



UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole doctorale Sciences-Technologique-Santé

Faculté des Sciences et Techniques

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

N° d'ordre : 2008-57

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Mention : Chimie appliquée-Chimie des Substances Naturelles

Présentée et soutenue publiquement par

Karine TESTE

Le 27 octobre 2008

***SYNTHÈSES ET ÉVALUATIONS BIOLOGIQUES D'AGENTS
ALKYLANTS HÉTÉROCYCLIQUES***

Directrice de thèse :
Rachida ZERROUKI, Professeur

Rapporteurs	Y. TROIN , Professeur	Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand)
	J. XIE , Professeur	ENS Cachan
Examineurs	P. KRAUSZ , Professeur	Université de Limoges
	R. ZERROUKI , Professeur	Université de Limoges



UNIVERSITE DE LIMOGES
Ecole doctorale Sciences-Technologique-Santé
Faculté des Sciences et Techniques
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles
N° d'ordre : 2008-57

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Mention : Chimie appliquée-Chimie des Substances Naturelles

Présentée et soutenue publiquement par

Karine TESTE

Le 27 octobre 2008

***SYNTHÈSES ET ÉVALUATIONS BIOLOGIQUES D'AGENTS
ALKYLANTS HÉTÉROCYCLIQUES***

Directrice de thèse :
Rachida ZERROUKI, Professeur

Rapporteurs	Y. TROIN , Professeur	Université Blaise Pascal-ENSCCF (Clermont-Ferrand)
	J. XIE , Professeur	ENS Cachan
Examineurs	P. KRAUSZ , Professeur	Université de Limoges
	R. ZERROUKI , Professeur	Université de Limoges

Remerciements

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

Je tiens à exprimer ma gratitude envers le Professeur Pierre KRAUSZ qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire et qui me permet de présenter ce travail. Mes sincères remerciements à vous M. KRAUSZ qui avait fortement enrichi ma formation, vos conseils, vos suggestions et commentaires m'ont été très utiles. Je vous remercie également d'accorder à tous vos doctorants toutes les facilités pour mener à bien leurs travaux.

Que les professeurs, Joanne XIE et Yves TROIN trouvent ici l'expression de ma plus haute considération et de ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.

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

Je tiens à remercier le professeur Michel KRÄEMER et Mme Odile SAINTE CATHERINE de m'avoir accueilli très chaleureusement dans le Laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université Paris XIII et de m'avoir permis d'effectuer un stage pour évaluer l'activité biologique de certaines molécules synthétisées. Grâce à vous ma thèse est devenue pluridisciplinaire. Odile, je te remercie pour ton implication dans ce travail, sans toi les manipulations expérimentales auraient été beaucoup plus difficiles.

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

Merci à tous les membres du LCSN (Valérie MAGLIULO, Robert GRANET, Vincent SOL, Vincent CHALEIX, Michèle CONSTANTIN...) qui m'ont accueilli au laboratoire à mon arrivée et qui se sont intéressés de près ou de loin à ce travail et qui m'ont fait part d'observations ou de remarques qui n'ont toujours beaucoup appris. Je voudrais remercier Karine CLÉRIES pour ces précieux conseils pédagogiques et son implication pour le bon déroulement des séances de TP que j'ai eu le plaisir d'effectuer à ses côtés. Je voudrais remercier également Géraldine, Amel et Ludovic devenus docteurs maintenant, pour l'accueil qu'ils m'ont réservé lors de mon arrivée au laboratoire, pour leurs précieux conseils et pour leurs enthousiastes. Je remercie aussi Romain et Julien que j'ai

eu le plaisir d'accueillir dans le laboratoire, je vous remercie tout les deux pour vos calambours, vos devinettes et blagues souvent houleuses mais qui continuent à me faire rire. Je remercie mes deux poupoux Benjamin et Pierre-Antoine que j'ai eu le plaisir d'encadrer durant leur stage de Master 1, je vous souhaite à tous les deux de réussir. Je tiens également à remercier tous les copains thésards pour tous les bons moments passés ensemble : Ninie, François, Yannick, Carmen, Florian, Marc, Aline et mes petits Cyril et Cédric.

Je voudrais remercier également les personnes qui m'ont accordé leur confiance en me permettant de travailler au sein de leur équipe en parallèle avec mes travaux de thèse et sans lesquels je n'aurai pu continuer mes études. Je remercie la BNP Paribas et notamment l'agence de la Souterraine pour m'avoir fait confiance pendant sept ans, merci à Jean-Pierre, Patrick, Patrice et ma petite Chantal à qui je souhaite que du bonheur. Je remercie la faculté des sciences de l'Université de Limoges en particulier M. Alain CÉLERJER ainsi que Mme Marlène Alexandre BURBEAU de m'avoir permis de participer aux inscriptions administratifs des étudiants durant mes trois ans de thèse. Je voudrais remercier aussi tout le personnel du service de la scolarité qui m'ont accueilli très chaleureusement au sein de leur équipe, merci à Martine, Monique, Manuella, Marlène, Patricia, Guilène, Laetitia, Murielle, Annie, Yvette, Anne, Thierry, Brigitte, Aline, Caroline et Chantal avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et qui a su me faire une place dans son bureau. Chantal, je te remercie pour tout ce que tu fais pour tous les doctorants et surtout pour ta patience et ta gentillesse avec eux. Je voudrais remercier aussi l'école Doctorale et en particulier M. Abbas. MOVAHHEDI et Melle Gaëlle PEYRAT de m'a avoir fait confiance pour inscrire administrativement les doctorants. Je remercie l'Office International de l'eau et en particulier le site de la Souterraine où j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler dans le laboratoire avec Anne RANTY et son équipe. Enfin, je tiens à remercier M. Fabrice CHANARD pour m'avoir fait confiance pour diriger à ses côtés la boulangerie-Pâtisserie durant toutes mes études universitaires. Je tiens aussi à remercier Eric et Mme Michelle MARCHAND avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et à toute la clientèle de la Boulangerie-Pâtisserie CHANARD installée à La Souterraine que j'ai eu plaisir de servir durant huit ans, alors à vous tous merci.

Je voudrais remercier tous mes amis pour leur soutien permanent et leur tendresse, merci à Jean Albert, Jacques, Catherine, Anne et Gilles.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour leur soutien sans faille, merci à René et Michou, mon Fanfan et toute sa petite famille, Ninie, Mélissa et Arthur, mon Rickou et toute sa petite famille, Angélique, Justine et Nathan. Merci à l'homme qui partage ma vie, Fabrice sache que je suis très fière de toi, de ton parcours atypique, et de ton courage, tu es un exemple pour moi. Merci pour ton soutien et ton implication dans ce travail, indirects peut être, mais si précieux pour moi. Je tiens, enfin, à remercier les deux personnes sans qui rien n'aurait commencé, merci à mes parents que j'admire. Vous m'avez apporté tant de choses si précieuses pour construire ma vie, l'éducation, le goût du travail, le respect, la force d'aller toujours plus loin. Pour vous deux, mille mercis.

SOMMAIRE

Remerciements

Liste des abréviations 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE..... 3

I.	INTRODUCTION.....	4
	I.1. Les nucléosides et nucléotides: définition, structure.....	4
	I.2. Structure et fonction de l'ADN et de l'ARN.....	6
	I.3. Qu'est ce que le cancer.....	9
	I.4. La chimiothérapie et les agents anticancéreux.....	10
	I.4.1. Les antimétabolites.....	11
	I.4.2. Les agents agissant sur les fonctions cellulaires.....	12
	I.4.3. Les agents agissant principalement au niveau de l'ADN.....	13
	I.5. Généralité sur les dérivés de la moutarde à l'azote.....	17
	I.5.1. Mécanisme d'action dans l'organisme.....	18
	I.5.2. Le chlorambucil.....	20
	I.5.3. Rétrospectives des analogues du chlorambucil.....	21
	I.6. Finalité du travail.....	22
II.	SYNTHÈSE D'AGENTS ALKYLANTS À PARTIR DE NUCLÉOSIDES ET DE DINUCLÉOSIDES.....	24
	II.1. Synthèse d'analogues de nucléosides monofonctionnels.....	24
	II.1.1. Chloroalkylation de la thymidine.....	25
	II.1.2. Chloroalkylation de l'uridine.....	27
	II.2. Synthèse d'analogues de dinucléosides chloroalkylés.....	27
	II.2.1. Mise au point bibliographique.....	28
	II.2.2. Généralité sur la réaction de métathèse des oléfines.....	31
	II.2.3. Synthèse de dinucléosides chloroalkylés reliés par une chaîne but-2-ène entre les positions 3' ...	38
	II.2.4. Synthèse de dinucléosides chloroalkylés reliés par une chaîne but-2-ène entre les positions 5' ...	44
	II.3. Conclusion.....	48
III.	SYNTHÈSE D'AGENTS ALKYLANTS À PARTIR DE BASES PYRIMIDIQUES.....	50
	III.1. Synthèse de la N,N-di-(2-chloroethyl)-2-(thymine-1-yl)acetamide.....	50
	III.1.1. Schéma général.....	50
	III.1.2. Les différentes étapes.....	51
	III.2. Synthèse de la N,N-di-(2-chloroethyl)-2-(uracil-1-yl)acetamide.....	53
	III.3. Transformation du carbonyle en position 4 de la thymine alkylée.....	55
	III.3.1. Résultats et discussions.....	58
	III.4. Conclusion.....	71
IV.	ÉVALUATIONS BIOLOGIQUES.....	73
	IV.1. Effets <i>in-vitro</i> des produits synthétisés sur la prolifération des cellules A431.....	74

IV.2.	Effets sur la migration des cellules A431	75
IV.3.	Effets sur l'invasion des cellules A431	76
IV.4.	Effets sur l'expression des métalloprotéases	78
IV.5.	Conclusion.....	79
	CONCLUSION GÉNÉRALE	81
V.	PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	83
V.1.	Réactifs et solvants	83
V.2.	Chromatographie.....	85
V.2.1.	Chromatographie sur couche mince analytique	85
V.2.2.	Chromatographie sur couche mince préparatives	85
V.2.3.	Chromatographie sur colonne.....	85
V.3.	Analyses	86
V.4.	Matériel	86
V.5.	Synthèses	87
V.6.	Evaluations biologiques – matériels et méthodes	119
V.6.1.	Matériels chimiques	119
V.6.2.	Matériels biologiques.....	119
V.6.3.	Étude in-vitro.....	120
V.6.4.	Étude de la migration et de l'invasion cellulaires.....	120
	GLOSSAIRE.....	124
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	125
	ANNEXE: STRUCTURES DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS	127

Liste des abréviations

A : Adénine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADMet : Métathèse des diènes acycliques (acyclic diene metathesis)
ARN : Acide ribonucléique
BSA : Sérum d'albumine bovin (bovine serum albumine)
C : Cytosine
CCM : Chromatographie sur couche mince
CEDU : 5-(2-chloroéthyl)-2'-désoxyuridine
CLB : Chlorambucil
CM : Métathèse croisée (cross metathesis)
COSY : Correlated spectroscopy
 Δ : Chauffage classique
DMAP : 4-diméthylaminopyridine
DMEM : Dulbecco's modified eagle's medium
DMF : N,N,diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EDTA: Ethylènediaminetétracétate
EGF : Epidermal growth factor (facteur de croissance épidermique)
éq.: équivalent
EP : Ether de pétrole
G: Guanine
HMQC : Heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy
IC₅₀ : 50 % inhibition cellulaire
IR : Infrarouge
MMP : Matrice métalloprotéase
MMP9 : Matrice métalloprotéase 9
MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
PAM : Acide moutarde phénylacétique
PBS : Phosphate buffered saline
ppm : Partie par million
PPTS : *Para*-toluène sulfonate de Pyridinium
ProMMP2 : Promatrice métalloprotéase 2
ProMMP9 : Promatrice métalloprotéase 9
RCM : Métathèse par fermeture de cycle (ring closing metathesis)

Rf : Rapport frontal (CCM)
R.L. : réactif de Lawesson
RMN : Résonance magnétique nucléaire
ROM : Métathèse par ouverture de cycle (ring opening metathesis)
ROMP : Métathèse de Polymérisation par ouverture de cycle (ring opening metathesis polymerization)
SM : Self-metathesis
SVF : Sérum de veau fœtal
T ou Thy : Thymine
TBAF : Florure de tétrabutyle ammonium
TBDMS : *Tert*-butyldiméthylsilyle
TBDMSCl : Chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle
Tf : Température de fusion
THF : Tétrahydrofurane
TMS : Triméthylsilyle
 $\mu.o$: Micro-ondes
VEGF : Vascular endothelial growth factor (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Pour certains le mot cancer désigne le signe astrologique occidental, la première constellation de l'été. Pour d'autre, ce mot est plus lourd à prononcer. En effet, le cancer a été longtemps considéré comme incurable. Aujourd'hui, nombre de cancer sont guéris ou vécus comme une maladie chronique grâce aux avancées spectaculaires de la médecine. Il n'en reste pas moins le plus grand fléau mondial du siècle. Effectivement, dans le monde, plus de 11 millions de personnes sont diagnostiquées avec un cancer et environ 7,6 millions de personnes meurent du cancer chaque année. En France, le cancer est la seconde cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires. 270 000 nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués chaque année parmi lesquels on dénombre plus de 150 000 décès.

La maladie du cancer est décrite depuis l'antiquité. C'est le médecin Hippocrate qui, en comparant les tumeurs à un crabe, leurs a donné pour la première fois les noms grecs de « κarkinos » et « κarkinoma ». La comparaison est justifiée par l'aspect de certaines tumeurs, dont les prolongements rappellent les pattes de l'animal. Le mot cancer désigne en fait un groupe de maladies très différentes les unes des autres. C'est pourquoi on devrait parler des cancers au pluriel. Cette grande diversité des cancers explique en partie la difficulté à trouver un remède efficace. Il existe trois modalités principales de traitements des cancers : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. C'est ce dernier mode de traitement qui a retenu toute notre attention.

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 nouveaux agents alkylants mono et bifonctionnels. Ces agents créent un lien chimique fort avec les bases de l'ADN. Lors de la division cellulaire, le dédoublement des deux brins d'ADN devient difficile et la transcription s'arrête au niveau de l'agent alkylant entraînant ainsi le suicide de la cellule. Ces nouveaux agents anticancéreux sont synthétisés à partir de molécules d'origines naturelles comme les bases ou les nucléosides, eux même composés d'une partie base (purique ou pyrimidique) et d'une partie glucidique. Les nucléosides constituent les éléments fondamentaux des acides nucléiques (ADN ou ARN). Leur présence dans la cellule est indispensable en raison de leur implication dans la synthèse protéique et dans le processus de transmission de l'information génétique, transcription et traduction. En effet après quelques modifications, ces composés constituent une source importante d'agents thérapeutiques.

Par la suite une étude de l'activité biologique de ces nouveaux agents alkylants mono et bifonctionnels sera réalisée.

Note : Les astérisques () renvoient au glossaire en fin de mémoire.*

CHAPITRE I

LES NUCLÉOSIDES – ÉTAT DE LA QUESTION

I. INTRODUCTION

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

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

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

Les nucléosides sont des molécules d'origines naturelles, constituants de base des acides nucléiques (ADN et ARN), qui jouent un rôle essentiel dans de très nombreux processus biologiques. Les acides nucléiques sont des substances qui ont été tout d'abord isolées du noyau des cellules. Plus tard, il a été mis en évidence qu'il existait des acides nucléiques non seulement dans le noyau, mais aussi dans le cytoplasme des cellules. Ce terme n'était donc plus approprié, mais il a été cependant conservé. Il existe donc deux types d'acides nucléiques, l'ADN (acide désoxyribonucléique) essentiellement localisé dans le noyau des cellules, et l'ARN (acide ribonucléique) essentiellement retrouvé dans le cytoplasme des cellules. C'est dans la synthèse des protéines, composés fondamentaux de la cellule, supports de la plupart des activités biologiques, que les acides nucléiques ADN et ARN jouent un rôle essentiel. D'une façon très schématique, l'ADN contient l'information nécessaire à cette synthèse, le programme. Il sert en quelque sorte à dicter l'ordre dans lequel les acides aminés doivent s'enchaîner pour donner finalement la protéine adéquate. Il renferme également l'information nécessaire à la régulation de la synthèse protéique. L'ADN est un élément permanent de la cellule. Les informations qu'il contient seront transmises aux descendants et constitue ainsi un support de l'hérédité. Les ARN, quand à eux, permettent la mise en oeuvre de la synthèse protéique.

Les acides nucléiques sont de très longues molécules, appelées oligonucléotide formées par un enchaînement de nucléosides.

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

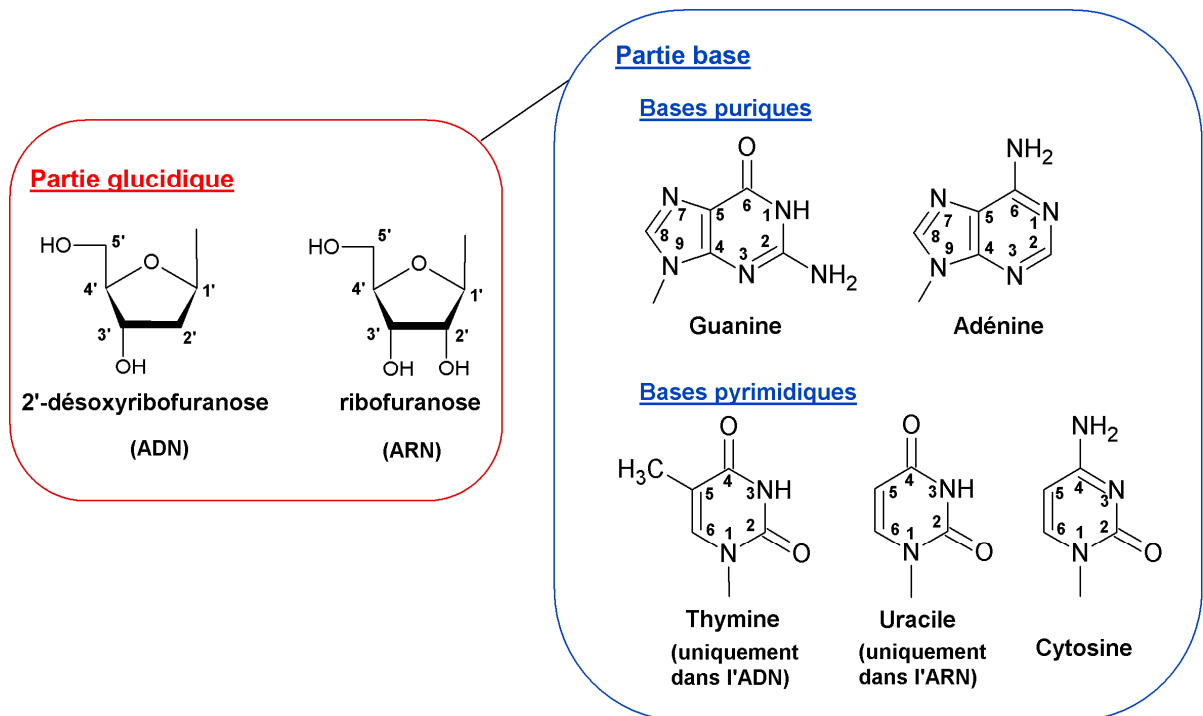


Schéma I.1 : Structure générale des nucléosides.

Les nucléotides résultent de la phosphorylation des nucléosides. On appelle ainsi nucléotide, tout motif complet qui comporte un groupe phosphate, un sucre et une base azotée (Schéma I.2). La liaison entre les différents nucléosides d'un oligonucléotide est assurée par de l'acide phosphorique qui estérifie les fonctions alcool en position 3' et 5' du sucre.

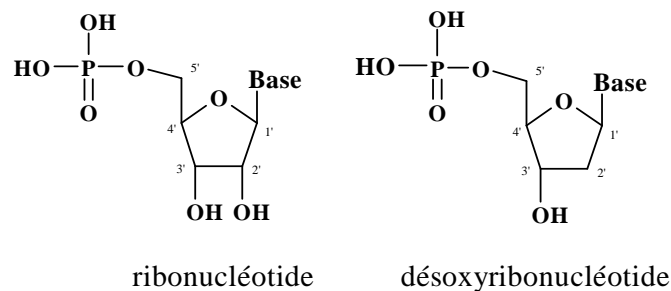


Schéma I.2 : Structure générale des ribo- et désoxyribonucléotide.

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

l'hydroxyle en position 3' d'un premier nucléotide et d'autre part l'hydroxyle en position 5' de l'autre nucléotide (Schéma I.3).

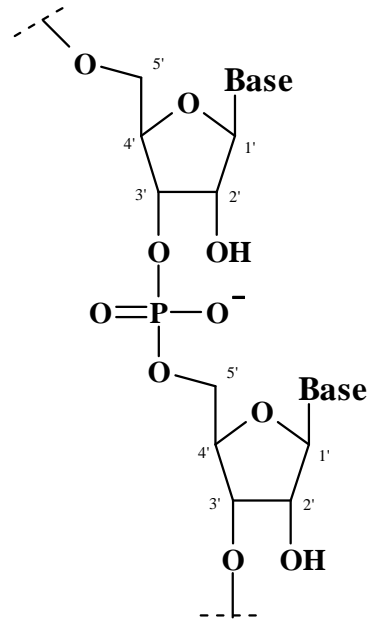


Schéma I.3 : Schéma d'un oligonucléotide.

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

L'ADN est donc un enchaînement d'un grand nombre de nucléosides reliés entre eux par des liaisons phosphodiesters. J.D. Watson et F.H.C Crick¹, en 1953, ont élucidé pour la première fois la structure de l'ADN. Trois caractéristiques sont propres à l'ADN, et vont le différencier des ARN. Comme les initiales « ADN » l'indiquent, l'ose entrant dans la constitution de l'ADN est du désoxyribose, et non du ribose comme ce sera le cas dans les ARN. Les bases constituant les nucléotides de l'ADN sont l'adénine, la guanine, la cytosine et la thymine. Dans les ARN, l'uracile remplace la thymine. Une molécule d'ADN est habituellement formée de deux chaînes (on dit aussi « deux brins ») de nucléotides, alors qu'une molécule d'ARN n'en comprend qu'une. Les deux chaînes de polynucléotides de l'ADN adoptent dans l'espace une configuration hélicoïdale : elles s'enroulent autour d'un axe central imaginaire en formant une double hélice (schéma I.4).

¹ a) J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **1953**, 171 (4356), 737-738; *id.*, 1953, 171 (4361), 964-967. b) F. H. C. Crick, J. D. Watson, *Proc. Roy. Soc. (A)*, **1954**, 223 (1152), 80-96.

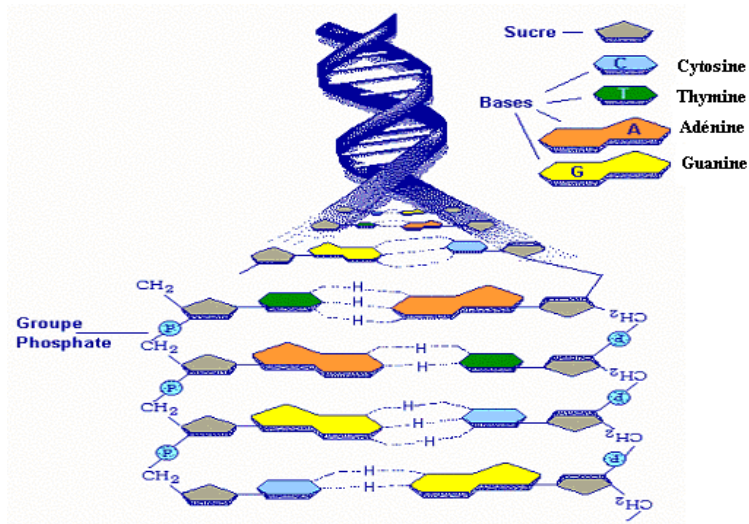


Schéma I.4 : Structure de l'ADN.

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

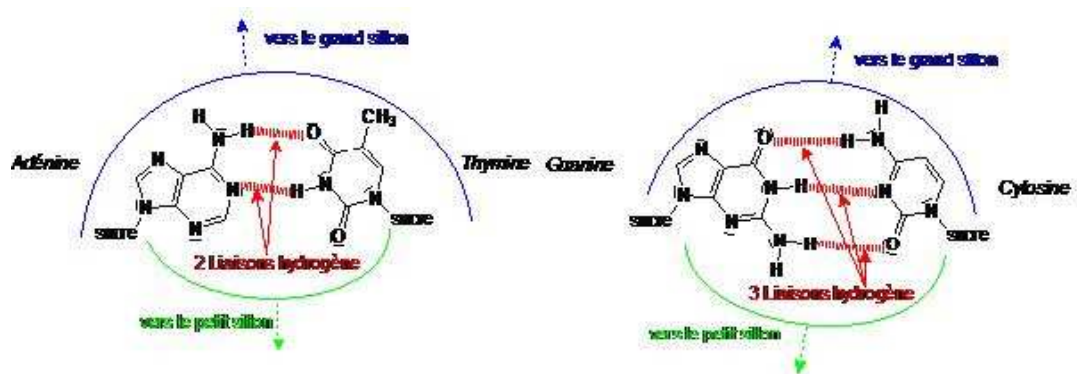


Schéma I.5 : Appariement des bases par liaisons hydrogène.

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

Il existe plusieurs formes d'ADN dont la classification est fondée sur des critères physico-chimiques. Ces types d'ADN diffèrent légèrement par le diamètre de leur hélice et par l'orientation de leur paire de bases. La structure de Watson et Crick également appelée forme B de l'ADN est la forme biologiquement la plus abondante. Elle se caractérise par un pas à droite de l'enroulement de la double hélice. Lorsque l'humidité est faible et que la salinité est forte, l'ADN se présente sous la forme A. Dans ce cas la double hélice a un pas à droite et un intervalle entre les paires de bases plus faible que dans l'ADN B. La molécule d'ADN dans la forme A est donc plus courte et de diamètre plus large que dans l'ADN B (Schéma I.6).

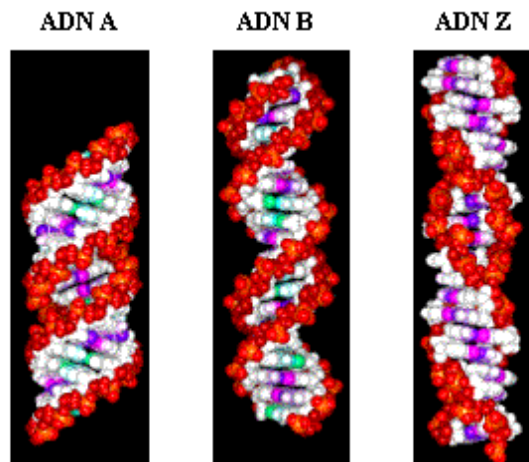


Schéma I.6 : Les différentes formes de l'ADN.

Une troisième forme dite ADN Z se différencie par des hélices qui tournent vers la gauche. Cet ADN de gauche n'est pas l'image dans un miroir de l'ADN de droite. Il a une conformation différente de la forme B. Le squelette sucre-phosphate prend une disposition en zigzag (d'où le nom qui lui a été donné), l'hélice est plus allongée et moins torsadée que l'ADN B, et l'intervalle entre les paires de bases est légèrement supérieur. La forme Z peut être adoptée par des séquences qui ne sont pas strictement des séquences pyrimidique-purique alternées. Par exemple, l'hexanucléotide m^5CGATm^5CG , contenant deux 5-méthylcytosine (m^5C), cristallise sous forme d'ADN Z. On pense que la méthylation de la cytosine en position 5 *in-vivo* favorise le changement de la conformation B en Z. En effet, ces groupes méthyles hydrophobes formeraient des saillies à la surface de l'ADN B, ce qui dans l'environnement aqueux du grand sillon déstabiliserait sa structure. Dans la conformation Z, ces mêmes groupes méthyles peuvent au contraire, créer une petite zone hydrophobe stabilisante. Certaines régions spécifiques de l'ADN cellulaire ont probablement la conformation Z, les autres étant essentiellement de conformation B. Comme la méthylation a un

rôle dans la régulation de l'expression des gènes, l'ADN Z pourrait par sa présence contribuer à la régulation de l'expression de l'information génétique.

Les acides nucléiques ADN ou ARN fournissent le scénario de tous les évènements qui se produisent dans une cellule en étant les dépositaires de l'information génétique. La structure de chaque protéine, et donc de chaque constituant cellulaire, est la résultante d'une information programmée dans la séquence nucléotidique des acides nucléiques cellulaire. Les informations contenues dans l'ADN nécessaires pour la synthèse des différentes protéines vont être transmises de génération en génération par un processus dit de réplication. La complémentarité de la structure en double hélice a amené Watson et Crick à suggérer une manière selon laquelle l'ADN pourrait s'auto dupliquer et transmettre le code génétique. Selon ce mécanisme, chacune des deux chaînes d'ADN fonctionne comme une matrice, la double hélice se défait partiellement et les enzymes commencent à assembler le nouvel ADN en couplant les nucléotides les uns aux autres selon une séquence complémentaire de celle de la matrice, c'est à dire en faisant correspondre C à G et A à T (Schéma I.7). Finalement deux doubles hélices complètes sont produites à partir de l'original.

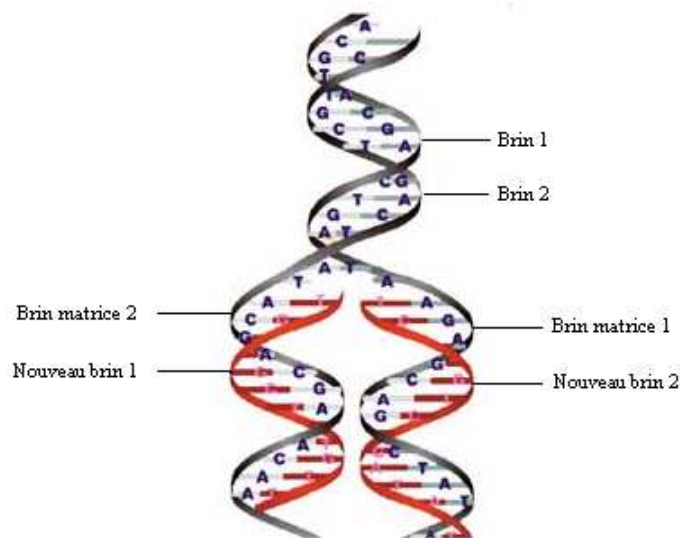


Schéma I.7 : Réplication de l'ADN.

La connaissance de la réplication et de la transcription de l'ADN, a permis de comprendre en partie le développement des tumeurs cancéreuses.

I.3. QU'EST CE QUE LE CANCER

Le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules normales de l'organisme, qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur

multiplication. En outre, ces cellules sont capables d'envahir le tissu normal avoisinant, en le détruisant, puis de migrer à distance pour former des métastases.

Chaque type de cancer a probablement des facteurs déclenchant, de promotion et de progression différents. Cependant d'une manière générale, on distingue schématiquement trois étapes majeures (schéma I.8).

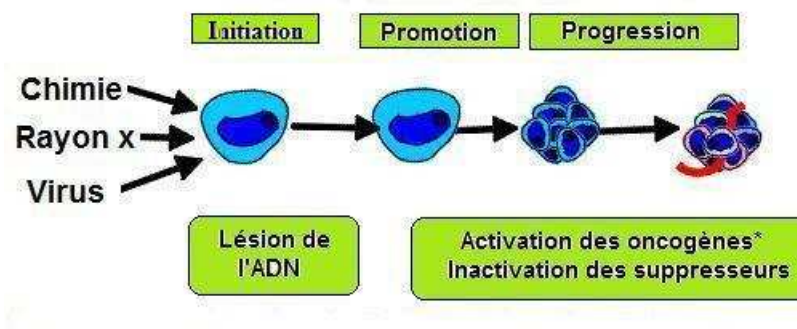


Schéma I.8 : Schéma général des premières étapes de la cancérisation.

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

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

I.4. LA CHIMIOThERAPIE ET LES AGENTS ANTICANCEREUX

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

I.4.1. Les antimétabolites

Les antimétabolites sont des médicaments anticancéreux qui inhibent la synthèse des acides nucléiques, indispensables pour 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. Ce sont des produits de synthèse, ayant subi des modifications de structure qui en font une « fausse clé » bloquant la « serrure » de l'activité cellulaire. Ils sont connus et utilisés depuis la fin des années 1940 et se répartissent en deux classes

✓ Les inhibiteurs d'enzymes indispensables au métabolisme de l'acide folique (vitamine B9), dont le chef de file est le méthotrexate (Schéma I.9). 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.

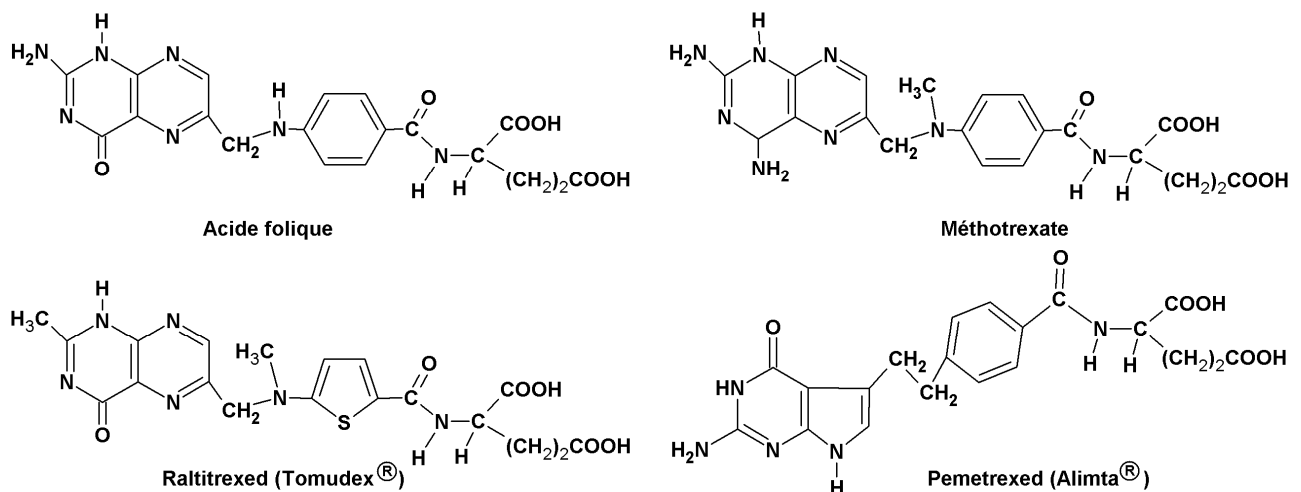


Schéma I.9 : Exemple de médicament anti-folique.

✓ Les médicaments qui interfèrent avec les bases puriques ou pyrimidiques. Leur structure chimique est semblable aux bases naturelles et sont acceptées comme substrats. Ils inhibent ainsi la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines indispensables pour la division cellulaire (Schéma I.10).

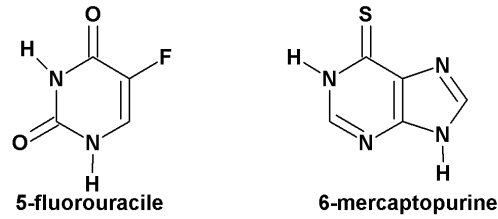


Schéma I.10 : Exemples de médicaments antipyrimidique et antipurique.

On peut distinguer les anti-pyrimidiques, médicaments qui vont ressembler à la cytosine, à la thymine ou à l'uracile et les anti-puriques, médicaments qui vont ressembler à la guanine ou à l'adénine.

I.4.2. Les agents agissant sur les fonctions cellulaires

Les agents agissant sur les fonctions cellulaires sont des composés qui interviennent pendant la mitose elle-même, quand les chromosomes dédoublés doivent migrer le long des tubules du fuseau cellulaire, vers un des deux pôles, avant la séparation des cellules (schéma I.11).

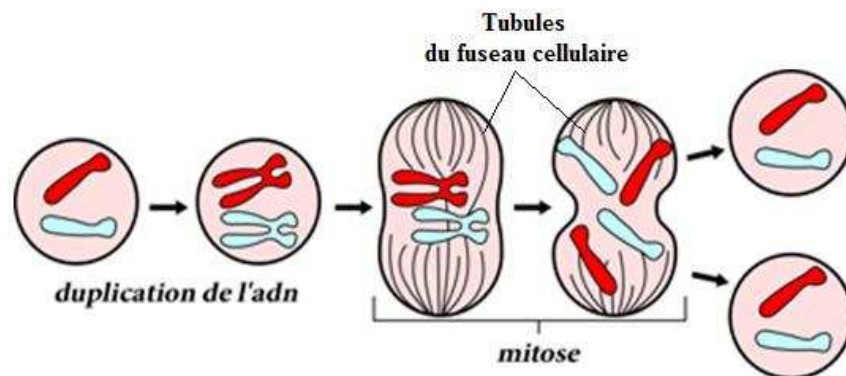


Schéma I.11 : Formations des tubules du fuseau cellulaire lors de la mitose.

Les agents agissant sur les fonctions cellulaires empêchent la synthèse des microtubules et la formation du fuseau mitotique d'où leur nom d'agents antimitotiques (schéma I.12).

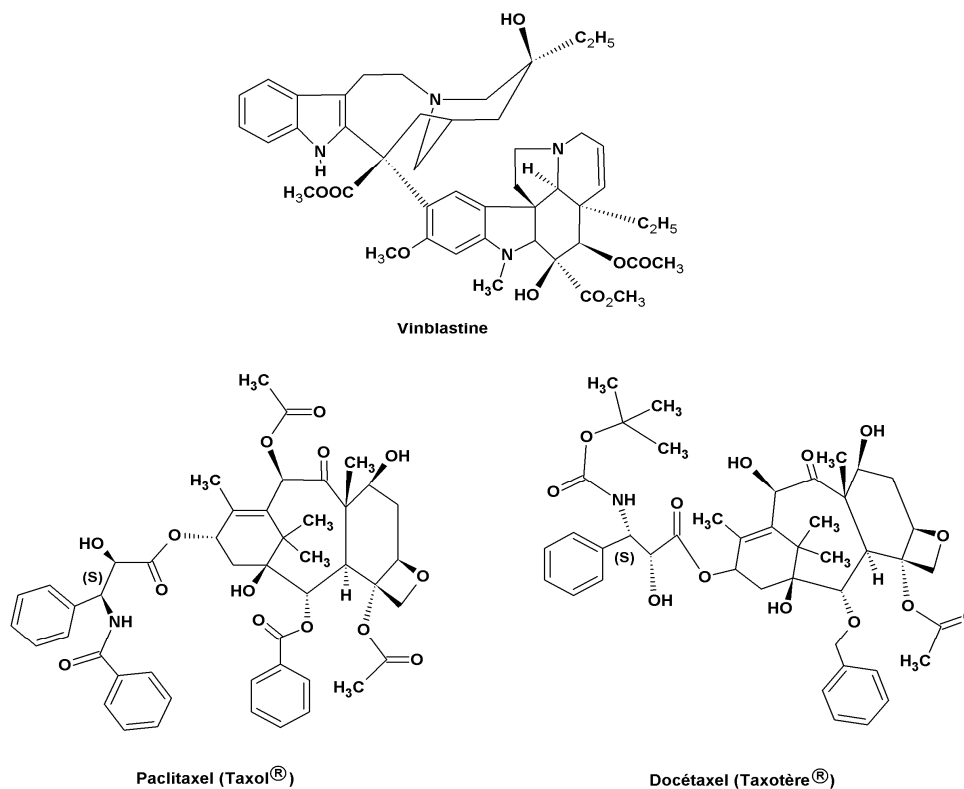


Schéma I.12 : Les agents antiméitotiques.

Ces agents antiméitotiques sont des alcaloïdes dérivés de végétaux qui peuvent être classés en deux catégories : les vinca-alcaloïdes comme la vinblastine qui se lie à des sites spécifiques de la tubuline, inhibent l'assemblage des tubulines en microtubules et le groupe des taxanes comme le paclitaxel (plus connu sous le nom de taxol) ou le docétaxel qui inhibent la division en stimulant la polymérisation des tubulines, améliorant la formation et la stabilité des microtubules. Ceux-ci ne peuvent alors se dégrader, et les chromosomes ne peuvent plus migrer vers les pôles du noyau.

I.4.3. Les agents agissant principalement au niveau de l'ADN

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

I.4.3.1. Les inhibiteurs de la topoisomérase I et II²

Les topoisomérases I et II 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. Cette dernière est coupée sur un brin pour permettre une transcription rapide. La topoisomérase maintient les deux bras à l'abri des nucléases. Elle permet la ligature des fragments de l'ADN et se sépare de celle-ci. Le rôle des anti-topoisomérase de type I est d'empêcher la reconstitution du brin d'ADN après le clivage, inhibant la synthèse correcte de l'ADN. Un exemple de ces inhibiteurs est l'irinotécan (schéma I.13).

Le deuxième type de topoisomérase est la topoisomérase de type II. Celle-ci à le même mode d'action que la topoisomérase I, mais ici la topoisomérase II coupe l'ADN sur les deux brins. La présence d'anti-topoisomérase II 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 sa mort. On peut citer comme exemple d'anti-topoisomérase II, le téniposide (schéma I.13).

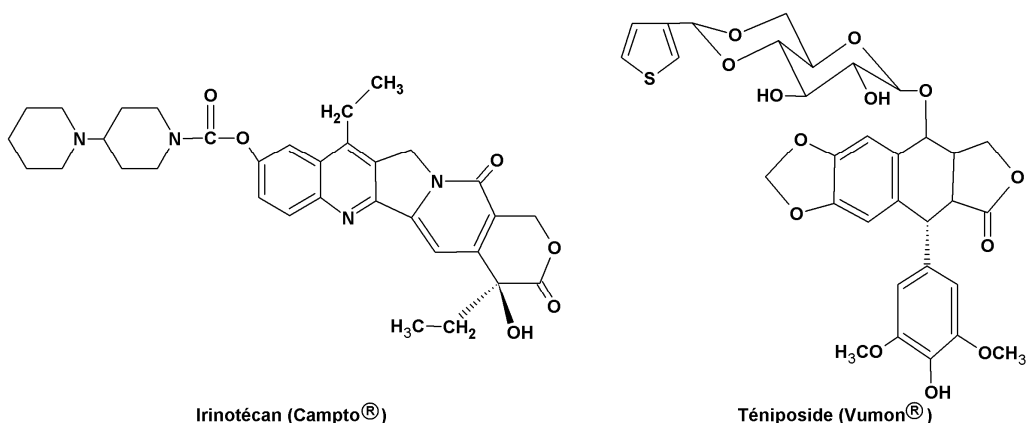


Schéma I.13 : Exemples d'inhibiteurs des topoisomérases I et II.

Les inhibiteurs de la topoisomérase I et II sont relativement nouveaux, assez toxiques et leur place réelle dans la panoplie thérapeutique n'est pas clairement définie.

I.4.3.2. Les agents intercalants

Ce sont des produits polycycliques plans, qui inhibent la réplication de l'ADN en s'intercalant entre deux paires de bases de la double hélice d'ADN : ils provoquent ainsi des

²S. Kirkiachiarlam, *Guide de la Chimie Thérapeutique*, 1996, 519-550.

modifications de structure inhibant la transcription et la réplication de l'ADN. Il existe deux types d'agents intercalants ; les composés tricycliques comme l'amsacrine et les composés tétracycliques comme les antracyclines (schéma I.14).

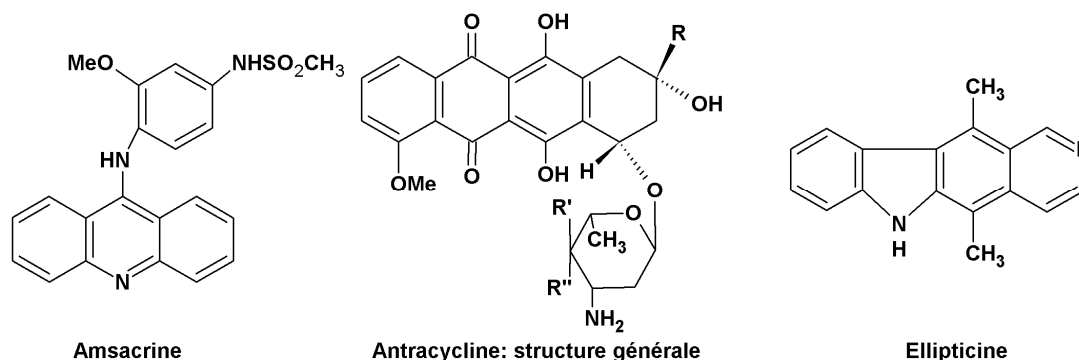


Schéma I.14 : Exemples d'agents intercalants.

On peut aussi inclure l'ellipticine qui par ses propriétés intercalantes est un puissant cytotoxique. Elle a également une aptitude à inhiber l'activité de religation de l'ADN de la topoisomérase II.

I.4.3.3. Les agents alkylants

On appelle alcoylant ou alkylant un composé capable d'introduire une ou plusieurs chaînes alkyles dans une molécule. Ce sont les substances les plus anciennement utilisées. Capable de se fixer à de nombreux substrats nucléophiles, (groupements phosphates, hydroxyles, carboxyles, amines, sulfures, etc...). On distingue des agents alkylants monofonctionnels, c'est à dire n'ayant qu'un seul lien chimique avec l'ADN, et les agents alkylants bifonctionnels qui créent de véritable pont entre différents secteurs de l'ADN, bloquant ainsi sa réplication. Du fait de l'existence d'enzymes de réparation de l'ADN (ligase, endonucléase), les agents alkylants monofonctionnels peuvent, ne pas bloquer véritablement la division cellulaire, mais au contraire, favoriser l'apparition d'ADN porteur de malformations, susceptibles de dégénérer en cancer chimio-induits (explication des leucémies chimio-induites au cours des maladies de Hodgkin ou des cancers de l'ovaire).

Les agents alkylants les plus utilisés sont les nitroso-urées, les sels de platine et les dérivés de la moutarde à l'azote.

a. Les nitroso-urées

Composés alkylants bifonctionnels, les nitroso-urées se caractérisent par une réactivité chimique très importante, entraînant en milieu aqueux neutre une décomposition rapide en un groupe chloroéthyle à fonction alkylante et un isocyanate, agissant par carbamoylation des protéines. On distingue trois familles de nitroso-urées : les chloroéthyl-nitroso-urées, les nitroso-urées ayant un radical glucidique et les nitroso-urées vectorisées. Parmi les chloroéthyl-nitroso-urées, les plus utilisées sont la fotémustine et la carmustine (schéma I.15).

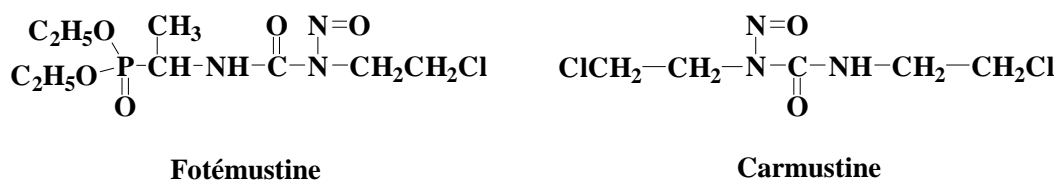


Schéma I.15 : Exemples de nitroso-urées.

b. Les sels de platine

Le cisplatine ou cisplatine (schéma I.16), utilisable uniquement par voie veineuse, est l'agent majeur de la chimiothérapie des tumeurs solides.

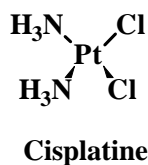
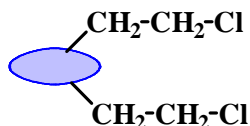


Schéma I.16 : Exemple de sels de platine.

Il a une action homologue à celle des moutardes azotées, en induisant des liaisons inter et intracaténares dans l'ADN et les ponts ADN-protéines. Il inhibe la réparation de l'ADN et possède également une action intercalante.

c. Les dérivés de la moutarde à l'azote

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



Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à ce type d'anticancéreux et nos efforts se sont orientés vers l'élaboration de nouveaux agents alkylants mono et bifonctionnels.

I.5. GENERALITE SUR LES DERIVES DE LA MOUTARDE A L'AZOTE

Le premier agent anticancéreux a été découvert accidentellement, du fait des propriétés leucopéniantes* d'un gaz de combat : le gaz moutarde (schéma I.17) échappé d'un navire américain en 1942, lors du bombardement de Bari.

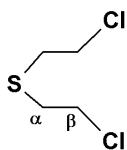


Schéma I.17 : Sulfure de bis(chloroéthyl) ou « gaz moutarde » ou ypérite.

L'ypérite est d'une part, trop toxique par ses propriétés vésicantes* et, d'autre part, très peu soluble dans l'eau. On a essayé d'améliorer la molécule en remplaçant le soufre par de l'azote méthyly pour obtenir la chlorméthine (schéma I.18).

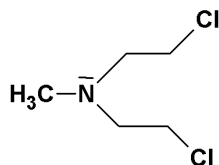
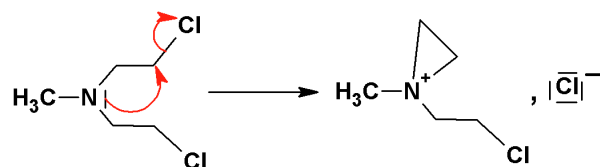


Schéma I.18 : Chlorméthine.

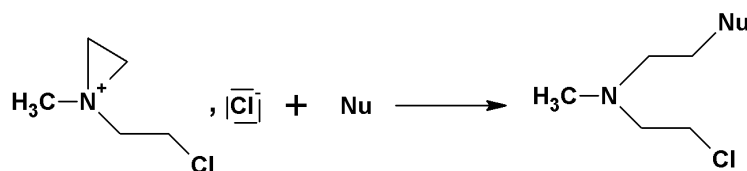
Ce produit constitue le représentant de base de la famille des agents alkylants. La chlorméthine ou « Moutarde à l'azote » est un médicament utilisé dans le traitement de différentes formes de cancers (cancer des poumons, des ovaires, leucémie lymphoïde chronique, et plus spécialement la maladie de Hodgkin).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

I.5.1. Mécanisme d'action dans l'organisme

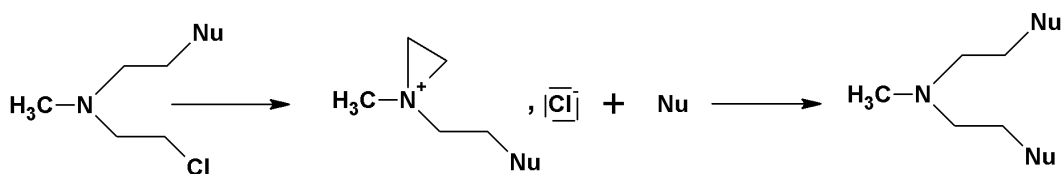
La chlorméthine est stable à pH acide, mais si le pH est plus élevé, le substrat apparaît dans l'organisme sous sa forme basique neutre. Sous cette forme, le produit subit une réaction de substitution nucléophile intramoléculaire qui aboutit à un composé cyclisé cationique. Cette structure est appelée éthylène-imonium :



C'est cette forme qui représente le véritable intermédiaire actif. Ce dernier s'est avéré extrêmement réactif vis-à-vis de toute une série de centres nucléophiles (Nu). Il y a réouverture du cycle et fixation du centre nucléophile :



Le résultat de cet ensemble de réaction est d'aboutir au remplacement du chlore par une série de substrats à propriétés nucléophiles (-SH, -OH, -NH₂...). Il est intéressant de noter que cette réaction peut se poursuivre avec la deuxième chaîne :



On peut donc greffer deux chaînes alkyles sur deux centres nucléophiles, qui sont à l'origine de cette dénomination d'agents alkylants.

En milieu biologique l'alkylation intervient essentiellement au moment de la réplication de l'ADN, quand les deux brins sont séparés et exposent ainsi les sites nucléophiles à l'action alkylante. De la sorte les deux groupements alkylants³ peuvent réagir, avec par exemple l'azote en position 7 de deux guanines des deux brins de la chaîne d'ADN, ce qui revient à rattacher les deux brins de l'ADN en formant un pont intercaténaire, empêchant de la sorte que ceux-ci ne se désenroulent lors de la transcription ou de la réplication (schéma I.19).

³L. P Graham, *Chimie pharmaceutique*, 2003, 128-132.

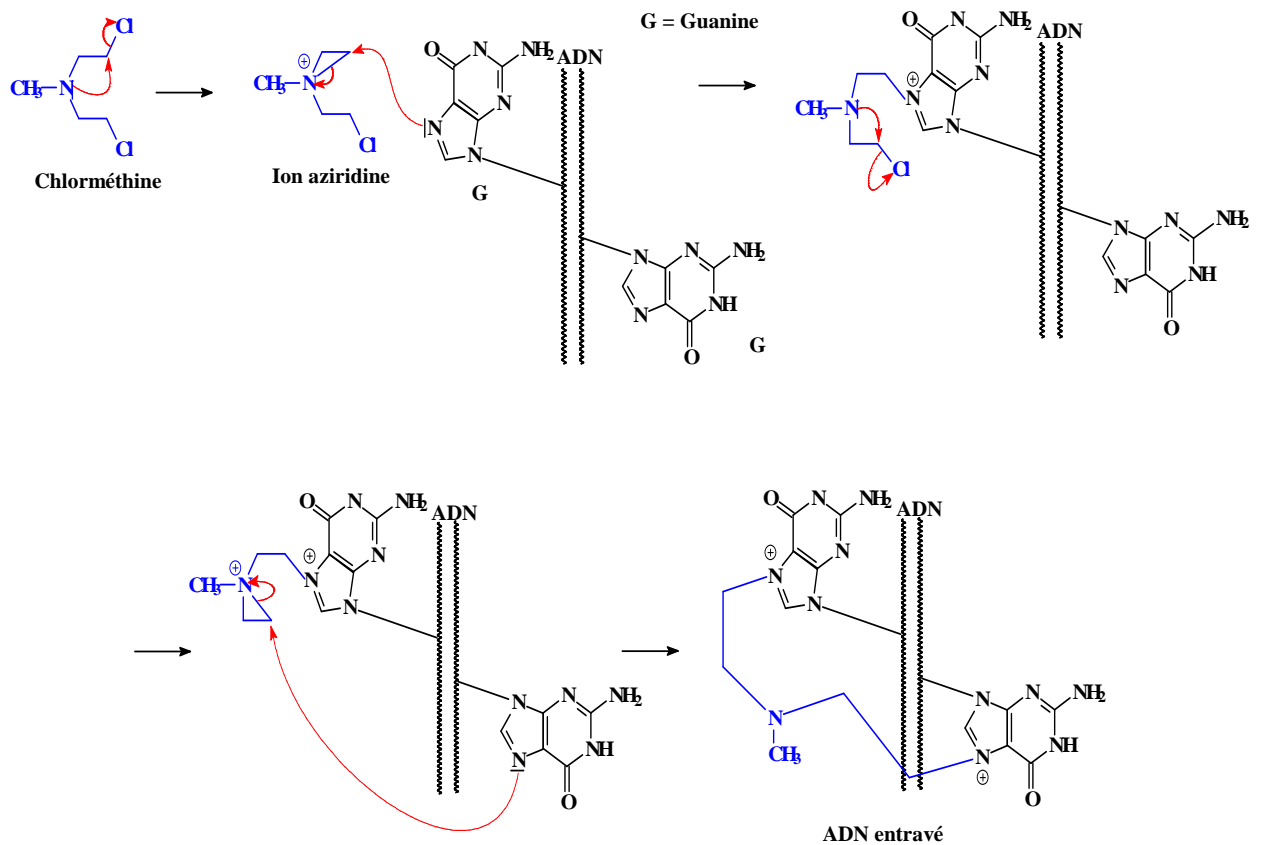


Schéma I.19 : Alkylation de l'ADN par la chlorméthine.

L'agent alkylant peut aussi se fixer sur l'ADN et former des ponts intracaténaire entre, par exemple, deux guanines adjacentes sur le même brin d'ADN. Une telle fixation revient à masquer cette partie de l'ADN, et donc empêcher l'accès des enzymes indispensables au bon fonctionnement de l'ADN (schéma I.20).

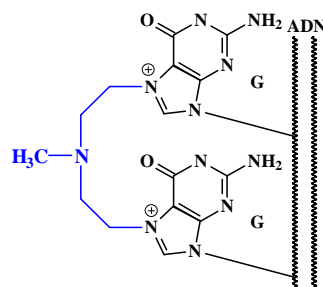


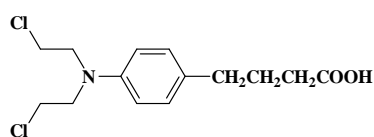
Schéma I.20 : Autre alternative d'alkylation de l'ADN par la chlorméthine.

Cependant, ce produit en plus de son action vésicante et de sa toxicité élevée pour la moelle osseuse conduit à une alkylation qui n'a rien de spécifique. En effet sa forme éthylène imonium attaque toute une série de cellules. Elle se fixe sur les protéines plasmatiques, sur les éléments figurés du sang, et diffuse dans les tissus sains. Finalement, il n'y a qu'une infime fraction qui arrive au tissu cancéreux, pour y réaliser l'alkylation recherchée. C'est pourquoi les scientifiques ont orientés leurs

recherches vers des dérivés dénués d'action vésicante et possédants une spécificité d'action aussi développée que possible vis-à-vis des cellules cancéreuses.

I.5.2. Le chlorambucil

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



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

Dans ce cas le noyau aromatique aura tendance à entraîner dans son système de résonance les atomes présentant des doublets. Par conséquent, le doublet de l'azote devient de moins en moins disponible pour le phénomène de cyclisation (rencontré dans la chlorméthine). On diminue, donc la vitesse de formation de l'ion éthylène-imonium, ce qui entraîne une diminution de la réactivité du produit. Ceci se traduit par un meilleur effet pharmacologique car l'effet peut s'exercer à plus longue distance et est plus sûr. Connors et coll.⁵ ont démontré que le métabolite majeur du chlorambucil était issu d'une β -oxydation de la chaîne butyrique (schéma I.21).

⁴J. L. Everett, J. J. Roberts, W. C. Ross, *J.Chem.Soc.*, **1953**, 2386-2392.

⁵A. McLean, D. Newell, G. Baker, T. Connors, *Biochem.Pharmacol*, **1980**, 29 (14), 2039-2047.

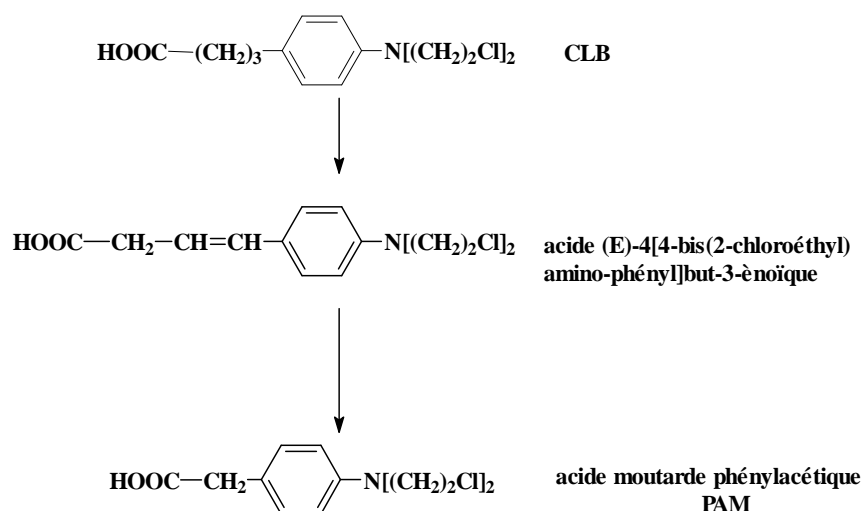


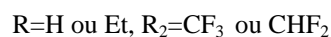
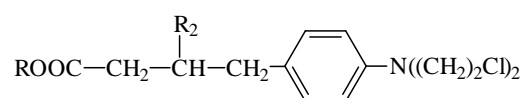
Schéma I.21 : Voie de métabolisation du CLB.

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

I.5.3. Rétrospectives des analogues du chlorambucil

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

Une modification de la chaîne butyrique pour rendre la β -oxydation impossible une fois le chlorambucil assimilé par l'organisme. Ceci est rendu possible en substituant le carbone en position β de la chaîne alkyle et ce par exemple par un groupement fluoré comme l'on fait Tatlow et coll..^{6,7}



Cela est également possible en augmentant la spécificité des analogues pour les cellules cancéreuses en greffant sur le chlorambucil un groupement glucidique.

⁶J. C. Tatlow, M. Markou, P. L. Coe, *Journal of Fluorine Chemistry*, **1998**, 89 (2), 183-188.

⁷J. C. Tatlow, M. Markou, P. L. Coe, *Journal of Fluorine Chemistry*, **1997**, 84 (2), 113-118.

I.6. FINALITE DU TRAVAIL

Par analogie à la structure des agents alkylants décrit précédemment et en tenant compte du fait que des composés du type chloroéthyle nucléoside présentent une activité antivirale significative, nous proposons, dans le cadre du programme d'élaboration de nucléosides modifiés abordé dans notre laboratoire, la synthèse d'agents alkylants mono et bifonctionnels en utilisant dans un premier temps les nucléosides comme synthons de départ et nous avons choisi la thymidine et l'uridine (schéma I.22).

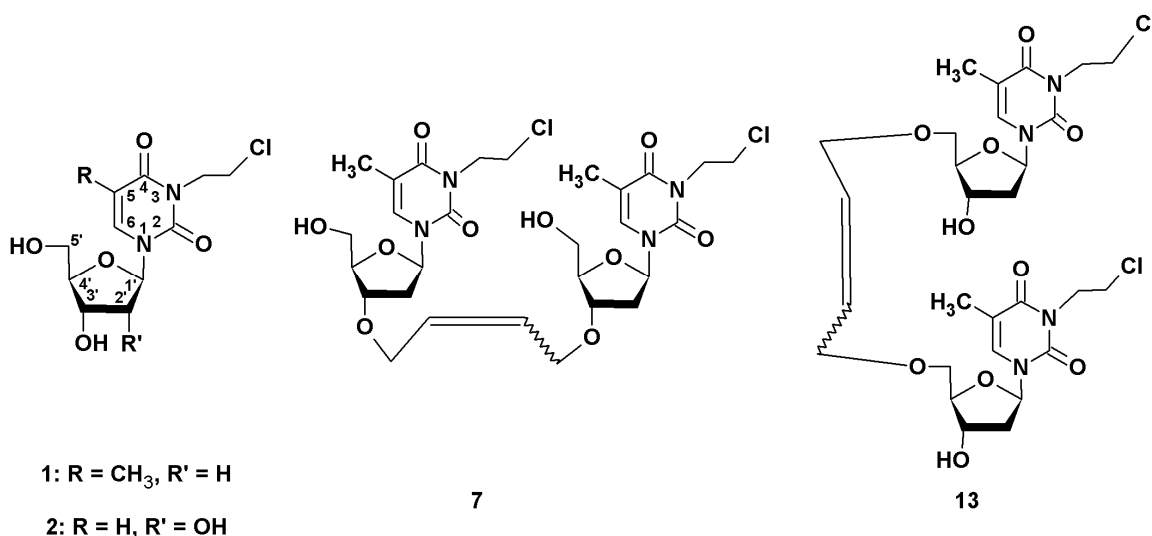
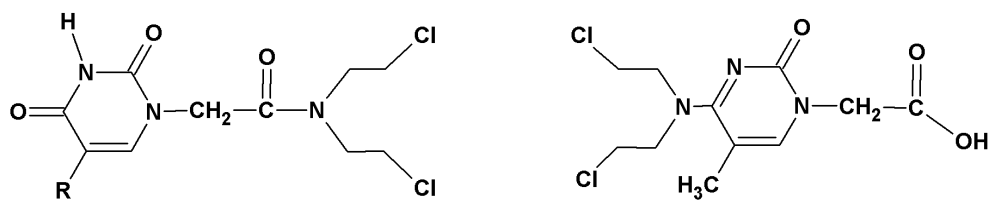


Schéma I.22 : Nucléosides et dinucléosides modifiés portant une ou deux chaînes chloroéthyle.

Dans un deuxième temps, nos efforts se sont orientés vers l'élaboration d'une nouvelle famille d'agents alkylants bifonctionnels en utilisant deux bases pyrimidiques, la thymine et l'uracile, comme substrat de départ. Le groupe bis-(β -chloroéthyl)amine sera fixé à la base d'une part par l'intermédiaire d'une fonction acétamide et d'autre part il sera directement greffé sur la position 4 (schéma I.23).



16: R = CH₃

19: R = H

Schéma I.23 ; Nouvelle famille d'agents alkylants.

Les méthodes utilisées au cours de ces synthèses ont mis en œuvre à chaque fois que cela était justifié une activation par irradiation micro-ondes afin de réduire sensiblement le temps de réaction et d'améliorer les régiosélectivités.

L'activité anticancéreuse de certains de ces composés a été évaluée sur des lignées cancéreuses au Laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université Paris XIII, dirigé par le Professeur Michel Kraemer

CHAPITRE II
SYNTHÈSE D'AGENTS ALKYLANTS À
PARTIR DE NUCLÉOSIDES ET DE
DINUCLÉOSIDES

II. SYNTHÈSE D'AGENTS ALKYLANTS À PARTIR DE NUCLÉOSIDES ET DE DINUCLÉOSIDES

Comme nous l'avons indiqué à la fin du chapitre précédent la première étape de ce travail est la synthèse d'agents alkylants à partir de nucléosides et de dinucléosides en utilisant principalement l'irradiation micro-ondes comme mode d'activation.

II.1. SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE NUCLEOSIDES MONOFONCTIONNELS

Différents auteurs⁸ ont montré qu'un analogue de nucléoside portant une chaîne chloroéthyle, en position 5, la 5-(2-chloroéthyl)-2'-désoxyuridine (CEDU) (schéma II.1) présente une activité antivirale vis à vis de l'herpes. Ce composé entraîne des mutations dans l'appariement des bases G/C et A/T.

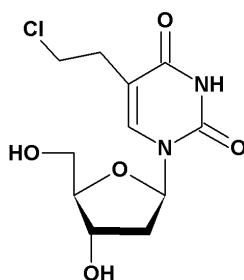


Schéma II.1 : Structure de la 5-(2-chloroéthyl)-2'-désoxyuridine (CEDU).

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'analogues de nucléosides chloroalkylés de ce type, en fixant la chaîne chloroéthyle en position 3 de la thymidine et de l'uridine⁹ (schéma II.2).

⁸ a) F. Staedtler, W. Suter, H-J. Martus, Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, **2004**, 568 (2), 211-220. b) W. Suter, U. Plappert-Helbig, S. Glowienke, F. Poetter-Locher, F. Staedtler, R. Racine, H-J. Martus, Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, **2004**, 568 (2), 195-209. c) E. De Clercq, B. Rosenwirth, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **1985**, 28 (2), 246-251.

⁹ L. Colombeau, K. Teste, A. Hadj-Bouazza, V. Chaleix, R. Zerrouki, M. Kraemer, O. Saint-Catherine, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, **2008**, 27 (2), 110-120.

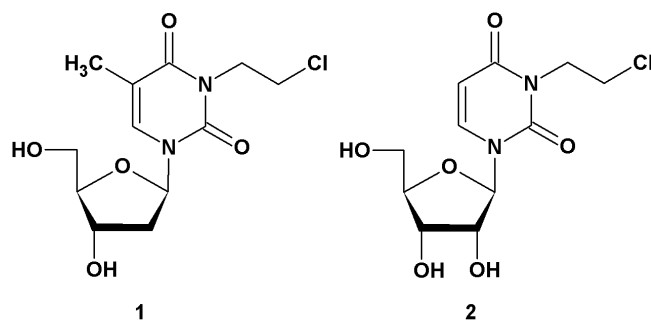


Schéma II.2 : Analogues de nucléosides portant une chaîne chloroéthyle.

II.1.1. Chloroalkylation de la thymidine

La thymidine étant commerciale, elle est directement alkylée dans le DMF, en présence de carbonate de potassium (5 éq.) et de 1,2-dichloroéthane en excès (10 éq.). Après deux heures de réaction à 80°C, l'analyse par CCM montre la formation de deux produits (schéma II.3).

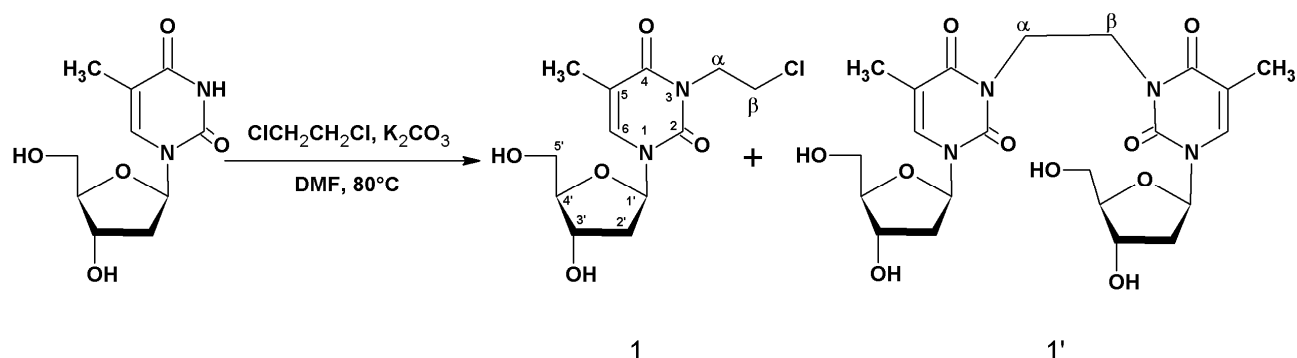


Schéma II.3 : Alkylation de la thymidine.

Après purification, l'analyse structurale des deux composés montre que l'un résulte de la N-chloroalkylation attendu (40%) et que le second **1'** résulte de la réaction de la thymidine sur la N-chloroéthylthymidine, formant ainsi un dimère (52,5%). Afin d'optimiser la sélectivité et donc de diminuer la quantité de dimère formé nous avons activé la réaction par irradiation micro-ondes. Une mise au point de la réaction a été réalisée en étudiant l'influence du dérivé halogéné ainsi que celle du temps de réaction. Les résultats les plus significatifs sont rassemblés dans le Tableau II.1.

Tableau II.1 : Différents résultats de l'alkylation de la thymidine.

Essai	Activation	XCH ₂ CH ₂ X (éq.)	Temps (min)	1 (%)	1' (%)
1	Δ (80°C)	ClCH ₂ CH ₂ Cl (10)	120	40	52,5
2	μ.o (80°C, 100 W)	ClCH ₂ CH ₂ Cl (10)	8	51	35,5
3	μ.o (80°C, 100 W)	BrCH ₂ CH ₂ Cl (10)	4	78	18
4	μ.o (80°C, 100 W)	BrCH ₂ CH ₂ Cl (20)	3	90	6

Δ = chauffage classique, μ.o = micro-ondes

Les essais 1 et 2 montrent que l'activation micro-ondes mène à une légère augmentation du rendement en produit désiré **1**, celui-ci passant de 40 à 51%. La quantité de dimère formée reste cependant très importante (35,5%). Bien que la proportion de N-chloroéthylthymidine augmente et que le temps de réaction diminue (8 min), le rendement en monomère reste néanmoins modéré. La variation du dérivé dihalogéné (essai 3) permet une nette amélioration du rendement en composé **1**, celui-ci passe de 51% à 78% en seulement 4 minutes d'activation. La quantité de dimère étant dans ce cas plus faible mais encore non négligeable (18%). Le meilleur résultat est obtenu en utilisant 20 équivalents de 1-bromo-2-chloroéthane (essai 4). Après 3 minutes d'activation, on isole 90% de chloroéthylthymidine et seulement 6% du dimère 1,2-di(thymidin-3-yl)éthane. L'augmentation du temps de réaction et de la puissance n'a pas donné de meilleurs résultats.

L'analyse du spectre RMN du proton du composé **1** montre la fixation de la chaîne chloroéthyle en position 3 de la thymidine par la disparition du proton H-3 (NH) et la présence d'un triplet élargi à 4,14 ppm avec une constante de couplage de 6,9 Hz correspondant aux protons H-α et d'un triplet élargi à 3,74 ppm avec une constante de couplage de 6,9 Hz correspondant aux protons H-β. La structure est confirmée par spectrométrie de masse par la présence des pics moléculaires (M+H)⁺ m/z 305 et m/z 307 et (M+NH₄)⁺ m/z 322 et m/z 324, qui est la conséquence de la présence de deux isotopes de l'atome de chlore. Le spectre RMN du proton du composé **1'** montre la présence de deux unités nucléosidiques reliés par une chaîne éthyle, structure confirmée par la présence en spectrométrie de masse d'un pic à m/z 511.

II.1.2. Chloroalkylation de l'uridine

Pour réaliser la chloroalkylation de l'uridine, nous avons utilisé les meilleures conditions d'alkylation mises au point précédemment sur la thymidine. L'uridine est mise en solution dans le DMF en présence de 5 équivalents de carbonate de potassium et 20 équivalents de 1-bromo-2-chloroéthane (schéma II.4).

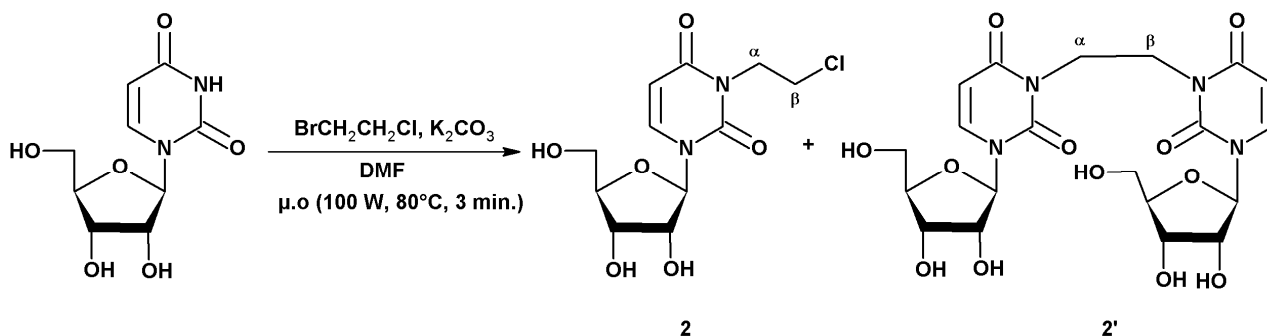


Schéma II.4 : Alkylation de l'uridine.

La réaction est suivie par CCM et arrêtée dès l'apparition du dimère, après 3 minutes d'irradiation micro-ondes (80 °C, 100 W). Le produit **2** est obtenu après purification avec un rendement de 90%, le dimère **2'** avec un rendement de 5%. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec la thymidine, montrant ainsi que la variation de la partie glucidique n'influe pas sur la N-alkylation de la base pyrimidique.

L'analyse du spectre RMN ¹H du composé **2** montre la présence de la chaîne chloroéthyle par l'apparition d'un triplet élargi à 4,25 ppm avec une constante de couplage de 6,8 Hz correspondant aux protons H-α et d'un triplet élargi à 3,72 ppm avec une constante de couplage de 6,8 Hz correspondant aux protons H-β. La présence des pics moléculaires (M+H)⁺ m/z 307 et m/z 309 et de (M+NH₄)⁺ m/z 324 et m/z 326 en spectrométrie de masse confirme cette structure.

Parallèlement à l'étude de la synthèse d'agents alkylants monofonctionnels, nous nous sommes intéressés à des agents bifonctionnels toujours à partir de nucléosides.

II.2. SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE DINUCLEOSIDES CHLOROALKYLES

Nous avons réalisé la synthèse des analogues de dinucléosides chloroalkylés. La préparation des agents bifonctionnels commence par la synthèse de dinucléosides et est suivie par la fixation des chaînes chloroéthyles (schéma II.5).

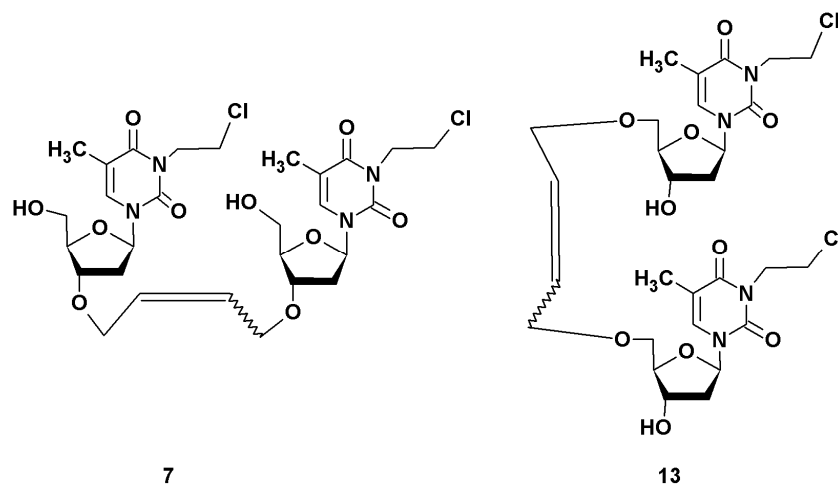


Schéma II.5 : Analogues de dinucléosides chloroalkylés.

II.2.1. Mise au point bibliographique

Les analogues de dinucléosides sont des intermédiaires de synthèse lors de la préparation d'analogues d'oligonucléotides utilisés dans la thérapie antisens et triple hélice. Les oligonucléotides classiques traversent avec difficulté les membranes cellulaires, car se sont des polyanions hydrophiles du fait de leurs liaisons internucléosidiques phosphodiesters. De plus ces oligonucléotides sont rapidement dégradés *in vivo* par des exonucléases, enzymes qui dégradent les oligonucléotides de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5'. Enfin, ils sont rapidement éliminés de la circulation par filtration rénale. C'est pourquoi, afin d'augmenter la résistance de ces liaisons vis-à-vis de ces enzymes, des modifications de la liaison internucléosidique phosphodiester ont été réalisés. Par exemple, en remplaçant l'atome d'oxygène portant la charge négative par un atome de soufre¹⁰, pour mener à des phosphorothionates. On peut aussi substituer la liaison phosphodiester par une liaison amide¹¹, pour donner des acides nucléiques polyamides ou encore la liaison internucléosidique peut être remplacée par une chaîne présentant une double liaison¹², obtenue par la réaction de Wittig, (schéma II.6).

¹⁰ V. T. Ravikumar, D. C. Capaldi, W. F. Lima, E. Lesnik, B. Turney, D. L. Cole, *Bioorg.Med.Chem.*, **2003**, *11* (21), 4673-4679.

¹¹ a) A. De Mesmaeker, R. Hinner, P. Martin, H. E. Moser, *Acc.Chem.Res.*, **1995**, *28* (9), 366-374. b) P. M. J. Jung, R. Beaudegnies, A. De Mesmaeker, S. Wendeborn, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44* (2), 293-297.

¹² S. Wenderborn, R. M. Wolf, A. De Mesmaeker, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36* (38), 6879-6882.

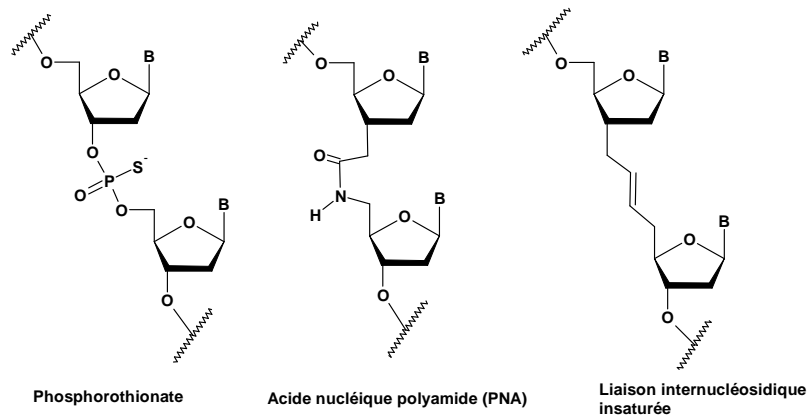


Schéma II.6 : Exemple d'oligonucléotides modifiés au niveau de la jonction 3'-5'.

Dans la thérapie antisens¹³, un oligonucléotide spécifique du gène ou de l'ARN se lie à l'ARN. Dans certains cas, l'agent de liaison peut être un ribozyme, molécule d'ARN catalytique, spécifiquement conçu pour couper l'ARN transcrit. Quant à la thérapie triple hélice¹⁴, elle repose sur l'addition d'un oligonucléotide pour former une triple hélice au niveau de l'ADN double brin du gène afin d'inhiber la transcription du gène. Dans le cas de cette dernière thérapie, il existe des oligonucléotides portant des ponts inverseurs. Le pont inverseur permet à la chaîne d'oligonucléotide de traverser le grand sillon de la double hélice efficacement, sans causer de distorsions importantes à la structure de la triple hélice, comme on peut le voir sur le schéma II.7.

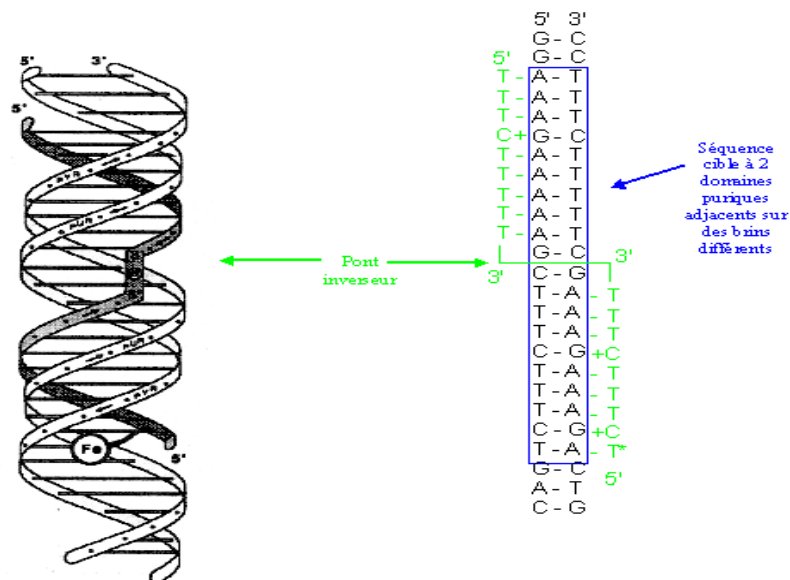


Schéma II.7: Triple hélice « sautant » d'un brin purique à l'autre.

¹³ M. Kumar, G. G. Carmichael, *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, **1998**, 62 (4), 1415-1434.

¹⁴ S. Buchini, C. J. Leumann, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2003**, 7 (6), 717-726.

L'oligonucléotide doit avoir une jonction introduisant une inversion de polarité appropriée (3'-3' ou 5'-5') ce qui assure aux deux extrémités 3' et 5' l'orientation exigée. Parmi les ponts inverseurs décrits, nous pouvons citer par exemple, le dinucléoside 3'-3' relié par une chaîne carbonée insaturée¹⁵ synthétisé dans notre laboratoire et le dinucléoside 5'-5' relié par un phosphoramide¹⁶ (schéma II.8).

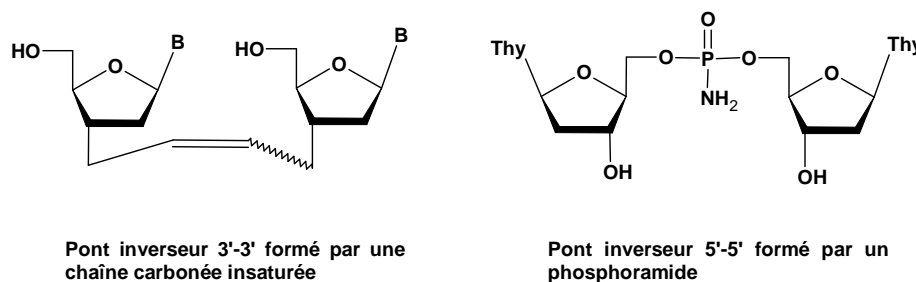


Schéma II.8 : Exemples de ponts inverseurs 3'-3', 5'-5'.

Les dinucléosides 3'-3' ou 5'-5' permettent donc à l'oligonucléotide de sauter d'un brin à l'autre de l'ADN, nous avons choisi, dans le cadre de ce travail, de synthétiser des dinucléosides 3'-3' et 5'-5' chloroalkylés. Ces dinucléosides sont reliés par une chaîne but-2-ène (schéma II.9). Ils ont été testés comme agents alkylants bifonctionnels. Les deux chaînes alkylantes pouvant se fixer sur les deux brins de l'ADN. Nous avons choisi la réaction de métathèse des oléfines pour relier les deux nucléosides.

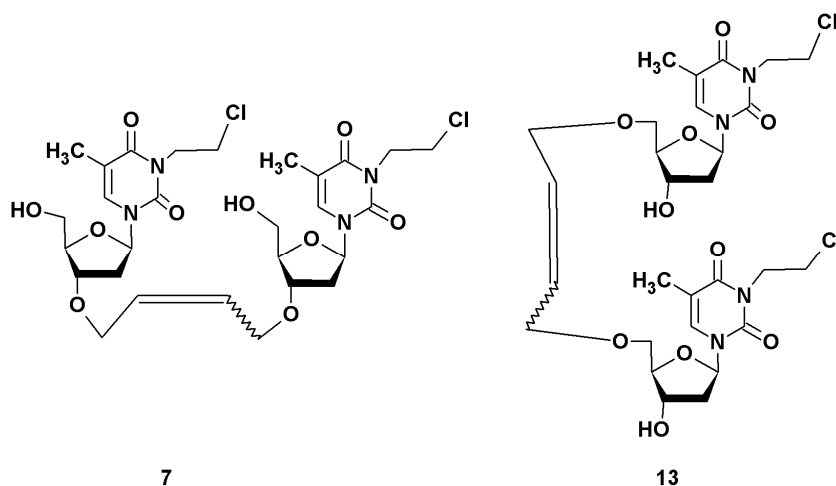


Schéma II.9 : Analogues de dinucléosides chloroalkylés reliés par une chaîne hydrocarbonée insaturée.

¹⁵N. Batoux, R. Benhaddou-Zerrouki, P. Bressolier, R. Granet, G. Laumont, A-M. Aubertin, P. Krausz, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42 (8), 1491-1493.

¹⁶J. Tomasz, *Nucleosides & Nucleotides*, **1983**, 2 (1), 51-61.

II.2.2. Généralité sur la réaction de métathèse des oléfines

La réaction de métathèse, d'une manière générale, consiste à faire réagir l'une sur l'autre, deux molécules d'alcènes pour former deux nouvelles molécules d'alcènes résultant de l'échange des groupements alkylidènes substituant les alcènes initiaux (schéma II.10). Les catalyseurs utilisés pour cette transformation sont des complexes de métaux de transition. La réaction de métathèse permet d'accéder à une grande variété de molécules insaturées.



Schéma II.10 : Représentation simplifiée de la métathèse des alcènes.

Sous le terme métathèse, on dénombre en fait cinq types de réaction (schéma II.11).

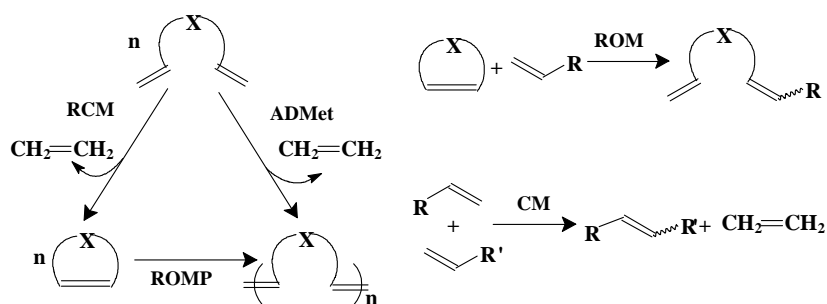


Schéma II.11 : Les différentes possibilités de métathèse.

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

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

En 1971 Hérisson et Chauvin¹⁷ ont proposé, pour les systèmes existants à l'époque, un mécanisme de cette réaction basé sur le postulat qu'un intermédiaire métallocyclobutane se forme par alternance de cycloaddition [2+2] et de cycloréversion à partir d'un métallocarbène (schéma II.12).

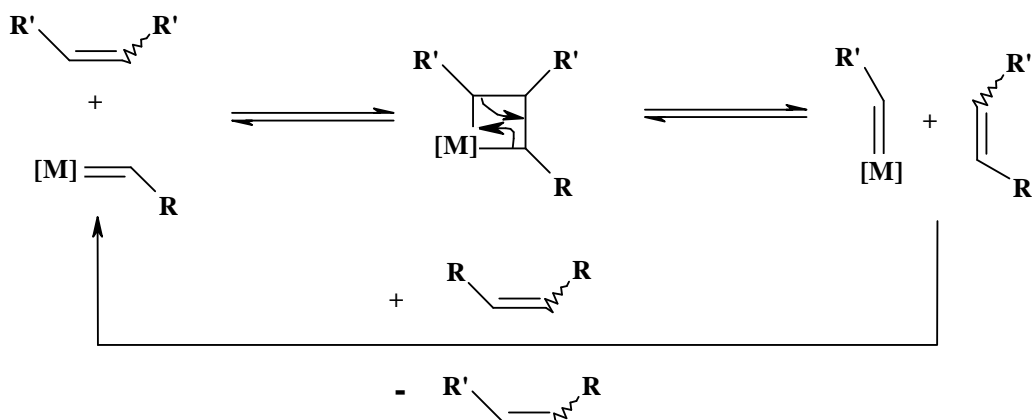


Schéma II.12 : Mécanisme de la réaction de métathèse des alcènes proposé par Hérisson et Chauvin.

Depuis les années 80, la mise au point de nouveaux catalyseurs plus tolérants vis-à-vis de groupements fonctionnels a relancé l'intérêt porté à cette réaction.

II.2.2.1. Les catalyseurs de métathèse les plus récents

Les progrès les plus significatifs ont été réalisés par la synthèse des catalyseurs au ruthénium développés par Grubbs et coll.¹⁸ et ceux au molybdène étudiés par Schrock et coll.¹⁹. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux catalyseurs au ruthénium car ils montrent une bonne tolérance aux fonctions oxygénées (aldéhyde, cétone, alcool ou ester).

a. Les catalyseurs de Grubbs de première génération

Le premier catalyseur au ruthénium synthétisé est le triphénylphosphine-3,3-diphénylprop-2-ényl-1-ylidènedichlororuthénium **A** obtenu par ouverture du cycle d'un 3,3-diphénylcyclopropène

¹⁷a) J. L. Hérisson, Y. Chauvin, *Makromol.Chem.*, **1971**, 141, 161-176. b) J. P. Soufflet, D. Commereuc, Y. Chauvin, *C.R. Acad.Sci.Paris*, **1973**, 276, 169-171.

¹⁸S. T. Nguyen, L. K. Johnson, R. H. Grubbs, *J.Am.Chem.Soc.*, **1992**, 114 (10), 3974-3975.

¹⁹a) G. C. Bazan, J. H. Oskam, H. N. Cho, L. Y. Park, R. R. Schrock, *J.Am.Chem.Soc.*, **1991**, 112, 6899-6907. b) R. R. Schrock, *Top.Organomet.Chem.*, 1998, 1,1.

par un précurseur phosphine ruthénium. Son dérivé **B** est obtenu par le remplacement des groupes triphénylphosphines par des tricyclohexylphosphines²⁰ (schéma II.13).

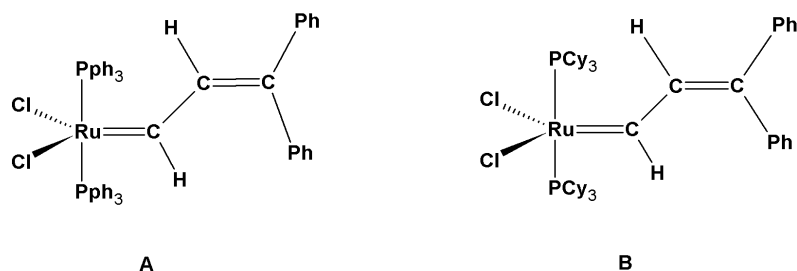


Schéma II.13: Catalyseur au ruthénium.

Ces deux catalyseurs présentent une activité très importante aussi bien en ROMP qu'en RCM, mais ils restent relativement peu performants au niveau de l'initiation de la réaction. Pour améliorer ce paramètre, Grubbs et coll.²¹ ont remplacé le groupement diphenylvinyle carbène par un groupement benzylidène. Ils ont ainsi obtenu entre autres le bis(tricyclohexylphosphine)dichlororuthénium benzylidène **C** (schéma II.14) qui s'est révélé être un catalyseur de choix, très stable, très réactif et très tolérant aux fonctions hétéroatomiques.

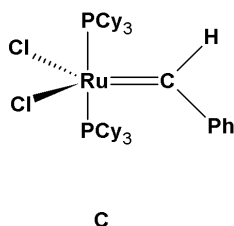


Schéma II.14: Catalyseur de Grubbs I.

Ce catalyseur (usuellement appelé Grubbs I) a ouvert la voie à un très vaste éventail de réaction de métathèse^{22;23}, y compris sur les oléfines fonctionnalisées. Il serait fastidieux d'énumérer toutes les synthèses réalisées avec ce catalyseur en raison du nombre très important de travaux publiés au cours de ces dernières années.

b. Les catalyseurs de Grubbs de deuxième génération

Dans le but d'améliorer les performances des catalyseurs de métathèse, de nombreux autres complexes du ruthénium ont été proposés ces dernières années. Parmi les catalyseurs développés, ceux dérivant du catalyseur de Grubbs, dont un des groupes tricyclohexylphosphines est remplacé

²⁰S.-B T. Nguyen, R. H. Grubbs, J. W. Ziller, *J.Am.Chem.Soc.*, **1993**, 115, 9858-9859.

²¹P. Schwab, R. H. Grubbs, J. W. Ziller, *J.Am.Chem.Soc.*, **1996**, 118 (1), 100-108.

²²A. Fürstner, *Angew.Chem.Int.Ed.*, **2000**, 39 (7), 1234-1239.

²³ Pour revue voir K. C. Nicolaou, P. G. Bulger, D. Sarlah, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 4490-4527.

par un ligand hétérocyclique azoté insaturé **D**²⁴ ou saturé **E**²⁵ (schéma II.15) se sont révélés extrêmement réactifs même vis-à-vis de substrats qui ne réagissaient pas avec les catalyseurs habituels au ruthénium. Ces nouveaux catalyseurs **D** et **E** permettent d'effectuer des réactions de métathèse sur des oléfines électro-déficientes, notamment en position α d'une fonction carbonyle ou carboxyle.

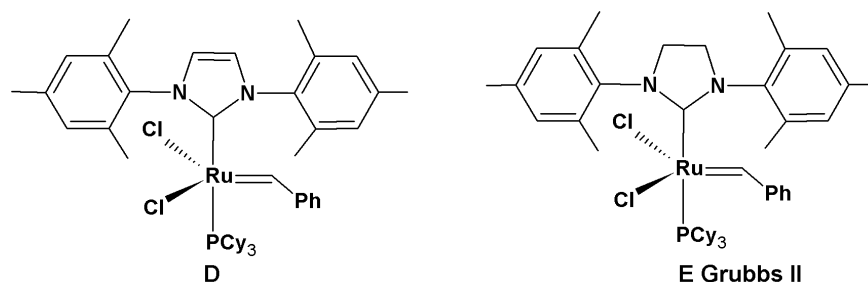


Schéma II.15 : Catalyseurs de deuxième génération à base de ruthénium.

II.2.2.2. Mécanisme de la métathèse

La réaction de métathèse des oléfines est un processus réversible. Le gain d'entropie doit fournir un entraînement suffisant pour la réaction même si la variation d'enthalpie est faible²⁶. C'est en se basant sur l'idée du mécanisme métallo-carbénique proposé par Chauvin et coll.¹⁸ que Grubbs et coll.²⁷ ont élaboré les catalyseurs **A** et **B** dans le but d'avoir des carbènes stables. Ces auteurs ont réalisé une étude très complète pour mettre en évidence les différentes étapes de ce processus complexe ainsi que l'influence du ligand sur l'activité catalytique du catalyseur **A** (schéma II.16).

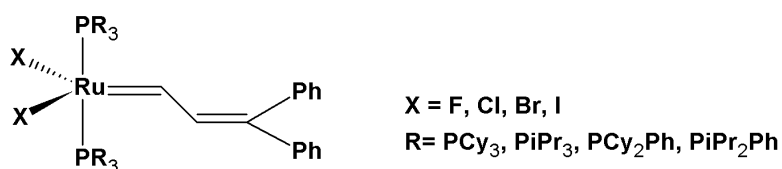


Schéma II.16 : Dérivés du catalyseur A.

En 1998, Grubbs et coll. ont reporté une étude mécanistique de la métathèse des alcènes terminaux.²⁸ Ils ont étudié les intermédiaires réactionnels afin d'expliquer la différence de réactivité observée entre les alcènes encombrés et entre les isomères *Z* et *E* des alcènes internes. En effet, une oléfine encombrée ou une oléfine interne de configuration *E* réagiront moins vite. La première constatation effectuée est que le catalyseur **A** (schéma II.13) n'est actif que pour les réactions de

²⁴A. Fürstner, O. R. Thiel, L. Ackermann, H. J. Schanz, S. P. Nolan, *J.Org.Chem.*, **2000**, 65 (7), 2204-2207.

²⁵M. Scholl, S. Ding, C. W. Lee, R. H. Grubbs, *Org.Lett.*, **1999**, 1 (6), 953-956.

²⁶A. Fürstner, K. Langemann, *J.Org.Chem.*, **1996**, 61 (12), 3942-3943.

²⁷E. L. Dias, S.-B. T. Nguyen, R. H. Grubbs, *J.Am.Chem.Soc.*, **1997**, 119 (17), 3887-3897.

²⁸M. Ulman, R. H. Grubbs, *Organometallics*, **1998**, 17 (12), 2484-2489.

ROMP de grandes chaînes. Le remplacement des groupes triphénylphosphines par des groupes tricyclohexylphosphines ou tri-*iso*-propylphosphines plus encombrants, a permis d'étendre l'activité de ce catalyseur à des cycles plus courts et aux oléfines acycliques. Le catalyseur au ruthénium de première génération qui présente l'initiation la plus rapide pour les réactions de ROMP, RCM et ADMet, est le catalyseur **C** (schéma II.14). Le mécanisme proposé par Grubbs et coll. pour la métathèse d'alcènes terminaux est représenté sur le schéma II.17.

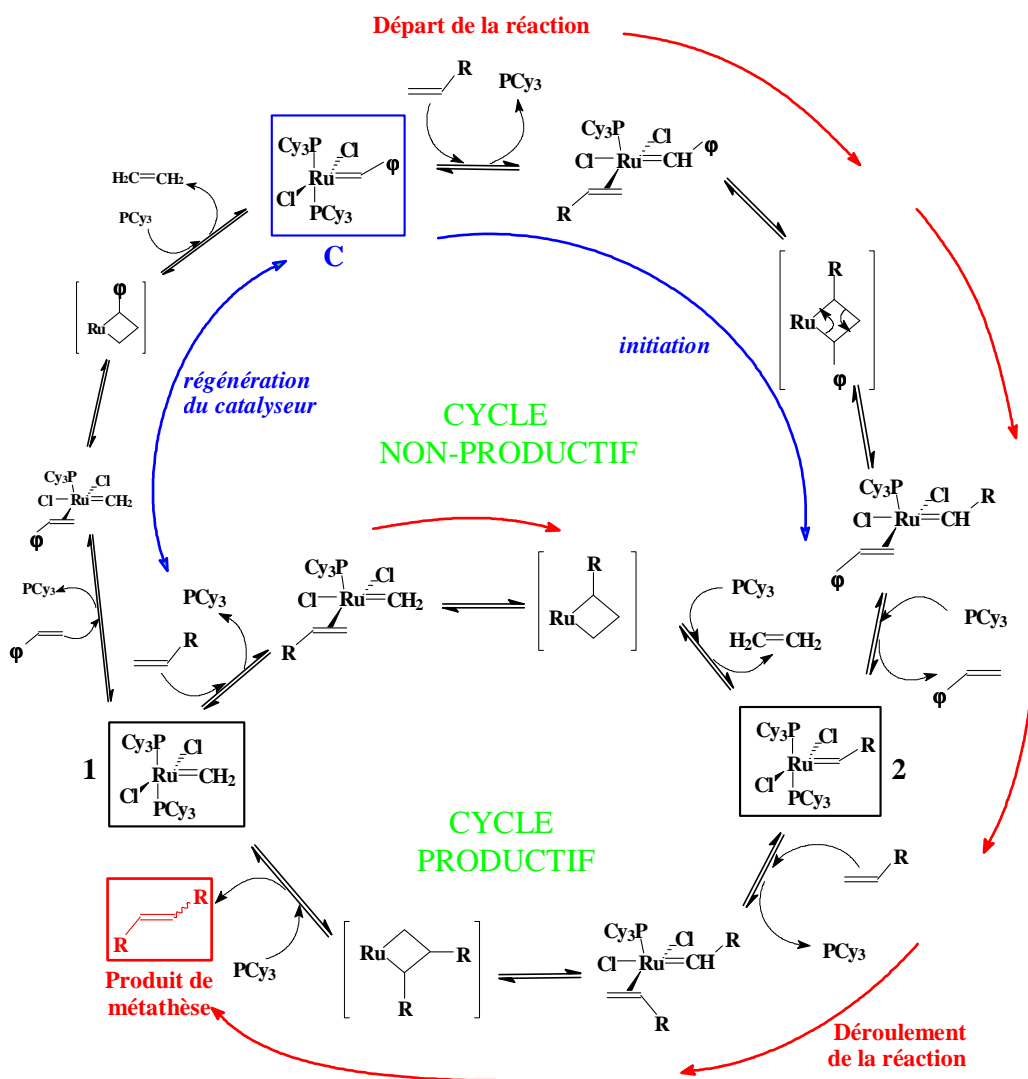


Schéma II.17 : Mécanisme de la réaction de métathèse des oléfines terminales.

On peut distinguer deux cycles dans ce mécanisme, un cycle, dit non productif, au cours duquel la métathèse est initiée et/ou le catalyseur régénéré, le deuxième, dit productif, permet d'obtenir le produit souhaité et passe par l'intermédiaire d'un ruthénium méthylidène **1**. Le complexe **1** est en fait l'espèce réactive dans le cas d'alcènes terminaux, c'est de sa stabilité et de sa réactivité dont dépendra la réaction de métathèse. De la capacité de **C**, ou plus généralement du catalyseur, à fixer l'oléfine de départ, dépendra l'étape d'initiation.

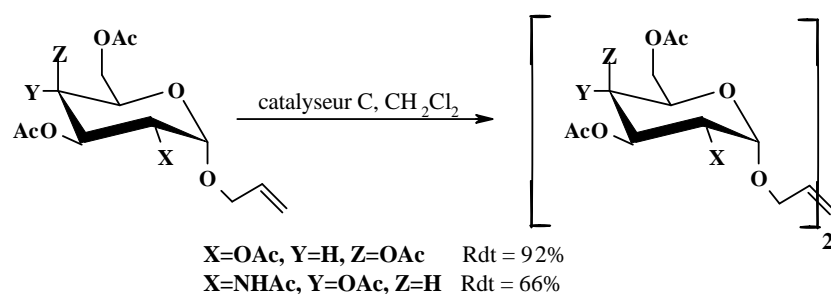


Schéma II.19 : Variation du rendement de la SM avec et sans fonction amine sur le sucre.

Kirschning et coll.³¹ ont également montré l'influence de la présence d'une fonction alcool portée par le sucre. En effet, la réalisation de la réaction de *self-métathèse* sur un sucre portant un groupe hydroxyle et celle réalisée sur le même sucre après protection de ce groupe par acétylation, conduit à une importante variation du rendement, celui-ci passe de 47% à 74% (schéma II.20).

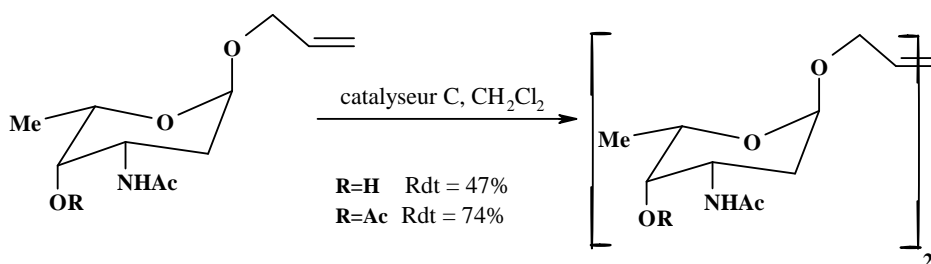


Schéma II.20 : Influence d'une fonction hydroxyle sur le rendement.

Il apparaît ainsi, suivant les auteurs et surtout suivant les substrats de départ utilisés, une grande disparité des produits obtenus dans les réactions de métathèse des composés comportant des fonctions azotées.³² Ce qu'il faut retenir d'une manière générale, c'est qu'il faut impérativement, dans le domaine des analogues de nucléosides, protéger dans un premier temps les fonctions amides primaires et les fonctions alcool primaire avant d'effectuer la réaction de métathèse.

³¹A. Kirschning, G. W. Chen, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40 (25), 4665-4668.

³²A. J. Phillips, A. D. Abell, *Aldrichimica Acta*, **1999**, 32 (3), 75-88.

II.2.3. Synthèse de dinucléosides chloroalkylés reliés par une chaîne but-2-ène entre les positions 3'

entre les positions 3'

Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'objectif de ce travail est la synthèse de dinucléosides reliés par les positions 3' ou 5' portant des groupements chloroéthyles en position 3 de la base. Nous commencerons par décrire la synthèse du dimère 3'-3' (**7**).

II.2.3.1. Stratégie de synthèse du dinucléoside 3'-3'

La stratégie adoptée pour la synthèse du dinucléoside **7** est représentée sur le schéma II.21. La première étape consiste à protéger sélectivement la position 5' de la thymidine. Le composé **3** ainsi obtenu est allylé en position 3' pour donner le composé **4**. On réalise alors, à partir de ce substrat la réaction de métathèse pour obtenir le composé **5**. La chloroalkylation de celui-ci, suivie de la déprotection des positions 5' conduit à l'agent dialkylant.

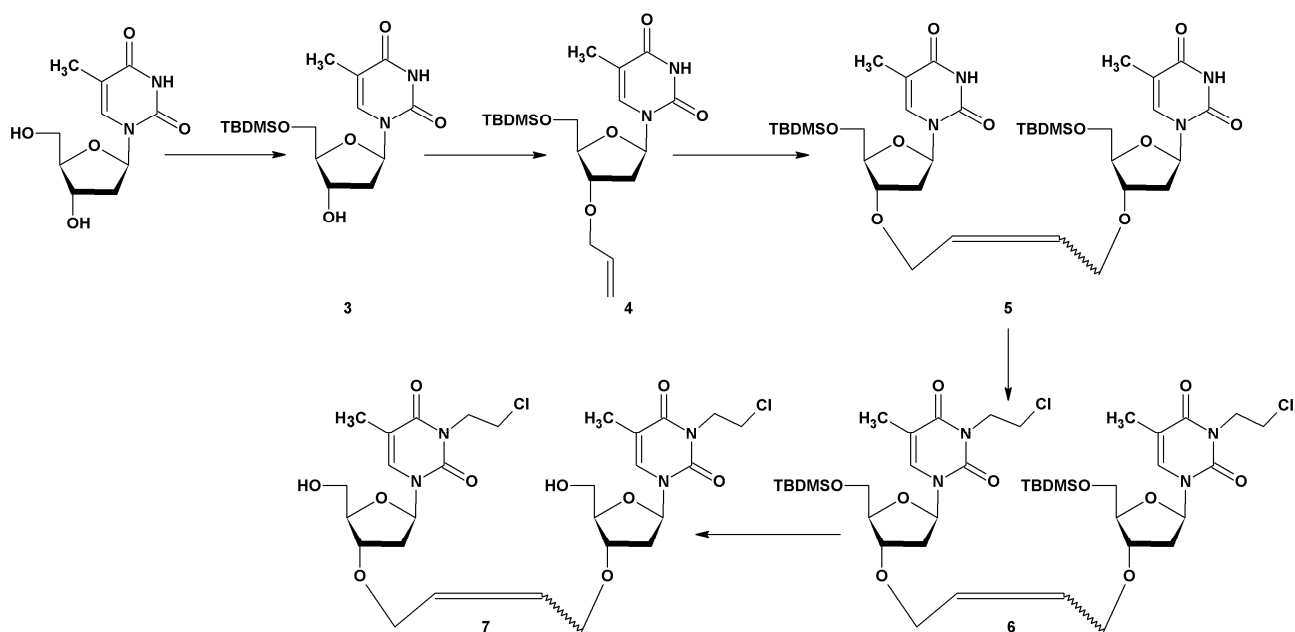


Schéma II.21 : Stratégie de synthèse du dinucléoside 3'-3' chloroalkylé.

II.2.3.2. Les différentes étapes

a. Synthèse de la 3'-O-allyl-5'-O-tert-butyldiméthylsilylthymidine

La synthèse de la 3'-O-allyl-5'-O-tert-butyldiméthylsilylthymidine **4** nécessite deux étapes (schéma II.22). Tout d'abord la protection sélective de l'alcool primaire, puis l'allylation de la position 3'.

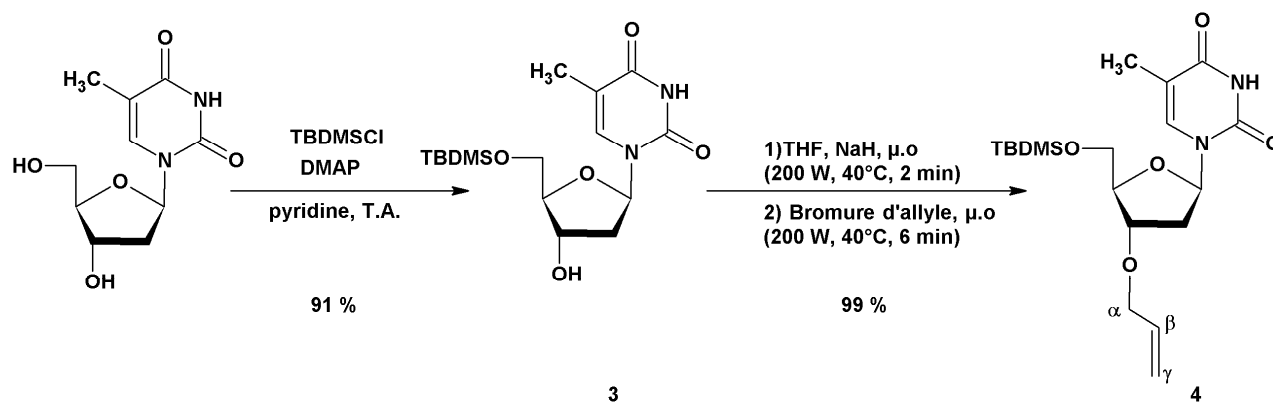


Schéma II.22 : Schéma synthétique de la 3'-O-allyl-5'-O-tert-butylidiméthylsilylthymidine.

La protection de la position 5' est effectuée classiquement par l'introduction d'un groupement encombrant trityle³³ ou silylé³⁴ sur le carbone primaire de la partie glucidique. Dans notre cas, nous avons choisi le groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS). La réaction est laissée 12 heures à température ambiante, en présence de 1,1 équivalents de TBDMSCl et d'une quantité catalytique de DMAP, dans la pyridine anhydre. Le composé silylé **3** est obtenu, après purification, avec un rendement de 91%.

L'analyse RMN du proton montre la présence du groupement TBDMS par l'apparition à 0,92 ppm d'un singulet intégrant pour 9 protons correspondant au groupement *tert*-butyle et à 0,11 ppm un singulet intégrant pour 6 protons correspondant aux groupements méthyles.

La réaction d'allylation sélective en position 3' est réalisée selon la méthode de Chattopadhyaya et coll.³⁵ en activant le système par irradiation micro-ondes.³⁶ On procède tout d'abord à la dissolution du composé silylé **3** dans le THF puis on ajoute l'hydrure de sodium en excès (2,5 éq.). Après 2 minutes d'activation par irradiation micro-ondes, le bromure d'allyle (2,5 éq.) est ajouté et la réaction, mène au bout de 6 minutes d'irradiation au composé attendu **4**, avec un rendement quasi-quantitatif.

³³M. Smith, D. H. Rammner, D. H. Goldberg, H. G. Khorana, *J.Am.Chem.Soc.*, **1962**, 84 (3), 430-440.

³⁴a) E. J. Corey, A. Venkateswarlu, *J.Am.Chem.Soc.*, **1972**, 94 (17), 6190-6191. b) S.Hanessian, P.Lavallee, *Can.J.Chem.*, **1975**, 53 (19), 2975-2977.

³⁵a) J. C. Wu, Z. Xi, C. Gioeli, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron*, **1991**, 47 (12-13), 2237-2254. b) M. Montebault, N. Bourgougnon, J. Lebreton, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43 (45), 8091-8094.

³⁶K. Teste, L. Colombeau, A. Hadj-Bouazza, R. Lucas, Y. Champavier, R. Zerrouki, P. Krausz, *Carbohydrate Research*, **2008**, 343 (9), 1490-1495.

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

b. Formation du dimère à partir de la 3'-O-allyl-5'-O-tert-butylidiméthylsilylthymidine

Nous avons réalisé la réaction de métathèse croisée à partir de la 3'-O-allyl-5'-O-tert-butylidiméthylsilylthymidine **4** synthétisée précédemment, en présence du catalyseur de Grubbs I (schéma II.23). En effet, une étude réalisée au laboratoire a montré que le catalyseur de Grubbs de deuxième génération conduit à de moins bon rendement que le catalyseur de première génération lors de la synthèse de dimère de nucléoside.

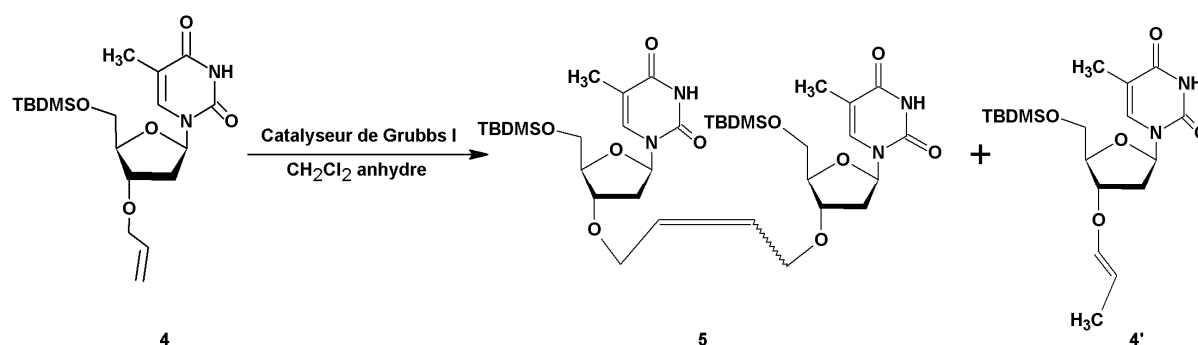


Schéma II.23 : Self-métathèse à partir du précurseur protégé.

Par chauffage classique la réaction est effectuée dans le dichlorométhane à reflux sous atmosphère inerte en présence de 0,2 équivalent de catalyseur de Grubbs I. Après 6 jours, l'analyse par CCM ne montre plus d'évolution de la réaction. Celle-ci est alors arrêtée par évaporation à sec du milieu réactionnel, et suivie d'une purification sur colonne de silice. Le composé de métathèse croisée **5** est obtenu avec un rendement de 38%. Ce rendement faible s'explique par la formation d'un produit secondaire **4'** issu de la transposition de la double liaison du composé initial **4**.

L'utilisation de l'activation micro-ondes a permis d'augmenter le rendement, celui-ci passe de 38% à 53%. Le temps de réaction quant à lui passe de 6 jours à 5 heures (Tableau II.2).

Tableau II.2 : Rendement de la réaction de métathèse en fonction du mode d'activation.

Activation	t (h)	5 (%)	E/Z
Δ (38°C)	144	38	4,5
$\mu.o$ (38°C, 80 W)	5	53	4,5

Le spectre RMN du composé **5** montre que nous sommes en présence d'un mélange de deux isomères E et Z. Une corrélation proton-carbone permet d'observer le dédoublement de signaux, correspondant aux carbones en α de la liaison éthylénique. La littérature nous indique que les carbones en α de la double liaison permettent l'identification de la configuration de celle-ci, pour une configuration Z, les signaux de ces carbones auront un blindage supérieur à celui de la configuration E. L'interprétation (schéma II.24) est liée aux répulsions stériques entre les atomes d'hydrogène sur le carbone en position α' d'une double liaison de configuration Z. Ces interactions conduisent à l'augmentation de la densité électronique sur les carbones α' et donc, au blindage de son signal de plusieurs ppm (36,61 ppm pour les carbones α' d'une double liaison de configuration Z et 43,18 ppm pour ceux de l'isomère E).

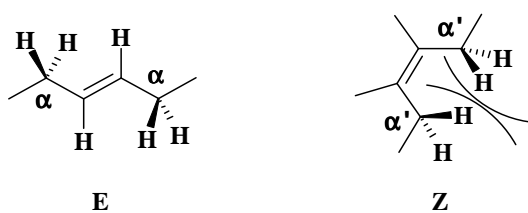


Schéma II.24 : Encombrement stérique des hydrogènes d'une double liaison.

L'analyse par spectroscopie RMN du composé **5** a donc permis de déterminer à partir des protons H- β et H- α le rapport E/Z (Tableau II.3). Ce rapport est de 4,5 quelque soit les conditions expérimentales, chauffage classique ou activation micro-ondes.

Tableau II.3: RMN ^1H et ^{13}C du composé 5 dans CDCl_3 .

Attribution	^1H δ ppm (J Hz)		^{13}C δ ppm	
	Isomère E	Isomère Z	Isomère E	Isomère Z
<i>Base</i>				
N-H	8,45 s	8,38 s		
C-2			150,13	
C-4			163,53	
C-5			110,83	
CH-6		7,49 q (1,0)	135,33	
CH ₃	1,89 d (1,0)	1,91 d (1,0)	12,53	
<i>Sucre</i>				
CH-1'	6,27 dd (5,5 ; 8,5)	6,26 dd (5,5 ; 8,5)	85,06	
CH-2'a	2,43 ddd (1,4 ; 5,5 ; 14,4)		37,75	37,91
CH-2'b	1,96 ddd (5,6 ; 8,5 ; 14,4)		//	//
CH-3'	4,10 m		79,49	
CH-4'	4,10 m		85,13	
CH-5'a	3,89 dd (2,4 ; 11,3)		63,68	
CH-5'b	3,78 dd (2,6 ; 11,3)		//	
<i>Chaîne</i>				
CH ₂ - α	4,04 m	3,95 m	69,05	65,07
CH=CH	5,82 t (2,7)	5,72 t (3,8)	128,94	128,86
<i>TBDMS</i>				
tBu		0,92 s	25,93	
Si-CH ₃		0,12 s	-5,32	

c. Réaction d'alkylation et de déprotection

La stratégie envisagée consiste tout d'abord à réaliser la réaction d'alkylation sur le dimère **5**, avant de déprotéger les deux fonctions alcools primaires.

La réaction de chloroalkylation du dimère est réalisée dans le DMF anhydre en présence de 10 équivalents de K_2CO_3 et de 20 équivalents de 1,2-dichloroéthane (schéma II.25).

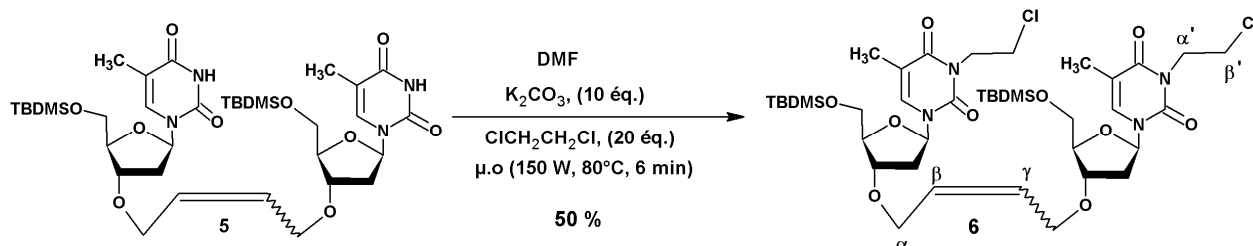


Schéma II.25 : Chloroalkylation en position 3 du dimère.

Au-delà de 6 minutes d'activation micro-ondes, la réaction ne montre plus d'évolution. L'analyse par CCM, montre la formation de deux composés, l'un monoalkylé et l'autre dialkylé, le produit de départ n'étant pas totalement consommé. Après purification, le composé **6** est obtenu sous forme d'huile avec un rendement de 50%. L'analyse par spectroscopie RMN du proton et du carbone confirme la fixation des deux chaînes chloroéthyles. On note la présence d'un triplet intégrant pour 4 protons à 4,31 ppm avec une constante de couplage de 6,8 Hz correspondant aux protons $H_{\alpha'}$, et un triplet intégrant pour 4 protons à 3,71 ppm avec une constante de couplage de 6,8 Hz correspondant aux protons $H_{\beta'}$.

La réaction de déprotection des deux fonctions alcools primaires est effectuée dans le THF avec 1,35 équivalents de TBAF par groupement TBDMS (schéma II.26).

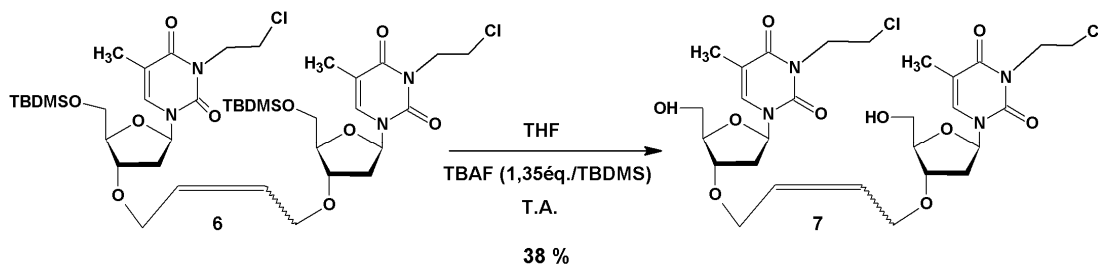


Schéma II.26 : Déprotection des hydroxyles primaires.

Après 2 heures de réaction, l'analyse par CCM montre la disparition du produit de départ **6** et l'apparition d'un produit nettement majoritaire. Après purification sur silice, le composé **7** est obtenu sous forme d'huile avec un rendement de 38%. Ce faible rendement est dû à la difficulté d'extraction du produit de la silice. L'analyse RMN du proton et du carbone montre la disparition

des deux groupements TBDMS et la présence des chaînes chloroéthyles, en effet on observe deux triplets correspondants aux protons α' et β' à 4,31ppm et 3,71ppm intégrant chacun pour 4 protons. La spectroscopie infrarouge, confirme la déprotection des deux groupements hydroxyles par la présence d'une bande caractéristique des hydroxyles à 3382 cm^{-1} .

II.2.4. Synthèse de dinucléosides chloroalkylés reliés par une chaîne but-2-ène entre les positions 5'

Après l'obtention du dinucléoside 3'-3' chloroalkylé **7**, nous avons poursuivie cette synthèse par l'élaboration du dimère (5'-5') **13** où les groupements chloroéthyles seront fixés par la suite sur l'azote en position 3

II.2.4.1. Schéma général

La stratégie adoptée consiste à allyler la thymidine en position 5' par une suite de réactions de protection et de déprotection (schéma II.27). La réaction de métathèse est appliquée sur le précurseur protégé. On effectue par la suite la réaction de chloroalkylation en position 3 suivie par la déprotection des groupements hydroxyles secondaires pour donner le composé final (**13**).

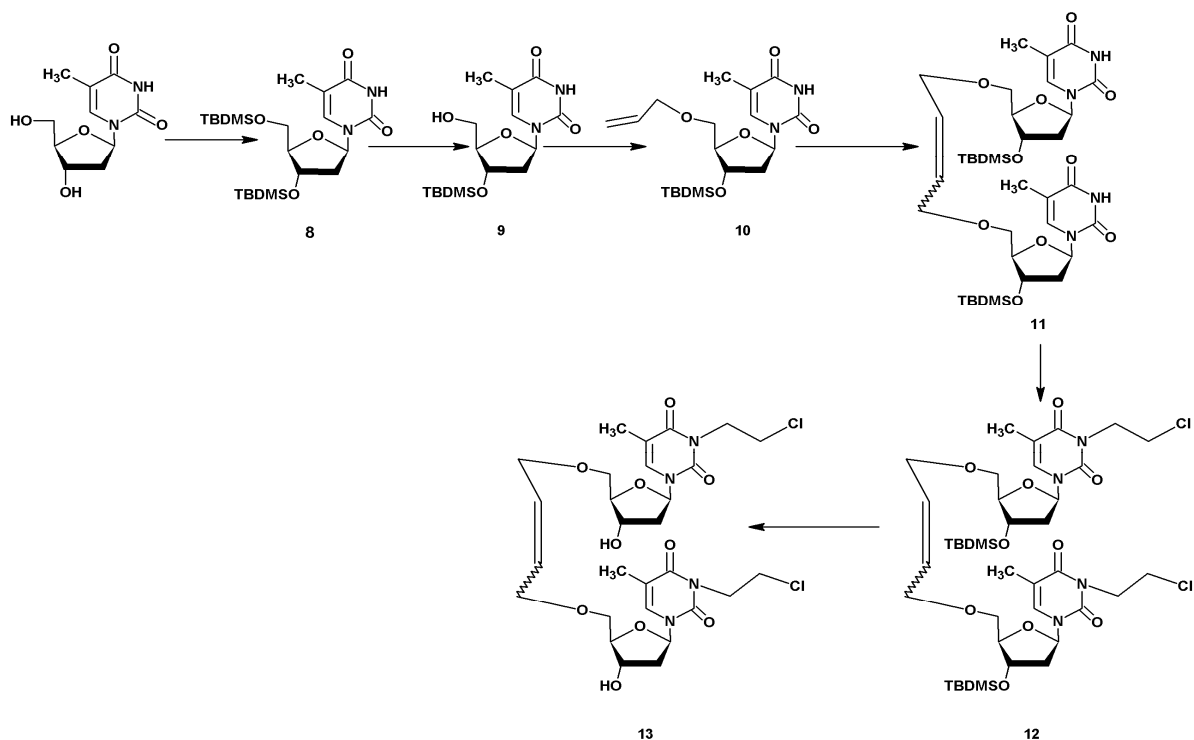


Schéma II.27 : Stratégie de synthèse du composé **13**.

II.2.4.2. Les différentes étapes

a. Synthèse de la 5'-O-allyl-3'-O-tert-butyldiméthylsilylthymidine

La synthèse de la 5'-O-allyl-3'-O-tert-butyldiméthylsilylthymidine **10** est réalisée en 3 étapes (schéma II.28). La thymidine est tout d'abord silylée sur les positions 5' et 3'. Après déprotection sélective de la position 5', le composé **9** est allylé pour mener au substrat **10**.

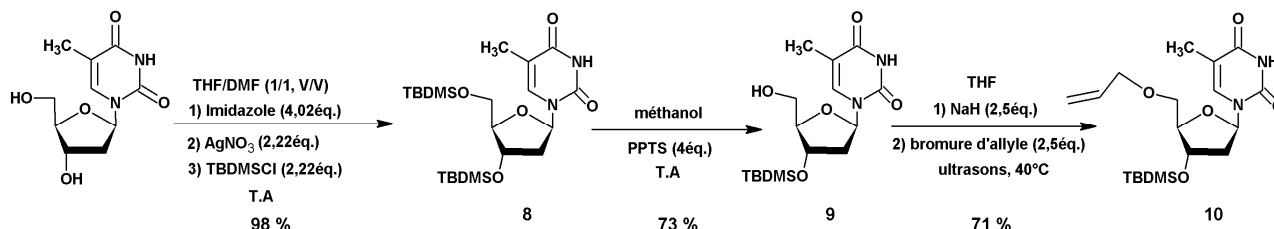


Schéma II.28 : Schéma synthétique de la 5'-O-allyl-3'-O-tert-butyldiméthylsilylthymidine.

Les groupements hydroxyles de la partie glucidique de la thymidine sont silylés par le TBDMSCl, selon la méthode de Montevecchi et coll.³⁷, en présence d'imidazole en excès et de nitrate d'argent dans les solvants mixtes THF/DMF (1/1). Après 24 heures de réaction à température ambiante, traitement et purification, le composé **8** est obtenu avec un rendement quasi quantitatif de 98%. L'analyse par RMN montre la présence des protons correspondant au groupement TBDMS en position 3' à 0,89ppm et 0,08ppm et ceux correspondant au groupement TBDMS en position 5' à 0,93ppm et 0,11ppm. Cette structure est confirmée en spectroscopie infrarouge par la disparition du signal correspondant aux groupements hydroxyles.

La déprotection sélective de l'hydroxyle en position 5' est réalisée selon la méthode d'Ogilvie³⁸, en présence de *para* toluène sulfonate de pyridinium (PPTS) dans le méthanol. Après 20 heures de réaction à température ambiante, le milieu réactionnel est traité puis évaporé à sec, le composé **9** est obtenu avec un rendement de 73% et est utilisé tel quel, sans purification pour la suite de la synthèse. Son spectre IR montre l'apparition de la bande caractéristique de la fonction alcool et la RMN ¹H, la disparition des protons correspondant au groupement TBDMS fixé sur la position 5'.

L'allylation sélective en position 5' est effectuée, comme précédemment, en présence d'un excès d'hydrure de sodium (2,5 équivalents) dans le THF que l'on active par sonication pendant 15

³⁷ a) P. C. Montevecchi, A. Manetto, M. L. Navacchia, C. Chatgililoglu, *Tetrahedron*, **2004**, 60 (19), 4303-4308. b) G. W. Buchko, F. E. Hruska, K. L. Sadana, *Can.J.Chem.*, **1989**, 67 (1), 109-119.

³⁸ a) K. K. Ogilvie, *Can.J.Chem.*, **1973**, 51 (22), 3799-3807. b) J. D. White, M. Kawasaki, *J.Am.Chem.Soc.*, **1990**, 112 (12), 4991-4993.

minutes. On ajoute alors au milieu réactionnel 2,5 équivalents de bromure d'allyle, la réaction est terminée au bout de 6 minutes de sonication. Le composé **10** est isolé avec un rendement de 71%. Le spectre RMN du proton présente un double double triplet correspondant au proton H- β du groupement allyle avec des constantes de couplage de 17,2 Hz, 10,3 Hz et 5,3 Hz et deux double quadruplets pour les protons H- γ avec des constantes de couplage de 17,2 Hz et 1,5 Hz pour l'un et 10,3 Hz et 1,5 Hz pour l'autre. Les deux protons H- α sont présents sous la forme de multiplet à 4,06 ppm.

b. Formation du dimère

La stratégie de synthèse (schéma II.29) consiste, comme nous l'avons mentionnée pour le composé **5**, à appliquer la réaction de métathèse sur la 5'-O-allyl-3'-O-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine en présence du catalyseur de Grubbs I.

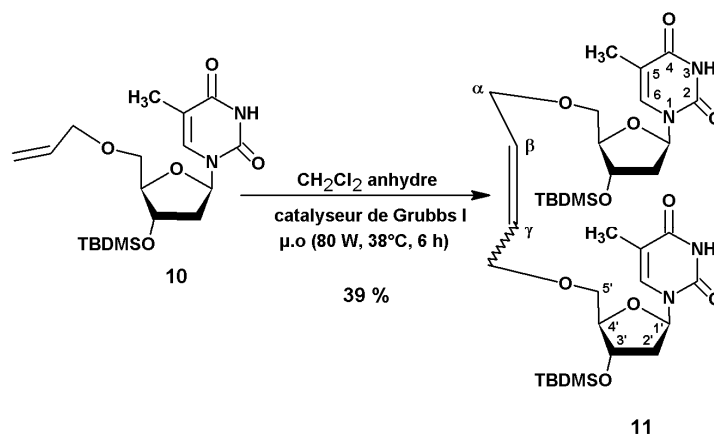


Schéma II.29 : Synthèse du dimère 5'-5'.

Le composé **10** est dissout dans du dichlorométhane et mis en présence de 36% molaire de catalyseur de Grubbs I. Après 6 heures d'activation micro-ondes (80W, 38°C), l'analyse par CCM ne montre plus d'évolution de la réaction. Le mélange réactionnel est alors évaporé à sec et le brut purifié. Le composé **11** est obtenu sous forme d'une huile avec un rendement de 39%. Ce rendement moyen est dû d'une part à la présence du substrat de départ à la fin de la réaction et d'autre part à la difficulté de purification. Le spectre RMN du proton du composé **11** (Tableau II.4) montre comme pour le composé **5** un excès d'isomères géométrique *E* avec un rapport *E/Z* de 5 confirmant ainsi, comme dans le cas du composé **5**, le contrôle thermodynamique de ce processus complexe.

Tableau II.4: RMN ^1H et ^{13}C du composé **II** dans CDCl_3 .

Attribution	^1H δ ppm (J Hz)		^{13}C δ ppm	
	Isomère E	Isomère Z	Isomère E	Isomère Z
<i>Base</i>				
N-H	8,22 s			
C-2			150,36	150,27
C-4			163,91	163,75
C-5			110,65	
CH-6	7,57 q (1,0)	7,55 q (0,9)	136,24	136,12
CH ₃	1,88 d (1,0)	1,90 d (0,9)	12,62	12,58
<i>Sucre</i>				
CH-1'	6,28 t (6,4)	6,29 t (6,2)	84,80	84,77
CH-2'a	2,26 ddd (3,8 ; 6,2 ; 13,3)		41,40	41,38
CH-2'b	2,12 dt (6,2 ; 13,3)		//	//
CH-3'	4,42 dt (3,8 ; 6,2)		72,51	72,45
CH-4'	3,97 m		87,37	87,30
CH-5'a	3,72 dd (2,7 ; 10,6)	3,70 dd (2,6 ; 10,4)	72,40	72,30
CH-5'b	3,58 dd (2,6 ; 10,6)	3,59 dd (2,7 ; 10,4)	//	//
<i>Chaîne</i>				
CH ₂ - α	4,07 m		79,13	74,87
CH=CH	5,83 t (2,5)	5,76 t (3,8)	134,96	133,12
<i>TBDMS</i>				
tBu	0,89 s	0,88 s	25,72	
Si-CH ₃	0,08 s	0,07 s	-4,86	

c. Réaction de chloroalkylation suivi de la déprotection

La réaction de chloroalkylation du dimère (5'-5') **11** est réalisée dans des conditions équivalentes que celle utilisés pour la formation du composé **6** (K_2CO_3 /1,2-dichloroéthane, 10éq./20éq.) et conduit après 12 minutes d'activation micro-ondes et purification par chromatographie, au composé **12** avec un rendement de 52% (schéma II.30).

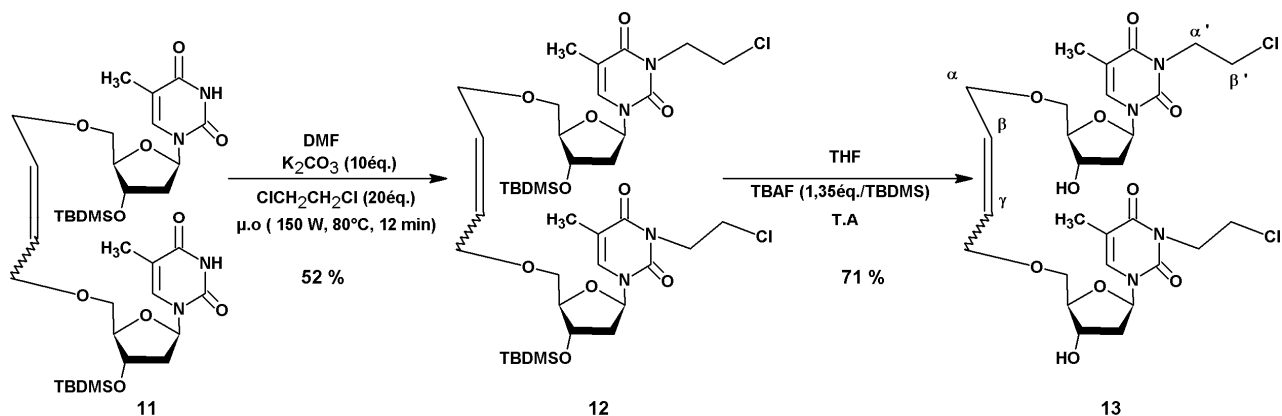


Schéma II.30 : Synthèse de la 4-bis-[(3,3-di-2-chloroéthyle)-3'-O-thymidinyl]-but-ène.

La spectroscopie RMN, comme dans le cas du composé **6**, confirme la fixation des deux chaînes chloroéthyle par la présence de deux triplets, l'un à 4,31 ppm intégrant pour les 4 protons H- α et l'autre à 3,72 ppm pour les 4 protons H- β .

La réaction de déprotection des deux fonctions alcool du composé **12** est réalisée dans le THF en présence de TBAF (schéma II.30). Après 2 heures de réaction à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé à sec et purifié sur plaques préparatives. Le composé **13** est obtenu sous forme d'huile avec un rendement de 71%. L'analyse RMN du proton montre la disparition des signaux correspondant aux protons des deux groupements TBDMS. La spectroscopie infrarouge montre la présence d'une bande à 3382 cm^{-1} caractéristique des groupements hydroxyles.

II.3. CONCLUSION

Ces dinucléosides bifonctionnels ont été synthétisés parallèlement à l'étude de mise au point de la chloroalkylation de la thymidine. Les rendements obtenus dans le cas de l'alkylation des deux dimères peuvent être améliorés en utilisant les conditions optimum, obtenus lors de cette mise

au point à savoir, l'utilisation d'un excès de 1-bromo-2-chloroéthane. L'activité biologique de ces nouveaux agents alkylants mono et bifonctionnels synthétisés à partir de nucléosides et de dinucléoside à été réalisé. Les résultats des différents tests effectués sur ces composés seront décrits dans un chapitre ultérieur (chapitre IV).

Après avoir préparé ces nouveaux agents alkylants mono et bifonctionnels à partir de nucléosides, nous avons étudiés la synthèse de nouveaux agents alkylants bifonctionnels en utilisant comme substrat de départ des bases pyrimidiques.

CHAPITRE III
SYNTHÈSE D'AGENTS ALKYLANTS
À PARTIR DE BASES
PYRIMIDIQUES

III. SYNTHÈSE D'AGENTS ALKYLANTS À PARTIR DE BASES PYRIMIDIQUES

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'agents alkylants en utilisant comme substrat de départ des bases naturelles pyrimidiques (schéma III.1). Dans un premier temps, le groupement bis(β -chloroéthyl)amine est fixé sur deux bases pyrimidiques (thymine et uracile), par l'intermédiaire d'une liaison acétamide. Dans un deuxième temps, ce groupement a directement été fixé en position 4 de la thymine.

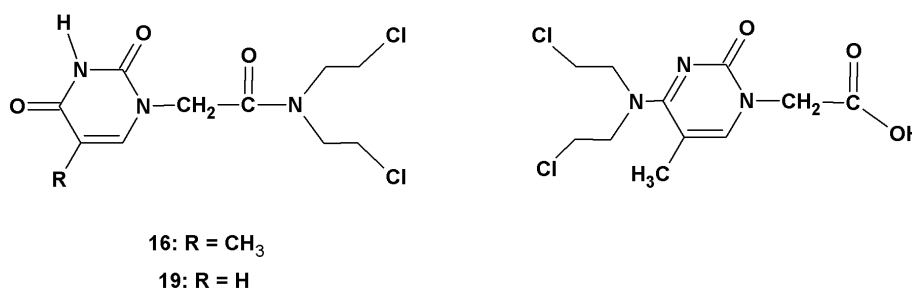


Schéma III.1 : Agents alkylants à partir de bases pyrimidiques.

III.1. SYNTHÈSE DE LA *N,N*-DI-(2-CHLOROETHYL)-2-(THYMIN-1-YL)ACETAMIDE

La fixation du groupement bis(β -chloroéthyl)amine sur la base naturelle par l'intermédiaire d'une liaison acétamide a été mise au point tout d'abord sur la thymine.³⁹

III.1.1. Schéma général

La stratégie adoptée pour la synthèse de la *N,N*-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide est représentée sur le schéma III.2. La première étape consiste à alkyler la position 1 de la thymine pour obtenir le composé **14**. Le groupement éthoxy est ensuite substitué par le groupement diéthanolamine pour former la liaison acétamide et donner le substrat **15**. On réalise alors la réaction de chloration pour conduire à l'agent alkylant.

³⁹ A. Hadj-Bouazza, K. Teste, L. Colombeau, V. Chaleix, R. Zerrouki, M. Kraemer, O. Sainte-Catherine, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2008**, 27 (5), 439-448.

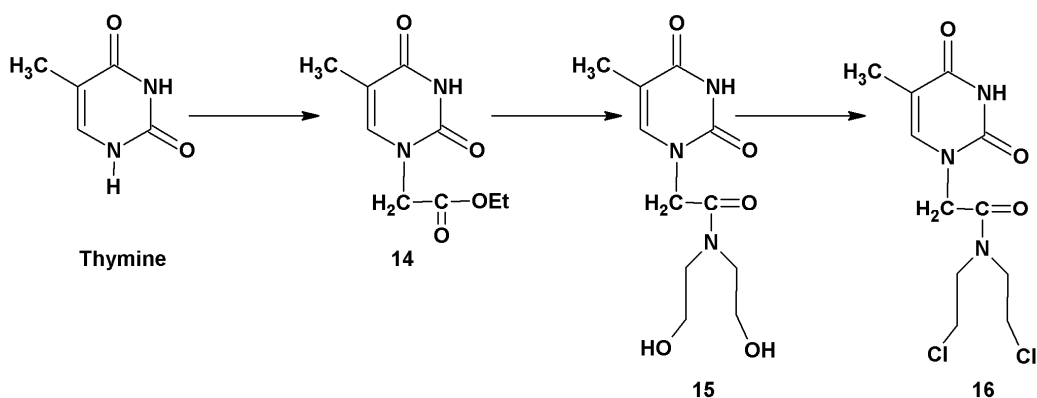


Schéma III.2 : Stratégie de synthèse de la *N,N*-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide

III.1.2. Les différentes étapes

III.1.2.1. Alkylation de la thymine

La première étape de cette synthèse consiste en l'alkylation régiosélective en position 1 de la thymine (schéma III.3). Cette dernière est dissoute dans le DMF en présence de NaH pour former l'anion puis activée par irradiation micro-ondes pendant 3 minutes (100°C, 300 W). On injecte alors 1,1 équivalents de bromoacétate d'éthyle, suivie par 6 minutes d'irradiation micro-ondes dans les mêmes conditions que précédemment.

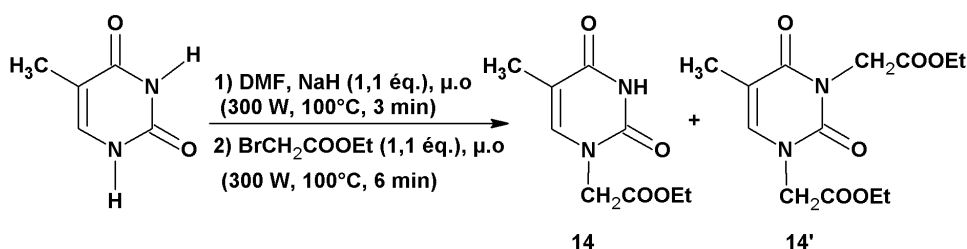


Schéma III.3 : Réaction d'alkylation.

Le suivi de la réaction par CCM, montre la disparition de la thymine et la formation de deux produits dont l'un est nettement majoritaire. Après évaporation et purification sur gel de silice, nous obtenons 74% de thymine N-1 alkylée **14** et 10% de thymine N-1, N-3 dialkylée **14'**.

La spectroscopie RMN du proton du composé **14** montre la fixation du groupement éthylacétate en position 1, par la présence d'un singulet à 11,30 ppm correspondant au proton N-H en position 3, un singulet à 4,45 ppm correspondant aux deux protons du groupe CH₂, ainsi qu'un quadruplet à 4,14 ppm et un triplet à 1,21 ppm correspondant respectivement aux protons CH₂ et CH₃ du groupement éthyle. Le spectre RMN du carbone confirme cette fixation. L'analyse du spectre IR montre une bande à 1720 cm⁻¹ correspondant à la fonction ester.

III.1.2.2. Fixation de la diéthanolamine

La fixation de la diéthanolamine s'effectue à reflux dans l'éthanol en présence d'un large excès de diéthanolamine (schéma III.4).

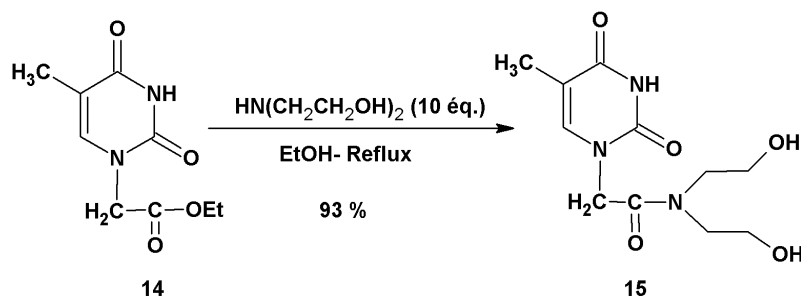


Schéma III.4 : Fixation de la diéthanolamine.

Cette réaction entraîne le départ du groupement éthoxy et la fixation de la diéthanolamine par l'intermédiaire d'une liaison acétamide. Après 12 heures de réaction, l'analyse par CCM du milieu réactionnel montre bien la disparition quasi-totale du produit de départ **14**. Après évaporation à sec du mélange réactionnel et purification le composé **15** est obtenu avec un rendement de 93%, sous forme d'un solide blanc.

L'analyse spectroscopie RMN du proton montre la présence de quatre triplets correspondant au quatre groupements CH_2 des deux chaînes hydroxyléthyles et la disparition des signaux correspondants au groupement éthoxy.

III.1.2.3. Réaction de chloration

La chloration des deux groupements hydroxyles du composé **15** est tout d'abord réalisée dans le DMF en présence de chlorure de thionyle (8 éq.). Le composé **16** est obtenu avec un rendement très faible de 10%. L'utilisation du dichlorométhane⁴⁰ comme solvant permet une amélioration du rendement, il passe à 35% mais celui-ci reste moyen. Le rendement optimum (66%) a été obtenu en réalisant la chloration dans le chlorure de thionyle (schéma III.5).

⁴⁰ D. W. Larden, H. T. Andrew Cheung, *Tetrahedron*, **1999**, 55 (11), 3265-3276.

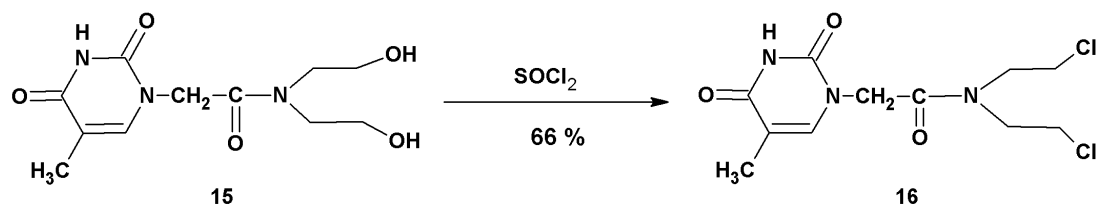


Schéma III.5 : Réaction de chloration.

Le suivie par CCM montre la disparition totale du produit de départ et la présence de deux produits secondaires en plus du produit majoritaire isolé. Ces produits secondaires n'ont pas été caractérisés mais pourraient résulter d'une réaction de substitution nucléophile intramoléculaire comme le montre le schéma ci-dessous.

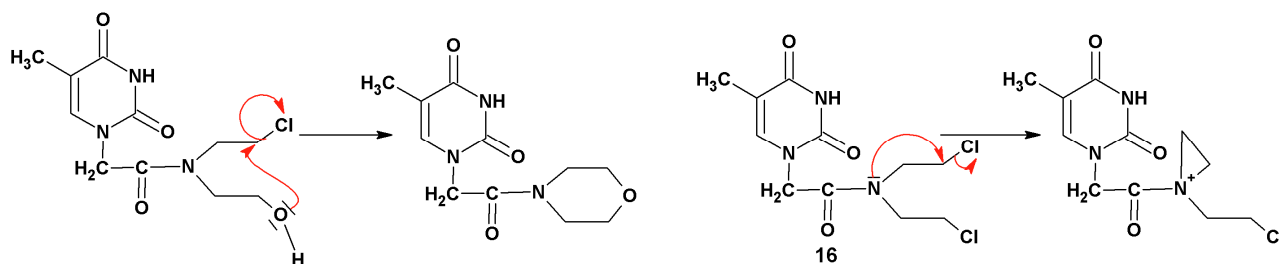


Schéma III.6 : Composés secondaires résultant de la substitution nucléophile intramoléculaire.

Le composé **16** a été analysé par RMN, tous les signaux attendus sont observés. La spectrométrie de masse confirme la fixation des deux atomes de chlore par la présence des pics quasi moléculaires $(M+H)^+$ m/z 308, m/z 310 et m/z 312 et $(M+NH_4)^+$ m/z 325, m/z 327 et m/z 329 caractéristique de la présence des deux isotopes de l'atome de chlore.

III.2. SYNTHÈSE DE LA N,N-DI-(2-CHLOROÉTHYL)-2-(URACIL-1-YL)ACÉTAMIDE

Le deuxième agent alkylant a été synthétisé à partir de l'uracile en utilisant la même stratégie que le composé **16** (schéma III.7).

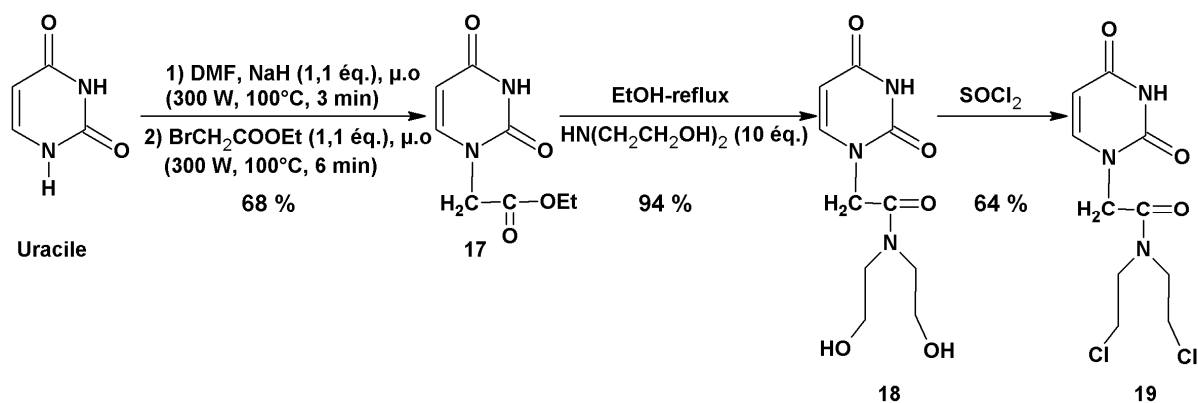


Schéma III.7 : Stratégie de synthèse de la *N,N*-di-(2-chloroéthyl)-2-(uracil-1-yl)acétamide.

L'alkylation de l'uracile est réalisée selon la méthode utilisée pour l'alkylation de la thymine. Celle-ci est effectuée dans le DMF en présence d'hydrure de sodium et de bromoacétate d'éthyle toujours par activation micro-ondes. Le suivi par CCM, nous permet d'arrêter la réaction lorsque le produit dialkylé apparaît. La disparition du produit de départ n'est donc pas totale. Le produit monoalkylé **17** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 68%.

Le composé **17** a été analysé par spectroscopie RMN. La fixation du groupement éthylacétate est confirmée par la présence d'un singulet à 4,51 ppm correspondant aux deux protons du groupe CH₂, un quadruplet à 4,15 ppm et un triplet à 1,21 ppm correspondant respectivement aux protons CH₂ et CH₃ du groupement éthoxy.

On procède alors à la fixation de la diéthanolamine dans l'éthanol à reflux en présence d'un large excès de celle-ci. Après une nuit de réaction, on constate la disparition quasi-totale du produit de départ **17**. Le composé **18** est obtenu avec un rendement de 94%. La spectroscopie RMN du proton montre la présence de quatre triplets correspondant au quatre groupements CH₂ des deux chaînes hydroxyléthyles.

La dernière étape de chloration dans le chlorure de thionyle conduit à l'agent alkylant **19** avec un rendement de 64%. La structure du composé **19** a été établie par spectroscopie RMN et confirmé par spectrométrie de masse. Le spectre de masse du composé **19** 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 caractéristique de la présence des deux isotopes de l'atome de chlore.

L'utilisation des conditions mises au point pour la synthèse de l'agent alkylant **16** a permis d'obtenir le composé **19** avec un rendement global de 41%. Ce rendement est comparable à celui obtenu lors de la synthèse du composé **16** (45%).

Afin d'élargir cette nouvelle famille d'agents alkylants, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'analogues du chlorambucil en fixant le groupement bis(β -chloroéthyl)amine en position 4 de la thymine.

III.3. TRANSFORMATION DU CARBONYLE EN POSITION 4 DE LA THYMINE ALKYLÉE

La fixation du groupement bis(β -chloroéthyl)amine en position 4 de la thymine alkylée (schéma III.8) permet, comme on la vu, dans le cas du chlorambucil (chapitre I) une délocalisation du doublet de l'azote dans le système de résonance de la base pyrimidique. Ceci conduirait à une diminution de la vitesse de formation de l'ion éthylène-imonium et par conséquent entraînerait une diminution de la réactivité du produit, se traduisant par un meilleur effet pharmacologique.

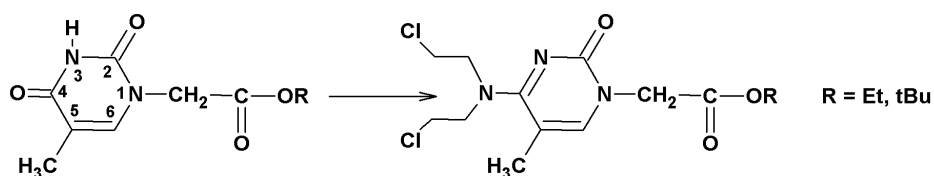


Schéma III.8 : Transformation du carbonyle en position 4.

Plusieurs auteurs ont réalisé la transformation du groupement carbonyle sur les bases puriques ou pyrimidiques en deux étapes, la première consiste à fixer un bon groupement nucléofuge tel que le mésitylènesulfonyle, le soufre ou bien encore le triazole. La deuxième étape est une substitution nucléophile permettant de fixer le nucléophile désiré. Cette transformation est possible du fait des formes tautomères présentées par les différentes bases, comme par exemple dans le cas de la thymine (schéma III.9). La forme (b) est la plus couramment rencontrée mais les deux autres formes sont possibles avec une probabilité plus grande pour la forme (c).

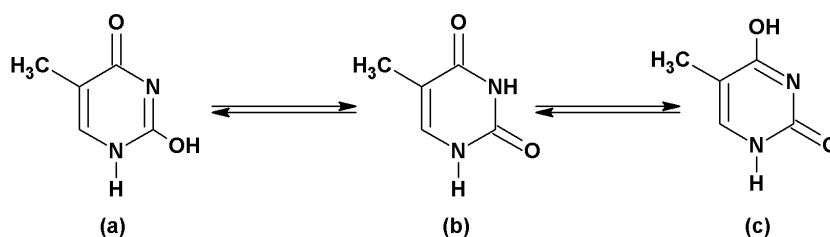


Schéma III.9 : Tautomérie de la thymine.

Pour effectuer la transformation du groupement carbonyle sur les bases puriques ou pyrimidiques, plusieurs voies de synthèses ont été développées, nous nous proposons, ici, d'en décrire quelques unes.

Grunder-Klotz et coll.⁴¹ ont transformé l'uracile en cytosine en fixant sur l'oxygène en position 4, le mésitylènesulfonyle, groupement très encombré et donc très sélectif de cette position. La molécule ainsi obtenue peut réagir avec l'azidure de sodium dans le DMF, conduisant alors au dérivé possédant un groupe azido en position 4. Celui-ci est réduit pour former l'amine (schéma III.10).

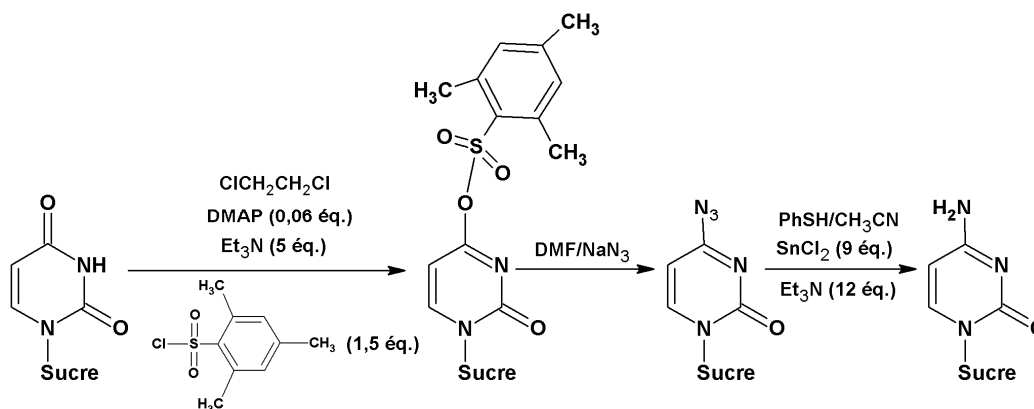


Schéma III.10: Formation de la cytidine à partir de l'uridine par substitution nucléophile.

L'uridine peut aussi être transformée en cytidine par l'intermédiaire d'une 4-thiouridine. En effet, Starrett et coll.⁴² ont rapporté que le pentasulfure de phosphore P_2S_5 pouvait transformer la fonction carbonyle en position 4 de l'uridine en fonction thiocarbonyle qui, après ammonolyse, conduit à la cytidine. Cependant, ces auteurs ont aussi montré que P_2S_5 ne conduit pas toujours au thioamide désiré. Une alternative à P_2S_5 est le réactif de Lawesson. Il s'agit du 2,4-bis-(4-méthoxyphényl)-1,3-dithia-2,4-diphosphétane-2,4 disulfide que nous noterons R.L. par la suite. Ce réactif permet de nombreuses réactions de thionation⁴³, et en particulier la réaction de conversion en thiocétone⁴⁴ ou en thiocarboxamides⁴⁵ des composés oxygénés correspondants. Une fois les thiocétones formées, celles-ci peuvent être converties en amines primaires par réaction avec l'ammoniac dans le méthanol. Cette réaction peut s'appliquer au cas des dérivés de l'uridine comme l'ont décrit Starrett et coll., on peut le résumer par le schéma III.11.

⁴¹ E. Grunder-Klotz, G. Just, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acids*, **1994**, 13 (9), 1829-1841.

⁴² J. E. Starrett Jr, D. R. Tortolani, D. C. Baker, M. T. Omar, A. K. Hebbler, J. A. Wos, J. C. Martin, M. M. Mansuri, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **1990**, 41 (7), 885-897.

⁴³ M. P.Cava, M. I. Levinson, *Tetrahedron*, **1985**, 41 (22), 5061-5087.

⁴⁴ B. S. Pedersen, S. Sheibye, N. Y. Nilsson, S-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1978**, 87 (3), 223-228.

⁴⁵ S. Sheibye, B. S. Pedersen, S-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1978**, 87 (3), 229-238.

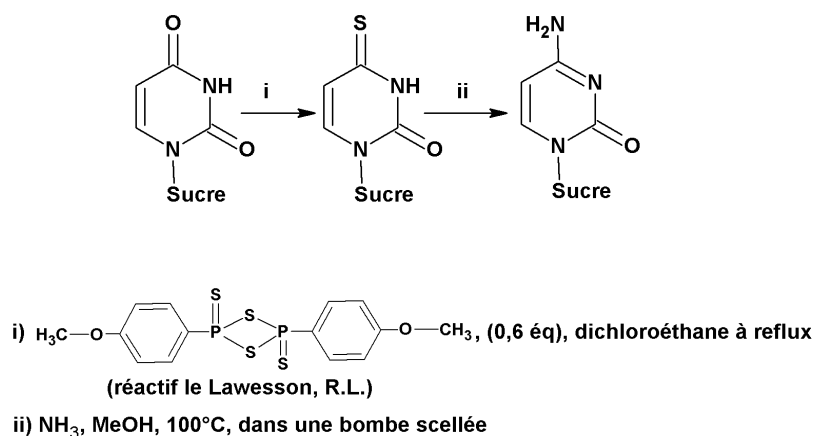


Schéma III.11 : Formation de la cytidine par l'intermédiaire d'une thiouridine.

Un mécanisme de l'étape de thionation est proposé sur le schéma III.12⁴⁴.

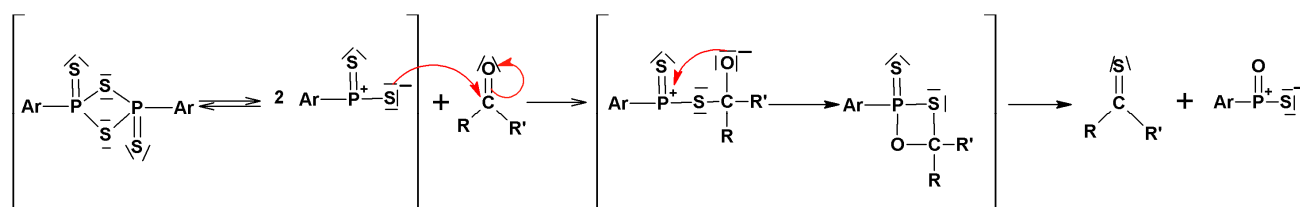


Schéma III.12 : Mécanisme de la réaction de thionation.

Une autre stratégie développée par A. A.-H. Abdel-Rahman et coll.⁴⁶ consiste à substituer le groupement carbonyle en position 4 de la thymidine protégée par le 1-pyrenylméthylamine en passant par l'intermédiaire triazolylé. Cette transformation est effectuée dans l'acétonitile en présence de triazole, triéthylamine et POCl_3 . La substitution nucléophile par le chlorhydrate de 1-pyrèneméthylamine (RNH_2 , HCl) est ensuite réalisée dans le DMF à 80°C en présence de triéthylamine et permet d'obtenir le produit avec un rendement de 77 % (schéma III.13).

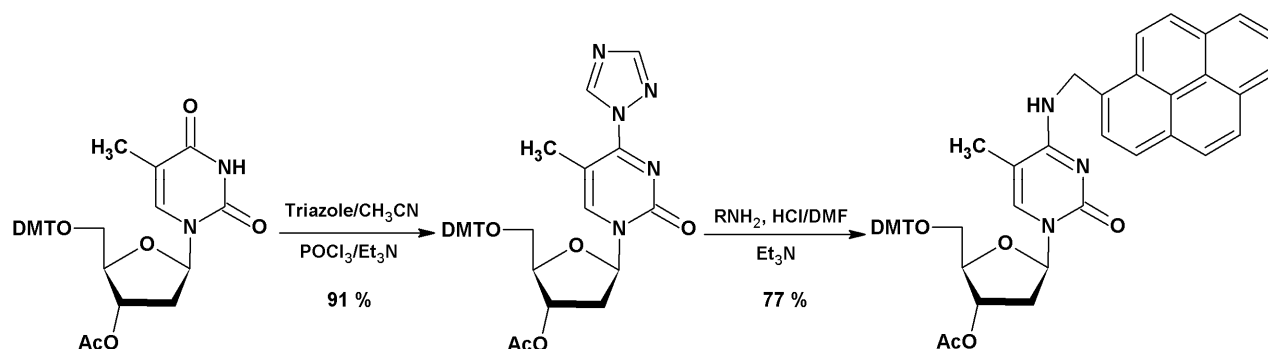


Schéma III.13 : Transformation du carbonyle en amine secondaire par l'intermédiaire d'une 4-triazolylation.

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

La fixation de l'unité triazolique suit le processus présenté sur le schéma III.14.

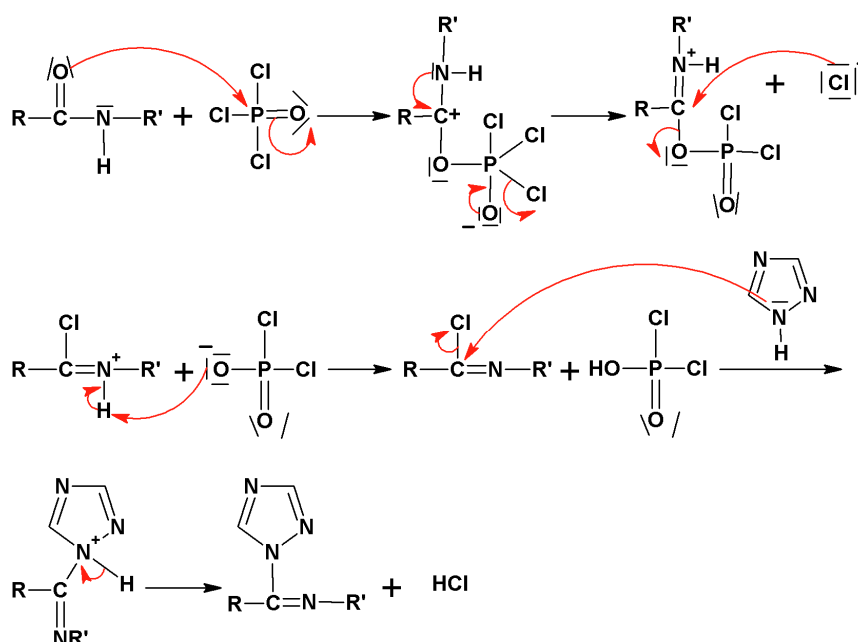


Schéma III.14 : Mécanisme de la réaction de triazoloylation.

III.3.1. Résultats et discussions

Nous avons mis en œuvre ces trois méthodes pour fixer le groupement actif bis(β -chloroéthyl)amine. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la méthode développée par Grunder-Klotz et coll..⁴¹ Pour cela nous avons fait réagir le chlorure de mésitylène sulfonyle sur la 1-éthoxycarbonylméthylthymine dans le dichloroéthane en présence de triéthylamine et de DMAP (schéma III.15).

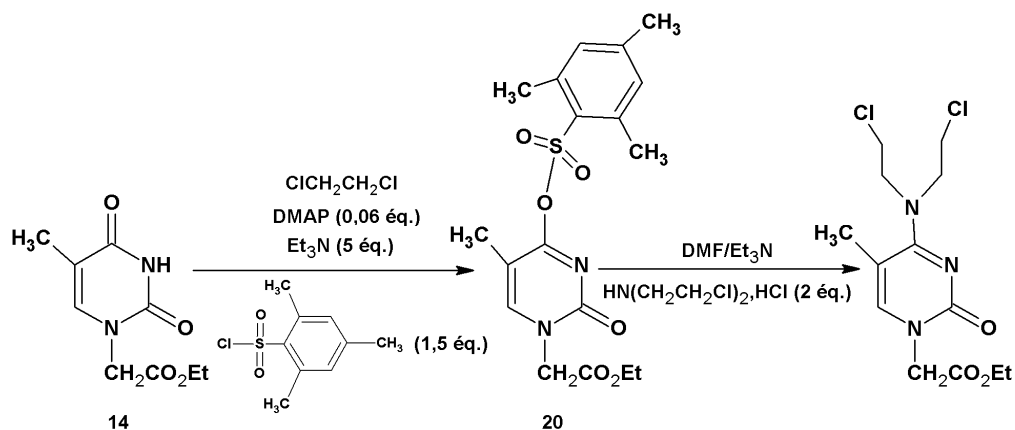


Schéma III.15: Passage par le groupement mésitylènesulfonyle.

Bien que lente (4 jours, à température ambiante), la réaction de fixation du groupement mésitylènesulfonyle conduit au composé intermédiaire avec un rendement de 56 % après purification. En spectroscopie RMN du proton, la présence du groupement mésitylènesulfonyle est

caractérisé par l'apparition d'un singulet intégrant pour 6 protons à 2,73 ppm correspondant aux deux groupements CH₃ en position *ortho*, un singulet correspondant au CH₃ en position *para* à 2,29 ppm, et un singulet intégrant pour 2 protons dans la zone de résonance des protons aromatiques correspondant aux protons en position méta (tableau III.1).

Tableau III.1 : Données RMN ¹H et ¹³C dans CDCl₃ du composé 20.

Attribution	RMN ¹ H δ ppm (J Hz)	RMN ¹³ C δ ppm
<i>Base</i>		
C-2		154,19
C-4		166,55
C-5		104,45
CH-6	7,31 q (0,8)	147,37
CH ₃	2,04 d (0,8)	12,15
<i>Mésitylènesulfonyle</i>		
CH-Ar	6,95 s	131,92
2 CH ₃ (<i>ortho</i>)	2,73 s	21,15
CH ₃ (<i>para</i>)	2,29 sé	22,75
<i>Chaîne</i>		
N- <u>CH</u> ₂ -COO	4,47 s	48,61
N-CH ₂ - <u>COO</u>		167,22
O- <u>CH</u> ₂ -CH ₃	4,20 q (7,16)	62,22
O-CH ₂ - <u>CH</u> ₃	1,26 t (7,16)	14,05

Cet intermédiaire est alors dissout dans le DMF et est mis à réagir avec le chlorhydrate de bis(β-chloroéthyl)amine en présence de triéthylamine. Le suivi de la réaction par CCM, montre qu'il n'y a aucune évolution à température ambiante même après plusieurs jours de réaction. Les différents essais menés en utilisant un excès de réactifs ou en augmentant la température de réaction, n'ont pas induit d'amélioration.

Nous avons alors utilisé la méthode proposée par Starrett et coll.⁴² par l'intermédiaire d'une thionation de la thymine. Nous avons mis à réagir la thymine alkylée avec 1,5 équivalents de réactif de Lawesson (R.L.) dans le dichloroéthane à reflux (schéma III.16).

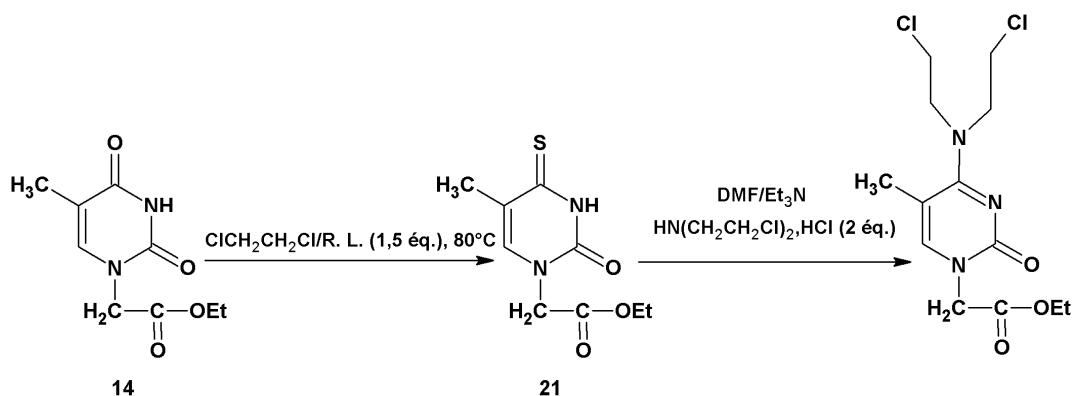


Schéma III.16 : Synthèse de la 4-thiothymine alkylée.

Après 8 heures de réaction à 80°C, le mélange réactionnel est évaporé à sec, puis le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice. Le produit **21** est obtenu avec un rendement quantitatif. Dans ce cas l'utilisation de l'irradiation micro-ondes a permis de diminuer considérablement le temps de réaction. Celui-ci passe de 8 heures à 34 minutes, la température étant fixée à 80°C et la puissance à 350 W.

L'analyse du spectre RMN du proton montre la présence de tous les signaux attendus (tableau III.2). Le spectre RMN du carbone confirme la présence de l'atome de soufre. On retrouve le signal correspondant au groupement C=S à 191,00 ppm. Le spectre de masse confirme la structure par la présence d'un pic quasi moléculaire (M+H)⁺ m/z 229.

Tableau III.2 : Données RMN ¹H et ¹³C dans CDCl₃ du composé 21.

Attribution	RMN ¹ H δ ppm (J Hz)	RMN ¹³ C δ ppm
<i>Base</i>		
N-H	9,98 s	
C-2		148,3
C-4		191,00
C-5		119,58
CH-6	6,97 q (0,8)	136,63
CH ₃	2,10 d (0,8)	17,02
<i>Chaîne</i>		
N- <u>CH</u> ₂ -COO	4,60 s	49,07
N-CH ₂ - <u>C</u> OO		166,94
O- <u>CH</u> ₂ -CH ₃	4,26 q (7,1)	62,44
O-CH ₂ - <u>CH</u> ₃	1,31 t (7,1)	14,11

Afin de réaliser l'étape d'amination, plusieurs essais de fixation du groupement bis(β -chloroéthyl)amine sur le produit **21** ont été réalisés, en faisant varier le solvant (DMF, pyridine ou mélange des deux) et le mode d'activation (chauffage classique ou activation micro-ondes). Nous avons reproduit les essais plusieurs fois en variant les paramètres opératoires. Aucun de ces essais n'a conduit au composé désiré.

Nous nous sommes alors tournés vers la méthode proposée par A. A.-H. Abdel-Rahman et coll.⁴⁶ passant par l'intermédiaire d'une triazolylolation de la thymine alkylée (schéma III.17).

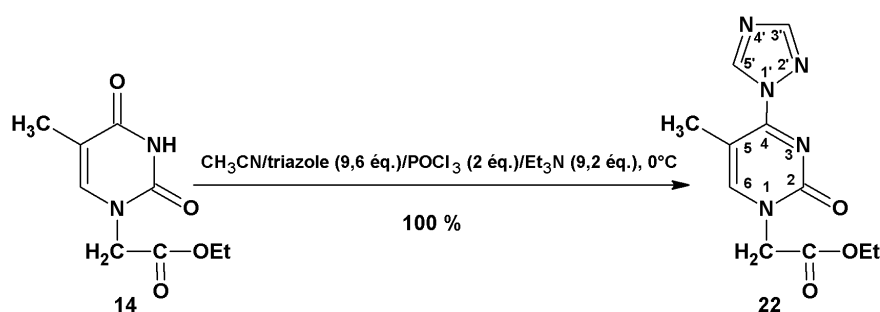


Schéma III.17: Réaction de fixation du groupement triazole en position 4.

Le triazole est dissout dans l'acétonitrile et mis en présence de POCl_3 , on ajoute goutte à goutte à l'aide d'une ampoule de coulée la triéthylamine à 0°C . Après 10 minutes d'agitation, on ajoute au milieu réactionnel le produit **14**. Le suivi par CCM de la réaction montre, au bout de 3 heures, la disparition totale du produit de départ. Après traitement le produit triazolylé **22** est isolé avec un rendement quasi-quantitatif.

Le spectre RMN du proton montre la fixation du groupement triazole en position 4 de la thymine alkylé par la disparition du singulet à 11,30 ppm correspondant au proton en position 3 (N-H). La présence des deux protons H-3' et H-5' respectivement à 9,32 et 8,37 ppm résonant sous forme de singulet confirme bien la présence du groupement triazole (tableau III.3). Le spectre de masse du composé **23** présente un pic quasi moléculaire correspondant à $(\text{M}+\text{H})^+$ m/z 263 confirmant la structure.

Tableau III.3 : Données RMN ^1H et ^{13}C dans le DMSO du composé **22**.

Attribution	RMN ^1H δ ppm (J Hz)	RMN ^{13}C δ ppm
<i>Base</i>		
C-2		153,33
C-4		158,35
C-5		104,41
CH-6	8,26 q (0,9)	146,78
CH ₃	2,30 d (0,9)	15,59
<i>Triazol</i>		
CH-3'	8,37 s	153,73
CH-5'	9,32 s	145,25
<i>Chaîne</i>		
N- <u>CH</u> ₂ -COO	4,78 s	50,49
N-CH ₂ - <u>COO</u>		166,43
O- <u>CH</u> ₂ -CH ₃	4,18 q (7,1)	61,27
O-CH ₂ - <u>CH</u> ₃	1,23 t (7,1)	13,89

Les essais d'amination du composé **22** sont réalisés dans le DMF en présence de deux équivalents de chlorhydrate de bis(β -chloroéthyl)amine et de deux équivalents de triéthylamine. Plusieurs essais ont été effectués soit par chauffage classique soit par activation micro-ondes. Malgré les différentes conditions réactionnelles testées, nous ne sommes pas parvenus au composé attendu.

Face à ces échecs, nous avons essayé de réaliser la fixation du groupement bis(β -chloroéthyl)amine en deux étapes à partir de la thymine alkylée triazolylée. Dans un premier temps, une substitution nucléophile par la diéthanolamine a été réalisée, puis les hydroxyles ont été substitués par des atomes de chlore en utilisant le chlorure de thionyle comme agent de chloration.

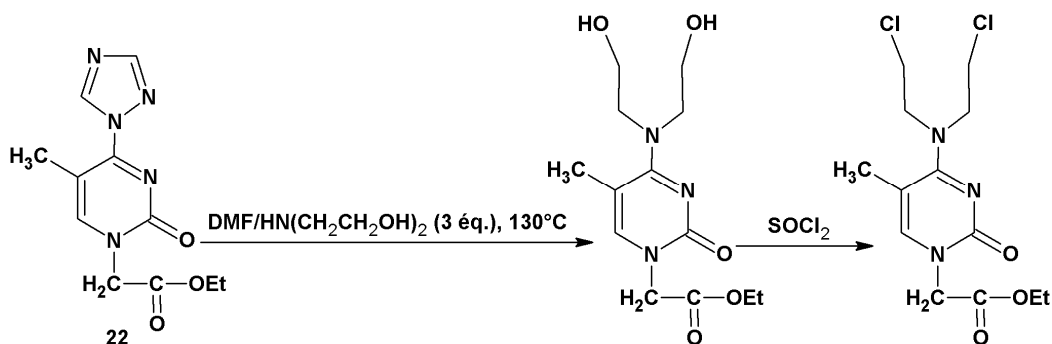


Schéma III.18 : Fixation de la diéthanolamine en position 4.

Nous avons commencé par appliquer le système le plus couramment rencontré, soit dans le DMF à 130°C. Malheureusement aucune évolution n'a été constatée, même en faisant varier le mode d'activation. Nous avons alors utilisé l'éthanol à reflux comme solvant. Après 16 heures de réaction, on observe la disparition totale du produit de départ et la formation d'un nouveau composé. Après purification, la structure du composé isolé est déterminée par spectroscopie RMN.

La RMN du proton montre la disparition du triplet correspondant au CH₃ et du quadruplet correspondant au CH₂ du groupement éthoxy de la fonction ester. On observe également quatre triplets entre 3,58 et 3,35 ppm correspondant aux quatre CH₂ de la diéthanolamine. La présence des deux singulets à 9,30 et 8,35 ppm correspondant aux protons H-5' et H-3' du groupement triazole montre que ce groupement est toujours présent dans le produit final. La diéthanolamine ne s'est donc pas fixée en position 4 de la thymine. L'attaque nucléophile s'est dirigée préférentiellement et majoritairement sur le carbonyle de la fonction ester conduisant au composé **23** avec un rendement de 74 % (schéma III.19 et tableau III.4).

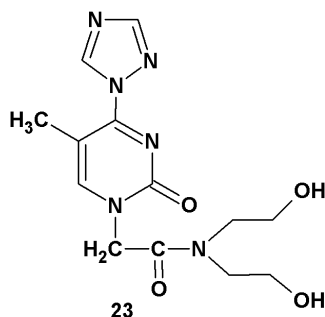


Schéma III.19 : Structure du composé **23**.

Tableau III.4 : Données RMN ^1H et ^{13}C dans le DMSO du composé **23**.

Attribution	RMN ^1H δ ppm (J Hz)	RMN ^{13}C δ ppm
<i>Base</i>		
C-2		150,98
C-4		163,79
C-5		100,35
CH-6	8,32 q (1)	146,58
CH₃	2,34 d (1)	15,59
<i>Triazol</i>		
CH-3'	8,35 s	153,73
CH-5'	9,30 s	145,25
<i>Chaîne</i>		
N-<u>CH₂</u>-CON	4,66 s	48,48
N-CH₂-<u>C</u>ON		166,76
N-CH₂-<u>CH₂</u>-	3,58 t (5,5)	60,25
N-<u>CH₂</u>-CH₂-	3,44 t (5,5)	51,52
N-CH₂-<u>CH₂</u>-	3,47 t (6,1)	58,75
N-<u>CH₂</u>-CH₂-	3,35 t (6,1)	49,63

Contrairement à nos attentes, il semble que le groupement éthoxy soit un meilleur nucléofuge que le groupement triazole dans les conditions utilisées. Afin d'éviter cette substitution au niveau de la fonction ester, nous avons remplacé le groupement éthoxy par le groupement *tert*-butoxy, ce dernier étant un très mauvais nucléofuge. Pour cela, nous avons fixé en position 1 de la thymine le groupement *tert*-butoxycarbonylméthyle. Cette réaction est réalisée en deux étapes comme précédemment pour le composé **14**. Dans un premier temps la thymine solubilisée dans le DMF est mise en présence de NaH suivi de six minutes d'irradiation micro-ondes. Dans un second temps, on injecte le bromoacétate de *tert*-butyle, suivi par six minutes d'activation micro-ondes (schéma III.20).

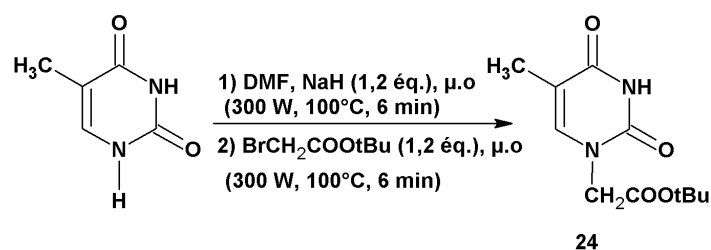


Schéma III.20 : Réaction d'alkylation.

Le suivi par CCM, nous permet d'arrêter la réaction lorsque le produit dialkylé apparaît. La disparition du produit de départ n'étant pas totale. Le produit monoalkylé **24** est obtenu après purification sur colonne de silice avec un rendement de 75 %. L'analyse par spectroscopie RMN confirme la fixation du groupement *tert*-butoxycarbonylméthyle en position 1 de la thymine par la présence d'un singulet à 11,34 ppm correspondant au proton en position 3 de la thymine (N-H). On retrouve à 4,34 ppm un singulet représentant le CH₂ et un singulet à 1,41 ppm intégrant pour 9 protons correspondant au groupement *tert*-butoxy (tableau III.5).

Tableau III.5 : Données RMN ¹H et ¹³C dans le DMSO du composé 24.

Attribution	RMN ¹ H δ ppm (J Hz)	RMN ¹³ C δ ppm
<i>Base</i>		
N-H	11,34 s	
C-2		150,91
C-4		164,20
C-5		108,34
CH-6	7,48 q (1,1)	141,70
CH₃	1,75 d (1,1)	11,85
<i>Chaîne</i>		
N-<u>CH</u>₂-COO	4,34 s	48,98
N-CH₂-<u>C</u>OO		167,27
(-<u>C</u>(CH₃)₃)		81,75
(-C(<u>CH</u>₃)₃)	1,41 s	27,65

La fixation du groupement triazole en position 4 du composé **24** est réalisée selon la méthode de A. A-H. Abdel-Rahman et coll. utilisée précédemment pour le composé **22**.

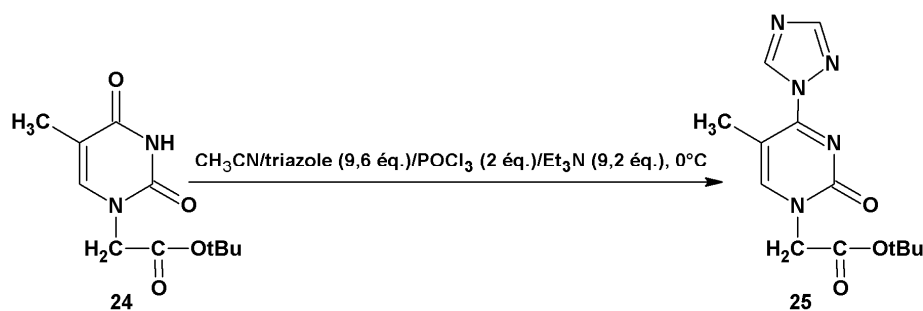


Schéma III.21 : Fixation du groupement triazole.

Au bout de trois heures de réaction le produit de départ a totalement disparu. Après extraction et purification, on récupère le 1-(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-4-(1,2,4-triazolyl)thymine avec un rendement quantitatif. La structure du composé isolé **25** a été déterminée par spectroscopie RMN. La présence de deux singulets à 9,34 et 8,38 ppm montre la présence du groupement triazole, l'absence du singulet à 11,30 ppm montre la disparition du proton en position 3 (N-H) et confirme la fixation du groupement triazole en position 4 (tableau III.6).

Tableau III.6 : Données RMN ^1H et ^{13}C dans le DMSO du composé **25**.

Attribution	RMN ^1H δ ppm (J Hz)	RMN ^{13}C δ ppm
<i>Base</i>		
C-2		150,98
C-4		163,79
C-5		100,35
CH-6	8,32 q (0,9)	146,58
CH ₃	2,34 d (0,9)	15,59
<i>Triazol</i>		
CH-3'	8,38 s	153,73
CH-5'	9,34 s	145,25
<i>Chaîne</i>		
N- <u>CH</u> ₂ -CO	4,66 s	48,48
N-CH ₂ - <u>COO</u>		166,76
(- <u>C</u> (CH ₃) ₃)		81,75
(-C(<u>CH</u> ₃) ₃)	1,41 s	27,65

La substitution nucléophile du groupement triazole par le groupement diéthanolamine est réalisée dans l'éthanol à reflux en présence de dix équivalents de diéthanolamine (schéma III.22).

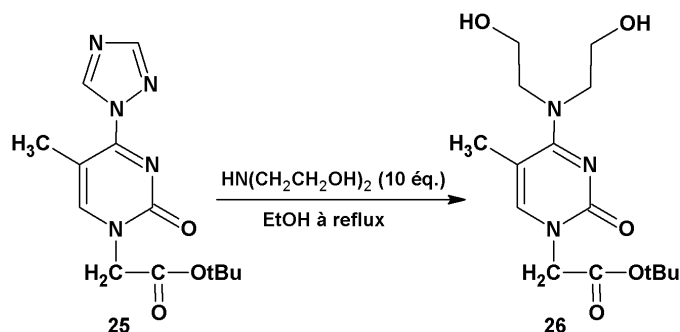


Schéma III.22 : Fixation de la diéthanolamine en position 4.

Après 16 heures de réaction, on observe la disparition totale de la 1-(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-4-(1,2,4-triazolyl)thymine **25** et montre la formation de plusieurs produits dont trois majoritaires. Après évaporation à sec et purification par chromatographie sur silice, les trois produits majoritaires isolés sont caractérisés par spectroscopie RMN et spectrométrie de masse (schéma III.23).

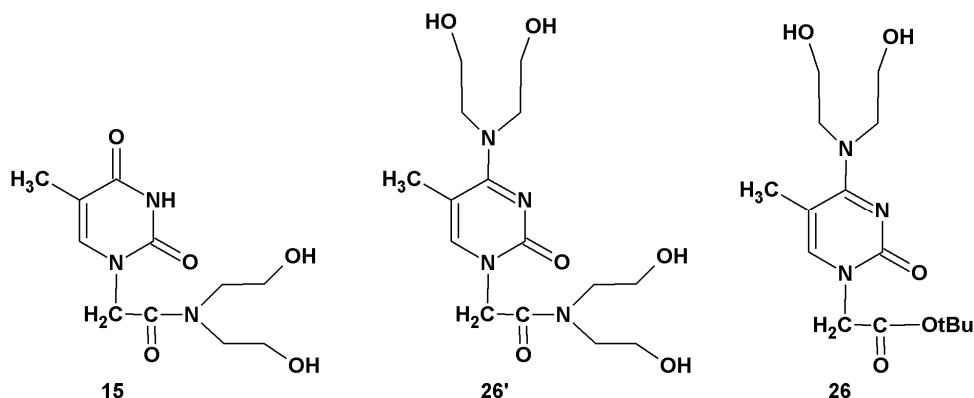


Schéma III.23 : Formation de trois produits.

Le premier composé **15** est issu de l'amidation de la fonction ester. Le remplacement du groupement éthoxy par le groupement *tert*-butoxy n'a pas empêché cette substitution. Le spectre RMN du proton montre bien la disparition du groupement *tert*-butoxy.

Le deuxième composé **26'** résulte d'une double réaction de la diéthanolamine, sur la position 4 mais également sur la fonction ester. Dans ce cas également, l'analyse par RMN montre bien l'absence des groupements *tert*-butoxy et triazole, et montre la présence des deux groupements diéthanolamine.

Le dernier composé isolé **26** est le composé attendu. Celui-ci est obtenu avec un rendement de 6 %. Comme pour les deux autres composés, la structure a été déterminée par spectroscopie RMN et spectrométrie de masse (tableau III.7).

Tableau III.7 : Données RMN ^1H dans le DMSO des composés 15, 26' et 26.

Composé	RMN ^1H δ ppm (J Hz)					Masse
	H-6	CH ₃	N-CH ₂ -CO	tBu	CH ₂ (bis(β -chloroéthyl)amine)	
15	7,17 q (1,0)	1,91 d (1,0)	4,73 s	/	3,79 t (5,2) 3,74 t (5,5) 3,57 t (5,2) 3,53 t (5,5)	(M+Na) ⁺ m/z 294,1
26'	7,42 sé	2,12 sé	4,31 s		3,40-3,65 m	(M+Na) ⁺ m/z 381,2
26	7,56 sé	1,81 sé	4,41 s	1,42 s	3,93 t (6,8) 3,45 t (5,6) 2,75 t (6,8) 2,66 t (5,6)	(M+Na) ⁺ m/z 350,2

Bien que le produit désiré soit obtenu avec un très faible rendement, celui-ci a été utilisé pour réaliser l'étape suivante. La chloration des deux groupements hydroxyles est réalisée dans le chlorure de thionyle à température ambiante (schéma III.24)

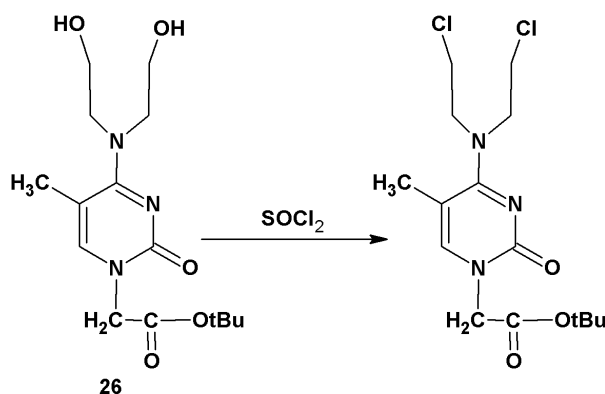


Schéma III.24 : Essai de chloration.

Quelles que soient les conditions utilisées, la CCM montre la formation d'une multitude de produits.

Les essais de fixation de la diéthanolamine ou de la bis(β -chloroéthyl)amine n'ayant pas donné de résultat satisfaisant, nous nous sommes interrogés sur l'influence de l'encombrement de ces amines secondaires sur leur nucléophilie. Pour cela, nous nous sommes proposés de fixer dans

un premier temps le groupement amino (NH_2) et de l'alkyler dans un deuxième temps. Nous avons donc utilisé le composé triazolylé **25** comme substrat de départ (schéma III.25).

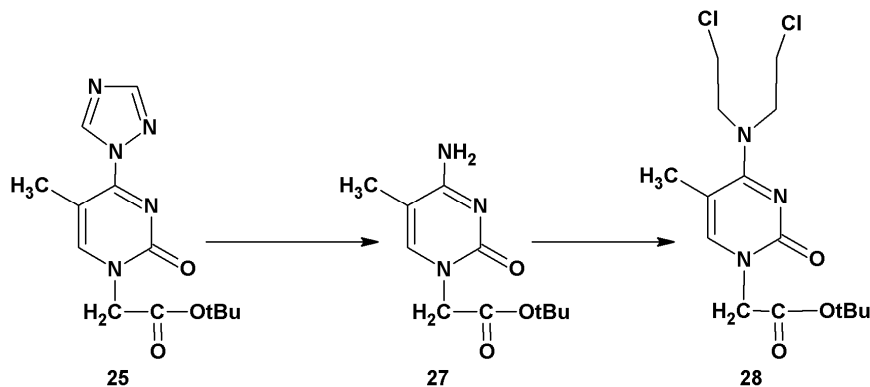


Schéma III.25 : Stratégie de synthèse 1-(tert-butoxycarbonylméthyl)-4-(bis(β -chloroéthyl)amine)thymine.

La substitution du groupement triazole par le groupement NH_2 est réalisée dans une solution d'ammoniac dans le méthanol (schéma III.26).

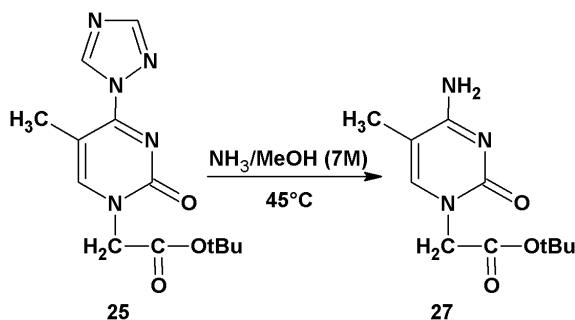


Schéma III.26 : Fixation du groupement NH_2 .

Au bout de quatre heures de réaction à 45°C , l'analyse par CCM montre la disparition totale du produit de départ et la formation d'un nouveau produit **27**, obtenu après purification avec un rendement de 58 %. Ce rendement moyen peut être expliqué par la difficulté d'extraction du produit de la silice lors de la purification.

Le spectre RMN du proton (tableau III.8) présente un singulet à 8,28 ppm correspondant aux deux protons du groupement amino. L'absence des deux singulets à 9,34 et 8,38 ppm du groupement triazole ainsi que la présence du groupement *tert*-butoxy confirment la présence du groupement amino en position 4 de la thymine. La spectrométrie de masse confirme la structure par la présence des pics quasi moléculaires $(\text{M}+\text{H})^+$ m/z 240 et $(\text{M}+\text{Na})^+$ m/z 262.

Tableau III.8 : Données RMN ¹H et ¹³C dans DMSO du composé 27.

Attribution	RMN ¹ H δ ppm (J Hz)	RMN ¹³ C δ ppm
<i>Base</i>		
C-2		155,70
C-4		165,90
C-5		100,30
CH-6	7,38 sé	143,60
CH ₃	1,81 sé	12,80
<i>Amino</i>		
NH ₂	8,28 s	153,73
<i>Chaîne</i>		
N- <u>CH</u> ₂ -CO	4,29 s	50,10
N-CH ₂ - <u>COO</u>		167,80
(- <u>C</u> (CH ₃) ₃)		81,00
(-C(<u>CH</u> ₃) ₃)	1,41 s	27,60

La réaction d'alkylation de la fonction amine a été réalisée dans le DMF en présence de 5 équivalents de carbonate de potassium et de 5 équivalents de 1-bromo-2-chloroéthane à 80°C. Après 5 jours de réaction, l'analyse par CCM montre la disparition du produit de départ et l'apparition de plusieurs produits dont deux majoritaires. Après purification par chromatographie, les deux produits majoritaires isolés sont caractérisés par spectroscopie RMN (schéma III.27).

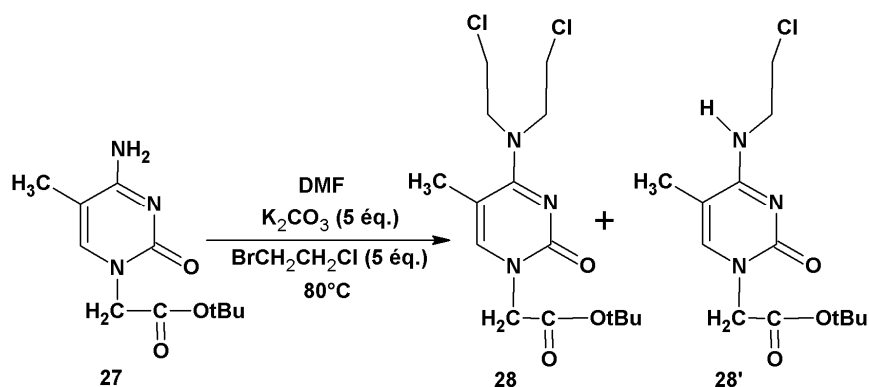


Schéma III.27 : Synthèse de la 1-(tert-butoxycarbonylméthyl)-4-(bis(β-chloroéthyl)amino)thymine.

Le composé **28'** résulte de la monoalkylation de la fonction amine par le 1-bromo-2-chloroéthane et est obtenu avec un rendement de 12 %. Le composé a été analysé par spectroscopie RMN. Les données de RMN ^1H sont rassemblées dans le tableau III.8.

Le composé **28** correspond au produit attendu résultant de la dialkylation de la fonction amine. Il est obtenu avec un rendement faible de 23 %. Le spectre RMN du proton montre bien la présence des quatre groupements CH_2 des deux chaînes fixées sur la fonction amine (tableau III.9).

Tableau III.9 : Données RMN ^1H dans le DMSO des composés **28'** et **28**.

Composé	RMN ^1H δ ppm (J Hz)				
	H-6	CH_3	N- CH_2 -CO	tBu	CH_2 (bis(β -chloroéthyl)amine)
28'	6,98 q (1,0)	1,77 d (1,0)	4,24 s	1,42 s	3,84 m
					3,73 m
28	7,81 q (1,4)	1,81 d (1,4)	4,63 s	1,43 s	4,42 m
					4,34 m
					4,27 m
					4,12 m

Cette nouvelle stratégie a permis d'obtenir lors de l'étape de substitution nucléophile un meilleur rendement de 58 %. Néanmoins le rendement d'alkylation de l'amine reste faible (23 %). La mise au point de cette dernière réaction est actuellement poursuivie afin d'améliorer ce rendement. Par la suite, la déprotection de la fonction acide sera réalisée dans l'acide trifluoroacétique.

III.4. CONCLUSION

Les composés **16** et **19** sont obtenus en trois étapes avec des rendements globaux correctes de 45 % et 41 % respectivement. Nous avons évalué sur ces deux composés leur activité anticancéreuse. Les résultats de ces tests seront présentés au chapitre IV.

La transformation du carbonyle en position 4 de la thymine alkylée s'est révélée complexe et a nécessité l'utilisation de plusieurs stratégies qui sont résumées dans le schéma III.28.

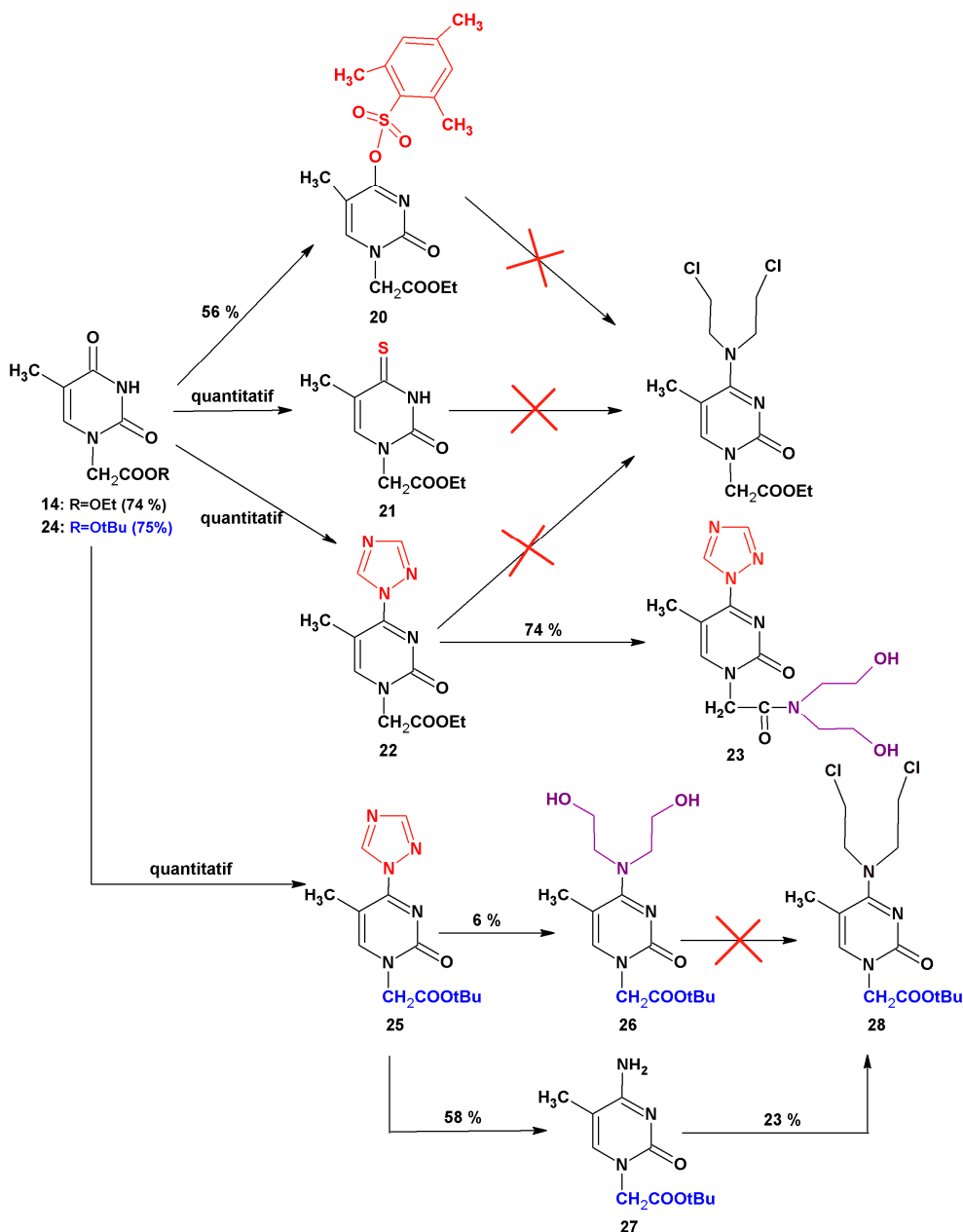


Schéma III.28 : Les différentes stratégies pour la transformation du carbonyle en position 4 de la thymine alkylée.

Comme le montre ce schéma la transformation du groupement carbonyle en position 4 de la thymine alkylée, nous a amené à étudier la fixation de groupements nucléofuges tels que le mésitylène, le soufre et le triazole. Cependant ces intermédiaires n'ont pas conduit à la substitution nucléophile attendue. On observe que le groupement protecteur de l'acide carboxylique peut entrer en compétition lors de cette substitution nucléophile. En effet, nous avons observé la fixation de la diéthanolamine au niveau de l'ester. Finalement, le composé attendu **28** a été obtenu à partir du dérivé de la thymine triazolylée **25** en deux étapes en passant par l'intermédiaire aminé **27**.

CHAPITRE IV
ÉVALUATIONS BIOLOGIQUES

IV. ÉVALUATIONS BIOLOGIQUES

Une évaluation biologique d'une partie des agents alkylants synthétisés (Schéma IV.1) a été réalisée au Laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université Paris XIII sous la direction du Professeur Michel Kraemer.

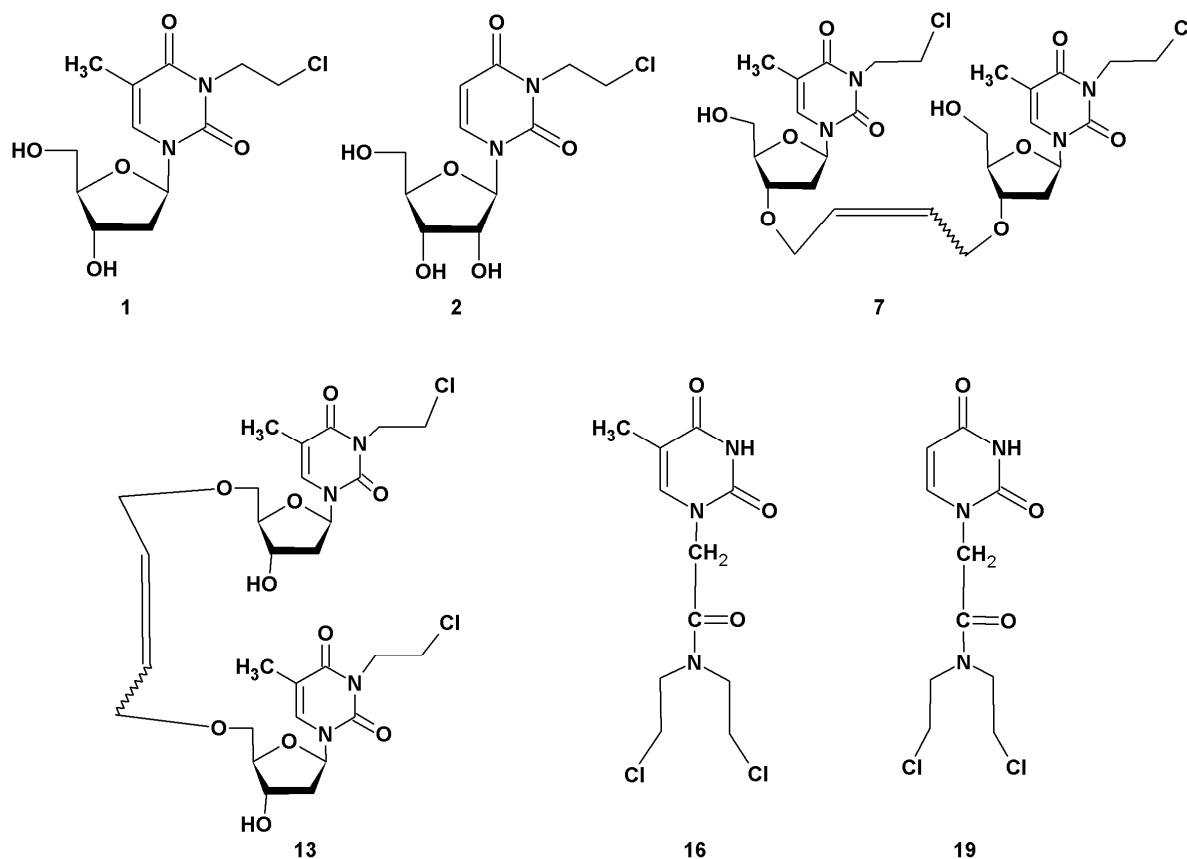


Schéma IV.1 : Structure chimique des agents alkylants testés.

Ces composés ont été testés sur des cellules de la lignée tumorale A431⁴⁷ d'un carcinome* épidermoïde vulvaire humain. Cette lignée se caractérise par un grand nombre de récepteurs à l'EGF⁴⁸ (Epidermal Growth Factor). Ce facteur de croissance épidermique est une hormone

⁴⁷a) M. Di Benedetto, A. Starzec, R. Vassy, G. Y. Perret, M. Crépin, M. Kraemer, *Br J Cancer.*, **2003**, 88 (12), 1987-1994. b) Y. Hamma-Kourbali, M. Di Benedetto, D. Ledoux, O. Oudar, Y. Leroux, M. Lecouvey, M. Kraemer, *Biochem Biophys Res Commun.*, **2003**, 310 (3), 816-823. c) E. Guenin, D. Ledoux, O. Oudar, M. Lecouvey, M. Kraemer, *Anticancer Res.*, **2005**, 25 (2A), 1139-1145.

⁴⁸A. Malliri, M. Symons, R. F. Hennigan, A. F. L. Hurlstone, R. F. Lamb, T. Wheeler, B. W. Ozanne, *J Cell Biol.*, **1998**, 143 (4), 1087-1099.

protéique qui lors de sa fixation sur ses récepteurs provoque une activité mitotique*, c'est-à-dire, une division cellulaire très rapide au sein des tissus épithéliaux vulvaires*. Par ailleurs, les cellules de cette lignée sécrètent une quantité importante de VEGF⁴⁹ (Vascular Endothelial Growth Factor = Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire), protéine qui est émise par la tumeur primitive pour assurer sa néovascularisation* à partir de vaisseaux sanguins déjà existants. Ce phénomène de vascularisation appelé néoangiogenèse* permet à certaines cellules cancéreuses de la tumeur primitive de migrer via le flux sanguin vers d'autres organes. Ces cellules cancéreuses vont alors envahir un nouvel organe et former une nouvelle tumeur appelée métastase. La lignée tumorale A431 représente donc un bon modèle pour évaluer l'effet biologique des composés synthétisés au cours de ce travail. Nous avons testé l'effet de ces molécules sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales.

De nombreux travaux récents décrivent l'implication des matrices métalloprotéases* (notamment les MMP2 et les MMP9) dans les processus métastatiques de nombreux cancers.⁵⁰ La dégradation de la matrice extracellulaire par ces métalloprotéases, ayant un rôle essentiel dans l'invasion et la dissémination d'une tumeur, nous avons également étudié les effets des composés synthétisés sur l'expression de ces métalloprotéases.

IV.1. EFFETS *IN-VITRO* DES PRODUITS SYNTHÉTISÉS SUR LA PROLIFÉRATION DES CELLULES A431

Dans un premier temps, nous avons étudié la prolifération des cellules A431 en présence des agents alkylants synthétisés.

L'étude des effets des produits **1**, **2**, **7**, **13**, **16** et **19** sur la multiplication des cellules tumorales A431 a été réalisée en traitant ces cellules pendant 72 heures avec des doses croissantes de produit. Ces doses s'étendant de 0,015 mM à 1 mM afin de déterminer la concentration induisant 50 % d'inhibition (IC₅₀). Quelles que soient leurs concentrations, les composés **7**, **13** et **19** ne présentent pas d'activité notable. La 3-(2-chloroéthyl)thymidine **1** inhibe faiblement la prolifération (20 %) à une concentration de 1 mM. En revanche la 3-(2-chloroéthyl)uridine **2** et la N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide **16** inhibent de façon significative la prolifération des cellules tumorales. L'IC₅₀ est de 60 µM pour le composé **2** et de 15 µM pour le composé **16** (schéma IV.2).

⁴⁹ a) Y. Myoken, Y. Kayada, T. Okamoto, M. Kan, G. H. Sato, J. D. Sato, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88 (13), 5819-5823. b) O. Melnyk, M. A. Shuman, K. J. Kim, *Cancer RES.*, **1996**, 56 (4), 921-924.

⁵⁰ C. Chantrain, Y. A. DeClerck, *Medecine/Sciences*, **2002**, 18, 565-575.

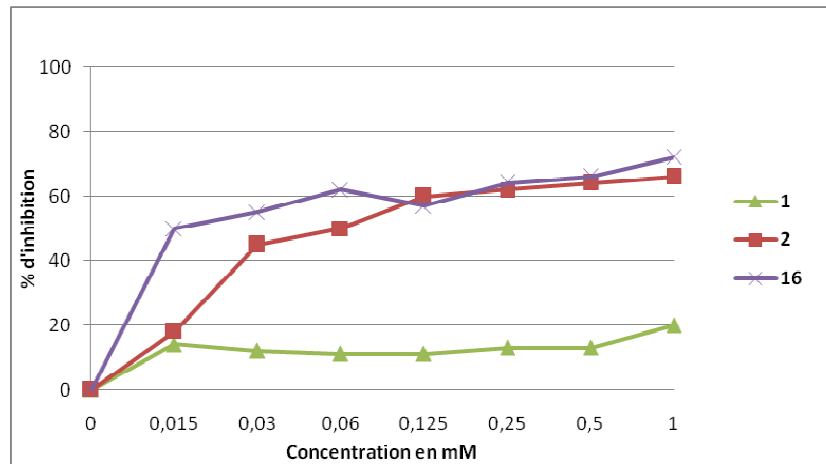


Schéma IV.2 : Effet dose dépendance des composés 1, 2, 16 sur les cellules A431.

Nous avons poursuivi les tests biologiques avec ces deux dernières molécules en étudiant leur effet sur la migration et l'invasion des cellules tumorales A431.

IV.2. EFFETS SUR LA MIGRATION DES CELLULES A431

L'étude de la migration des cellules tumorales A431 s'effectue dans des chambres de culture appelées chambres de Boyden. Celles-ci sont composées d'inserts constitués d'une membrane poreuse et sont placés dans une plaque de 24 puits (schéma IV.3).

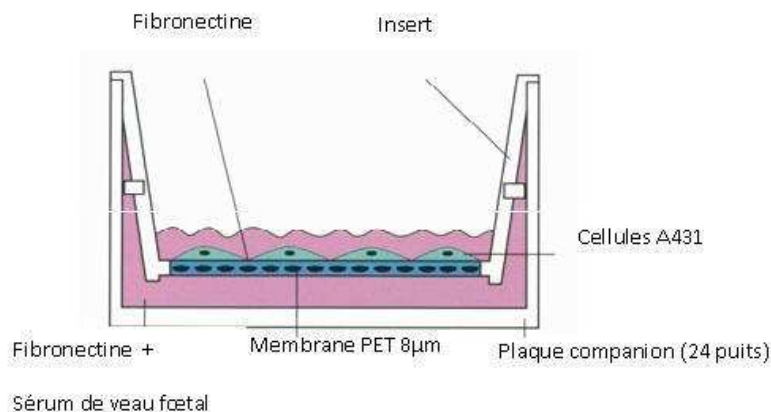


Schéma IV.3 : Chambre de Boyden, seulement un puits est représenté.

Pour la migration, la membrane poreuse est recouverte de fibronectine* et les cellules A431 sont déposées sur cette membrane puis incubées pendant 24 heures. La présence d'une substance stimulante comme le Sérum de veau foetal (SVF) dans la partie inférieure de la chambre de Boyden conduit les cellules A431 à migrer à travers les pores vers la surface inférieure de la membrane. On ajoute alors l'agent alkylant à une certaine concentration dans l'eau. Après 24

heures, les cellules ayant migrées à travers la membrane sont colorées puis dénombrées au microscope.

Le schéma ci-dessous montre qu'en absence d'agent alkylant (schéma IV.4, contrôle), la migration est totale (100 % de migration). Par contre elle diminue significativement de 60 % et de 66 % en présence respectivement de 50 μM et de 100 μM de 3-(2-chloroéthyl)uridine **2**.

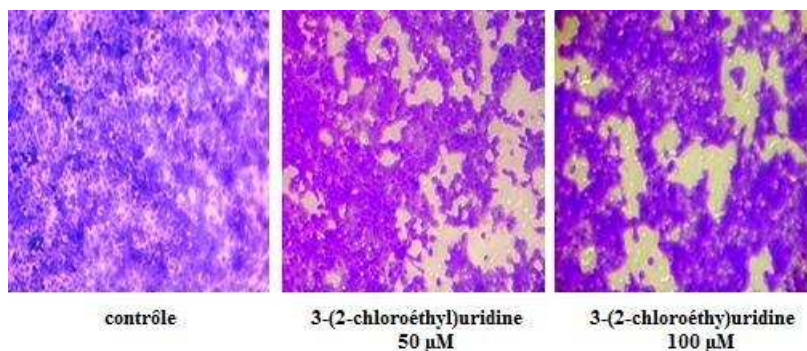


Schéma IV.4: Effets de la 3-chloroéthyluridine sur la migration des cellules A431.

Dans le cas de la N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide **16**, la migration est réduite de 60 % en présence de 50 μM et de 68 % en présence de 100 μM d'agent alkylant (schéma IV.5).

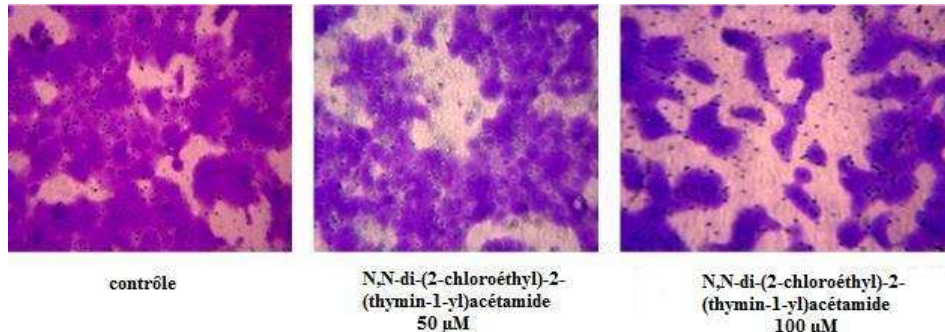


Schéma IV.5: Effets de la N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide sur la migration des cellules A431.

IV.3. EFFETS SUR L'INVASION DES CELLULES A431

Après les tests de migration, nous avons procédé à des tests d'invasion. Dans ce cas, la membrane est recouverte de matrigel*, mime de la matrice extracellulaire. La présence de Sérum de veau fœtal dans la partie inférieure de la chambre de Boyden conduit les cellules tumorales A431 à digérer le matrigel et à traverser la membrane poreuse vers la surface inférieure de celle-ci. Ce test permet de déterminer si les agents alkylants inhibent les cellules tumorales A431 les empêchant ainsi de digérer la matrice.

En absence d'agent alkylant (schéma IV.6, contrôle), l'invasion est de 100 %, les cellules cancéreuses ont digéré le matrigel et traversé la membrane poreuse. En présence de la 3-(2-chloroéthyl)uridine **2**, l'invasion des cellules tumorales A431 a significativement diminué de 19 % et de 34% avec respectivement 50 μ M et 100 μ M d'agent alkylant.

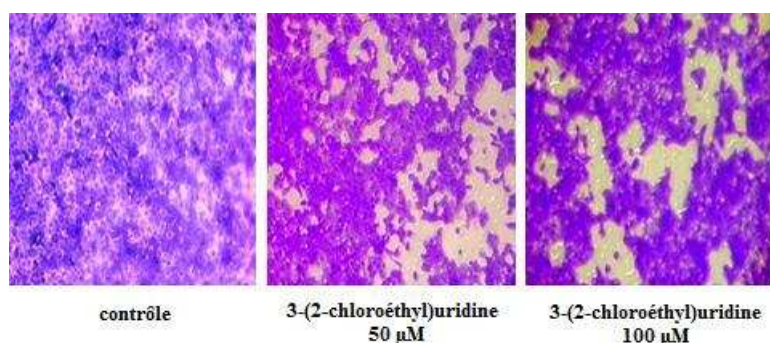


Schéma IV.6 : Effets de la 3-(2-chloroéthyl)uridine sur l'invasion des cellules A431.

De meilleurs résultats sont obtenus dans le cas de la N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide **16**. L'invasion diminue de 63 % en présence de 50 μ M et de 80 % en présence de 100 μ M d'agent alkylant (schéma IV.7).

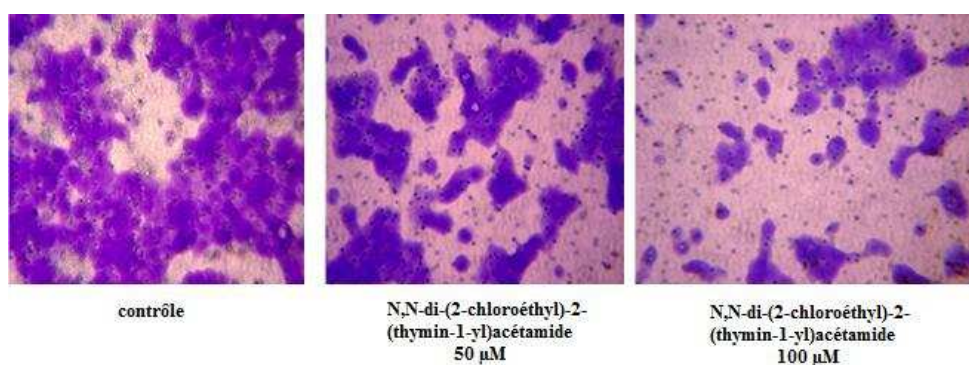


Schéma IV.7: Effets de la N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide sur l'invasion des cellules A431.

IV.4. EFFETS SUR L'EXPRESSION DES METALLOPROTEASES

La migration des cellules a lieu durant la néoangiogénèse et exige une dégradation de la matrice cellulaire par les protéases telles que les matrices métalloprotéases (MMP).⁵¹ Une étude permettant de déterminer quelle métalloprotéase dégrade la matrice a consisté à réaliser une zymographie sur les deux composés les plus intéressants. Nous avons utilisé comme témoins la prométalloprotéase 9, la métalloprotéase 9 et la prométalloprotéase 2 (schéma IV.8).

Dans le cas de la 3-(2-chloroéthyl)uridine **2**, l'analyse quantitative indique qu'en présence de 15 μ M d'agent alkylant, la concentration des ProMMP9, MMP9 et ProMMP2 sécrétées n'est pas significative après 24 ou 48 heures de traitement. Après 72 heures, l'expression des MMP9 est totalement abolie, tandis que l'expression des ProMMP9 diminue de 30 %. L'expression des ProMMP2 n'est pas affectée même après 72 heures.

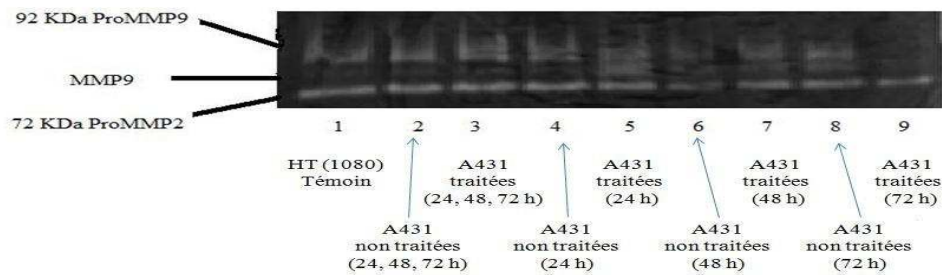


Schéma IV.8: Etude par zymographie des effets de la 3-(2-chloroéthyl)uridine **2** sur l'expression des ProMMP9, MMP9 et ProMMP2 des cellules A431.

⁵¹ B. Heissig, K. Hattori, M. Friedrich, S. Rafii, Z. Werb, *Curr. Opin. Hematol.*, **2003**, 10 (2), 136-141.

Dans le cas de la *N,N*-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide **16**, on observe qu'après 72 heures de traitement avec 4 μ M ou 16 μ M d'agent alkylant, l'expression des ProMMP9, MMP9 et ProMMP2 diminue respectivement de 85 %, 50 % et 25 % (schéma IV.9).

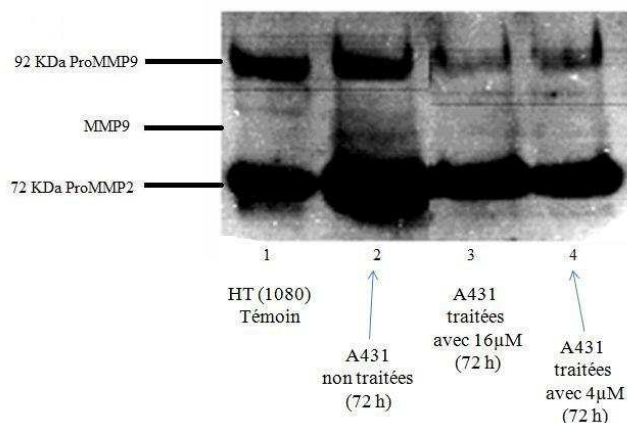


Schéma IV.9 : Etude par zymographie des effets de la *N,N*-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide **16** sur l'expression des ProMMP9, MMP9 et ProMMP2 des cellules A431

IV.5. CONCLUSION

Les effets anti-migration et anti-invasion de la 3-(2-chloroéthyl)uridine **2** et de la *N,N*-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide **16** peuvent donc être expliqués, en partie par l'inhibition de l'expression des MMP9. Ces effets ont été comparés avec les résultats obtenus avec le chlorambucil, composé de référence (tableau IV.1).

Tableau IV.1 : Etude comparative du chlorambucil avec les deux agents alkylés testés.

		<i>Chlorambucil</i>	<i>Composé 2</i>	<i>Composé 16</i>
<i>IC₅₀</i>		<i>15 μM</i>	<i>60 μM</i>	<i>15 μM</i>
<i>Migration</i>	<i>50 μM</i>	<i>95 %</i>	<i>60 %</i>	<i>60 %</i>
	<i>100 μM</i>	<i>95 %</i>	<i>66 %</i>	<i>68 %</i>
<i>Invasion</i>	<i>50 μM</i>	<i>95 %</i>	<i>19 %</i>	<i>63 %</i>
	<i>100 μM</i>	<i>95 %</i>	<i>34 %</i>	<i>80 %</i>

Pour l'effet anti-migration, les résultats obtenus pour les deux composés **2** et **16** sont comparables, néanmoins ils inhibent plus faiblement que le chlorambucil. Pour l'effet anti-invasion le composé **2** présente une faible inhibition alors que le composé **16** donne de meilleurs résultats. A une concentration de 100 μ M, le pourcentage d'inhibition est de 80 % valeur proche du résultat obtenu avec le chlorambucil à cette même concentration.

Ces tests biologiques démontrent que la 3-chloroéthyluridine **2** et la N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide **16** inhibent la prolifération et pourraient jouer un rôle sur la migration et l'invasion des cellules tumorales A431. En effet, les molécules synthétisées semblent diminuer la sécrétion des métalloprotéases en inhibant l'expression génique de ces enzymes.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Au cours de ce travail, nous avons synthétisé de nouveaux agents anticancéreux mono et bifonctionnels à partir de molécules d'origines naturelles (nucléosides et bases).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux agents alkylants synthétisés à partir de nucléosides (thymidine et uridine). Tout d'abord, nous avons optimisé la réaction de fixation de la chaîne chloroéthyle en position 3 des deux nucléosides permettant ainsi d'obtenir des agents alkylants monofonctionnels avec de bon rendement. Parallèlement, nous avons synthétisé deux analogues de dinucléosides chloroalkylés reliés par une chaîne but-2-ène entre les positions 3' et 5' de la thymidine conduisant à des agents alkylants bifonctionnels. Pour ce faire, nous avons utilisé la réaction de métathèse des oléfines. Nous avons également procédé dans le cadre de cette synthèse à la mise au point de la réaction d'allylation de la thymidine protégée en position 5'.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'agents alkylants bifonctionnels à partir de bases naturelles pyrimidiques telles que la thymine et l'uracile. Les premiers analogues synthétisés sont issus de la fixation du groupement bis(β -chloroéthyl)amine, par l'intermédiaire d'une liaison acétamide, sur la fonction ester des bases alkylées en position 1.

Afin d'élargir cette nouvelle famille d'agents alkylants, nous avons étudié la synthèse d'un analogue du chlorambucil en remplaçant le noyau aromatique par la thymine. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la fixation du groupement bis(β -chloroéthyl)amine en position 4 de la thymine alkylée. Face à la complexité de cette modification, plusieurs stratégies ont été étudiées mettant en jeu la fixation de différents groupes nucléofuges en position 4 de la thymine alkylée. Différents nucléophiles ont été utilisés pour réaliser la deuxième étape de cette modification (substitution nucléophile). Le meilleur résultat, néanmoins faible (6 %), a été obtenu en utilisant le groupement triazole comme nucléofuge et la diéthanolamine comme nucléophile. Afin d'améliorer ce résultat, nous avons substitué le groupement triazole par le groupement amino, puis effectué quelques essais d'alkylation du groupement amino par le 1-bromo-2-chloroéthane. Ces essais ont conduit au composé dialkylé avec un rendement de 23 %. La mise au point de cette réaction d'alkylation est actuellement poursuivi afin d'améliorer ce rendement.

*Tout au long de ce travail, nous avons étudié l'influence du mode d'activation, tels que les micro-ondes et les ultrasons sur la sélectivité et le rendement de certaines réactions. Tous les composés ont été caractérisés par différentes méthodes physiques (IR, RMN, spectrométrie de masse). Une évaluation biologique sur certains de ces composés a été menée, dans le cadre d'une collaboration avec le Professeur Kraemer, au Laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université Paris XIII, afin de déterminer l'activité antitumorale de ces composés. Deux composés synthétisés (produits **2** et **16**) ont montré de très bonnes propriétés anticancéreuses. L'activité biologique de certains produits intermédiaires synthétisés sera également évaluée.*

Nous pensons avoir induit une nouvelle classe d'agents alkylants, prometteurs dans la stratégie anticancéreuse. Dans une phase ultérieure, nous nous proposons d'orienter nos recherches sur la fixation de polyamines ou d'agents de véctorisation spécifiques sur les structures présentées dans ce travail.

CHAPITRE V
PARTIE EXPÉRIMENTALE

V. PARTIE EXPÉRIMENTALE

V.1. REACTIFS ET SOLVANTS

L'origine des réactifs et solvants utilisés au cours de ce travail est présentée dans le tableau V.1. Tous ces composés sont utilisés tels quels après avoir contrôlé leur pureté et l'absence d'eau par IR.

Tableau V.1: Réactifs et solvants utilisés.

Réactifs et solvants	CAS [Reg.Num.]	pureté	Origine
acétate d'éthyle	[141-78-6]	99%	SDS
acétone	[67-64-1]	P.A	VWR
acétonitrile	[75-05-08]	99,9%	Aldrich
argon			Air liquide
bis(tricyclohexylphosphine)- dichlororuthénium (IV) benzylidène	[172222-30-9]	/	Aldrich
bromoacétate d'éthyle	[105-36-2]	98%	Aldrich
bromoacétate de <i>tert</i> -butyle	[5292-43-3]	98%	Alfa Aesar
1-bromo-2-chloroéthane	[107-04-0]	98%	Aldrich
bromure d'allyle	[106-95-6]	99%	Aldrich
carbonate de potassium	[584-08-7]	99%	Aldrich
chlorhydrate de bis-(β - chloroéthyl)amine	[821-48-7]	98%	Aldrich
chloroforme	[67-66-3]	99,9%	SDS
chlorure d'ammonium	[12125-02-9]	99,5%	Aldrich
chlorure de mésitylènesulfonyle	[773-64-8]	99%	Aldrich
chlorure de <i>tert</i> - butyldiméthysilyle	[18162-48-6]	97%	Alfa Aesar
chlorure de thionyle	[7719-09-7]	99,5%	Acros

Réactifs et solvants	CAS [Reg.Num.]	pureté	Origine
1,2-dichloroéthane	[107-06-02]	99%	Aldrich
dichlorométhane	[75-09-2]	99,9%	Alfa Aesar
dichlorométhane	[75-09-2]	99,8%	SDS
diéthanolamine	[111-42-2]	99%	Acros
4,4-diméthylaminopyridine	[1122-58-3]	99%	Acros
N,N-diméthylformamide	[68-12-2]	99,8%	Aldrich
éthanol absolu	[64-17-5]	99%	VWR
éther de pétrole 40 à 65°C	[64742-49-0]	/	SDS
fluorure de tétrabutylammonium	[429-41-4]	1M dans THF	Acros
hydrogénocarbonate de sodium	[144-55-8]	99%	Acros
hydrure de sodium	[7646-69-7]	60% dispersion dans l'huile minérale	Aldrich
imidazole	[288-32-4]	99%	Aldrich
méthanol	[67-56-1]	99,99%	Aldrich
nitrate d'argent	[7761-88-8]	99%	Aldrich
<i>para</i> toluène sulfonate de pyridinium	[24057-28-1]	98%	Acros
pyridine	[110-86-1]	99,8%	Aldrich
réactif de Lawesson	[19172-47-5]	97%	Aldrich
solution méthanolique d'ammoniac	[7664-41-7]	7M	Acros
sulfate de magnésium	[7487-88-9]	99%	SDS
tétrahydrofurane	[109-99-9]	99,7%	Alfa Aesar
thymidine	[50-89-5]	99%	Alfa Aesar
thymine	[65-71-4]	99%	Aldrich

Réactifs et solvants	CAS [Reg.Num.]	pureté	Origine
toluène	[108-88-3]	99,8%	SDS
1,2,4-triazole	[288-88-0]	99%	Alfa Aesar
Trichlorure de phosphoryle	[10025-87-3]	99%	Aldrich
triéthylamine	[121-44-8]	99,5%	Aldrich
uracile	[66-22-8]	99%	Acros
uridine	[58-96-8]	99%	Acros

V.2. CHROMATOGRAPHIE

V.2.1. Chromatographie sur couche mince analytique

Les plaques de silices (Kieselger 60 F₂₅₄ de 0.2 mm d'épaisseur, Merck) sont employées pour la chromatographie sur couche mince. La révélation des plaques se fait :

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

V.2.2. Chromatographie sur couche mince préparatives

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

V.2.3. Chromatographie sur colonne

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

V.3. ANALYSES

Température de fusion : Les températures de fusion (T_f) sont mesurées sur banc Köfler ;

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

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

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

Spectrométrie de masse : Les spectres de masse par ionisation chimique (IC) et par ionisation par électrospray (ESI) ont été réalisés sur un appareil R10-10 Nermag au Laboratoire de Structure et Fonction de Molécules Bioactives (UMR 7613) de l'Université Paris VI. L'agent ionisant dans le cas de l'ionisation chimique est le gaz ammoniac NH_3 .

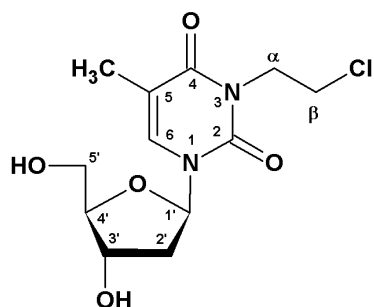
V.4. MATERIEL

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

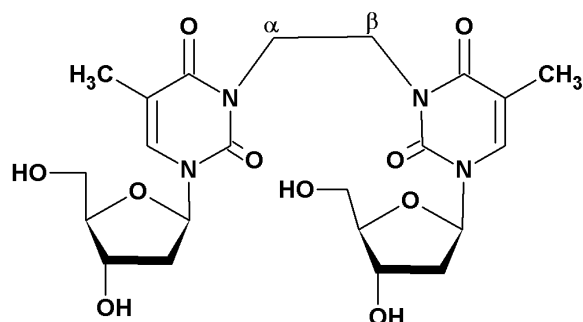
Four micro-onde : Les irradiations micro-onde ont été réalisées au moyen d'un four micro-onde de laboratoire (Milestone, modèle MicroSynth). La durée, la température et la puissance sont ajustées par ordinateur au moyen d'un logiciel de contrôle. La température est évaluée à l'aide d'une sonde.

V.5. SYNTHÈSES

3-(2-chloroéthyl)thymidine 1



1,2-di-(thymidin-3-yl)éthane 1'



Dans un bicol de 25 mL, on introduit 242 mg (1 mmol) de thymidine que l'on dissout dans 8 mL de DMF. On ajoute 691 mg (5 éq., 5 mmol) de carbonate de potassium et 1,7 mL (20 éq., 20 mmol) de 1-bromo-2-chloroéthane. Le milieu réactionnel est mis sous agitation magnétique et activé par irradiation micro-ondes (P=100 W, T=80°C). Au bout de 3 minutes d'activation, l'analyse CCM montre la disparition du produit de départ. Le milieu réactionnel est alors filtré pour éliminer l'excès de K₂CO₃ et évaporé à sec. La purification est effectuée sur plaques préparatives de silice (CH₂Cl₂/EtOH ; 85/15 ; V/V). Le produit **1** est obtenu sous forme d'huile avec un rendement de 90% (274 mg). On récupère également 6% (16 mg) du composé **1'**.

3-(2-chloroéthyl)thymidine (1)

R_f = 0,64 (CH₂Cl₂/EtOH; 80/20; V/V)

RMN¹H, (DMSO, δ): *Thymine*: 7,80 (q, 1H, J=0,7 Hz, H₆), 1,83 (d, 3H, J=0,7 Hz, CH₃); *Sucre*: 6,20 (t, 1H, J=6,7 Hz, H_{1'}), 4,25 (dd, 1H, J=4,4 Hz, J=6,8 Hz, H_{3'}), 3,78 (m, 1H, H_{4'}), 3,61 (dd, 1H, J=3,6 Hz, J=11,9 Hz, H_{5'a}), 3,55 (dd, 1H, J=3,8 Hz, J=11,9 Hz, H_{5'b}), 2,11 (m, 2H, H_{2'}); *Chloroéthyle*: 4,14 (té, 2H, J=6,9 Hz, H_α), 3,74 (té, 2H, J=6,9 Hz, H_β).

RMN¹³C, (DMSO, δ): *Thymine*: 162,45 (C-4), 150,22 (C-2), 135,04 (C-6), 108,36 (C-5), 12,75 (CH₃); *Sucre*: 87,30 (C-4'), 84,71 (C-1'), 70,12 (C-3'), 61,07 (C-5'), 39,48 (C-2'); *Chloroéthyle*, 41,50 (C-α), 40,28 (C-β).

SM : (M+H)⁺ m/z 305 et m/z 307, (M+NH₄)⁺ m/z 322 et m/z 324.

1,2-di-(thymidin-3-yl)éthane (1')

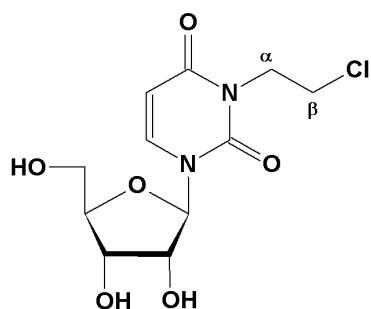
Rf = 0,16 (CH₂Cl₂/EtOH; 80/20; V/V)

RMN¹H, (DMSO, δ): *Thymine*: 7,73 (q, 2H, J=0,5 Hz, H₆), 1,75 (d, 6H, J=0,5 Hz, CH₃); *Sucre*: 6,09 (t, 2H, J=6,8 Hz, H_{1'}), 4,23 (dt, 2H, J=3,5 Hz, J=9,0 Hz, H_{3'}), 3,77 (m, 2H, H_{4'}), 3,62 (dd, 4H, J=3,6 Hz, J=11,9 Hz, H_{5'a}), 3,56 (dd, 4H, J=3,7 Hz, J=11,9 Hz, H_{5'b}), 2,05 (m, 4H, H_{2'}); *Chloroéthyle*: 4,08 (m, 4H, H_α, H_β).

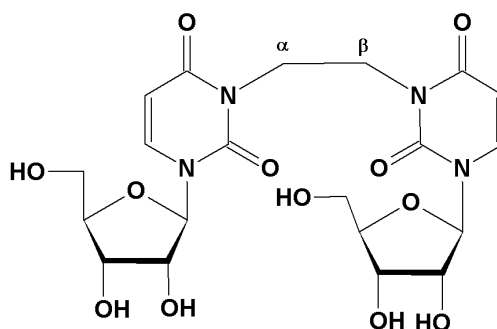
RMN¹³C, (DMSO, δ): *Thymine*: 162,86 (C-4), 150,46 (C-2), 134,49 (C-6), 108,01 (C-5), 12,77 (CH₃); *Sucre*: 87,28 (C-4'), 84,80 (C-1'), 69,92 (C-3'), 60,94 (C-5'), 39,63 (C-2'); *Chloroéthyle*, 40,33 (C-α), 39,83 (C-β).

SM: (M+H)⁺ m/z 511, (M+Na)⁺ m/z 533, (M+K)⁺ m/z 549.

3-(2-chloroéthyl)uridine 2



1,2-di-(uridin-3-yl)éthane 2'



Dans un bicol de 25 mL, on introduit 244 mg (1 mmol) d'uridine que l'on dissout dans 8 mL de DMF. On ajoute 691 mg (5 éq., 5 mmol) de carbonate de potassium et 1,7 mL (20 éq., 20 mmol) de 1-bromo-2-chloroéthane. Le milieu réactionnel est mis sous agitation magnétique et activé par irradiation micro-ondes (P=100 W, T=80°C). Au bout de 3 minutes d'activation, le milieu réactionnel est filtré puis évaporé à sec. La purification est effectuée par chromatographie sur couche mince préparative (CH₂Cl₂/EtOH ; 70/30 ; V/V). Le produit **2** est obtenu sous forme d'huile avec un rendement de 90% (275 mg). On récupère également 5% (13 mg) du composé **2'**.

3-(2-chloroéthyl)uridine (2)

Rf = 0,55 (CH₂Cl₂/EtOH; 80/20; V/V) ;

RMN¹H, (CD₃OD, δ): *Thymine*: 8,05 (d, 1H, J=8,2 Hz, H₆), 5,77 (d, 1H, J=8,2 Hz, H₅); *Sucre*: 5,91 (d, 1H, J=5,1 Hz, H_{1'}), 4,16 (t, 1H, J=5,1 Hz, H_{2'}), 4,15 (t, 1H, J=5,1 Hz, H_{3'}), 4,01 (dté, 1H, J=2,8 Hz, J=5,1 Hz, H_{4'}), 3,86 (dd, 1H, J=2,8 Hz, J=12,2 Hz, H_{5'a}), 3,74 (dd, 1H, J=2,7 Hz, J=12,2 Hz, H_{5'b}); *Chloroéthyle*: 4,25 (té, 2H, J=6,8 Hz, H_α), 3,72 (té, 2H, J=6,8 Hz, H_β).

SM : (M+H)⁺ m/z 307 et m/z 309, (M+NH₄)⁺ m/z 324 et m/z 326.

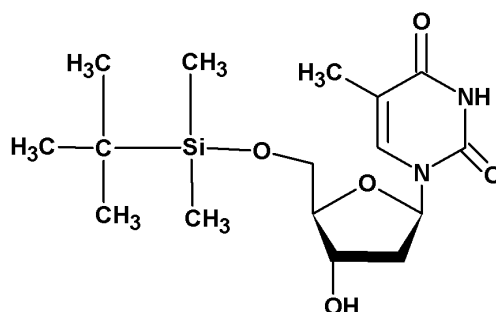
1,2-di-(uridin-3-yl)éthane (2')

Rf = 0,1 (CH₂Cl₂/EtOH; 80/20; V/V)

RMN¹H, (CD₃OD, δ): *Thymine*: 8,00 (d, 2H, J=8,1 Hz, H₆), 5,68 (d, 2H, J=8,1 Hz, H₅); *Sucre*: 5,80 (d, 2H, J=3,4 Hz, H_{1'}), 4,18 (dd, 2H, J=3,4 Hz, J=5,7 Hz, H_{2'}), 4,02 (dd, 2H, J=2,8 Hz, J=5,7 Hz,

H_{3'}), 4,00 (dté, 2H, J=2,8 Hz, J=5,7 Hz, H_{4'}), 3,88 (dd, 4H, J=2,8 Hz, J=12,7 Hz, H_{5'a}), 3,73 (dd, 4H, J=2,7 Hz, J=12,7 Hz, H_{5'b}); *Chloroéthyle*: 4,20 (t, 2H, J=5,5 Hz, H_α), 4,15 (t, 2H, J=5,5 Hz, H_β).
RMN¹³C, (CD₃OD, δ): *Thymine*: 165,54 (C-4), 152,90 (C-2), 141,23 (C-6), 101,75 (C-5); *Sucre*: 92,46 (C-1'), 86,06 (C-4'), 75,9 (C-2'), 70,79 (C-3'), 61,98 (C-5') ; *Chloroéthyle*, 40,04 (C-α), 39,74 (C-β).

5'-O-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine 3



Dans un ballon de 100 mL, on introduit 3.0 g (12,4 mmol) de thymidine, 76 mg (0,05 éq., 0,62 mmol) de DMAP et 30 mL de pyridine anhydre. On place l'ensemble sous atmosphère d'argon. On ajoute 2,056 g (1,1 éq., 13,64 mmol) de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMSCl). On laisse réagir pendant une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors évaporé, la pyridine est azéotropée trois fois au toluène. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (23x4 cm ; gradient d'éluant de CHCl₃/EP ; 90/10 à CHCl₃/EtOH ; 95/5). 4,036 g de produit pur est recueilli sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 91%.

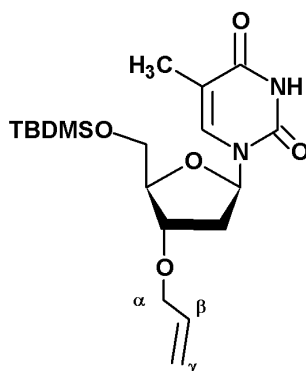
R_f = 0,44 (CHCl₃/EtOH; 90/10; V/V); T_f = 200°C; (litt⁵² 198-200°C); [α]_D²² = +6,957 (c=1.0; CHCl₃)

IR: 3445 (OH), 3186 (NH), 2929 (CH alkyl), 1698 (C=O Thym), 1635 (C=C).

RMN¹H, (CDCl₃, δ): *Thymine*: 8,68 (s, 1H, N-H), 7,50 (q, 1H, J=0,92 Hz, H₆), 1,91 (d, 3H, J=0,92 Hz, CH₃); *Sucre*: 6,36 (dd, 1H, J=5,9 Hz, J=7,9 Hz, H_{1'}), 4,46 (dt, 1H, J=2,4 Hz, J=5,4 Hz, H_{3'}), 4,03 (m, 1H, H_{4'}), 3,89 (dd, 1H, J=2,7 Hz, J=11,3 Hz, H_{5'a}), 3,83 (dd, 1H, J=2,5 Hz, J=11,3 Hz, H_{5'b}), 2,36 (ddd, 1H, J=2,4 Hz, J=5,9 Hz, J=13,6 Hz, H_{2'a}), 2,10 (ddd, 1H, J=5,4 Hz, J=7,9 Hz, J=13,6 Hz, H_{2'b}); *TBDMS*: 0,92 (s, 9H, *tert-but*), 0,11 (s, 6H, Si-CH₃).

⁵² S.Moharram, A.Zhou, L.I.Wiebe, E.E.Knaus, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2004**, 47 (7), 1840-1846.

3'-O-allyl-5'-O-tert-butylidiméthylsilylthymidine 4



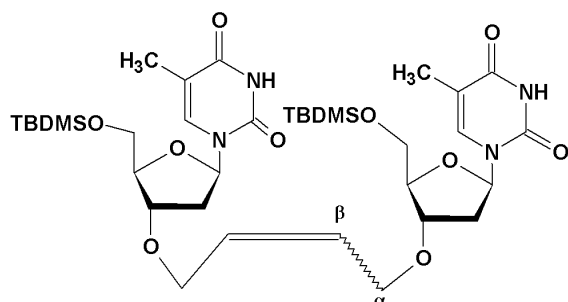
Dans un réacteur, on introduit 2,12 g (5,95 mmol) de produit **3** dans 30 mL de THF anhydre, et 595 mg (14,87 mmol, 2,5 éq.) d'hydrure de sodium en suspension à 60% dans une huile minérale. Le milieu réactionnel est activé par irradiation micro-ondes (200 W, 40°C, 2 min). Au bout de 2 minutes, 1,29 mL (14,87 mmol, 2,5 éq.) de bromure d'allyle sont ajoutés. La réaction est de nouveau activée par irradiation micro-ondes (200 W, 40°C) pendant 6 minutes. On ajoute alors au milieu réactionnel 20 mL d'une solution saturée de NH₄Cl. La phase aqueuse est extraite avec deux fois 60 mL de chloroforme et la phase organique est lavée avec 20 mL d'eau. Celle-ci est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (24x4 cm ; gradient d'éluant CHCl₃/EP ; 90/10 à CHCl₃). 2,33 g de produit pur est recueilli sous forme d'une huile avec un rendement de 99%.

Rf= 0,44 (CHCl₃/EtOH; 95/5; V/V) ; $[\alpha]_D^{22} = +27,77$ (c=3,5 ; CHCl₃)

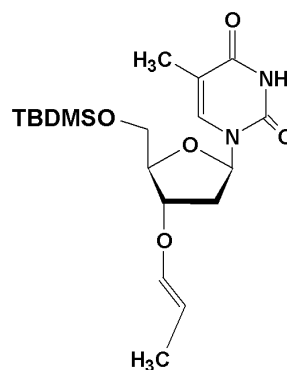
IR: 3158 (NH), 2931 (CH alkyl), 1696 (C=O Thym), 1632 (C=C), 1270 (C-O-C), 992 (C=C allyl).

RMN¹H, (CDCl₃, δ): *Thymine*: 8,76 (s, 1H, N-H), 7,50 (q, 1H, J=1,0 Hz, H₆), 1,91 (d, 3H, J=1,0 Hz, CH₃); *Sucre*: 6,30 (dd, 1H, J=5,6 Hz, J=8,4 Hz, H_{1'}), 4,12 (m, 2H, H_{3'}, H_{4'}), 3,90 (dd, 1H, J=2,4 Hz, J=11,4 Hz, H_{5'a}), 3,78 (dd, 1H, J=2,1 Hz, J=11,4 Hz, H_{5'b}), 2,44 (ddd, 1H, J=1,7 Hz, J=5,6 Hz, J=13,7 Hz, H_{2'a}), 1,95 (ddd, 1H, J=5,6 Hz, J=8,4 Hz, J=13,7 Hz, H_{2'b}); *TBDMS*: 0,92 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,11 (s, 6H, Si-CH₃); *Allyle*: 5,89 (dddd, 1H, J=4,1 Hz, J=4,4 Hz, J=10,6 Hz, J=17,2 Hz, H _{β}), 5,30 (dq, 1H, J=1,5 Hz, J=17,2 Hz, H _{γ}), 5,21 (dq, 1H, J=1,3 Hz, J=10,6 Hz, H _{γ}), 4,04 (ddt, 1H, J=1,5 Hz, J=4,1 Hz, J=12,7 Hz, H _{α}), 3,95 (ddt, 1H, J=1,3 Hz, J=4,4 Hz, J=12,7 Hz, H _{α'}).

1,4-bis(5'-O-tert-butylidiméthylsilylthymidin-3'-yl)but-2-ène 5



3'-O-(prop-1-enyl)-5'-O-tert-butylidiméthylsilylthymidine 4'



Par chauffage classique:

Dans un ballon de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 626 mg (1,58 mmol) de **4** dissous dans 5 mL de dichlorométhane anhydre. 187 mg (0,23 mmol, 29% molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)dichlororuthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 5 mL de dichlorométhane anhydre, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. Le mélange est placé à 35°C sous agitation magnétique. Au bout de 6 jours, plus aucune évolution n'est constatée par CCM. Le milieu réactionnel est alors concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur couche mince préparative (éluant : CH₂Cl₂/EtOH ; 95/5 ; V/V). 227 mg (38%) de produit **5** sous forme d'une huile colorée sont ainsi obtenus avec un mélange d'isomère *E/Z* = 4,5. On récupère également 7% du composé **4'**.

Par activation micro-onde:

Dans un bicol de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 512 mg (1,29 mmol) du composé **4** dissous dans 5 mL de dichlorométhane anhydre. 215 mg (0,26 mol, 41% molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)dichlororuthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 8 mL de dichlorométhane anhydre, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. Le mélange est mis sous agitation magnétique et activé par irradiation micro-onde (P=80 W, T=38°C). Au bout de 5 heures d'activation, plus aucune évolution n'est constatée par CCM. Le milieu réactionnel est alors évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur couche mince préparative (éluant :

CH₂Cl₂/EtOH ; 95/5 ; V/V). 256 mg (53%) de produit **5** sous forme d'une huile colorée sont ainsi obtenus avec un mélange d'isomères *E/Z* toujours égale à 4,5.

1,4-bis(5'-O-tert-butyl-diméthylsilylthymidin-3'-yl)but-2-ène (5)

Rf = 0,35 (CH₂Cl₂/EtOH, 95/5, V/V)

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

RMN¹H, (CDCl₃, δ): **Isomère E**: *Thymine*: 8,45 (s, 2H, N-H), 7,49 (q, 2H, J=1,0 Hz, H₆), 1,89 (d, 6H, J=1,0 Hz, CH₃); *Sucre*: 6,27 (dd, 2H, J=5,5 Hz, J=8,5 Hz, H_{1'}), 4,10 (m, 4H, H_{3'} et H_{4'}), 3,89 (dd, 2H, J=2,4 Hz, J=11,3 Hz, H_{5'a}), 3,78 (dd, 2H, J=2,6 Hz, J=11,3 Hz, H_{5'b}), 2,43 (ddd, 2H, J=1,4 Hz, J=5,5 Hz, J=14,4 Hz, H_{2'a}), 1,96 (ddd, 2H, J=5,6 Hz, J=8,5 Hz, J=14,4 Hz, H_{2'b}); *But-2-ène*: 5,82 (t, 2H, J=2,7 Hz, H_β), 4,04 (m, 4H, H_α); *TBDMS*: 0,92 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,12 (s, 12H, Si-CH₃); **Isomère Z**: *Thymine*: 8,38 (s, 2H, N-H), 7,49 (q, 2H, J=1,0 Hz, H₆), 1,91 (d, 3H, J=1,0 Hz, CH₃); *Sucre*: 6,26 (dd, 2H, J=5,5 Hz, J=8,5 Hz, H_{1'}), 4,10 (m, 4H, H_{3'} et H_{4'}), 3,89 (dd, 2H, J=2,4 Hz, J=11,3 Hz, H_{5'a}), 3,78 (dd, 2H, J=2,6 Hz, J=11,3 Hz, H_{5'b}), 2,43 (ddd, 2H, J=1,4 Hz, J=5,5 Hz, J=14,4 Hz, H_{2'a}), 1,96 (ddd, 2H, J=5,6 Hz, J=8,5 Hz, J=14,4 Hz, H_{2'b}); *But-2-ène*: 5,72 (t, 2H, J=3,8 Hz, H_β), 3,95 (m, 4H, H_α); *TBDMS*: 0,92 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,12 (s, 12H, Si-CH₃).

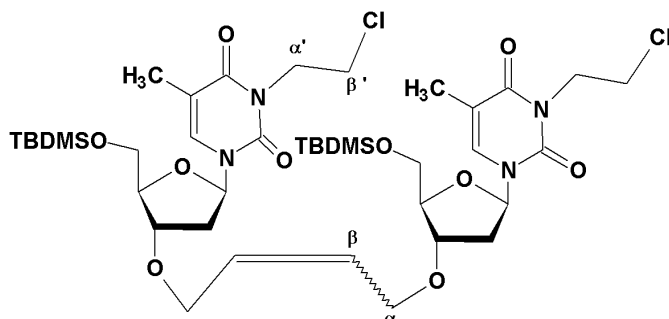
RMN¹³C, (CDCl₃, δ): **Isomère E**: *Thymine*: 163,53 (C-4), 150,13 (C-2), 110,83 (C-5), 135,33 (C-6), 12,53 (CH₃); *Sucre*: 85,06 (C-1'), 85,13 (C-4'), 79,49 (C-3'), 63,68 (C-5'), 37,75 (C-2'); *But-2-ène*: 128,94 (C-β), 69,05 (C-α); *TBDMS*: 25,93 (*tert*-butyle), -5,32 (CH₃); **Isomère Z**: *Thymine*: 163,53 (C-4), 150,13 (C-2), 110,83 (C-5), 135,33 (C-6), 12,53 (CH₃); *Sucre*: 85,06 (C-1'), 85,13 (C-4'), 79,49 (C-3'), 63,68 (C-5'), 37,91 (C-2'); *But-2-ène*: 128,86 (C-β), 65,07 (C-α); *TBDMS*: 25,93 (*tert*-butyle), -5,32 (CH₃).

3'-O-(prop-1-ényl)-5'-O-tert-butyl-diméthylsilylthymidine (4')

RMN¹H, (CDCl₃, δ): **Isomère E**: *Thymine*: 8,50 (s, 1H, N-H), 7,49 (q, 1H, J=1,1 Hz, H₆), 1,92 (d, 3H, J=1,1 Hz, CH₃); *Sucre*: 6,34 (dd, 1H, J=5,4 Hz, J=8,8 Hz, H_{1'}), 4,41 (dt, 1H, J=1,7 Hz, J=5,8 Hz, H_{3'}), 4,16 (m, 1H, H_{4'}), 3,91 (dd, 1H, J=2,2 Hz, J=11,3 Hz, H_{5'a}), 3,90 (dd, 1H, J=2,4 Hz, J=11,3 Hz, H_{5'b}), 2,47 (ddd, 1H, J=1,7 Hz, J=5,4 Hz, J=13,7 Hz, H_{2'a}), 2,00 (ddd, 1H, J=5,8 Hz, J=8,8 Hz, J=13,7 Hz, H_{2'b}); *Prop-1-ényle*: 6,07 (dq, 1H, J=1,5 Hz, J=13,0 Hz, H_α), 4,83 (dq, 1H, J=6,7 Hz, J=13,0 Hz, H_β), 1,56 (dd, 3H, J=1,5 Hz, J=6,7 Hz, CH₃); *TBDMS*: 0,93 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,13 (s, 6H, Si-CH₃); **Isomère Z**: *Thymine*: 8,50 (s, 1H, N-H), 7,49 (q, 1H, J=1,1 Hz, H₆),

1,92 (d, 3H, $J=1,1$ Hz, CH_3); *Sucrose*: 6,30 (dd, 1H, $J=5,4$ Hz, $J=8,8$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 4,39 (dt, 1H, $J=1,7$ Hz, $J=5,8$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 4,16 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3,80 (dd, 1H, $J=1,8$ Hz, $J=11,3$ Hz, $\text{H}_{5'a}$), 3,79 (dd, 1H, $J=2,0$ Hz, $J=11,3$ Hz, $\text{H}_{5'b}$), 2,46 (ddd, 1H, $J=1,7$ Hz, $J=5,4$ Hz, $J=13,7$ Hz, $\text{H}_{2'a}$), 2,01 (ddd, 1H, $J=5,8$ Hz, $J=8,8$ Hz, $J=13,7$ Hz, $\text{H}_{2'b}$); *Prop-1-ène*: 5,89 (dq, 1H, $J=1,6$ Hz, $J=13,1$ Hz, H_α), 4,57 (dq, 1H, $J=6,5$ Hz, $J=13,1$ Hz, H_β), 1,56 (dd, 3H, $J=1,6$ Hz, $J=6,5$ Hz, CH_3); *TBDMS*: 0,92 (s, 9H, *tert*-butyle), 0,12 (s, 6H, Si- CH_3).

1,4-bis[3-(2-chloroéthyl)-5'-O-tert-butylidiméthylsilylthymidin-3'-yl]but-2-ène 6



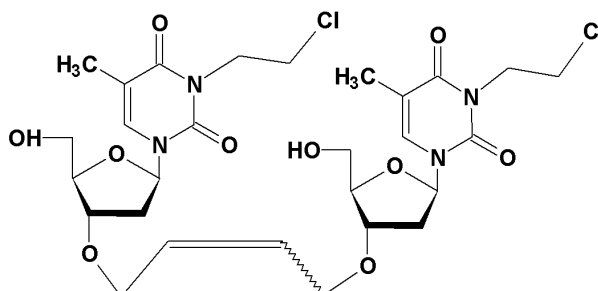
Dans un bicol de 25 mL, on introduit 114 mg (0,15 mmol) du composé **5** que l'on dissout dans 9 mL de DMF anhydre. On ajoute 207 mg (1,5 mmol, 10 éq) de K_2CO_3 suivie d'une injection de 235 μ L (2,98 mmol, 20 éq) de 1,2-dichloroéthane. Le mélange réactionnel est mis sous agitation magnétique et activé par irradiation micro-ondes ($P=150$ W, $T=80^\circ C$). Au bout de 6 minutes, la réaction n'évolue plus. Le mélange réactionnel est alors filtré pour éliminer K_2CO_3 , puis évaporé à sec. Après purification sur gel de silice (15x2 cm, éluant : $CHCl_3$;100%) le produit pur est obtenu avec un rendement de 50 %, soit 67 mg. Le produit **6** est une huile dont le mélange d'isomère E/Z est égal à 7,8

Rf=0,63 ($CH_2Cl_2/EtOH$, 98/2, V/V)

RMN¹H, ($CDCl_3$, δ): **Isomère E**: *Thymine*: 7,50 (q, 2H, $J=0,9$ Hz, H_6), 1,94 (d, 6H, $J=0,9$ Hz, CH_3); *Sucre*: 6,31 (dd, 2H, $J=5,5$ Hz, $J=8,3$ Hz, $H_{1'}$), 4,15-4,10 (m, 4H, $H_{3'}$ et $H_{4'}$), 3,90 (dd, 2H, $J=2,4$ Hz, $J=11,3$ Hz, $H_{5'a}$), 3,79 (dd, 2H, $J=2,2$ Hz, $J=11,3$ Hz, $H_{5'b}$), 2,46 (ddd, 2H, $J=1,4$ Hz, $J=5,5$ Hz, $J=13,8$ Hz, $H_{2'a}$), 1,97 (ddd, 2H, $J=5,5$ Hz, $J=8,3$ Hz, $J=13,8$ Hz, $H_{2'b}$); *But-2-ène*: 5,82 (t, 2H, $J=2,6$ Hz, H_β), 4,05 (m, 4H, H_α); *Chloroéthyle*: 4,31 (t, 4H, $J=6,8$ Hz, $H_{\alpha'}$), 3,71 (t, 4H, $J=6,8$ Hz, $H_{\beta'}$); *TBDMS*: 0,93 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,12 (s, 12H, Si- CH_3); **Isomère Z**: *Thymine*: 7,50 (q, 2H, $J=0,9$ Hz, H_6), 1,96 (d, 6H, $J=0,9$ Hz, CH_3); *Sucre*: 6,31 (dd, 2H, $J=5,5$ Hz, $J=8,3$ Hz, $H_{1'}$), 4,15-4,10 (m, 4H, $H_{3'}$ et $H_{4'}$), 3,90 (dd, 2H, $J=2,4$ Hz, $J=11,3$ Hz, $H_{5'a}$), 3,79 (dd, 2H, $J=2,2$ Hz, $J=11,3$ Hz, $H_{5'b}$), 2,46 (ddd, 2H, $J=1,4$ Hz, $J=5,5$ Hz, $J=13,8$ Hz, $H_{2'a}$), 1,97 (ddd, 2H, $J=5,5$ Hz, $J=8,3$ Hz, $J=13,8$ Hz, $H_{2'b}$); *But-2-ène*: 5,71 (t, 2H, $J=2,6$ Hz, H_β), 3,95 (m, 4H, H_α); *Chloroéthyle*: 4,31 (t, 4H, $J=6,8$ Hz, $H_{\alpha'}$), 3,71 (t, 4H, $J=6,8$ Hz, $H_{\beta'}$); *TBDMS*: 0,93 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,12 (s, 12H, Si- CH_3).

RMN¹³C, (CDCl₃, δ): **Isomère E**: *Thymine*: 163,22 (C-4), 150,73 (C-2), 133,76 (C-6), 110,03 (C-5), 12,53 (CH₃); *Sucre*: 85,77 (C-1'), 85,18 (C-4'), 79,43 (C-3'), 63,64 (C-5'), 37,95 (C-2'); *But-2-ène*: 128,92 (C-β), 69,01 (C-α); *Chloroéthyle*: 42,18 (C-α'), 40,03 (C-β'); *TBDMS*: 25,93 (*tert*-butyle), -5,33 (CH₃), -5,44 (CH₃); **Isomère Z**: *Thymine*: 163,22 (C-4), 150,73 (C-2), 133,76 (C-6), 110,03 (C-5), 12,53 (CH₃); *Sucre*: 85,77 (C-1'), 85,18 (C-4'), 79,49 (C-3'), 63,64 (C-5'), 37,95 (C-2'); *But-2-ène*: 128,79 (C-β), 65,10 (C-α); *Chloroéthyle*: 42,18 (C-α'), 40,03 (C-β'); *TBDMS*: 25,93 (*tert*-butyle), -5,33 (CH₃), -5,44 (CH₃).

1,4-bis[3-(2-chloroéthyl)thymidin-3'-yl]but-2-ène 7



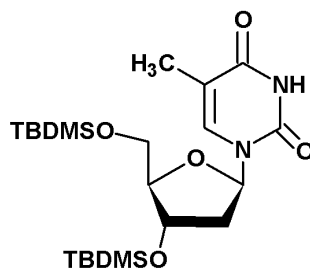
Dans un ballon de 25 mL, on introduit 53,2 mg ($5,99 \cdot 10^{-5}$ mol) du composé **7** que l'on dissout dans 3 mL de THF anhydre. On injecte alors au milieu réactionnel 50 μ L ($1,61 \cdot 10^{-4}$ mol, 2,70 éq.) de TBAF. Le mélange réactionnel est mis sous agitation magnétique et sous atmosphère inerte. Au bout de deux heures de réaction, le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur couche mince préparative (Eluant : $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$, 90/10, V/V). 15 mg de produit pur est recueilli sous forme d'huile jaune avec un rendement de 38%. Le rapport d'isomère E/Z est égal à 8,0.

Rf = 0,44 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$, 90/10, V/V)

RMN¹H, (CDCl_3 , δ): **Isomère E**: *Thymine*: 7,41 (q, 2H, $J=0,9$ Hz, H_6), 1,94 (d, 6H, $J=0,9$ Hz, CH_3); *Sucre*: 6,12 (dd, 2H, $J=6,4$ Hz, $J=7,6$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 4,28-4,25 (m, 2H, H_3'), 4,12-4,09 (m, 2H, H_4'), 3,93 (dd, 2H, $J=2,6$ Hz, $J=11,9$ Hz, $\text{H}_{5'a}$), 3,79 (dd, 2H, $J=2,8$ Hz, $J=11,9$ Hz, $\text{H}_{5'b}$), 2,39 (ddd, 2H, $J=2,8$ Hz, $J=6,4$ Hz, $J=13,6$ Hz, $\text{H}_{2'a}$), 2,33 (ddd, 2H, $J=1,2$ Hz, $J=7,1$ Hz, $J=13,6$ Hz, $\text{H}_{2'b}$); *But-2-ène*: 5,82 (t, 2H, $J=2,8$ Hz, H_β), 4,07 (m, 4H, H_α); *Chloroéthyle*: 4,31 (t, 4H, $J=6,6$ Hz, $\text{H}_{\alpha'}$), 3,71 (t, 4H, $J=6,6$ Hz, $\text{H}_{\beta'}$); **Isomère Z**: *Thymine*: 7,43 (q, 2H, $J=0,9$ Hz, H_6), 1,94 (d, 6H, $J=0,9$ Hz, CH_3); *Sucre*: 6,12 (dd, 2H, $J=6,4$ Hz, $J=7,6$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 4,28-4,25 (m, 2H, H_3'), 4,12-4,09 (m, 2H, H_4'), 3,93 (dd, 2H, $J=2,6$ Hz, $J=11,9$ Hz, $\text{H}_{5'a}$), 3,79 (dd, 2H, $J=2,8$ Hz, $J=11,9$ Hz, $\text{H}_{5'b}$), 2,39 (ddd, 2H, $J=2,8$ Hz, $J=6,4$ Hz, $J=13,6$ Hz, $\text{H}_{2'a}$), 2,33 (ddd, 2H, $J=1,2$ Hz, $J=7,1$ Hz, $J=13,6$ Hz, $\text{H}_{2'b}$); *But-2-ène*: 5,75 (t, 2H, $J=3,9$ Hz, H_β), 3,98 (m, 4H, H_α); *Chloroéthyle*: 4,31 (t, 4H, $J=6,6$ Hz, $\text{H}_{\alpha'}$), 3,71 (t, 4H, $J=6,6$ Hz, $\text{H}_{\beta'}$).

RMN¹³C, (CDCl₃, δ): **Isomère E**: *Thymine*: 163,08 (C-4), 150,86 (C-2), 135,34 (C-6), 110,37 (C-5), 13,25 (CH₃); *Sucre*: 88,12 (C-1'), 85,18 (C-4'), 78,38 (C-3'), 62,74 (C-5'), 37,15 (C-2'); *But-2-ène*: 129,27 (C-β), 69,10 (C-α); *Chloroéthyle*: 42,18 (C-α'), 40,01 (C-β'); **Isomère Z**: *Thymine*: 163,08 (C-4), 150,86 (C-2), 110,37 (C-5), 135,34 (C-6), 13,25 (CH₃); *Sucre*: 88,12 (C-1'), 85,18 (C-4'), 78,38 (C-3'), 62,74 (C-5'), 37,15 (C-2'); *But-2-ène*: 127,00 (C-β), 65,21 (C-α); *Chloroéthyle*: 42,18 (C-α'), 40,01 (C-β').

3'-5'-di-O-tert-butylidiméthylsilylthymidine 8

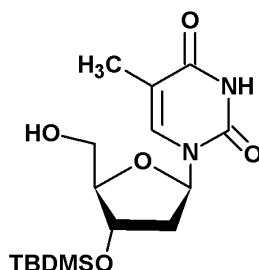


Dans un ballon de 100 mL, on introduit 2 g (8,26 mmol) de thymidine qui sont dissout dans 30 mL d'un mélange DMF/THF, 1/1. On ajoute 2,3 g (4,02 éq.) d'imidazole, 3,1 g (2,22 éq.) de nitrate d'argent et 2,8 g (2,22 éq.) de TBDMSCl. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et atmosphère inerte. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Ep, 98/2, V/V) et est arrêtée au bout d'une nuit. Le mélange réactionnel est alors filtré et repris dans 60mL d'acétate d'éthyle, puis laver deux fois avec 5 mL d'eau, séché sur MgSO₄ et évaporé. La purification sur colonne de silice (20 x 3,5 cm, CHCl₃, 100%) conduit au produit pur avec un rendement de 98% (3,8 g).

Rf = 0,85 (AcOEt/Ep; 98/2; V/V); Tf = 125°C ; $[\alpha]_D^{22} = +11,52$ (c=2; CHCl₃)

RMN¹H, (CDCl₃, δ): *Thymine*: 8,48 (s, 1H, N-H), 7,47 (q, 1H, J=0,8 Hz, H₆), 1,91 (d, 3H, J=0,8 Hz, CH₃); *Sucre*: 6,33 (dd, 1H, J=5,9 Hz, J=7,9 Hz, H_{1'}), 4,40 (dt, 1H, J=2,5 Hz, J=5,9 Hz, H_{3'}), 3,94 (qé, 1H, J=2,5 Hz, H_{4'}), 3,87 (dd, 1H, J=2,5 Hz, J=11,4 Hz, H_{5'a}), 3,76 (dd, 1H, J=2,3 Hz, J=11,4 Hz, H_{5'b}), 2,25 (ddd, 1H, J=2,5 Hz, J=5,9 Hz, J=13,1 Hz, H_{2'a}), 2,00 (ddd, 1H, J=5,9 Hz, J=7,9 Hz, J=13,1 Hz, H_{2'b}); *5'-O-TBDMS*: 0,93 (s, 9H, *tert-butyle*), 0,11 (s, 6H, Si-CH₃), *3'-O-TBDMS*: 0,89 (s, 9H, *tert-butyle*), 0,08 (s, 6H, Si-CH₃).

3'-O-*tert*-butyldiméthylsilylthymidine 9

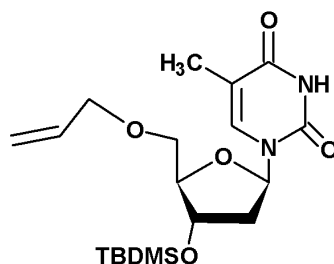


Dans un ballon de 100 mL, on introduit 2,6 g (5,5 mmol) du produit **8** que l'on dissout dans 42 mL de méthanol anhydre et on ajoute 5,5 g (4 éq.) de PPTS (*para* toluène sulfonate de pyridinium). Le milieu réactionnel est mis sous atmosphère d'argon et sous agitation magnétique. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Ep, 98/2, V/V). Celle-ci est terminée au bout de 20 heures, le mélange réactionnel est alors concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans 20 mL d'acétate d'éthyle et lavé trois fois avec 2 mL d'eau. Après contrôle du pH, on récupère la phase organique que l'on sèche sur MgSO₄, celle-ci est filtrée et évaporé à sec. Le produit brut est obtenu avec un rendement de 73% (1,4 g). Le produit se présente sous forme d'un solide blanc.

Rf = 0,60 (AcOEt/Ep; 98/2; V/V) ; Tf = 95°C; $[\alpha]_D^{22} = +20,41$ (c=3,2; CHCl₃)

RMN¹H, (CDCl₃, δ): *Thymine*: 8,91 (s, 1H, N-H), 7,37 (q, 1H, J=0,9 Hz, H₆), 1,91 (d, 3H, J=0,9 Hz, CH₃); *Sucre*: 6,14 (t, 1H, J=6,8 Hz, H_{1'}), 4,50 (dt, 1H, J=3,4 Hz, J=6,8 Hz, H_{3'}), 3,92 (m, 1H, H_{4'}), 3,92 (dd, 1H, J=2,4 Hz, J=12,4 Hz, H_{5'a}), 3,75 (dd, 1H, J=3,1 Hz, J=12,4 Hz, H_{5'b}), 2,35 (dt, 1H, J=6,8 Hz, J=13,5 Hz, H_{2'a}), 2,22 (ddd, 1H, J=3,4 Hz, J=6,8 Hz, J=13,5 Hz, H_{2'b}); *TBDMS*: 0,89 (s, 9H, *tert-butyle*), 0,09 (s, 6H, Si-CH₃).

5'-O-allyl-3'-O-tert-butyldiméthylsilylthymidine 10



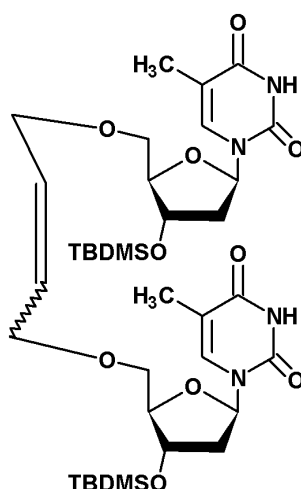
Dans un ballon de 100 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 1,43 g (4 mmol) de produit **9** dans 20 mL de THF anhydre et 400 mg (2,5 éq.) d'hydrure de sodium en suspension à 60% dans une huile minéral. Au bout de 15 minutes de sonication, 0,86 ml (2,5 éq.) de bromure d'allyle sont ajoutés. La réaction est terminée au bout de 6 minutes de sonication. Le mélange réactionnel est versé dans 5 mL d'une solution saturée de chlorure d'ammonium, puis est repris deux fois dans 60 mL de chloroforme et lavé avec 5 mL d'eau puis séché sur MgSO₄, filtré et évaporé. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant CHCl₃, 100%). 1,13 g de produit pur est recueilli sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 71%.

Rf = 0,49 (CHCl₃/EtOH; 95/5; V/V); Tf = 99°C; $[\alpha]_D^{22} = +21,96$ (c=1,6; CHCl₃)

RMN¹H, (CDCl₃, δ): *Thymine*: 8,46 (s, 1H, N-H), 7,65 (q, 1H, J=0,8 Hz, H₆), 1,89 (d, 3H, J=0,8 Hz, CH₃); *Sucre*: 6,33 (t, 1H, J=6,5 Hz, H_{1'}), 4,45 (dt, 1H, J=2,5 Hz, J=6,5 Hz, H_{3'}), 3,98 (qé, 1H, J=2,5 Hz, H_{4'}), 3,76 (dd, 1H, J=2,4 Hz, J=10,7 Hz, H_{5'a}), 3,59 (dd, 1H, J=2,3 Hz, J=10,7 Hz, H_{5'b}), 2,25 (ddd, 1H, J=2,5 Hz, J=6,5 Hz, J=13,3 Hz, H_{2'a}), 2,12 (dt, 1H, J=6,5 Hz, J=13,3 Hz, H_{2'b}); *TBDMS*: 0,89 (s, 9H, *tert-butyle*), 0,08 (s, 6H, Si-CH₃); *Allyle*: 5,92 (ddt, 1H, J=5,3 Hz, J=10,3 Hz, J=17,2 Hz, H_β), 5,30 (dq, 1H, J=1,5 Hz, J=17,2 Hz, H_γ), 5,24 (dq, 1H, J=1,5 Hz, J=10,3 Hz, H_{γ'}), 4,06 (m, 2H, H_α).

RMN¹³C, (CDCl₃, δ): *Thymine*: 163,69 (C-4), 150,24 (C-2), 136,03 (C-6), 110,68 (C-5), 12,56 (CH₃); *Sucre*: 86,47 (C-4'), 85,03 (C-1'), 72,39 (C-5'), 72,03 (C-3'), 41,39 (C-2'); *Allyle*: 134,00 (C-β), 117,56 (C-γ), 69,50 (C-α); *TBDMS*: 25,72 (CH₃-*tert-butyle*), 4,87 (Si-CH₃).

1,4-bis(3'-O-tert-butyltriméthylsilylthymidin-5'-yl)but-2-ène 11



Dans un bicol de 25 mL, sous atmosphère d'argon, on introduit 138 mg (0,17 mmol) de produit **10** dissous dans 4 mL de dichlorométhane anhydre. 51 mg (0,062 mmol, 36% molaire) de bis(tricyclohexylphosphine)dichlororuthénium (IV) benzylidène sont dissous dans 5 mL de dichlorométhane anhydre, et sont ajoutés progressivement au mélange réactionnel. Le mélange est placé sous agitation magnétique et activé par irradiation micro-ondes (p=80 W, T=38°C). La réaction est suivie par CCM (CH₂Cl₂/EtOH, 95/5, V/V). Au bout de 6 heures, la réaction n'évolue plus et le milieu réactionnel est alors évaporé. Le résidu est purifié sur plaques de silice (CH₂Cl₂/EtOH, 95/5, V/V), on obtient 52 mg (39%) de produit sous forme d'une mousse colorée. L'analyse montre la présence de deux isomères avec un rapport *E/Z*=5.

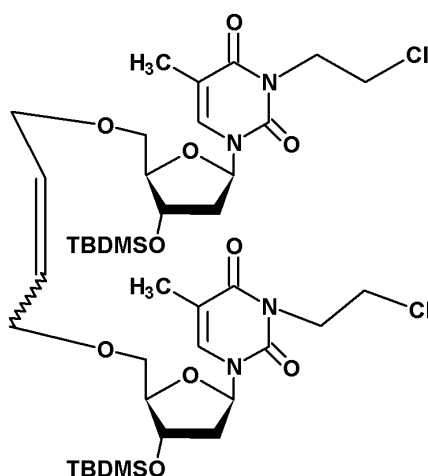
R_f = 0,57 (CH₂Cl₂/EtOH, 95/5, V/V)

RMN¹H, (CDCl₃, δ): **Isomère E**: *Thymine*: 8,22 (s, 2H, N-H), 7,57 (q, 2H, J=1,0 Hz, H₆), 1,88 (d, 6H, J=1,0 Hz, CH₃); *Sucre*: 6,28 (t, 2H, J=6,4 Hz, H_{1'}), 4,42 (dt, 2H, J=3,8 Hz, J=6,2 Hz, H_{3'}), 3,97 (m, 2H, H_{4'}), 3,72 (dd, 2H, J=2,7 Hz, J=10,6 Hz, H_{5'a}), 3,58 (dd, 2H, J=2,6 Hz, J=10,6 Hz, H_{5'b}), 2,26 (ddd, 2H, J=3,8 Hz, J=6,2 Hz, J=13,3 Hz, H_{2'a}), 2,12 (dt, 2H, J=6,2 Hz, J=13,3 Hz, H_{2'b}); *But-2-ène*: 5,83 (t, 2H, J=2,5 Hz, H_β), 4,07 (m, 4H, H_α); *TBDMS*: 0,89 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,08 (s, 12H, Si-CH₃); **Isomère Z**: *Thymine*: 8,22 (s, 2H, N-H), 7,55 (q, 2H, J=0,9 Hz, H₆), 1,90 (d, 6H, J=0,9 Hz, CH₃); *Sucre*: 6,29 (t, 2H, J=6,2 Hz, H_{1'}), 4,42 (dt, 2H, J=3,8 Hz, J=6,2 Hz, H_{3'}), 3,97 (m, 2H, H_{4'}), 3,70 (dd, 2H, J=2,7 Hz, J=10,4 Hz, H_{5'a}), 3,59 (dd, 2H, J=2,6 Hz, J=10,4 Hz, H_{5'b}), 2,26

(ddd, 2H, J=3,8 Hz, J=6,2 Hz, J=13,3 Hz, H_{2'a}), 2,12 (dt, 2H, J=6,2 Hz, J=13,3 Hz, H_{2'b}); *But-2-ène*: 5,76 (t, 2H, J=3,8 Hz, H_β), 4,07 (m, 4H, H_α); *TBDMS*: 0,88 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,07 (s, 12H, Si-CH₃).

RMN¹³C, (CDCl₃, δ): **Isomère E**: *Thymine*: 163,91 (C-4), 150,36 (C-2), 136,24 (C-6), 110,65 (C-5), 12,62 (CH₃); *Sucre*: 87,35 (C-4'), 84,80 (C-1'), 72,51 (C-3'), 72,40 (C-5'), 41,40 (C-2'); *But-2-ène*: 134,96 (C-β), 79,13 (C-α); *TBDMS*: 25,72 (*tert*-butyle), -4,86 (CH₃); **Isomère Z**: *Thymine*: 163,75 (C-4), 150,27 (C-2), 136,12 (C-6), 110,65 (C-5), 12,58 (CH₃); *Sucre*: 87,30 (C-4'), 84,77 (C-1'), 72,45 (C-3'), 72,30 (C-5'), 41,38 (C-2'); *But-2-ène*: 133,12 (C-β), 74,87 (C-α); *TBDMS*: 25,72 (*tert*-butyle), -4,86 (CH₃).

1,4-bis[3-(2-chloroéthyl)-3'-O-tert-butylidiméthylsilylthymidin-5'-yl]but-2-ène 12



Dans un bicol de 25 mL, on introduit 113 mg (0,15 mmol) du composé **11** que l'on dissout dans 9 mL de DMF anhydre. On ajoute 207 mg (1,5 mmol, 10 éq) de K_2CO_3 suivie de 233 μ L (2,96 mmol, 20 éq) de 1,2-dichloroéthane. Le mélange réactionnel est mis sous agitation magnétique et activé par irradiation micro-ondes ($P=150$ W, $T=80^\circ C$). Au bout de 12 minutes, la réaction n'évolue plus. Le mélange réactionnel est alors filtré pour éliminer K_2CO_3 , puis évaporé à sec. Après purification sur plaques de silice ($CHCl_3/EtOH$, 98/2, V/V) le produit pur est obtenu avec un rendement de 52%, soit 28 mg. Le produit **12** est une huile dont le mélange d'isomère *E/Z* est égal à 2,9.

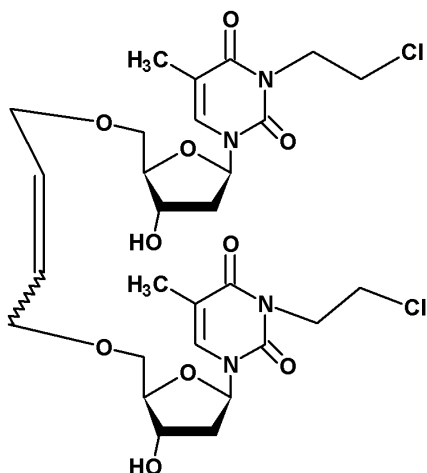
Rf = 0,90 ($CHCl_3/EtOH$, 95/5, V/V)

RMN¹H, ($CDCl_3$, δ): **Isomère E**: *Thymine*: 7,58 (q, 2H, $J=0,9$ Hz, H_6), 1,91 (d, 6H, $J=0,9$ Hz, CH_3); *Sucre*: 6,32 (t, 2H, $J=6,4$ Hz, $H_{1'}$), 4,41 (dt, 2H, $J=3,1$ Hz, $J=7,9$ Hz, $H_{3'}$), 3,99-3,97 (m, 2H, $H_{4'}$), 3,60 (dd, 2H, $J=2,9$ Hz, $J=11,4$ Hz, $H_{5'a}$), 3,57 (dd, 2H, $J=3,1$ Hz, $J=11,4$ Hz, $H_{5'b}$), 2,28 (ddd, 2H, $J=3,1$ Hz, $J=6,4$ Hz, $J=13,3$ Hz, $H_{2'a}$), 2,12 (ddd, 2H, $J=3,1$ Hz, $J=6,4$ Hz, $J=13,3$ Hz, $H_{2'b}$); *But-2-ène*: 5,83 (t, 2H, $J=2,7$ Hz, H_β), 4,07 (m, 4H, H_α); *Chloroéthyle*: 4,31 (t, 4H, $J=6,8$ Hz, $H_{\alpha'}$), 3,72 (t, 4H, $J=6,8$ Hz, $H_{\beta'}$); *TBDMS*: 0,89 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,08 (s, 12H, Si- CH_3); **Isomère Z**: *Thymine*: 7,57 (q, 2H, $J=1,0$ Hz, H_6), 1,92 (d, 6H, $J=1,0$ Hz, CH_3); *Sucre*: 6,32 (t, 2H, $J=6,4$ Hz, $H_{1'}$), 4,41 (dt, 2H, $J=3,1$ Hz, $J=7,9$ Hz, $H_{3'}$), 3,99-3,77 (m, 2H, $H_{4'}$), 3,60 (dd, 2H, $J=2,9$ Hz, $J=11,4$ Hz, $H_{5'a}$), 3,57 (dd, 2H, $J=3,1$ Hz, $J=11,4$ Hz, $H_{5'b}$), 2,28 (ddd, 2H, $J=3,1$ Hz, $J=6,4$ Hz, $J=13,3$ Hz, $H_{2'a}$), 2,12 (ddd,

2H, J=3,1 Hz, J=6,4 Hz, J=13,3 Hz, H_{2'b}); *But-2-ène*: 5,76 (t, 2H, J=3,8 Hz, H_β), 4,14 (m, 4H, H_α); *Chloroéthyle*: 4,31 (t, 4H, J=6,8 Hz, H_{α'}), 3,72 (t, 4H, J=6,8 Hz, H_{β'}); *TBDMS*: 0,89 (s, 18H, *tert*-butyle), 0,08 (s, 12H, Si-CH₃).

RMN¹³C, (CDCl₃, δ): **Isomère E**: *Thymine*: 163,18 (C-4), 150,74 (C-2), 134,30 (C-6), 109,69 (C-5), 13,30 (CH₃); *Sucre*: 86,19 (C-4'), 85,76 (C-1'), 71,78 (C-3'), 69,67 (C-5'), 41,34 (C-2'); *But-2-ène*: 129,14 (C-β), 71,32 (C-α); *Chloroéthyle*: 42,13 (C-α'), 40,07 (C-β'); *TBDMS*: 25,70 (*tert*-butyle), -4,66 (CH₃), -4,86 (CH₃); **Isomère Z**: *Thymine*: 163,18 (C-4), 150,74 (C-2), 134,23 (C-6), 109,80 (C-5), 13,35 (CH₃); *Sucre*: 86,09 (C-4'), 85,68 (C-1'), 71,68 (C-3'), 69,67 (C-5'), 41,30 (C-2'); *But-2-ène*: 129,10 (C-β), 71,22 (C-α); *Chloroéthyle*: 42,13 (C-α'), 40,07 (C-β'); *TBDMS*: 25,70 (*tert*-butyle), -4,66 (CH₃), -4,86 (CH₃).

1,4-bis[3-(2-chloroéthyl)thymidin-5'-yl]but-2-ène 13



Dans un ballon de 25 mL, on introduit 14 mg (0,016 mmol) du composé **12** que l'on dissout dans 3 mL de THF anhydre. On injecte alors dans le milieu réactionnel 13 μ L (0,043 mmol, 2,70 eq.) de TBAF. Le mélange réactionnel est mis sous agitation magnétique et sous atmosphère inerte. Au bout de deux heures de réaction, le milieu est évaporé à sec. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur couche mince préparative (Eluant : $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$, 90/10, V/V). 8 mg de produit pur est recueilli sous forme d'huile jaune avec un rendement de 71%. Le rapport d'isomère E/Z est égal à 3,0.

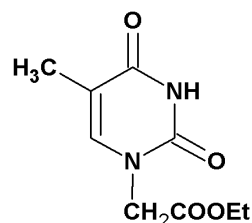
Rf = 0,41 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$, 90/10, V/V)

RMN^1H , (CDCl_3 , δ): **Isomère E**: *Thymine*: 7,59 (q, 2H, $J=0,7$ Hz, H_6), 1,91 (d, 6H, $J=0,7$ Hz, CH_3); *Sucre*: 6,32 (t, 2H, $J=6,3$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 4,48-4,47 (m, 2H, $\text{H}_{3'}$), 4,07 (dté, 2H, $J=3,2$ Hz, $J=6,6$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 3,74 (dd, 2H, $J=3,2$ Hz, $J=10,3$ Hz, $\text{H}_{5'a}$), 3,67 (dd, 2H, $J=3,3$ Hz, $J=10,3$ Hz, $\text{H}_{5'b}$), 2,37 (ddd, 2H, $J=2,1$ Hz, $J=6,3$ Hz, $J=13,5$ Hz, $\text{H}_{2'a}$), 2,21 (ddd, 2H, $J=2,1$ Hz, $J=6,3$ Hz, $J=13,5$ Hz, $\text{H}_{2'b}$); *But-2-ène*: 5,80 (t, 2H, $J=2,8$ Hz, H_β), 4,12-4,08 (m, 4H, H_α); *Chloroéthyle*: 4,30 (t, 4H, $J=6,8$ Hz, $\text{H}_{\alpha'}$), 3,72 (t, 4H, $J=6,8$ Hz, $\text{H}_{\beta'}$); **Isomère Z**: *Thymine*: 7,53 (q, 2H, $J=0,6$ Hz, H_6), 1,92 (d, 6H, $J=0,6$ Hz, CH_3); *Sucre*: 6,34 (t, 2H, $J=6,3$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 4,48-4,47 (m, 2H, $\text{H}_{3'}$), 4,07 (dté, 2H, $J=3,2$ Hz, $J=6,6$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 3,74 (dd, 2H, $J=3,2$ Hz, $J=10,3$ Hz, $\text{H}_{5'a}$), 3,67 (dd, 2H, $J=3,3$ Hz, $J=10,3$ Hz, $\text{H}_{5'b}$), 2,37 (ddd, 2H, $J=2,1$ Hz, $J=6,3$ Hz, $J=13,5$ Hz, $\text{H}_{2'a}$), 2,21 (ddd, 2H, $J=2,1$ Hz, $J=6,3$ Hz, $J=13,5$ Hz, $\text{H}_{2'b}$); *But-*

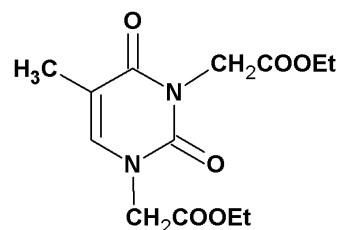
2-ène: 5,76 (t, 2H, J=3,8 Hz, H_β), 4,12-4,08 (m, 4H, H_α); *Chloroéthyle*: 4,30 (t, 4H, J=6,8 Hz, H_{α'}), 3,72 (t, 4H, J=6,8 Hz, H_{β'}).

RMN¹³C, (CDCl₃, δ): **Isomère E**: *Thymine*: 163,44 (C-4), 150,66 (C-2), 134,53 (C-6), 109,93 (C-5), 13,30 (CH₃); *Sucre*: 85,94 (C-1'), 85,61 (C-4'), 71,63 (C-3'), 69,96 (C-5'), 41,07 (C-2'); *But-2-ène*: 129,20 (C-β), 67,09 (C-α); *Chloroéthyle*: 42,15 (C-α'), 40,10 (C-β'); **Isomère Z**: *Thymine*: 163,44 (C-4), 150,74 (C-2), 109,88 (C-5), 134,45 (C-6), 13,36 (CH₃); *Sucre*: 85,85 (C-1'), 85,69 (C-4'), 71,59 (C-3'), 70,07 (C-5'), 41,07 (C-2'); *But-2-ène*: 129,29 (C-β), 67,00 (C-α); *Chloroéthyle*: 42,15 (C-α'), 40,10 (C-β').

1-éthoxycarbonylméthylthymine 14



1,3-di(éthoxycarbonylméthyl)thymine 14'



Dans un bicol de 50 mL, on introduit 756 mg de thymine (6 mmol) dissout dans 20 mL de DMF et mis en présence de 1,1 équivalents d'hydrure de sodium soit 264 mg. Le milieu réactionnel est alors activé par irradiation micro-ondes pendant 3 minutes à 100°C et 300 W. On injecte alors 1,1 équivalents de bromoacétate d'éthyle (750 µL) au milieu réactionnel, le temps d'irradiation micro-ondes est de six minutes (2x3 min, 100 °C, 300 W). Après évaporation et purification par chromatographie sur gel de silice avec un gradient d'éluant d'éther de pétrole/acétone, nous obtenons la 1-éthoxycarbonylméthylthymine **14** (solide blanc) et la 1,3-di(éthoxycarbonylméthyl)thymine **14'** (huile) avec des rendements respectifs de 74% (999 mg) et 10% (178 mg).

1-éthoxycarbonylméthylthymine 14

Rf = 0,21 (EP/Acétone/Toluène, 4/3/4, V/V/V) ; Tf = 166°C ; IR (cm⁻¹): 3100 (N-H), 1720 (C=O, ester), 1700 (C=O, thym), 1670 (C=C).

RMN¹H, (DMSO, δ): 11,30 (s, 1H, N-H), 7,48 (sé, 1H, H₆), 1,76 (sé, 3H, CH₃-thym), 4,45 (s, 2H, CH₂), 4,14 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH₂CH₃), 1,21 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH₂CH₃)

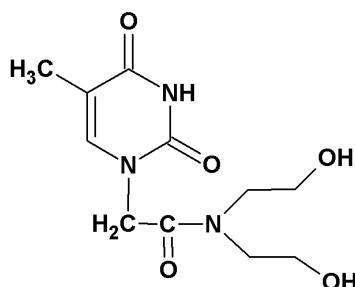
RMN¹³C, (DMSO, δ): 168,07 (C=O), 164,15 (C₄), 150,82 (C₂), 141,43 (C₆), 108,44 (C₅), 60,98 (OCH₂CH₃), 48,30 (CH₂), 13,89 (CH₃ thym), 11,71 (OCH₂CH₃).

1,3-di(éthoxycarbonylméthyl)thymine 14'

Rf = 0,48 (EP/Acétone/Toluène, 4/3/4, V/V/V); IR (cm⁻¹): 1721 (C=O, ester), 1706 (C=O, thym), 1675 (C=C).

RMN¹H, (DMSO, δ): 7,5 (q, 1H, J=1 Hz, H₆), 1,77 (d, 3H, J=1 Hz, CH₃-thym), 6,11 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH₂CH₃), 5,9 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH₂CH₃), 4,65 (s, 2H, CH₂), 4,47 (s, 2H, CH₂), 1,27 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH₂CH₃), 1,23 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH₂CH₃).

N,N-di-(2-hydroxyéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide 15



Dans un ballon de 100 mL, on introduit 1g (4,72 mmol) du composé **14** que l'on dissout dans 30 mL d'éthanol, on ajoute 4,50 mL (47,2 mmol) de diéthanolamine. Le ballon est surmonté d'un réfrigérant, plongé dans un bain d'huile préchauffé à 80°C et mis sous agitation magnétique. La réaction est alors laissée à reflux toute la nuit. Le milieu réactionnel est évaporé puis purifié par chromatographie avec un gradient d'éluant de CH₂Cl₂/EtOH. Le composé **15** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 93% (1,18g).

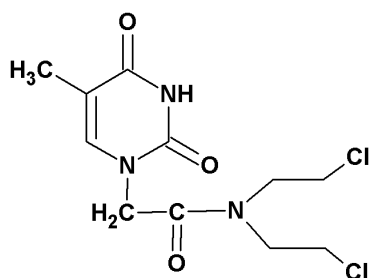
Rf = 0,52 (CHCl₃/EtOH, 50/50, V/V); Tf = 193 °C.

RMN¹H, (CD₃OD, δ): 7,17 (q, 1H, J=1 Hz, H₆), 1,91 (d, 3H, J=1 Hz, CH₃-thym), 4,73 (s, 2H, CH₂), 3,79 (t, 2H, J=5,2 Hz, OCH₂CH₂N), 3,74 (t, 2H, J=5,5 Hz, OCH₂CH₂N), 3,57 (t, 2H, J=5,2 Hz, OCH₂CH₂N), 3,53 (t, 2H, J=5,5 Hz, OCH₂CH₂N).

RMN¹³C, (CD₃OD, δ): 168,8 (CON), 166,1 (C₄), 152,4 (C₂), 142,7 (C₆), 110,8 (C₅), 60,1 (OCH₂CH₂N), 59,9 (OCH₂CH₂N), 51,4 (OCH₂CH₂N), 50,1 (OCH₂CH₂N), 49,3 (CH₂), 12,2 (CH₃ thym).

SM: (M+H)⁺ m/z 272, (M+NH₄)⁺ m/z 289.

N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(thymine-1-yl)acétamide 16



Dans un ballon de 25 mL, on introduit 100 mg (0,37 mmol) de composé **15** que l'on dissout dans 2 mL de chlorure de thionyle. Le milieu réactionnel est mis sous agitation magnétique et à température ambiante pendant cinq heures. Après évaporation, le brut réactionnel est purifié sur plaque de silice en utilisant l'éluant AcOEt/EtOH, 90/10, V/V. Le composé **16** est obtenu sous forme de solide blanc avec un rendement de 66% (75 mg).

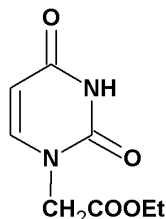
Rf = 0,38 (AcOEt/EtOH, 90/10, V/V) ; Tf = 188 °C.

RMN¹H, (CD₃OD, δ): 7,02 (sé, 1H, H₆), 1,93 (sé, 3H, CH₃-thym), 4,62 (s, 2H, CH₂), 3,85 (t, 2H, J=5,8 Hz, ClCH₂CH₂N), 3,77 (t, 2H, J=5,8 Hz, ClCH₂CH₂N), 3,71 (m, 4H, ClCH₂CH₂N).

RMN¹³C, (CD₃OD, δ): 167,4 (C=O), 164,5 (C₄), 151,2 (C₂), 141,1 (C₆), 110,9 (C₅), 50,3 (ClCH₂CH₂N), 49,2 (ClCH₂CH₂N), 41,5 (ClCH₂CH₂N), 41,2 (ClCH₂CH₂N), 48,2 (CH₂), 12,3 (CH₃ thym).

SM: (M+H)⁺ m/z 308, 310 et 312, (M+NH₄)⁺ m/z 325, 327 et 329.

1-éthoxycarbonyluracile 17



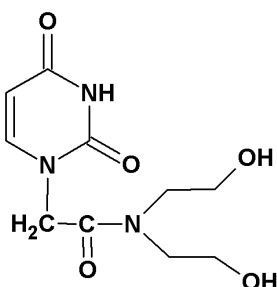
Nous appliquons le mode opératoire décrit pour la synthèse du composé **14**, en faisant réagir cette fois 2 g (17,8 mmol) d'uracile dans 56 mL de DMF. On ajoute 783 mg (19,6 mmol) d'hydrure de sodium, suivie par trois minutes d'activation micro-ondes. On injecte 2,17 mL (19,6 mmol) de bromoacétate d'éthyle, suivie de six minutes d'activation micro-ondes. Après évaporation et purification par chromatographie, on récupère le produit **17**, solide blanc, avec un rendement de 68% (2,2 g).

Rf = 0,22 (EP/Acétone/Toluène, 4/3/4, V/V/V) ; Tf = 139 °C ; IR (cm⁻¹): 3100 (N-H), 1720 (C=O, ester), 1700 (C=O, thym), 1670 (C=C).

RMN¹H, (DMSO, δ): 11,39 (s, 1H, N-H), 7,62 (d, 1H, J=7,9Hz, H₆), 5,61 (d, 1H, J=7,9Hz H₅), 4,51 (s, 2H, CH₂), 4,15 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH₂CH₃), 1,21 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH₂CH₃).

RMN¹³C, (DMSO, δ): 168,16 (C=O), 163,75 (C₄), 150,96 (C₂), 145,89 (C₆), 101,08 (C₅), 61,20 (OCH₂CH₃), 48,61 (CH₂), 14,02 (OCH₂CH₃).

N,N-di-(2-hydroxyéthyl)-2-(uracil-1-yl)acétamide **18**



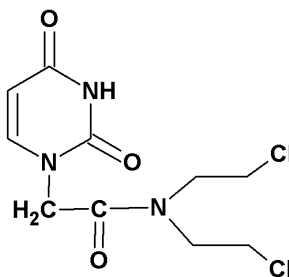
Le composé **18** est obtenu selon le même mode opératoire utilisé pour la synthèse du composé **15**. A partir de 450 mg (2,3 mmol) de composé **17**, 15 mL d'éthanol et 2,2 mL (2,27 mmol) de diéthanolamine. Le composé **18** est obtenu après purification sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 94% (550 mg).

R_f = 0,25 (CHCl₃/EtOH, 50/50, V/V); T_f = 142 °C

RMN¹H, (DMSO, δ): 11,36 (s, 1H, N-H), 7,43 (d, 1H, J=7,8 Hz, H₆), 5,55 (d, 1H, J=7,8 Hz, H₅), 4,66 (s, 2H, CH₂), 3,58 (t, 2H, J=5,5 Hz, OCH₂CH₂N), 3,47 (t, 2H, J=6,1 Hz, OCH₂CH₂N), 3,44 (t, 2H, J=5,5 Hz, OCH₂CH₂N), 3,35 (t, 2H, J=6,1 Hz, OCH₂CH₂N).

RMN¹³C, (DMSO, δ): 166,76 (C=O), 163,79 (C₄), 150,98 (C₂), 146,58 (C₆), 100,35 (C₅), 60,25 (OCH₂CH₂N), 58,75 (OCH₂CH₂N), 51,52 (OCH₂CH₂N), 49,63 (OCH₂CH₂N), 48,48 (CH₂).

N,N-di-(2-chloroéthyl)-2-(uracil-1-yl)acétamide **19**



Le composé **18** est obtenu en appliquant le mode opératoire décrit pour la synthèse du composé **16**. On fait régir 132 mg (0,51 mmol) de composé **17** dans 2,6 mL de chlorure de thionyle. Le composé **19** est obtenu après purification sous forme de solide blanc avec un rendement de 64% (96 mg).

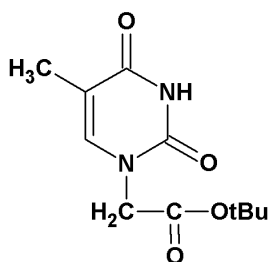
Rf = 0,35 (AcOEt/EtOH, 90/10, V/V) ; Tf = 183 °C

RMN¹H, (DMSO, δ): 11,40 (s, 1H, N-H), 7,02 (d, 1H, J=7,8 Hz, H₆), 5,63 (d, 1H, J=7,8 Hz, H₅), 4,64 (s, 2H, CH₂), 4,42 (t, 2H, J=5,1 Hz, ClCH₂CH₂N), 3,96 (t, 2H, J=6,2 Hz, ClCH₂CH₂N), 3,35 (7, 2H, J= 6,2 Hz, ClCH₂CH₂N), 3,29 (t, 2H, J=5,1 Hz, ClCH₂CH₂N).

RMN¹³C, (DMSO, δ): 159,1 (C=O), 154,8 (C₄), 142,0 (C₂), 137,5 (C₆), 92,2 (C₅), 51,2 (ClCH₂CH₂N), 39,4 (CH₂), 39,1 (ClCH₂CH₂N), 38,5 (ClCH₂CH₂N), 31,7 (ClCH₂CH₂N).

SM: (M+H)⁺ m/z 294, 296 et 298, (M+Na⁺) m/z 316, 318 et 320.

1-tert-butoxycarbonylméthylthymine 24



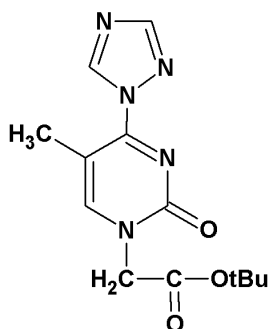
Le composé **24** est synthétisé par activation micro-ondes, selon le mode opératoire utilisé pour la préparation du composé **14** en utilisant le bromoacétate de *tert*-butyle à partir de 23,8 mmol de thymine. Après purification sur colonne de silice, on recueille 4,28 g de composé **24** (75 %) sous forme d'un solide blanc.

Rf = 0,2 (EP/Acétone/Toluène, 4/3/4, V/V/V) ; Tf = 193 °C

RMN¹H, (DMSO, δ): voir tableau III.5.

RMN¹³C, (DMSO, δ): voir tableau III.5.

1-(tert-butoxycarbonylméthyl)-4-(1,2,4-triazolyl)thymine 25



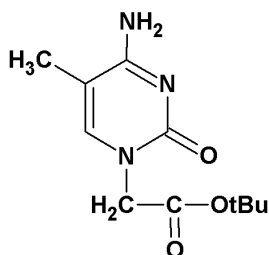
Dans un bicol de 100 mL, on introduit 2,760 g de triazole (9,6 éq.), 780 μ L de POCl_3 (2 éq.) et 50 mL d'acétonitrile. On place le ballon sous agitation magnétique à 0°C et on ajoute goutte à goutte, à l'aide d'une ampoule de coulée, 5,40 mL de triéthylamine (9,2 éq.). 1,00 g du produit **24** sont alors rajoutés à température ambiante. On suit l'évolution de la réaction par CCM dans l'éluant $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$, 90/10, V/V. Après 3 heures de réaction, on ajoute au brut réactionnel 3,5 mL de triéthylamine et 2 mL d'eau, au bout de 10 minutes le mélange est évaporé à sec. Le brut réactionnel est placé dans une ampoule à décanter avec 10 mL d'une solution basique saturée de NaHCO_3 et 50 mL de chloroforme, on récupère la phase organique et on extrait la phase aqueuse avec 50 mL de chloroforme. Les deux phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO_4 . Après filtration et évaporation du solvant, on récupère le composé **25** avec un rendement quasi-quantitatif. Le composé **25** se présente sous forme d'huile jaune.

Rf = 0,54 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$, 90/10, V/V)

RMN¹H, (DMSO, δ): voir tableau III.6.

RMN¹³C, (DMSO, δ): voir tableau III.6.

1-(tert-butoxycarbonylméthyl)-4-(amino)thymine 27



Dans un ballon de 50 mL, on introduit 309 mg de composé **25** que l'on dissout dans 10 mL d'une solution d'ammoniac 7 molaire dans le méthanol. Le ballon est mis sous agitation magnétique et plongé dans un bain d'huile préchauffé à 45°C. La réaction est suivie par CCM dans l'éluant CHCl₃/EtOH, 50/50, V/V. Après 4 heures de réaction, le brut réactionnel est évaporé à sec. Le composé **27** est obtenu, après purification sur colonne de silice, avec un rendement de 58 % soit 147,3 mg.

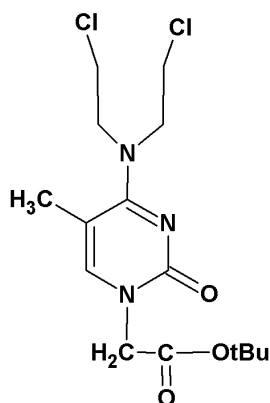
Rf = 0,67 (CHCl₃/EtOH, 50/50, V/V.) ; Tf = 216°C

RMN¹H, (DMSO, δ): 8,28 (s, 2H, NH₂), 7,38 (sé, 1H, H₆), 4,29 (s, 2H, N-CH₂-COO), 1,81 (sé, 3H, CH₃ thy), 1,41 (s, 9H, tBu).

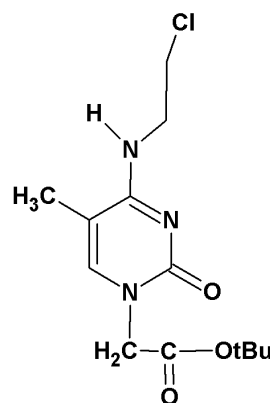
RMN¹³C, (DMSO, δ): 167,8 (N-CH₂-COO), 165,9 (C₄), 155,7 (C₂), 143,6 (C₆), 100,3 (C₅), 81,0 (C-(CH₃)₃), 50,1 (N-CH₂-COO), 27,6 (C-(CH₃)₃), 12,8 (CH₃ thy).

SM: (M+Na⁺) m/z 262.

1-(tert-butoxycarbonylméthyl)-4-[N,N-di-(2-chloroéthyl)amino]thymine 28



1-(tert-butoxycarbonylméthyl)-4-(2-chloroéthyl)amino]thymine 28'



Dans un ballon de 25 mL, on introduit 55,7 mg de composé **27** que l'on dissout dans 5 ml de DMF. On ajoute 160 mg soit 5 équivalents de K_2CO_3 et on injecte 96 μL soit 5 équivalent de 1-bromo-2-chloroéthane. Le ballon est mis sous agitation magnétique et est plongé dans un bain d'huile préchauffé à 80°C. La réaction est suivie par CCM dans l'éluant $CHCl_3/EtOH$, 80/20, V/V. Après cinq jours de réaction, le milieu réactionnel est évaporé à sec et purifié par chromatographie sur couche mince préparative (éluant : $CHCl_3/EtOH$, 80/20, V/V). On récupère 20 mg soit 23 % de produit dialkylé **28** et 7 mg soit 12 % de produit monoalkylé **28'**. Les deux produits se présentent sous un aspect huileux.

1-(tert-butoxycarbonylméthyl)-4-(N,N-di-(2-chloroéthyl)amino)thymine 28

Rf =0,73 ($CHCl_3/EtOH$, 80/20, V/V)

RMN¹H, (DMSO, δ): voir tableau III.8.

SM : (M+H)⁺ m/z 364, 366 et 368, (M+Na⁺) m/z 386, 388 et 390.

1-(tert-butoxycarbonylméthyl)-4-(2-chloroéthyl)amino]thymine 28'

Rf =0,40 ($CHCl_3/EtOH$, 80/20, V/V)

RMN¹H, (DMSO, δ): voir tableau III.8.

SM : (M+H)⁺ m/z 302 et 304, (M+Na⁺) m/z 324 et 326.

V.6. EVALUATIONS BIOLOGIQUES – MATERIELS ET METHODES

V.6.1. Matériels chimiques

Nous avons étudiés les effets biologiques de six molécules synthétisées, les composés **1, 2, 7, 13, 16, 19**. Les solutions mères sont préparées extemporanément*. Les molécules sont dissoutes dans de l'eau distillée à une concentration de 10 mM (pH 7,4). Pour des raisons de solubilité, le chlorambucil, qui servira de référence, est préparé dans l'éthanol à une concentration de 10 mM. L'éthanol n'ayant pas d'effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses.

V.6.2. Matériels biologiques

V.6.2.1. Lignée cellulaire

Les études ont été menées sur des cellules de la lignée tumorale A431 provenant de l'ATCC (American Type Collection Culture). Cette lignée d'un carcinome épidermoïde vulvaire humain se caractérise par une morphologie de cellules épithéliales et un grand nombre de récepteurs à l'EGF.⁴⁸ Par ailleurs, ces cellules sécrètent une quantité importante de VEGF, favorisant l'angiogenèse.⁴⁹

V.6.2.2. Culture cellulaire

La lignée cellulaire est cultivée dans un milieu de culture DMEM (4500mg/mL de glucose, pyruvate de sodium et glutaMAX), enrichi de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et contenant un mélange d'antibiotiques (50UI/mL de pénicilline, 50µg/mL de streptomycine) (Invitrogen). Les cellules sontensemencées dans des T75 (Falcon) à raison de $5 \cdot 10^5$ à 10^6 cellules/10mL de milieu de culture et maintenues en culture dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ en atmosphère humide. A confluence, les cellules sont rincées avec une solution saline de phosphate tamponnée (PBS ; Gibco) puis détachées par une solution de trypsine-EDTA (0,025% de trypsine, 0,01% d'EDTA ; Invitrogen) et ré-ensemencées au 1/10^{ème} de la confluence dans de nouvelles boîtes de culture. Chaque trypsination correspond à un passage numéroté.

V.6.3. Étude in-vitro

V.6.3.1. Étude de la viabilité cellulaire

a. Tests MTT

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

i) Principe du test MTT

Les sels de tétrazolium, comme le MTT, peuvent être réduits en milieu alcalin et donner un composé coloré : le bleu de formazan. Les mitochondries sont capables de réaliser cette réduction grâce à leurs déshydrogénases membranaires. Ainsi, le nombre de mitochondries fonctionnelles, proportionnel au nombre de cellules vivantes, peut être quantifié en fonction de l'intensité de la coloration.

ii) Étude des effets de doses et du temps

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de 96 puits (Falcon) à raison de 5.10^3 cellules/100 μ L dans du milieu complet (10% de SVF). Après 24h de culture, le milieu est enlevé et remplacé par du milieu à 2% de SVF contenant des concentrations croissantes de produits (15 μ M, 30 μ M, 60 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 500 μ M, et 1mM). Après 72h de traitement, les cellules sont rincées au PBS puis incubées avec 100 μ L de MTT (0,2mg/mL de PBS) pendant 4h à 37°C et 5% de CO₂. Le MTT, réduit en bleu de formazan, est solubilisé par l'addition de 100 μ L/puits de DMSO (diméthylsulfoxyde ; Sigma-Aldrich). La densité optique (DO) est mesurée à 595nm grâce à un lecteur de plaque Labsystem Multiskan MS. Le pourcentage de viabilité cellulaire (%V) est déterminé selon la formule suivante :

$$\%V = \left[\frac{DO_{\text{cellule traitées}}}{\text{Moy}(DO_{\text{cellules non traitées}})} \right] \cdot 100$$

V.6.4. Étude de la migration et de l'invasion cellulaires

Nous avons étudié les effets de certains produits synthétisés et celui du chlorambucil sur la migration et l'invasion des cellules A431. Pour cela, nous avons utilisé des chambres de cultures (ou chambre de migration) appelées chambres de Boyden (Becton Dickinson). Ces chambres sont composées d'inserts constitués d'une membrane poreuse (membrane de 0,3 cm², pores de 8 μ m), placés dans des plaques de 24 puits (plaques companions ; Falcon ; Becton Dickinson).

V.6.4.1. Préparation des inserts pour la migration

Pour l'étude de la migration cellulaire, l'intérieur des inserts (déposés dans les puits de plaque companion) est recouvert de 100µl de fibronectine (à 100µg/mL dans du PBS) par inserts. Après une nuit à 4°C, l'excédent de fibronectine est enlevé, les membranes sont rincées deux fois au PBS puis saturées 1 heure avec 1% de BSA (Albumine bovine ; Sigma-Aldrich). Le milieu avec 1% BSA est enlevé.

V.6.4.2. Préparation des inserts pour l'invasion

Pour l'étude de l'invasion cellulaire, l'intérieur des inserts (déposés dans les puits de la plaque companion) est recouvert par 100µL de matrigel (à 10mg/mL dans du PBS ; Becton Dickinson). La plaque de culture est alors placée dans l'incubateur à 37°C pendant 3 heures, puis sous une hotte à flux laminaire (12 à 24 heures) pour permettre la polymérisation du Matrigel. Les inserts sont stockés à 4°C puis réhydratés 24 heures avant l'expérience avec 500µL de milieu.

V.6.4.3. Préparation des cellules pour la migration

Les cellules A431 sontensemencées dans des T25 à raison de $1,7 \cdot 10^6$ à $2 \cdot 10^6$ cellules/5mL/T25 dans du milieu de culture à 10% de SVF. Après 24h, les cellules sont rincées au PBS puis traitées par 50 ou 100µM de produits testés (dilution dans du milieu 10% SVF). Après les traitements par les différentes molécules, les cellules sont rincées au PBS, détachées à la trypsine, puis comptées. Les cellules sont alors diluées dans du milieu dépourvu de sérum mais additionné de 0,1% de BSA.

V.6.4.4. Préparation des cellules pour l'invasion

Les cellules ne sont pas pré traitées, mais sont mises en même temps que les produits testés à 50 ou 100µM dans les inserts.

V.6.4.5. Migration cellulaire

Les cellules prétraitées et non traitées (témoins) sont déposées dans les inserts recouverts de fibronectine à raison de $10 \cdot 10^4$ cellules/500 µL/insert dans du milieu à 0,1% de BSA. Du milieu à 10% de SVF est placé comme chémoattractant dans les puits de la plaque companion (500 µL/puits), afin de permettre la formation d'un gradient chimiotactique de part et d'autre de la membrane poreuse (Schéma V.1). Après 24h de migration dans l'incubateur à 37°C, le surnageant est enlevé et les inserts sont rincés au PBS sur chaque face. Les cellules n'ayant pas migré à travers les pores (face interne des inserts) sont éliminées par grattage avec un coton-tige, celles qui ont migré sur la fibronectine (face externe des inserts) sont fixées pendant 10min au méthanol, puis

colorées au cristal violet. Les cellules sont comptées au microscope (Zeiss Axiophot). L'ensemble des cellules est compté 'grossissement x200) et les pourcentages de migration sont déterminés en comparant le nombre de cellules pré-traitées qui ont migré ($N_{\text{traitées}}$) au nombre de cellules non traitées qui ont migré ($N_{\text{non traitées}}$). Ainsi :

$$\% \text{Migration} = (N_{\text{traitées}} / N_{\text{non traitées}}) \cdot 100$$

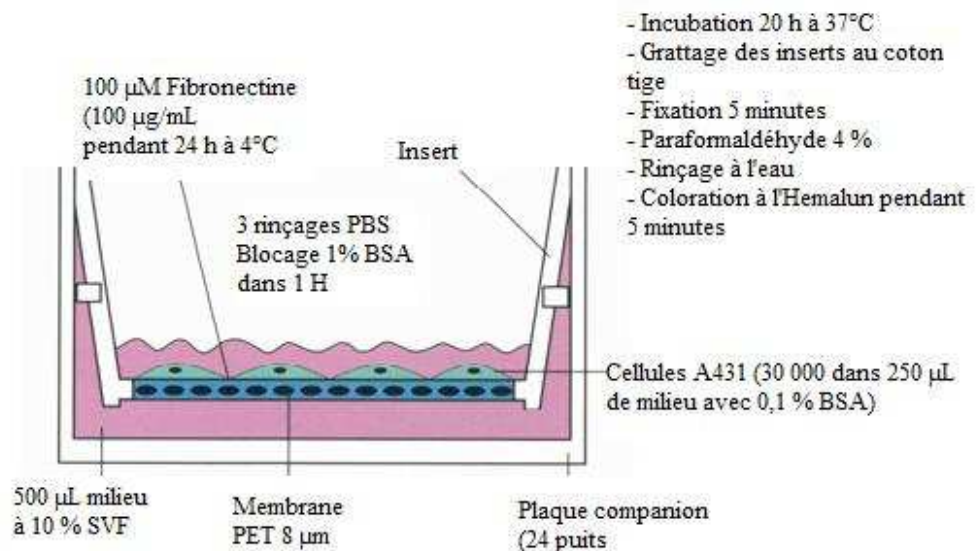


Schéma V.1 : Principe de la migration et de l'invasion cellulaires en chambre de Boyden.

V.6.4.6. Invasion cellulaire

Les cellules non traitées sont déposées dans les inserts recouverts de Matrigel à raison de $10 \cdot 10^4$ cellules/500µl/insert dans du milieu à 0,1% de BSA contenant différentes concentrations de produits testés. Comme précédemment, du milieu à 10% de SVF est placé dans les puits de la plaque companion (500µL/puits). Après 24h d'invasion dans l'incubateur à 37°C, les inserts sont récupérés et les cellules ayant traversées le Matrigel sont lavées, fixées, colorées et comptées comme décrit pour l'étude de la migration. Des pourcentages d'invasion cellulaire sont calculés de la même manière que les pourcentages de migration.

V.6.4.7. Principe de la Zymographie

L'activité gélatinolytique des métalloprotéases 2 et 9 contenues dans les surnageants de culture ainsi que celles de leurs formes zymogènes est étudiée par zymographie. Il s'agit d'une

électrophorèse SDS-PAGE effectuée en conditions non réductrices. Le substrat de la protéase étudiée (gélatine) est copolymérisé avec l'acrylamide.

Les cellules sontensemencées dans des plaques de 6 puits (Falcon) à raison de 50.10^4 cellules/2mL dans du milieu complet (10% de SVF). L'expérience comporte des temps de traitement des cellules de 24h, 48h, et 72h. Après 24h de culture, le milieu est enlevé et remplacé par du milieu sans SVF pour les cellules non traitées, et $15\mu\text{M}$ de produits à tester pour les cellules traitées pour la première plaque. Les autres plaques sont maintenues avec 10% de SVF pendant 24h et 48h supplémentaires. Les surnageants des cellules A431 (sans sérum) sont récoltés toutes les 24 heures de traitement. Les surnageants sont concentrés avec des centricons 1000g pendant 1h30 (Millipore) puis dilués dans un tampon d'échantillon non réducteur SDS 4x, 30 minutes à température ambiante avant le dépôt sur un gel de polyacrylamide 10% co-polymérisés avec 1mg/ml de gélatine (gélatine type B ; Sigma-Aldrich), substrat préférentiel des MMP2 et MMP9. L'électrophorèse débute à 60V pendant 20 minutes puis continue à 160V à 4°C. Après migration, le SDS est éliminé par des lavages successifs dans une solution de Triton sous agitation à température ambiante pour permettre la renaturation des protéines, puis à l'eau distillée. Les gels sont incubés dans un tampon de digestion (50mM Tris-HCl pH 7,4 ; 0,2M NaCl ; 5mM CaCl_2 ; 0,05% Brij 35) contenant les éléments nécessaires à l'activité enzymatique des MMPs durant 19 heures à 37°C. Le gel est enfin coloré pendant 1 heure dans une solution à 30% de méthanol, 10% d'acide acétique et 0,5% de bleu de Coomassie R.250 puis décoloré dans des bains à 30% de méthanol, 10% d'acide acétique ; Les gélatinases sont révélées par une bande claire sur un fond bleu, correspondant à la protéolyse locale de la gélatine dans le gel.

Sur chacun des zymogrammes réalisés, une fraction des surnageants issue de la culture de la lignée HT1080 (fibrosarcome humain ; ATCC) et sécrétant les ProMMP2 et ProMMP9 en quantité importante est déposée en parallèle des échantillons analysés. La quantification des plages de lyse est effectuée par analyse semi-automatique. La surface (μm^2), ainsi que la densité grise des plages de lyse sont mesurées pour chaque dépôt effectué, les activités ProMMP2 sont alors exprimées en teinte gris/ μm^2 . Les activités ainsi mesurées sont ramenées au nombre de cellule déterminées dans chaque puits dont sont issus les échantillons analysés (dosage de protéines). De façon à pouvoir normaliser l'ensemble des valeurs obtenues et effectuer une comparaison des activités mesurées à partir des différents gels, la valeur d'activité mesurée pour la plage de lyse correspond à l'activité ProMMP2 sécrétée par HT1080 est prise pour référence et chacune des valeurs lui est comparée.

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

Activité mitotique : Processus de division cellulaire.

Néoangiogenèse : Phénomène de vascularisation de la tumeur.

Carcinome ou épithélioma : Cancer développé à partir de tissu épithélial (peau, muqueuse).

Extemporément : Préparé et administré directement.

Fibronectines : Constituant de la matrice extracellulaire. Ces Protéines possèdent une fonction importante dans la migration et la différenciation cellulaire.

Matrigel : Glycoprotéines de la matrice extracellulaire.

Métalloprotéases : Enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire.

Oncogène : Gènes impliqués dans la formation des tumeurs.

Propriété leucopéniante : Entraîne une diminution du nombre de globules blancs dans le sang.

Tissus épithéliaux vulvaire : Peau ou muqueuse appartenant à l'ensemble des parties génitales externes chez la femme.

Néovascularisation : Ensemble des vaisseaux sanguins qui nourrissent un organe, un tissu, une tumeur.

Vésicante : Qui fait naître des ampoules sur la peau.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

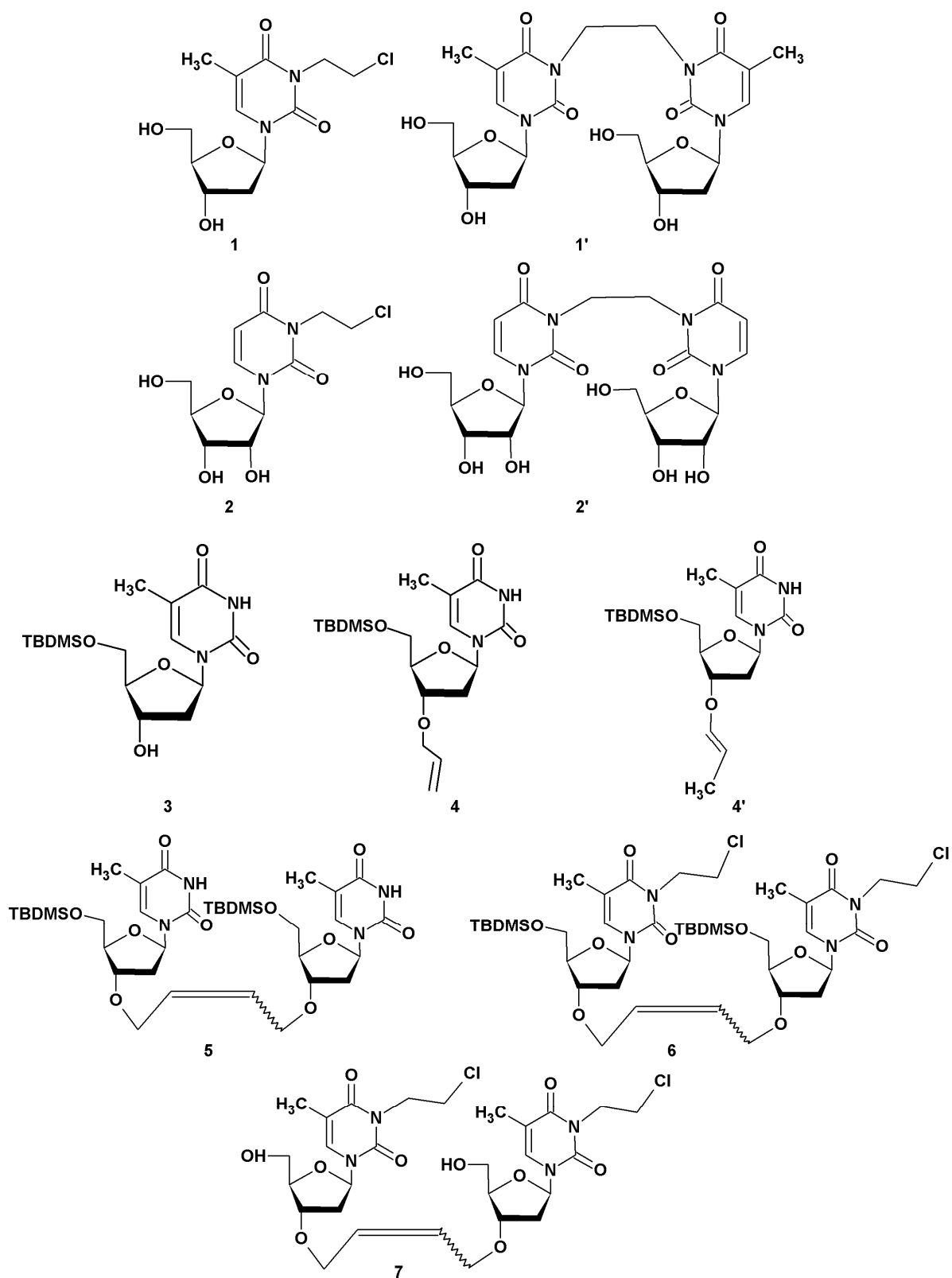
- ¹a) J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **1953**, *171* (4356), 737-738; *id.*, 1953, *171* (4361), 964-967.
b) F. H. C. Crick, J. D. Watson, *Proc. Roy. Soc. (A)*, **1954**, *223* (1152), 80-96.
- ²S. Kirkiacharian, *Guide de la Chimie Thérapeutique*, **1996**, 519-550.
- ³L. P. Graham, *Chimie pharmaceutique*, **2003**, 128-132.
- ⁴J. L. Everett, J. J. Roberts, W. C. Ross, *J. Chem. Soc.*, **1953**, 2386-2392.
- ⁵A. McLean, D. Newell, G. Baker, T. Connors, *Biochem. Pharmacol.*, **1980**, *29* (14), 2039-2047.
- ⁶J. C. Tatlow, M. Markou, P. L. Coe, *J. Fluorine. Chem.*, **1998**, *89* (2), 183-188.
- ⁷J. C. Tatlow, M. Markou, P. L. Coe, *J. Fluorine. Chem.*, **1997**, *84* (2), 113-118.
- ⁸a) F. Staedtler, W. Suter, H-J. Martus, Mutation Research, *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **2004**, *568* (2), 211-220.
b) W. Suter, U. Plappert-Helbig, S. Glowienke, F. Poetter-Locher, F. Staedtler, R. Racine, H-J. Martus, Mutation Research, *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **2004**, *568* (2), 195-209.
c) E. De Clercq, B. Rosenwirth, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **1985**, *28* (2), 246-251.
- ⁹L. Colombeau, K. Teste, A. Hadj-Bouazza, V. Chaleix, R. Zerrouki, M. Kraemer, O. Saint-Catherine, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2008**, *27* (2), 110-120
- ¹⁰V. T. Ravikumar, D. C. Capaldi, W. F. Lima, E. Lesnik, B. Turney, D. L. Cole, *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11* (21), 4673-4679.
- ¹¹a) A. De Mesmaeker, R. Hünner, P. Martin, H. E. Moser, *Acc. Chem. Res.*, **1995**, *28* (9), 366-374.
b) P. M. J. Jung, R. Beaudegnies, A. De Mesmaeker, S. Wendeborn, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44* (2), 293-297.
- ¹²S. Wenderborn, R. M. Wolf, A. De Mesmaeker, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36* (38), 6879-6882.
- ¹³M. Kumar, G. G. Carmichael, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **1998**, *62* (4), 1415-1434.
- ¹⁴S. Buchini, C. J. Leumann, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2003**, *7* (6), 717-726.
- ¹⁵N. Batoux, R. Benhaddou-Zerrouki, P. Bressolier, R. Granet, G. Laumont, A-M. Aubertin, P. Krausz, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42* (8), 1491-1493.
- ¹⁶J. Tomasz, *Nucleosides & Nucleotides*, **1983**, *2* (1), 51-61.
- ¹⁷a) J. L. Hérisson, Y. Chauvin, *Makromol. Chem.*, **1971**, *141*, 161-176. b) J. P. Soufflet, D. Commereuc, Y. Chauvin, *C.R. Acad. Sci. Paris*, **1973**, *276*, 169-171.
- ¹⁸S. T. Nguyen, L. K. Johnson, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114* (10), 3974-3975.
- ¹⁹a) G. C. Bazan, J. H. Oskam, H. N. Cho, L. Y. Park, R. R. Schrock, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *112*, 6899-6907.
b) R. R. Schrock, *Top. Organomet. Chem.*, **1998**, *1*, 1.
- ²⁰S.-B. T. Nguyen, R. H. Grubbs, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 9858-9859.
- ²¹P. Schwab, R. H. Grubbs, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118* (1), 100-108.
- ²²A. Fürstner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39* (7), 1234-1239.
- ²³Pour revue voir: K. C. Nicolaou, P. G. Bugar, D. Sarlah, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 4490-4527.
- ²⁴A. Fürstner, O. R. Thiel, L. Ackermann, H. J. Schanz, S. P. Nolan, *J. Org. Chem.*, **2000**, *65* (7), 2204-2207.
- ²⁵M. Scholl, S. Ding, C. W. Lee, R. H. Grubbs, *Org. Lett.*, **1999**, *1* (6), 953-956.
- ²⁶A. Fürstner, K. Langemann, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61* (12), 3942-3943.
- ²⁷E. L. Dias, S.-B. T. Nguyen, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119* (17), 3887-3897.
- ²⁸M. Ulman, R. H. Grubbs, *Organometallics*, **1998**, *17* (12), 2484-2489.
- ²⁹A. J. Vernall, A. D. Abell, *Aldrimica Acta.*, **2003**, *36* (3), 93-105.
- ³⁰R. Roy, S. K. Das, *Chem. Commun.*, **2000**, (7), 519-529.
- ³¹A. Kirschning, G. W. Chen, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40* (25), 4665-4668.
- ³²A. J. Phillips, A. D. Abell, *Aldrichimica Acta*, **1999**, *32* (3), 75-88.
- ³³M. Smith, D. H. Rammner, D. H. Goldberg, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, *84* (3), 430-440.
- ³⁴a) E. J. Corey, A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94* (17), 6190-6191.
b) S. Hanessian, P. Lavallee, *Can. J. Chem.*, **1975**, *53* (19), 2975-2977.
- ³⁵a) J. C. Wu, Z. Xi, C. Gioeli, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron*, **1991**, *47* (12-13), 2237-2254.
b) M. Montembault, N. Bourgougnon, J. Lebreton, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43* (45), 8091-8094.
- ³⁶K. Teste, L. Colombeau, A. Hadj-Bouazza, R. Lucas, Y. Champavier, R. Zerrouki, P. Krausz, *Carbohydr. Res.*, **2008**, *343* (9), 1490-1495.
- ³⁷a) P. C. Montevecchi, A. Manetto, M. L. Navacchia, C. Chatgililoglu, *Tetrahedron*, **2004**, *60* (19), 4303-4308.
b) G. W. Buchko, F. E. Hruska, K. L. Sadana, *Can. J. Chem.*, **1989**, *67* (1), 109-119.
- ³⁸a) K. K. Ogilvie, *Can. J. Chem.*, **1973**, *51* (22), 3799-3807.
b) J. D. White, M. Kawasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112* (12), 4991-4993.
- ³⁹A. Hadj-Bouazza, K. Teste, L. Colombeau, V. Chaleix, R. Zerrouki, M. Kraemer, O. Sainte-Catherine, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2008**, *27* (5), 439-448.

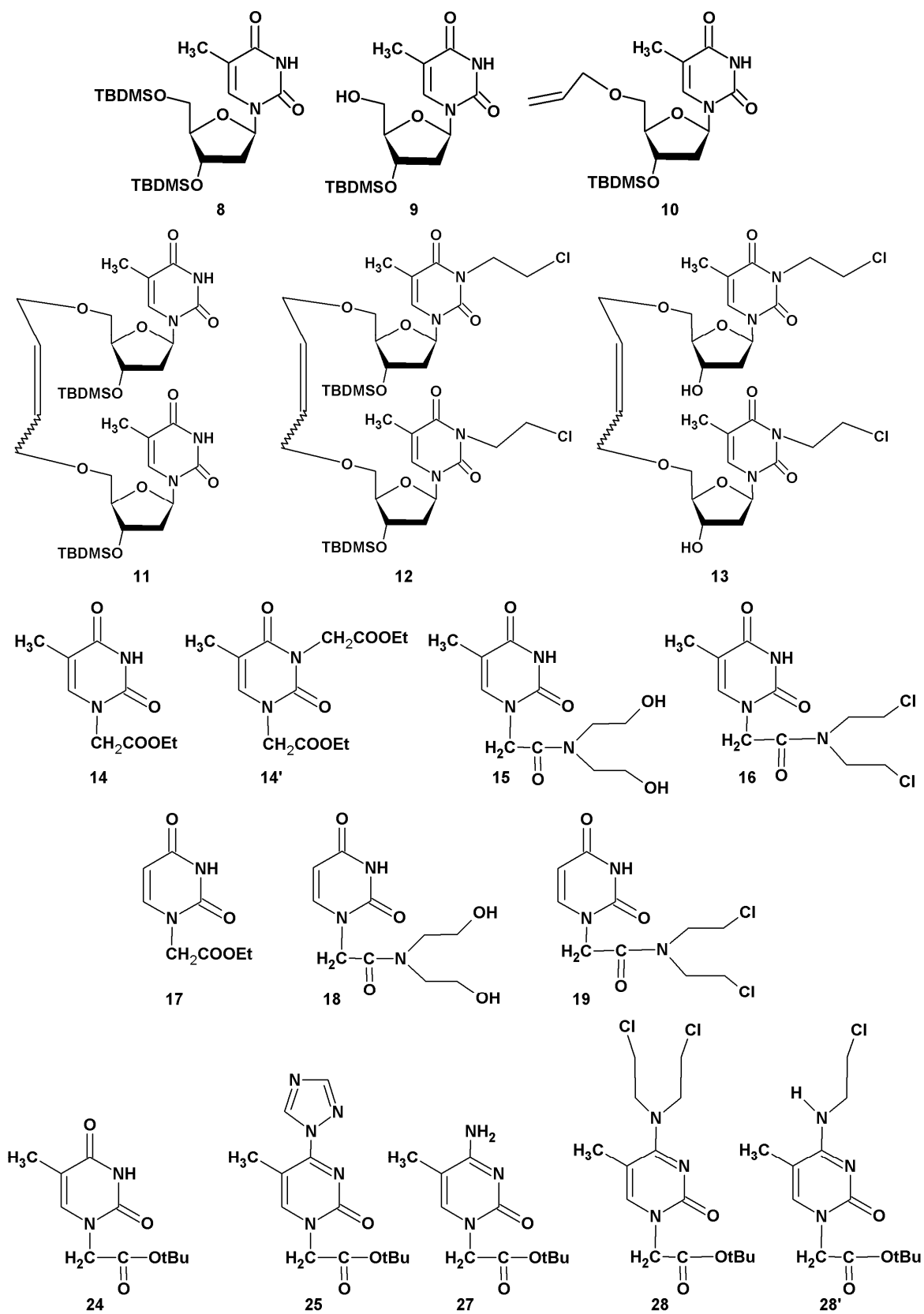
- ⁴⁰D. W. Larden, H. T. Andrew Cheung, *Tetrahedron*, **1999**, 55 (11), 3265-3276.
- ⁴¹E. Grunder-Klotz, G. Just, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acids*, **1994**, 13 (9), 1829-1841.
- ⁴²J. E. Starrett Jr, D. R. Tortolani, D. C. Baker, M. T. Omar, A. K. Hebbler, J. A. Wos, J. C. Martin, M. Mansuri, *Nucleosides and Nucleotides*, **1990**, 9 (7), 885-897.
- ⁴³M. P. Cava, M. I. Levinson, *Tetrahedron*, **1985**, 41 (22), 5061-5087.
- ⁴⁴B. S. Pedersen, S. Sheibye, N. Y. Nilsson, S-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1978**, 87 (3), 223-228.
- ⁴⁵S. Sheibye, B. S. Pedersen, S-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1978**, 87 (3), 229-238.
- ⁴⁶A. A.-H. Abdel-Rahman, O. M. Ali, E. B. Pedersen, *Tetrahedron*, **1996**, 52 (48), 15311-15324.
- ⁴⁷a) M. Di Benedetto, A. Starzec, R. Vassy, G. Y. Perret, M. Crépin, M. Kraemer, *Br. J. Cancer.*, **2003**, 88 (12), 1987-1994.
- b) Y. Hamma-Kourbali, M. Di Benedetto, D. Ledoux, O. Oudar, Y. Leroux, M. Lecouvey, M. Kraemer, *Biochem Biophys Res Commun.*, **2003**, 310 (3), 816-823.
- c) E. Guenin, D. Ledoux, O. Oudar, M. Lecouvey, M. Kraemer, *Anticancer Res.*, **2005**, 25 (2A), 1139-1145.
- ⁴⁸A. Malliri, M. Symons, R. F. Hennigan, A. F. L. Hurlstone, R. F. Lamb, T. Wheeler, B. W. Ozanne, *J Cell Biol.*, **1998**, 143 (4), 1087-1099.
- ⁴⁹a) Y. Myoken, Y. Kayada, T. Okamoto, M. Kan, G. H. Sato, J. D. Sato, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **1991**, 88 (13), 5819-5823.
- b) O. Melnyk, M. A. Shuman, K. J. Kim, *Cancer RES.*, **1996**, 56 (4), 921-924.
- ⁵⁰C. Chantrain, Y. A. DeClerck, *Medecine/Sciences*, **2002**, 18, 565-575.
- ⁵¹B. Heissig, K. Hattori, M. Friedrich, S. Rafii, Z. Werb, *Curr. Opin. Hematol.*, **2003**, 10 (2), 136-141.
- ⁵²S. Moharram, A. Zhou, L.I. Wiebe, E.E. Knaus, *J. Med. Chem.*, 2004, 47 (7), 1840-1846.

ANNEXE

STRUCTURES DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS

ANNEXE: STRUCTURES DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS





Résumé :

Nous décrivons la synthèse de nouveaux agents anticancéreux mono et bifonctionnels à partir de molécules d'origines naturelles (nucléosides et bases pyrimidiques). Dans un premier temps, nous avons optimisé la réaction de fixation de la chaîne chloroéthyle en position 3 des deux nucléosides (thymidine et uridine) permettant ainsi l'obtention d'agents alkylants monofonctionnels. Parallèlement, nous avons synthétisé deux analogues de dinucléosides chloroalkylés reliés par une chaîne but-2-ène entre les positions 3' ou 5' de la thymidine conduisant à des agents alkylants bifonctionnels. Pour ce faire, nous avons utilisé la réaction de métathèse des oléfines. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'agents alkylants bifonctionnels à partir de bases naturelles pyrimidiques (la thymine et l'uracile). Les premiers analogues synthétisés sont issus de la fixation du groupement bis(β -chloroéthyl)amine par l'intermédiaire d'une liaison amide sur des bases alkylées. Afin d'élargir cette nouvelle famille d'agents alkylants, nous avons étudié la synthèse d'un analogue du chlorambucil en remplaçant le noyau aromatique par la thymine. Tous les produits synthétisés ont été caractérisés par différentes méthodes spectroscopiques. Deux composés synthétisés ont montré des propriétés anticancéreuses très encourageantes.

Abstract :

The synthesis of news antitumorals agents mono and bifonctionnals from naturals molecular (nucleoside and base) is described. This first time, we are optimized the fixation reaction of chloroethyle chain in position 3 of this two nucleosides (thymidine and uridine) obtained so monofonctionnals alkylants agents. Parallelly, we are synthesized two chloroalkyles dinucleosides analogues linked by an unsaturated hydrocarbon chain between position 3' or 5' from thymidine leading at the bifonctionnals alkylants agents. For do it, we are used of olefin metathesis reaction. This second time, we are interested in the synthesis bifonctionnals alkylants agents from pyrimidics naturals bases (thymine and uracile). The first analogues synthesized are descended of the fixation groupement bis(β -chloroethyl)amine by the intermediary amide bond on alkyled bases. In order to widen these new family alkylants agents, we are elaborated the synthesis a chlorambucil analogue in substituted for aromatic group by thymine. All the products synthesized are characterized by different spectroscopic methods. Two compounds synthesized are showed antitumorals proprieties very encouraging.