deux brins. Chacune des bases azotées à un complément exclusif : l'adénine est toujours appariée à la thymine et la guanine à la cytosine (Figure 1.3).

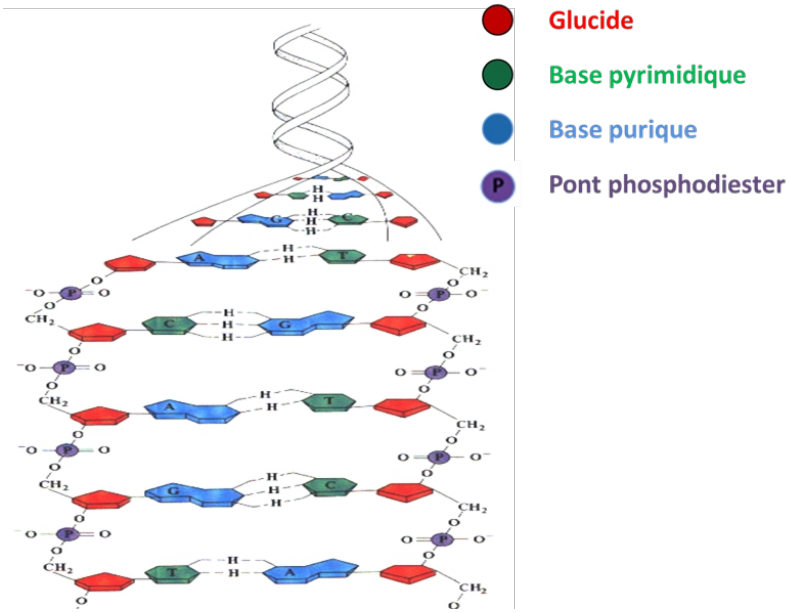


Figure 1.3 *: Structure de l'ADN*

1.3.2. Cycle cellulaire et réplication de l'ADN.

Toutes les cellules de l'organisme sont capables de se multiplier, conduisant à la formation de deux cellules filles à partir d'une cellule mère. Au cours de ce cycle cellulaire, l'ADN va se répliquer, transmettant ainsi l'information génétique aux cellules de la génération suivante. Le cycle cellulaire se déroule selon quatre phases : G_1, S, G_2 et M (Figure 1.4).

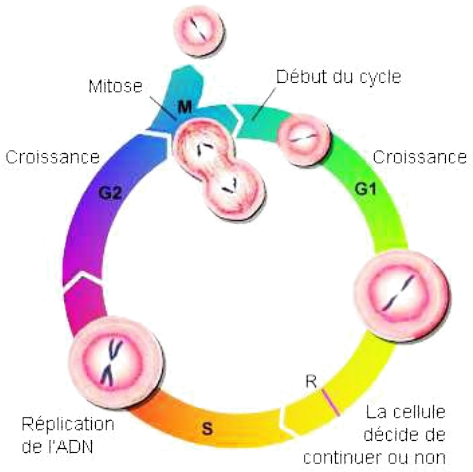


Figure 1.4 *: Phases du cycle cellulaire.*

Au cours de la **phase G_1**, la taille de la cellule augmente et l'activité biosynthétique s'accroit considérablement, notamment pour préparer la réplication de l'ADN. La **phase S** est marquée par le début de la réplication de l'ADN. Lors de ce processus, les deux brins d'ADN servent de matrices et deux nouveaux brins se forment de manière complémentaire. On obtient ainsi deux molécules d'ADN identiques par réplication (Figure 1.5). A la fin de la phase S, la quantité d'ADN a effectivement doublé au sein de la cellule.

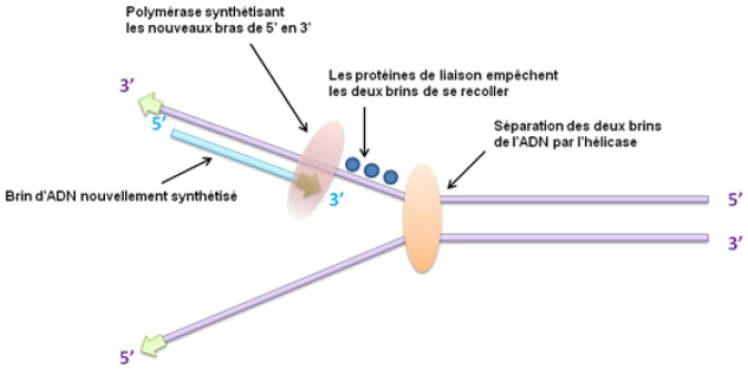


Figure 1.5 *: Processus de réplication de l'ADN en phase S.*

Cette phase est suivie par la **phase G_2**, où la biosynthèse augmente de nouveau afin de préparer la cellule au processus de mitose (**phase M**). Au cours de cette phase, les

chromosomes dédoublés vont migrer chacun vers un des pôles de la cellule. Cette migration se déroule grâce aux tubules du fuseau cellulaire. Lorsque le matériel génétique est effectivement séparé, la cellule va se diviser en son centre, aboutissant à deux cellules filles. (Figure 1.6).

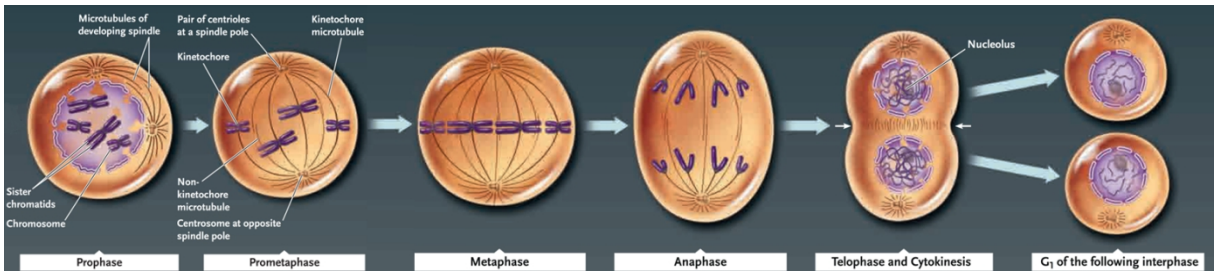


Figure 1.6 *: Processus de la mitose.*[4]

Les cellules filles peuvent alors de nouveau initier un cycle cellulaire et se diviser ou rester en phase G_0 ou quiescence, phase de « repos » où la cellule n'initie plus de division. La plupart des agents anticancéreux ont pour but de bloquer le cycle cellulaire des cellules cancéreuses.

1.4. AGENTS ANTICANCEREUX ET CHIMIOTHÉRAPIE.

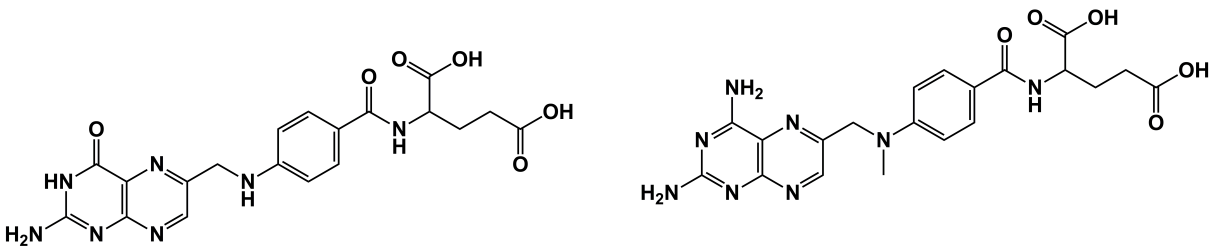
Dans la lutte contre le cancer, on peut distinguer quatre traitements : la chirurgie, la radiothérapie, la photothérapie dynamique et la chimiothérapie. Ce dernier traitement consiste à injecter, le plus souvent par voie intraveineuse, un ou plusieurs agents anticancéreux. Le but de ces agents anticancéreux est de tuer les cellules cancéreuses en bloquant certaines étapes de la division cellulaire. On peut ainsi répartir ces agents en quatre grandes classes : les antimétabolites, les alcaloïdes de plantes, les antibiotiques cytotoxiques et les agents alkylants.

1.4.1. Les antimétabolites.

Les antimétabolites inhibent la synthèse des acides nucléiques, indispensables à la multiplication cellulaire. Leur structure moléculaire est voisine de celle des composés naturels que les cellules utilisent pour synthétiser les bases azotées, précurseurs des acides nucléiques. Les antimétabolites bloquent le fonctionnement de certaines enzymes qui interviennent dans le métabolisme cellulaire. Ils sont connus et utilisés depuis la fin des années 1940 et se répartissent en deux classes : les antifolates et les inhibiteurs de la synthèse nucléique.

4 D'après P.J. Russel, P.E. Hertz, B. McMillan, *Biology, The Dynamic Science*, Brooks/Cole, **2008**, 202-203.

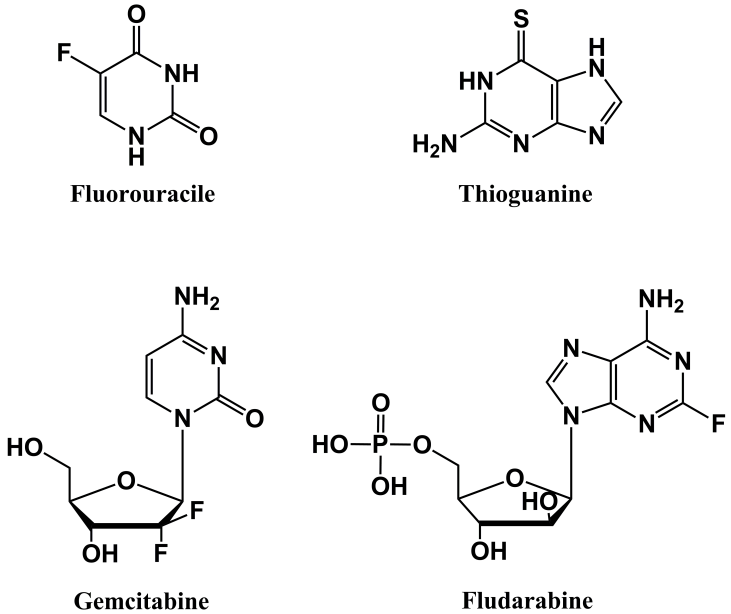
Les antifolates sont des inhibiteurs d'enzymes indispensables au métabolisme de l'acide folique (vitamine B9), dont le chef de file est le méthotrexate[5] (Figure 1.7). Il inhibe la dihydrofolate-réductase et bloque la transformation de l'acide dihydrofolique (premier métabolite de l'acide folique) en acide tétrahydrofolique nécessaire à la synthèse des acides nucléiques.



Acide Folique **Methotrexate**

***Figure 1.7** : Acide folique et méthotrexate.*

Les inhibiteurs de la synthèse nucléique ont une structure chimique semblable aux bases naturelles et sont acceptées comme substrats.[6] Ils inhibent la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines indispensables à la division cellulaire (Figure 1.8). On peut distinguer les anti-pyrimidiques, médicaments qui ressemblent à la cytosine, à la thymine ou à l'uracile et les anti-puriques, médicaments ressemblant à la guanine ou à l'adénine.



Fluorouracile **Thioguanine**

Gemcitabine **Fludarabine**

***Figure 1.8** : Exemples de médicaments antipyrimidiques ou antipuriques.*

5 B.N. Cronstein, J.R. Bertino, *Methotrexate,* Springer, **2000**, 9-11.

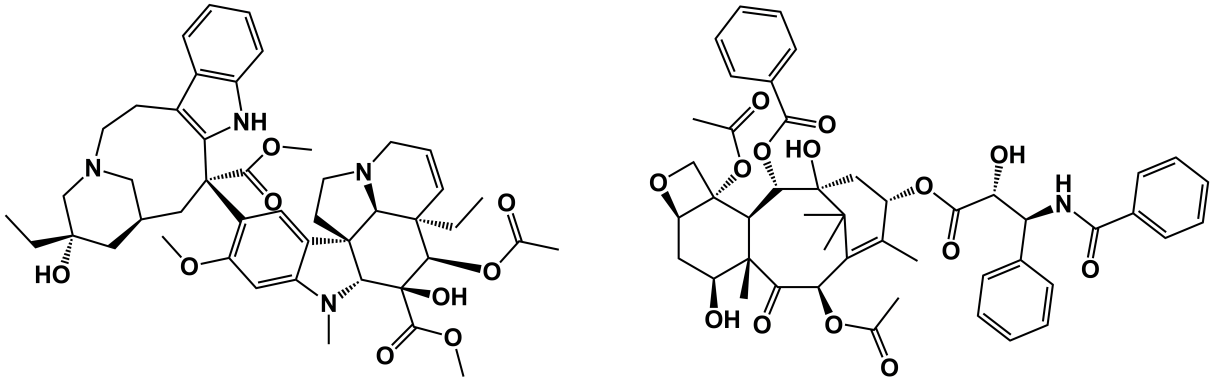
6 R.B. Silverman, *The organic chemistry of drug design and drug action*, Elsevier **2004**, 289-302.

1.4.2. Les alcaloïdes de plantes et dérivés.

Les alcaloïdes de plantes sont des molécules extraites de végétaux et sont utilisés dans différentes pharmacopées. On distingue les alcaloïdes selon leur mode d'action : les poisons du fuseau mitotique et les inhibiteurs de topoisomérases.

1.4.2.1. Les poisons du fuseau mitotique.

Ces alcaloïdes peuvent agir sur la synthèse et le fonctionnement du fuseau cellulaire au cours de la mitose. On peut distinguer deux catégories : les vinca-alcaloïdes et les taxanes[7] (Figure 1.9).



Vinblastine **Paclitaxel**

Figure 1.9 *: Alcaloïdes, poisons du fuseau mitotique.*

Les vinca-alcaloïdes, comme la vinblastine, peuvent se lier à des sites spécifiques de la tubuline et inhibent l'assemblage des tubulines en microtubules, empêchant ainsi la croissance du fuseau mitotique. Les taxanes, dont le composé le plus connu est le paclitaxel, stimulent la polymérisation de la tubuline, améliorant sa formation et rendant très stables les microtubules. Ceux-ci ne peuvent alors pas se dégrader, empêchant ainsi la migration des chromosomes vers les pôles de la cellule.

1.4.2.2. Les inhibiteurs de topoisomérase.

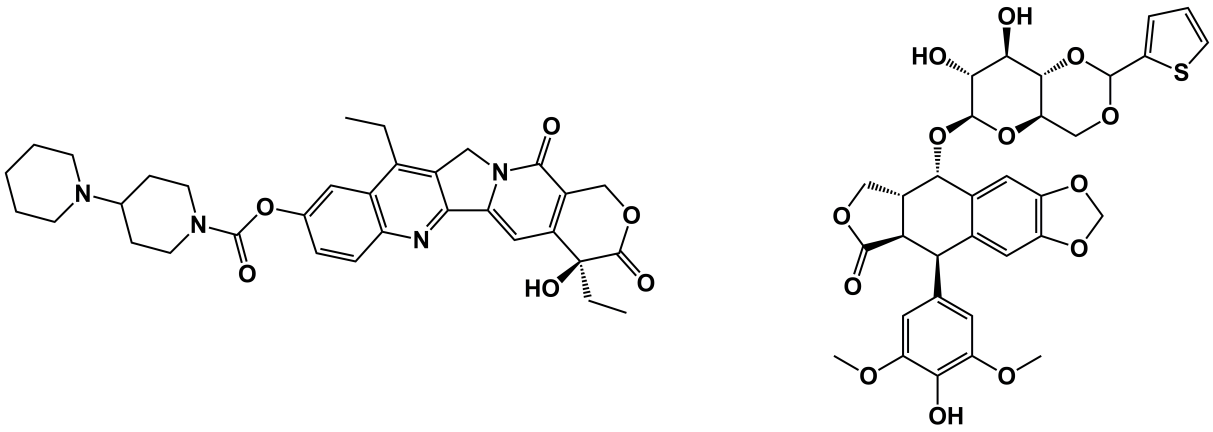
Les topoisomèrases sont des enzymes indispensables pour « dénouer » l'enroulement très important de l'ADN avant sa transcription ou sa réplication. On distingue deux types de topoisomérases.

La topoisomérase de type I se fixe au niveau de l'ADN. Ce dernier est **coupé sur un seul brin** pour permettre une transcription rapide. La topoisomérase maintient les deux brins

7 L. Brunton, K. Parker, D. Blumenthal, I. Buxton, *Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapteutics*, McGraw Hill **2008**, 881-884.

d'ADN à l'abri des nucléases. Elle permet la ligature des fragments de l'ADN et se sépare de celui-ci. Le rôle des inhibiteurs de topoisomérase de type I (irinotécan, Figure 1.10) est d'empêcher la reconstitution du brin d'ADN après le clivage, inhibant la synthèse correcte de l'ADN.

La topoisomérase de type II a le même mode d'action que la topoisomérase de type II, mais dans ce cas, elle **coupe les deux brins** de l'ADN. La présence d'inhibiteurs de topoisomérase de type II (téniposide, Figure 1.10) empêche la reconstitution des deux brins d'ADN, après le clivage. La coupure ainsi maintenue de l'ADN interrompt le cycle de la division cellulaire et conduit à la mort de la cellule.



Irinotecan **Teniposide**

Figure 1.10 *: Exemples d'inhibiteurs de topoisomérases I et II.*[8]

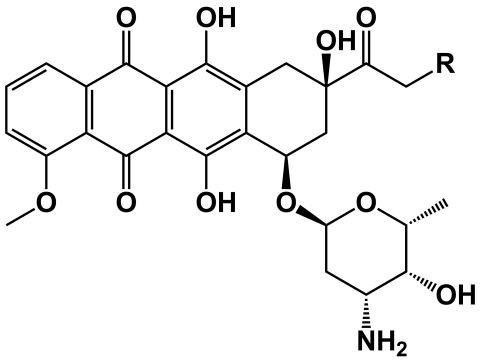
1.4.3. Les antibiotiques cytotoxiques.

Cette classe de molécules regroupe des composés d'origine naturelle produits principalement par des bactéries du genre *Streptomyces*. Leurs applications sont extrêmement variées et ne s'arrêtent pas qu'au champ de la lutte contre le cancer. Ils sont également utilisés contre le SIDA ou la malaria par exemple. Nous nous arrêterons ici à la présentation de trois types d'antibiotiques cytotoxiques et de leurs modes d'action : les anthracyclines, la bléomycine et la mitomycine C.

1.4.3.1. Les anthracyclines.

8 R.B. Silverman, *The organic chemistry of drug design and drug action*, Elsevier **2004**, 346-353.

Les anthracyclines sont des dérivés naturels d'anthraquinone, la première anthracycline découverte, la daunorubicine, ainsi que la plus connue, la doxorubicine (Figure 1.11).



Daunorubicine (R = H)
Doxorubicine (R = OH)

Figure 1.11 *: Daunorubicine et doxorubicine.*

Ces composés agissent sur les fonctions cellulaires de trois façons[9] :

- en tant qu'**intercalant de l'ADN**, les anthracyclines peuvent inhiber la réplication ou la transcription de l'ADN,
- par transfert électronique au sein de la cellule, ces molécules peuvent entraîner la **formation de radicaux hydroxyles** (HO·), espèces très réactives qui détruit l'ADN,
- enfin, un troisième mécanisme suggère la formation de **complexe anthracycline - fer(III)** qui conduit lui aussi à la formation de radicaux hydroxyles. De plus, ce complexe a une très grande affinité pour l'ADN.

C'est probablement ce « triple » mode d'action qui permet aux anthracyclines d'être d'excellents agents anticancéreux. Cependant, leur cardiotoxicité est élevée, limitant ainsi leur utilisation en chimiothérapie.

1.4.3.2. La bléomycine.

9 D.A. Gewirtz, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727.

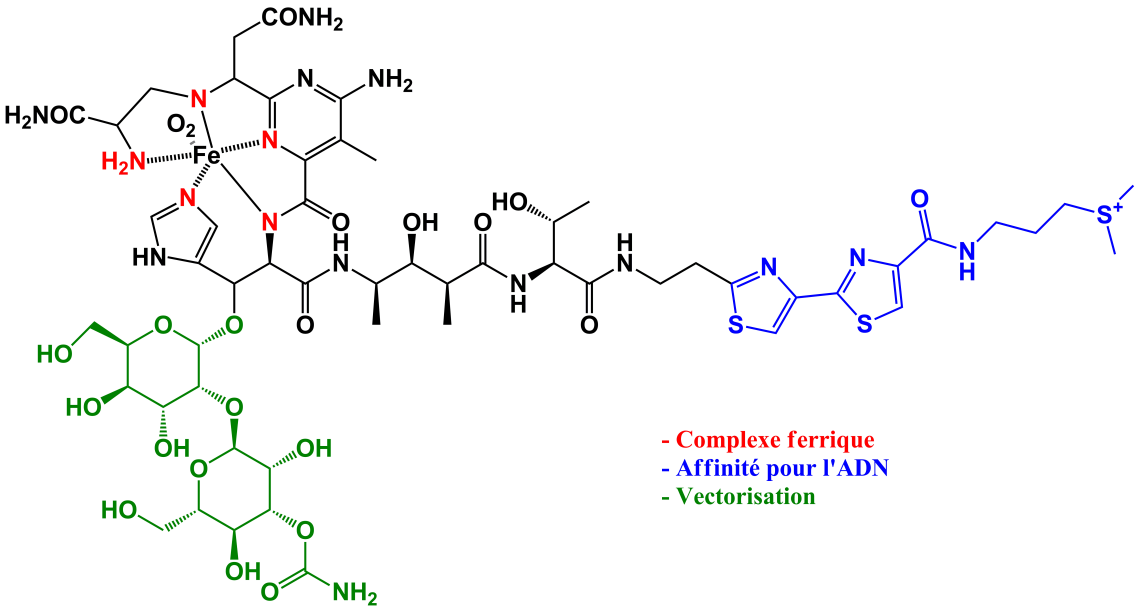
Issue de la souche *Streptomyces verticellus*, la bléomycine[10] agit principalement sur l'ADN en coupant sélectivement les sites 5'-GC et 5'-GT[11]. Son mode d'action fait intervenir le fer(II) et l'oxygène, en formant un complexe très stable (Figure 1.12). Ce complexe va ensuite initier une succession de réaction radicalaire qui coupe l'ADN. L'efficacité de cet agent anticancéreux provient de sa structure unique, dont on peut distinguer trois parties[12] (Figure 1.12) :

- une partie pyrimidine/aminoalanine/hydroxyimidazole, lui permettant de former un complexe avec le fer(II),
- la partie bisthiazole/alkyl-sulfonium, qui augmente grandement son affinité pour l'ADN,
- la partie disaccharidique (gulose/mannose), qui pourrait être responsable de son accumulation dans certaines cellules cancéreuses.

10 H. Umezawa, Y. Suhara, T. Takita, K. Maeda, *J. Antiobiot. Ser. A*. **1966**, *19*, 210.

11 (a) J. Stubbe, J.W. Kozarich, W. Wu, D.E. Vanderwall, *Acc. Chem. Res*. **1996**, *29*, 322 ; (b) L.F. Povirk, Y.-H. Han, R.J. Steighner, *Biochemistry* **1989**, *28*, 5808 ; (R.J. Steighner, L.F. Povirk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8350

12 J. Stubbe, J.W. Kozarich, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1107.



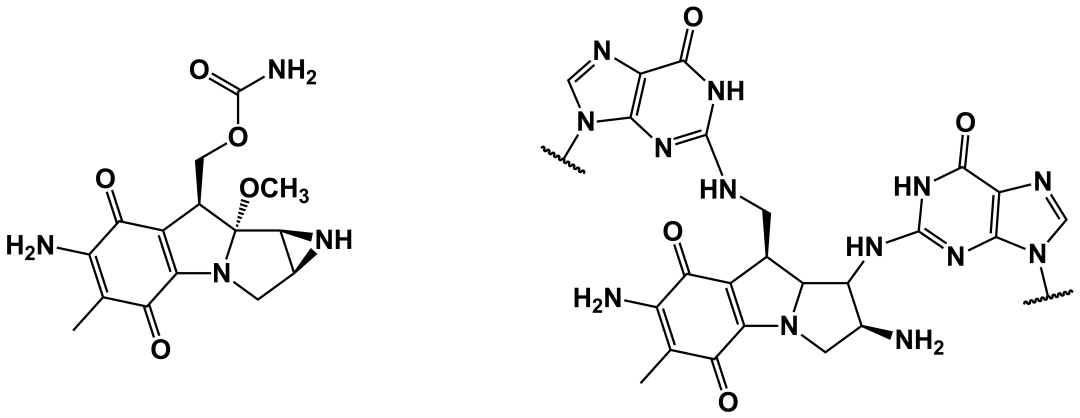
Complexe ferrique de la bléomycine

Figure 1.12 *: Structure de la bléomycine et de son complexe avec le fer(II).*

Utilisée depuis les années 70, la bléomycine est un agent anticancéreux efficace, mais son utilisation peut entraîner de graves problèmes pulmonaires, du fait de la grande concentration en fer et en oxygène dans cet organe.

1.4.3.3. La mitomycine C.

La mitomycine C est un agent alkylant bifonctionnel. Relativement inerte, cette molécule nécessite une réduction chimique ou enzymatique de sa partie quinone afin de générer l'entité active.[13] Elle subit alors une série de réarrangements et de réactions complexes pour conduire à l'alkylation des groupements N^2-amino de deux guanines de la chaîne d'ADN.[14] Le pont intercaténaire formé altère définitivement l'ADN et empêche son ouverture lors de la réplication ou de la transcription (Figure 1.13).



Mitomycine C **Pont intercaténaire**

Figure 1.13 *: Mitomycine C et formation d'un pont intercaténaire dans l'ADN.*

1.4.4. Les agents alkylants.

Cette dernière classe de composés rassemble des molécules, principalement de synthèse, capables d'introduire une ou plusieurs chaînes alkyles dans la molécule d'ADN. Historiquement, ce sont les substances les plus anciennement utilisées dans la lutte contre le cancer en chimiothérapie. Les agents alkylants les plus utilisés sont les sels de platine, les nitroso-urées et les moutardes à l'azote.

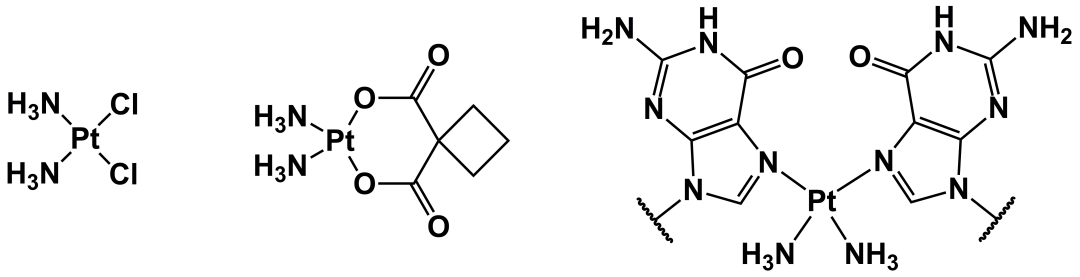
1.4.4.1. Les sels de platine.

Les sels de platine, tels que le cisplatine ou le carboplatine[15] (Figure 1.14), sont utilisés dans le traitement de nombreuses tumeurs solides (mélanomes, glioblastomes, cancer

13 H.W. Moore, *Science* **1977**, *197*, 527.

14 D.M. Noll, T. McG. Mason, P. S. Miller, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 277-301

du foie ...). Ces composés sont à l'origine de ponts intracaténaires au sein de l'ADN, en réagissant principalement avec les bases puriques sur leur position 7.

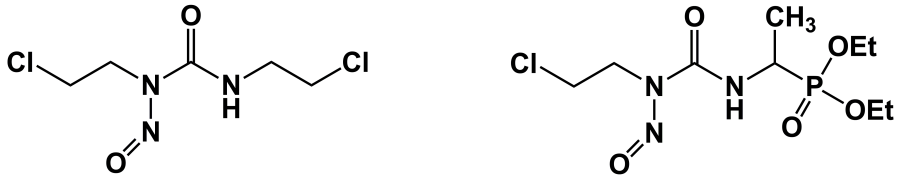


Cisplatine **Carboplatine** **Pont intercaténaire GG**

Figure 1.14 *: Cisplatine, carboplatine et pont intercaténaire dans l'ADN.*

1.4.4.2. Les nitroso-urées.

Assez répandus dans le traitement des cancers du cerveau, les nitroso-urées se caractérisent par une réactivité chimique importante. Leur structure comprend un groupement nitroso-urée auquel est liée une chaîne 2-chloroéthyle, comme par exemple dans la carmustine ou la fotemustine (Figure 1.15).



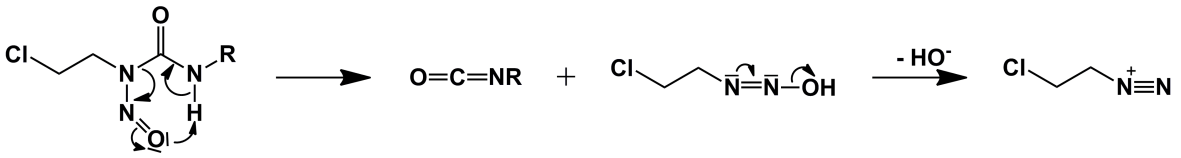
Carmustine **Fotemustine**

Figure 1.15 *: Carmustine et fotemustine.*

En milieu aqueux, le composé va subir une décomposition rapide, conduisant à la formation d'un isocyanate[16], qui pourra réagir sur diverses enzymes essentielles au fonctionnement de l'ADN, et à un sel de diazonium, réagissant rapidement sur un centre nucléophile de l'ADN (Schéma 1.1). L'alkylation va ensuite se poursuivre par la chaîne chloroéthyle, formant ainsi un pont intercaténaire au sein de l'ADN.

15 L. Brunton, K. Parker, D. Blumenthal, I. Buxton, *Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapteutics*, McGraw Hill **2008**, 867-868.

16 W.P. Tong, M.C. Kirk, D.B. Ludlum, *Cancer Res.* **1982**, *42,* 3102.



2-chloroéthyl nitroso-urée **Isocyanate** **Sel de diazonium**

Schéma 1.1 *: Décomposition des 2-chloroéthyl-nitroso-urées.*

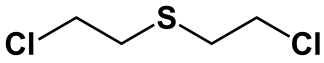
Bien qu'efficaces dans le traitement des cancers du cerveau, l'usage des nitroso-urées est limité par leurs effets secondaires, notamment une toxicité importante et prolongée vis-à-vis la moelle osseuse.

1.4.4.3. Les Moutardes à l'azote.

Les moutardes à l'azote tirent leur nom du gaz moutarde, un gaz de combat utilisé pour la première fois au cours de la Première Guerre Mondiale. Ce sont historiquement les premières molécules utilisées dans la lutte contre le cancer. Ils sont encore utilisés dans le cas de nombreuses maladies (leucémies, lymphomes non-Hodgkiniens, certains mélanomes ...).

1.4.4.3.1. Du gaz de combat au premier agent anticancéreux de synthèse.

Découvert à la fin du XIX^{ème} siècle, le sulfure de bis-2-chloroéthyle (Figure 1.16) fut employé comme gaz de combat pour la première fois par l'armée allemande en 1917, près d'Ypres (Belgique).



Sulfure de bis-2-chloroéthyle

Figure 1.16 *: Sulfure de bis-2-chloroéthyle ou gaz moutarde ou ypérite.*

Redoutable, mais peu mortel, le gaz moutarde provoque des lésions sur la peau aboutissant à la nécrose et une forte incapacité pulmonaire, handicapant les soldats pour plusieurs mois. Une forte exposition pouvait entraîner la mort. L'autopsie de ces soldats[17] a révélé d'autres effets inattendus du gaz moutarde : leucopénie (faible nombre de globules blancs), aplasie médullaire (fonctionnement défectueux de la moelle osseuse), tissus lymphoïdes dissous et ulcération gastro-intestinale. Ces lésions indiquent un effet important du gaz de combat sur toutes les cellules en division rapide. En 1931,[18] des tests ont été menés en injectant directement le sulfure de bis-2-chloroéthyle dans des tumeurs humaines, mais la toxicité du

17 E.B. Krumbhaar, H.D. Krumbhaar, *J. Med. Res.* **1919**, *40*, 497.

produit et sa faible solubilité dans l'eau en faisaient un très mauvais agent thérapeutique. Gilman et son équipe[19] synthétisèrent alors la méchloréthamine (Figure 1.17), remplaçant ainsi l'atome de soufre par de l'azote méthylé. C'est ce groupe fonctionnel, bis(2-chloroéthyl)amine, qui sera à la base de toutes les moutardes à l'azote. Les premiers tests cliniques se montrèrent positifs et, en 1946,[20] un premier traitement fut enfin disponible. Ces travaux marquent les débuts de la chimiothérapie des cancers.

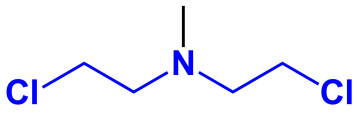


***Figure 1.17** : Méchloréthamine.*

1.4.4.3.2. Mécanisme d'action dans l'organisme.

La méchloréthamine est un composé stable à pH acide. Cependant au pH physiologique, ce composé subit une réaction de substitution nucléophile intramoléculaire qui aboutit à un composé cyclisé cationique, appelé ion aziridinium. Cette forme représente le véritable intermédiaire réactif, capable de réagir avec toute une série de centre nucléophile (Nu), entraînant l'ouverture du cycle aziridinium. Cet ensemble de réactions conduit au remplacement du chlore par une série de substrats à propriétés nucléophiles (-SH, -OH, $-NH_2$). Cette réaction peut se poursuivre avec la deuxième chaîne chloroéthyle (Schéma 1.2).

18 F.E. Adair, H.J. Baag, *J. Ann. Surgery* **1931**, *93*, 190.

19 L.S. Goodman, M.M. Wintrobe, W. Dameshek, M.J. Goodman, A. Gilman, M. McLennan, *J. Am. Med. Assoc.* **1946**, *132,* 126-132

20 A. Gilman, F.S. Philips, *Science* **1946**, *103*, 409-415.

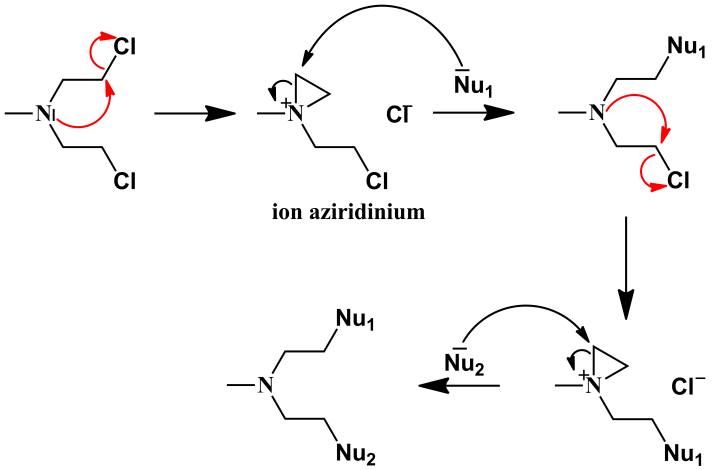
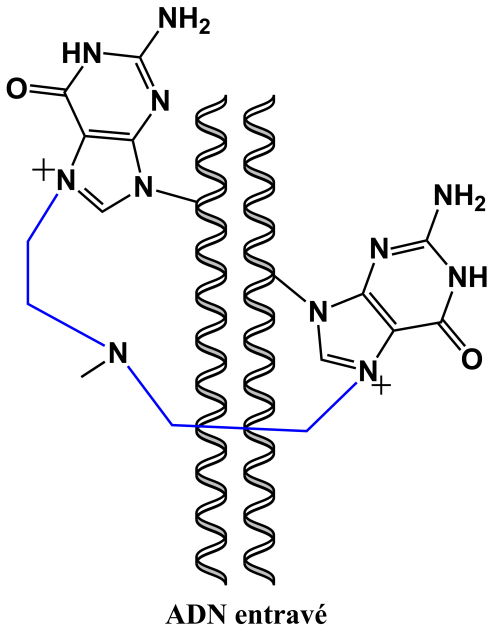


Schéma 1.2 *: Mécanisme d'alkylation par les moutardes à l'azote.*

Dans la cellule, cette alkylation intervient lors de la réplication de l'ADN, quand les deux brins sont séparés, exposant ainsi leurs sites nucléophiles à l'action alkylante. Les deux groupements alkylants[21] peuvent réagir avec, par exemple, l'azote en position 7 de deux guanines des deux brins de la chaîne d'ADN. Ce processus revient à rattacher les deux brins, formant un pont intercaténaire et empêchant l'ouverture de l'ADN lors de sa réplication (Figure 1.18).



ADN entravé

Figure 1.18 *: Alkylation de l'ADN, formation d'un pont intercaténaire.*

L'agent alkylant peut aussi se fixer sur deux groupements nucléophiles d'un même brin, résultant en un pont intracaténaire. Cette fixation revient alors à masquer cette partie de

21 R.B. Silverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Elsevier Academic Press **2004**, 354-355.

l'ADN et donc, empêcher l'accès aux enzymes nécessaires à son bon fonctionnement (Figure 1.19).

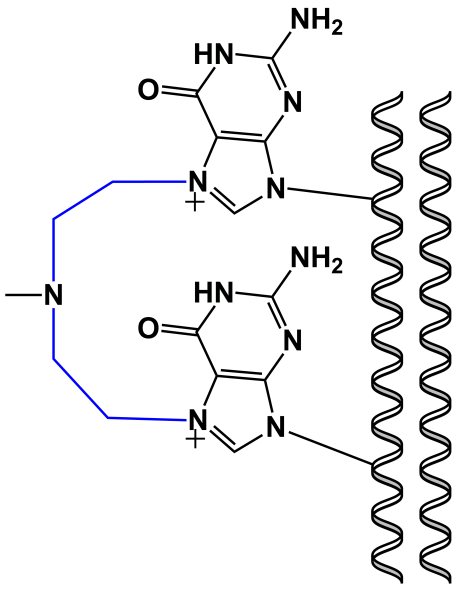


Figure 1.19 *: Alkylation de l'ADN, formation d'un pont intracaténaire.*

Ces guanines *N*-7 alkylées présentent une charge positive, ce qui les rend relativement instables, et peut conduire à deux nouvelles réactions. La première est le clivage de la liaison N-glycoside, se traduisant par une perte du pont formé. La deuxième réaction est une hydrolyse du groupement imidazole de la guanine conduisant à la formation d'une formamido-pyrimidine (FAPY), particulièrement résistante et qui stabilise le pont formé (Schéma 1.3).[22]

22 J.O. Ojwang, D.A. Grueneberg, E.L. Loechler, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 6529-6537.

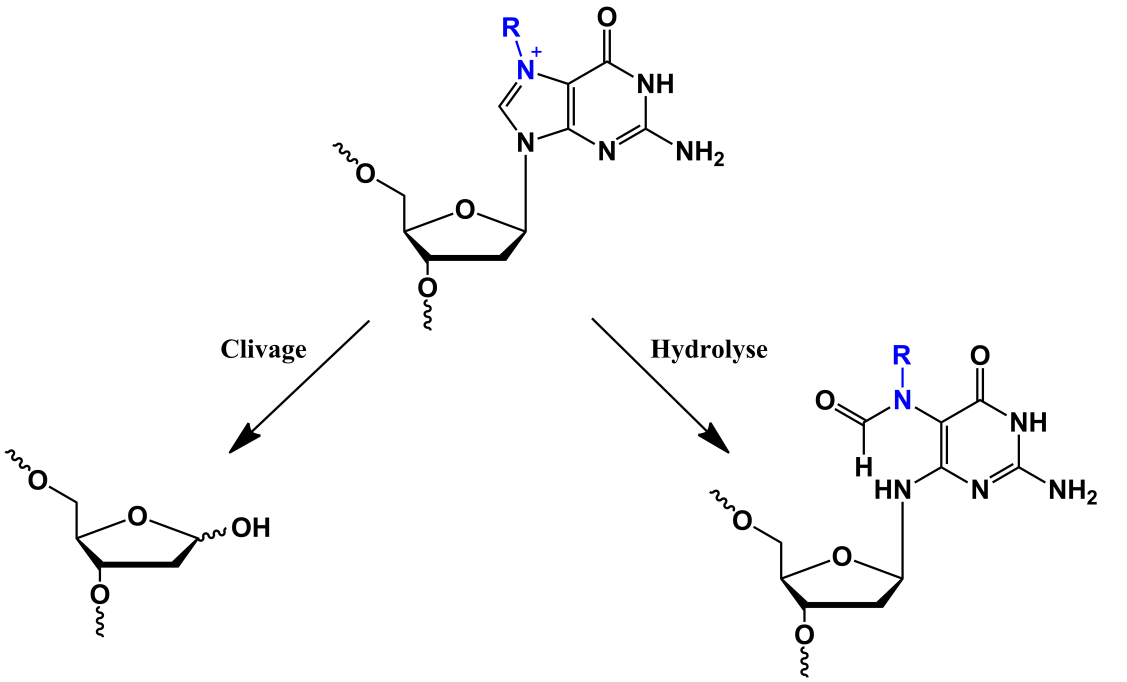


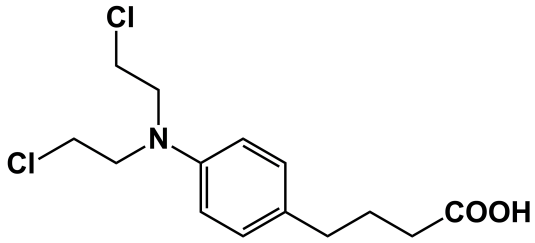
Schéma 1.3 *: Devenirs des guanines* N-*7 alkylées.*

1.4.4.3.3. Les dérivés des moutardes à l'azote.

L'utilisation de la méchloréthamine comme agent anticancéreux s'accompagne toutefois d'importants effets secondaires et d'une toxicité élevée vis-à-vis des tissus sains. La formation de l'intermédiaire aziridinium étant particulièrement rapide, elle peut réagir rapidement avec des éléments du sang et, finalement, seule une infime fraction atteint les tissus cancéreux pour y réaliser l'alkylation recherchée. Les travaux de recherches se sont alors orientés vers de nouvelles molécules, moins toxiques et avec un meilleur effet pharmacologique.

1.4.4.3.3.1. Le chlorambucil.

Dans les années 50, Ross et coll.[23] ont synthétisé un analogue arylé de la méchloréthamine, l'acide 4-[4-bis(2-chloroéthyl)aminophényl]butyrique, appelé couramment chlorambucil (CLB), en greffant le groupe actif bis(2-chloroéthyl)amine sur un support aromatique (Figure 1.20).



Chlorambucil (CLB)

Figure 1.20 *: Acide 4-[4-bis(2-chloroéthyl)aminophényl]butyrique ou chlorambucil.*

Dans ce cas, le noyau aromatique rend le doublet de l'azote moins disponible pour le phénomène de cyclisation. La vitesse de formation de l'ion aziridinium est donc diminuée, entraînant ainsi une baisse de la réactivité du produit. Ce dernier atteint sa cible thérapeutique avant la formation de l'espèce réactive. De plus, la présence de la chaîne butyrique permet une meilleure solubilité du produit dans l'eau.

Par la suite, Connors et coll.[24] ont démontré que le métabolite majeur du chlorambucil, issu de la β-oxydation de la chaîne butyrique, présente une forte activité antitumorale mais aussi une toxicité accrue vis-à-vis des tissus sains (Schéma 1.4).

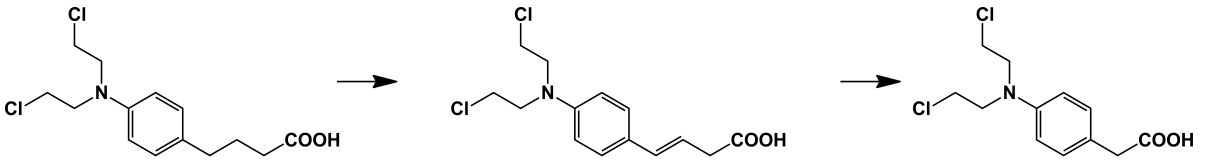


Schéma 1.4 *: Voie de métabolisation du chlorambucil.*

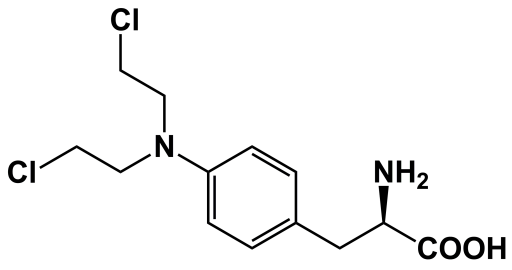
23J.L. Everett, J.J. Roberts, W.C. Ross, *J. Chem. Soc.* **1953**, 2386-2392

24 A. McLean, D. Newell, G. Baker, T. Connors, *Biochem. Pharmacol.* **1980**, 29, 2039-2047.

Le chlorambucil est encore utilisé à l'heure actuelle dans certains cas de leucémie lymphoïde chronique. Cette structure a inspiré bon nombre de chercheurs dans l'élaboration de nouvelles moutardes à l'azote.

1.4.4.3.3.2. Le melphalan.

Le melphalan a été synthétisé à partir de la L-Phénylalanine (Figure 1.21).[25] Cet acide aminé est en effet le précurseur de la mélanine, particulièrement surexprimée au sein des mélanomes. L'effet attendu était une concentration du melphalan dans ce type de cellules cancéreuses de la peau. En réalité, les tests ont montré une inefficacité totale du melphalan contre les mélanomes. Il reste cependant efficace, et même encore utilisé, dans le traitement de certains myélomes multiples.[26]



Melphalan

Figure 1.21 *: Melphalan.*

1.4.4.3.3.3. Le cyclophosphamide.

A la fin des années 50, Brock et son équipe synthétisèrent le cyclophosphamide. Le but était de diminuer la toxicité des moutardes à l'azote en synthétisant une prodrogue, chimiquement inactive, et qui libèrerait le principe actif uniquement au sein des cellules malignes, après réaction enzymatique. Pour ce faire, le groupement bis(2-chloroéthyl)amine a été lié au phosphore d'un cycle oxazaphosphorine. Ce groupement phosphamide est

25 F. Bergel, J.A. Stock, *J. Chem. Soc.* **1954**, 2409-2417.

26 D.T. Vistica, *Pharmacol. Ther.* **1983**, *22*, 379.

particulièrement électroattracteur et empêche toute formation de l'ion aziridinium. Le principe actif ne peut être « activé » que par désamination oxydative, mécanisme induit par voie enzymatique au sein des cellules (Schéma 1.5).[27]

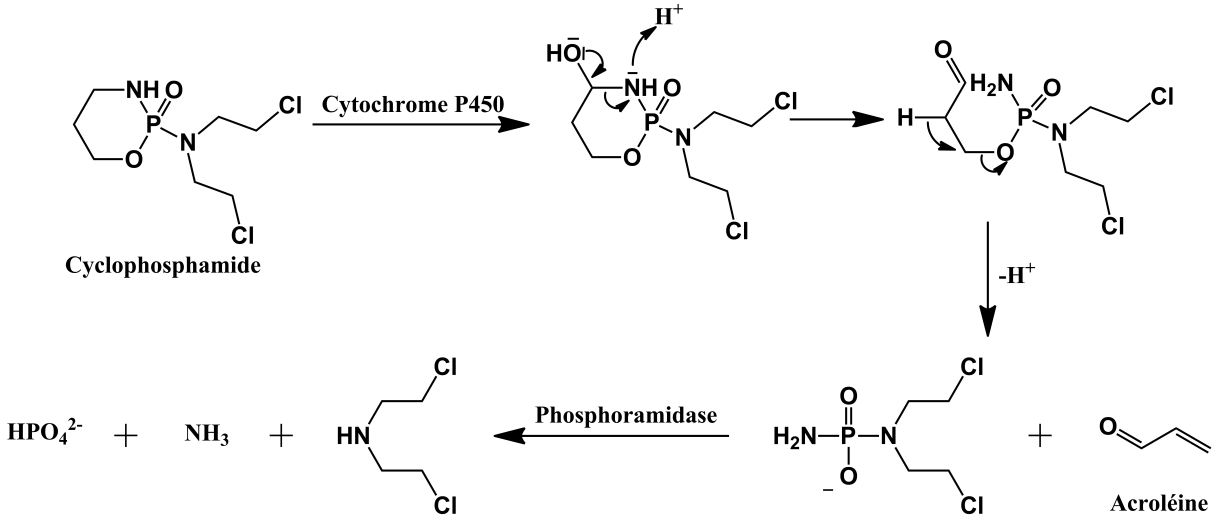


Schéma 1.5 *: Cyclophosphamide et mécanisme d'action au sein des cellules.*

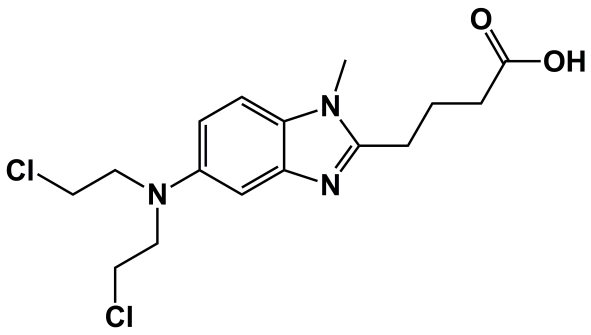
Plusieurs études ont montré que le cyclophosphamide était métabolisé par les cellules du foie et pas au sein des cellules cancéreuses, aboutissant à une hépatotoxicité, notamment par la formation d'acroléine, extrêmement toxique. Il semblerait que la sélectivité du cyclophosphamide pour les cellules cancéreuses soient due à des mécanismes de détoxification plus complexes, actifs dans les cellules normales (d'où une toxicité moindre pour les tissus sains) et défaillants dans bon nombre de cellules cancéreuses.

1.4.4.3.3.4. La bendamustine.

La bendamustine est une moutarde à l'azote synthétisée pour la première fois en 1963,[28] en reprenant le principe du chlorambucil, le groupement bis(2-chloroéthyl)amine est fixé sur un cycle aromatique, le benzimidazole. Ce dernier porte également une chaîne acide butyrique qui permet une bonne solubilité dans l'eau (Figure 1.22).

27 R.B. Silverman,*The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Elsevier Academic Press **2004**, 530-532.

28 W. Ozegowski, D. Krebs, *J. Prakt. Chem*. **1963**, *20*, 178-186.



Bendamustine

Figure 1.22 *: Structure de la bendamustine.*

Synthétisée en Allemagne de l'Est, et uniquement réservée aux pays du Bloc de l'Est, la bendamustine est devenue disponible dans toute l'Europe après 1993. De très nombreuses études cliniques ont été menées et ont conduit à des résultats intéressants. Elles ont montré que la bendamustine est un agent anticancéreux plus efficace et moins toxique que les autres moutardes à l'azote. De plus, la bendamustine a également montré une efficacité contre certains cancers résistants aux traitements classiques.[29] Cette efficacité proviendrait du cycle benzimidazole, conférant à la bendamustine les propriétés d'un analogue de base purique de l'ADN. Cette structure lui permettrait une interaction plus importante avec l'ADN, se traduisant par une stabilité des ponts formés par alkylation.[30] Cette molécule a d'ailleurs été autorisée récemment (2008) aux Etats-Unis pour le traitement de leucémie lymphoïde chronique (LLC) et dans le cas de lymphomes indolents résistants aux traitements classiques. L'Allemagne a, quant à elle, étendu son autorisation aux traitements des lymphomes non-Hodgkiniens (LNH) et des myélomes multiples (MM).

1.4.4.3.4. Les récentes avancées.

Ces dernières années, les chimistes organiciens ont travaillé à l'amélioration de l'efficacité des moutardes à l'azote par deux moyens : la conjugaison de moutardes à l'azote déjà existantes à d'autres composés ou bien l'élaboration de structures nouvelles.

1.4.4.3.4.1. Les conjugués de moutardes à l'azote.

29 B.D. Cheson, M.J. Rummel, *J Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 1492-1501.

30 A. Forera-Torres, M.N. Saleh, *Clinical Lymphoma & Myeloma* **2007**, *8*, 13-17.

La plupart des travaux menés lors de la dernière décennie porte sur la conjugaison de moutardes à l'azote déjà bien connues (chlorambucil, melphalan, bendamustine …) à d'autres molécules organiques avec pour but d'augmenter leur effet thérapeutique.

Dans cette optique, trois équipes[31] ont conjugué le chorambucil et ses analogues (*o*-nitro-chlorambucil, melphalan) à une partie stéroïdienne (Figure 1.23). Cette conjugaison a deux buts, cibler les tumeurs surexprimant certains récepteurs hormonaux (adénocarcinome du sein, cancer de la prostate …) et augmenter la lipophilie de l'agent anticancéreux, afin qu'il passe efficacement la membrane cellulaire. Les résultats des tests biologiques ont été particulièrement intéressants, la partie stéroïdienne a permis d'augmenter grandement la toxicité vis-à-vis des cellules cancéreuses surexprimant leurs récepteurs hormonaux, mais ces conjugués se sont aussi révélés efficaces contre d'autres types de cellules cancéreuses, confirmant ainsi l'intérêt d'augmenter la lipophilie de ces composés.

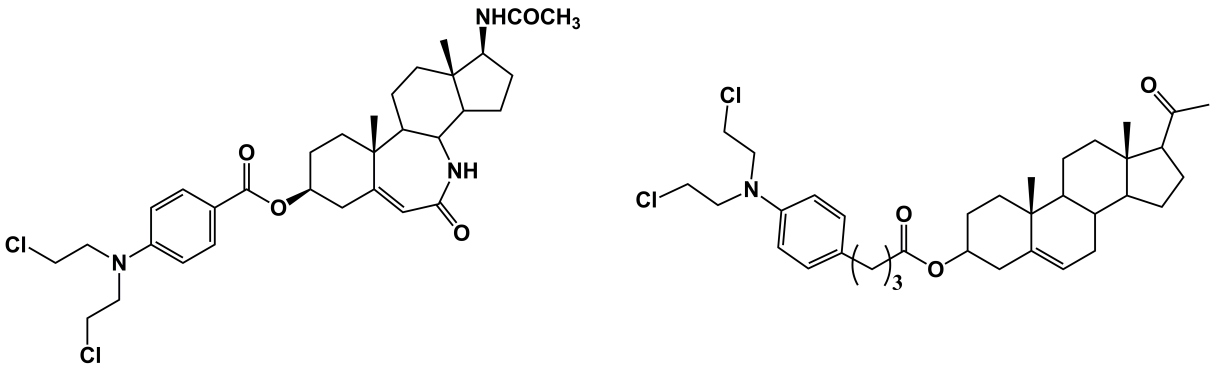


***Figure 1.23** : Conjugués de chlorambucil et de stéroïdes.*

D'autres travaux ont eu pour but de lier le chlorambucil ou ces analogues à des molécules le rapprochant de sa cible biologique, l'ADN. Le « transporteur », ayant une forte affinité pour l'ADN, permettrait donc à la moutarde à l'azote d'être « adressée » directement à l'ADN, sans se lier à d'autres éléments du sang ou de la cellule, phénomène responsable de nombreux effets secondaires et d'une perte d'efficacité du produit. On peut citer par exemple des « transporteurs » tel que les acridines et 9-anilinoacridines,[32] la distamycine A et ses

31 (a) J.C. Marquis, S.M. Hillier, A.N. Dinaut, D. Rodrigues, K. Mitra, J.M. Essigmann, R.G. Croy, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 779. (b) A.I. Koutsourea, M.A. Fousteris, E.S. Arsenou, A. Papageorgiou, G.N. Pairas, S.S Nikolaropoulos, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5207-5215.(c) L.A. Shervington, N. Smith, E. Norman, T. Ward, R. Phillips, A. Shervington, *Eur. J Med. Chem.* **2009**, *44*, 2944-2951.

32 N. Kapuriya, K. Kapuriya, H. Dong, X. Zhang, T.-C. Chou, Y.-T. Chen, T.-C. Lee, W.-C. Lee, T.-H. Tsai, Y. Naliapara, T.-L. Su, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1264-1275.

analogues,[33] la netropsine,[34] les amidines,[35] les quinolines[36] et les quinazolines.[37] Ces composés sont très souvent des agents intercalants de l'ADN ou des inhibiteurs de topoisomérases en tant qu'agents thérapeutiques isolés, leur affinité pour l'ADN est donc exploitée pour la conjugaison avec les moutardes à l'azote (Figure 1.24).

33 Y. Wang, S.C. Wright, J.W. Larrick, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 459-461.

34 P.G. Baraldi, R. Romagnoli, N. Bianchi, R. Gambari, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2381-2388.

35 K. Bielawski, A. Bielawska, and B. Poplawska*Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2009**, *342*, 484-490.

36 R. Kakadiya, H. Dong, A. Kumar, D. Narsinh, X. Zhang, T.-C. Chou, T.-C. Lee, A. Shah, T.-L. Su, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2285-2299.

37 B. Marvania, P.-C. Lee, R. Chaniyara, H. Dong, S. Suman, R. Kakadiya, T.-C. Chou, T.-C. Lee, A. Shah, T.-L. Su, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1987-1998.

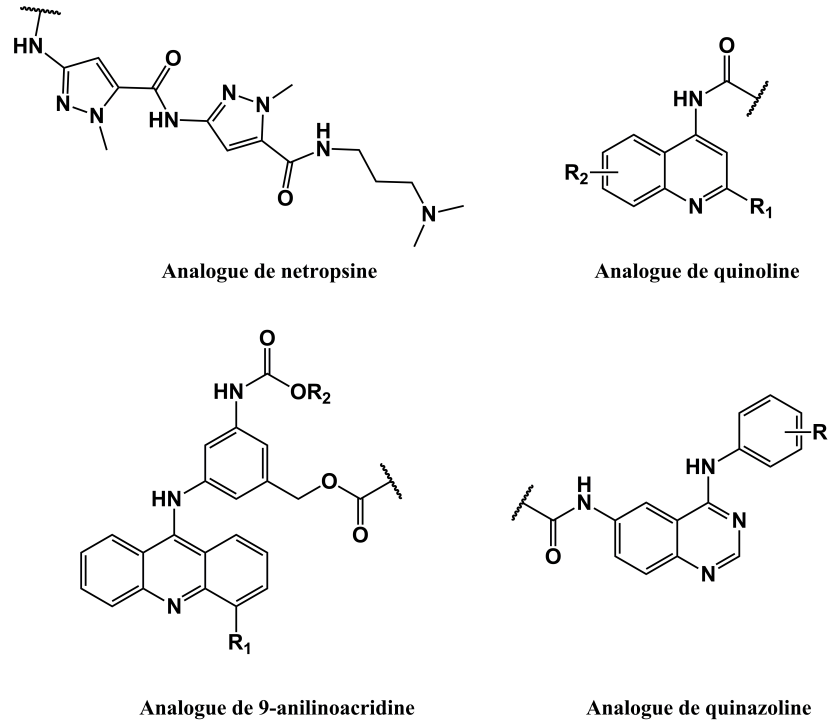


Figure 1.24 *: « Transporteurs » avec affinité pour l'ADN.*

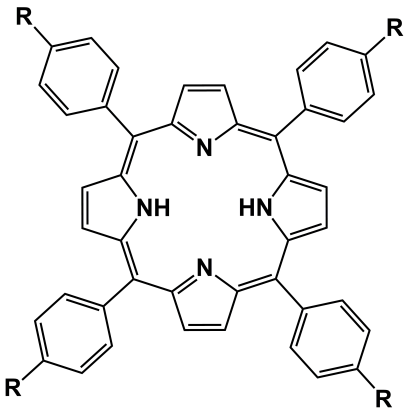
Tous ces travaux ont montré une augmentation de la cytotoxicité des produits portant ces « transporteurs », se traduisant par une CI_{50} bien plus basse que celle du chlorambucil (jusqu'à 1000 fois plus cytotoxique). Il en résulte une formation plus importante de pont intercaténaire au sein de l'ADN et, dans le cas des inhibiteurs de topoisomérases, il semble même qu'un effet de synergie entre les deux modes d'action soit observé.

1.4.4.3.4.2. Les nouvelles structures.

Récemment, quelques travaux ont porté sur l'élaboration de composés aux structures innovantes, intégrant la partie bis(2-chloroéthyl)amine à des composés à activité biologique reconnue. En 2004, Guo et coll.[38] ont travaillé sur la synthèse de moutardes à l'azote porphyrinique. Ils souhaitaient ainsi combiner la cytotoxicité des moutardes à l'azote aux porphyrines, qui sont cytotoxiques après irradiations lumineuses. Ce travail a conduit à la synthèse d'un large panel de composés (Figure 1.25) et les tests de cytotoxicité des composés se sont montrés prometteurs. En absence de lumière, les composés semblent particulièrement toxiques vis-à-vis de cellules du cancer du foie (bel-7404). Les auteurs attribuent ces résultats aux propriétés du cycle porphyrinique, agent intercalant de l'ADN. Ces composés n'ont

38 C.-C. Guo, R.-B. Tong, K.-L. Li, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2469-2475.

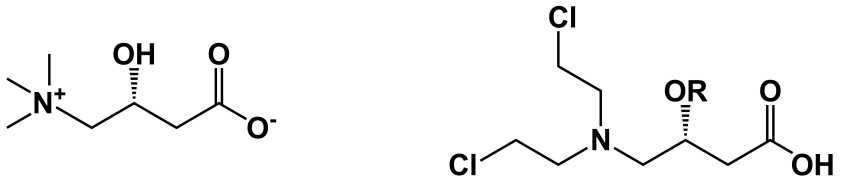
malheureusement pas encore été testés sous irradiation lumineuse, ne permettant pas ainsi de confirmer l'intérêt de combiner photothérapie dynamique et agents alkylants de l'ADN.



R = H ou $N(CH_2CH_2Cl)_2$

Figure 1.25 *: Porphyrines - moutardes à l'azote.*

Toujours dans l'optique d'associer vectorisation et moutarde à l'azote, l'équipe de Marc Lucas a élaboré des analogues de la L-carnitine, en substituant un groupement amine par une partie bis(2-chloroéthyl)amine (Figure 1.26).[39] La L-carnitine est un acide aminé jouant un rôle crucial dans le transport des acides gras au sein de la mitochondrie. Il constitue donc un composé intéressant pour vectoriser une moutarde à l'azote vers l'ADN mitochondrial. Ces chercheurs ont synthétisé plusieurs moutardes à l'azote, en alkylant la fonction alcool de la L-carnitine afin d'augmenter la lipophilie des composés. Ces dérivés ont montré une cytotoxicité importante contre des cellules des lignées A375 (mélanome) et MCF7 (cancer du sein) et ont prouvé leur efficacité contre une lignée particulièrement résistante de carcinome du colon (HT29).

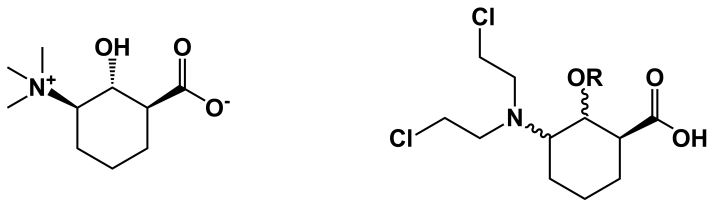


L-carnitine **R = H ou groupement lipophile**

Figure 1.26 *: Moutardes à l'azote analogues de la L-carnitine.*

39 L. Faissat, K. Martin, C. Chavis, J.-L. Montéro, M. Lucas, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 325-334.

Ces travaux se sont poursuivis par la synthèse d'analogue cyclique de la L-carnitine (Figure 1.27).[40] Dans ce cas, les résultats obtenus vis-à-vis des cellules A375 et H460 (adénocarcinomes) sont décevants, les molécules synthétisées étant moins actives que le chlorambucil.



Analogue cyclique de la L-carnitine **R = H ou groupement lipophile**

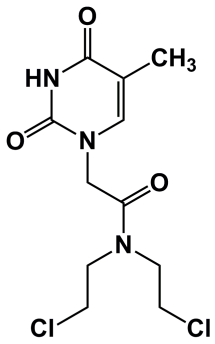
***Figure 1.27** : Moutardes à l'azote analogues cycliques de la L-carnitine.*

Des travaux réalisés au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles ont montré l'intérêt de combiner moutarde à l'azote et analogues de nucléosides ou de bases nucléiques. Un analogue de l'uridine, la 3-(2-chloroéthyl)uridine (ClEU) [41] et un acétamide dérivé de la thymine[42] ont été synthétisés (Figure 1.28). Lors de tests sur la viabilité cellulaire, ces dérivés ont montré des activités anticancéreuses intéressantes.

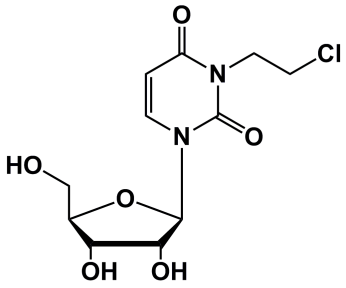
40 S. Leiris, M. Lucas, A. Dupuy d'Angeac, A. Morère, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4140-4148.

41 L. Colombeau, A. Hadj-Bouazza, V. Chaleix, R. Zerrouki, M. Kraemer, O. Sainte Catherine, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2008**, *27*, 110-120.

42 A. Hadj-Bouazza, K. Teste, L. Colombeau, V. Chaleix, R. Zerrouki, M. Kraemer, O. Sainte Catherine, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2008**, *27*, 439-448.



N,*N*-**bis(2-chloroethyl)-2-(thymin-1-yl)acetamide**



3-(2-chloroéthyl)uridine

Figure 1.28 *: Moutardes à l'azote analogues de la thymine et de l'uridine.*

1.5. Finalité du travail.

Dans la continuité des travaux menés au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, nous nous sommes intéressés à la synthèse de moutardes à l'azote aux structures variées.

Dans une première partie, afin d'étudier l'influence de la nature de la base pyrimidique sur l'activité biologique de l'acétamide précédemment préparé, nous avons synthétisé le dérivé à partir de l'uracile. Cette synthèse a été réalisée en trois étapes et nous a conduits à étudier tout particulièrement la réaction d'amidation directe entre un ester d'éthyle et une amine (Schéma 1.6). Une étude expérimentale a permis de généraliser cette méthode à d'autres types d'amines et une étude théorique, basée sur des calculs de chimie quantique, nous a apporté des réponses sur la chimiosélectivité de cette réaction.

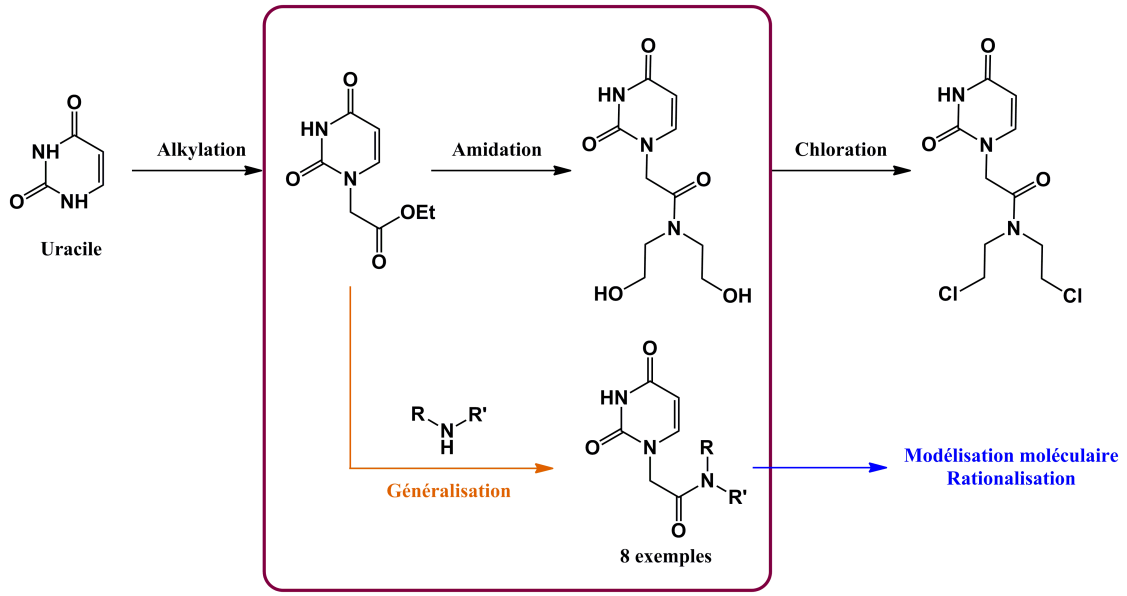


Schéma 1.6 *: Synthèse d'un acétamide dérivé de l'uracile et généralisation de l'étape d'amidation.*

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à la synthèse d'analogue de moutarde à l'azote à partir de deux bases puriques, la 6-chloropurine et la 2-amino-6-chloropurine. Les structures envisagées sont présentées dans la Figure 1.29.

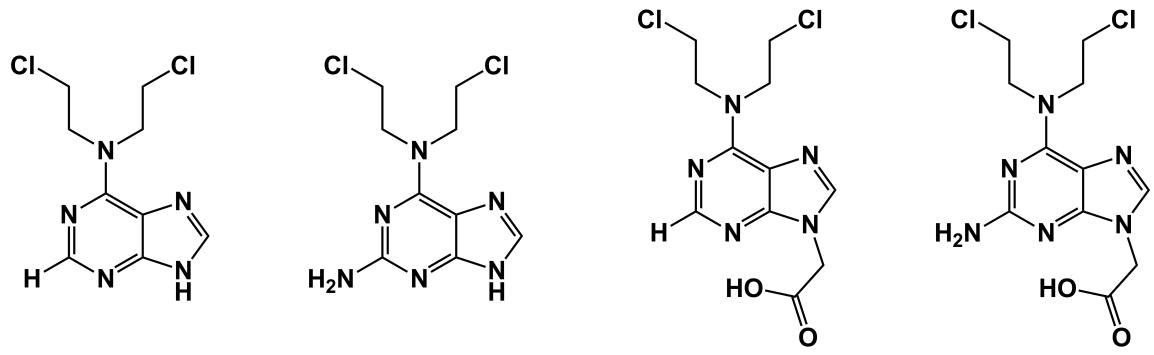


Figure 1.29 *: Structures proposées d'analogues puriques de moutarde à l'azote.*

Dans un troisième temps, nos efforts se sont orientés vers l'élaboration d'une nouvelle famille de moutardes à l'azote à motifs triazoliques. Le groupe bis-(2-chloroéthyle)amine est lié à diverses molécules d'intérêts biologiques par un lien triazole, permettant une grande variabilité de ce type de structure (Figure 1.30).

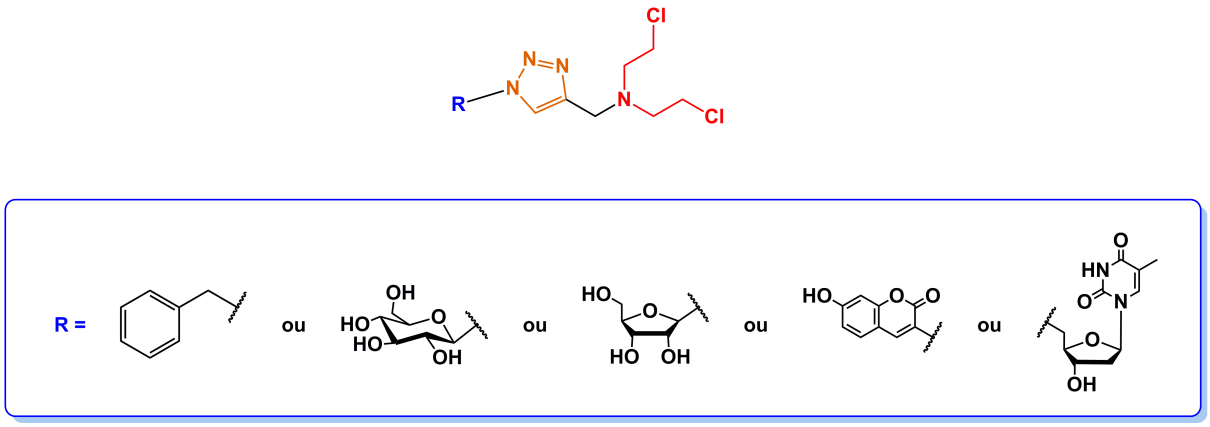


Figure 1.30 *: Moutardes à l'azote à motifs triazoliques.*

Enfin, dans le cinquième chapitre, certaines de ces molécules synthétisées ont été testées sur quatre lignées de cellules cancéreuses : JURKAT, K562, U266 et A431. Cette évaluation biologique passera par l'étude de la cytotoxicité de ces composés et leur impact sur le cycle cellulaire.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA SYNTHESE D'UN DÉRIVÉ PYRIMIDIQUE DE MOUTARDE

à l'azote

Lors de précédents travaux menés au sein de notre laboratoire, une moutarde à l'azote dérivée de la thymine, la *N,N*-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymin-1-yl)acétamide (Figure 2.1), a été synthétisée et a montré une activité anticancéreuse intéressante.

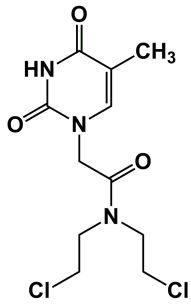


Figure 2.1 *:* N,N-*di-(2-chloroéthyl)-2-(thymin-1-yl)acétamide.*

Nous avons travaillé à la synthèse de l'analogue de ce composé, à partir de l'uracile, ceci afin de déterminer l'influence de la nature de la base pyrimidique sur l'activité biologique. La stratégie de synthèse adoptée est décrite dans la Schéma 2.1.

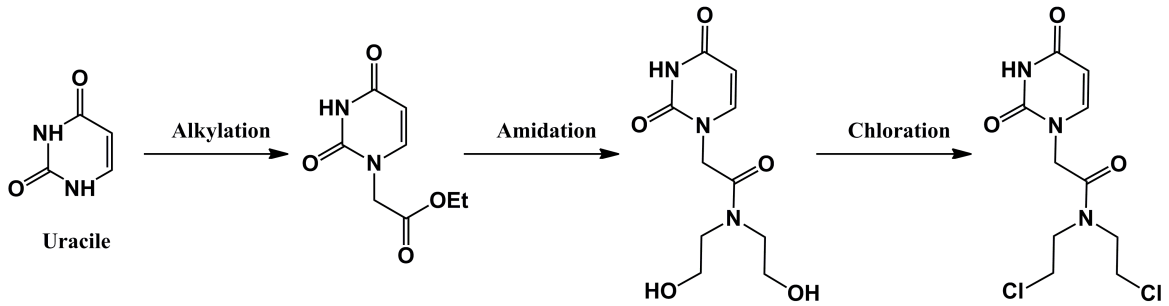


Schéma 2.1 *: Stratégie de synthèse du dérivé de l'uracile.*

L'uracile est tout d'abord alkylée puis couplée à la diéthanolamine et enfin les groupements hydroxyles sont substitués par des chlores.

Au cours de ce travail portant sur la synthèse de l'agent alkylant à partir de l'uracile, nous nous sommes attardés sur la mise au point de l'étape d'amidation directe. En effet, il s'agit de l'étape clé de cette voie de synthèse. Classiquement, cette dernière est réalisée en deux étapes à partir d'un acide carboxylique et d'une amine (Schéma 2.2). La première étape consiste à activer la fonction acide carboxylique en créant un ester actif,[43] c'est ce dernier qui est couplé à l'amine lors de la deuxième étape.[44,45]

43 P.G.M. Wuts, T.W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis* **2007**, John Wiley, New-York.

44 Z. Yan, W. Tian, F. Zeng, Y. Dai, *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 2727-2729.

45 C.A. Montalbetti, V. Falque, M. Park, A. Ox, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.

***Schéma 2.2** : Schéma général du couplage entre un acide carboxylique et une amine.*

L'activation des fonctions acide carboxylique est souvent réalisée en s'appuyant sur des réactifs utilisés en synthèse peptidique. L'acide est mis à réagir par exemple avec le dicyclohexylcarbodiimide (DCC), puis le composé activé est mis en présence du 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) ce qui permet la formation d'un ester plus réactif. Dans la littérature, cet ester peut être également obtenu par l'action de l'hexafluorophosphate de benzotriazolyloxy-tri-(diméthylamino)phosphonium (BOP) ou bien encore par l'hexafluorophosphate de benzotriazolyloxy-tri(pyrrolidino)phosphonium (PyBOP) avec des rendements similaires.[46,47]

Au cours de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude de cette amidation en une seule étape et sans activation préalable. Nous avons travaillé à sa mise au point et à sa généralisation avec différentes amines primaires et secondaires. Des calculs de modélisation moléculaire sont venus appuyer les résultats expérimentaux. Enfin, la moutarde à l'azote dérivée de l'uracile sera obtenue par réaction de chloration de cet intermédiaire

2.1. Alkylation de l'uracile.

La première étape de la synthèse consiste en l'akylation en position 1 de l'uracile par le bromoacétate d'éthyle, selon la méthode de Hadj-Bouazza et coll.[48] Dans un premier temps, la base est solubilisée dans le DMF anhydre et mise en présence de 1,2 équivalents de NaH, afin de former l'anion. Après trois minutes d'activation par irradiations micro-ondes à 100°C et 300 W, on injecte 1,1 équivalents de bromoacétate d'éthyle. On réalise à nouveau une activation, de neuf minutes cette fois-ci (Schéma 2.3).

46 B. Castro, J.R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron* **1975**, *14*, 1219-1222.

47 J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 205-208.

48 A. Hadj-Bouazza, K. Teste, L. Colombeau, V. Chaleix, M. Kramer, O. Sainte-Catherine, R. Zerrouki, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2008**, *27*, 439-448.

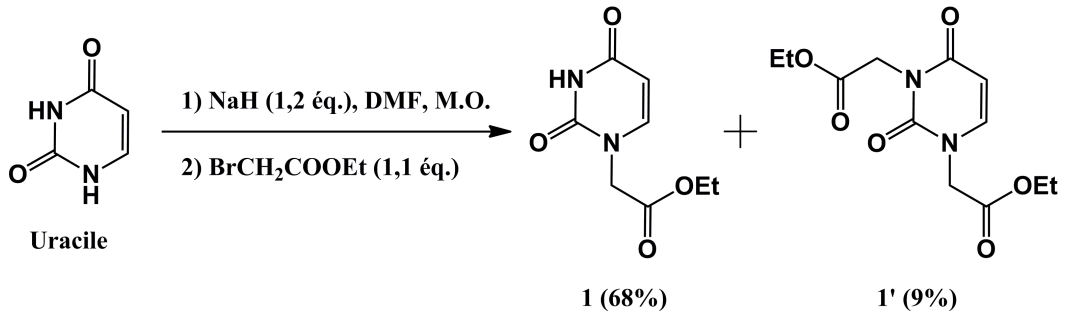


Schéma 2.3 *: Schéma général de l'alkylation de l'uracile.*

Le suivi de la réaction par CCM nous permet de l'arrêter dès l'apparition du produit de dialkylation (composé **1'**), l'uracile n'étant pas totalement consommée. On sépare le composé monoalkylé **1** du composé dialkylé **1'** par chromatographie.

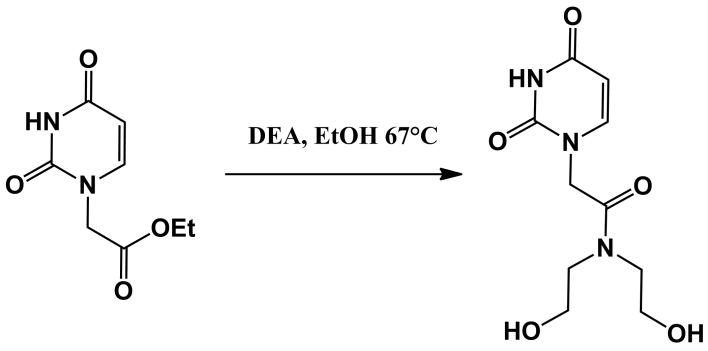
L'analyse par spectroscopie RMN du proton de l'uracile monoalkylé (composé **1**) confirme la fixation du groupement éthanoate d'éthyle en position 1, par la présence d'un singulet à 11,30 ppm correspondant au proton en position 3 du cycle pyrimidique. Plusieurs signaux correspondent au groupement éthanoate d'éthyle, un singulet à 4,45 ppm correspondant aux deux protons du groupe CH_2, ainsi qu'un quadruplet à 4,14 ppm et un triplet à 1,21 ppm correspondant respectivement aux protons CH_2 et CH_3 du groupement éthyle. On observe également un doublet à 5,61 ppm, correspondant au proton H-5 de l'uracile, ainsi qu'un doublet à 7,62 ppm correspondant au proton H-6. Le spectre RMN du carbone confirme cette fixation. L'analyse du spectre IR montre l'apparition d'une bande à 1720 cm^{-1} correspondant à la fonction ester.

2.2. Etude de la réaction d'amidation directe.

La réaction d'amidation directe étant particulièrement importante dans cette stratégie de synthèse, nous avons commencé par sa mise au point en utilisant la diéthanolamine. En effet, lors de travaux précédents réalisés au laboratoire, la réaction était réalisée en présence d'un large excès de diéthanolamine, ce qui entrainait une purification fastidieuse et constituait un frein à cette stratégie de synthèse.

2.2.1. Mise au point de la réaction d'amidation.

L'uracile alkylé est mis en présence de diéthanolamine (DEA) dans l'éthanol (Schéma 2.4). La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM).



1 **2**

Schéma 2.4 *: Schéma général de la réaction entre l'uracile* N-*1 alkylée et la diéthanolamine.*

Les résultats de l'étude de l'influence de la quantité de diéthanolamine et du mode d'activation sur la vitesse et le rendement de la réaction sont rassemblés dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 *: Etude de l'influence des conditions opératoires.*

Essai	DEA (éq.)	Mode d'activation	Temps (h)	Rendement (%)
1	10	Δ (67°C)	24	94
2	1,5	Δ (67°C)	96	80
3	1,2	Δ (67°C)	96	75
4	1,02	Δ (67°C)	144	90
5	1,02	Ultrasons	10	70
6	1,02	Micro-onde (200 W, 67°C)	13	55

Le premier essai a été réalisé en utilisant dix équivalents de DEA et un chauffage classique à 67°C, conditions précédemment utilisées au laboratoire. Au bout de 24 heures de réaction, on obtient le produit d'amidation avec un rendement de 94%, après purification sur colonne chromatographique. Comme nous l'avons précisé précédemment, la présence d'un large excès de diéthanolamine conduit à une purification complexe et longue. Les essais 2, 3 et 4 ont permis de mesurer l'influence de la quantité de DEA sur la vitesse de réaction et son rendement. La diminution de la quantité d'amine entraîne une augmentation du temps de réaction. L'utilisation d'une quantité quasi-stœchiométrique (1,02 équivalents) de diéthanolamine conduit à un très bon rendement de 90% mais a nécessité six jours de

réaction. Dans ces conditions, une simple recristallisation du brut réactionnel par l'éthanol permet d'obtenir le produit pur.

L'utilisation de l'activation par irradiations micro-ondes (essai 6) conduit à un rendement de 55% au bout de 13 heures de réaction, l'activation du milieu réactionnel se faisant par irradiations successives de 30 min. Malgré un résultat moyen au bout de 13 heures, la mise en place de cette méthode devient contraignante. La sonication conduit à un rendement de 70% au bout de 10 heures de réaction. Cette dernière permet de diminuer considérablement le temps de réaction tout en ayant un rendement acceptable. Dans ce cas, l'augmentation du temps de réaction n'a pas permis l'amélioration de ce rendement. Comparé au résultat obtenu par chauffage classique, le temps de réaction est bien plus faible, mais la présence de produits de départ et de diéthanolamine rend la purification plus difficile et nécessite une chromatographie sur gel de silice.

Pour la suite de cette étude, nous avons donc choisi le chauffage classique comme mode d'activation pour la facilité de purification du produit de réaction.

Contrairement à la littérature, nous avons effectué ce couplage « sans étapes d'activation préalable » avec un bon rendement de 90%, malgré un temps de réaction élevé. De plus, nous n'observons pas de réaction de transestérification, entre la fonction ester et les groupements hydroxyles de la diéthanolamine, montrant une étonnante chimiosélectivité de ce couplage.

2.2.2. Généralisation de la réaction d'amidation.

Afin de généraliser cette méthode d'amidation directe, nous avons réalisé cette réaction en utilisant une série d'amines primaires et secondaires, la diéthylamine, l'éthanolamine, la propargylamine, la *N*-propargyléthanolamine, l'aniline, la benzylamine et la *N*-benzyléthanolamine (Figure 2.2).

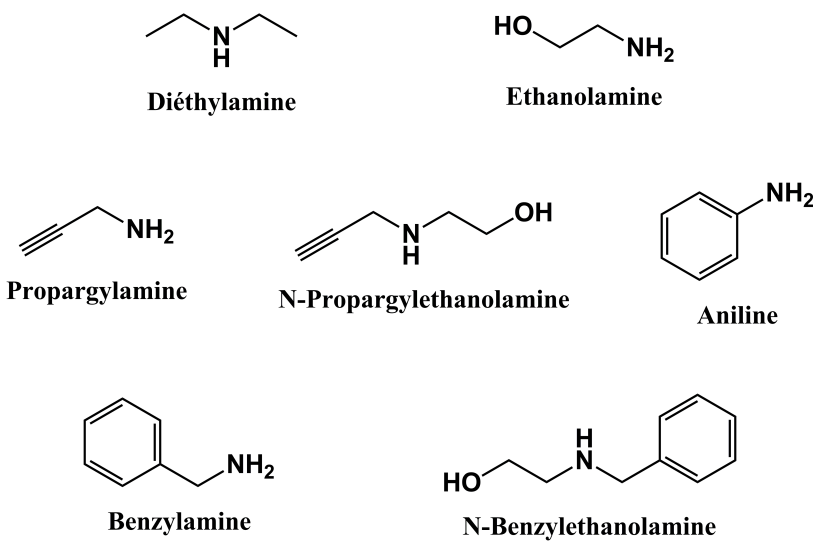
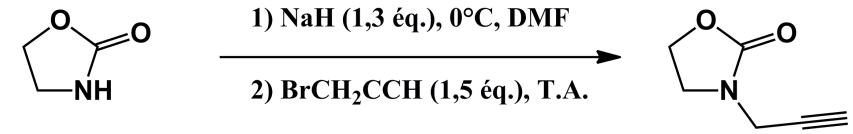


Figure 2.2 *: Amines primaires et secondaires utilisées.*

La *N*-propargyléthanolamine n'étant pas commerciale, nous avons, dans un premier temps, procédé à sa synthèse.

2.2.2.1. Synthèse de la *N*-propargyléthanolamine.

L'alkylation sélective de l'azote des aminoalcools est une étape très délicate. D'une part, la forte réactivité de ces derniers conduit très souvent à des amines polyalkylées et, d'autre part, cette réaction nécessite la protection de la fonction alcool (voire de l'amine dans certains cas) ou l'utilisation de systèmes peu conventionnels.[49] Des travaux réalisés au laboratoire, qui s'appuient sur les travaux de Simon et coll.[50] et Martn et coll.,[51] ont montré la possibilité de synthétiser simplement la *N*-propargyléthanolamine[52] en utilisant la 2-oxazolidinone comme substrat de départ ; les raisons étant une réactivité moindre de l'azote et une ouverture du cycle facile.



Oxazolidinone **3 (88%)**

Schéma 2.5 *: Synthèse de la N-propargyl-2-oxazolidinone.*

La réaction est réalisée dans le DMF anhydre à 0°C, en présence de 1,3 équivalents de NaH (à 60% dans de l'huile minérale). Cette première étape permet d'accroitre la nucléophilie de l'azote en formant l'anion correspondant. Après une heure à 0°C, on ajoute goutte-à-goutte 1,5 équivalents de bromure de propargyle dilués dans le DMF. Au bout d'une heure, la CCM montre que la réaction est terminée. Le brut réactionnel est évaporé à sec avant d'être purifié. Le composé **3** est obtenu avec un rendement de 88%.

49 R.N. Salvatore, A.S. Nagle, K. Woon Jung, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 674-683.

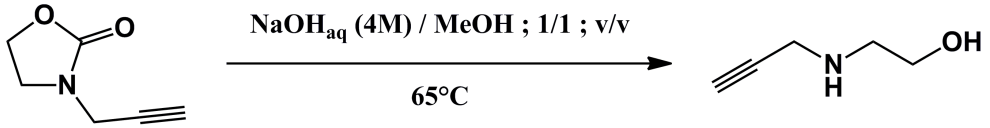
50 M.D. Simon, K.M. Shokat, *J. Am. Chem. Soc.* **2004,** *126*, 8078-8079.

51 R. Martn, C. Murruzzu, M.A. Perics, A. Riera, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2325-2328.

52 J. Vergnaud, P.-A. Faugeras, V. Chaleix, Y. Champavier, R. Zerrouki, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6185-6189.

L'analyse par RMN ^{1}H indique la présence de deux protons méthyléniques à 4,00 ppm couplés à un proton acétylénique à 3,32 ppm, ces signaux caractérisent le groupement propargyle. On observe également les signaux des protons méthyléniques de la 2-oxazolidinone à 4,30 et 3,56 ppm. L'analyse IR, quant à elle, confirme la propargylation par la présence de la bande à 2118 cm^{-1}, caractéristique de la fonction alcyne.

La deuxième étape consiste en l'ouverture du cycle suivie d'une décarboxylation pour conduire à la N-propargyléthanolamine. (Schéma 2.6).



3 **4 (90%)**

Schéma 2.6 *: Synthèse de la N-propargyléthanolamine.*

La N-propargyl-2-oxazolidinone est dissoute dans une solution de soude aqueuse (4 M) et de méthanol à volumes équivalents. Après deux heures à 65°C, l'analyse par CCM montre la disparition totale du produit de départ. Le produit **4** est alors obtenu par une simple extraction au chloroforme avec un rendement de 90%.

L'analyse par spectroscopie RMN ^{1}H montre toujours la présence des protons du groupement propargyle, et l'apparition d'un signal correspondant au proton de l'hydroxyle à 4,44 ppm. L'analyse par RMN ^{13}C confirme la disparition d'un atome de carbone. Enfin, la spectroscopie IR indique également la présence du groupement hydroxyle à 3395 cm^{-1}.

2.2.2.2. Résultats de la réaction d'amidation.

Comme précisé précédemment, nous avons réalisé les réactions d'amidation en utilisant l'uracile monoalkylée comme substrat de départ et en faisant varier la nature de l'amine (Schéma 2.7).

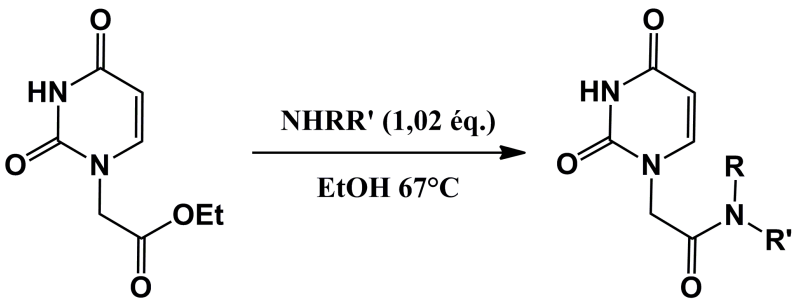
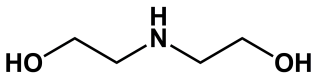
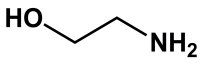
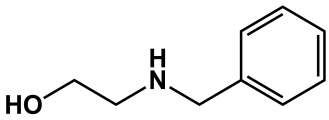
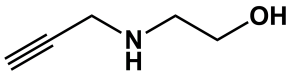
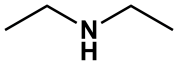
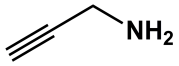
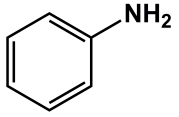
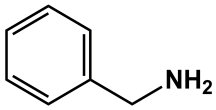


Schéma 2.7 *: Réaction d'amidation avec l'uracile N-1 alkylée.*

Les résultats obtenus avec les différentes amines choisies sont rassemblés dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 *: Généralisation de la réaction d'amidation directe.*

Essai	Amine	Produit	Temps (jours)	Rendement (%)
1		**2**	6	90
2		**5**	6	70
3		**6**	9	70
4		**7**	22	10
5		**8**	34	-
6		**9**	34	-
7		**10**	15	-
8		**11**	20	60

Conditions : 2-(uracil-1-yl)éthanoate d'éthyle (1 mmol), amine (1,02 mmol), EtOH, 67°C.

Nous avons tout d'abord utilisé des amines primaires ou secondaires portant un groupement hydroxyéthyle. L'utilisation de l'éthanolamine (essai 2) a conduit, au bout de six jours de réaction, au produit de couplage avec un rendement de 70%, plus faible que celui obtenu avec la diéthanolamine (essai 1). L'utilisation de la *N*-benzyléthanolamine (essai 3) conduit au produit **6** avec un rendement de 70% mais en un temps plus long de neuf jours. On observe dans ce cas, lors de l'analyse RMN, la présence de deux rotamères dans un ratio 70/30. L'utilisation de la N-propargyléthanolamine (essai 4) conduit à un rendement très faible de 10%. Après 22 jours de réaction, la CCM montre toujours la présence de l'uracile monoalkylé. Le produit **7** a été isolé par chromatographie sur colonne. L'analyse par spectroscopie de RMN de ce composé montre également la présence de deux rotamères, dans un rapport 70/30.

Le suivi par CCM de la réaction avec la diéthylamine (essai 5), dans les mêmes conditions, ne montre aucune évolution même après 34 jours de réaction. Le même résultat est observé avec la propargylamine (essai 6). Enfin, l'aniline (essai 7) ne réagit pas avec l'uracile monoalkylé.

Au vu de ces résultats, il nous a semblé que la présence du groupement hydroxyéthyle sur l'amine était nécessaire pour observer une évolution de la réaction, ce qui nous a conduits à formuler l'hypothèse selon laquelle le groupement hydroxyéthyle est impliqué dans un pont hydrogène qui stabilise le produit d'amidation.
Un dernier essai, utilisant la benzylamine (essai 8) a conduit, à notre grand étonnement, au produit **11** avec un rendement de 60% après 20 jours de réaction. Le suivi de réaction par CCM montre une évolution lente mais très claire de l'amidation.

Ce dernier résultat surprenant nous a conduits à réaliser une étude de modélisation moléculaire.

2.2.3. Etude de modélisation moléculaire.

Les calculs de modélisation moléculaire nous ont permis d'expliquer au mieux les résultats obtenus. Nous proposons ici quelques rappels théoriques avant de décrire les apports obtenus à l'échelle moléculaire.

2.2.3.1. Notions théoriques.

2.2.3.1.1. Généralités.

La modélisation moléculaire regroupe deux grands types de méthodes de calcul, en accord avec l'approximation de Born-Oppenheimer : le calcul des niveaux d'énergie et le calcul des fonctions d'onde. Ces calculs ne sont possibles que pour des systèmes à un électron. Pour une molécule, même de taille modeste, l'opération nécessite des approximations et une forte capacité de calcul. Born et Oppenheimer ont publié en 1927 une théorie permettant une première simplification de ces calculs. On peut interpréter cette approximation de la façon suivante : partant du principe que pour une même molécule le mouvement des noyaux est beaucoup plus lent que celui des électrons, il apparaît cohérent de découpler le mouvement de ces deux types de particules. Deux grands types de méthodologies découlent de cette approximation, la mécanique moléculaire et la chimie quantique.

Les méthodes de mécanique moléculaire s'intéressent au mouvement des noyaux. Utilisées pour la première fois en 1960, ces méthodes consistent à représenter les atomes comme des boules et les liaisons comme des ressorts (une molécule étant donc un assemblage de boules et de ressorts). Les forces internes à la structure considérée sont décrites par de simples fonctions mathématiques basées sur les équations de la mécanique classique (ou

mécanique de Newton). Les interactions électroniques sont prises en compte de manière globale, utilisant des potentiels d'interaction électrostatique classiques.

En mécanique moléculaire les calculs sont effectués à 0K et permettent d'optimiser la conformation autour d'un puits de potentiel donné. Si l'on introduit le paramètre température dans les équations, on réalise des dynamiques moléculaires, ce qui permet notamment de réaliser des analyses conformationnelles très complètes, même lorsque le degré de liberté du système moléculaire est grand.

Les méthodes de chimie quantique se focalisent sur le mouvement des électrons en considérant l'ossature des noyaux fixe pendant le calcul de l'énergie électronique. La mise en œuvre de ces méthodes nécessite des temps de calcul beaucoup plus longs que les méthodes de mécanique moléculaire. Cependant, elles constituent le seul moyen d'accéder à la structure électronique et donc à la réactivité des molécules. Nous avons essentiellement utilisé ces méthodes et nous proposons de nous attarder plus longuement sur leurs principes de base.

2.2.3.1.2. La chimie quantique.

Toutes les méthodes de chimie quantique ont un point commun, l'équation de Schrödinger du système moléculaire (indépendante du temps, donc considérée à l'état stationnaire):

$$\mathbf{H\Psi = E\Psi}$$

où H est l'opérateur Hamiltonien, E l'énergie et Ψ la fonction d'onde du système moléculaire. La fonction d'onde est décrite mathématiquement comme une combinaison de spinorbitales moléculaires, elles-mêmes décrites comme une combinaison d'orbitales atomiques. Pour résoudre cette équation pour des systèmes à plus d'un électron (systèmes multiélectroniques), de nombreuses approximations sont proposées. Dans de nombreux cas, la vitesse des électrons est considérée comme petite par rapport à celle de la lumière (approximation non-relativiste). Il existe de nombreuses autres approximations et nous nous proposons de lister certaines d'entre elles.

- Hartree-Fock (HF) :

Avec cette méthode, on néglige les termes de répulsion biélectroniques (exprimés dans l'opérateur Hamiltonien H). L'approximation de Hartree-Fock permet de remplacer le problème multiélectronique par un problème monoélectronique. Schématiquement, on

considère l'interaction d'un électron avec le reste du système comme une interaction moyenne. On remplace un système polyélectronique à n électrons par n systèmes monoélectroniques. Le terme *ab initio* (depuis l'origine) est souvent utilisé pour qualifier ce type de calculs. Pour ces méthodes, en effet, on résout l'ensemble des équations sans paramétrer les interactions ; la résolution est effectuée en choisissant une base de fonctions mathématiques choisie pour décrire les spinorbitales moléculaires. La base de calcul étant fixée, tout le calcul se déroule sans faire intervenir de nouveaux paramètres.

Néanmoins, cette méthode a démontrée de nombreuses faiblesses dans la majorité des systèmes électroniques étudiées. L'erreur la plus importante provient de la corrélation électronique attribuée au spin des électrons. La corrélation des électrons de spins parallèles constitue le terme d'échange ; celui-ci qui est très bien décrit dans le formalisme HF. La corrélation du mouvement des électrons de spins antiparallèles constitue à proprement parler le terme de corrélation électronique. Le problème principal de la méthode HF est que ce terme de corrélation n'est tout simplement pas pris en compte. La contribution énergétique due au terme de corrélation électronique est très faible, de l'ordre de 1% ; il s'agit pourtant d'un terme crucial pour prédire avec précision le comportement de nombreuses propriétés liées à la structure électronique.

Afin de corriger ce défaut majeur, d'autres types de méthodes ont été créés.

- Post Hartree-Fock (post-HF) :

Les méthodes post-HF permettent de calculer une partie de l'énergie de corrélation. On peut citer les méthodes de perturbation MPn (MP2…) ou d'interaction de configurations CI (CID…). Bien que très efficaces, ces calculs sont extrêmement coûteux en terme de temps-processeur et de mémoire utilisés.

- Density Fonctionnal Theory (DFT) :

Dans le cas de la DFT, le formalisme ne se base pas sur la fonction d'onde Ψ mais sur la densité électronique ρ. Le terme de corrélation est intrinsèquement inclus dans le formalisme. L'ensemble des interactions ainsi que des grandeurs mesurables telle que l'énergie, sont décrites comme des fonctions de ρ, elle-même fonction de Ψ. Une fonction de fonction étant une fonctionnelle, tous les termes d'interaction (e.g., termes d'échange et de corrélation) du formalisme DFT sont ainsi nommés. La recherche de la meilleure fonctionnelle a mérité une grande attention au cours de ces dernières années. Les

fonctionnelles dites pure-DFT (*e.g*. BLYP) ne donnent généralement pas des résultats très satisfaisants. L'un des problèmes vient de la mauvaise description du terme d'échange.

Au vu de la situation et sachant que HF donne une bonne description du terme d'échange, les développeurs ont proposé de décrire le terme de corrélation par une fonctionnelle DFT et le terme d'échange à l'aide du formalisme HF. Cette combinaison s'est avérée inefficace et très rapidement les fonctionnelles « hybrides » ont été développées.

- Fonctionnelles hybrides :

Introduites en 1993 par Axel Becke, il s'agit de méthodes mélangeant HF et DFT pour décrire le terme d'échange, et pure DFT pour le terme de corrélation électronique. Schématiquement, la méthode peut se décrire de la façon suivante :

$$\underbrace{\textbf{a\% de HF + b\% de DFT}}_{\textbf{Echange}} \quad + \quad \underbrace{\textbf{100\% de DFT}}_{\textbf{Corrélation}}$$

Par exemple, la fonctionnelle B3LYP utilise environ 30% d'échange HF et BHandHLYP introduit exactement 50% d'échange HF. Ces fonctionnelles marchent particulièrement bien et sont de nos jours largement utilisées avec succès par la communauté scientifique.

2.2.3.1.3. Les bases.

Dans les formalismes HF et DFT, les fonctions d'onde sont décrites par des orbitales moléculaires dont l'expression mathématique doit être approximée. L'ensemble de ces fonctions mathématiques se nomme la base. Il en existe plusieurs types mais les bases créées par John Pople (prix Nobel en 1998) sont les plus utilisées.

Les orbitales moléculaires peuvent être exprimées comme des combinaisons linéaires d'orbitales atomiques (LCAO pour l'acronyme anglophone). La forme rigoureuse des orbitales atomiques est donnée par des fonctions de Slater. Ces fonctions décroissent de manière exponentielle quand la distance par rapport au noyau augmente. Ces fonctions sont relativement difficiles à traiter mathématiquement, en particulier pour le calcul de leurs intégrales.

Les chercheurs (dont John Pople) ont alors cherché à approximer les fonctions de Slater, des combinaisons linéaires de fonctions gaussiennes (courbe en cloche) se sont avérées particulièrement efficace. Utiliser des fonctions de base gaussiennes accélère considérablement les calculs d'intégrale, comme les intégrales de recouvrement. D'une manière générale, plus la base est grande (i.e., plus le nombre de fonctions gaussiennes utilisées pour ces combinaisons linéaires est important), plus la précision de calcul est bonne.

Les bases peuvent être divisées en deux grandes catégories, minimale et étendue.

- Bases minimales :

Dans ce cas, chaque orbitale atomique est décrite par une seule fonction, combinaison linéaire de gaussiennes. Les bases minimales les plus courantes sont les bases STO-nG (Slater-Type Orbital-n Gaussians), où n est un entier représentant le nombre de fonctions primitives gaussiennes. De plus, aucune distinction n'est faite entre orbitales de cœur et orbitales de valence, elles sont toutes décrites par la même fonction. Ces bases ne sont quasiment plus utilisées et donnent des résultats peu concluants.

- Bases étendues :

Dans le cas des bases étendues (ou bases à valence séparée), les orbitales atomiques de cœur sont décrites par une seule fonction (comme en base minimale) tandis que les couches de valence sont décrites par deux fonctions ou plus. Les bases les plus utilisées (ou bases de Pople) sont notées X-YZ G, avec X représentant le nombre de gaussiennes décrivant les orbitales de cœur ; *Y* et *Z* indiquent que les orbitales de valence sont composées chacune de deux fonctions, la première étant composée d'une combinaison linéaire de *Y* fonctions gaussiennes primitives, la deuxième est une combinaison linéaire de *Z* fonctions gaussiennes primitives.

Par exemple : 6-311G signifie que chaque orbitale atomique de cœur est décrite par une fonction combinaison linéaire de six gaussiennes, et chaque orbitale atomique de valence est décrite par trois fonctions (base triple-dzeta), la première est une combinaison linéaire de trois gaussiennes et les deux autres sont chacune une fonction gaussienne.

D'autres fonctions gaussiennes peuvent être rajoutées afin de mieux décrire les systèmes électroniques. On trouve entre autre les fonctions de polarisation, qui permettent de donner plus de précision à la densité électronique. Pour les atomes « lourds » dont les couches de valence sont du type s et p, les fonctions de polarisation sont de type d ou f. Pour les

atomes « légers » (atome d'hydrogène) dont les couches de valence sont de type s, les fonctions de polarisation sont de type p, d ou f. L'utilisation de ces fonctions permet de « casser » la symétrie parfaite introduite par les fonctions gaussiennes, symétrie artificiellement trop importante pour autoriser une certaine flexibilité dans la description des structures électroniques.

Par exemple, 6-31G(d,p) est une base double-dzeta à laquelle des fonctions polarisations d et p sont utilisées sur les atomes lourds et d'hydrogène, respectivement.

Enfin, ces bases peuvent être complétées par des fonctions diffuses notées + ou ++. Pour améliorer la description des effets électroniques loin du noyau (polarisation et délocalisation des électrons), on ajoute des fonctions gaussiennes diffuses i.e., aplaties au maximum de la fonction (centre) et étendues loin du centre. Le premier + signifie que l'on introduit des fonctions diffuses pour les atomes « lourds » (autre que H et He) et ++ pour tous les atomes sans distinction (exemples : 6-31+G(d,p) ; 6-31++G(2d,3pd)).

2.2.3.2. Méthodologie.

L'ensemble des calculs a été réalisé avec le programme Gaussian09. Une recherche conformationnelle des réactants et produits a été réalisée. Les effets de solvant ont été pris en compte par des modèles implicites de type PCM (polarizable continuum model) dans lesquels les molécules sont placées dans une cavité entourée d'un continuum diélectrique caractérisé par sa constante diélectrique (ε = 24,852 pour l'éthanol). Les conformations les plus stables ont été optimisées dans le formalisme DFT avec la base 6-31+G(d,p). Le calcul des propriétés thermodynamiques (enthalpies et énergies de Gibbs standards ΔH^0 et ΔG^0) a été réalisé après l'analyse de l'ensemble des modes de vibration à 298 K pour les réactants et les produits :

$$\mathbf{\Delta H^0 = H^0(produits) - H^0(réactants)\ ;\ \Delta G^0 = G^0(produits) - G^0(réactants).}$$

Afin de définir la fonctionnelle la plus appropriée à cette étude, un large panel de fonctionnelles représentatives a été testé. Les énergies de Gibbs standard de formation (ΔG^0) calculées pour les différents produits de couplage ont été comparées aux rendements obtenus. Les différents résultats issus de ces calculs sont présents en annexes.

Nous avons tout d'abord évalué l'influence du pourcentage d'échange HF. La corrélation LYP a été choisie et les fonctionnelles suivantes ont été testées : BLYP (0% HF), B3LYP (30% HF)

et BHandHLYP (50% HF). A titre de comparaison, un calcul HF a également été réalisé. Comme nous pouvons le constater avec l'exemple de la fonctionnelle BHandHLYP (Figure 2.3), l'ensemble de ces méthodes ne permettent pas de corréler les énergies de Gibbs et les rendements observés ; des valeurs positives de ΔG^0 sont même obtenues dans le cas de composés de rendements élevés (tout particulièrement dans le cas du composé **2**, 90%).

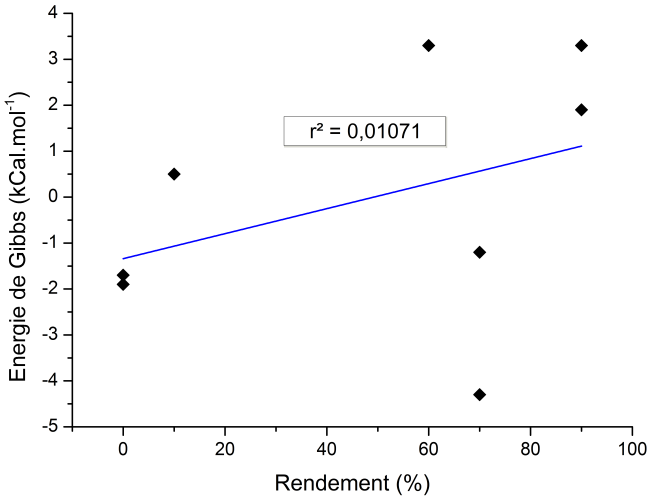


***Figure 2.3** : Corrélation ΔG^0 calculées – Rendements avec la méthode BHandHLYP.*

Cette mauvaise corrélation est confirmée avec d'autres fonctionnelles hydrides, utilisant d'autres fonctionnelles de corrélation, notamment B3P86 (30% d'échange HF).

Au vu de l'importance des interactions longue distance (pont H et π-stacking) dans les composés étudiés, des fonctionnelles incluant des termes d'interaction longue distance ont été utilisées (CAM-B3LYP, ωB97X, ωB97XD).

La fonctionnelle CAM-B3LYP propose des paramétrisations différentes selon que l'on s'intéresse aux interactions proches ou éloignées du noyau. Toutefois, cette fonctionnelle semble encore mal décrire les effets stabilisants ce type de structure (Figure 2.4).

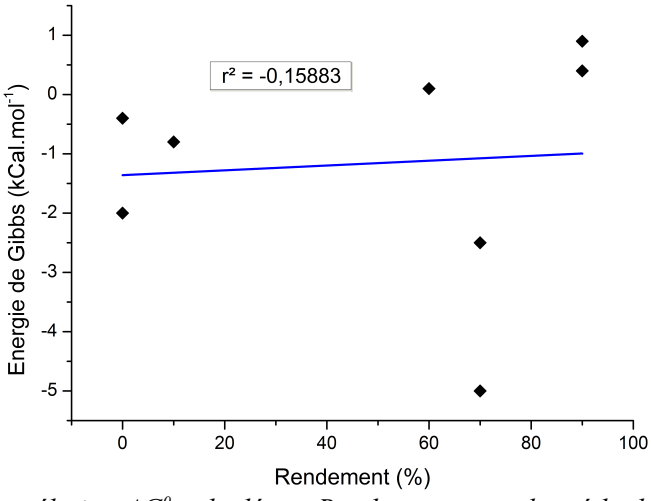


***Figure 2.4** : Corrélation ΔG^0 calculées – Rendements avec la méthode CAM-B3LYP.*

Les fonctionnelles ωB97X et ωB97XD utilisent, elles aussi, des termes séparés de courte et longue interactions. La fonctionnelle ωB97XD a récemment été développée (2007) et elle inclue en plus un terme d'énergie de dispersion (D). Les auteurs recommandent l'utilisation de cette dernière fonctionnelle pour décrire au mieux les interactions faibles, tout en conservant une bonne description des interactions courte distance.[53] La robustesse du paramétrage de ωB97XD a également été validée sur une série de molécules dont la stabilité est partiellement attribuée aux interactions non-covalentes.[54]

Dans notre cas, on constate l'importance de ce terme dispersif dans le calcul des énergies de formation des composés (Figure 2.5). On peut également constater que la fonctionnelle ωB97X décrit assez bien la stabilité des molécules comme les composés **2**, **5** ou **6**, où les ponts hydrogène semblent importants. Mais des cas, comme les composés **7** et **9** (alcynes) ou **11** (composé benzylé), montrent l'importance d'introduire les effets dispersifs dans cette fonctionnelle.

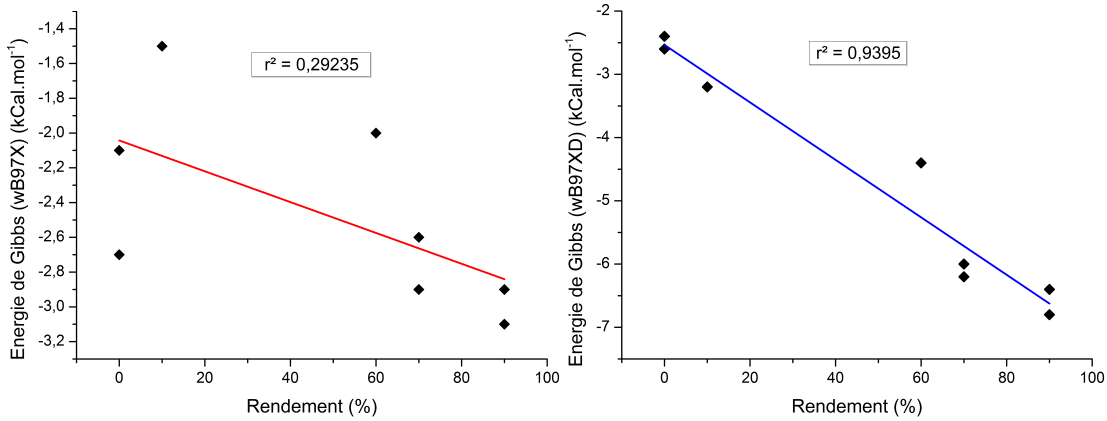


***Figure 2.5** : Comparaison des fonctionnelles ωB97X et ωB97XD.*

L'utilisation de ωB97XD conduit alors à une corrélation énergie / rendement particulièrement satisfaisante, avec un coefficient de corrélation voisin de 0,94 (Figure 2.5). C'est donc par cette méthode de calcul que nous avons poursuivi l'étude de la conformation des composés synthétisés.

2.2.3.3. Etude conformationnelle des composés synthétisés.

53 J.-D. Chai, M. Head-Gordon, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2008**, *10*, 6615-6620.

54 P. Jurecka, J. Cerny, P. Hobza, *Journal of Computational Chemistry* **2007,** *28*, 555-569.

Les numéros des molécules renvoient au Tableau 2.2. Les noms de composé **2a** et **2b** correspondent aux deux conformères de la molécule **2** (Figures 2.6 et 2.7). Les calculs sont réalisés avec la méthode (PCM)-ωB97XD/6-31+G(d,p).

Tableau 2.2. *: Energie de Gibbs standard de la formation des composés* ***2-11****.*

Molécules	ΔG° (kcal/mol) (Phase gazeuse)	ΔG° (kcal/mol) (solvant PCM)	Rendement (%)	Temps (jours)
2a	-4,9	-6,8	90	6
2b	-3,8	-6,4		
5	-4,8	-6,2	70	6
6	-4,8	-6,0	70	9
7	-1,9	-3,2	10	22
8	-1,1	-2,4	-	34
9	-1,7	-2,6	-	34
10	3,6	2,5	-	15
11	-2,8	-4,4	60	20

Les réactions de synthèse ont été réalisées sur des temps relativement longs permettant a priori d'atteindre les équilibres et les produits thermodynamiques. Ainsi nous nous attendons à une bonne corrélation avec les calculs de stabilité (ΔG^0).

Les conformères **2a** et 2**b** (qui proviennent du couplage entre l'uracile alkylée et la diéthanolamine) possèdent respectivement deux et une liaison hydrogène. Pour **2a**, la première liaison se forme entre l'un des hydroxyles et le carbonyle de la liaison amide, et l'autre entre le deuxième hydroxyle et le carbonyle en position 2 de l'uracile (Figure 2.6). Dans le cas de **2b**, un seul pont hydrogène est formé entre les deux groupements hydroxyéthyles (Figure 2.7).

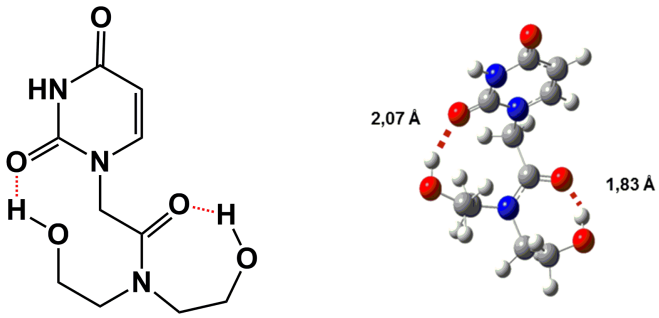


Figure 2.6 *: Conformère* ***2a****, deux ponts hydrogène.*

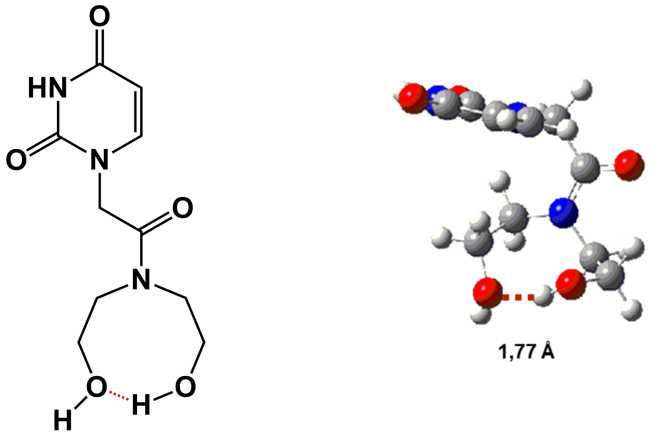


***Figure 2.7** : Conformère **2b**, un pont hydrogène entre les deux groupements hydroxyles.*

Dans le cas des molécules **5** (Figure 2.8) et **7** possédant un seul groupement hydroxyle, la liaison hydrogène se fait préférentiellement avec le carbonyle de la liaison amide car la distance est plus courte de 0,124 Å par rapport au carbonyle de l'uracile en position 2 (la liaison s'en trouve donc plus forte).

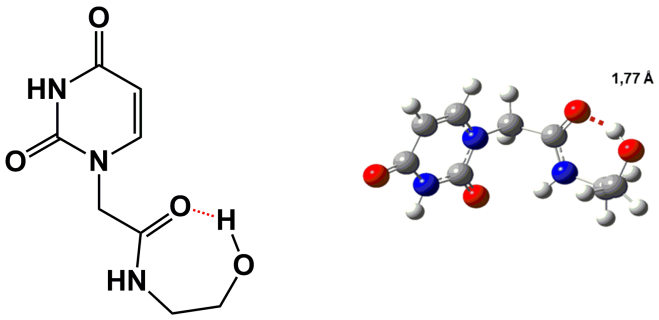


***Figure 2.8** : Molécule **5**, un pont hydrogène avec le carbonyle de la liaison amide.*

Pour les molécules **7** et **9**, la conformation obtenue montre un encombrement stérique de la fonction propargyle, ayant un effet défavorable sur la formation des produits. Dans le cas de la molécule **10** (couplage entre l'uracile monoalkylée et l'aniline), l'hypothèse selon laquelle la délocalisation du doublet de l'azote rend ce dernier peu disponible pour l'amidation a été confirmée. En effet, on constate que l'énergie de Gibbs est positive, et ce peu importe la méthode employée (Tableau 2.2) ; ceci tend à prouver que la réaction n'est pas possible.

Pour l'ensemble des composés précédemment décrits, nous confirmons l'importance des liaisons hydrogène pour décrire les stabilités relatives, corrélées aux rendements de formation.

En ce qui concerne la molécule **11** (qui provient du couplage entre la benzylamine et l'uracile alkylée), le fort rendement observé ne peut pas s'expliquer par la présence de liaisons

hydrogène. Dans ce cas, la molécule est stabilisée par une interaction longue distance de type π-stacking entre les deux cycles aromatiques (uracile et phényle) (Figure 2.9).

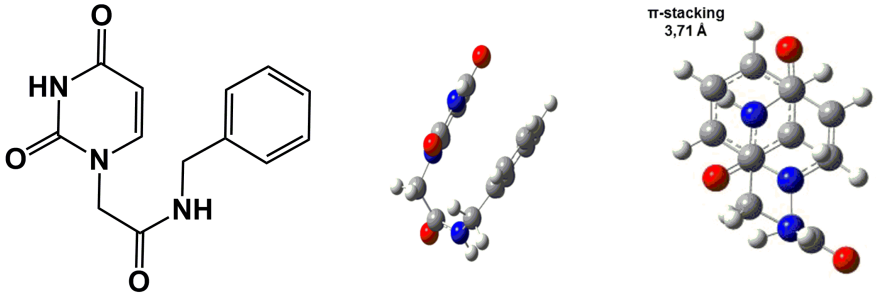


Figure 2.9 *: Molécule **11**, interaction longue distance de type π-stacking.*

Pour la molécule **6** (couplage entre la benzyléthanolamine et l'uracile alkylé), trois conformères quasi iso-énergétiques ont été trouvés : un conformère possédant une interaction de type π-stacking (uracile et phényle), un deuxième conformère possédant une liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle et le carbonyle de l'amide et enfin un dernier conformère comportant ces deux types d'interaction longue distance. Ce troisième conformère a été utilisé pour le calcul des ΔG^0 (Tableau 2.2 et Figure 2.10).

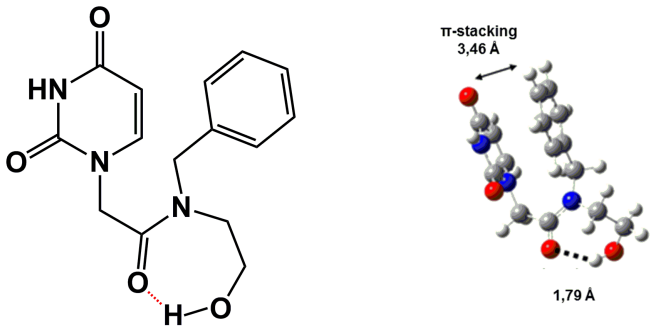
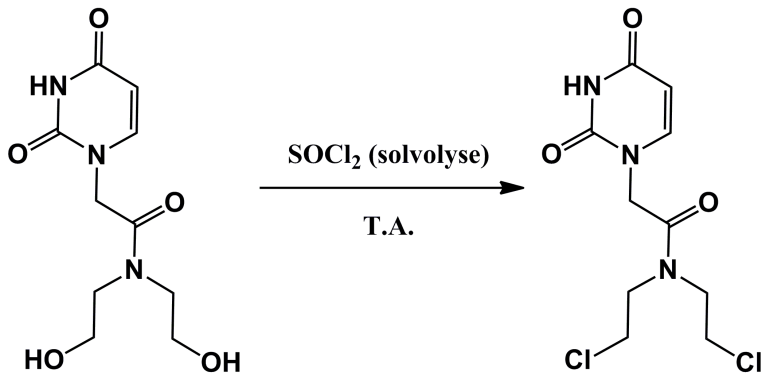


Figure 2.10 *: Molécule **6**, interaction longue distance π-stacking et pont hydrogène.*

Ces différents calculs viennent appuyer les constatations expérimentales faites précédemment. Nous avons confirmé l'importance des interactions faibles dans cette réaction d'amidation directe : liaisons hydrogène dans le cas de molécules possédant un ou plusieurs groupements hydroxyéthyles et π-stacking dans le cas du composé issu du couplage entre l'uracile alkylée et la benzylamine. Dans tous les cas, ces interactions non-liantes, bien décrites par la fonctionnelle ωB97XD, semblent être les forces motrices guidant cette réaction. Il est intéressant de noter l'importance que jouent les forces dispersives dans ce type d'interactions.

2.3. Synthèse de la moutarde à l'azote dérivée de l'uracile.

L'obtention du N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(uracil-1-yl)acétamide a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites par Hadj-Bouazza et coll.[6] La chloration du composé **2** est faite dans le chlorure de thionyle, à température ambiante pendant cinq heures (Schéma 2.8).



2 **12 (64%)**

Schéma 2.8 *: Chloration du composé **2**.*

Après purification, le composé **12** est obtenu avec un rendement de 64%. La structure du composé a été établie par spectroscopie de RMN et confirmée par spectrométrie de masse. Le spectre de masse confirme la chloration par la présence des pics quasi moléculaires $(M+H)^+$ m/z 294, m/z 296 et m/z 298 et $(M+Na)^+$ m/z 316, m/z 318 et m/z 320, caractéristiques de la présence des deux isotopes des atomes de chlore.

2.3. Conclusion.

Au cours de ce travail, nous avons obtenu une moutarde à l'azote, dérivée de l'uracile, par une stratégie de synthèse simple en trois étapes, avec un rendement global de 39%.

Nous avons optimisé la réaction d'amidation entre l'uracile alkylée et la diéthanolamine afin d'obtenir le meilleur rendement avec une purification du brut réactionnel simplifiée. Par la suite, nous avons étudié l'influence de la nature de l'amine sur cette réaction. Les résultats expérimentaux, appuyés par une étude théorique des interactions moléculaires, ont montré l'importance d'interactions longues distances, π-stacking et liaison hydrogène, pour cette réaction d'amidation directe.

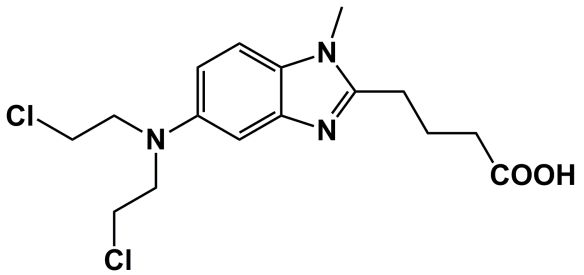
Enfin, le N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(uracil-1-yl)acétamide synthétisé, ainsi que le dérivé issu de la thymine seront par la suite testés biologiquement vis-à-vis de différentes lignées de cellules cancéreuses (Chapitre V).

CHAPITRE III

SYNTHÈSE DE MOUTARDES A L'AZOTE A MOTIFS PURIQUES

L'un des problèmes majeurs des traitements anticancéreux par les agents alkylants, et notamment les moutardes à l'azote, est le développement de résistance par les cellules tumorales à ce type de traitement. Cette résistance se traduit notamment par deux phénomènes, une augmentation de la production d'enzymes réparatrices de l'ADN, éliminant ainsi les ponts inter- et intracaténaires formés et une augmentation de la production de gluthation, qui vient réagir directement sur l'agent alkylant.

Comme nous l'avons vu précédemment dans la mise au point bibliographique, la bendamustine est une moutarde à l'azote qui connaît actuellement un renouveau. En effet, la bendamustine (Figure 3.1) est efficace contre certains cancers résistants au traitement par des agents alkylants tels que le chlorambucil ou le cisplatine. Son efficacité dans ce type de traitements provient de sa structure comportant un cycle benzimidazole, analogue de base purique de l'ADN. Cette structure a permis une plus grande stabilité des ponts formés.



Bendamustine

Figure 3.1 *: Structure de la bendamustine.*

Compte tenu de ces paramètres et dans la continuité des travaux réalisés à partir des bases pyrimidiques, nous nous sommes proposé dans cette partie d'élaborer de nouvelles moutardes à l'azote analogue de bases puriques (Figure 3.2).

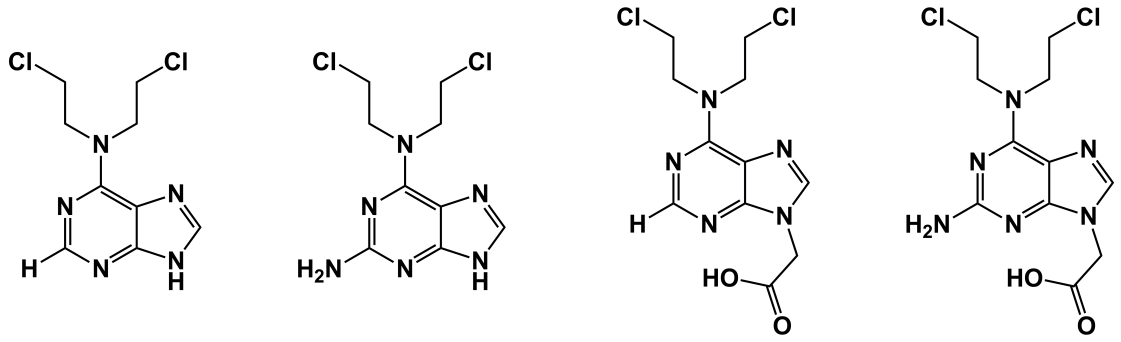


***Figure 3.2** : Structures proposées pour les moutardes à l'azote dérivées de purine.*

On retrouve au sein de toutes ces structures un motif purine ou 2-aminopurine mimant les bases naturelles de l'ADN, l'adénine et la guanine. La chaîne acide acétique en position 9 du cycle purique aura pour but d'augmenter la solubilité dans l'eau des composés synthétisés et pourra également permettre, par la suite, la fixation d'agents de vectorisation ou de transports (peptides, dérivés de métabolite, …) par l'intermédiaire d'un lien ester ou amide, par exemple.

La stratégie de synthèse de ces différents composés aura pour substrats de départ deux produits commerciaux : la 6-chloropurine et la 2-amino-6-chloropurine (Schéma 3.1).

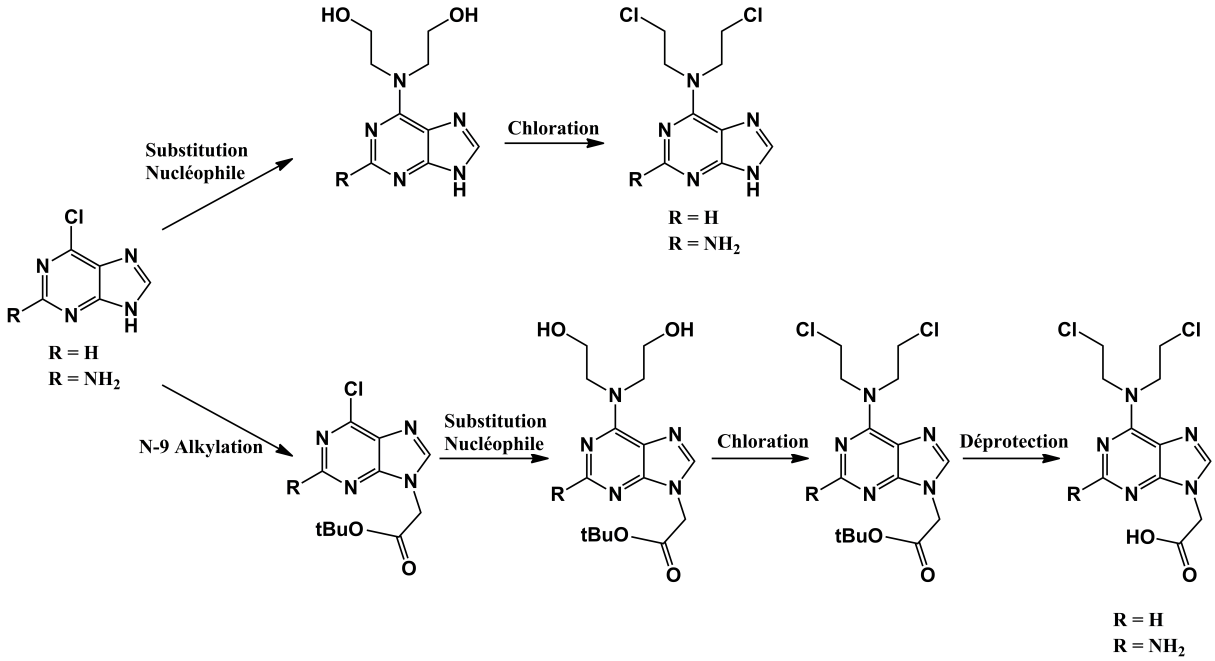


***Schéma 3.1** : Stratégie de synthèse.*

Dans une première voie, la diéthanolamine est fixée directement en position 6 du cycle purique par substitution nucléophile. Les groupements hydroxyles sont par la suite chlorés pour fournir deux moutardes à l'azote à motifs puriques.

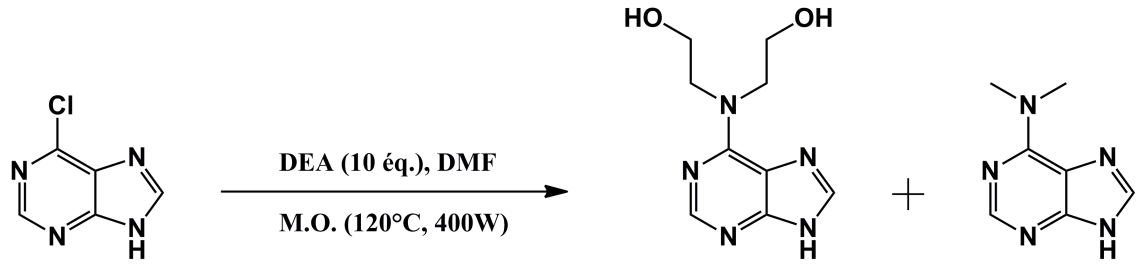
Dans une deuxième voie, on réalisera l'alkylation régiosélective des 6-chloropurines en position 9 par le bromoacétate de *tert*-butyle. La diéthanolamine sera ensuite fixée en position 6 puis ces groupements hydroxyles seront chlorés pour fournir des moutardes à l'azote après déprotection des fonctions acides carboxyliques.

3.1. Synthèse de moutardes à l'azote à partir des 6-chloropurines.

3.1.1. Fixation de la diéthanolamine en position 6.

Afin de réaliser la substitution nucléophile du chlore par la diéthanolamine en position 6 des purines, nous avons commencé par utiliser la méthode de Cherng et coll.[55] Dans ces travaux, les auteurs utilisent différents nucléophiles (thiolates, amines primaires, amines cycliques ou aromatiques …) et réalisent cette substitution en position 6 de la 6-chloropurine et de la 2-amino-6-chloropurine dans des solvants polaires, type DMF ou DMSO, et sous irradiations micro-ondes.

Un essai réalisé sur la 6-chloropurine selon cette méthode, avec 10 équivalents de diéthanolamine, dans le DMF et sous irradiations micro-ondes (120°C, 400 W), a conduit à une évolution très lente de la réaction et à l'apparition de deux composés. Après 1h30 d'activation, ces composés ont été isolés avec des rendements de 44% et 13%. Le produit de départ n'est pas entièrement consommé (Schéma 3.2).



13 (44%) **13' (13%)**

***Schéma 3.2**: Utilisation de la méthode de Cherng et coll.*

L'analyse par spectroscopie de RMN montre que le composé majoritaire correspond au produit attendu, notamment par l'apparition de signaux correspondant aux groupements

55 L.-K. Huang, Y.-C. Cherng, Y.-R. Cheng, J.-P. Jang, Y.-L. Chao, Y.-J. Cherng, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5323-5327.

hydroxyles à 4,80 ppm et de deux multiplets à 4,15 ppm et 3,68 ppm, intégrant chacun pour 4 protons, et correspondant aux deux chaînes éthyles du groupement diéthanolamino. La spectrométrie de masse vient confirmer cette structure.

Le produit secondaire, quant à lui, correspond à la fixation du groupement diméthylamino en position 6 du cycle purique. En effet, on constate en spectroscopie de RMN la présence d'un singulet intégrant pour six protons à 2,87 ppm et la spectrométrie de masse présente un pic moléculaire ($M+H^+$) à *m/z* 164,09.

Dans leurs travaux sur la diméthylamination des 6-chloropurines,[56] Janeba et coll. ont obtenu ce type de composés en utilisant le DMF comme solvant. Ils ont également montré que l'activation par irradiation micro-ondes favorisait cette réaction. Deux mécanismes[57] ont été proposés pour cette réaction (Schéma 3.3). Le premier mécanisme (voie a) fait intervenir directement le doublet de l'atome d'azote du DMF qui vient réagir sur la position 6 du cycle purique, conduisant à un intermédiaire réactionnel qui, après perte de monoxyde de carbone et d'acide chlorhydrique, donne le produit portant le groupement diméthylamino. Dans un second mécanisme (voie b), la décomposition thermique du diméthylformamide conduit à la formation directe de diméthylamine et de monoxyde de carbone. La diméthylamine ainsi formée réagit en tant que nucléophile sur la position 6 du cycle purique, conduisant par substitution nucléophile au produit secondaire **13'**.

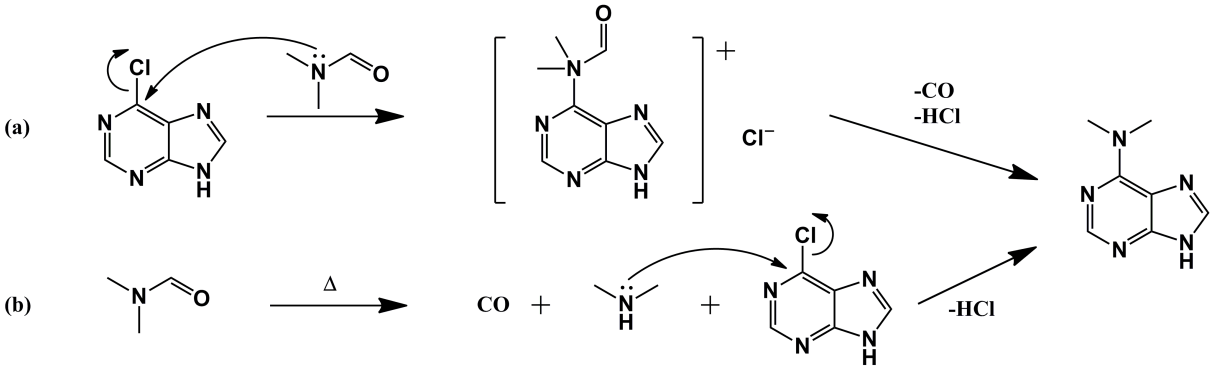


Schéma 3.3 *: Mécanismes proposés pour la diméthylamination par le DMF.*

56 L. Cechova, P. Jansa, M. Sala, M. Dracinsky, A. Holy, Z. Janeba, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 866-871.

57 J. Muzart, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8313-8323.

Un autre mécanisme pourrait expliquer la formation de diméthylamine par réaction entre la diéthanolamine et le DMF (Schéma 3.4), tel que proposé par Park et Cho.[58]. Cette réaction conduit également à la formation de formate de 2-((2-hydroxyéthyl)amino)éthyle.

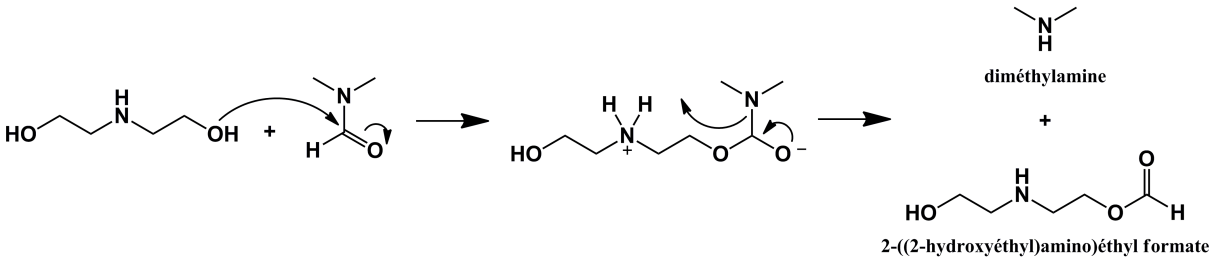


Schéma 3.4 *: Formation de diméthylamine par réaction de la diéthanolamine sur le DMF.*

Cette méthode ne s'avère pas satisfaisante car elle conduit à des rendements moyens (44%) et nécessite des temps de réaction particulièrement longs, même dans le cas de l'utilisation de l'activation par irradiations micro-ondes. La faible nucléophilie de la diéthanolamine peut expliquer ce résultat peu satisfaisant. Nous nous sommes alors tournés vers une méthode plus efficace,[59] utilisant la triéthylamine pour activer la position 6 de la base purique. Ce mécanisme permet d'accroître la vitesse de substitution nucléophile en passant par un intermédiaire triéthylammonium (Schéma 3.5).

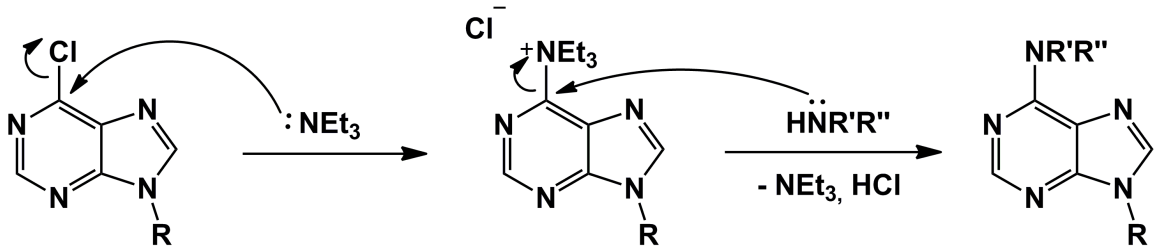


Schéma 3.5 *: Mécanisme proposée pour la substitution nucléophile des 6-chloropurine.*

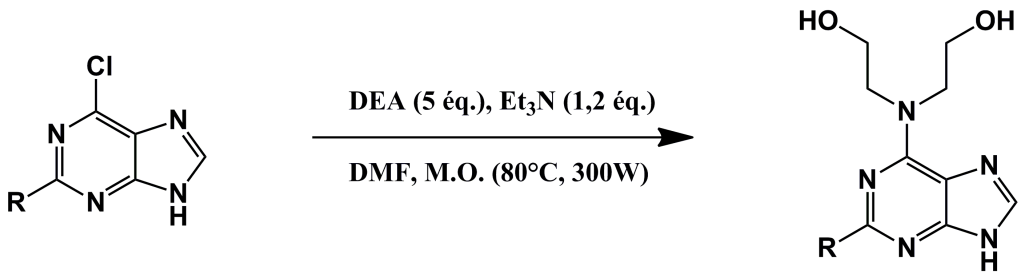
Un essai sur la 6-chloropurine a été effectué en présence de cinq équivalents de diéthanolamine, et d'une quantité quasi-stœchiométrique de triéthylamine (1,2 équivalents) dans le DMF et sous irradiation micro-ondes (300 W, 80°C). Après une heure d'activation, le produit de départ a totalement disparu. Dans ce cas, le produit attendu est isolé avec un

58 Y.H. Cho, J.C. Park, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8331-8334.

59 (a) R.A.F. De Ligt, P.A.M. Van Der Klein, J.K Von Frijtag Drabbe Künzel, A. Lorenzen, F.A. El Maate, S. Fujikawa, R. Van Westhoven, T. Van Den Hoven, J. Brussee, A.P. Ijzerman, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 139-149 ; (b) S.A. Laufer, D.M. Domeyer, T.R.F. Scior, W. Albrecht, D.R.J. Hauser, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 710-722 ; (c) D. Taddei, A.M.Z. Slawin, J.D. Woollins, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 939-947.

rendement de 67%. On constate la formation du composé **13'**, issu de la diméthylamination avec un rendement faible de 7%.

Cette méthode plus efficace a alors été utilisée sur la 2-amino-6-chloropurine. Elle a ainsi permis d'obtenir la 6-((bis-2-hydroxyéthyl)amino)-2-aminopurine **14** avec un rendement de 72% (Schéma 3.6).



R = H
R = NH_2

13. R = H (67%)
14. R = NH_2 (72%)

***Schéma 3.6**: Synthèse des composés **13** et **14**.*

L'analyse par spectroscopie de RMN permet de déterminer la structure du composé **14**. On constate la présence de pics caractéristiques du groupement bis(2-hydroxyéthyle)amine, avec la présence d'un multiplet à 4,77 ppm, intégrant pour deux protons, et correspondant aux groupes hydroxyles, et de deux multiplets intégrant chacun pour quatre protons, à 3,96 et 3,65 ppm, correspondants aux groupes méthylènes des deux chaînes éthyles. La spectrométrie de masse vient confirmer cette structure.

3.1.2. Chloration des intermédiaires dihydroxylés.

3.1.2.1. Chloration de la 6-((bis-2-hydroxyéthyl)amino)purine.

Le premier essai de chloration a été mené sur le composé **13**, dans les mêmes conditions que pour la synthèse du dérivé pyrimidique **12** (Chapitre II). Nous avons donc réalisé cette réaction par solvolyse dans le chlorure de thionyle et à température ambiante.

La réaction évolue très rapidement. On remarque, au bout de dix minutes, la disparition totale du produit de départ et la présence de deux produits. Lorsque l'on continue l'agitation du milieu réactionnel, on constate au bout de six heures la disparition de l'un des deux produits, au profit de l'autre.

Après purification, le composé obtenu **15** est caractérisé. Le spectre de RMN du proton (Tableau 3.1) montre un important effet de déblindage sur les protons du cycle purique, H-5 (8,78 ppm) et H-2 (8,58 ppm). On constate aussi la présence de deux triplets (4,79 ppm et 4,19 ppm) intégrant pour 2 protons chacun et présentant une constante de couplage anormalement élevée (J = 9,5 Hz), en comparaison des deux autres triplets (4,42 ppm et 4,07 ppm, J = 5,9 Hz).

Tableau 3.1 *: Analyse par spectroscopie de RMN du produit issu de la chloration (DMSO-D6).*

Position	δ_C	δ_H (mult ; *J* en Hz)	HMBC
2	143,9	8,58 (s)	C-3a ; C-9b
3a	115,4	-	-
5	114,6	8,78 (s)	C-3a ; C-7 ; C-9a ; C-9b
7	47,8	4,79 (t ; 9,5)	C-5 ; C-8 ; C-9a
8	48,3	4,19 (t ; 9,5)	C-7 ; C-9a
9b	151,1	-	-
9a	149,7	-	-
α	48,0	4,42 (t ; 5,9)	C-β ; C-9a
β	41,1	4,07 (t ; 5,9)	Cα

L'analyse par expérience HMBC montre un couplage entre un groupement CH_2 et les carbones en position 5 (114,6 ppm) et en position 9a (149,7 ppm) du cycle purique (Figure

3.3). On retrouve ce couplage entre le proton de la position 5 du cycle purique et le carbone 7, ceci pouvant s'expliquer par une réaction de cyclisation intramoléculaire.

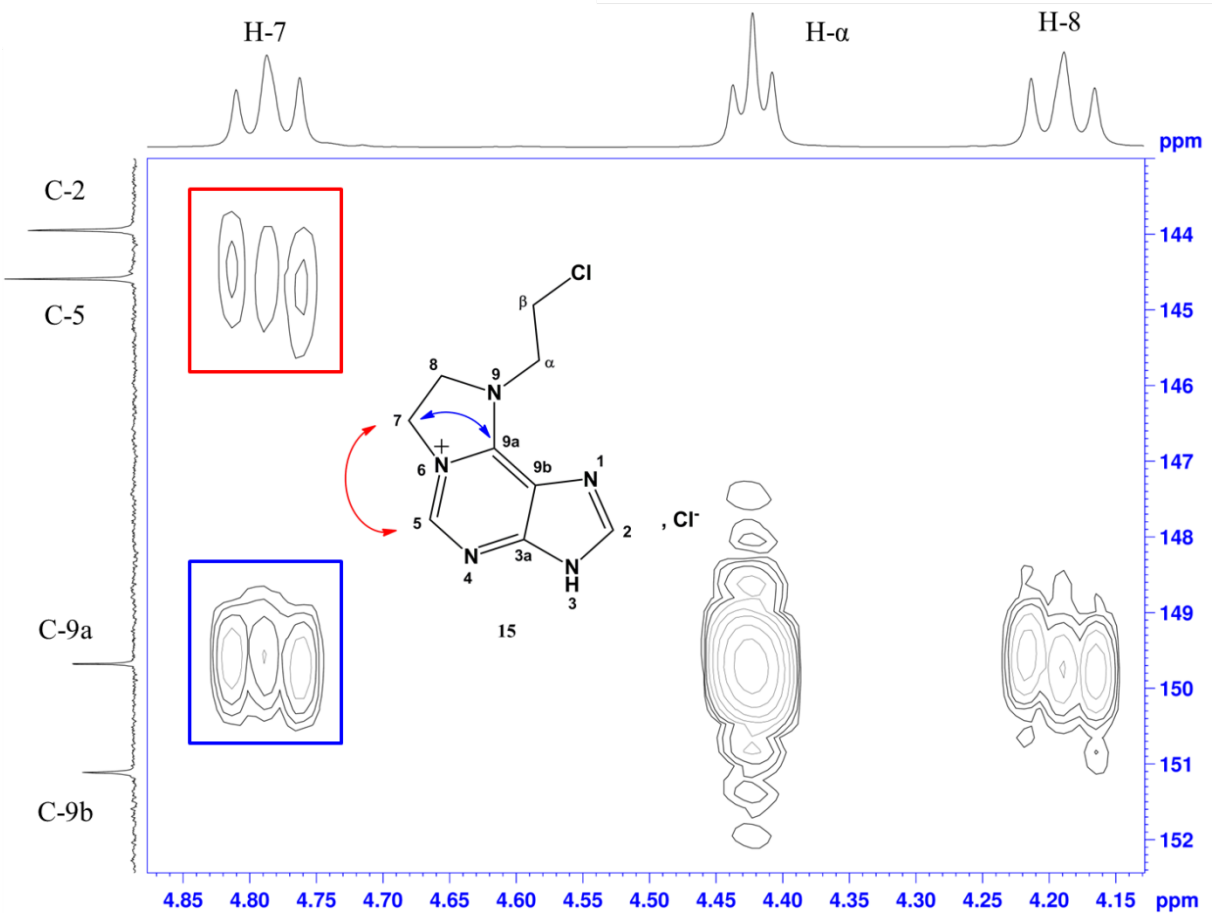


Figure 3.3 *: Couplages HMBC des protons H-7 avec les carbones C-5 et C-9a.*

Enfin, l'analyse par spectrométrie de masse permet l'identification d'un pic moléculaire M^+ à *m/z* 224 et d'un pic isotopique à *m/z* 226. Cette analyse permet de confirmer la formation d'un sel organique au cours de cette réaction, et la présence d'un seul atome de chlore au sein de cette structure.

L'analyse structurale du produit obtenu montre que la réaction de chloration du composé **13** a conduit très rapidement à une cyclisation, issue de la réaction intramoléculaire entre l'azote en position 1 du cycle purique et une des chaînes chloroéthyles.

3.1.2.1. Chloration de la 2-amino-6-((bis-2-hydroxyéthyl)amino)purine.

La chloration de la 2-amino-6-((bis-2-hydroxyéthyl)amino)purine a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. A nouveau, on constate très rapidement la disparition du substrat de départ au profit de la formation de deux composés. Dans ce cas également, on observe que la réaction continue à évoluer avec la diminution de l'intensité d'un des deux composés au profit de l'autre. L'évolution de cette seconde réaction semble

particulièrement lente car, même après sept jours, le mélange réactionnel contient toujours deux produits, dans un ratio 70 / 30. Les spectres obtenus par spectroscopie de RMN ^{1}H de ces deux composés sont assez semblables (Tableau 3.2). Une analyse plus poussée (expériences COSY, HMQC et HMBC), montre qu'il y a eu la même cyclisation que précédemment pour les deux produits obtenus.

***Tableau 3.2** : Analyse par spectroscopie de RMN du mélange issu de la chloration de **14** (DMSO-D6).*

Position	δ_H(mult ; *J* en Hz)	
	16	**16'**
NH_2	7,86 (s)	7,78 (s)
2	8,12 (s)	8,08 (s)
7	4,33 (t ; 8,7)	4,37 (t ; 9,2)
8	4,12 (t ; 8,7)	4,11 (t ; 9,2)
α	4,02 (t ; 5,2)	3,92 (t ; 5,6)
β	3,73 (t ; 5,2)	3,66 (m)

L'analyse par spectrométrie de masse montre que le produit majoritaire **16,** issu de la réaction, comporte une chaîne chloroéthyle et que le produit minoritaire **16'** comporte, quant à lui, une chaîne hydroxyéthyle (Schéma 3.7).

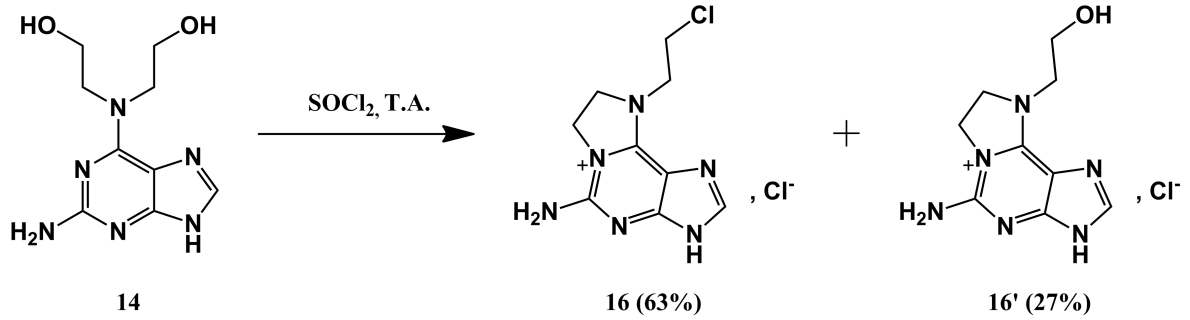
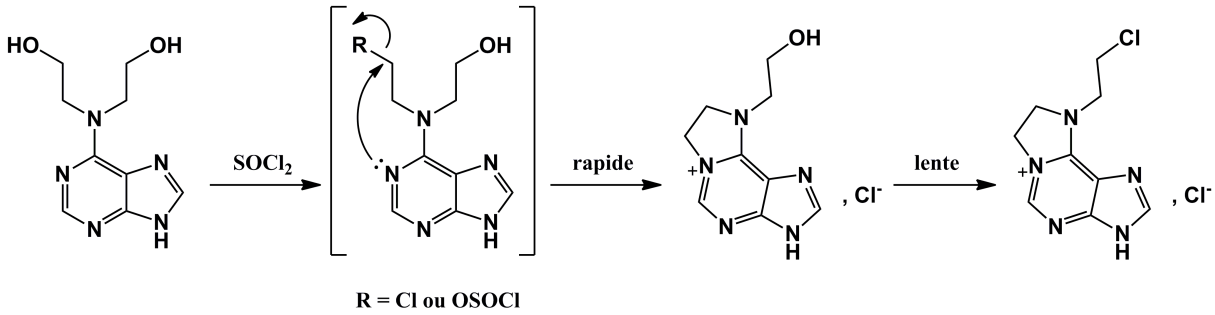


***Schéma 3.7** : Chloration du composé **14**.*

De manière surprenante, la chloration de cette chaîne hydroxyéthyle semble particulièrement lente et la réaction totale n'a pu être atteinte, même après plusieurs semaines de réaction.

Ces deux réactions de chloration sur les composés **13** et **14** nous amènent à proposer un mécanisme réactionnel. Dans les deux cas, on constate la formation rapide d'un premier intermédiaire cyclisé. Cette cyclisation pourrait intervenir soit au niveau du produit issu de la chloration, soit sur le composé intermédiaire sulfochloridite (R = OSOCl). Dans un deuxième temps, la chloration intervient de façon plus lente sur la chaîne hydroxyéthyle (Schéma 3.8).



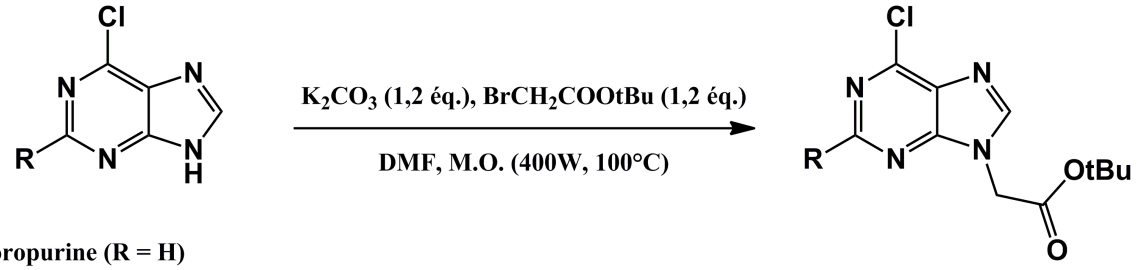
R = Cl ou OSOCl

Schéma 3.8 *: Mécanisme proposé de la formation du composé* ***15****.*

3.2. Synthèse appliquée aux purines *N*-9 alkylées.

3.2.1. Alkylation régiosélective des 6-chloropurines.

L'alkylation régiosélective en position *N-9* des 6-chloropurines a été réalisée selon les travaux de Condom et coll.[60] et de Maga et coll.[61] Les 6-chloropurines sont alkylées dans le diméthylformamide en présence de bromoacétate de *tert*-butyle et de carbonate de potassium, à 100°C. Dans le but d'augmenter la vitesse de réaction, nous avons choisi d'utiliser l'activation par irradiations micro-ondes (400 W, 100°C, Schéma 3.9).



6-Chloropurine (R = H)
2-Amino-6-chloropurine (R = NH_2)

17. R = H (72%)
18. R = NH_2 (79%)

Schéma 3.9 *: Alkylation des 6-chloropurines.*

60 A. Farèse, N. Patino, R. Condom, S. Dalleu, R. Guedj, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1413-1416.

61 K.F. Adebambo, S. Zanoli, M.G. Thomas, R. Cancio, N.M. Howarth, G. Maga, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1405- 1409.

Après quinze minutes d'activation, la CCM montre la disparition totale du produit de départ. Après évaporation et purification, les 6-chloropurines *N-9* alkylées sont obtenues avec des rendements de 72% (**17**) et 79% (**18**).

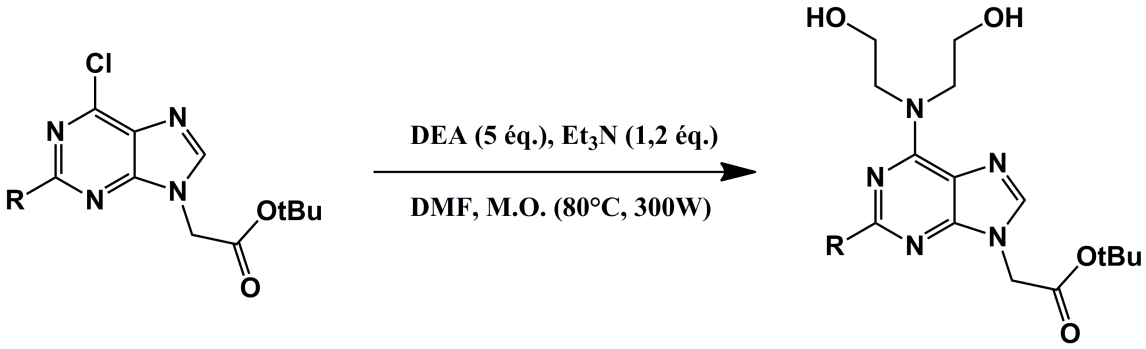
On constate par spectroscopie infrarouge l'apparition de bandes à 1732 cm^{-1}, caractéristiques des carbonyles des fonctions esters. L'analyse par spectroscopie de RMN du proton (Tableau 3.3) vient confirmer cette alkylation par l'apparition de signaux intégrants pour deux protons (CH_2 éthanoate) et de signaux intégrants pour neuf protons (groupement *tert*-butyle). Enfin, les couplages longues distances observés par expériences HMBC, entre le groupement CH_2 de la fonction éthanoate et les carbone en position 4 et position 8 du cycle purique, viennent confirmer la nature régiosélective de la réaction.

Tableau 3.3 *: Données de spectroscopie RMN des composés **17** et **18** (DMSO-D6).*

Composé **17**				Composé **18**			
Position	δ_C	δ_H (mult)	HMBC	δ_C	δ_H (mult)	HMBC
2	151,7	8,81 (s)	C-4, C-6, C-5	159,8	-	-
NH_2	-	-	-	-	6,96 (s)	C-2, C-6, C-5
4	152,0	-	-	154,2	-	-
5	130,4	-	-	122,8	-	-
6	149,0	-	-	149,3	-	-
8	147,9	8,68 (s)	éthanoateC-5, C-4, C-6, CH_2	C-6, CH_2	8,09 (s)	éthanoateC-5, C-4, C-6, CH_2
CH_2 éthanoate	45,2	5,16 (s)	C=O, C-4, C-8	44,5	4,86 (s)	C=O, C-4, C-8
C=O	166,2	-	-	166,6	-	-
$C_{quat.}$ tBu	82,5	-	-	82,2	-	-
CH_3 tBu	27,5	1,43 (s)	CH_3 tBu, $C_{quat.}$ tBu	27,6	1,42 (s)	CH_3 tBu, $C_{quat.}$ tBu

3.2.2. Fixation de diéthanolamine en position 6.

La fixation de la diéthanolamine en position 6 des composés **17** et **18** a été réalisée selon le même mode opératoire appliqué à la 6-chloropurine et la 2-amino-6-chloropurine (Schéma 3.10).



17. R = H
18. R = NH_2

19. R = H (89%)
20. R = NH_2 (78%)

Schéma 3.10** : Fixation de diéthanolamine en position 6 des composés **17** et **18.

Après une heure d'activation par irradiation micro-ondes, on constate la disparition totale du produit de départ et la formation d'un seul composé. Les composés **19** et **20** sont obtenus purs avec des rendements de 89 et 78%, respectivement. Dans le cas de ces dérivés alkylés de bases puriques, on ne constate pas la formation de sous-produit issu de la réaction de diméthylamination.

L'analyse par spectroscopie de RMN de ces deux composés montre l'apparition de signaux correspondant aux deux chaînes bis-2-hydroxyéthyles (Tableau 3.4). La spectrométrie de masse vient confirmer ces structures.

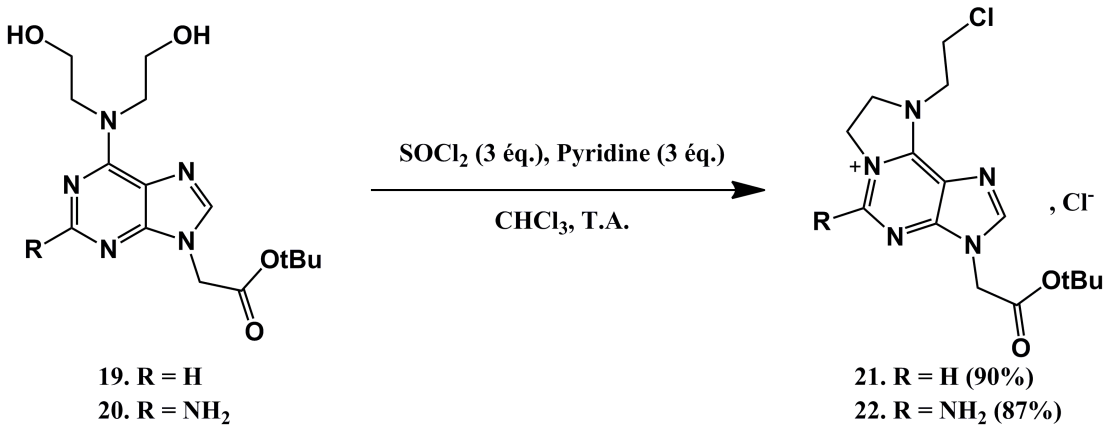
***Tableau 3.4** : Analyse par spectroscopie RMN des composés **19** et **20** (DMSO-D6).*

	δ_H (mult, *J* en Hz)	
Position	Composé **19**	Composé **20**
H-2	8,20 (s)	-
H-8	8,12 (s)	7,69 (s)
NH_2	-	5,81 (s)
CH_2 éthanoate	4,95 (s)	4,74 (s)
OH	4,80 (t ; 5,2)	4,75 (t ; 4,6)
Hβ	4,27 (m) ; 3,83 (m)	4,02 (m)
Hα	3,83 (m)	3,65 (m)
CH_3 tBu	1,42 (s)	1,42 (s)

3.2.3. Chloration et déprotection des composés alkylés 19 et 20.

Dans le cas des dérivés d'ester de *tert*-butyle, la chloration par solvolyse dans le chlorure de thionyle ne peut être réalisée car cette méthode génère de l'acide chlorhydrique, qui entraîne la perte du groupement *tert*-butyle et le retour à l'acide carboxylique, qui subit à son tour une chloration. Afin de neutraliser l'acide chlorhydrique formé au cours de la réaction, nous avons utilisé une base organique : la pyridine.

Les composés **19** et **20** sont chlorés dans le chloroforme en présence de trois équivalents de pyridine et de trois équivalents de chlorure de thionyle (Schéma 3.11).



19. R = H
20. R = NH_2

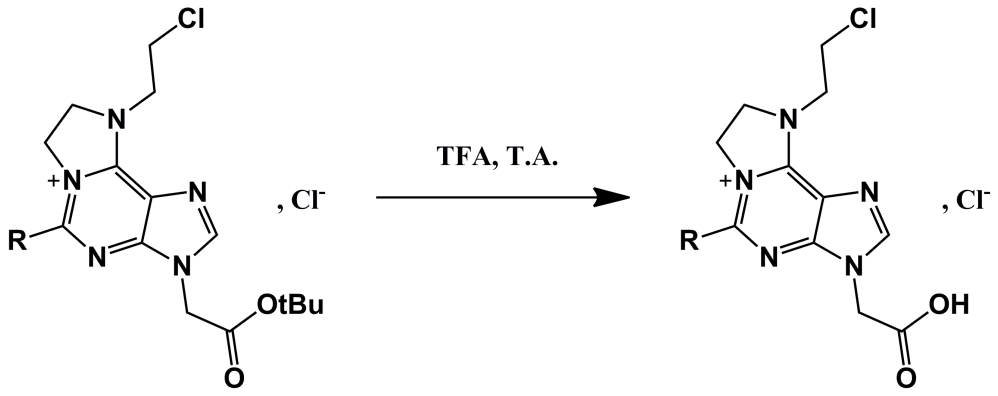
21. R = H (90%)
22. R = NH_2 (87%)

Schéma 3.11 *: Chloration des composés **19** et **20**.*

Après une heure de réaction, on constate, comme dans le cas des composés non alkylés, la disparition du produit de départ et la formation de deux composés très polaires. Après 24 heures, la CCM ne montre plus qu'un seul composé. Après purification, les composés **21** et **22** sont obtenus avec des rendements de 90% et 87%, respectivement.

L'analyse par spectroscopie de RMN du proton confirme encore une fois la présence du cycle à cinq chaînons, comme constatée précédemment. On peut aussi remarquer que cette méthode de chloration n'a pas eu d'impact sur l'ester de *tert*-butyle, avec la présence d'un singulet intégrant pour 9 protons à 1,44 ppm, pour le composé **21**, et à 1,43 ppm, pour le composé **22**.

Afin de déprotéger la fonction acide carboxylique, les composés **21** et **22** ont été mis en solution dans l'acide trifluoroacétique (TFA). Le suivi par CCM de la réaction montre, qu'après deux heures, le produit de départ a totalement disparu au profit d'un unique composé formé (Schéma 3.12).



21. R = H
22. R = NH_2

23. R = H
24. R = NH_2

Schéma 3.12 *: Déprotection des composés **21** et **22** dans l'acide trifluoroacétique.*

Après purification, les composés **23** et **24** sont obtenus avec des rendements quantitatifs. La spectroscopie de RMN du proton confirme la disparition des protons correspondants au groupement *tert*-butyle et la spectrométrie de masse vient confirmer ces structures avec des pics (M^+) à *m/z* 282,0754 pour le composé **23** et *m/z* 297,0864 pour le composé **24**.

3.3. Conclusion.

Au cours de ce travail, nous avons réalisé la synthèse de quatre analogues de bases nucléiques puriques de l'ADN. Grâce à l'utilisation des micro-ondes, l'alkylation en position 9 du cycle purique et la fixation de la diéthanolamine en position 6 ont été optimisées. Nous avons constaté que, quelle que soit la structure, l'étape de chloration entraînait une réaction intramoléculaire, conduisant à la formation d'un cycle tetrahydroimidazolium, entre les positions *N-1* et N^6.

Bien que les structures obtenues ne possèdent pas de groupement bis(2-chloroéthyle)amine, comme attendu pour des moutardes à l'azote, la présence d'une chaîne 2-chloroéthyle peut conduire à l'alkylation de l'ADN. De plus, la structure du cation cyclique obtenu rappelle celle du cation aziridinium. Elle pourrait donc conduire à une alkylation de l'ADN par attaque nucléophile sur le carbone α du cycle tetrahydroimidazolium. Ces structures possèdent donc deux sites électrophiles pouvant entraîner une dialkylation de l'ADN. Ce type de composés sera par la suite testé biologiquement vis-à-vis de différentes lignées cellulaires.

CHAPITRE IV

ELABORATION DE MOUTARDES À L'AZOTE GENEREES PAR « CLICK CHEMISTRY »

La synthèse de moutardes à l'azote peut s'avérer complexe à cause du nombre élevé d'étapes, entrainant des rendements faibles. De plus, les réactions sont souvent menées dans des conditions particulièrement drastiques (utilisation d'oxyde d'éthylène, traitements acides ...). Il devient donc difficile d'appliquer ces conditions à des molécules d'intérêt biologique, souvent sensibles aux dégradations par ce type de milieux. Ces difficultés constituent un frein majeur à leur développement.

Afin d'allier rendements élevés, temps de réactions courts et variabilité structurale, nous nous sommes proposés d'appliquer le concept de « click chemistry » à la synthèse de moutardes à l'azote, notamment basée sur la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre(I) entre un alcyne vrai et un azoture (CuAAC).

4.1. Rappels sur le concept de Click Chemistry.

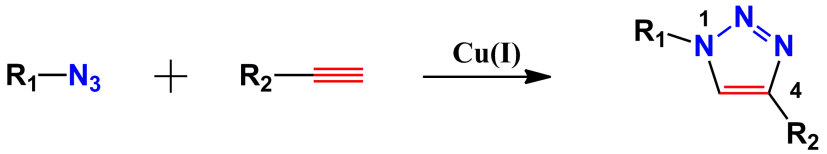
Depuis plus de 10 ans et son édiction par Sharpless et coll.,[62] le concept de « click chemistry » a connu un essor important (plus de 3500 publications référencées) et est désormais appliqué à un grand nombre de domaines de la chimie tel que la chimie des matériaux, la biochimie et la chimie thérapeutique. L'idée générale est d'élaborer rapidement et efficacement ("click") des molécules à partir d'unités plus petites et fonctionnalisées. Ce concept inclut aussi d'autres critères plus généraux (économie d'atomes, stéréospécificité, bons rendements, purifications simples) et reprend de nombreux principes de la Chimie Verte (absence de solvants ou solvants "verts", sous-produits inoffensifs ...).

De nombreuses réactions courantes en chimie organique peuvent permettre d'atteindre ce but (addition de Michael, réaction de Diels-Alder, époxydation, dihydroxylation etc.) mais c'est sans nul doute la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre(I) entre un alcyne vrai et un azoture (CuAAC) qui a connu le plus grand succès au cours de ces dix dernières années. Ce succès est tel que cette réaction est souvent appelée "réaction de click chemistry", confondant ainsi le concept général et l'une de ses applications.

Connue depuis les années 70 à la suite des travaux de Huisgen, c'est en 2002 que le rôle catalytique du cuivre(I) fut découvert par deux équipes indépendantes.[63] Ce catalyseur est particulièrement crucial puisqu'il conduit rapidement à une réaction stéréospécifique entre

62 H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

l'alcyne vrai et l'azoture. Le produit issu de cette réaction est alors exclusivement un isomère 1,4-disubstitué du 1,2,3-triazole (Schéma 4.1).



1,2,3-triazole 1,4-disubstitué

Schéma 4.1 *: Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre(I) entre un alcyne vrai et un azoture.*

Si cette réaction connaît un tel succès, c'est notamment par son efficacité. Elle conduit souvent à des rendements élevés dans des temps de réactions très courts. Ainsi, elle a été appliquée à des domaines très variés, allant même jusqu'à être efficace dans des systèmes vivants.[64]

4.2. Stratégie de synthèse.

Afin de respecter au maximum les principes de la "click chemistry", nous avons élaboré un schéma de synthèse simple, à partir de produits de départs facilement disponibles (Schéma 4.2). Cette stratégie de synthèse, centrée sur la CuAAC, aura pour avantage de conduire à une variété structurale importante des composés finaux, en faisant varier les azotures utilisés (R-N_3). Cette variabilité est nécessaire car c'est cette partie (notée R sur le schéma) qui pourra influer sur l'activité biologique de ces moutardes à l'azote.

63 a) C.W. Tornoe, M. Meldal, *Peptidotriazoles : Copper(I) catalyzer 1,3-dipolar cycloadditions on solid phase*, American Peptide Society and Kluwer Academic Publishers, **2001** ; b) V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599 ; c) C.W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

64 a) A.J. Link, D.A. Tirrell, *J Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164-11165 ; b) P.-H. Elchinger, P.-A. Faugeras, B. Boëns, F. Brouillette, D. Montplaisir, R. Zerrouki, R. Lucas, *Polymers* **2011**, *3*, 1607-1651.

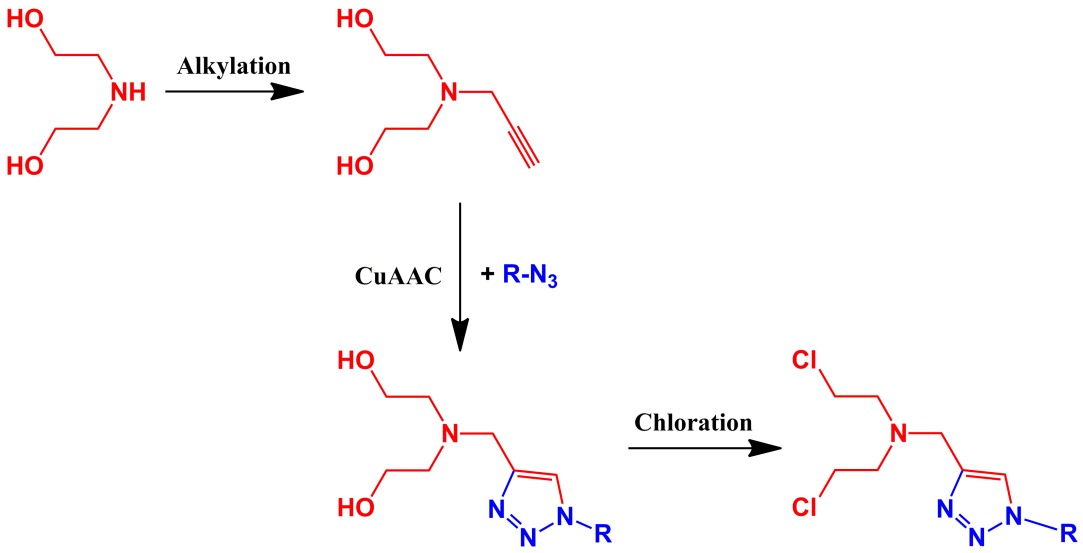


Schéma 4.2 *: Stratégie de synthèse.*

La première étape nécessite de la diéthanolamine et du bromure de propargyle, deux composés aisément disponibles. La mise au point de cette réaction devra permettre un rendement élevé et prouver la faisabilité de cette synthèse à plus grande échelle.

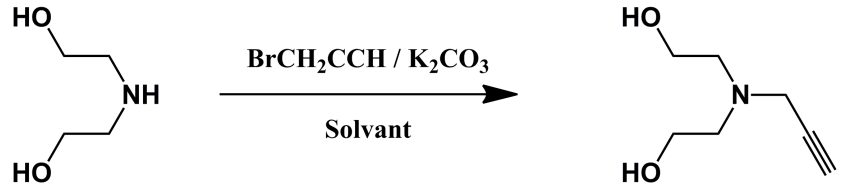
Enfin, la dernière étape de chloration doit conduire aux moutardes à l'azote désirées, en évitant l'utilisation de méthodes drastiques de chloration incompatibles avec nombre de composés d'intérêt biologique.

4.3. Première étape : *N*-alkylation de la diéthanolamine.

Seules deux équipes décrivent dans la littérature la synthèse de la *N*-propargyldiéthanolamine. En 2010, Nieman et coll.[65] ont réalisé la propargylation de la diéthanolamine, en utilisant une quantité stœchiométrique de bromure de propargyle en présence de carbonate de potassium dans le dichlorométhane. La synthèse de ce composé a nécessité 60 heures de réaction pour un rendement faible de 25%. En utilisant 1,1 équivalents de diéthanolamine dans l'acétone, Lonsdale et coll.[66] ont, quant à eux, obtenu après 24 heures de réaction un meilleur rendement de 45%.

65 J.A. Nieman, S.K. Nair, S.E. Heasley, B.L. Schultz, H.M.Zerth, R.A. Nugent, K. Chen, K.J. Stephanski, T.A. Hopkins, M.L. Knetchel, N.L. Oien, J.L. Wieber, M.W. Wathen, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *20*, 3039-3042.

66 D.E. Lonsdale, M.J. Monteiro, *Polymer Chem.* **2011**, *49*, 4603-4612.



Diéthanolamine **N-Propargyldiéthanolamine (25)**

Schéma 4.3 *:* N-*Alkylation de la diéthanolamine.*

Lors d'un premier essai, nous avons repris les conditions expérimentales des travaux de Nieman et coll. en utilisant l'activation par irradiations micro-ondes, espérant ainsi diminuer le temps de réaction et augmenter le rendement. Ce changement du mode d'activation de la réaction a permis d'obtenir un rendement de 20% en seulement deux heures, au lieu de 60 heures de réaction à température ambiante. La diéthanolamine est en fait peu soluble dans le dichlorométhane, ce qui semble largement freiner la réaction.

L'analyse par spectroscopie de RMN du composé obtenu montre la présence du groupement propargyle par l'apparition d'un proton acétylénique à 3,05 ppm et de deux protons méthyléniques (CH_2) à 3,38 ppm. La présence d'un triplet à 4,36 ppm, attribué aux deux groupements hydroxyles, confirment l'absence de *O*-alkylation de la diéthanolamine. La spectroscopie infrarouge montre la présence d'une bande d'absorption caractéristique des alcynes à 2103 cm^{-1}.

Afin d'améliorer le rendement de cette réaction, nous avons fait varier différents paramètres tels que le solvant, la quantité de réactifs, le mode d'activation ou encore le temps d'activation. Les résultats les plus significatifs sont rassemblés dans le Tableau 4.1.

Tableau 4.1 *: Etude de la synthèse de la* N-*propargyldiéthanolamine.*

Essai	Solvant	Réactifs $BrCH_2CCH$ / K_2CO_3 (éq.)	Mode d'activation	Temps	Rendement
Nieman et coll.[5]	CH_2Cl_2	1 / 1	T.A.	60h	25%
Lonsdale et coll.[6]	Acétone	1,1 / 1,1	Δ, 80°C	24h	45%
1	CH_2Cl_2	1,6 / 1,2	M.O. (30°C, 300 W)	2h	20%
2	CH_3CN	1 / 2	Δ, 80°C	6h	63%
3	DMF	1 / 2	Δ, 80°C	6h	73%
4	DMF	1 / 2	M.O. (80°C, 500W)	30 min	44%

Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser une quantité stœchiométrique de bromure de propargyle et de l'introduire goutte-à-goutte dans le milieu, en présence d'un excès limité de carbonate de potassium (essais 2 et 3). Différents solvants organiques ont été testés et seule l'utilisation de l'acétonitrile a conduit à un rendement intéressant de 63%. L'utilisation du diméthylformamide, dans ces mêmes conditions (essai 3), a permis d'obtenir un rendement élevé de 73% et un temps de réaction relativement court de six heures. Un large excès de réactifs (5 équivalents) dans le DMF et un temps de réaction de 24 heures ont conduit à la formation de plusieurs produits, rendant la purification du brut réactionnel complexe. Ces différents produits résultent probablement de réactions d'alkylation sur les groupements hydroxyles de la diéthanolamine. Enfin, l'utilisation de l'irradiation micro-ondes (essai 4) semble favoriser les réactions secondaires de *O*-propargylation, avec la formation de composés di- et trialkylés. Le composé résultant de la *N*-propargylation est obtenu avec un rendement moyen de 44%.

L'optimisation de cette réaction nous a permis de réaliser cette synthèse, selon l'essai 3, à plus grande échelle (0,1 mol de réactifs) et d'obtenir le produit en quantité importante (10,17 g).

4.4. Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre(I).

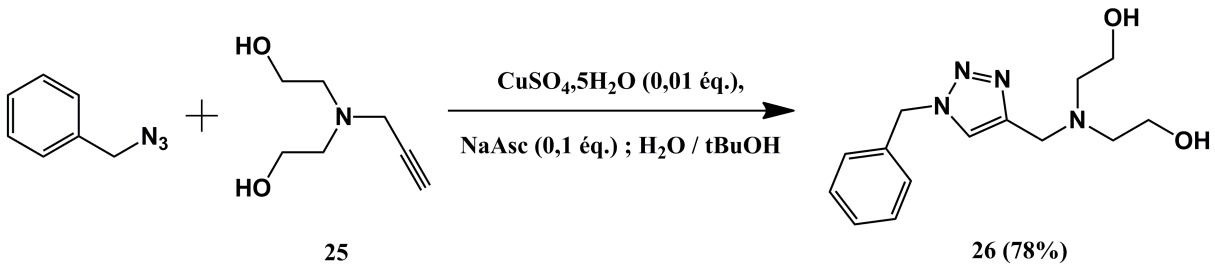
La deuxième étape de notre stratégie fait intervenir la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre(I) entre un alcyne vrai et un azoture (CuAAC). Nous avons choisi, dans un premier temps, d'utiliser un azoture commercial et facilement disponible, l'azoture de benzyle, pour l'étude du couplage avec la *N*-propargyldiéthanolamine.

4.4.1. Couplage entre la *N*-propargyldiéthanolamine et l'azoture de benzyle.

La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre l'azoture de benzyle et la N-propargyldiéthanolamine a été réalisée en utilisant un système de catalyseur classique : iodure de cuivre(I) et diisopropyléthylamine. Réalisée dans le DMF et sous irradiations micro-ondes (300 W, 80°C), le suivi de la réaction par CCM montre que les produits de départ ne disparaissent pas, même après plusieurs minutes d'activation. Le produit **26** n'est obtenu qu'avec un rendement de 44%.

Afin d'améliorer ce rendement, la réaction a été réalisée en utilisant un autre système catalytique, sulfate de cuivre / ascorbate de sodium et dans un mélange eau / *tertio*butanol, sous irradiation micro-ondes à 300 W et 80°C, selon un mode opératoire mis au point au

laboratoire.[67] Après trois minutes d'activation, on constate sur CCM la disparition de l'alcyne de départ et la formation du composé attendu. Celui-ci est obtenu, après purification, avec un rendement de 78% (Schéma 4.4).



25 **26 (78%)**

Schéma 4.4 *: Réaction de CuAAC entre l'azoture de benzyle et la N-propargyldiethanolamine.*

Le spectre RMN du proton montre l'apparition de 5 protons aromatiques entre 7,36 et 7,28 ppm. La présence d'un singulet résonant à 8,03 ppm, correspondant au proton H-5 du triazole, confirme la sélectivité du couplage, l'isomère 1,5-triazole n'étant pas formé. La spectrométrie de masse confirme cette structure avec des pics [MH^+] à *m/z* 277 et [MNa^+] à *m/z* 299.

Ce deuxième essai ayant donné un bon résultat, nous avons donc choisi d'utiliser le système sulfate de cuivre / ascorbate de sodium pour réaliser les réactions de couplage entre la *N*-propargyldiéthanolamine et les différents composés azoturés.

4.4.1. Choix des composés azoturés.

Le choix des composés azoturés est d'une grande importance car il permettra de moduler l'activité biologique de ces nouvelles moutardes à l'azote. Nous nous sommes tournés vers plusieurs composés dont la synthèse est aisément reproductible à grande échelle (Figure 4.1).

67 R. Lucas, R. Zerrouki, R. Granet, P. Krausz, Y. Champavier, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5467-5471.

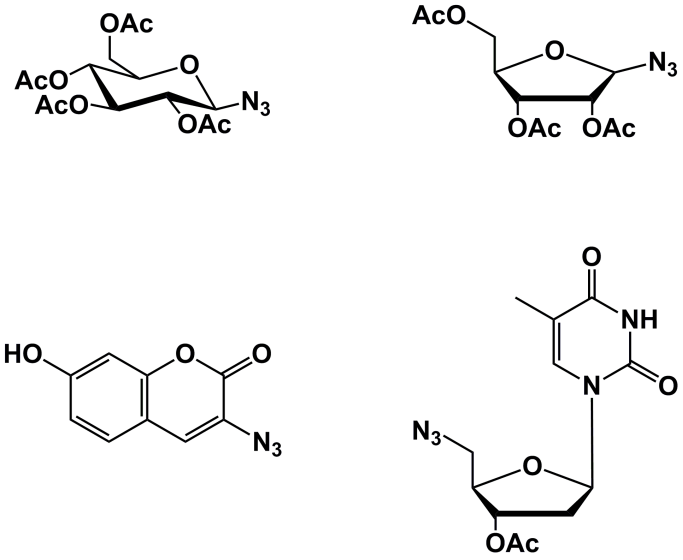


***Figure 4.1** : Différents composés azoturés utilisés.*

Le β-D-azidoglucopyranose a été choisi afin de déterminer l'effet biologique de la partie glucidique sur des cellules ayant un important métabolisme mitochondrial.

Nous avons choisi le β-D-azidoribofuranose afin de synthétiser une moutarde à l'azote, analogue de nucléoside pyrimidique. Ce type d'analogue de nucléoside triazolique a déjà été décrit par Benhida et coll.[68] Nous étudierons l'effet de cette structure sur la vectorisation et la cytotoxicité du composé final.

Décrite par Sivakumar et coll.,[69] la 3-azido-7-hydroxycoumarine donnera, après réaction de CuAAC, un composé fluorescent par formation du 1,2,3-triazole. Après chloration, la moutarde à l'azote dérivée pourra servir de fluorophore lors des tests biologiques et nous permettra de visualiser la localisation de ce composé au sein des cellules cancéreuses.

Enfin, dans la continuité des travaux effectués dans notre équipe de recherche,[70] un dérivé de la thymidine, modifiée en position 5', a été synthétisé. Dans ce cas, nous cherchons encore à combiner analogue de nucléosides et moutardes à l'azote.

68 R. Guezguez, K. Bougrin, K. El Akri, R. Benhida, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4807-4811.

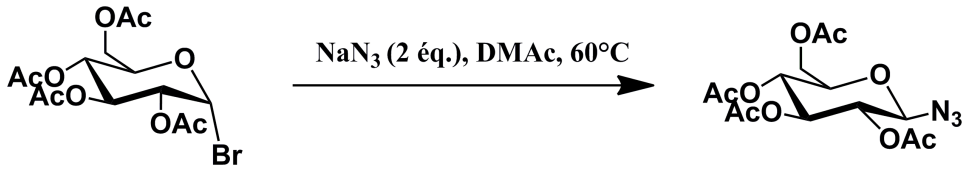
69 K. Sivakumar, F. Xie, B.M. Cash, S. Long, H.N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Letters* **2004**, *6*, 4603-4606.

70 R. Lucas, R. Zerrouki, R. Granet, P. Krausz, Y. Champavier, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5467-5471.

4.4.2. Synthèses des composés azoturés.

4.4.2.1. Synthèse du 1-azido-1-désoxy-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-β-D-glucopyranose.

L'azidation du 1-bromo-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-α-D-glucopyranose commercial a été réalisée en présence de deux équivalents d'azoture de sodium, dans le diméthylacétamide à 60°C (Schéma 4.5).[71] Après quatre heures de réaction et traitement, le solide obtenu est rincé à l'éther diéthylique puis séché. Le produit azoturé **27**, obtenu avec un rendement de 70%, est quasi-pur et utilisé tel quel pour la réaction de CuAAC.



27 (70%)

***Schéma 4.5** : Azidation du bromoglucopyranose.*

La spectroscopie infrarouge montre la présence du groupement azido par l'apparition d'une bande caractéristique à 2120 cm^{-1}. La RMN du proton montre une constante de couplage élevée de 8,8 Hz entre le proton anomérique H-1 et le proton voisin H-2, attestant de la forme β du sucre. On retrouve aussi tous les signaux caractéristiques du glucose tetraacétylé.

71 V. Neto, R. Granet, P . Krausz, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4633-4646.

4.4.2.2. Synthèse du 1-azido-1-désoxy-2,3,5-tri-*O*-acétyl-β-D-ribofuranose.

Le 1-azido-1-désoxy-2,3,5-tri-*O*-acétyl-β-D-ribofuranose a été synthétisé selon la méthode de Kobe et coll.[72] Elle consiste en la réaction du *per*acétyl-β-D-ribofuranose en présence d'une quantité quasi-stœchiométrique d'azidotriméthylsilane (1,1 équivalents) et d'une quantité catalytique d'acide de Lewis, soit 0,05 équivalents de tétrachlorure d'étain (Schéma 4.6).

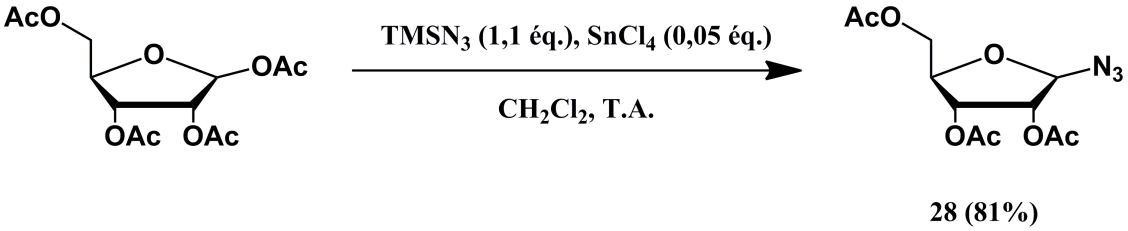


***Schéma 4.6** : Azidation du peracétyl-β-D-ribofuranose.*

Après quatre heures de réaction, traitement, puis purification, le composé azoturé **28** est obtenu avec un rendement de 81%. La spectroscopie de RMN du proton montre notamment la disparition d'un groupement acétate et la spectrométrie de masse confirme cette structure, avec la présence d'un pic [M+Na$^+$] à *m/z* 324,0804.

4.4.2.3. Synthèse de la 3-azido-7-hydroxycoumarine.

La synthèse de la 3-azido-7-hydroxycoumarine a été réalisée selon la méthode décrite par Sivakumar et coll.[69]. Une première étape consiste en la condensation du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde et de la N-acétylglycine en présence d'acétate de sodium, dans l'anhydride acétique à reflux durant quatre heures. Le produit est alors isolé par simple précipitation dans l'eau. Les trois étapes suivantes sont réalisées "one-pot", elles permettent la désacétylation de l'intermédiaire précédemment isolé dans un mélange HCl_{aq} / Ethanol à reflux. Enfin, l'introduction de la fonction azoture se fait directement sur le mélange par l'intermédiaire de la formation d'un sel de diazonium (Schéma 4.7).

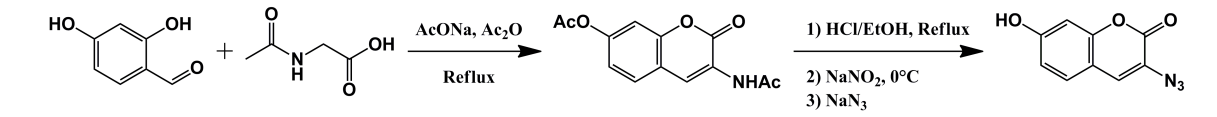


***Schéma 4.7** : Synthèse de la 3-azido-7-hydroxycoumarine.*

72 A. Štimac, J. Kobe, *Carbohydr. Res.* **1992**, *232*, 359–365.

Les premiers essais de cette synthèse ont été réalisés en respectant le mode opératoire décrit par les auteurs mais ont conduit à un rendement global faible de l'ordre de 7%, en désaccord avec le rendement de 54% obtenu par les auteurs. L'analyse RMN du composé obtenu concorde en tout point avec les données de la littérature et la spectroscopie IR montre la présence d'une bande caractéristique de la fonction azoture à 2120 cm^{-1}. Seul un essai, dans lequel le temps de réaction de la première étape a été augmenté (16 heures), a permis d'atteindre un rendement de 12%. Ce rendement peut sembler modeste au vu des résultats obtenus par les auteurs, mais on constate dans la littérature des variations dans les rendements obtenus par d'autres équipes.[73] Ces rendements varient entre 5 et 54%.

4.4.2.4. Synthèse de la 3'-*O*-acétyl-5'-azidothymidine.

La 3'-*O*-acétyl-5'-azidothymidine a été obtenue par modification de la thymidine en trois étapes. Tout d'abord, la thymidine est tosylée sélectivement en position 5'. Puis la position 3' est acétylée afin de la protéger lors de l'étape de chloration. Enfin, le groupement tosylate a été substitué par l'azoture de sodium (Schéma 4.8).

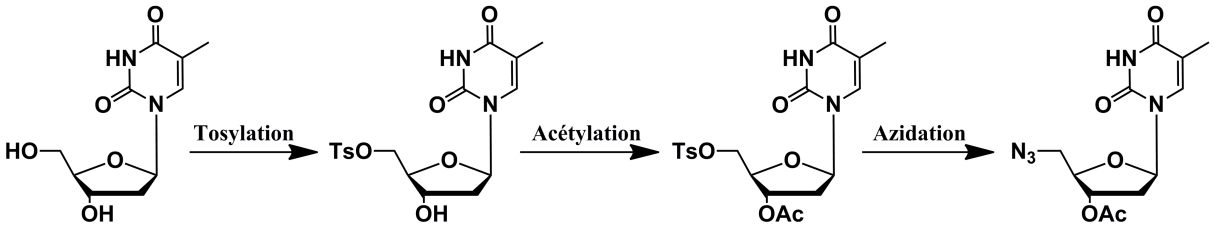


***Schéma 4.8** : Stratégie de synthèse de la 3'-O-acétyl-5'-azidothymidine.*

4.4.2.4.1. Tosylation de la position 5' de la thymidine.

La thymidine est tosylée dans la pyridine, à 0°C, en présence de 1,2 équivalents de chlorure de *p*-toluènesulfonyle (TsCl) (Schéma 4.9).[74] Après une heure sous agitation, la CCM montre que la réaction est terminée. Le composé **30** est obtenu après purification avec un rendement de 74%.

73 (a) L. Yi, J. Shi, S. Gao, S. Li, C. Niu, Z. Xi, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *50*, 769-762 ; (b) R. Jolck, H. Sun, R.H. Berg, T.L. Andresen, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3326-3331 ; (c) T.M. Gokmen, J. Brassinne, R.A. Prasath, F.E. Du Prez, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4652-4654 ; (d) R. Rajaganesh, P. Ravinder, V. Subramanian ; T. Mohan Das, *Carbohydrate Res.* **2011**, *346*, 2327-2336.

74 K. Gogoi, A.D. Gunjal, U.D. Phalgune, V.A. Kumar, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2697-2700.

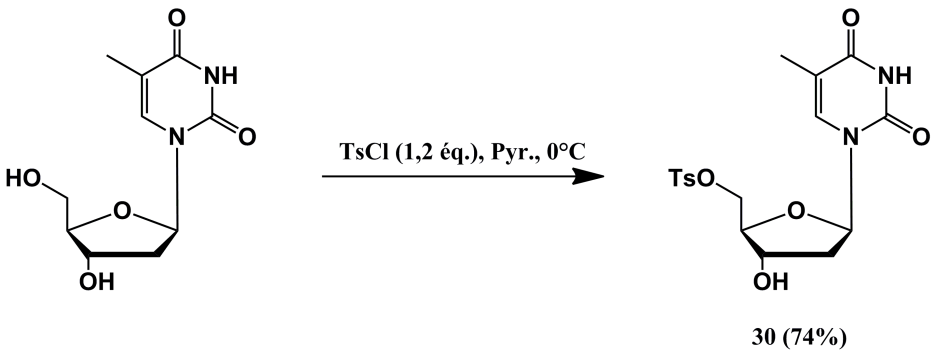


Schéma 4.9 *: Tosylation de la thymidine.*

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 tosyle. Les signaux correspondants aux protons de la thymidine sont également observés. La spectrométrie de masse confirme cette structure ($[MNa]^+$ à *m/z* 419).

4.4.2.4.2. Acétylation de la 5'-O-tosylthymidine.

La 5'-*O*-tosylthymidine est acétylée dans un mélange anhydride acétique / pyridine (1/1 ; v/v) à température ambiante (Schéma 4.10). Le suivi par CCM de la réaction montre, au bout d'une heure, que le produit de départ a totalement disparu. Le composé **31** est obtenu quasi-pur après simple traitement du brut réactionnel avec un rendement de 90%.

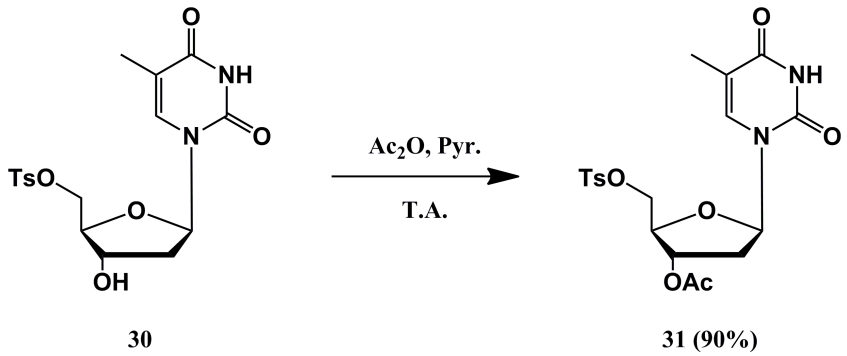
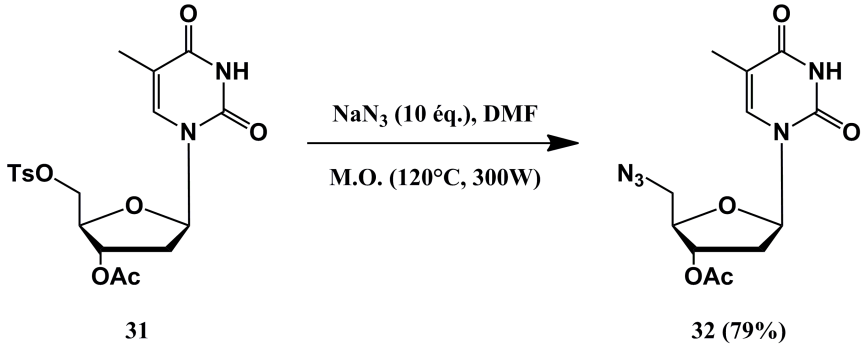


Schéma 4.10 *: Acétylation de la 5'-O-tosylthymidine.*

L'analyse par spectroscopie RMN du proton montre l'apparition d'un singulet à 2,03 ppm correspondant aux trois protons du groupement acétyle. On constate par ailleurs la disparition du signal caractéristique du proton du groupement hydroxyle en position 3'.

4.4.2.4.3. Azidation de la 3'-O-acétyl-5'-O-tosylthymidine.

La substitution nucléophile du groupement tosylate a été réalisée dans le DMF en présence de dix équivalents d'azoture de sodium (Schéma 4.11). Après cinq minutes d'activation par irradiations micro-ondes (120°C, 300 W), le produit **32** est obtenu par traitement puis précipitation dans l'éther diéthylique avec un rendement de 79%.



31 **32 (79%)**

Schéma 4.11 *: Azidation de la 3'-O-acétyl-5'-O-tosylthymidine.*

L'analyse par spectroscopie IR du composé montre l'apparition d'une bande caractéristique des fonctions azotures à 2029 cm^{-1} et la disparition de la bande des fonctions sulfonyles à 1363 cm^{-1}. Cette modification structurale est confirmée par la spectroscopie de RMN, où l'on constate une disparition des protons caractéristiques du groupement tosyle. De plus, on remarque un blindage des protons de la position 5', passant de 4,26 ppm et 4,33 ppm à 3,61 ppm et 3,66 ppm.

4.4.3. Réactions de couplage de la *N*-propargyldiéthanolamine et des composés azoturés.

La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre la N-propargyldiéthanolamine et les différents composés azoturés synthétisés a été réalisée selon les conditions précédemment choisies : système ascorbate de sodium / sulfate de cuivre, mélange eau / *tertio*butanol et activations par irradiations micro-ondes à 80°C et 300 W (Schéma 4.12).

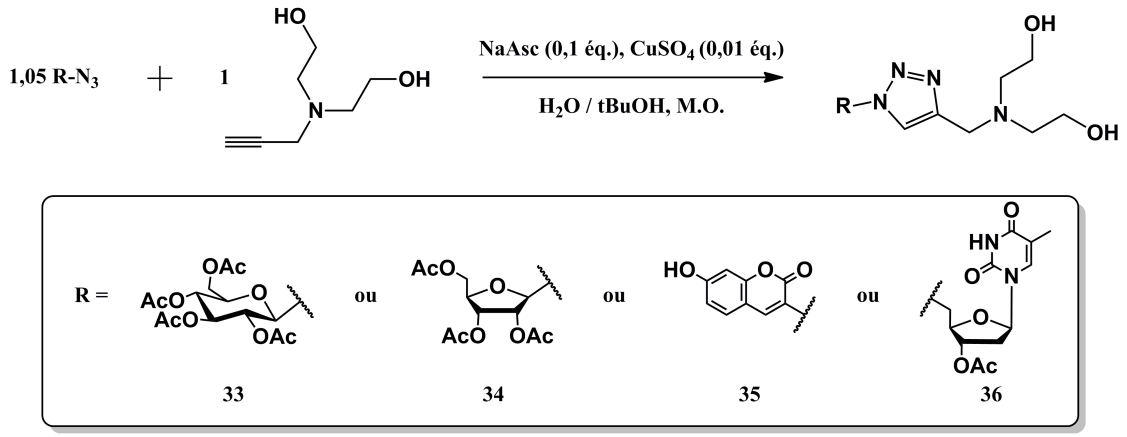


Schéma 4.12 *: Réactions de CuAAC.*

Les différents résultats obtenus à l'issue de cette étape sont regroupés dans le Tableau 4.2.

Tableau 4.2 *: Synthèse des composés* ***33, 34, 35*** *et* ***36****.*

Composé azoturé	Temps d'activation	Composé issu de la CuAAC	Rendement
27	1 min	**33**	Quantitatif
28	4 min	**34**	71%
29	2 min	**35**	78%
32	3 min	**36**	64%

Ces différentes réactions de couplage ont conduit aux composés attendus avec des rendements variant entre 64 et 100%, dans des temps de réactions très courts, compris entre 1 et 4 minutes.

L'analyse par spectroscopie de RMN montre dans tous les cas la formation du cycle triazole substitué en positions 1 et 4, notamment par la présence du proton H-5, et l'apparition des signaux caractéristiques de la diéthanolamine (Tableau 4.3).

Tableau 4.3 *: Analyses ^{1}H RMN (DMSO-d_6, 400 MHz) et HRMS des composés* ***33***, ***34***, ***35*** *et* ***36****.*

	δ_H (mult, J en Hz)					
Composé	H-5 Triazole	-CH_2-N	CH_2(β)	CH_2(α)	-OH	HRMS (MH^+)
33	8,27 (s)	3,76 (s)	3,44 (q ; 5,4)	2,48 (t ; 5,6)	4,32 (t ; 5,6)	517,2143
34	8,20 (s)	3,79 (s)	3,46 (dt ; 6,2 ; 5,5)	2,52 (t ; 6,2)	4,35 (t ; 5,5)	445,1930
35	8,45 (s)	3,87 (s)	3,49 (t ; 6,2)	2,57 (t ; 6,2)	4,40 (m)	347,1352
36	7,99 (s)	3,75 (s)	3,44 (t ; 6,1)	2,50 (m)	4,33 (m)	489,1414

On observe également tous les autres protons caractéristiques des molécules couplées. La spectrométrie de masse haute résolution vient confirmer la structure de ces composés.

Dans le cas du composé **35**, dérivé de la coumarine, on confirme que la formation du triazole a provoqué l'apparition d'un phénomène de fluorescence. Nous avons déterminé par spectrophotométries UV-visible et de fluorescence les longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission de cette molécule (Figure 4.2).

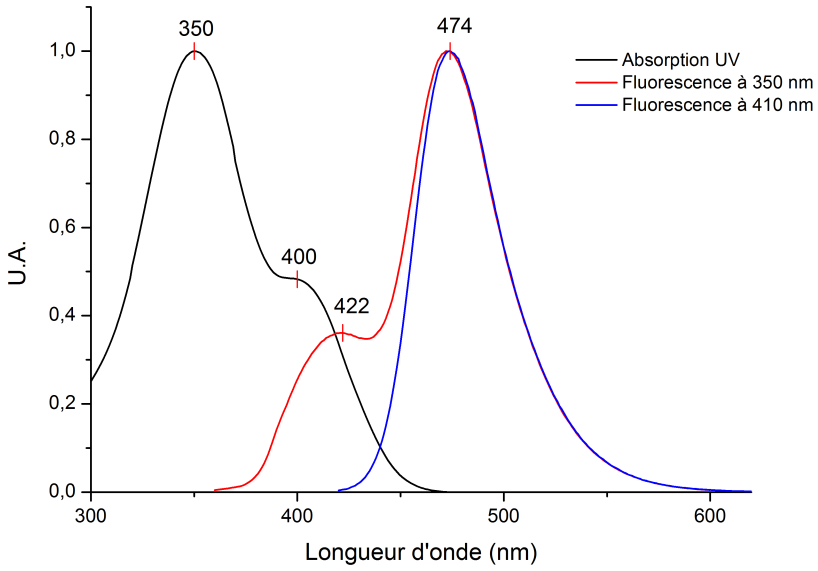


Figure 4.2 *: Spectre d'absorption UV-visible et de fluoresence du composé* ***35****.*

On constate sur le spectre UV-visible la présence de deux maximums d'absorption à 350 et 400 nm. Ces maximums d'absorption conduisent, en fluorescence, à deux spectres

d'émission. Il s'agit en fait des deux formes tautomères du composé (Schéma 4.13), phénomène caractéristique des 7-hydroxycoumarines.[75]

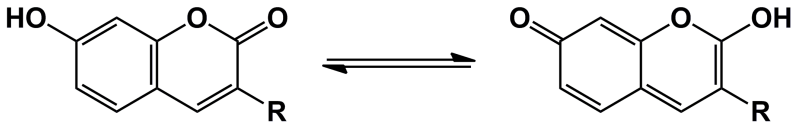


Schéma 4.13 *: Formes tautomères des 7-hydroxycoumarines.*

En combinant cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre(I) et activations par irradiations micro-ondes, nous avons obtenu les composés intermédiaires avec de bons rendements et dans des temps de réactions très courts. Nous avons ainsi pu confirmer l'efficacité de la réaction choisie pour l'étape de couplage des différents composés azoturés avec la *N*-propargyldiéthanolamine.

4.5. Etape finale de chloration.

L'étape de chloration est une étape limitante dans la synthèse des moutardes à l'azote, car elle fait souvent intervenir des conditions drastiques, incompatibles avec l'utilisation de molécules telles que les glucides ou les nucléosides. Nous avons réalisé cette réaction en utilisant le composé **26**, comme molécule de référence.

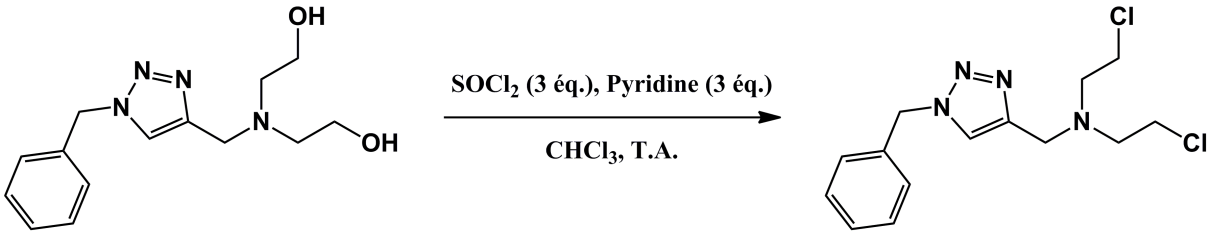
4.5.1. Etude de la réaction de chloration.

4.5.1.1. Chloration par le système $SOCl_2$ / Pyridine.

L'utilisation du chlorure de thionyle par solvolyse est à exclure dans le cas de produits sensibles aux acides forts car cette méthode génère de l'acide chlorhydrique entraînant des dégradations. Nous avons utilisé la pyridine en combinaison avec le chlorure de thionyle, comme dans le cas des analogues de bases puriques.

Nous avons donc réalisé un essai en mettant le composé **26** en présence de 3 équivalents de chlorure de thionyle et de 3 équivalents de pyridine dans le chloroforme, à température ambiante (Schéma 4.14).

75 (a) R.H. Goodwin, B.M. Pollock, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1954**, *49,* 1-6 ; (b) M. Hoshiyama, K. Kubo, T. Igarashi, T. Sakurai, *J Photochem. and Photobiol. A: Chemistry* **2001**, *138,* 227-233.



26 **37**

Schéma 4.14 *: Chloration par le système $SOCl_2$ / Pyridine.*

Après 16 heures de réaction, le suivi par CCM nous indique la disparition totale du produit de départ. Après purification, le composé **37** est obtenu avec un rendement moyen de 51%. Au vu de ce résultat, nous avons travaillé à la mise au point de la réaction en faisant varier les quantités de réactifs et le mode d'activation. Les résultats les plus significatifs sont rassemblés dans le Tableau 4.4.

Tableau 4.4 *: Etude de la chloration par $SOCl_2$ / Pyridine.*

Essai	Réactifs $SOCl_2$ / Pyridine (éq.)	Mode d'activation	Temps	Rendement
1	3 / 3	T.A.	16h	51%
2	6 / 6	T.A.	16h	53%
3	3 / 3	U.S.	4h	61%
4	3 / 3	M.O. (50°C, 200 W)	30 min	53%

En augmentant les quantités de chlorure de thionyle et de pyridine (essai 2), on ne constate pas d'amélioration, le rendement étant similaire pour un temps de réaction identique. L'utilisation d'activation par ultrasons (essai 3), pendant quatre heures, a conduit à une augmentation du rendement et à une diminution importante du temps de réaction. Enfin, l'utilisation d'activation par irradiations micro-ondes permet de faire passer ce temps de réaction à 30 min pour un rendement moindre de 53%. Toutefois, au-delà de 30 minutes, on n'observe pas d'amélioration significative de ce rendement. On constate par spectroscopie RMN du proton la disparition des signaux correspondant aux groupements hydroxyles, entraînant un changement de la multiplicité du signal des protons H-β, passant d'un quadruplet à un triplet. On note aussi un déblindage des signaux des protons proches des chlores (Tableau 4.5).

***Tableau 4.5** : Comparaison des données ^1H RMN des composés **26** et **37**.*

	δ_H (mult, J en Hz)	
Position	Composé **26**	Composé **37**
H-5 Triazole	7,44 (s)	8,03 (s)
H-Aromatiques	7,36 (dd ; 6,8 ; 7,3) ; 7,33 (d ; 6,8) ; 7,28 (d ; 7,3)	7,34 (m) ; 7,26 (m)
CH_2 benzyle	5,57 (s)	5,53 (s)
OH	4,33 (t ; 5,4)	-
CH_2-N	3,74 (s)	3,90 (s)
Hβ	3,44 (q ; 5,4)	3,52 (t ; 6,8)
Hα	2,50 (t ; 6,1)	2,91 (t ; 6,8)

De plus, cette structure est confirmée par la spectrométrie de masse haute résolution avec un pic [MH^+] à *m/z* 313,0984. Deux pics isotopiques à *m/z* 315,0955 et *m/z* 317,0927 viennent confirmer la présence des deux atomes de chlores.

Le rendement obtenu étant moyen, nous avons testé d'autres méthodes de chloration afin d'améliorer ce résultat.

4.5.1.2. Chloration par la méthode de Appel.

Réalisée dans le tétrachlorométhane à reflux en présence de triphénylphosphine, la méthode de Appel est une méthode classique de chloration des groupements hydroxyles. Elle a été largement étudiée dans la littérature et de nombreuses variantes existent.[76] Nous avons donc appliqué ces conditions au composé **26**. Un essai a été réalisé dans le tétrachlorométhane

76[14] (a) R. Appel, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 801 ; (b) *Organophosphorus Reagents in Organic Synthesis*, ed. Cadogan, J.I.G., *Academic Press*, London, **1979**, ch. 9 ; (c) W. Pluempanupat, O. Chantarasriwong, P. Taboonpong, D.O. Jang, W. Chavasiri, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 223-226. (d) R.M. Denton, J. An, B. Adeniran, *Chem. Commun.* **2010,** *46*, 3025-3027.

en présence de trois équivalents de triphénylphosphine. La réaction se déroule en milieu hétérogène car le composé **26** n'est pas soluble dans le tétrachlorométhane. Même après 48 heures de réaction, la CCM ne montre aucune évolution. Nous avons alors réalisé la réaction dans un mélange tétrachlorométhane / chloroforme afin d'éviter ces problèmes de solubilité. On constate dans ce cas la disparition du composé **26** et la formation d'un nouveau composé dans un temps particulièrement long de 48 heures. L'analyse du produit obtenu montre que nous sommes en présence du produit de monochloration. L'augmentation du nombre d'équivalents de triphénylphosphine n'apporte aucune amélioration.

4.5.1.3. Chloration via un intermédiaire mésylé.

Nous avons testé une des méthodes de chloration les plus utilisées en synthèse organique. Elle se déroule en deux étapes, d'abord la mésylation du composé dihydroxylé puis la chloration de ce composé mésylé par le chlorure de lithium.[77] Le composé **26** est mis en présence de 2,5 équivalents de chlorure de mésyle et de 3 équivalents de triéthylamine dans le chloroforme à température ambiante.

Le suivi par CCM montre après une heure de réaction la présence du produit de départ et de plusieurs produits formés. Des modifications du mode opératoire comme l'abaissement de température (0°C) ou l'augmentation de la quantité de chlorure de mésyle ou le remplacement de celui-ci par le chlorure de tosyle n'ont pas permis l'obtention de résultats satisfaisants.

4.5.1.4. Chloration par utilisation d'une variante de la réaction de Vilsmeier-Haack.

La réaction de Vilsmeier-Haack est une réaction qui a été décrite dans le but de réaliser la formylation de composés aromatiques.[78] Sous ces mêmes conditions, des réactions de chloration ont été observées sur des groupements hydroxyles. La réaction de Vilsmeier-Haack fut donc « détournée ». Plusieurs publications décrivent ces variantes pouvant

77 B. Coggiola, F. Pagliai, G. Allegrone, A.A. Genazzani, G.C. Tron, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3551-3554.

78 A. Vilsmeier, A. Haack, *Chem. Ber.* **1927**, *60*, 119.

intervenir entre des chlorures d'acides[79] ou des chlorures de sulfonyles[17] et le diméthylformamide. Ce type de réactions est souvent réalisé dans des conditions douces et conduisent aux produits de chloration dans de bons rendements.

Un premier essai de chloration a été réalisé selon la méthode développée par Dubey et coll.,[79] utilisant le DMF et le chlorure de pivaloyle comme agent de chloration. Le composé **26** a été mis en présence de 3 équivalents de chlorure de pivaloyle dans le DMF à température ambiante. Même après plusieurs jours de réaction, on ne constate aucune évolution de la réaction. L'utilisation par la suite d'irradiation micro-ondes (300 W et 80°C) pour activer la réaction ne conduit pas à la disparition du produit de départ.

Un autre essai a été réalisé selon la méthode de Lucas et coll.[17] faisant intervenir le chlorure de tosyle (3 équivalents) comme agent chlorant, dans le DMF et sous irradiation micro-ondes (80°C, 300 W). Là encore, aucune réaction n'est observée. Ni l'augmentation du temps d'irradiation, ni l'ajout de chlorure de tosyle ne conduisent au composé attendu.

4.5.2. Chloration des composés générés par réaction de « click chemistry ».

Après cette étude de la réaction de chloration et compte tenu des résultats obtenus, nous avons appliqué les conditions qui ont donné les meilleurs rendements. La chloration des composés **33**, **34**, **35** et **36** a été réalisée dans le chloroforme en présence de 3 équivalents de chlorure de thionyle et de 3 équivalents de pyridine, sous activation par ultrasons (Figure 4.3). Dans le cas du composé **40**, dérivé de la coumarine, on obtient un bon rendement de 74%. Pour les trois autres composés **38**, **39** et **41**, on constate que les rendements sont moyens, mais restent acceptables pour cette étape de chloration. Ils varient entre 47 et 57%

79 A. Dubey, A.K. Upadhyay, P. Kumar, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 744-746.

[17] R. Lucas, V. Neto, A. Hadj-Bouazza, R. Zerrouki, R. Granet, P. Krausz, Y. Champavier, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 1004-1007.

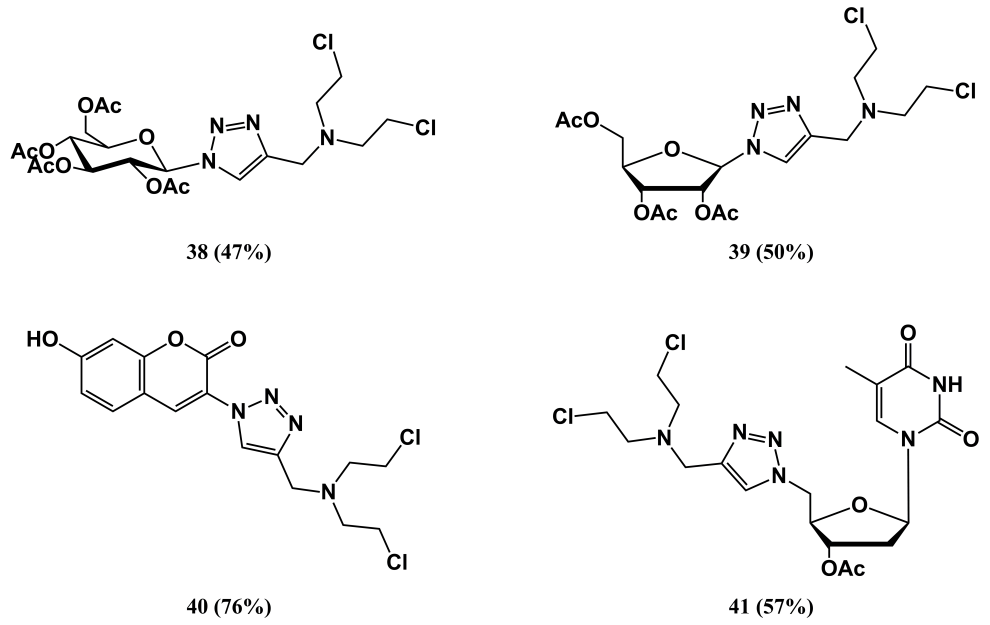


Figure 4.3 *: Chloration des intermédiaires dihydroxylés.*

L'analyse par spectroscopie de RMN de ces composés issus de la chloration montre la disparition des signaux caractéristiques des groupements hydroxyles et un déblindage des protons du groupement bis-2-chloroéthyle (de 0,2 à 1,2 ppm) et du proton H-5 du groupement triazole (de 0,1 à 0,6 ppm). Toutes ces structures sont confirmées par spectrométrie de masse, où l'on observe la présence de pics isotopiques (Tableau 4.6).

Tableau 4.6 *: Analyses ^{1}H RMN (DMSO-d_6, 400 MHz) et HRMS des composés* ***38***, ***39***, ***40*** *et* ***41***.

Position	**38**	**39**	**40**	**41**
H-5 triazole	8,35 (s)	7,80 (s)	8,65 (s)	8,02 (s)
-CH_2-N	3,86 (s)	4,02 (s)	3,87 (s)	3,85 (s)
$CH_2(\alpha)$	2,80 (t ; 6,8)	3,00 (m)	3,34 (m)	3,66 (t ; 6,7)
$CH_2(\beta)$	3,62 (m)	3,60 (m)	3,99 (m)	3,62 (t ; 6,7)
HRMS (MH^+)	553,1462 555,1431	481,1252 483,1225	383,0674 385,0645	489,1414 491,1388

557,1460	485,1205	387,0631	493,1367

4.5.2. Déprotection des composés acétylés.

Les composés **38**, **39** et **41**, comportant des groupements acétyles, ont été déprotégés en utilisant une solution d'ammoniac méthanolique à 7M. Après une heure de réaction, la CCM montre la disparition totale du produit de départ. Après purification sur plaques préparatives, les composés **42**, **43** et **44** sont obtenus avec des rendements de 67%, 73% et 79%, respectivement (Figure 4.4).

Les analyses par spectroscopie de RMN des composés déprotégés montrent la disparition des signaux caractéristiques des groupements acétyles.

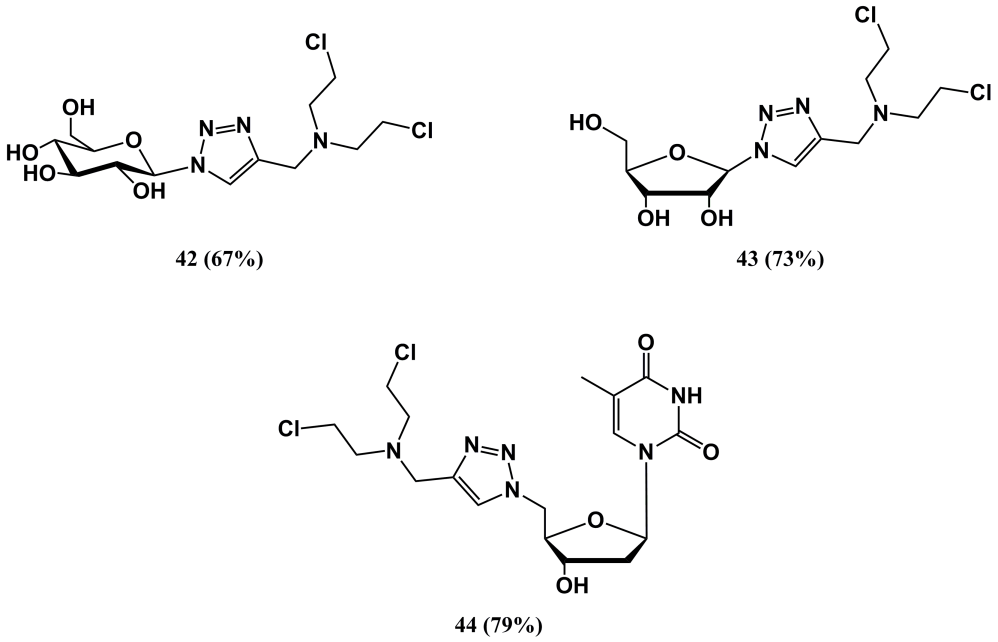


***Figure 4.4** : Déprotection des composés **38**, **39** et **41**.*

Dans le cas du composé **42**, lors de son extraction de la silice dans un mélange chloroforme/éthanol, on observe la formation d'un composé avec un faible rapport frontal sur CCM. La spectrométrie de masse montre un pic ($M+H^+$) à *m/z* 384,0969 correspondant au composé **42** et un deuxième pic à *m/z* 733,2239 pouvant correspondre à un produit de dimérisation de ce composé par réaction d'un groupement hydroxyle d'une molécule sur une chaîne alkylante d'une deuxième molécule (Figure 4.5).

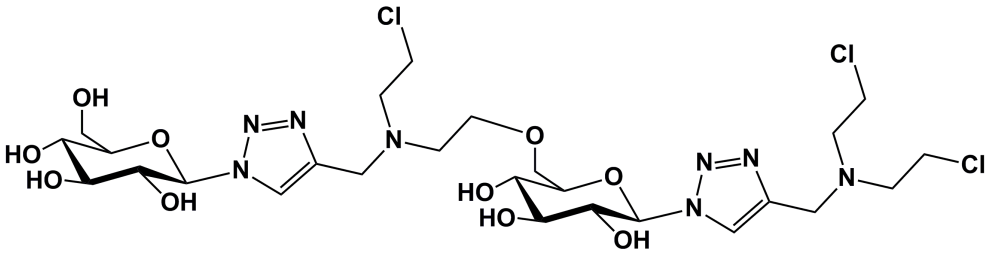


***Figure 4.5** : Structure supposée du produit de dimérisation du composé **42**.*

4.6. Conclusion.

La stratégie de synthèse que nous avons proposée, développée autour de la réaction de « click chemistry », s'est avérée particulièrement intéressante. La mise au point de la propargylation de la diéthanolamine et la régiosélectivité de la réaction a permis d'obtenir un synthon de départ avec un bon rendement, celui-ci portant les deux bras hydroxylés qui conduiront aux deux chaînes alkylantes après chloration. L'utilisation de la CuAAC a permis d'introduire des motifs variés au sein des structures. Enfin, l'étape de chloration conduit à des rendements acceptables dans des conditions douces, permettant ainsi l'application de cette stratégie de synthèse à des composés sensibles, tels que le glucose, le ribose ou la thymidine. Cette étude ouvre la voie à l'élaboration de nouvelles moutardes à l'azote aux motifs variés. Enfin, l'évaluation biologique de ces composés nous permettra de conclure quant à l'efficacité de telles structures vis-à-vis des cellules cancéreuses.

CHAPITRE V

Evaluation biologique de moutardes à l'azotes à motifs puriques pyrimidiques ou triazoliques

Une évaluation biologique d'une partie des agents alkylants synthétisés a été réalisée au laboratoire sous la direction du Docteur Tan-Sothea Ouk. Ces composés ont été testés sur différentes lignées de cellules cancéreuses. Nous avons évalué la cytotoxicité de ces molécules sur des cellules cancéreuses en culture *in vitro* puis nous avons analysé leur impact sur le cycle cellulaire.

5.1. Molécules testées.

Nous avons étudié les effets de huit molécules (Figure 5.1). Les composés **12**, **15**, **36**, **39** et **41** ont été synthétisés au cours de ce travail. La *N,N*-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymin-1-yl)acétamide (**DClETAc**) et la chloroéthyluridine (**ClEU**) sont deux composés déjà préparés au laboratoire dans le cadre du même programme de synthèse d'agents alkylants.[41,42] Ces composés ont montré des résultats intéressants lors de tests préliminaires. Le chlorambucil (CLB) a été utilisé comme référence tout au long des tests effectués.

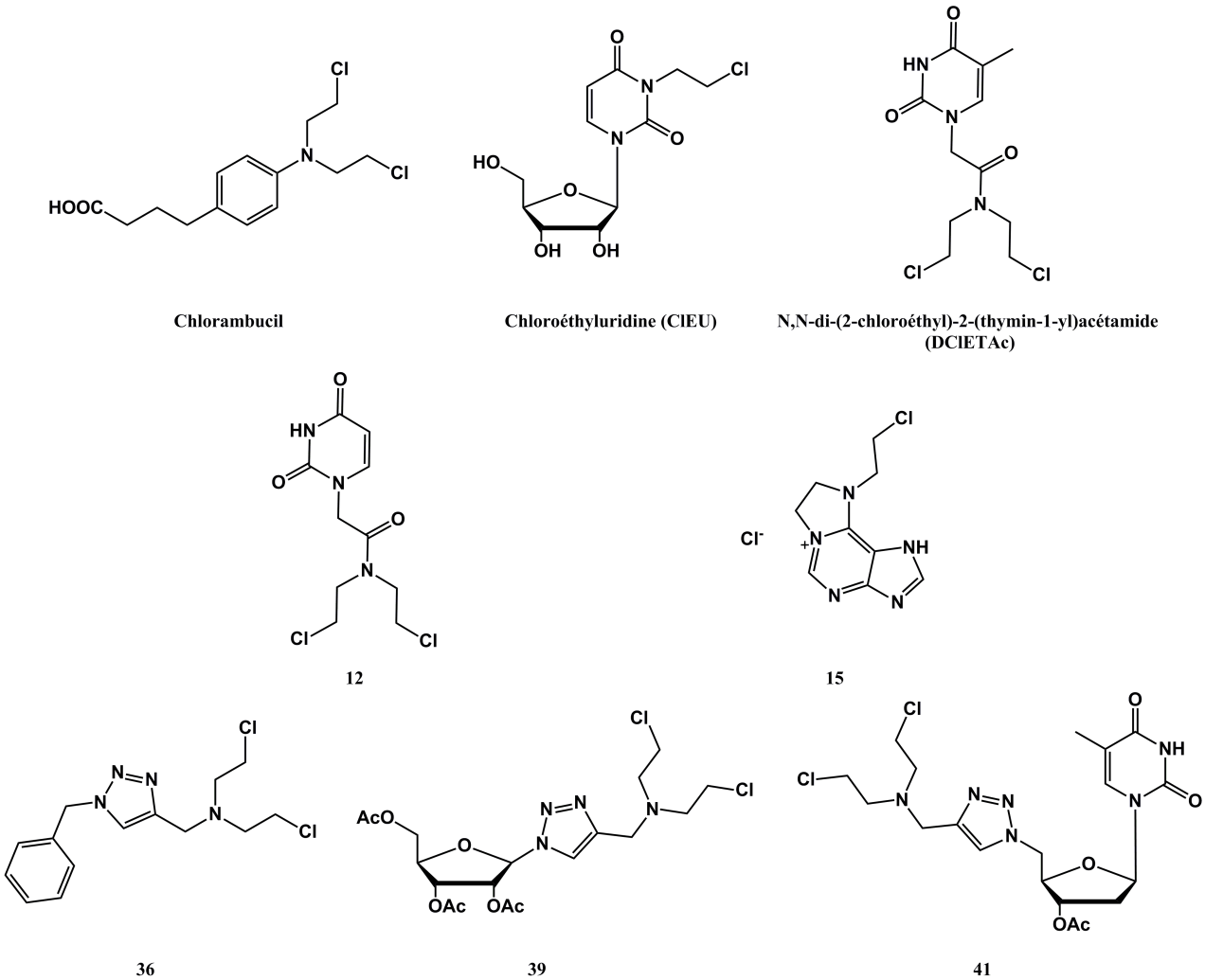


Figure 5.1 *: Molécules testées.*

5.2. Choix des lignées cellulaires testées.

Afin de réaliser l'évaluation biologique de ces composés, nous avons choisi d'utiliser quatre lignées cellulaires représentatives des cibles thérapeutiques des agents alkylants : JURKAT, U266, K562 et A431.

5.2.1. Cellules JURKAT.

Les cellules JURKAT[80] sont des cellules cancéreuses dérivant de lymphocytes T immatures. Cette lignée cellulaire est issue d'une leucémie aigüe lymphoblastique. Cette maladie se traduit par l'accumulation de lymphoblastes malins dans la moelle osseuse puis dans le sang. Il s'agit d'un cancer particulièrement virulent et peut s'avérer fatal en quelques semaines sans traitement.[81]

5.2.2. Cellules K562.

Les cellules K562 sont des cellules myéloïdes multipotentes.[82]Elles sont représentatives de la leucémie lymphoïde chronique, maladie caractérisée par la prolifération de cellules cancéreuses dans la moelle osseuse. A ce jour, aucun traitement de chimiothérapie ne s'est avérée réellement efficace contre ce type de cancer et seule la greffe de moelle osseuse, quand elle est possible, assure une rémission au patient.[83]

5.2.3. Cellules U266.

80 U. Schneider, H.-U. Schwenk, G. Bornkamm, *Int. J. Cancer* **1977**, *19*, 621-626.

81 M. Onciu, *Hematology/Oncology Clinics of North America* **2009**, *23*, 655-674.

82 C.B. Lozzio, B.B. Lozzio, *Blood* **1975**, *45*, 321-333.

83 J.M. Goldman, J.V. Melo, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1451-1464.

Les cellules U266 sont représentatives du myélome multiple.[84] Il s'agit de plasmocytes malins, s'accumulant dans la moelle osseuse et circulant peu dans le sang. Cette maladie passe souvent pour « incurable », avec des rechutes répétitives, même après greffe de moelle osseuse. D'ailleurs, on estime le temps moyen de survie du patient sous traitement à 45 mois actuellement.[85]

5.2.4. Cellules A431.

Il s'agit d'une lignée tumorale de cellules de carcinome épidermoïde vulvaire humain.[86] Il s'agit de cellules adhérentes et particulièrement proliférantes. Dans ce cas de cancer, l'un des traitements classiquement appliqués est le traitement par le cisplatine. Elles représentent donc un bon modèle pour étudier l'effet des agents alkylants synthétisés sur des tumeurs solides.

5.3. Effets des molécules testées sur la viabilité cellulaire.

Nous avons étudié l'effet des molécules synthétisées sur la viabilité cellulaire. Nous avons incubé les différentes lignées cellulaires en présence de concentration croissante des molécules durant 72 heures. Ces doses s'étendent de 3,9 µM à 2 mM afin de déterminer la concentration molaire inhibant 50% de la croissance cellulaire (CI_{50}). La viabilité cellulaire après traitement est évaluée selon le test colorimétrique au MTT développé par Mosmann.[87] Les différentes CI_{50}, exprimées en micromolaire (µM), obtenues en fonction des molécules et des lignées, sont représentées dans la Figure 5.2. Par ailleurs, nous avons constaté que les

84 K. Nilsson, H. Bennich, S.G.O. Johansson, J. Pontén, *Clin. Exp. Immunol.* **1970**, *7*, 477-489.

85 S.K. Kumar, S.V. Rajkumar, A. Dispenzieri, M.Q. Lacy, S.R. Hayman, F.K. Buadi, S.R. Zeldenrust, D. Dingli, S.J. Russell, J.A. Lust, P.R. Greipp, R.A. Kyle, M.A. Gertz, *Blood* **2008**, *111*, 2516-2520.

86 D.J. Giard, S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersey, H. Dosik, W.P. Parks, *J. Nat. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1417-1423.

87 T. Mosmann, *J. Immun. Methods* **1983**, *65*, 55-63.

composés **12**, **15** et **41** n'ont aucun effet notable sur la viabilité cellulaire, même à forte concentration (2 mM).

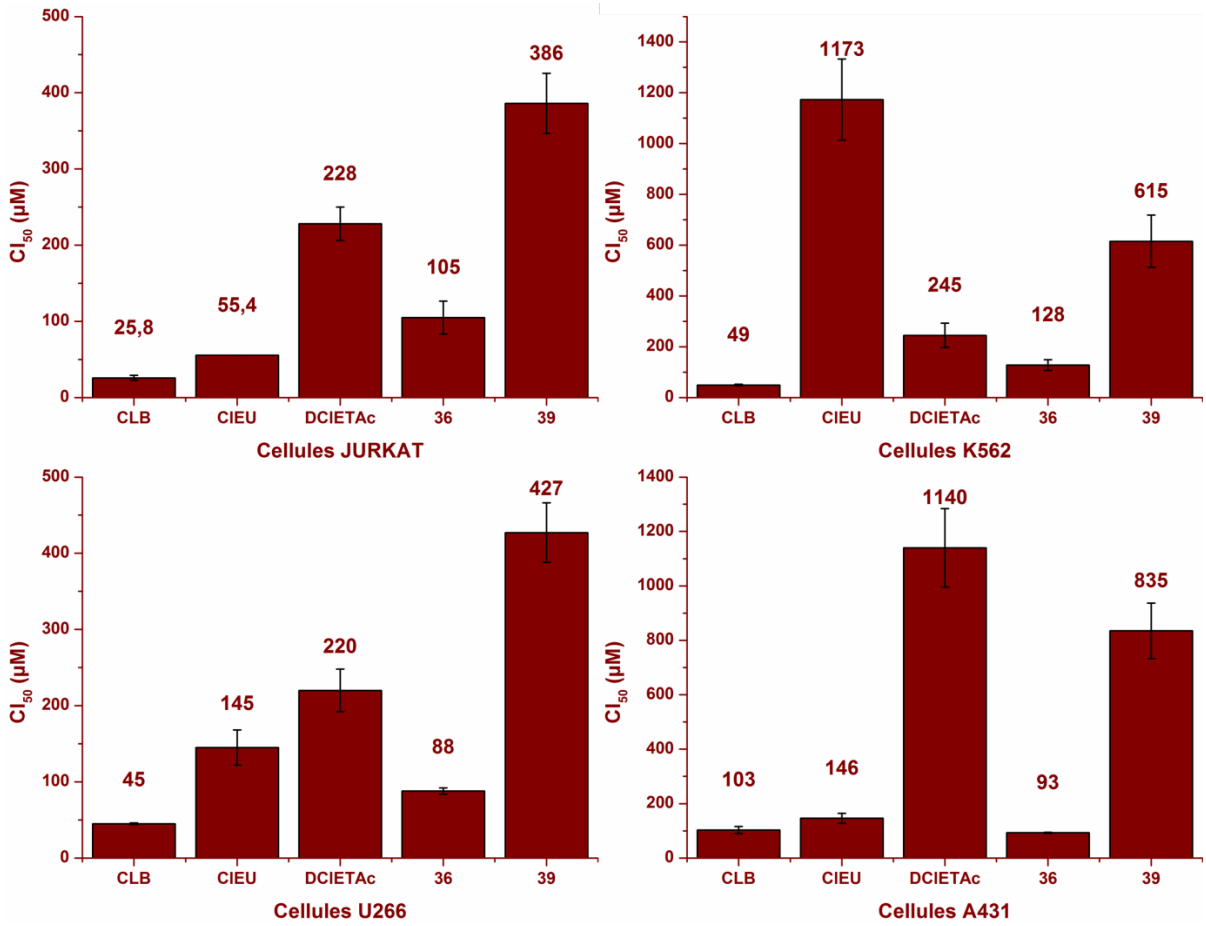


Figure 5.2 *: Concentrations inhibitrices à 50% des molécules testées sur les quatre lignées cellulaires.*

Contrairement au composé **12**, son analogue **DClETAc**, issu de la thymine, a un impact négatif sur la viabilité des cellules. Il est modérément actif contre les lignées cellulaires JURKAT, K562 et U266, avec une CI_{50} comprise entre 220 et 245 µM. Il présente par contre une activité très faible vis-à-vis des cellules adhérentes A431. Ainsi, pour ce type de structure, la nature de la base pyrimidique semble avoir un impact sur l'activité du composé.

La chloroéthyluridine montre une activité intéressante vis-à-vis des lignées JURKAT, U266 et A431. De manière surprenante, sa cytotoxicité contre le type cellulaire K562 est particulièrement faible. Ce résultat pourrait s'expliquer par des mécanismes de transport transmembranaire des nucléosides particuliers aux cellules K562. En effet, dans ce type de cellules, le transport des nucléosides pyrimidiques et de leurs analogues est défavorisé.[88]

88 H. Boleti, I.R. Coe, S.A. Baldwin, J.D. Young, C.E. Cass, *Neuropharmacology* **1997**, *36*, 1167-1179.

Le composé **36** présente une très bonne activité contre les cellules A431, puisque cette activité est comparable à celle du chlorambucil. Cette molécule est aussi efficace contre les lignées cellulaires JURKAT, U266 et K562. Le composé **39**, également issu de la « click chemistry » présente une activité modérée, entre 386 et 835 µM.

On remarque dans le cas des molécules résultant du couplage par cycloaddition une grande disparité dans leur activité vis-à-vis des cellules cancéreuses, puisqu'on passe d'une activité comparable à celle du chlorambucil pour le compose **36** à une activité nulle pour le composé **41**. Ceci montre l'importance de la partie non-alkylante sur l'efficacité des molécules.

Pour les quatre molécules (**ClEU**, **DClETAc**, **36** et **39**) qui présentent une activité cytotoxique vis-à-vis de ces lignées cellulaires, nous avons poursuivi cette évaluation biologique par une étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux.

5.4. Impact sur le cycle cellulaire.

5.4.1. Cytométrie en flux – Principe.

La cytométrie en flux (CMF) permet l'évaluation de caractéristiques physiques et physiologiques de suspensions cellulaires monodispersées défilant devant une source lumineuse sous forme de laser. Le cytomètre va détecter de manière qualitative et quantitative la fluorescence émise par les particules (cellules, bactéries,…) de la suspension cellulaire.

Afin d'étudier l'effet des molécules sur le cycle cellulaire des cellules cancéreuses, l'ADN est révélé grâce à un marquage à l'iodure de propidium (IP), agent intercalant des acides nucléiques. L'intensité de fluorescence émise par l'IP sera proportionnelle à la quantité d'ADN présent dans la cellule. Cette quantité d'ADN est directement liée aux différentes phases du cycle cellulaire (phase G_0/G_1, phase S, phase G_2/M). A titre d'exemple, lors de la mitose (phase G_2/M) durant laquelle la cellule-mère donne lieu à deux cellules-filles, la quantité d'ADN doublée sera révélée par un doublement de la fluorescence émise par l'IP. Ainsi, la CMF nous permet d'établir l'état du cycle cellulaire à un instant t et sous diverses conditions. En condition non-traitée, on obtient un cytogramme tel que présenté dans la Figure 5.3.

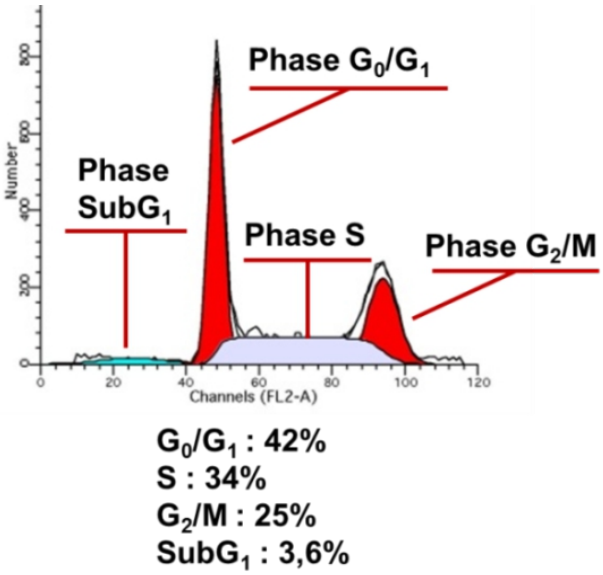


Figure 5.3 *: Exemple de cytogramme obtenu pour une population de cellules non-traitées.*

On distingue ainsi les trois grandes étapes du cycle cellulaire (voir Chapitre 1) :

- la phase de quiescence (G_0) ou de croissance (G_1), où la quantité d'ADN reste stable,
- la phase de réplication de l'ADN (S), durant laquelle la quantité d'ADN croît continuellement,
- enfin la deuxième phase de croissance (G_2), où la quantité d'ADN correspond au double de la quantité durant la phase G_0/G_1,
- puis la mitose (M), qui conduit à la production de deux cellules filles, qui vont entrer en phases G_0 ou G_1.

La « phase » dite subG1, peu présente dans cet exemple, correspond aux cellules dont le matériel génétique est en train de se dégrader lors de la mort cellulaire.

Un traitement mathématique permet de fournir une distribution du cycle cellulaire, en pourcentage, et une quantification de la mort cellulaire (bas de la Figure 5.3). Les résultats obtenus sont traités et nous permettent d'évaluer l'influence des traitements par nos molécules sur le cycle cellulaire.

Dans le cas d'agents anticancéreux tels que les agents alkylants, causant directement des dommages à l'ADN, on constate classiquement un arrêt du cycle cellulaire en phase G_2.[89]

89 (a) J. Konopa, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 2303-2309 ; (b) P.M. O'Connor, D.K. Ferris, M. Pagano, G. Draetta, J. Pines, T. Hunter, D.L. Longo, K.W. Kohn, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 8298-8308 ; (c) M.J. O'Connell, N.C. Walworth, A.M. Carr, *Trends Cell Biol. 10* **2000**, 296-303 ; (d) J. Ren, H.-J. Xu, H. Chen, W.-Q. Xin, X. Chen, K. Hu, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 175-187.

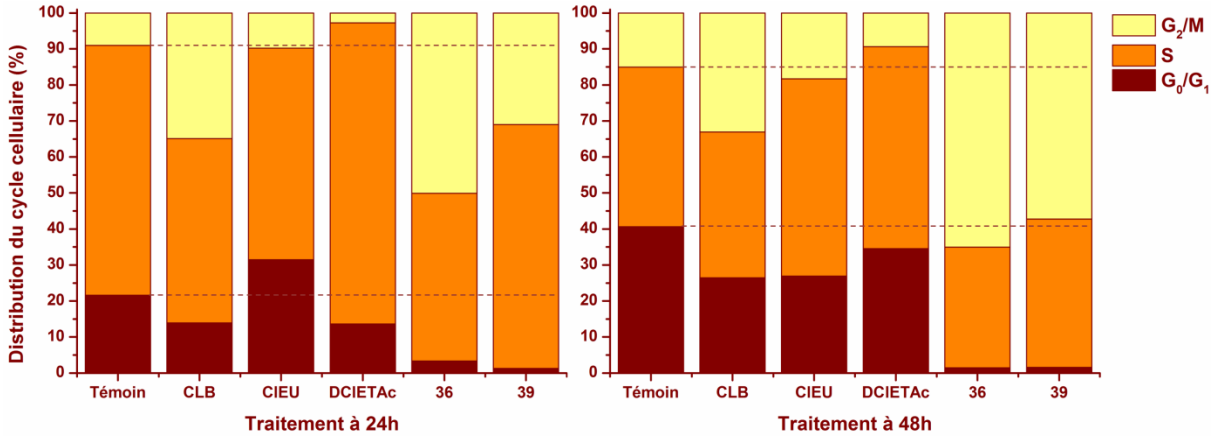
En effet, les mécanismes d'alkylation interviennent généralement lorsque la chromatine est décondensée, durant la réplication de l'ADN. Ce dernier étant trop altéré, la phase de mitose n'est pas déclenchée et la cellule reste dans cette phase G_2. Si ce blocage persiste, la cellule va alors entrer en mort cellulaire, par apoptose ou par nécrose.

Afin de déterminer l'impact des quatre molécules retenues sur le cycle cellulaire, le cas de chaque lignée sera traité séparément. Cette analyse nous permettra de déterminer si ces composés ont un effet direct sur l'ADN et son fonctionnement.

5.4.2. Impact sur le cycle des cellules JURKAT.

Un traitement de ces cellules par le chlorambucil aboutit à une nette accumulation des cellules traitées en phase G_2/M. Ce même phénomène a lieu pour les cellules traitées par les molécules **36** et **39**. De manière concomitante, on constate que la population des cellules en phase G_0/G_1 est quasi-nulle, que ce soit après 24 ou 48 heures de traitement.

Le traitement des cellules par le composé **DClETAc**, après 24 heures, semble conduire à une augmentation de la population de cellules en phase S. Cependant, cet effet ne semble pas se confirmer à plus long terme, puisque la proportion de cellules en phase S semble diminuer au bout de 48 heures. Enfin, le traitement par la **ClEU** semble avoir peu d'impact sur le cycle cellulaire (Figure 5.4).



Temps	24 heures						48 heures					
Traitement	Témoin	CLB	ClEU	DClETAc	36	39	Témoin	CLB	ClEU	DClETAc	36	39
G0/G1	21,6	13,9	31,5	13,7	3,4	1,3	40,6	26,4	26,9	34,5	1,4	1,6
S	69,3	51,2	58,7	83,6	46,5	67,7	44,4	40,5	54,6	56,1	33,5	41,2
G2/M	9,1	34,9	9,8	2,8	50,1	31,0	15,0	33,1	18,3	9,4	65,0	57,2

Figure 5.4 *: Distribution du cycle cellulaire pour les cellules JURKAT après 24 et 48 heures de traitement.*

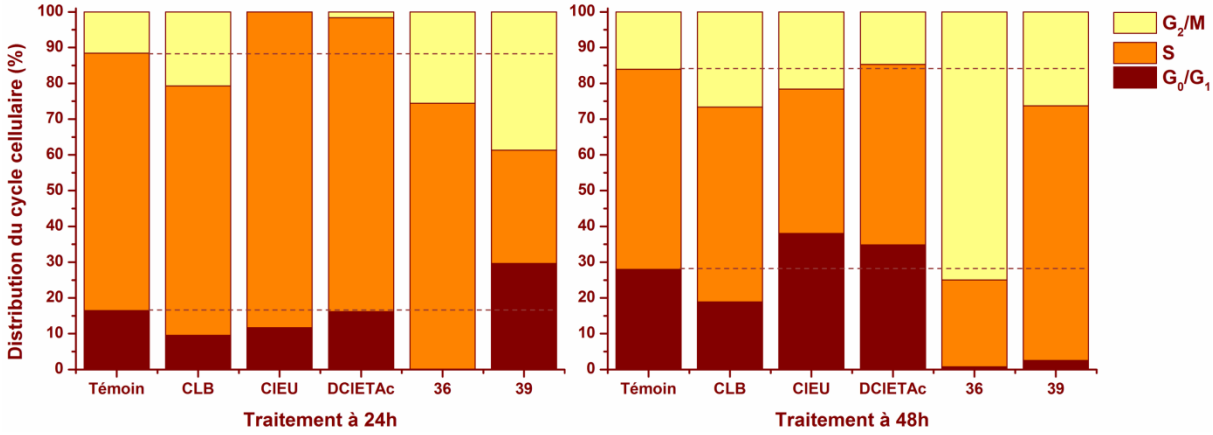
5.4.3. Impact sur le cycle des cellules K562.

Le traitement des cellules K562 par le chlorambucil conduit à un blocage des cellules en phase G_2/M, après de 24 heures de traitement.

Pour les composés **ClEU** et **DClETAc**, on remarque une augmentation de la population de cellules en phase S. Cependant, après 48 heures de traitement, cet effet ne se prolonge pas. Le traitement par la **ClEU** entraîne une légère accumulation des cellules en phase G_0/G_1, avec une diminution sensible de la population en phase S. Tandis que, dans le cas du traitement par **DClETAc**, la distribution du cycle cellulaire est similaire à celle des cellules non-traitées.

Comme dans le cas des cellules JURKAT, le traitement par le composé **36** conduit, dans un premier temps, à une forte accumulation des cellules en phases S et G_2/M. Après 48 heures, une très forte proportion de la population cellulaire se trouve en phase G_2/M.

Le traitement en présence du composé **39** semble induire une accumulation en phase G_2/M, au bout de 24 heures. Après 48 heures, on constate une forte augmentation du nombre de cellules en phase S, entraînant une baisse du nombre de cellules en phase G_2/M et une quasi-absence de cellules en phase G_0/G_1 (Figure 5.5).



Temps	24 heures						48 heures					
Traitement	Témoin	CLB	ClEU	DCIETAc	36	39	Témoin	CLB	ClEU	DCIETAc	36	39
G0/G1	16,4	9,6	11,7	16,2	0	29,6	28	19,0	38,0	34,6	0,7	2,5
S	72,0	69,7	88,3	82,2	74,5	31,7	56,0	54,5	40,4	50,5	24,3	71,2
G2/M	11,6	20,8	0	1,6	25,6	38,7	16,1	26,6	21,6	14,7	75,0	26,3

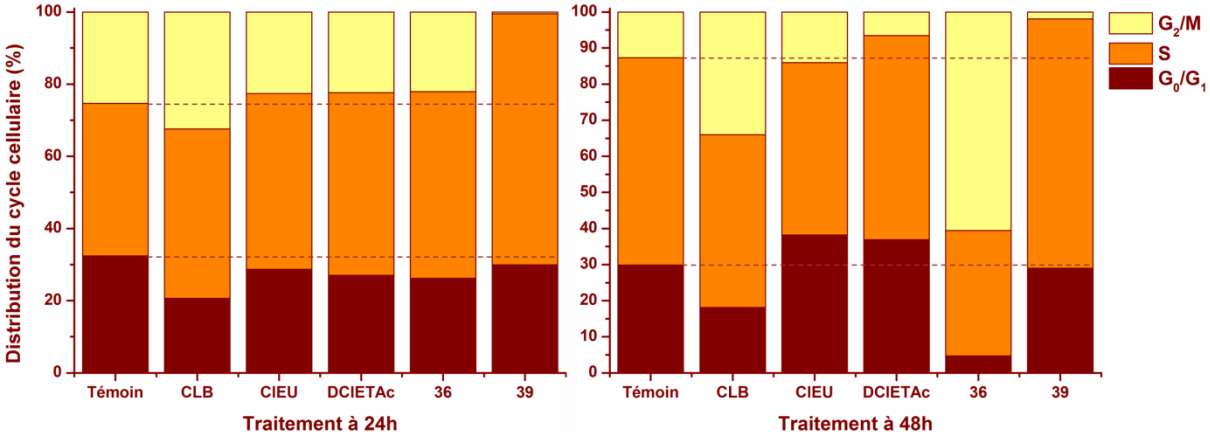
Figure 5.5 *: Distribution du cycle cellulaire pour les cellules K562 après 24 et 48 heures de traitement.*

5.4.4. Impact sur le cycle des cellules U266.

Après 24 heures, les cellules U266 traitées par le chlorambucil s'accumulent légèrement en phase G_2/M avec un accroissement de cet effet après 48 heures de traitement.

Les molécules **ClEU**, **DClETAc** et **36** n'ont quasiment aucun effet sur le cycle cellulaire après 24 heures de traitement. A 48 heures, le traitement par **ClEU** et **DClETAc** conduit à une accumulation des cellules en phase G_1/G_0. Dans le cas du composé **36**, on constate une très forte augmentation du nombre de cellules en phase G_2/M, après 48 heures de traitement. Enfin, le traitement par la molécule **39** semble entraîner un arrêt du cycle cellulaire en phase S.

Pour cette lignée cellulaire, l'effet des molécules sur le cycle cellulaire semble intervenir assez tardivement, au bout de 48 heures de traitement (Figure 5.6).



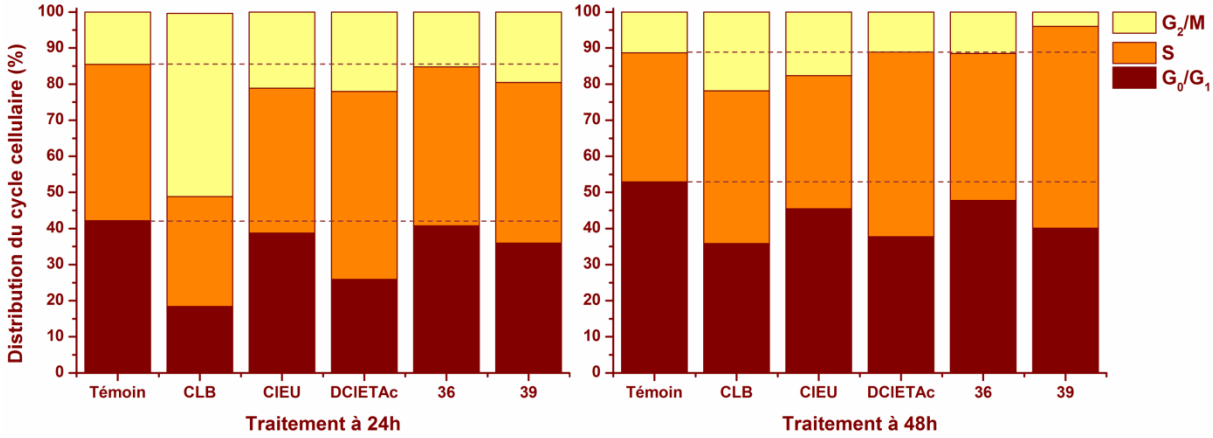
Temps	24 heures						48 heures					
Traitement	**Témoin**	**CLB**	**ClEU**	**DClETAc**	**36**	**39**	**Témoin**	**CLB**	**ClEU**	**DClETAc**	**36**	**39**
G0/G1	32,4	20,7	28,7	27,0	26,2	29,9	29,9	18,1	38,2	36,9	4,7	29,0
S	42,3	46,9	48,7	50,6	51,7	69,6	57,4	47,8	47,8	56,6	34,8	69,1
G2/M	25,3	32,4	22,6	22,4	22,0	0,5	12,7	34,0	14,0	6,6	60,5	1,9

Figure 5.6 *: Distribution du cycle cellulaire pour les cellules U266 après 24 et 48 heures de traitement.*

5.4.5. Impact sur le cycle des cellules A431.

Un traitement par le chlorambucil induit une nette accumulation des cellules en phase G_2/M. Dans le cas du traitement par le composé **DClETAc**, on observe une faible augmentation du nombre de cellules dans les phases S et G_2/M. Enfin, le traitement des cellules par les molécules **ClEU**, **36** et **39**, ne semble pas provoquer d'effet sur le cycle cellulaire.

Après 48 heures de traitement, aucun effet notoire supplémentaire n'est remarqué, hormis pour la molécule **39**. En effet, celle-ci entraîne une accumulation de cellules en phase S après 48 heures de traitement.



Temps	24 heures						48 heures					
Traitement	Témoin	CLB	ClEU	DClETAc	36	39	Témoin	CLB	ClEU	DClETAc	36	39
G0/G1	42,2	18,4	38,8	25,9	40,8	36,0	52,9	35,9	45,5	37,7	47,8	40,1
S	43,3	30,4	40,1	52,1	44,0	44,5	35,7	42,3	36,9	51,2	40,7	55,9
G2/M	14,5	50,8	21,2	22,0	15,21	19,6	11,4	21,9	17,7	11,1	11,5	4,00

***Figure 5.7** : Distribution du cycle cellulaire pour les cellules A431 après 24 et 48 heures de traitement.*

5.4.6. Discussion.

Lors de cette analyse par cytométrie en flux, nous remarquons des impacts différents sur le cycle cellulaire selon les composés testés.

Notre référence, le chlorambucil, conduit au bout de 48 heures, et quelle que soit la lignée cellulaire, à un arrêt du cycle cellulaire en phase G_2/M, comme décrit dans la littérature.[13] Cet arrêt du cycle cellulaire semble induire une augmentation du nombre de cellules dans la phase sub-G_1 (« phase » correspondant à la population cellulaire en cours de mort cellulaire) à 48 heures, entre 5 et 13% de cellules apoptotiques selon la lignée.

Dans le cas de cellules traitées par la chloroéthyluridine, on ne remarque pas d'effet important sur le cycle cellulaire, même après 48 heures. Dans le cas des lignées A431 et U266, on constate que le cycle cellulaire reste quasiment inchangé. Le traitement des lignées JURKAT et K562 conduit à une augmentation de la proportion de cellules en phase S, au bout de 24 heures, mais cet effet ne semble pas se prolonger et le cycle cellulaire est peu perturbé après 48 heures de traitement.

Par ailleurs, l'analyse des données de cytométrie en flux montre une augmentation significative de la proportion de cellules en phase sub-G_1 (cellules en mort cellulaire) après 48 heures, allant jusqu'à 25% dans le cas des cellules U266. Il semble que le traitement par cette molécule n'ait qu'un effet indirect sur le cycle cellulaire, on peut donc penser que cette molécule n'agit pas directement sur l'ADN.

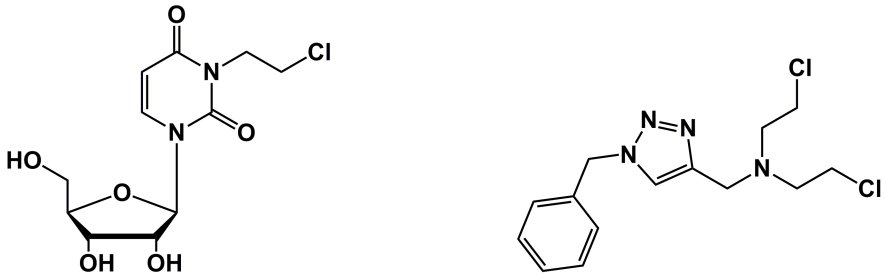
Le traitement des cellules par le composé **DClETAc** conduit, lui aussi, à une accumulation de cellules en phase S après 24 heures de traitement et cet effet ne se prolonge pas. Ce traitement conduit à un taux de mort cellulaire compris entre 8 et 23%. Cette molécule ne semble pas agir directement sur le cycle cellulaire et donc sur l'ADN.

Le traitement des cellules JURKAT, K562 et U266 par le composé **36** provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G_2/M. Ce blocage semble se poursuivre au bout de 48 heures, mais n'entraîne toutefois pas d'augmenation du taux de mort cellulaire, contrairement au traitement par le chlorambucil. Dans le cas du traitement des cellules A431, on ne constate aucun effet de la molécule **36** sur le cycle cellulaire. Ce traitement conduit pourtant à un taux de mort cellulaire trois fois plus important que le témoin. Le composé **36** n'agirait pas sur l'ADN dans ce cas et possèderait donc un mécanisme d'action différent selon la lignée cellulaire testée.

Dans le cas de cellules traitées par le composé **39**, on constate un arrêt du cycle cellulaire en phase S pour les lignées A431, K562 et U266, et un arrêt en phase G_2/M, dans le cas des cellules JURKAT. Comme dans le cas du traitement par la molécule **36**, on ne constate pas d'évolution du taux de mort cellulaire entre 24 et 48 heures pour les lignées de cellules en suspension, JURKAT K562 et U266. Dans le cas des cellules A431, on observe une forte augmentation de ce taux de mort cellulaire.

5.5. Conclusion.

Au cours de ces tests biologiques, nous avons évalué la cytotoxicité de plusieurs molécules synthésisées, en utilisant quatre lignées cellulaires cancéreuses. Les premiers tests au MTT nous ont révélé l'efficacité de certaines structures. Par la suite, l'étude de l'effet du traitement sur le cycle cellulaire par cytométrie en flux a permis de montrer de grande disparité dans le mode d'action possible. De manière générale, on constate que les molécules testées ont des effets différents sur le cycle et la mort cellulaires, comparativement à ceux entraînés par le chlorambucil. De plus, ces effets semblent dépendants du type de lignée cellulaire étudiée. Néanmoins, ces résultats préliminaires sont encourageants. Deux molécules sont retenues pour poursuivre leur évaluation biologique, la Chloroéthyluridine et le 1-Benzyl-4-(*N,N*-di-2-chloroéthylaminométhyl)-*1H*-[1,2,3]triazole (Figure 5.8).



Chloroéthyluridine (ClEU) **36**

Figure 5.8 *: Chloroéthyluridine et composé* ***36****.*

Afin de poursuivre cette évaluation biologique et d'étudier les possibles modes d'action de ces molécules, il sera intéressant, dans un premier temps, d'évaluer l'impact sur le cycle cellulaire après 72 heures de traitement. Cette analyse à plus long terme nous permettra de confirmer les premiers constats réalisés.

L'expérience par cytométrie en flux pourra être poursuivie par une étude du type de mort cellulaire impliquée, apoptose ou nécrose, grâce à une expérimentation utilisant l'annexine V. L'annexine V est une protéine ayant une affinité pour des phospholipides membranaires externalisés au cours de l'apoptose, les phosphatidyl-sérines. Une utilisation conjointe de l'annexine V et de l'Iodure de Propidium nous permettra de distinguer les cellules apoptotiques et les cellules nécrotiques.

Dans certains cas, où l'on constate que la cytotoxicité n'est pas induite par une perturbation du cycle cellulaire, il sera nécessaire d'étudier plus en détail d'autres cibles potentielles de ce type de molécules au sein des cellules (récepteurs cellulaires, organites cellulaires telle que la mitochondrie,…).

Des travaux récents portant sur la méchloréthamine, le chlorambucil[90] et la bendamustine[91] tendent à prouver que l'effet d'alkylation de l'ADN n'expliquerait pas entièrement l'effet cytotoxique des moutardes à l'azote. Ainsi, il faudrait étudier l'effet du traitement sur la production de certaines enzymes réparatrices de l'ADN, telles que la topoisomérase II ou l'ADN-O^6-Alkylguanine-Alkyltransferase, ou sur les protéines intervenant dans les mécanismes d'apoptose (p53, p21, BAX …).

90 R. Loeber, E. Michaelson, Q. Fang, C. Campbell, A.E. Pegg, N. Tretyakova, *Cancer Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 787-795.

91 L.M. Leoni, B. Bailey, J. Reifert, H.H. Bendall, R.W. Zeller, J. Corbeil, G. Elliott, C.C. Niemeyer, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 309-317.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail, nous avons synthétisé de nouvelles moutardes à l'azote aux structures variées.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un acétamide, dérivé de l'uracile. L'étude de cette amidation directe nous a permis de généraliser cette méthode à diverses amines primaires ou secondaires. Nous avons ainsi remarqué l'impact de la structure de l'amine sur le rendement de la réaction. Ces résultats, parfois surprenants, ont été confirmés par une étude de modélisation moléculaire, qui a mis en évidence l'importance des interactions non liantes, liaisons hydrogène et π-stacking, dans cette réaction d'amidation directe. Enfin, la dernière étape de chloration nous a permis d'obtenir une moutarde à l'azote, dérivée de l'uracile.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié la synthèse de moutarde à l'azote à partir de bases puriques. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'introduction du motif di-2-chloroéthylamine sur la position 6 de la 6-chloropurine et de la 2-amino-6-chloropurine et de leurs dérivés *N*-9 alkylés. La chloration des intermédiaires dihydroxylés, conduit dans tous les cas à la formation d'un cycle à cinq chaînons, dihydroimidazolium, entre l'azote N^6 et l'azote *N*-1 du cycle purique.

Dans une troisième partie, nous avons décrit la synthèse de moutardes à l'azote générées par « Click Chemistry ». L'utilisation de la réaction de CuAAC a permis de générer aisément des intermédiaires dihydroxylés aux structures variées. Enfin, l'étape de chloration a permis la synthèse de cinq moutardes à l'azote aux structures innovantes. Cette nouvelle stratégie permet l'élaboration d'un large panel de moutardes à l'azote aux structures diverses.

Enfin, ce travail s'achève avec l'évaluation biologique des structures synthétisées et de composés déjà étudiés au sein de notre laboratoire. Une première étude de la cytotoxicité de ces différents composés vis-à-vis de quatre lignées cellulaires a montré une activité intéressante du 1-Benzyl-4-(N,N-di-2-chloroéthylaminométhyl)-1H-[1,2,3]triazole (**36**) et de la Chloroéthyluridine (**ClEU**). La poursuite de ces tests par une étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux a permis de montrer les différences entre les modes d'action possibles de ces composés. Cette étude montre toutefois un effet intéressant de la part de molécules générées par « Click Chemistry », qui entraînent un arrêt net du cycle cellulaire en phase G_2/M.

Ce travail a employé divers outils récents de chimie organique (activation micro-ondes, « Click Chemistry »,…) et permis la synthèse de moutardes à l'azote innovantes. De plus, la biologie cellulaire et la chimie théorique ont appuyé les résultats obtenus, montrant ainsi l'importance de la multidisciplinarité.

CHAPITRE VI

PARTIE EXPERIMENTALE

6.1. SYNTHESE ORGANIQUE.

6.1.1. Réactifs et solvants.

L'origine des réactifs et solvants utilisés au cours de ce travail est présentée dans les Tableaux 6.1 et 6.2. Tous ces composés sont utilisés tels quels après avoir contrôlé leur pureté et l'absence d'eau par IR. La pureté indiquée est la pureté minimale garantie par le fournisseur.

Tableau 6.1 : Origine et pureté des solvants utilisés.

Solvants	Pureté	Origine
Acétate d'éthyle	99,0%	Carlo Erba
Acétone	P.A.	Carlo Erba
Acide acétique	99-100%	VWR
Acide chlorhydrique (37% dans l'eau)	-	VWR
Butanol	99,0%	Acros
Chloroforme	99,9%	SDS
Cyclohexane	99,0%	VWR
Dichlorométhane	99,9%	SDS
Diméthylacétamide	99,8%	Acros
Diméthylformamide	99,0%	Acros
Ethanol absolu	99,0%	Carlo Erba
Ether de pétrole	99,9%	VWR
Ether diéthylique	99,8%	VWR
Méthanol	99,0%	VWR
Pyridine	99,8%	Acros
Toluène	99,0%	VWR

Tableau 6.2 : Origine et pureté des réactifs utilisés.

Produits	Pureté	Origine
1-Bromo-1-désoxy-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-β-D-glucopyranose	98,0%	Sigma Aldrich
2,4-Dihydroxybenzaldéhyde	98,0%	Sigma Aldrich
2-Amino-6-chloropurine	99,0%	Sigma Aldrich
6-Chloropurine	99,0%	Acros
2-Oxazolidinone	99%	Alfa Aesar
Acétate de sodium	Anhydre	Sigma Aldrich
Anhydride acétique	99,0%	Acros
Aniline	98,5%	Acros
Ascorbate de sodium	99,0%	Alfa Aesar
Azidotriméthylsilane	94,0%	Alfa Aesar
Azoture de benzyle	94,0%	Alfa Aesar
Azoture de sodium	99,0%	Acros
Benzylamine	99%	Acros
Benzyléthanolamine	99%	Alfa Aesar
Bromoacétate d'éthyle	98%	Alfa Aesar
Bromoacétate de tertbutyle	98,0%	Sigma Aldrich
Bromure de propargyle	80% v/v dans le toluène	Alfa Aesar
Carbonate de potassium	-	Alfa Aesar
Chlorure de sodium	-	Alfa Aesar
Chlorure de thionyle	99,0%	Sigma Aldrich
Chlorure de tosyle	99,0%	Alfa Aesar
Diéthanolamine	99%	Sigma Aldrich
Diéthylamine	99%	Acros
Ethanolamine	99%	Acros

Hydrogénocarbonate de sodium	-	Prolabo
Hydroxyde de Sodium	100%	VWR
Hydrure de Sodium	60% dans l'huile minérale	Sigma Aldrich
N-Acétylglycine	99,0%	Fluka
Nitrite de sodium	99,0%	Sigma Aldrich
*Per*acétyl-β-D-ribofuranose	98,0%	Acros
Propargylamine	99%	Acros
Sulfate de cuivre(II) pentahydrate	-	Alfa Aesar
Sulfate de magnésium	-	Alfa Aesar
Thymidine	99,0%	Alfa Aesar
Triéthylamine	99,0%	Acros

6.1.2. Chromatographie.

6.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique.

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

Observation sous ultraviolet (λ = 256 nm ou λ = 365 nm),

Vaporisation d'une solution (6 M) d'acide sulfurique et d'orcinol suivie d'un chauffage dans le cas des produits comportant une partie osidique,

Vaporisation de triphénylphosphine 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.

6.1.2.2. 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.

6.1.2.3. Chromatographie éclair automatisée.

Le Combiflash *Rf* 100® 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 Combiflash *Rf* 100® 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). La phase stationnaire est de la silice (35-70 µm) préconditionnée en colonne de 4 à 80 g. Tous les bruts réactionnels à purifier sont dissous dans un minimum de solvant ou fixés sur florisil ou sur silice et déposés en tête de colonne.

6.1.3. Analyses.

6.1.3.1. Température de fusion.

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

6.1.3.2. Spectroscopie de RMN.

Les spectres de RMN ont été réalisés sur un appareil Brüker DPX-400 avec une fréquence de 400,13 MHz pour le proton (^{1}H) et de 100,16 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 ; m : multiplet.

6.1.3.3. Spectroscopie Infra-rouge.

Les spectres IR sont réalisés sur un appareil Perkin Elmer 1000 sur des échantillons préparés dans du bromure de potassium. Les nombres d'onde sont exprimés en cm^{-1}.

6.1.3.4. Spectroscopie UV-Visible.

Les spectres UV-Visible en solution ont été réalisés sur un spectrophotomètre Specord 210 (Analytik Jena) et ont été effectués dans des cellules de quartz de 1 cm de trajet

optique. Les spectres ont été réalisés à une concentration voisine de 10^{-5}-10^{-6} M dans le solvant adéquat. Les longueurs d'onde λ correspondantes aux absorbances maximales sont exprimées en nm.

6.1.3.5. Spectroscopie de Fluorescence.

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence ont été réalisés sur un fluorimètre QM-4/QuantaMaster (PTI) et ont été effectués dans des cellules de quartz de 1 cm de trajet optique. Les spectres ont été réalisés à une concentration voisine de 10^{-6} M dans le solvant adéquat. Les longueurs d'onde λ correspondantes aux absorbances et aux émissions maximales sont exprimées en nm.

6.1.3.6. Spectrométrie de Masse Basse Résolution.

Les spectres de masse 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).

6.1.3.7. Spectrométrie de Masse Haute Résolution.

Les spectres de masse haute résolution par électrospray (IES) ont été réalisés sur un appareil Q-TOF maXis (Brüker) couplé à une chaîne Ultimate 3000 RSLC (Dionex) à l'Institut de Chimie Organique et Analytique de l'Université d'Orléans. Le solvant d'injection est un mélange Acétonitrile /Acide Formique 0,1% dans l'eau (65/35 ; v/v)

6.1.4. Appareillages Ultrasons et Micro-ondes.

6.1.4.1. Cuve à ultrasons.

Les activations par ultrasons ont été réalisées à l'aide d'une cuve à ultrason ELMA-ONE avec une fréquence de 35 kHz et de puissance 30 W. Toutes les réactions sont conduites dans un ballon, immergé dans la cuve remplie d'eau.

6.1.4.2. Four à micro-ondes.

Les irradiations micro-ondes ont été effectuées au moyen d'un four micro-ondes de laboratoire (Milestone, Ethos 1600Microsynth). 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.

6.1.5. Produits / Synthèses / Caractéristiques.

2-(uracil-1-yl)éthanoate d'éthyle (1)

Dans un bicol de 100 mL, on dissout 1,79 g d'uracile (16 mmol) dans 50 mL de DMF anhydre, auxquels on ajoute 1,2 équivalents d'hydrure de sodium à 60% dans l'huile minérale (461 mg). La réaction est alors activée par irradiations micro-ondes 3 x 1 minute (100°C et 300 W). On injecte alors 1,1 équivalents de bromoacétate d'éthyle (1,93 mL) au milieu réactionnel, qu'on active 3 x 3 minutes (100°C et 300 W). Après évaporation à sec, le produit brut est purifié sur *Combiflash Rf*® (gradient d'éluant $CHCl_3$/EP, 70/30 à 100/0 ; v/v). Nous obtenons l'uracile monoalkylé en position 1 avec un rendement de 68% (2,15 g, solide blanc).

Rf = 0,22 (EP/Acétone/Toluène, 4/3/4, v/v/v)

Tf = 139°C (litt.[92] 137-139°C)

IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 1720 (C=O, ester) ; 1700 (C=O, uracile) ; 1582 (N-H uracile).

RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 11,39 (s, 1H, N-H) ; 7,62 (d, 1H, J = 7,9 Hz, H-6) ; 5,61 (d, 1H, J = 7,9 Hz, H-5) ; 4,51 (s, 2H, H-2') ; 4,15 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH_2 éthyle) ; 1,21 (t, 3H, J = 7,1 Hz, CH_3 éthyle).

92 G. Qu, Z. Zhang, H. Guo, M. Geng, R. Xia, *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *5*, 1061-1067.

RMN ^{13}C, (DMSO-d_6, δ) : 168,2 (C-1') ; 163,8 (C-4) ; 151,0 (C-2) ; 145,9 (C-6) ; 101,1 (C-5) ; 61,2 (CH_2 éthyle) ; 48,6 (C-2') ; 14,0 (CH_3 éthyle).

N-propargyl-2-oxazolidinone (3)

Dans un bicol de 50 mL, on dissout, à 0°C, 2 g (23 mmol) de 2-oxazolidinone dans 25 mL de DMF anhydre, puis on ajoute 1,3 éq. (28 mmol ; 1,15 g) d'hydrure de sodium à 60% dans l'huile minérale. Après 1 heure, 1,55 éq. (33 mmol ; 3,8 mL) de bromure de propargyle dilués dans 7 mL de DMF anhydre sont ajoutés goutte-à-goutte pendant 40 min. Une fois l'ajout terminé, la réaction se poursuit à température ambiante et le mélange devient jaune. Après 20 min, la réaction est arrêtée avec 1 mL d'eau, puis le mélange réactionnel est évaporé à sec. Le brut réactionnel est repris dans 40 mL de $CHCl_3$ et 10 mL d'eau. La phase aqueuse obtenue est alors extraite avec 30 mL de $CHCl_3$, puis lavée avec 10 mL d'eau. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ puis évaporées à sec. Le brut réactionnel obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice sur *Combiflash Rf*® (gradient d'éluant $CHCl_3$/EtOH, 100/0 à 90/10 ; v/v). Le produit est obtenu pur, sous forme d'une huile de couleur ambrée, avec un rendement de 88% (2,54 g).

Rf = 0,86 ($CHCl_3$/EtOH ; 7/3 ; v/v)

IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 2118 (C-H alcyne), 1756 (C=O).

RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 4,30 (t, 2H, J = 8,1 Hz, H-4) ; 4,00 (d, 2H, J = 2,5 Hz, CH_2 propargyle) ; 3,56 (t, 2H, J = 8,1 Hz, H-5) ; 3,32 (t, 1H, J = 2,5 Hz, CH propargyle).

RMN ^{13}C, (DMSO-d_6,δ) : 157,5 (C-1) ; 79,9 (C_{quat} propargyle) ; 78,1 (CH propargyle) ; 75,4 (C-5) ; 61,9 (C-4) ; 43,5 (CH_2 propargyle).

ESIMS : $(M+H^+)$ *m/z* 126 ; $(M+Na^+)$ *m/z* 148.

N-Propargyléthanolamine (4)

Dans un ballon de 100 mL, on dissout 2,52 g (20,1 mmol) de composé **3** dans un mélange $NaOH_{aq.}$(4M) / MeOH (28 mL ; 1/1). Le mélange est placé sous agitation et chauffé à 65°C. Après 2h, la CCM montre que la réaction n'évolue plus. Le milieu réactionnel est directement traité par extraction cinq fois avec 80 mL de $CHCl_3$. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis évaporée à sec. On obtient le produit sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 90% (1,78 g).

Rf = 0,30 ($CHCl_3$/EtOH ; 7/3 ; v/v)

IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3395 (OH), 3277 (NH), 2103 (C-H alcyne).

RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 4,44 (m, 1H, OH) ; 3,44 (t, 2H, J = 5,8 Hz, H-3) ; 3,31 (d, 2H, J = 2,5 Hz, H-4) ; 3,02 (t, 1H, J = 2,5 Hz, H-6) ; 2,60 (t, 2H, J= 5,8 Hz, H-2).

RMN ^{13}C, (DMSO-d_6,δ) : 83,1 (C-5) ; 73,4 (C-6) ; 60,2 (C-3) ; 50,3 (C-2) ; 37,4 (C-4).

ESIMS : ($M+H^+$) *m/z* 100 ; ($M+Na^+$) *m/z* 122.

Réactions d'amidation de l'uracile mono alkylée 1 : Mode opératoire général.

Dans un bicol de 25 mL, on introduit 1 mmol de 2-(uracil-1-yl)éthanoate d'éthyle **1** que l'on dissout dans 10 mL d'éthanol, et on ajoute 1,02 équivalents d'amine. Le bicol est surmonté d'un réfrigérant, plongé dans un bain d'huile préchauffé à 67°C et mis sous agitation magnétique. Lorsque la réaction n'évolue plus, le produit pur est obtenu par recristallisation dans l'éthanol absolu du brut réactionnel.

***N,N*-di-(2-hydroxyéthyl)-2-(uracil-1-yl)éthanamide (2)**

Rendement : 90% ; Tf = 142°C (solide blanc)

Rf = 0,25 ($CHCl_3$/EtOH, 1/1, v/v)

IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3400 (O-H) ; 1700 (C=O, amide) ; 1691 (C=O, uracile) ; 1582 (N-H uracile).

RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 11,36 (s, 1H, N-H) ; 7,43 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-6) ; 5,55 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-5) ; 4,94 (m, 1H, OH) ; 4,70 (m, 1H, OH) ; 4,66 (s, 2H, H-2') ; 3,58 (t, 2H, J = 5,5 Hz, H-β') ; 3,47 (t, 2H, J=6,1 Hz, H-β) ; 3,44 (t, 2H, J = 5,5 Hz, H-α') ; 3,35 (t, 2H, J = 6,1 Hz, H-α).

RMN ^{13}C, (DMSO-d_6,δ) : 166,76 (C-1') ; 163,79 (C-4) ; 150,98 (C-2) ; 146,58 (C-6) ; 100,35 (C-5) ; 60,25 (C-β) ; 58,75 (C-β) ; 51,52 (C-α) ; 49,63 (C-α) ; 48,48 (C-2').

N-(2-hydroxyéthyl)-2-(uracil-1-yl)éthanamide (5)

Rendement : 70% ; Tf = 238°C (solide blanc).

Rf = 0,32 ($CHCl_3$/EtOH, 1/1, v/v)

IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3600 (O-H) ; 1700 (C=O amide) ; 1691 (C=O uracile) ; 1584 (N-H).

RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 11,23 (s, 1H, N-H) ; 8,17 (t, 1H, J = 5,3 Hz, NH acétamide) ; 7,53 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-6) ; 7 ; 5,54 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-5) ; 4,69 (s, 1H, OH) ; 4,31 (s, 2H, H-2') ; 3,40 (t, 2H, J = 5,8 Hz, H-β) ; 3,14 (t, 2H, J = 5,8 Hz, H-α).

N-(benzyl)-*N*-(2-hydroxyéthyl)-2-(uracil-1-yl)éthanamide (6)

Rendement : 70% ; Tf = 160°C (solide blanc).

Rf = 0,43 ($CHCl_3$/EtOH, 1/1, v/v)

IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3600 (O-H) ; 3050 (C_{sp2}-H Ar) ; 1700 (C=O amide) ; 1691 (C=O uracile) ; 1582 (N-H uracile) ; 1500 (C_{sp2} Ar).

RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : *Rotamère majoritaire (70%) :* 11,26 (s, 1H, NH) ; 7,52 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-6) ; 7,41–7,22 (m, 5H, H_{Ar}) ; 5,57 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-5) ; 4,96 (t, 1H, J = 5,2 Hz, OH) ; 4,77 (s, 2H, H-2') ; 4,57 (s, 2H, CH_2 Bn) ; 3,57 (t, 2H, J = 5,2 Hz, H-β) ; 3,33 (t, 2H, J = 5,2 Hz, H-α) ; *Rotamère minoritaire* (30%): 11,26 (s, 1H, NH) ; 7,54 (d, 1H, J = 7,7 Hz, H-6) ; 7,41–7,22 (m, 5H, H_{Ar}) ; 5,56 (d, 1H, J = 7,7 Hz, H-5) ; 4,67 (s, 2H, H-2') ; 4,68 (t, 1H, J = 6,0 Hz, OH) ; 4,64 (s, 2H, CH_2 Bn) ; 3,45 (t, 2H, J = 6,0 Hz, H-β) ; 3,28 (t, 2H, J = 6,0 Hz, H-α).

N-(2-hydroxyéthyl)-*N*-(propargyl)-2-(uracil-1-yl)éthanamide (7)

Rendement : 10% (huile orange)

Rf = 0,39 ($CHCl_3$/EtOH, 1/1, v/v)

IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3600 (O-H) ; 2124 (C-H_{alcyne}) ; 1700 (C=O amide) ; 1690 (C=O uracile) ; 1580 (N-H uracile).

RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : *Rotamère majoritaire (70%) :* 11,27 (s, 1H, N-H) ; 7,47 (d, 1H, J = 7,9 Hz, H-6) ; 5,55 (d, 1H, J = 7,9 Hz, H-5) ; 4,98 (t, 1H, J = 5,3 Hz, OH) ; 4,68 (s, 2H, H-2') ; 4,19 (d, 2H, J = 2,3 Hz, H-α') ; 3,40 (t, 2H, J = 5,8 Hz, H-β) ; 3,20 (t, 1H, J = 2,3 Hz, H-γ') ; 3,14 (t, 2H, J = 5,8 Hz, H-α). *Rotamère minoritaire (30%) :* 11,27 (s, 1H, N-H) ; 7,49 (d, 1H, J = 7,7 Hz, H-6) ; 5,55 (d, 1H, J = 7,7 Hz, H-5) ; 4,74 (t, 1H, J = 5,2 Hz, OH) ; 4,68 (s, 2H, H-2') ; 4,29 (d, 2H, J = 2,4 Hz, H-α') ; 3,49 (m, 2H, H-β) ; 3,40 (m, 1H, H-γ') ; 3,40 (m, 2H, H-α).

N-(2-hydroxyéthyl)-2-(uracil-1-yl)éthanamide (11)

Rendement : 60% ; Tf = 236°C (solide blanc).

Rf = 0,49 ($CHCl_3$/EtOH, 1/1, v/v)

IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3050 (C_{sp2}-H Ar) ; 1700 (C=O amide) ; 1693 (C=O uracile) ; 1580 (N-H uracile) ; 1500 (C_{sp2} Ar).

RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 11,27 (s, 1H, N-H) ; 8,66 (1H, t, J = 5,8 Hz, NH acétamide) ; 7,58 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-6) ; 7,34-7,22 (m, 5H, H_{Ar}) ; 5,56 (d, 1H, J = 7,9 Hz, H-5) ; 4,38 (s, 2H, H-2') ; 4,30 (d, 2H, J = 5,8 Hz, CH_2 Bn).

N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(uracil-1-yl)éthanamide (12)

Dans un ballon de 10 mL, on dissout 132 mg de composé **2** (0,51 mmol) dans 2,6 mL de chlorure de thionyle. Le milieu réactionnel est mis sous agitation magnétique à température ambiante pendant cinq heures. Après évaporation, le brut réactionnel est purifié sur plaques chromatographiques préparatives (AcOEt / EtOH ; 9/1 ; v/v). Le composé **12** est obtenu après purification, sous la forme d'un solide blanc, avec un rendement de 64% (96 mg).

Rf = 0,35 (AcoEt / EtOH ; 9/1 ; v/v)

Tf = 183°C

RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 11,40 (s, 1H, N-H) ; 7,02 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-6) ; 5,63 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-5) ; 4,64 (s, 2H, H-2') ; 4,42 (t, 2H, J = 5,1 Hz, H-β) ; 3,96 (t, 2H, J = 6,2 Hz, H-β') ; 3,35 (t, 2H, J = 5,1 Hz, H-α) ; 3,29 (t, 2H, J = 6,2 Hz, H-α').

RMN ^{13}C, (DMSO-d_6,δ) : 159,1 (C-1') ; 154,8 (C-4) ; 142,0 (C-2) ; 137,5 (C-6) ; 92,2 (C-5) ; 51,2 (C-β) ; 39,4 (C-2') ; 39,1 (C-α) ; 38,5 (C-β') ; 31,7 (C-α').

ESIMS : ($M+H^+$) *m/z* 294, 296 et 298 ; ($M+Na^+$) *m/z* 316, 318 et 320.

Mode opératoire général de *N*-9-Alkylation des 6-Chloropurines.

Dans un bicol de 250 mL, on dissout 1 équivalent de 6-chloropurine dans 100 mL de DMF. On introduit ensuite 1,2 équivalents de carbonate de potassium, puis on injecte 1,2 équivalents de bromoacétate de *tert*-butyle. Après 15 minutes d'activations par irradiations micro-ondes (3x5 min, 400 W, 100°C), le mélange réactionnel est évaporé à sec, puis le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient d'éluant $CHCl_3$ / EP de 30/70 à 100/0, v/v).

2-(6-chloropurin-9-yl)éthanoate de *tert*-butyle (17)

A partir 1 g de 6-chloropurine (6,5 mmol), 1,08 g de carbonate de potassium (7,8 mmol), et 1,14 mL de bromoacétate de *tert*-butyle (7,8 mmol), le produit pur est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 72% (1,26 g).
Rf = 0,47 ($CHCl_3$ / EtOH ; 95/5 ; v/v)
Tf = 92°C
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3065 (C-H Ar) ; 1732 (C=O) ; 1333 (C-N Ar) ; 1175 (C_{Ar}-Cl).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 8,81 (s, 1H, H-2) ; 8,68 (s, 1H, H-8) ; 5,16 (s, 2H, C-2') ; 1,43 (s, 9H, $(CH_3)_3$).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 166,2 (C-1') ; 152,0 (C-4) ; 151,7 (C-2) ; 147,9 (C-8) ; 149,0 (C-6) ; 130,4 (C-5) ; 82,5 ($\underline{C}(CH_3)_3$) ; 45,2 (C-2') ; 27,5 ($C(\underline{C}H_3)_3$).

2-(6-chloro-2-aminopurin-9-yl)éthanoate de *tert*-butyle (18)

A partir de 1 g de 2-amino-6-chloropurine (5,9 mmol), 980 mg de carbonate de potassium (7,1 mmol) et 1 mL de bromoacétate de *tert*-butyle (7,1 mmol), le produit pur est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 71% (1,32 g).

Rf =0,46 ($CHCl_3$/EtOH ; 95/5 ; v/v)
Tf = 149°C (litt.[61] 147-149°C)
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3062 (C-H Ar) ; 1732 (C=O) ; 1614 (C-NH_2) ; 1340 (C-N Ar) ; 1174 (C_{Ar}-Cl).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 8,09 (s, 1H, H-8) ; 6,96 (s, 2H, NH_2) ; 4,86 (s, 2H, C-2') ; 1,42 (s, 9H, $(CH_3)_3$).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 166,6 (C-1') ; 159,8 (C-2) ; 154,2 (C-4) ; 149,3 (C-6) ; 143,5 (C-8) ; 122,8 (C-5) ; 82,2 ($\underline{\mathbf{C}}(CH_3)_3$) ; 44,5 (C-2') ; 27,6 ($C(\underline{\mathbf{C}}H_3)_3$).

Fixation de la diéthanolamine en position 6 des chloropurines.

Dans un bicol de 25 mL, on introduit 5 mmol de chloropurine ou de chloropurine *N*-9 alkylée dans 8 mL de DMF. On ajoute 1,2 équivalents de triéthylamine (836 µL ; 6 mmol) et 5 équivalents (2,4 mL ; 25 mmol) de diéthanolamine. Après irradiations micro-ondes (2x30 min, 300 W, 80°C), le mélange réactionnel est évaporé à sec puis purifié par chromatographie sur gel de silice, avec un gradient d'éluant $CHCl_3$/EtOH de 100/0 à 70/30.

6-(*N*,*N*-(di-2-hydroxyéthyl)amino)purine (13)

Le produit est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 67% (750 mg).

Rf = 0,53 ($CHCl_3$/EtOH ; 1/1 ; v/v)
Tf = 215°C (litt.[93] 214-215°C)
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3281 (O-H) ; 3082 (C-H Ar) ; 1345 (C-N Ar) ; 1054 (C-OH).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 12,93 (s, 1H, NH) ; 8,17 (s, 1H, H-2) ; 8,09 (s, 1H, H-8) ; 4,80 (m, 2H, OH) ; 4,15 (m, 4H, H-α) ; 3,68 (m, 4H, H-β).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 153,6 (C-6) ; 151,6 (C-2) ; 151,1 (C-4) ; 130,0 (C-8) ; 118,5 (C-5) ; 59,6 (C-β) ; 51,7 (C-α).
ESIMS : ($M+H^+$) *m/z* 224,11 ($M+Na^+$) *m/z* 246,10

93 G.-R. Qu, J. Wu, Y.-Y. Wu, F. Zhang, H.-M. Guo, *Green Chem.* **2009**, *11*, 760-762.

2-amino-6-(*N*,*N*-(di-2-hydroxyéthyl)amino)purine (14)

Le produit est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanchâtre avec un rendement de 72% (860 mg).

Rf = 0,41 ($CHCl_3$/EtOH ; 1/1 ; v/v)
Tf = 198°C (litt.[81] 196-198°C)
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3324 (O-H) ; 3095 (C-H Ar) ; 1397 (C-N Ar) ; 1077 (C-OH).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 12,12 (s, 1H, NH-9) ; 7,66 (s, 1H, H-8) ; 5,63 (s, 2H, NH_2) ; 4,77 (m, 2H, OH) ; 3,96 (m, 4H, H-β) ; 3,65 (m, 4H, H-α).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 159,4 (C-6) ; 154,0 (C-4) ; 153,4 (C-2) ; 134,7 (C-8) ; 112,9 (C-5) ; 59,7 (C-β) ; 51,3 (C-α).
ESIMS : ($M+H^+$) *m/z* 239 ; ($M+Na^+$) *m/z* 261.

2-(6-(*N*,*N*-(di-2-hydroxyéthyl)amino)-purin-9-yl)éthanoate de *tert*-butyle (19)

Le produit, une poudre blanche, est obtenu avec un rendement de 89% (1,50 g).

Rf = 0,42 ($CHCl_3$ / EtOH ; 7/3 ; v/v)
Tf = 110°C
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3476 (O-H) ; 1721 (C=O) ; 1057 et 1034 (C-OH).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 8,20 (s, 1H, H-2) ; 8,12 (s, 1H, H-8) ; 4,95 (s, 2H, H-2') ; 4,80 (t, 2H, J = 5,2 Hz, OH) ; 4,27 (m, 2H, H-α) ; 3,83 (m, 2H, H-α) ; 3,68 (m, 4H, H-β) ; 1,42 (s, 9H, $(CH_3)_3$).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 166,9 (C-1') ; 152,0 (C-4) ; 151,7 (C-2) ; 149,0 (C-6) ; 147,9 (C-8) ; 130,4 (C-5) ; 82,0 ($\underline{\mathbf{C}}(CH_3)_3$) ; 60,0 (C-β) ; 53,6 (C-α) ; 45,5 (C-2') ; 27,6 ($C(\underline{\mathbf{C}}H_3)_3$).
ESIMS : ($M+H^+$) *m/z* 338 ; ($M+Na^+$) *m/z* 360

2-(2-amino-6-(*N,N*-(di-2-hydroxyéthyl)amino)-purin-9-yl)éthanoate de *tert*-butyle

(20)

Le produit, une poudre blanche, est obtenu avec un rendement de 78% (1,37 g).

Rf = 0,37 ($CHCl_3$ / EtOH ; 7/3 ; v/v)
Tf = 112°C
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3500 (O-H) ; 2922 et 2868 (Csp^3-H) ; 1731 (C=O) ; 1595 (C-NH_2) ; 1060 et 1037 (C-OH).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 7,69 (s, 1H, H-8) ; 5,81 (s, 2H, NH_2) ; 4,75 (t, 2H, J = 4,6 Hz, OH); 4,74 (s, 2H, H-2') ; 4,02 (m, 4H, H-α) ; 3,65 (m, 4H, H-β) ; 1,42 (s, 9H, $(CH_3)_3$).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 167,3 (C-1') ; 159,6 (C-6) ; 154,2 (C-4) ; 152,9 (C-2) ; 137,2 (C-8) ; 112,7 (C-5) ; 81,8 (**C**$(CH_3)_3$) ; 59,6 (C-β) ; 51,2 (C-α) ; 44,8 (C-2') ; 27,7 ($(CH_3)_3$).
ESIMS : ($M+H^+$) *m/z* 353 ; ($M+Na^+$) *m/z* 375

Chlorure de 9-(2-chloroéthyl)-7,8-dihydroimidazo[2,1-*i*]purinium (15)

Dans un ballon de 5 mL, on introduit 50 mg (0,23 mmol) de composé **13**, puis on ajoute 2 mL de chlorure de thionyle. Le milieu est placé sous agitation magnétique à température ambiante pendant six heures. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur fritté. Le solide blanc ainsi récupéré est lavé avec de l'éther diéthylique. Le produit pur est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 88% (52 mg).

Rf = 0,47 (BuOH/AcOH/H_2O ; 2/1/1 ; v/v/v)
Tf = 268°C (décomposition)
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 8,78 (s, 1H, H-5) ; 8,58 (s, 1H, H-2) ; 6,00 (s, 1H, NH-3) ; 4,79 (t, 2H, J = 9,5 Hz, H-7) ; 4,42 (t, 2H, J = 5,9 Hz, H-α) ; 4,19 (t, 2H, J = 9,5 Hz, H-8) ; 4,07 (t, 2H, J = 5,9 Hz, H-β).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 151,1 (C-9b) ; 149, 7 (C-9a) ; 144,6 (C-5) ; 143,9 (C-2) ; 115,4 (C-3a) ; 48,3 (C-8) ; 48,0 (C-α) ; 47,8 (C-7) ; 41,1 (C-β).
ESIMS : (M^+) *m/z* 224 et 226.

Chloration de la 2-amino-6-(*N,N*-(di-2-hydroxyéthyl)amine)purine

Dans un ballon de 5 mL, on introduit 100 mg (0,42 mmol) de composé **14**, puis on ajoute 2 mL de chlorure de thionyle. Le milieu est placé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 16 heures puis filtré sur fritté. Le solide blanc ainsi récupéré est lavé avec de l'éther diéthylique. Les composés **16** et **16'** sont isolés par plaques chromatographiques préparatives (éluant BuOH/AcOH/H_2O ; 2/1/1 ; v/v/v).

Chlorure de 5-amino-9-(2-chloroéthyl)-7,8-dihydroimidazo[2,1-*i*]purinium (16)

Solide blanc.
Rf = 0,45 (BuOH/AcOH/H_2O ; 2/1/1 ; v/v/v)
Rendement : 63% (65 mg) ; Tf = 273°C (decomposition)
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 8,12 (s, 1H, H-2) ; 7,86 (s, 1H, NH_2) ; 4,33 (t, 2H, J = 8,6 Hz, H-7) ;

4,12 (t, 2H, J = 8,6 Hz, H-8) ; 4,02 (t, 2H, J = 5,2 Hz, H-α) ; 3,73 (t, 2H, J = 5,2 Hz, H-β).
HRMS : calculée pour $C_9H_{12}N_6Cl$ (M^+) : 239,0807 trouvée : 239,0806.

Chlorure de 5-amino-9-(2-hydroxyéthyl)-7,8-dihydroimidazo[2,1-*i*]purinium (16')

Solide blanc.

Rf = 0,32 (BuOH/AcOH/H_2O ; 2/1/1 ; v/v/v)
Rendement : 27% (26 mg) ; Tf (solide blanc) = 269°C (decomposition)
RMN ^1H, (DMSO-d_6, δ) : 8,08 (s, 1H, H-2) ; 7,78 (s, 1H, NH_2) ; 4,37 (t, 2H, J = 9,2 Hz, H-7) ;

4,11 (t, 2H, J = 9,2 Hz, H-8) ; 3,92 (t, 2H, J = 5,6 Hz, H-α) ; 3,66 (m, 2H, H-β).
HRMS : calculée pour $C_9H_{13}N_6O$ (M^+) : 221,1145 trouvée : 221,1144.

Chlorure de 3-(tertbutoxycarbonylméthyl)-9-(2-chloroéthyl)-7,8-dihydroimidazo [2,1-*i*]purinium (21)

Dans un ballon de 5 mL, on introduit 100 mg de composé **19** (0,30 mmol) dans 2 mL de chloroforme. On introduit ensuite trois équivalents de chlorure de thionyle (66 µL, 0,9 mmol) et trois équivalents de pyridine (73 µL, 0,9 mmol). Après 24 heures de réaction et évaporation sec, le produit **21** est obtenu par recristallisation du brut réactionnel dans l'éthanol avec un rendement de 90% (101 mg).

Rf = 0,56 (BuOH/AcOH/H_2O ; 2/1/1 ; v/v/v)
Tf = 224°C
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 8,88 (s, 1H, H-5) ; 8,65 (s, 1H, H-2) ; 5,19 (s, 2H, H-2') ; 4,83 (t, 2H, J = 9,5 Hz, H-7) ; 4,43 (t, 2H, J = 5,8 Hz, H-α) ; 4,23 (t, 2H, J = 9,5 Hz, H-8) ; 4,09 (t, 2H, J = 5,8 Hz, H-β) ; 1,44 (s, 9H, CH_3 tBu).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 166,1 (C-1') ; 150,3 (C-9b) ; 149,8 (C-9a) ; 145,9 (C-5) ; 141,8 (C-2) ; 115,4 (C-3a) ; 82,8 ($C_{quat.}$ tBu) ; 48,5 (C-8) ; 47,9 (C-α) ; 47,8 (C-7) ; 45,5 (C-2') ; 41,1 (C-β) ; 27,6 (CH_3 tBu).

HRMS : calculée pour $C_{15}H_{21}N_5O_2Cl$ (M^+) : 338,1378 trouvée : 338,1379.

Chlorure de 5-amino-3-(tertbutoxycarbonylméthyl)-9-(2-chloroéthyl)-7,8-dihydroimidazo[2,1-*i*]purinium (22)

Dans un ballon de 5 mL, on introduit 100 mg de composé **20** (0,28 mmol) dans 2 mL de chloroforme. On introduit ensuite trois équivalents de chlorure de thionyle (61 µL, 0,84 mmol) et trois équivalents de pyridine (68 µL, 0,84 mmol). Après 24 heures de réaction et évaporation sec, le produit **22** est obtenu par recristallisation du brut réactionnel dans l'éthanol avec un rendement de 87% (95 mg).

Rf = 0,51 ($BuOH/AcOH/H_2O$; 2/1/1 ; v/v/v)
Tf = 236°C (décomposition)
RMN ^1H, (DMSO-d_6, δ) : 8,15 (s, 1H, H-2) ; 8,02 (s, 2H, NH_2) ; 4,86 (s, 2H, H-2') ; 4,37 (t, 2H, J = 9,4 Hz, H-7) ; 4,32 (t, 2H, J = 5,6 Hz, H-α) ; 4,12 (t, 2H, J = 9,4 Hz, H-8) ; 4,01 (t, 2H, J = 5,6 Hz, H-β) ; 1,43 (s, 9H).

HRMS : calculée pour $C_{15}H_{22}N_6O_2Cl$ (M^+) : 353,1487 trouvée : 353,1488.

Chlorure de 3-(carboxyméthyl)-9-(2-chloroéthyl)-7,8-dihydroimidazo[2,1-*i*]purinium (23)

Dans un ballon de 5 mL, on introduit 50 mg (0,13 mmol) de composé **21** dans 2 mL d'acide trifluoroacétique. Après deux heures de réaction, le solvant est évaporé à sec. Le brut réactionnel obtenu est lavé à l'éthanol froid pour obtenir le composé **23**, avec un rendement quantitatif (41 mg).

Rf = 0,36 ($BuOH/AcOH/H_2O$; 2/1/1 ; v/v/v)
RMN ^{1}H, ($DMSO\text{-}d_6$, δ) : 8,80 (s, 1H, H-5) ; 8,59 (s, 1H, H-2) ; 5,15 (s, 2H, H-2') ; 4,78 (t, 2H, J = 9,5 Hz, H-7) ; 4,41 (t, 2H, J = 5,9 Hz, H-α) ; 4,19 (t, 2H, J = 9,5 Hz, H-8) ; 4,07 (t, 2H, J = 5,9 Hz, H-β).
RMN ^{13}C**,** ($DMSO\text{-}d_6$, δ) : 168,4 (C-1') ; 150,3 (C-9b) ; 149,8 (C-9a) ; 145,9 (C-2) ; 145,2 (C-5) ; 115,4 (C-3a) ; 48,5 (C-8) ; 48,1 (C-α) ; 47,9 (C-7) ; 45,0 (C-2') ; 41,1 (C-β).

HRMS : calculée pour $C_{11}H_{13}N_5O_2Cl$ (M^+) : 282,0752 trouvée : 282,0754.

Chlorure de 5-amino-3-(carboxyméthyl)-9-(2-chloroéthyl)-7,8-dihydroimidazo [2,1-*i*]purinium (24)

Dans un ballon de 5 mL, on introduit 50 mg (0,13 mmol) de composé **22** dans 2 mL d'acide trifluoroacétique. Après deux heures de réaction, le solvant est évaporé à sec. Le brut réactionnel obtenu est lavé à l'éthanol froid pour obtenir le composé **24**, avec un rendement quantitatif (43 mg).

Rf = 0,29 ($BuOH/AcOH/H_2O$; 2/1/1 ; v/v/v)
RMN ^1H, (DMSO-d_6, δ) : 8,13 (s, 1H, H-2) ; 7,94 (s, 2H, NH_2) ; 4,87 (s, 2H, H-2') ; 4,33 (t, 2H, J = 8,9 Hz, H-7) ; 4,32 (t, 2H, J = 6,0 Hz, H-α) ; 4,12 (t, 2H, J = 8,9 Hz, H-8) ; 4,01 (t, 2H, J = 6,0 Hz, H-β).
HRMS : calculée pour $C_{11}H_{14}N_6O_2Cl$ (M^+) : 297,0861 trouvée : 297,0864.

N-Propargyldiéthanolamine (25)

Dans un bicol de 25 mL, on dissous 384 µL de diéthanolamine (4 mmol) dans 5 mL de DMF, On introduit ensuite 2,76 g de carbonate de potassium (8 mmol, 2 éq,). Le bicol est placé dans un bain d'huile, à 80°C et sous argon. Puis on ajoute, goutte-à-goutte, une solution de 5 mL de DMF contenant 430 µL de bromure de propargyle (80% dans le toluène, v/v, 4 mmol, 1 éq,). Après quatre heures de réaction, le solvant est évaporé à sec et le brut réactionnel est purifié sur colonne à gel de silice (gradient d'éluant CH_2Cl_2/MeOH de 100/0 à 90/10 ; v/v). Le produit est obtenu pur sous la forme d'un solide déliquescent orange (416 mg) avec un rendement de 73%.

Rf = 0,45 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 8/2 ; v/v)
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3362 (O-H) ; 2103 (C≡C) ; 1134 (C-N) ; 1073 et 1040 (C-OH).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 4,36 (t, 2H, J = 5,4 Hz, OH) ; 3,43 (q, 4H, J = 6,1 Hz, H-β) ; 3,38 (d, 2H, J = 2,0 Hz, CH_2 propargyle) ; 3,05 (t, 1H, J = 2,0 Hz, CH propargyle) ; 2,53 (t, 4H, J = 6,1 Hz, H-α).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 79,6 (C_{quat} propargyle) ; 75,2 (CH propargyle) ; 59,1 (C-β) ; 55,8 (C-α) ; 42,6 (CH_2 propargyle).

1-Benzyl-4-(*N*,*N*-di-2-hydroxyéthylaminométhyl)-*1H*-[1,2,3]triazole (26)

Dans un bicol de 25 mL, on dissout 859 mg de *N*-propargyldiéthanolamine (6 mmol) dans 10 mL d'une mélange eau / tertiobutanol (1/1 ; v/v). On introduit ensuite 15 mg de sulfate de cuivre pentahydrate (0,06 mmol), 119 mg d'ascorbate de sodium (0,6 mmol) et 837 µL d'azoture de benzyle (6,3 mmol). Le mélange réactionnel est activé par irradiations micro-ondes (2 min, 80°C, 300 W). Après évaporation à sec et purification sur colonne de gel de silice (gradient d'éluant CH_2Cl_2 à CH_2Cl_2 / MeOH de 100/0 à 90/10 ; v/v), le composé est obtenu pur (huile orange) avec un rendement de 78% (1,29 g).

Rf = 0,38 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 9/1 ; v/v)
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3363 (O-H) ; 2947 (Csp^3-H) ; 1497 et 1455 (C=C Ar) ; 1372 (C-N Ar) ; 1221 (C-N) ; 1046 (C-OH).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 8,03 (s, 1H, H-5) ; 7,36 (dd, 2H, J = 6,8 Hz et J = 7,3 Hz, H_{meta}) ; 7,33 (d, 1H, J = 6,8 Hz, H_{para}) ; 7,28 (d, 2H, J = 7,3 Hz, H_{ortho}) ; 5,57 (s, 2H, CH_2 Bn) ; 4,33 (t, 2H, J = 5,4 Hz, OH) ; 3,74 (s, 2H, CH_2) ; 3,44 (q, 4H, J = 5,4 Hz, H-β) ; 2,50 ppm (t, 4H, J = 6,1 Hz, H-α).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 144,2 (C-4) ; 136,3 (C-1 Ar) ; 128,7 (C-meta) ; 128,0 (C-para) ; 127,7 (C-ortho) ; 123,7 (C-5) ; 59,1 (C-β) ; 55,9 (C-α) ; 52,6 (CH_2 Bn) ; 48,9 (CH_2).
MS : ($M+H^+$) *m/z* 277 et ($M+Na^+$) *m/z* 299.

1-Azido-1-désoxy-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-β-D-glucopyranose (27)

Dans un bicol de 100 mL, on dissout 4,25 g de 1-bromo-1-désoxy-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-β-D-glucopyranose (10,3 mmol) dans 40 mL de DMAc. On introduit ensuite 1,34 g d'azoture de sodium (20,6 mmol) et on place le ballon sous agitation magnétique dans un bain d'huile à 60°C. Après quatre heures de réaction, le solvant est évaporé à sec et le brut réactionnel est repris dans 100 mL de chloroforme. La phase organique est lavée par 50 mL d'eau distillée puis 50 mL d'une solution saturée en NaCl. La phase organique est ensuite séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée à sec. Après rinçage à l'éther diéthylique froid et filtration, le produit est obtenu sous forme d'solide jaunâtre avec un rendement de 70% (2,69 g).

Rf = 0,62 (AcOEt/EP ; 7/3 ; v/v)
Tf = 126°C (litt.[71] 126°C)
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 2943 (Csp^3-H) ; 2120 (N_3) ; 1752 (C=O).
RMN ^{1}H, ($CDCl_3$, δ) : 5,22 (t, 1H, J = 9,5 Hz,H-3) ; 5,11 (t, 1H, J = 9,5 Hz,H-4) ; 4,96 (t, 1H, J = 9,2 Hz, H-2) ; 4,65 (d, 1H, J = 8,8 Hz, H-1) ; 4,28 (dd, 1H, J = 4,8 Hz et J = 12,5Hz, H-6a) ; 4,17 (dd, 1H, J = 2,3 Hz et J = 12,4 Hz, H-6b) ; 3,80 (ddd, 1H, J = 2,3 Hz, J = 4,7 Hz et J = 10,0 Hz, H-5) ; 2,11 (s, 3H, CH_3) ; 2,08 (s, 3H, CH_3) ; 2,03 (s, 3H, CH_3) ; 2,01(s, 3H, CH_3).
RMN ^{13}C**,** ($CDCl_3$, δ) : 170,6 (CO) ; 170,1 (CO) ; 169,3 (CO) ; 169,2 (CO) ; 87,9 (C-1) ; 74,0 (C-5) ; 72,6 (C-3) ; 70,6 (C-2) ; 67,9 (C-4) ; 61,7 (C-6) ; 20,7 (CH_3) ; 20,5 (CH_3).

1-Azido-1-désoxy-2,3,5-tri-*O*-acétyl-β-D-ribofuranose (28)

Dans un ballon de 10 mL, on dissout 1,9 g de *per*acétyl-β-D-ribofuranose (6 mmol) dans 12 mL de dichlorométhane. On injecte ensuite 922 µL d'azidotriméthylsilane (6,6 mmol) puis 35 µL de tétrachlorure d'étain (0,3 mmol). La réaction se fait à température ambiante et sous agitation magnétique. Après quatre heures, la réaction est arrêtée par ajout de 1,5 mL d'une solution aqueuse saturée de $NaHCO_3$. Après ajout de 5 mL de dichlorométhane, le mélange est ensuite séparé par décantation. La phase aqueuse est ensuite extraite par 5 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées, puis le solvant est évaporé. Après purification sur colonne de gel de silice (gradient d'éluant EP/$CHCl_3$ de 100/0 à 0/100 ; v/v), le produit est obtenu pur (huile incolore) avec un rendement de 81% (1,45 g).

Rf = 0,77 (AcOEt/EP ; 1/1 ; v/v)
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 2943 (Csp^3-H) ; 2120 (N_3) ; 1682 (C=O) ; 1374 (C-H).
RMN ^{1}H, ($CDCl_3$, δ) : 5,27 (d, 1H, J = 2,0 Hz, H-1) ; 5,25 (dd, 1H, J = 6,6 Hz et J = 4,8 Hz, H-3) ; 5,05 (dd, 1H, J = 4,8 Hz et J = 2,0 Hz, H-2) ; 4,25 (m, 1H, H-4) ; 4,24-4,40 (m, 2H, H-4 et H-5) ; 4,06 (dd, 1H, J = 11,6 Hz et J = 2,1 Hz, H-5b) ; 2,04 (s, 6H, CH_3) ; 1,99 (s, 3H, CH_3).
HRMS : calculée pour $C_{11}H_{15}N_3O_7Na$ ($M+Na^+$) : 324,0802 trouvée : 324,0804.

3-Azido-7-hydroxycoumarine (29)

Dans un bicol de 250 mL, on introduit 2,76 g de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde (20 mmol), 2,34 g de *N*-acétylglycine (20 mmol) et 4,9 g d'acétate de sodium (60 mmol) dans 100 mL d'anhydride acétique. Le mélange est chauffé à reflux pendant seize heures, puis précipité dans de la glace pour donner un solide jaune qui est filtré puis rincé à l'eau froide. Ce résidu est ensuite repris dans un mélange acide chlorhydrique (37% dans l'eau) / Ethanol (2/1 ; v/v ; 30 mL) et placé à reflux durant deux heures. On ajoute ensuite 40 mL d'eau froide pour diluer la solution. Le bicol est mis à refroidir dans un bain d'eau glacée, puis 2,76 g de nitrite de sodium (40 mmol) sont ajoutés. Après dix minutes de réaction, on ajoute 3,9 g d'azoture de sodium (60 mmol). Au bout de 15 min, un précipité se forme, il est filtré, lavé à l'eau froide puis séché au dessiccateur sous vide pour obtenir un solide marron (487 mg, 12%),

Rf = 0,38 (Cyclohexane/Acétone ; 1/1 ; v/v)
Tf = 120°C (litt.[69] 120-122°C)
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 7,55 (s, 1H, H-4) ; 7,47 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H) ; 6,80 (dd, 1H, J = 8,4 Hz et J = 2,2 Hz, H-6) ; 6,74 (d, 1H, J = 2,2 Hz, H-8).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 161,0 (C-2) ; 158,0 (C-7) ; 153,4 (C-10) ; 128,7 (C-5) ; 128,5 (C-4) ; 121,8 (C-9) ; 114,5 (C-3) ; 112,0 (C-6) ; 102,7 (C-8).

5'-*O*-Tosylthymidine (30)

Dans un ballon de 100 mL, on dissout 3,00 g de thymidine (12,29 mmol) dans 24 mL de pyridine anhydre, l'ensemble est mis à 0°C dans un bain de glace, puis on ajoute 2,83 g (14,87 mmol) de chlorure de tosyle. Après une heure de réaction à 0°C, la CCM montre que la réaction n'évolue plus. Le milieu réactionnel est alors évaporé à sec, la pyridine étant azéotropée par le toluène. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (gradient d'éluant CH_2Cl_2/EtOH, 100/0 à 90/10). Le produit tosylé est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 74% (3,633 g).

Rf = 0,30 ($CHCl_3$ / EtOH ; 9/1 ; v/v)
Tf = 163°C (litt[94] 160-164°C)
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3369 (O-H) ; 3175 (NH) ; 3042 (C-H Ar) ; 2934 (C-H Alk) ; 1721 (C=O) ; 1645 (C=C) ; 1363 (SO_2).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : *thymine* : 11,31 (s, 1H, NH) ; 7,38 (s, 1H, H-6) ; 1,80 (s, 3H, CH_3) ; *désoxyribose* : 6,15 (t, 1H, J = 6,8 Hz, H-1') ; 5,42 ($s_{él}$, 1H, OH-3') ; 4,26 (dd, 1H, J = 3,0 Hz et J = 10,7 Hz, H-5'a) ; 4,17 (dd, 1H, J = 5,8 Hz et J = 10,7 Hz, H-5'b) ; 4,16 (m, 1H, H-3') ; 3,86 (m, 1H, H-4') ; 2,15 (dt, J= 6,8 Hz et J = 13,5 Hz, H-2'b) ; *tosyle* : 7,79 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H-2 et H-6) ; 7,47 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H-3 et H-5) ; 2,41 (s, 3H, CH_3).

94 K. Gogoi, A.D. Gunjal, U.D. Phalgune, V.A. Kuma, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2967-2700.

RMN ^{13}C, (DMSO-d_6, δ) : *thymine* : 163,6 (C-4) ; 150,3 (C-2) ; 135,9 (C-6) ; 109,8 (C5) ; 12,1 (CH_3) ; *désoxyribose* : 84,0 (C-4') ; 70,1 (C-3') ; 69,9 (C-5') 38,3 (C-2') ; *tosyle* : 145,1 (C-1) ; 132,1 (C-4), 130,2 (C-3, C-5) ; 127,6 (C-2, C-6) ; 21,1 (CH_3).

3'-*O*-Acétyl-5'-*O*-tosylthymidine (31)

Dans un ballon de 10 mL, on introduit 396 mg de 5'-*O*-tosyl-thymidine (1 mmol) dans 2 mL de pyridine. On ajoute 2 mL d'anhydride acétique et, après une heure de réaction, le milieu réactionnel est évaporé à sec et la pyridine coévaporée au toluène. Le brut réactionnel est repris dans 50 mL de chloroforme, la phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en $NaHCO_3$. Cette phase est séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis évaporée à sec. Le produit est obtenu sous forme de poudre blanch avec un rendement de 90% (394 mg).

Rf = 0,67 ($CHCl_3$ / EtOH ; 9/1 ; v/v)
Tf = 72°C
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3190 (NH) ; 3051 (C-H Ar) ; 2929 (C-H Alk) ; 1760 (C=O) ; 1660 (C=O) ; 1361 (SO_2).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : *thymine* : 11,36 (s, 1H, NH) ; 7,42 ($s_{él}$, 1H, H-6) ; 1,77 (s, 3H, CH_3) ; *désoxyribose* : 6,15 (dd, 1H, J = 6,6 Hz et J = 7,8 Hz, H-1') ; 5,10 (m, 1H, H-4') ; 4,33 (dd, 1H, J = 3,2 Hz et J = 10,8 Hz, H-5'a) ; 4,26 (dd, 1H, J = 5,8 Hz et J = 10,8 Hz, H-5'b) ; 4,12 (m, 1H, H-3') ; 2,03 (s, 3H, CH_3 Ac) ; 2,35 (q, J= 7,3 Hz, H-2'a) ; 2,25 (ddd, J= 2,6 Hz et J = 6,3 Hz et J = 14,3, H-2'b) ; *tosyle* : 7,79 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H-2 et H-6) ; 7,47 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H-3 et H-5) ; 2,41 (s, 3H, CH_3).

3'-*O*-Acétyl-5'-Azido-5'-désoxy-thymidine (32)

Dans un bicol de 25 mL, on dissout 200 mg de 3'-*O*-acétyl-5'-*O*-tosylthymidine (0,46 mmol) dans 6 mL de DMF. On introduit 300 mg d'azoture de sodium (4,6 mmol) puis le mélange est activé par irradiations micro-ondes (5 min, 120°C, 300 W). Le mélange est évaporé à sec et repris dans 50 mL de chloroforme. La phase organique est lavée avec 15 mL d'eau distillée, puis séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée à sec. On ajoute 50 mL d'éther diéthylique à l'huile obtenue puis on active le mélange aux ultrasons pendant 15 minutes. Le précipité formé est filtré et séché au dessiccateur sous vide. Le produit (solide blanc) est obtenu avec un rendement de 79% (112 mg).

Rf = 0,68 ($CHCl_3$ / EtOH ; 9/1 ; v/v)
Tf = 107°C
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3189 (NH) ; 3051 (C-H Ar) ; 2929 (C-H Alk) ; 2029 (N_3) ; 1760-1660 (C=O).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : *thymine* : 11,38 (s, 1H, NH) ; 7,55 ($s_{él}$, 1H, H-6) ; 1,80 (s, 3H, CH_3) ; *désoxyribose* : 6,18 (dd, 1H, J = 6,2 Hz et J = 8,3 Hz, H-1') ; 5,14 (m, 1H, H-4') ; 4,09 (m, 1H, H-3') ; 3,66 (dd, 1H, J = 6,2 Hz et J = 13,2 Hz, H-5'a) ; 3,61 (dd, 1H, J = 4,3 Hz et J = 13,2 Hz, H-5'b) ; 2,48 (m, 1H, H-2'a) ; 2,26 (ddd, J= 2,0 Hz et J = 6,0 Hz et J = 14,2, H-2'b) ; 2,06 (s, 3H, CH_3 Ac).
RMN ^{13}C, (DMSO-d_6, δ) : *thymine* : 163,5 (C-4) ; 150,4 (C-2) ; 135,9 (C-6) ; 109,9 (C-5) ; 12,0 (CH_3) ; *désoxyribose* : 170,0 (CO Ac) ; 83,9 (C-1') ; 81,8 (C-4') ; 74,0 (C-3') ; 51,5 (C-5') 34,9 (C-2') ; 20,7 (CH_3 Ac).

Réaction de couplage par CuAAC : Mode opératoire général.

Dans un bicol de 25 mL, on dissout la *N*-propargyldiéthanolamine (1 éq.) dans 8 mL d'un mélange eau/tertiobutanol (1/1 ; v/v). On introduit ensuite 0,01 équivalents de sulfate de cuivre pentahydrate, 0,01 équivalents d'ascorbate de sodium et 1,05 équivalents de composé azoturé. Le mélange réactionnel est activé par irradiations micro-ondes (80°C, 300 W). Après évaporation à sec, le brut réactionnel est purifié sur colonne de gel de silice (gradient d'éluant CH_2Cl_2 / MeOH de 100/0 à 90/10 ; v/v).

1'-(4-(*N,N*-di-2-hydroxyéthylaminométhyl)-[1,2,3]triazol-1-yl)-2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl-β-D-glucopyranose (33)

A partir de 80 mg de *N*-propargyldiéthanolamine (0,56 mmol), 2 mg de sulfate de cuivre pentahydrate, 12 mg d'ascorbate de sodium et 220 mg (0,59 mmol) de 1-azido-1-désoxy-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-β-D-glucopyranose, le produit **33** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement quantitatif (289 mg),

Rf = 0,6 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 9/1 ; v/v)
Tf = 96°C
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3406 (O-H) ; 2951 (C-H Alk) ; 1748 (C=O) ; 1372 (C-N Ar) ; 1250 (C-N) ; 1075 et 1040 (C-OH).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 8,27 (s, 1H, H-5) ; 6,31 (d, 1H, J = 9,0 Hz, H-1') ; 5,62 (t, 1H, J = 9,3 Hz, H-2') ; 5,55 (t, 1H, J = 9,42 Hz, H-3') ; 5,17 (t, 1H, J = 9,7 Hz, H-4') ; 4,37 (m, 1H,

H-5') ; 4,32 (t, 2H, J = 5,6 Hz, OH) ; 4,15 (dd, 1H, J = 5,3 Hz et J = 12,2 Hz, H-6'a) ; 4,08 (dd, 1H, J = 2,1 Hz et J = 12,2 Hz, H-6'b) ; 3,76 (s, 2H, CH_2) ; 3,44 (q, 4H, J = 5,6 Hz, H-β) ; 2,48 (t, 4H, J = 5,6 Hz, H-α) ; 2,03 (s, 3H, CH_3) ; 2,01 (s, 3H, CH_3) ; 1,96 (s, 3H, CH_3) ; 1,77 (s, 3H, CH_3).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 169,9 (CO) ; 169,4 (CO) ; 169,3 (CO) ; 168,3 (CO) ; 144,4 (C-4) ; 122,5 (C-5) ; 83,6 (C-1') ; 73,1 (C-5') ; 72,0 (C-3') ; 70,1 (C-2') ; 67,5 (C-4') ; 61,7 (C-6') ; 59,0 (C-β) ; 55,7 (C-α) ; 48,5 (CH_2) ; 20,4 (CH_3) ; 20,3 (CH_3) ; 20,1 (CH_3) ; 19,7 (CH_3).
HRMS : calculée pour $C_{21}H_{33}N_4O_{11}$ ($M+H^+$) : 517,2140 trouvée : 517,2143.

1'-(4-(*N*,*N*-di-2-hydroxyéthylaminométhyl)-[1,2,3]triazol-1-yl)-2',3',5'-tri-*O*-acétyl-β-D-ribofuranose (34)

A partir de 272 mg de *N*-propargyldiéthanolamine (1,9 mmol), 6 mg de sulfate de cuivre pentahydrate, 40 mg d'ascorbate de sodium et 647 mg (2,0 mmol) de *per*acétyl-β-D-azidoribofuranose, le composé est obtenu pur (huile incolore) avec un rendement de 71% (630 mg).

Rf = 0,37 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 9/1 ; v/v)
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3301 (O-H) ; 1682 (C=O) ; 1369 (C-N Ar) ; 1261 (C-N) ; 1069 (C-OH).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 8,20 (s, 1H, H-5) ; 6,34 (d, 1H, J = 3,4 Hz, H-1') ; 5,77 (dd, 1H, J = 3,4 Hz et J = 5,2 Hz, H-2') ; 5,56 (t, 1H, J = 5,62 Hz, H-3') ; 4,44 (m, 1H, H-4') ; 4,35 (t, 2H, J = 5,5 Hz, OH) ; 4,34 (dd, 1H, J = 4,0 Hz et J = 10,9 Hz, H-5'a) ; 4,09 (dd, 1H, J = 5,1 Hz et J = 10,9 Hz, H-5'b) ; 3,79 (s, 2H, CH_2) ; 3,46 (dt, 4H, J = 6,2 Hz et J = 5,5 Hz, H-β) ; 2,52 (t, 4H, J = 6,2 Hz, H-α) ; 2,12 (s, 6H, CH_3) ; 1,97 (s, 3H, CH_3).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 169,9 (CO) ; 169,4 (CO) ; 169,1 (CO) ; 144,6 (C-4) ; 123,4 (C-5) ; 88,8 (C-1') ; 79,6 (C-4') ; 73,3 (C-2') ; 70,1 (C-3') ; 62,5 (C-5') ; 59,0 (C-β) ; 55,8 (C-α) ; 48,7 (CH_2) ; 20,3 (CH_3) ; 20,2 (CH_3) ; 20,1 (CH_3).
HRMS : calculée pour $C_{18}H_{29}N_4O_9$ ($M+H^+$) : 445,1929 trouvée : 445,1930.

7-Hydroxy-3-(4-(*N*,*N*-di-2-hydroxyéthylaminométhyl)-[1,2,3]triazol-1-yl)coumarine (35)

A partir de 378 mg de *N*-propargyldiéthanolamine (2,64 mmol), 7 mg de sulfate de cuivre pentahydrate, 55 mg d'ascorbate de sodium et 564 mg (2,77) de 3-azido-7-hydroxycoumarine, le composé est obtenu pur sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 78% (715 mg).

Rf = 0,46 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 9/1 ; v/v)
Tf = 162°C
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3392 (O-H) ; 2926 (C-H Alk) ; 1732 (C=O) ; 1369 (C-N Ar) ; 1229 (C-N) ; 1075 (C-OH).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : *coumarine :* 10,85 ppm (s, 1H, OH-7) ; 8,60 (s, 1H, H-4) ; 7,74 (d, 1H, J = 8,5 Hz, H-5) ; 6,92 (dd, 1H, J = 8,5 Hz et J = 2,0 Hz, H-6) ; 6,86 (d, 1H, J = 2,0 Hz, H-8) ; *lien triazolique :* 8,45 (s, 1H, H-5) ; 3,87 (s, 1H, CH_2) ; *diéthanolamine :* 4,40 (m, 2H, OH) ; 3,49 (t, 4H, J = 6,2 Hz, H-β) ; 2,57 (t, 4H, J = 6,2 Hz, H-α).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : *coumarine :* 162,3 (C-7) ; 156,21 (C-2) ; 154,5 (C-10) ; 135,9 (C-4) ; 130,8 (C-5) ; 119,3 (C-3) ; 114,2 (C-6) ; 110,3 (C-9) ; 102,7 (C-8) ; *lien triazolique :* 144,1 (C-4) ; 124,4 (C-5) ; 48,7 (CH_2) ; *diéthanolamine :* 59,1 (C-β) ; 55,8 (C-α).
HRMS : calculée pour $C_{16}H_{19}N_4O_5$ ($M+H^+$) : 347,1350, trouvée : 347,1352.

3'-*O*-Acétyl-5'-désoxy-5'-(4-(*N*,*N*-di-2-hydroxyéthylaminométhyl)-[1,2,3]triazol-1-yl)thymidine (36)

A partir de 440 mg de *N*-propargyldiéthanolamine (3,08 mmol), 8 mg de sulfate de cuivre pentahydrate, 64 mg d'ascorbate de sodium et 1,00 g (3,24) de 5'-azido-3'-acétylthymidine, le composé est obtenu pur sous la forme d'une mousse jaune avec un rendement de 64% (973 mg).

Rf = 0,29 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 9/1 ; v/v)
Tf = 56°C
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3457 (O-H) ; 3047 (C-H Ar) ; 1737 et 1686 (C=O) ; 1368 (C-N Ar) ; 1234 (C-N) ; 1068 (C-OH).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : *thymine :* 11,36 (s, 1H, NH) ; 7,42 ($s_{él}$, 1H, H-6) ; 1,81 (s, 3H, CH_3) ; *désoxyribose :* 6,13 (dd, 1H, J = 6,2 Hz et J = 8,16 Hz, H-1') ; 5,27 (m, 1H, H-3') ; 4,75 (dd, 1H, J = 14,5 Hz et J = 5,3 Hz, H-5'a) ; 4,71 (dd, 1H, J = 14,5 Hz et J = 7,3 Hz, H-5'b) ; 4,33 (m, 1H, H-4') ; 2,35 (dt,1H, J = 7,3 Hz et J = 14,3, H-2'a) ; 2,26 (ddd, J = 6,2 Hz et J = 2,4 Hz et J = 14,3 Hz, H-2'b) ; 2,05 ($s_{él}$, 3H, CH_3) ; *lien triazolique :* 7,99 (s, 1H, H-5) ; 3,75 (s, 2H, CH_2) ; *diéthanolamine :* 4,33 (m, 2H, OH) ; 3,44 (t, 4H, J = 6,1 Hz, H-β) ; 2,50 (m, 4H, H-α).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : *thymine :* 163,5 (C-4) ; 150,3 (C-2) ; 135,9 (C-6) ; 109,9 (C-5) ; 12,0 (CH_3) ; *désoxyribose :* 169,9 (CO) ; 84,1 (C-1') ; 81,2 (C-4') ; 74,1 (C-3') ; 50,8 (C-5') ; 34,9 (C-2') ; *lien triazolique :* 143,9 (C-4) ; 124,2 (C-5) ; 20,6 (CH_3) ; *diéthanolamine :* 59,0 (C-β) ; 55,7 (C-α) ; 48,8 (CH_2).
HRMS : calculée pour $C_{19}H_{27}N_6O_5Cl_2$ ($M+H^+$) : 453,2092, trouvée : 453,2098.

Réaction de Chloration : Mode Opératoire Général.

Dans un ballon de 10 ml, on dissout le composé dihydroxylé (1 éq.) dans 2 mL de chloroforme. On introduit par la suite 3 équivalents de pyridine puis 3 équivalents de chlorure de thionyle. Le mélange réactionnel est activé durant quatre heures aux ultrasons puis évaporé à sec, Les traces de pyridine sont ensuite éliminées par coévaporation avec du toluène. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de gel de silice (gradient d'éluant CH_2Cl_2 / MeOH de 100/0 à 90/10 ; v/v).

1-Benzyl-4-(*N*,*N*-di-2-chloroéthylaminométhyl)-*1H*-[1,2,3]triazole (37)

A partir de 180 mg de composé **26** (0,65 mmol), 157 µL de pyridine (1,95 mmol) et 142 µL de chlorure de thionyle (1,95 mmol), on obtient le composé **37**, sous la forme d'une huile orangée, avec un rendement de 61% (124 mg).

Rf = 0,69 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 95/5 ; v/v)
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 2951 (N-Csp^3-H) ; 1361 (C-N Ar) ; 1225 (C-N) ; 1502 et 1455 (C=C Ar) ;.
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 7,44 (s, 1H, H-5) ; 7,34 (m, 3H, H-Ar) ; 7,26 (m, 2H, H-Ar) ; 5,53 (s, 2H, CH_2 Bn) ; 3,90 (s, 2H, CH_2) ; 3,52 (t, 4H, J = 6,8 Hz, Hα) ; 2,91 (t, 4H, J = 6,8 Hz, Hβ).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 145,4 (C-4) ; 134,7 ; 129,2 ; 128,8 ; 128,0 (C-Ar) ; 122,5 (C-5) ; 55,9 (C-β) ; 54,2 (CH_2 Bn) ; 49,6 (CH_2) ; 42,03 (C-α).
HRMS : calculée pour $C_{14}H_{19}N_4Cl_2$ ($M+H^+$) : 313,0981, trouvée : 383,0984.

1'-(4-(*N,N*-di-2-chloroéthylaminométhyl)-[1,2,3]triazol-1-yl)-2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl-β-D-glucopyranose (38)

A partir de 114 mg de composé **33** (0,22 mmol), 53 µL de pyridine (0,66 mmol) et 48 µL de chlorure de thionyle (0,66 mmol), on obtient le composé **38** (solide blanc) avec un rendement de 47% (57 mg).
Rf = 0,76 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 9/1 ; v/v)
Tf = 92°C
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 2961 (C-H Ar) ; 1755 et 1744 (C=O) ; 1371 (C-N Ar) ; 1250 (C-N).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 8,34 (s, 1H, H-5) ; 6,32 (d, 1H, J = 9,0 Hz, H-1') ; 5,63 (t, 1H, J = 9,4 Hz, H-2') ; 5,56 (t, 1H, J = 9,4 Hz, H-3') ; 5,17 (t, 1H, J = 9,8 Hz, H-4') ; 4,37 (m, 1H, H-5') ; 4,14 (dd, 1H, J = 5,4 Hz et J = 12,5 Hz, H-6'a) ; 4,08 (dd, 1H, J = 2,2 Hz et J = 12,5 Hz, H-6'b) ; 3,86 (s, 2H, CH_2) ; 3,62 (m, 4H, H-β) ; 2,80 (t, 4H, J = 6,8 Hz, H-α) ; 2,03 (s, 3H, CH_3) ; 2,00 (s, 3H, CH_3) ; 1,97 (s, 3H, CH_3) ; 1,78 (s, 3H, CH_3).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 169,9 (CO) ; 169,4 (CO) ; 169,3 (CO) ; 168,3 (CO) ; 143,8 (C-4) ; 123,0 (C-5) ; 83,8 (C-1') ; 73,2 (C-5') ; 72,0 (C-3') ; 70,3 (C-2') ; 67,6 (C-4') ; 61,8 (C-6') ; 54,7 (C-β) ; 47,5 (CH_2) ; 41,8 (C-α) ; 20,5 (CH_3) ; 20,4 (CH_3) ; 20,2 (CH_3) ; 19,8 (CH_3).
HRMS : calculée pour $C_{21}H_{31}N_4O_9Cl_2$ ($M+H^+$) : 553,1463 trouvée : 553,1462.

1'-(4-(*N*,*N*-di-2-chloroéthylaminométhyl)-[1,2,3]triazol-1-yl)-2',3',5'-tri-*O*-acétyl-β-D-ribofuranose (39)

A partir de 70 mg de composé **34** (0,255 mmol), 72 µL de pyridine (0,77 mmol) et 56 µL de chlorure de thionyle (0,77 mmol), on obtient le composé **39** (huile orangée) avec un rendement de 50% (39 mg).

Rf = 0,54 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 97/3 ; v/v)
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 2960 (C-H Alk) ; 1747 (C=O) ; 1372 (C-N Ar) ; 1226 (C-N).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 7,80 (s, 1H, H-5) ; 6,16 (d, 1H, J = 4,2 Hz, H-1') ; 5,80 (dd, 1H, J = 4,2 Hz et J = 5,1 Hz, H-2') ; 5,60 (t, 1H, J = 5,2 Hz, H-3') ; 4,48 (m, 1H, H-4') ; 4,40 (dd, 1H, J = 3,1 Hz et J = 12,3 Hz, H-5'a) ; 4,25 (dd, 1H, J = 4,2 Hz et J = 12,3 Hz, H-5'b) ; 4,02 (s, 2H, CH_2) ; 3,60 (m, 4H, H-β) ; 3,00 (m, 4H, H-α) ; 2,13-2,11 (m, 9H, CH_3).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : 170,4 (CO) ; 169,5 (CO) ; 169,3 (CO) ; 122,2 (C-5) ; 90,0 (C-1') ; 81,0 (C-4') ; 74,3 (H-2') ; 70,8 (H-3') ; 63,0 (C-5') ; 55,8 (C-α) ; 49,4 (CH_2) ; 41,6 (C-β) ; 20,9 (CH_3) ; 20,8 (CH_3) ; 20,4 (CH_3).
HRMS : calculée pour $C_{18}H_{27}Cl_2N_4O_7$ ($M+H^+$) : 481,1251 trouvée : 481,1252.

7-Hydroxy-3-(4-(*N*,*N*-di-2-chloroéthylaminométhyl)-[1,2,3]triazol-1-yl)coumarine

(40)

A partir de 173 mg de composé **35** (0,5 mmol), 121 µL de pyridine (1,5 mmol) et 109 µL de chlorure de thionyle (1,5 mmol), on obtient le composé **40** (solide jaunâtre) avec un rendement de 76% (145 mg).

Rf = 0,8 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 9/1 ; v/v)
Tf = 136°C
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3400 (O-H Ar) ; 2926 (C-H Alk) ; 1733 (C=O) ; 1373 (C-N Ar) ; 1236 (C-N).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : *coumarine :* 11,04 ppm (s, 1H, OH-7) ; 8,78 (s, 1H, H-4) ; 7,78 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-5) ; 6,94 ($d_{él}$, 1H, J = 8,4 Hz, H-6) ; 6,90 (d, 1H, H-8) ; *lien triazolique :* 8,65 (s, 1H, H-5) ; 3,87 (s, 2H, CH_2) ; *dichloroéthylamine :* 3,99 (m, 4H, H-β) ; 3,34 (m, 4H, H-α).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : *coumarine :* 162,3 (C-7) ; 156,21 (C-2) ; 154,5 (C-10) ; 131,0 (C-5) ; 119,3 (C-3) ; 114,3 (C-6) ; 110,3 (C-9) ; 102,2 (C-8) ; *lien triazolique :* 144,1 (C-4) ; 136,3 (C-5) ; 48,7 (CH_2) ; *dichloroéthylamine :* 59,1 (C-β) ; 53,5 (C-α).
HRMS : calculée pour $C_{16}H_{19}N_4O_3Cl_2$ ($M+H^+$) : 383,0672, trouvée : 383,0674.

3'-*O*-Acétyl-5'-désoxy-5'-(4-(*N*,*N*-di-2-chloroéthylaminométhyl)-[1,2,3]triazol-1-yl)thymidine (41)

A partir de 100 mg de composé **36** (0,22 mmol), 106 µL de pyridine (1,32 mmol) et 96 µL de chlorure de thionyle (1,32 mmol), on obtient le composé **41** (huile brunâtre) avec un rendement de 57% (59 mg).

Rf = 0,69 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 85/15 ; v/v)
IR : ν_{max}(cm^{-1}) : 3052 (C-H Ar) ; 1738 et 1686 (C=O) ; 1370 (C-N Ar) ; 1234 (C-N).
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : *thymine :* 11,37 (s, 1H, NH) ; 7,47 ($s_{él}$, 1H, H-6) ; ; 1,81 (s, 3H, CH_3) ; *désoxyribose :* 6,14 (dd, 1H, J = 6,0 Hz et J = 7,8 Hz, H-1') ; 5,26 (m, 1H, H-3') ; 4,78 (dd, 1H, J = 14,2 Hz et J = 5,0 Hz, H-5'a) ; 4,72 (dd, 1H, J = 14,2 Hz et J = 7,5 Hz, H5'b) ; 4,33 (m, 1H, H-4') ; 2,39 (dt,1H, J = 7,8 Hz et J = 14,7, H-2'a) ; 2,26 (ddd, J = 6,0 Hz et J = 2,1 Hz et J = 14,7 Hz, H-2'b) ; 2,05 ($s_{él}$, 3H, CH_3) ; *lien triazolique :* 8,02 (s, 1H, H-5) ; 3,85 ($s_{él}$, 2H, CH_2) ; *dichloroéthylamine :* 3,62 (t, 4H, J = 6,7 Hz, H-β) ; 3,66 (t, 4H, J = 6,7 Hz, H-α).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : *thymine :* 12,0 (CH_3 Thymine) ; 163,5 (C-4) ; 150,3 (C-2) ; 135,9 (C-6) ; 109,9 (C-5) ; *désoxyribose :* 169,8 (CO) ; 84,2 (C-1') ; 81,3 (C-4') ; 74,1 (C-3') ; 50,8 (C-5') ; 34,8 (C-2') ; 20,6 (CH_3) ; *lien triazolique :* 143,3 (C-4) ; 124,4 (C-5) ; 47,7 (CH_2) ; *dichloroéthylamine :* 54,8 (C-α) ; 42,1 (C-β).

HRMS : calculée pour $C_{19}H_{27}N_6O_5Cl_2$ ($M+H^+$) : 489,1415, trouvée : 489,1414.

Déprotection des composés acétylés : Mode Opératoire Général.

Dans un ballon de 5 mL, on dissous 1 équivalent de composé acétylé dans 2 mL d'une solution d'ammoniac méthanolique à 7M. Après une heure de réaction, le solvant est évaporé à sec et le brut réactionnel est purifié sur plaque chromatographique préparative (éluant CH_2Cl_2 / MeOH ; 80/20 ; v/v).

1'-(4-(*N*,*N*-di-2-chloroéthylaminométhyl)-[1,2,3]triazol-1-yl)-β-D-glucopyranose (42)

A partir de 30 mg de composé **38** (0,06 mmol), on obtient le composé **42** (solide blanc) avec un rendement de 67% (15 mg).
Rf = 0,26 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 8/2 ; v/v)
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 8,10 (s, 1H, H-5) ; 5,88 (d, 1H, J = 9,0 Hz, H-1') ; 5,65 (d, 1H, J = 5,2 Hz, OH) ; 5,50 (d; 1H, J = 5,5 Hz, OH) ; 5,30 (m, 1H, OH) ; 4,80 (d, 1H, J = 5,4 Hz, OH) ; 4,38 (t, 1H, J = 9,0 Hz, H-2') ; 3,74 (m, 2H, H-3' et H-4') ; 3,35 (m, 1H, H-5' et H-6') ; 3,84 (s, 2H, CH_2) ; 3,70 (t, 4H, J = 6,5 Hz, H-β) ; 2,85 (t, 4H, J = 6,8 Hz, H-α).
HRMS : calculée pour $C_{13}H_{23}N_4O_5Cl_2$ ($M+H^+$) : 384,0967 trouvée : 384,0969.

1'-(4-(*N,N*-di-2-chloroéthylaminométhyl)-[1,2,3]triazol-1-yl) -β-D-ribofuranose (43)

A partir de 34 mg de composé **39** (0,07 mmol), on obtient le composé **43** (solide blanc) avec un rendement de 73% (18 mg).

Rf = 0,29 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 9/1 ; v/v)
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : 8,21 (s, 1H, H-5) ; 5,93 (d, 1H, J = 4,3 Hz, H-1') ; 5,55 (d, 1H, J = 5,5 Hz, OH) ; 5,21 (d, 1H, J = 4,8 Hz, OH) ; 4,95 (m, 1H, OH) ; 4,35 ($d_{él}$, 1H, J = 4,3 Hz, H-2') ; 4,10 (m, 1H, H-3') ; 3,96 (m, 1H, H-4') ; 3,63 (m, 1H, H-5'a) ; 3,51 (m, 1H, H-5'b) ; 3,86 (s, 2H, CH_2) ; 3,65 (t, 4H, J = 6,9 Hz, H-β) ; 3,16 (m, 4H, H-α).

HRMS : calculée pour $C_{12}H_{20}Cl_2N_4O_4$ ($M+H^+$) : 355,1706 trouvée : 355,1707.

5'-(4-(*N*,*N*-di-2-chloroethylaminomethyl)-[1,2,3]triazol-1-yl)-5'-déoxythymidine (44)

A partir de 32 mg de composé **41** (0,066 mmol), on obtient le composé **43** (solide blanc) avec un rendement de 79% (30 mg).

Rf = 0,36 (CH_2Cl_2 / MeOH ; 85/15 ; v/v)
RMN ^{1}H, (DMSO-d_6, δ) : *thymine :* 11,29 (s, 1H, NH) ; 7,36 ($s_{él}$, 1H, H-6) ; 1,80 (s, 3H, CH_3) ; *désoxyribose :* 6,16 (dd, 1H, J = 6,8 Hz et J = 7,0 Hz, H-1') ; 5,49 (m, 1H, OH) ; 4,70 (dd, 1H, J = 14,4 Hz et J = 4,3 Hz, H-5'a) ; 4,61 (dd, 1H, J = 14,4 Hz et J = 7,4 Hz, H5'b) ; 4,28 (m, 1H, H-3') 4,07 (m, 1H, H-4') ; 2,2-2,08 (m, 2H, H-2') ; *lien triazolique :* 8,00 (s, 1H, H-5) ; 3,84 (s, 2H, CH_2) ; *dichloroéthylamine :* 3,62 (t, 4H, J = 6,8 Hz, H-β) ; 2,81 (t, 4H, J = 6,8 Hz, H-α).
RMN ^{13}C**,** (DMSO-d_6, δ) : *thymine :* 163,5 (C-4) ; 150,3 (C-2) ; 135,9 (C-6) ; 109,8 (C-5) ; 12,0 (CH_3) ; *désoxyribose :* 83,9 (C-1') ; 83,9 (C-4') ; 70,7 (C-3') ; 51,0 (C-5') ; 37,8 (C-2') ; *lien triazolique :* 143,3 (C-4) ; 124,4 (C-5) ; 47,7 (CH_2) ; *dichloroéthylamine :* 54,8 (C-α) ; 42,1 (C-β).

HRMS : calculée pour $C_{17}H_{25}N_6O_4Cl_2$ ($M+H^+$) : 447,1309, trouvée : 447,1307.

6.2. EVALUATION BIOLOGIQUE.

6.2.1. Molécules testées.

Nous avons testé l'effet biologique de sept molécules synthétisées (Figure 7.1) au cours de ce travail et de précédents travaux menés au sein du laboratoire. Les solutions mères sont préparées extemporanément. Pour des problèmes de solubilité, les molécules sont solubilisées à une concentration de 8 mM dans une solution de tampon de culture cellulaire contenant 2% de tétrahydrofurane (THF). Des essais préliminaires ont confirmé que le THF ne présente pas de cytotoxicité sur les cellules cancéreuses. La molécule de référence lors de tous nos tests est le chlorambucil (CLB).

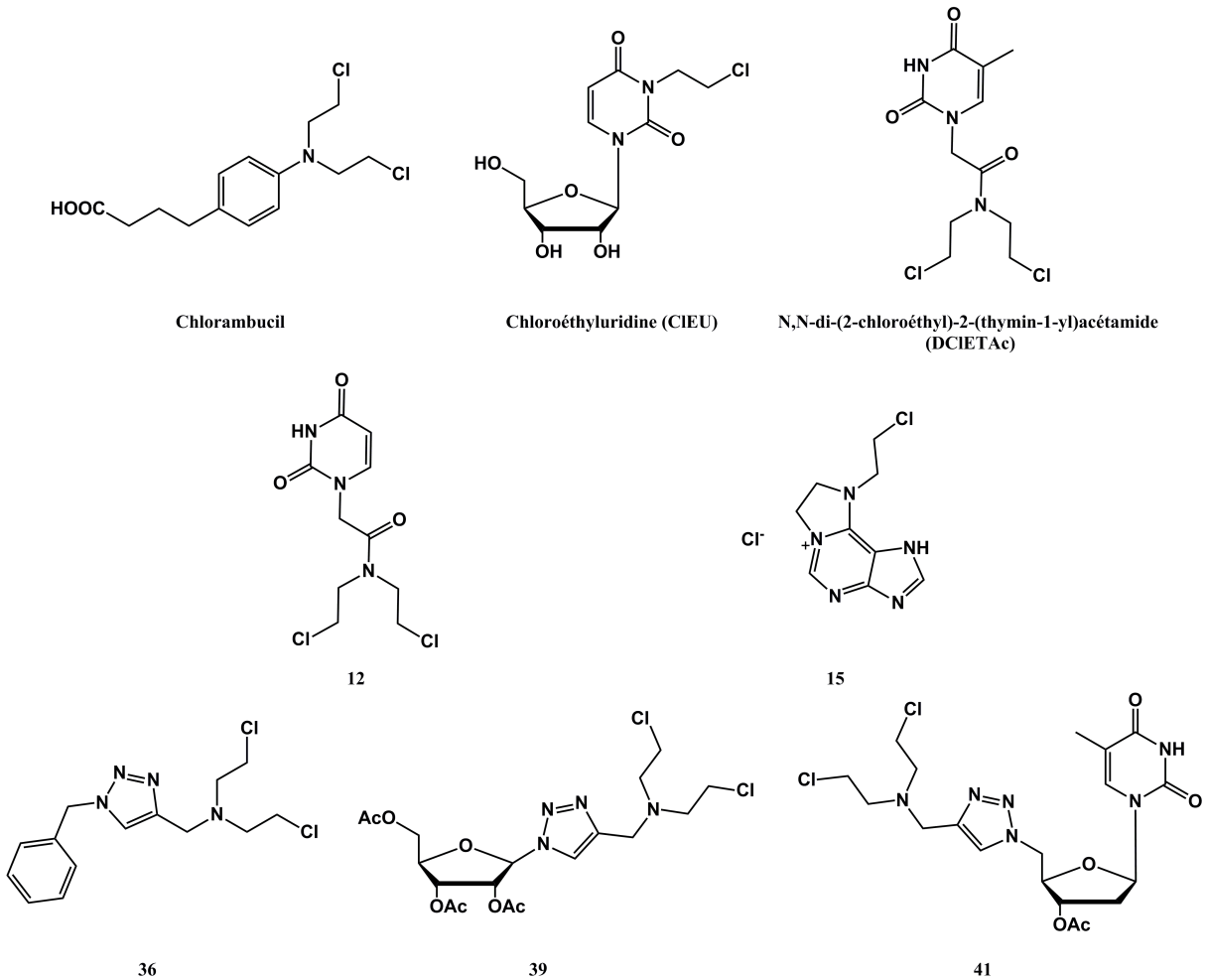


Figure 7.1 : Molécules testées biologiquement.

6.2.2. Matériels biologiques.

6.2.2.1. Lignées cellulaires.

Les études ont été menées sur des lignées cellulaires provenant de l'American Type Collection Culture (ATCC) et caractéristiques de cellules cancéreuses : A431 (carcinome épidermoïde vulvaire, ATCC n° CRL-1555), JURKAT (lymphome T, ATCC n° TIB152, U266 (myélome, ATCC n° TIB-196) et K562 (leucémie myéloïde chronique, ATCC n° CCL-243).

6.2.2.2. Culture cellulaire.

6.2.2.2.1. Cellule adhérente.

Les cellules A431 sont cultivées dans un milieu de culture DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Gibco), auquel est ajouté 10% de sérum de vœu fœtal (SVF, Gibco), préalablement décomplémenté à 56°C, 100 $U.mL^{-1}$ de pénicilline (Gibco), 100 $\mu g.mL^{-1}$ de streptomycine (Gibco), 2 mM de L-glutamine et 1 mM de pyruvate (Gibco).

6.2.2.2.2. Cellules en suspension.

Les lignées cellulaires JURKAT, U266 et K562 sont cultivées dans un milieu de culture RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) auquel est ajouté 10% de sérum de vœu fœtal (SVF, Gibco) 100 $U.mL^{-1}$ de pénicilline (Gibco), 100 $\mu g.mL^{-1}$ de streptomycine (Gibco), 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate (Gibco), 1% de vitamines et 1% d'acides aminés non-essentiels.

6.2.2.3. Etude *in vitro*.

6.2.2.3.1. Etude de la viabilité cellulaire.

6.2.2.3.1.1. Tests MTT –Principe.

L'effet des différents composés sur la viabilité cellulaire a été étudié grâce à un test au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ; Sigma-Aldrich) (Mosmann, 1983).

Au sein des cellules, les mitochondries sont capables de réaliser la réduction des sels de tétrazolium en cristaux de bleu de formazan grâce à leurs déshydrogénases membranaires. Les cristaux de bleu de formazan sont dissous dans un tampon de solubilisation et la densité optique est lue à 595 nm. Ainsi, l'activité de la déshydrogénase est proportionnelle à la viabilité cellulaire.

6.2.2.3.1.2. Tests MTT – Mode opératoire.

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de 96 puits à fond plat (Nunclon®, Nunc) dans du milieu complet à une confluence de 5.10^3 cellules/200 µL/puits pour les cellules adhérentes et de 10^4 cellules/100 µL/puits pour les cellules en suspension. Les cellules sont mises en présence des produits à des concentrations croissantes (de 4 µM à 4 mM). Après 72h de traitement, on ajoute 20 µL d'une solution aqueuse de MTT (5 $mg.mL^{-1}$ dans du PBS) puis les cellules sont incubées pendant 3h à l'étuve (37°C et 5% de CO_2) jusqu'à formation des cristaux de bleu de formazan. Après retrait du milieu de culture, les cristaux de bleu de formazan sont solubilisés par addition de 100 µL/puits d'une solution de solubilisation (Butan-2-ol 50% / HCl 0,04M / SDS 10%). La DO est mesurée à 595 nm grâce à un lecteur de plaque (Triad, Dynex technologies). Le pourcentage de viabilité cellulaire (%V) est déterminé selon la formule suivante :

$$\%V = \left(\frac{DO_{cellules\ traitées}}{Moy\left(DO_{cellules\ non traitées}\right)} \right) x100$$

6.2.2.3.2. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.

6.2.2.3.2.1. Traitement et fixation des cellules.

Les cellules sont mises en culture dans des flasques 75 cm² (Nunclon®) dans du milieu de culture complet à raison de 4.10^6 cellules par flasque pour les cellules adhérentes et de 5.10^6 $cellules.mL^{-1}$ pour les cellules en suspension. Les cellules sont mises en présence des produits à des concentrations correspondantes à la CI_{50} déterminée lors des tests au MTT. Deux prélèvements de $1,2.10^6$ cellules sont effectués après 24 et 48 heures de traitement. La suspension cellulaire est centrifugée à 1000 rpm pendant 10 minutes. Le culot cellulaire est lavé par une remise en suspension avec 2 mL de PBS froid (+4°C) et de nouveau centrifugé pendant 10 minutes. Dans les mêmes conditions, un second lavage est réalisé avec du PBS. Le culot cellulaire est ensuite repris avec 300 µL de PBS froid, auxquels sont ajoutés rapidement 700 µL d'éthanol glacial (-20°C) afin de fixer et perméabiliser les structures cellulaires. Les échantillons sont stockés à une température de -20°C.

6.2.2.3.2.2. Marquage du contenu en ADN de la cellule.

Les échantillons cellulaires sont ensuite centrifugés à 1000 rpm pendant 10 minutes afin de retirer le surnageant. Les culots cellulaires sont lavés à 2 reprises dans le PBS. Les culots obtenus sont resuspendus dans 1 mL de PBS, auquel on ajoute 60 µL d'une solution de RNase A (Roche Applied Science, 1 $mg.mL^{-1}$ dans du tampon Tris), afin d'éliminer les ARN et d'éviter toute interaction avec le fluorophore utilisé. Les cellules sont incubées à température ambiante durant 20 min. Avant l'analyse en CMF, 50 µL d'iodure de propidium (Sigma Aldrich, 1 $mg.mL^{-1}$), intercalant de l'ADN ($\lambda_{excitation}$ = 488 nm, $\lambda_{émission}$ = 617 nm), sont ajoutés à 1 mL de suspension cellulaire contenant environ 10^6 cellules.

6.2.2.3.2.3. Analyse.

L'analyse du cycle cellulaire est réalisée au service commun de cytométrie de l'Université de Limoges à l'aide d'un analyseur-trieur Facs Vantage (Becton-Dickinson, USA) équipé d'un laser argon excitant à 488 nm. Le principe de cette analyse est détaillé dans le Chapitre 5. Pour chaque échantillon, une analyse conditionnelle a été effectuée à l'aide d'un cytogramme FSC (Forward SCatter mesurant la taille des cellules) versus SSC (Side SCatter mesurant la granularité cellulaire), afin d'exclure les évènements correspondants aux débris de petite taille et aux agrégats. L'analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est réalisée par le logiciel ModFit LT (Verity Software House, Inc., USA).

ANNEXES

ANNEXE 1

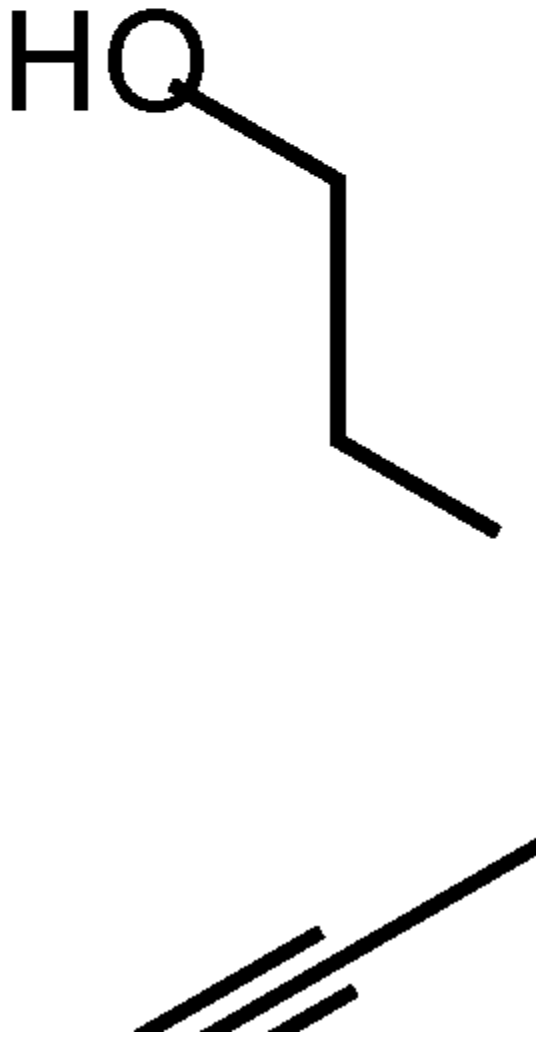
-

MOLÉCULES SYNTHÉTISÉES AU COURS DU TRAVAIL

Chapitre II : Etude de la synthèse d'un dérivé pyrimidique de moutarde à l'azote.

Chapitre III : Synthèse de moutarde à l'azote à motifs puriques.

Chapitre IV : Elaboration de moutardes à l'azote générées par « Click Chemistry ».



Chapitre V : Evaluations biologiques de moutardes à l'azote à motifs puriques, pyrimidiques ou triazoliques.

ANNEXE 2

-

RÉSULTATS DES CALCULS DE MODELISATION MOLECUAIRE

Tableau 1: Résultats obtenus en B3P86 sans tenir compte de l'effet de solvant.

Molécules	ΔE (kCal/mol)	ΔH (kCal/mol)	ΔG (kCal/mol)	Rdt (%)	t (jours)
2a	-5,3	-4,8	-1,3	90	6
2b	-3,2	-2,8	0,5		
5	-7,9	-7,6	-5,5	70	6
6	-3,7	-3,5	-0,7	70	9
7	-3,5	-3,3	-1,2	10	22
8	-1,7	-1,4	0,0	-	34
9	-2,6	-2,6	-1,9	-	34
10	1,4	1,6	3,6	-	15
11	-6,1	-5,8	-2,1	60	20

Tableau 2 : Résultats obtenus en ωB97XD sans tenir compte de l'effet de solvant.

Molécules	ΔE (kCal/mol)	ΔH (kCal/mol)	ΔG (kCal/mol)	Rdt (%)	t (jours)
2a	-9,3	-8,6	-4,9	90	6
2b	-9,0	-8,3	-3,8		
5	-8,7	-8,3	-4,8	70	6
6	-6,8	-6,6	-4,8	70	9
7	-5,5	-5,1	-1,9	10	22
8	-4,1	-3,2	-1,1	-	34
9	-2,9	-2,6	-1,7	-	34
10	1,4	1,6	3,6	-	15
11	-6,1	-5,8	-2,8	60	20

Tableau 3 : Résultats obtenus en B3P86 en tenant compte de l'effet de solvant.

Molécules	ΔE (kCal/mol)	ΔH (kCal/mol)	ΔG (kCal/mol)	Rdt (%)	t (jours)
2a	-4,1	-3,7	0,4	90	6
2b	-3,1	-2,9	0,6		
5	-7,8	-7,6	-5,2	70	6
6	-4,4	-4,2	-1,4	70	9
7	-3,1	-3,1	-1,1	10	22
8	-4,0	-3,9	-2,8	-	34
9	-2,8	-2,8	-2,2	-	34
10	1,4	1,3	2,5	-	15
11	-6,6	-6,6	-3,8	60	20

Tableau 4 : Résultats obtenus en ωB97XD en tenant compte de l'effet de solvant.

Molécules	ΔE (kCal/mol)	ΔH (kCal/mol)	ΔG (kCal/mol)	Rdt (%)	t (jours)
2a	-8,2	-7,8	-6,8	90	6
2b	-7,7	-7,2	-6,4		
5	-7,7	-7,5	-6,2	70	6
6	-7,5	-7,4	-6,0	70	9
7	-5,0	-4,8	-3,2	10	22
8	-5,3	-4,4	-2,4	-	34
9	-3,0	-3,1	-2,6	-	34
10	1,4	1,3	2,5	-	15
11	-6,6	-6,6	-4,4	60	20

Tableau 5: Résultats obtenus en BLYP en tenant compte de l'effet de solvant.

Molécules	ΔE (kCal/mol)	ΔH (kCal/mol)	ΔG (kCal/mol)	Rdt (%)	t (jours)
2a	-1,7	-1,3	1,5	90	6
2b	-0,5	-0,1	3,2		
5	-6,5	-6,3	-4,0	70	6
6	-1,9	-1,6	0,9	70	9
7	-1,3	-1,2	0,4	10	22
8	-2,2	-2,0	-0,6	-	34
9	-1,9	-1,9	-1,2	-	34
10	7,5	7,4	8,4	-	15
11	-2,1	-2,2	-1,8	60	20

Tableau 6 : Résultats obtenus en B3LYP en tenant compte de l'effet de solvant.

Molécules	ΔE (kCal/mol)	ΔH (kCal/mol)	ΔG (kCal/mol)	Rdt (%)	t (jours)
2a	-1,9	-1,5	-1,5	90	6
2b	-0,9	-0,5	1,1		
5	-6,5	-6,3	-4,5	70	6
6	-3,4	-3,2	-0,9	70	9
7	-1,5	-1,4	0,1	10	22
8	-2,8	-2,5	-1,9	-	34
9	-2,2	-2,3	-1,9	-	34
10	7,3	7,2	8	-	15
11	-2,5	-2,5	-1,9	60	20

Tableau 7 : Résultats obtenus en BHandHLYP en tenant compte de l'effet de solvant.

Molécules	ΔE (kCal/mol)	ΔH (kCal/mol)	ΔG (kCal/mol)	Rdt (%)	t (jours)
2a	-1,5	-0,9	1,9	90	6
2b	-0,6	-0,1	3,3		
5	-5,9	-5,7	-4,3	70	6
6	-3,3	-3,1	-1,2	70	9
7	-1,1	-0,2	0,5	10	22
8	-2,8	-2,7	-1,9	-	34
9	-2,0	-2,1	-1,7	-	34
10	7,4	7,3	7,6	-	15
11	1,0	1,4	3,3	60	20

Tableau 8 : Résultats obtenus en HF en tenant compte de l'effet de solvant.

Molécules	ΔE (kCal/mol)	ΔH (kCal/mol)	ΔG (kCal/mol)	Rdt (%)	t (jours)
2a	4,4	5,0	7,4	90	6
2b	5,0	5,5	8,5		
5	-2,4	-2,1	-1,1	70	6
6	1,9	1,2	2,7	70	9
7	1,9	2,0	3,1	10	22
8	-0,1	0,0	0,8	-	34
9	-0,2	-0,2	0,0	-	34
10	9,0	8,9	9,5	-	15
11	-0,5	-0,5	-0,5	60	20

Tableau 9 : Résultats obtenus en CAM-B3LYP en tenant compte de l'effet de solvant.

Molécules	ΔE (kCal/mol)	ΔH (kCal/mol)	ΔG (kCal/mol)	Rdt (%)	t (jours)
2a	-3,3	-2,8	0,4	90	6
2b	-2,3	-2,0	0,9		
5	-6,8	-6,6	-5,0	70	6
6	-4,2	-3,8	-2,5	70	9
7	-2,4	-2,2	-0,8	10	22
8	-2,0	-1,6	-0,4	-	34
9	-2,3	-2,4	-2,0	-	34
10	6,9	6,7	7,0	-	15
11	0,3	0,2	0,1	60	20

Tableau 10 : Résultats obtenus en ωB97X en tenant compte de l'effet de solvant.

Molécules	ΔE (kCal/mol)	ΔH (kCal/mol)	ΔG (kCal/mol)	Rdt (%)	t (jours)
2a	-5,1	-4,6	-3,1	90	6
2b	-4,9	-4,6	-2,9		
5	-6,8	-6,5	-2,9	70	6
6	-5,1	-5,1	-2,6	70	9
7	-3,5	-3,2	-1,5	10	22
8	-4,4	-4,2	-2,1	-	34
9	-3,0	-2,8	-2,7	-	34
10	4,6	4,4	5	-	15
11	-2,8	-2,9	-2,0	60	20

Résumé

Au travers de ce manuscrit, nous décrivons la synthèse de moutardes à l'azote à motifs pyrimidiques, puriques ou triazoliques. Dans un premier temps, nous étudions la synthèse d'une moutarde à l'azote dérivée de l'uracile. L'étude de l'étape d'amidation directe a permis de généraliser cette méthode à diverses amines. Une étude de modélisation moléculaire a mis en évidence l'importance des interactions non liantes dans cette réaction. Dans une seconde partie, nous décrivons la synthèse de moutarde à l'azote à partir de bases puriques. Cette stratégie a conduit à la formation de composés tricycliques, dérivés de la purine. Dans une troisième partie, nous nous sommes intéressés à l'élaboration d'une nouvelle famille de moutardes à l'azote à motifs triazoliques. Grâce à l'utilisation de la réaction de CuAAC, nous avons synthétisé huit molécules aux structures innovantes. Cette dernière stratégie ouvre la voie à la synthèse d'une nouvelle famille de moutardes à l'azote aux motifs variés. Enfin, nous étudions l'activité biologique de certains des composés synthétisés par test de viabilité cellulaire, puis par cytométrie en flux. Deux composés obtenus ont présenté des résultats encourageants vis-à-vis de quatre lignées cancéreuses.

Abstract

The synthesis of pyrimidine, purine and triazole nitrogen mustards is described. First, we studied the synthesis of uracil-based nitrogen mustards. The amidation step was particularly studied and this method was extended to several amines. A series of DFT calculations highlighted the significance of non-bounding interactions in this amidation step. Second, the synthesis of several purine-based nitrogen mustards is described. This synthetic pathway led to the formation of tricyclic compounds, derive from purine. In a third part, we were interested in the elaboration of a new family of triazole nitrogen mustards. Thanks to the use of CuAAC reaction, we managed to synthesize 8 new nitrogen mustards. This latter strategy paves the way to the synthesis of a new family of nitrogen mustards, with an important structural variability. Furthermore, we studied the biological activity of synthesized compounds by testing their cytotoxicity and, then, by flow cytometry. Two of them showed encouraging results towards four cancer cells lines.