

50376  
1991  
188

65865

50376  
1991  
188

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

N° d'ordre 782

Thèse pour l'obtention du  
Doctorat en Chimie Organique et Macromoléculaire

Présentée le 30 Septembre 1991

par

Christel PIERLOT

**CONCEPTION ET SYNTHÈSE EN SÉRIE  
NUCLEOTIDIQUE ET NUCLEOSIDIQUE  
DE MOLECULES A VISEE ANTI-HIV**



Jury: Pr. H. SLIWA (Président, Rapporteur)  
Pr. A. TARTAR (Rapporteur)  
Pr. C. SERGHERAERT  
Pr. A. MARCINCAL  
Pr. D. BARBRY

**A ma femme, Sylvie**

**A ma fille, Chloé**

**A ma famille.**

**Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Chimie des Biomolécules à l'Institut Pasteur de Lille, (Professeur André Tartar) URA CNRS 1309, Faculté de Pharmacie de Lille , sous la direction du Professeur Christian Sergheraert.**

**Ce travail a pu être réalisé grâce à une bourse cofinancée par le Conseil Régional du Nord / Pas de Calais et l'Institut Pasteur de Lille.**

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur C. SERGHERAERT pour m'avoir confié ce sujet en me prodiguant conseils et critiques durant ces trois années. Qu'il soit également assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur A. TARTAR pour m'avoir accueilli dans son laboratoire en me faisant bénéficier de son expérience scientifique et qui m'a fait l'honneur de bien vouloir examiner cette thèse.

Je remercie également le Professeur H. SLIWA, dont j'ai pu apprécier la clarté de l'enseignement, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Professeur A. MARCINCAL qui a bien voulu participer au jury de cette thèse.

Je voudrais remercier le professeur D. BARBRY qui m'a fait l'honneur de faire partie du jury.

Je tiens à remercier le Professeur P. DURIEZ pour avoir dirigé les études d'incorporation de médicaments dans les LDL.

Mes remerciements s'adressent également à H. SQALLI et à T. LUCAS pour leur travaux sur les incorporations de médicaments dans les LDL.

Je remercie également M. LEMAITRE et H. HENIN de la société Rhône-Poulenc, pour nous avoir fourni les activités anti-HIV des dérivés du D4T.

J'adresse également mes remerciements à F. ROUAIX pour l'évaluation de l'activité anti-HIV des oligodésoxyribonucléotides modifiés.

Je tiens à remercier tout particulièrement J.P. KUSNIERZ , dont j'ai pu apprécier le dévouement tout au long de ma thèse, pour les études de cytofluorimétrie.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur G. RICARD de l'USTL pour les études en spectrométrie de masse FAB.

J'adresse mes remerciements à Monsieur B. MOUCHEL de l'USTL pour les études de RMN.

Je remercie Pierrette MAES pour la bonne ambiance qu'elle s'emploie à faire régner durant les travaux pratiques de chimie générale.

Je remercie également Pascal LEMIERE et Martine HOUDIN pour l'aide qu'il m'ont apportée tout au long de ma thèse.

J'adresse également mes remerciements à Carole DESRUELLE pour avoir accepté de dactylographier une partie de ce travail.

Je tiens à remercier tous les membres du Service Chimie des Biomolécules pour ces trois années passées en leur compagnie.

Enfin, je voudrais remercier mes amis pour le soutien qu'ils m'ont apporté durant ce travail.

**Ce travail a fait l'objet du poster suivant :**

Oligonucléotides possédant un reste glucocorticoïde en 5' dans l'inhibition de l'infection HIV *in vitro*.

Christel PIERLOT, Frank ROUAIX, André TARTAR, Jean-Claude AMEISEN, Christian SERGHERAERT.

Lors des 27<sup>èmes</sup> rencontres internationales de chimie thérapeutique (CAEN).

**sont en préparation les publications suivantes :**

Synthesis and anti-HIV evaluation of prodrugs of D4T 5' monophosphate.

En collaboration avec Rhône-Poulenc, dans le cadre d'un contrat A.N.R.S..

Vectorisation de dérivés fluorescents du D4T via les LDL.

En collaboration avec l'équipe de P. DURIEZ.(S.E.R.L.I.A.) Institut Pasteur de Lille, Faculté de pharmacie.

## Abréviations

AcOEt	: acétate d'éthyle
AcOH	: acide acétique
Boc	: tertibutyloxycarbonyle
Bop	: hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylaminophosphonium
CHOL	: reste cholestérol
DEXA	: reste dexaméthasone
DCA	: acide dichloroacétique
DCC	: dicyclohexylcarbodiimide
DCU	: dicyclohexylurée
DMAP	: diméthylaminopyridine
DIPEA	: diisopropyléthylamine
DMF	: diméthylformamide
DMSO	: diméthylsulfoxyde
DMTr	: diméthoxytrityl
FAB	: spectrométrie de masse "fast atom bombardment"
FITC	: isothiocyanate de fluoresceine
MeOH	: méthanol
MMTr	: monométhoxytrityl
NBD	: 7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole
-O-Su	: ester hydrosuccinimide
tBuOH	: tertibutanol
tBuOK	: tertibutylate de potassium
TCA	: acide trichloroacétique
TFA	: acide trifluoroacétique
Tos	: tosyle
TOF	: spectrométrie de masse "time of flight"

Tr : trityl

T4 : tétrathymidylate



# SOMMAIRE

<b>I) <u>INTRODUCTION GENERALE</u></b>	1
<b>II) <u>SYNTHESE CHIMIQUE D'OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES</u></b>	3
<b>A) <u>STRUCTURE ET REACTIVITE CHIMIQUE DE L'ADN</u></b>	3
1) STRUCTURE PRIMAIRE ET SECONDAIRE DE L'ADN	3
2) REACTIVITE CHIMIQUE DE L'ADN	4
<b>B) <u>SYNTHESE CHIMIQUE D'OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES</u></b>	6
1) GROUPES PROTECTEURS	6
2) METHODE DE SYNTHESE EN PHASE SOLIDE	8
2.1 Support et fonctionnalisation	10
2.2. Assemblage de la chaine	11
2.3 Contrôle de la synthèse	12
2.4 Déprotection et purification	13
<b>C) <u>PURIFICATIONS ET CONTROLES</u></b>	13
1) TECHNIQUES DE PURIFICATION	13
1.1 Chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse	13
1.2 Purification par colonne OPC (Oligonucléotides Purification Cartridge)	14
1.3 Purification par chromatographie liquide haute performance échange d'anions	14
1.4 Purification par gel d'électrophorèse	14
2) CONTROLES	15
2.1 Chromatographie sur couche mince	15
2.2 Chromatographie liquide haute performance en phase inverse	15
2.3 Digestion enzymatique couplée à l'HPLC phase inverse	15
2.4 Spectrométrie de masse TOF (Time Of Flight)	16
<b>III) <u>MODIFICATION D'OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES EN PHASE SOLIDE SUR L'EXTREMITE 5'</u></b>	17

<b>A) <u>INTERET DE MODIFIER LES OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES EN 5'</u></b>	17
1) HYBRIDATION ET MISE EN EVIDENCE	17
1.1 Hybridation non perturbée	17
1.2 Mise en évidence de l'hybridation	17
2) UTILISATION DE GROUPES FLUORESCENTS POUR LE SEQUENCAGE DE L'ADN	18
3) OPTIMISATION DU PHENOMENE D' HYBRIDATION	19
<b>B) <u>INTERET DE REALISER LES MODIFICATIONS EN PHASE SOLIDE</u></b>	20
1) ELIMINATION DES REACTIFS EN EXCES PAR LA VAGE	20
2) MINIMISATION DES REACTIONS SECONDAIRES	20
<b>C) <u>METHODE GENERALE POUR LA MODIFICATION EN 5'</u></b>	22
1) INTRODUCTION	22
2) FONCTIONNALISATION DU 5'OH EN 5'NH <sub>2</sub>	22
2.1 Etude bibliographique	22
3) REACTIONS POSSIBLE SUR LE 5'NH <sub>2</sub>	24
3.1 Etude bibliographique	24
3.2 Autres méthodes envisagées	27
3.3 Application au couplage de trois acides différents en 5' d'un aminooligodésoxyribonucléotide	29
4) SUIVI ET CONTROLE DES DIFFERENTES REACTIONS	30
4.1 Démarche entreprise	30
4.2 Réaction sur des oligonucléotides de petite taille	31
5) RESULTATS	32
5.1 Synthèse de l' aminotétrathymidylate	32
5.2 Comparaison des méthodes de couplage (Bop-DCC)	34
5.3 Conclusion	36
6) SYNTHESE D'AUTRES OLIGONUCLEOTIDES MODIFIES	37
6.1 Contrôle par HPLC	38

6.2 Contrôle par Spectrométrie de masse TOF	39
<b>D) <u>APPLICATION A LA STRATEGIE ANTI-SENS</u></b>	44
1) INTRODUCTION	44
2) PROBLEMES POSES	44
3) SOLUTIONS ENVISAGEES	45
4) SYNTHÈSE DES DERIVES DEXAMETHASONE ET CHOLESTEROL- ANTISENS	45
4.1 Synthèse d'un dérivé acide de la dexaméthasone	45
4.2. Synthèse du 3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxy)-cholest-5'-ène	47
4.3. Réaction des deux acides sur l'aminooligonucléotide	51
5) ACTIVITE BIOLOGIQUE	51
6) CONCLUSION	52
7) SYNTHÈSE D'OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES THIOPHOSPHATES	52
<b>IV) <u>MULTIPLICATION EN PHASE SOLIDE DES FONCTIONS AMINES EN 5' D'UN OLIGONUCLEOTIDE</u></b>	54
<b>A) <u>INTERET</u></b>	54
<b>B) <u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	54
1) METHODE DES PHOSPHOROAMIDITES	54
2) CONCLUSION	57
<b>C) <u>STRATEGIE EMPLOYEE</u></b>	57
1) COUPLAGES SUCCESSIFS DE LA LYSINE SUR UN AMINOOLIGONUCLEOTIDE	57
1.1. Utilisation de la lysine	57
1.2. Principe	58
2. Utilisation de la Di-Fmoc-lysine	60
2.1. Etude bibliographique	60

2.2. Couplages successifs de la Di-Fmoc-lysine sur un amino tétrathymidylate.	61
2.3. Résultats	63
2.4. Application à un tétramère de séquence ACGT	63
2.5. Conclusion	67
<b>3) UTILISATION DE LA DI-TRITYL-LYSINE</b>	<b>67</b>
3.1. Intérêt d'utiliser la Di-trityl-lysine	67
3.2. Synthèse de la N $\alpha$ ,N $\epsilon$ -Di-trityl-lysine (sel de diéthylamine)	68
3.3. Couplage sur un amino tétrathymidilate	70
3.4. Conclusion	71
<b>4) UTILISATION DE SELS DE LA DI-DIMETHOXYTRITYL-LYSINE</b>	<b>72</b>
4.1. Intérêt d'utiliser un sel de la didiméthoxytrityl-lysine	72
4.2. Synthèses de sels de la didiméthoxytrityl-lysine	72
4.3. Couplages sur un amino tétrathymidylate	79
4.4. Conclusions	81
<b>5) UTILISATION DU SEL DE POTASSIUM DE LA DI MONOMETHOXY-TRITYL-LYSINE</b>	<b>81</b>
5.1. Synthèse du sel de potassium de la dimonométhoxytrityl-lysine	81
5.2. Couplages sur un amino-tétrathymidylate	82
5.3. Conclusions	83
<b>6) CONCLUSION</b>	<b>83</b>
<b>D) <u>AUTRE STRATEGIE</u></b>	<b>84</b>
<b>1) UTILISATION DE LA SPERMINE</b>	<b>84</b>
1.1. La spermine	84
1.2. Intérêt	84
1.3. Couplage de la spermine sur un tétrathymidilate	85
1.4. Fonctionnalisation avec la biotine	85
<b>2) CONCLUSION</b>	<b>86</b>

<b>V) <u>CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE PRODRUGUES DU D4T EN VUE DE L'INHIBITION D'HIY</u></b>	<b>87</b>
<b>A) <u>LE D4T</u></b>	<b>87</b>
1) SA STRUCTURE	87
2) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	87
2.1 Solubilité	87
2.2 Réactions chimiques possibles	87
2.3 Caractéristiques physico-chimiques du D4T	88
3) PREMIERE METHODE DE SYNTHÈSE DU D4T	88
3.1 Synthèse du 5'-O-Tryl-Thymidine	90
3.2 Synthèse du 5'-O-Tryl-3'-O-Mésyl-Thymidine	90
3.3 Synthèse du 5'-O-Tryl-2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-Thymidine	91
3.4 Synthèse du 2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-Thymidine	91
3.5 Conclusion	92
4) MODIFICATION DE LA PREMIERE METHODE	92
4.1 Synthèse du 5'-O-Monométhoxytryl-Thymidine	93
4.2 Synthèse du 5'-O-Monométhoxytryl-3'-O-Mésyl-Thymidine	93
4.3 Synthèse du 5'-O-Monométhoxytryl-2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-Thymidine	94
4.4 Synthèse du 2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-Thymidine	94
4.5 Conclusion	95
5) DEUXIEME METHODE DE SYNTHÈSE DU D4T	95
5.1 Synthèse du 5'-O-3'-O-Dimésyl-Thymidine	95
5.2 Synthèse du 1(2-désoxy-3,5-époxy- $\beta$ -D-thréo-pentofuranosyl)-thymine	95
5.3 Synthèse du 2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-Thymidine	97
5.4 Conclusion	98
6) AMELIORATION DE LA DEUXIEME METHODE	98

6.1 Amélioration de la dernière étape de synthèse du D4T	98
7) CONCLUSION	101
<b>B) <u>CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE PRODRUGUES DU D4T</u></b>	102
1) MODE D'ACTION DU D4T	102
2) AVANTAGE DU D4T PAR RAPPORT A L'AZT	103
3) CONCEPTION DE PRODRUGUES DU D4T	103
3.1 Dérivés phospho tri-et di-esters du D4T	103
3.2 Esters du D4T	105
3.3 Dérivés carbonate et carbamate du D4T	106
4) SYNTHÈSE DES DERIVES PHOSPHO-DI ET TRI-ESTERS DU D4T	107
4.1. Première méthode	109
4.2. Deuxième méthode	110
4.3. Synthèse des dérivés phospho-tri et di ester du bis D4T	112
5) SYNTHÈSE DES DERIVES ESTERS DU D4T	113
6) SYNTHÈSE DES DERIVES CARBONATE ET CARBAMATE DU D4T	114
<b>C) <u>ACTIVITE ANTI-HIV</u></b>	115
1) GENERALITES	115
2) RESULTATS	115
3) CONCLUSIONS	118
<b>VI) <u>VECTORISATION DE MEDICAMENT PAR LES LIPOPORTEINES DE BASSE DENSITE (LDL)</u></b>	119
<b>A) <u>INTRODUCTION</u></b>	119
<b>B) <u>SYNTHÈSE DE MOLECULES DERIVEES DU D4T INCORPORABLES DANS LES LDL</u></b>	119
1) SYNTHÈSE DU N-4-(7-NITROBENZO-2-OXO-1,3-DIAZOLE)AMINOHEXANOATE DE 5'-O-(2',3'-DIDESOXY-2',3'-DIDEHYDRO-THYMIDINYLE)	120

1.1. Acide N-4-(7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)aminohexanoïque	121
1.2. N-4-(7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)aminohexanoate de 5'-O-(2',3'- didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)	121
2) SYNTHÈSE DU N $\alpha$ -4-(7-NITROBENZO-2-OXO-1,3-DIAZOLE)-Ne-(3 $\beta$ - (2'CARBOXYMETHOXYCHOLESTÈNE))-LYSINATE DE 5'-O-(2',3'- DIDÉSOXY-2',3'-DIDÉHYDRO-THYMINYLE)	121
2.1. Trifluoroacétate de N $\alpha$ -Fmoc-lysine	122
2.2. N $\alpha$ -Fmoc-Ne-(3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxycholestène))-lysine	122
2.3. Ne-(3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxycholestène))-lysine (sel de pipéridine)	122
2.4. N $\alpha$ -4-(7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)-Ne-(3 $\beta$ -(2'- carboxyméthoxycholestène))-lysine	123
2.5. N $\alpha$ -4-(7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)-Ne-(3 $\beta$ -(2'- carboxyméthoxycholestène))-lysinate de 5'-O-(2',3'-didésoxy-2',3'- didéhydro-thymidinyle)	123
<b>C) <u>MESURE DE LA QUANTITE DE MEDICAMENT INCORPORÉE DANS LES</u></b>	
<b><u>LDL</u></b>	124
1) EVALUATION PAR CCM	124
2) DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMETRIE	124
<b>VII) <u>CONCLUSION</u></b>	127
<b>VIII) <u>PARTIE EXPERIMENTALE</u></b>	129
<b>A) <u>PARTIE OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES</u></b>	129
1) SYNTHÈSE D'OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES	129
1.1. Synthétiseur d'oligodésoxyribonucléotides	129
1.2. Traitement des résines	130
2) MODIFICATION D'OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES SUR RESINE	130
2.1. Fonctionnalisation du 5' OH en 5' NH <sub>2</sub>	131



3) COUPLAGE D'UN ACIDE (OU D'UN SEL) SUR UN AMINO-OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES	131
4) COUPLAGE DE LA FITC	132
5) CONTROLES	132
5.1. Contrôle HPLC	132
5.2. Contrôle par spectrométrie de masse TOF	133
5.3. HPLC et TOF de différents oligodésoxyribonucléotides modifiés	134
<b>B) <u>PARTIE MOLECULES ORGANIQUES</u></b>	141
1) MOLECULES DERIVEES DE LA LYSINE	141
1.1. Introduction	141
1.2. Sel de diparatoluène sulfonate de lysinate de méthyle	141
1.3. N $\alpha$ ,Ne-ditrityl-lysinate de méthyle	142
1.4. N $\alpha$ ,Ne-ditrityl-lysine (sel de diéthylamine)	142
1.5. N $\alpha$ ,Ne-dimonométhoxytrityl-lysinate de méthyle	143
1.6. N $\alpha$ ,Ne-dimonométhoxytrityl-lysine (sel de potassium)	143
1.7. N $\alpha$ ,Ne-di-diméthoxytrityl-lysinate de méthyle	144
1.8. N $\alpha$ ,Ne-di-diméthoxytrityl-lysine (sel de potassium)	145
1.9. Ester nitrophénolique de la N $\alpha$ ,Ne-di-Boc-lysine	145
1.10. Ester fluorèneméthylque de la N $\alpha$ ,Ne-di-Boc-lysine	146
1.11. Sel de de di-paratoluène sulfonate de lysinate de fluorèneméthyle	147
1.12. N $\alpha$ ,Ne-di-diméthoxytrityl-lysinate de fluorèneméthyle	147
1.13. N $\alpha$ ,Ne-di-diméthoxytrityl-lysine (sel de diéthylamine)	148
2) SYNTHESE DU D4T	149
2.1. Première méthode	149
2.2. Modification de la première méthode	151
2.3. Deuxième méthode	153
3) SYNTHESE DE DERIVES PHOSPHO-TRI ET DI-ESTERS DU D4T	154
3.1. 1-(hexadécyl)-5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidiny)-2- cyanoéthoxy -phosphotri-ester	154

3.2. Sel d'ammonium du 1-(hexadécyl)-5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyl)-monophosphate	155
3.3. 3 $\beta$ -(2'-hydroxyéthoxy-cholestène)-5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyl)-2-cyanoéthoxy-phosphotriester	156
3.4. Sel d'ammonium du 3 $\beta$ -(2'-hydroxyéthoxy-cholestène)-5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyl)-monophosphate	157
3.5. Bis 5',5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyl)-2-cyanoéthoxy-phosphotriester	158
3.6. Sel d'ammonium du Bis 5',5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyl)-monophosphate	158
<b>4) SYNTHÈSE DES DERIVES ESTERS DU D4T</b>	<b>159</b>
4.1. Procédé général pour l'estérification du D4T	159
4.2. Palmitate de 5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)	159
4.3. 3 $\beta$ -(2'-hydroxyéthoxy-cholestène)-5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)	160
4.4. Linoléate de 5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)	160
4.5. Linoléate de 5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)	161
4.6. N $\alpha$ ,N $\epsilon$ -Dipalmitoyl-lysinate de 5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)	162
4.7. N-4-(7-Nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)-aminohexanoate de 5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)	162
4.8. N $\alpha$ -4-(7-Nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)-N $\epsilon$ -3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxy-cholestène)lysinate de 5'-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)	163
<b>5) SYNTHÈSE DES DERIVES CARBONATE ET CARBAMATE DU D4T</b>	<b>163</b>
5.1. 5'-O-(palmityl-oxy-carbonyl)-2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidine	163
5.2. 5'-O-(palmityl-amino-carbonyl)-2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidine	164

6) SYNTHESE DES ACIDES UTILISES POUR L'ESTERIFICATION DU D4T	164
6.1. Synthèse de la N $\alpha$ ,N $\epsilon$ -dipalmytyl-lysine	164
6.2. Synthèse de l'acide N-(7-Nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)- aminohexanoïque	166
6.3. Synthèse de la N $\alpha$ -4-(7-Nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)-N $\epsilon$ -3 $\beta$ -(2'- carboxyméthoxy-cholestène)lysine	166
6.4. Synthèse de l'acide 11,17 $\alpha$ ,18 $\alpha$ , $\epsilon$ -trihydroxy-9-fluoro-16-méthyl-1,4- pregndiène-21-oïque	168
6.5. Synthèse du 3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxy-cholest-5-ène)	169

IX) <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	171
--------------------------	-----

## INTRODUCTION GENERALE

Le virus d'immunodéficience humaine (VIH) est le rétrovirus pathogène, agent causal du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Une des questions primordiales posées lors de la découverte du virus était de savoir si une thérapeutique antirétrovirale était envisageable. Depuis, un médicament, la 3'-azido-2',3'-didéoxythymidine (AZT ou zidovudine) s'est montré capable de prolonger et d'améliorer la qualité de vie des individus présentant une infection VIH avancée. Plus récemment, il a été observé que l'administration d'AZT pouvait même retarder la progression clinique pour certains cas d'infection asymptomatique. Aussi la question cruciale n'est plus de savoir si une thérapeutique antirétrovirale est possible mais plutôt d'utiliser la connaissance accrue du cycle répliatif du virus pour créer de nouvelles voies de traitement.

Bien que chacune des étapes du cycle répliatif du VIH (Figure 1) puisse en principe servir de cible à un agent thérapeutique, six ont fait l'objet de premiers travaux.

- l'adsorption du virus à la membrane cellulaire dépendant de l'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120 et le récepteur cellulaire CD4 présent sur une catégorie de lymphocytes T et sur d'autres cellules immunes.
- la transcription de l'ARN viral en ADN proviral par la transcriptase inverse virale.
- la transactivation de l'expression des gènes viraux par les protéines régulatrices (ex : protéine tat).
- la synthèse des protéines virales.
- le clivage protéolytique des protéines virales précurseurs.
- la glycosylation des protéines virales.

Nous nous sommes attaché dans ce travail à la préparation d'inhibiteurs de la synthèse de protéines virales indispensables et à celle d'inhibiteurs de la fonction transcriptase inverse virale.

L'inhibition de la synthèse de protéines virales a été envisagée en termes de stratégie anti-sens selon laquelle une courte séquence d'ADN complémentaire d'une partie de la séquence d'un gène, introduite dans une cellule, peut inhiber la synthèse de la protéine codée par ce gène. L'oligonucléotide "anti-sens" va interagir avec la séquence correspondante du génome viral et réaliser un blocage intracellulaire de la portion de génome considéré par une hybridation, empêchant donc la traduction de la portion considérée du message.

Des modifications chimiques des oligonucléotides ont été réalisées dans le but de leur faciliter le franchissement membranaire, de stabiliser l'hybride potentiel, de mettre en évidence l'hybridation et sa localisation sans utiliser la radioactivité.

La première partie du mémoire traite des différentes possibilités de modification en 5' d'un oligodésoxyribonucléotide, du suivi étape par étape de cette modification et de la caractérisation en spectrométrie de masse temps de vol des produits obtenus.

L'inhibition de la transcriptase inverse virale a été étudiée par la synthèse de dérivés du D4T(2',3'-didéhydro-2',3'-didéoxythymidine) un didéoxynucléoside montrant le même mode d'action que l'AZT mais susceptible de démontrer un avantage métabolique essentiel. La justification de la préparation de ces prodrogues, leur synthèse et leurs activités anti VIH in vitro font l'objet de la seconde partie du mémoire.

**SYNTHESE CHIMIQUE**  
**D'OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES**

## A) STRUCTURE ET REACTIVITE CHIMIQUE DE L'ADN

La structure et la réactivité chimique de l'acide désoxyribonucléique ont justifié différentes stratégies de synthèse des désoxyribonucléotides. Le comportement de l'ADN peut se résumer en quelques principes importants.

### 1) STRUCTURE PRIMAIRE ET SECONDAIRE DE L'ADN

La structure primaire de l'ADN est parfaitement définie (Figure 2). Elle est constituée d'un polymère de 2-désoxy-riboses liés par des chainons 3'-5' phosphate et, portant chacun en position 1', une des quatre bases hétérocycliques possibles dans une configuration  $\beta$ .

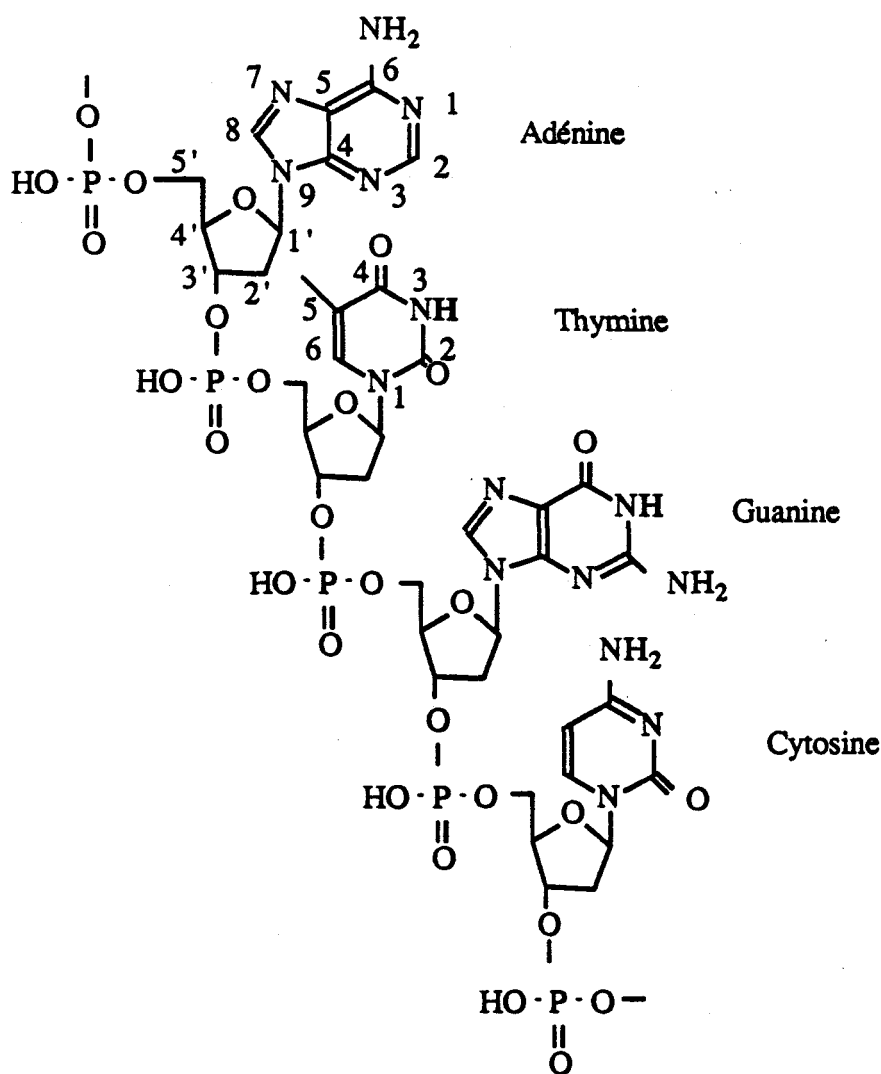


Figure 2 : Structure primaire de l'ADN montrant les 4 bases et le système de numérotation.



La grande solubilité dans l'eau de l'ADN est due à la présence des restes phosphates et des fonctions amines primaires exocycliques de la cytosine, guanine ou de l'adénine, pouvant mener à l'établissement de liaisons hydrogènes avec le solvant, ou avec d'autres molécules polaires.

Une autre conséquence due à la possibilité de formation de liaisons hydrogènes par ces amines primaires, est la formation de structures secondaires. En particulier, elles justifient l'appariement spécifique de la guanine avec la cytosine et de l'adénine avec la thymine (Figure 3), pouvant se produire au sein d'une seule molécule d'ADN ou entre deux molécules d'ADN (pour donner la forme naturelle " double brin " de l'ADN cellulaire).

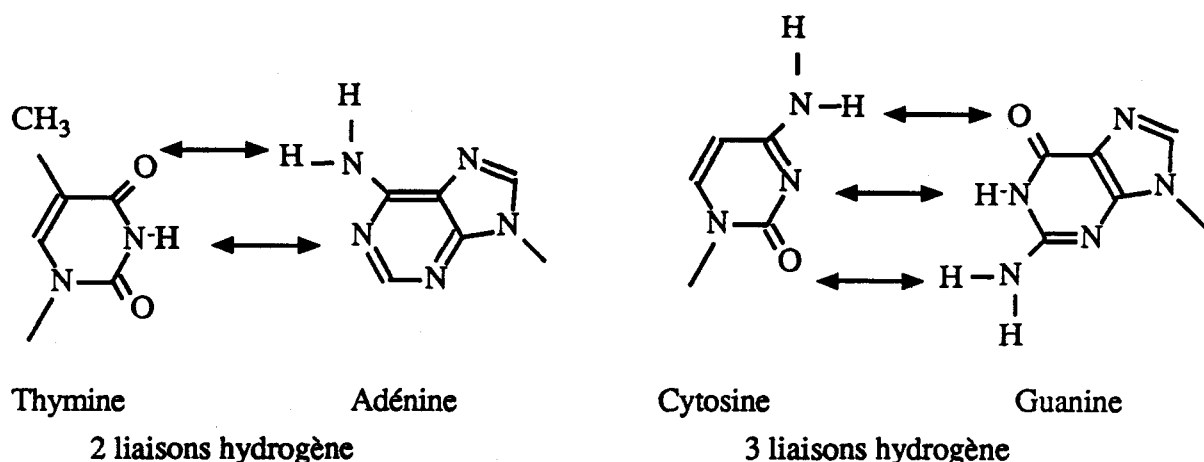


Figure 3 : Liaison hydrogène entre la thymine et l'adénine, et entre la cytosine et la guanine

## 2) REACTIVITE CHIMIQUE DE L'ADN

Elle impose pour la synthèse d'ADN la protection des groupements phosphates et des amines exocycliques. Ceci pour deux raisons :

- pour obtenir une bonne solubilité de l'ADN dans les solvants organiques.
- parce qu'ils sont les centres nucléophiles principaux, et pourraient interférer avec le processus de formation des liaisons internucléotidiques .

Les bases hétérocycliques peuvent aussi être le siège de réactions chimiques. Tous les atomes d'azote et d'oxygène des hétérocycles sont des sites potentiels d'attaques électrophiles (la position N-7 des purines est particulièrement réactive). Ceci exclut l'emploi de réactifs acylants en excès, cependant l'acylation douce est raisonnablement bien tolérée et peut être utilisée pour protéger les amines exocycliques.

Les conditions acides de déprotection sont à proscrire car la liaison glycosidique N-C1' est labile et peut provoquer des dépurinations (Figure 4); seules des solutions acides diluées pourront être utilisées.

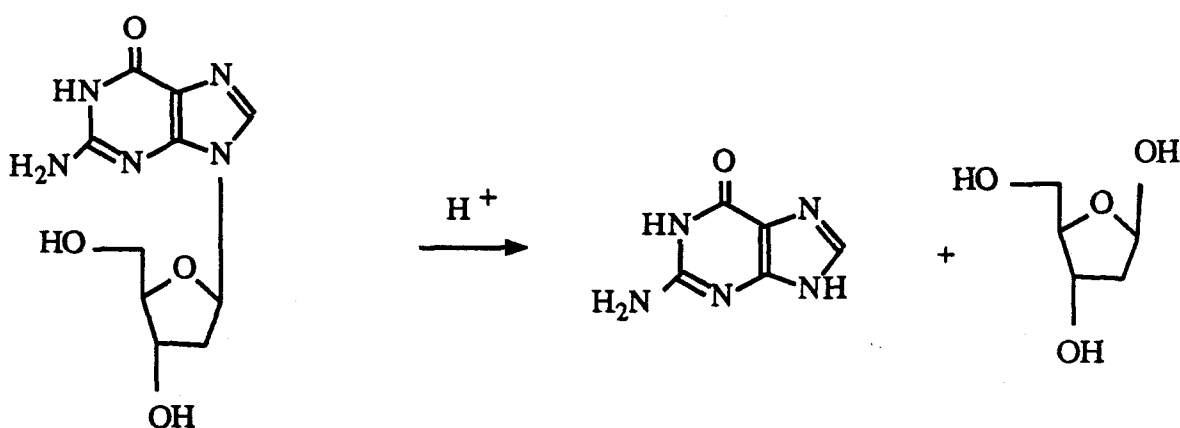


Figure 4 : Dépurination en milieu acide

A l'inverse, l'ADN n'est pas sensible aux solutions basiques, la seule exception résidant en la déamination de la cytosine pour donner l'uracile par l'ion hydroxyle à haut pH. Heureusement la liaison phosphate est assez stable à l'hydrolyse acido-basique. Encore que la forme protégée (phosphotriester) ne le soit pas, et donc seules les méthodes de déprotection spécifiques ne causant pas de coupures internucléotidiques sont utilisables pour l'obtention d'ADN synthétique.

D'après ces considérations, les différents types de réactions chimiques applicables en synthèse d'oligonucléotides se résument à :

- l'hydrolyse alcaline douce
- l'hydrolyse acide très douce
- les réactions de substitutions nucléophiles douces
- les réactions d'éliminations catalysées par les bases

- certaines réactions redox (iode, soufre)

## B) SYNTHÈSE CHIMIQUE D'OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES

L'étape clef dans la synthèse de l'ADN est la formation de la liaison phosphate internucléotidique. Puisqu'un désoxyribonucléoside contient deux hydroxyles (3' et 5'), l'un doit être protégé chimiquement pendant que l'autre est spécifiquement phosphitylé et ensuite couplé sur l'unité désoxyribonucléosidique suivante.

Comme les amines exocycliques doivent aussi être protégées, deux types de groupements protecteurs devront être utilisés pour ce type de synthèse :

- les permanents, protégeant l'oligonucléotide tout au long de la synthèse et éliminés à la fin de l'assemblage.
- les temporaires, destinés à provoquer la spécificité du couplage et ôtés à chaque cycle.

### 1) GROUPES PROTECTEURS

Les amines exocycliques nécessitent une protection permanente, réalisée par acylation. Bien que plusieurs alternatives soient proposées, les protections les plus courantes sont le benzoyle pour l'adénine et la cytosine et l'isobutyryle pour la guanine (Figure 5). Ces groupes sont stables dans les conditions de synthèse et éliminés sous l'effet d'une solution ammoniacale concentrée à la fin de la phase d'élongation.

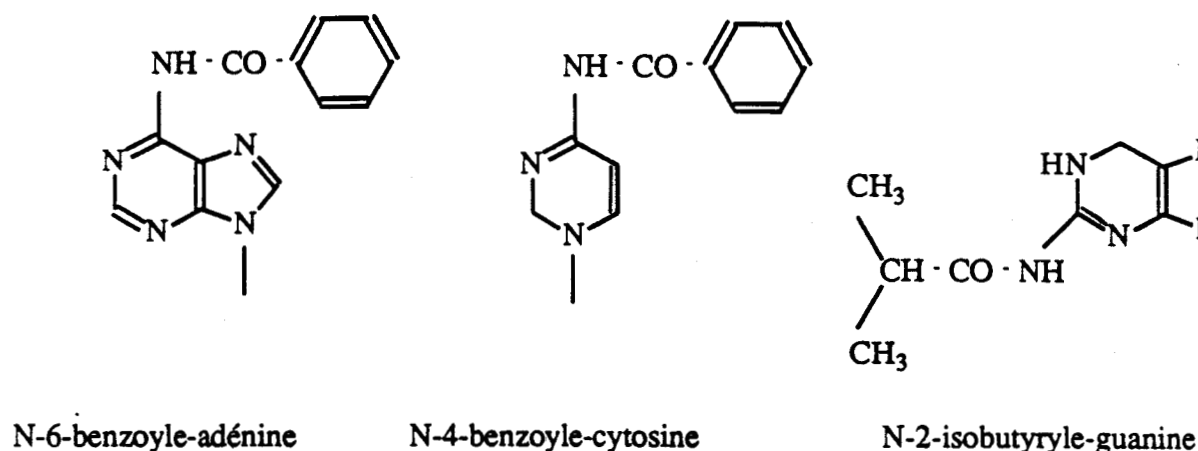


Figure 5 : Groupements protecteurs des bases exocycliques

En ce qui concerne les deux hydroxyles du désoxyribose (3' et 5'), la position 3' est généralement phosphitylée, alors que le groupe hydroxyle en 5' nécessite une protection temporaire. Cette dernière protection est souvent réalisée par une famille de composés dérivés du trityle (Figure 6), éliminables en milieu acide. Si le groupement diméthoxytrityle est plus labile que le groupement monométhoxytrityle, le trityle quant à lui, requiert des conditions trop acides pour être enlevé (et donc pour être utilisé). Les conditions acides douces utilisées lors de chaque cycle pour déprotéger le 5' OH minimisent donc le risque de dépurination.

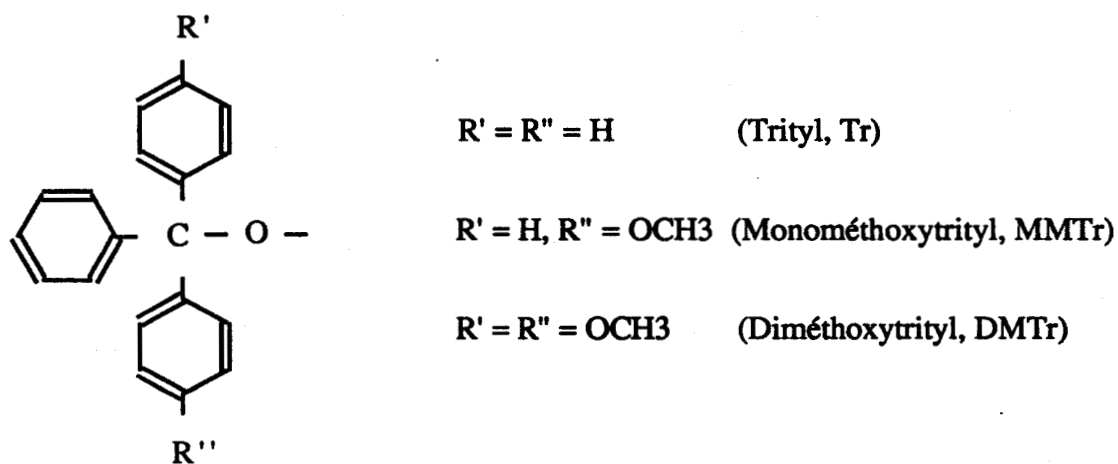


Figure 6 : Le groupe O - Trityle et ses mono et di-méthoxy dérivés

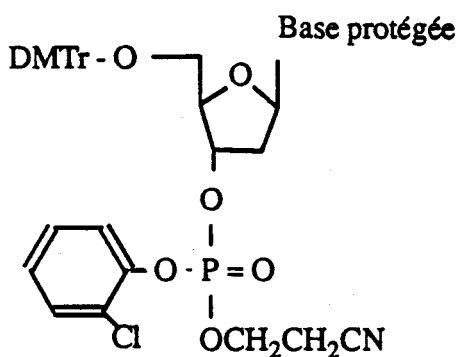
La liaison phosphate internucléotidique doit être protégée, pour éviter les réactions secondaires dues au pouvoir nucléophile de l'oxygène chargé négativement. Le plus courant des groupes protecteurs actuellement utilisé est le groupe cyanoéthyle éliminé en présence d'une base comme l'ammoniaque à froid par un mécanisme de  $\beta$  élimination.

## **2) METHODE DE SYNTHÈSE EN PHASE SOLIDE**

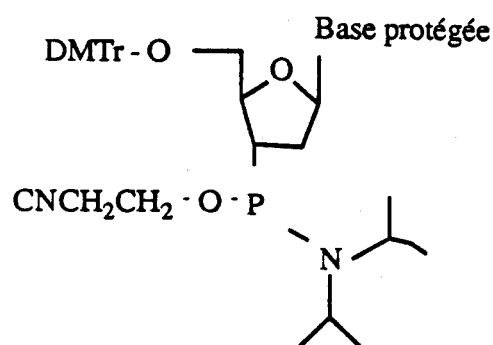
La synthèse d'ADN en solution (phase homogène) comprend les étapes suivantes :

- a) la préparation des 4 désoxyribonucléotides entièrement protégés (protections variables selon la méthode phosphate ou phosphite triester (phosphoroamidite)). (Figure 7)
- b) la déprotection sélective de 2 désoxyribonucléotides à condenser l'un en 5' l'autre en 3' de manière à libérer sur chaque monomère les fonctions engagées dans la formation de la liaison internucléotidique.
- c) la condensation pour former un dimère entièrement protégé soumis à purification.
- d) l'extension de la chaîne par répétition des réactions des étapes b et c j'usqu'à obtention de l'oligodésoxyribonucléotide désiré entièrement protégé.
- e) la déprotection séquentielle et contrôlée du produit.
- f) son isolement, sa purification et sa caractérisation.

La synthèse d'ADN en solution a apporté beaucoup dans la mise au point des réactifs, la détection des réactions secondaires possibles, l'identification des produits parasites.



Monomère en méthode phosphotriester

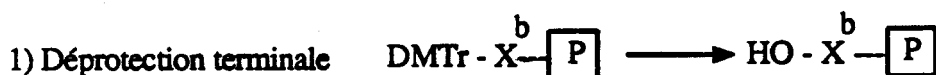


Monomère en méthode phosphoroamidite

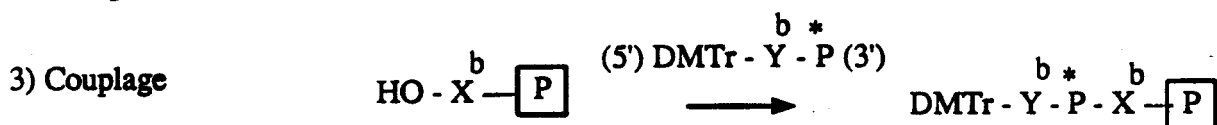
Figure 7 : Monomères utilisés en phase homogène

La synthèse en phase solide est préférée pour obtenir des oligonucléotides de plus grande taille. Cette dernière méthode se prête fort bien à l'automatisation, et permet d'obtenir rapidement plusieurs mg de produit.

Dans son principe la méthode comprend la fixation en 3' d'un désoxyribonucléoside protégé en 5' sur un support solide, l'élongation de la chaîne est effectuée par alternance de déprotections des hydroxyles en 5' et réactions de couplage (Figure 8).



2) Lavage



4) Lavage

5) Oxydation, Capping

$\overset{\text{b}}{\text{X}}, \overset{\text{b}}{\text{Y}}$  : nucléosides protégés

$\boxed{\text{P}}$  : support polymère

$\overset{*}{\text{P}}$  : dérivé phosphate ou phosphite

Figure 8 : Etapes essentielles de déprotection et de couplage au cours d'un cycle

Dans tous les cas un excès de réactifs est employé afin d'obtenir des réactions totales, et les composés qui n'ont pu réagir sont éliminés par lavage du support avec un solvant approprié. Les cycles se succèdent ainsi jusqu'à ce que la séquence désirée soit obtenue, puis l'oligonucléotide est détaché de son support, et les groupes protecteurs enlevés. Il reste alors à purifier le produit obtenu.

Pour résumer, les quatre étapes essentielles de la synthèse en phase solide sont :

- fonctionnalisation du support
- assemblage de la chaîne
- déprotection et séparation du support
- purification

## 2.1- Support et fonctionnalisation

4 types de matériels sont employés en synthèse d'ADN en phase solide.

Le gel de silice et les billes de verre sont particulièrement intéressants dans les opérations manuelles et automatiques à cause de leur faible chargement (habituellement 30 à 70  $\mu\text{mol}$  par gramme de résine), et leur bonne résistance mécanique.

Le polystyrène et le gel de polydiméthylacrylamide ont des avantages à grande échelle, car ils sont raisonnablement rigides, leur possibilité de gonfler permet une meilleure accessibilité des sites réactifs quand le chargement de la résine dépasse 100  $\mu\text{mol}$  par gramme. Ces supports sont surtout utilisés quand on veut obtenir de grandes quantités d'oligonucléotides en particulier pour les études structurales (cristallographie, ou RMN).

La liaison entre le support et le désoxyribonucléotide est réalisée par l'acide succinique, qui forme une liaison ester avec le 3' OH du sucre et une liaison amide avec une amine préalablement introduite sur le support (Figure 9).

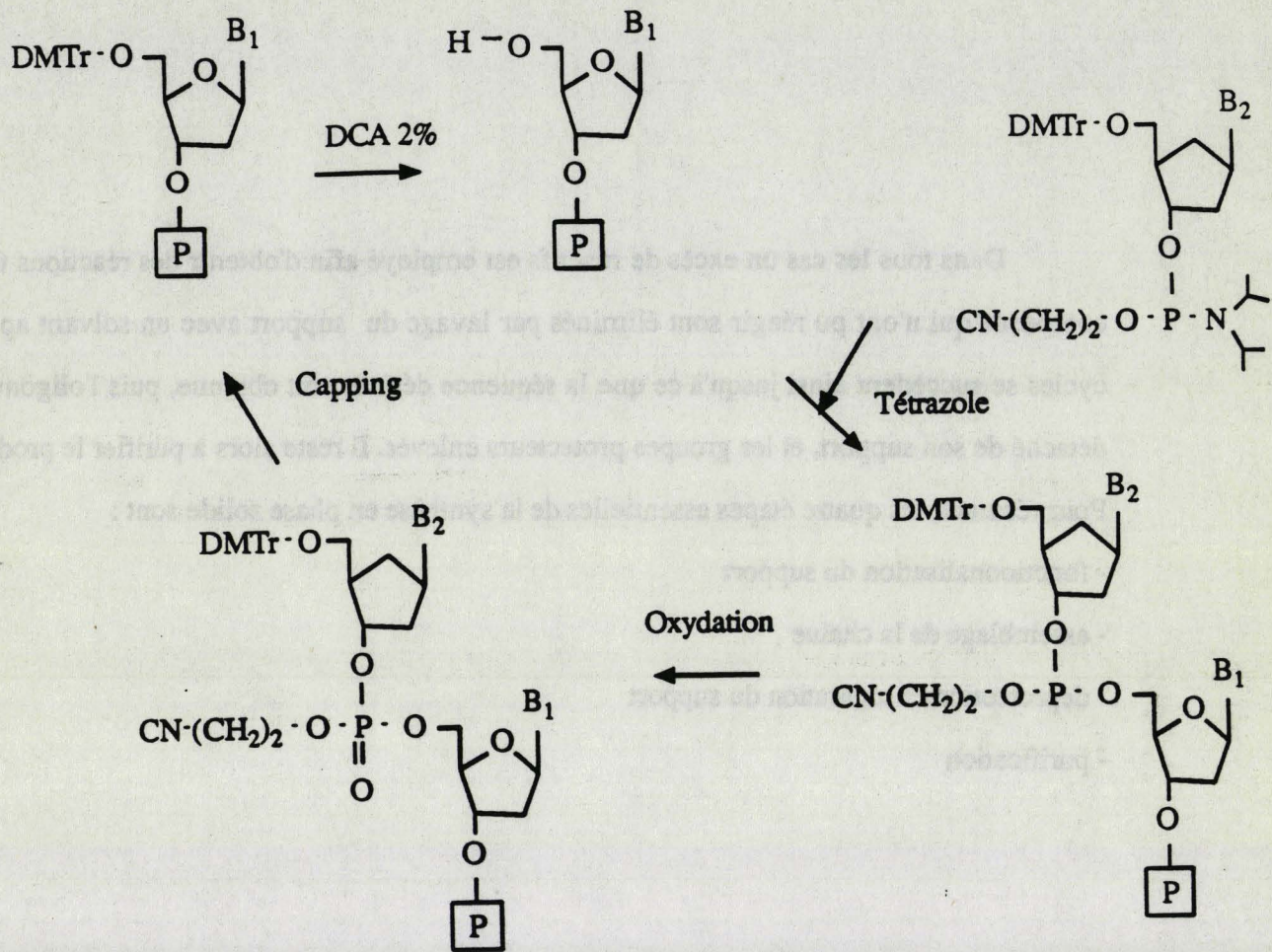


Figure 10 : Assemblage de la chaîne suivant la méthode des phosphoroamidites.



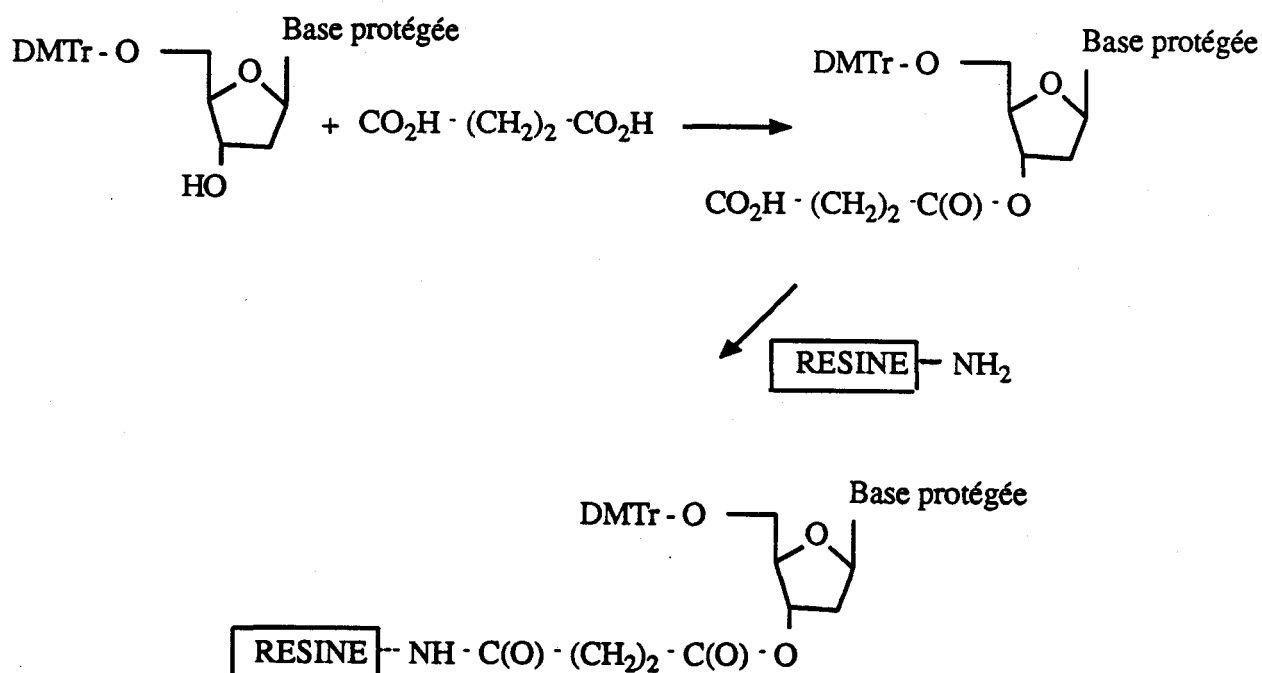


Figure 9 : Formation de la liaison succinate, reliant le nucléoside à sa résine

Cependant, dans la pratique on utilise des colonnes de synthèse remplies de petites billes de silice sur lesquelles le premier nucléoside est déjà fixé. Ces colonnes sont de différentes charges, 0,2  $\mu$ mol, 1  $\mu$ mol, ou encore 10  $\mu$ mol suivant les besoins de la synthèse.

## 2.2 Assemblage de la chaîne

L'assemblage de la chaîne suivant la méthode phosphite triester (ou encore méthode des phosphoroamidites) (Figure 10) étant la plus employée actuellement, seule cette chimie sera développée.

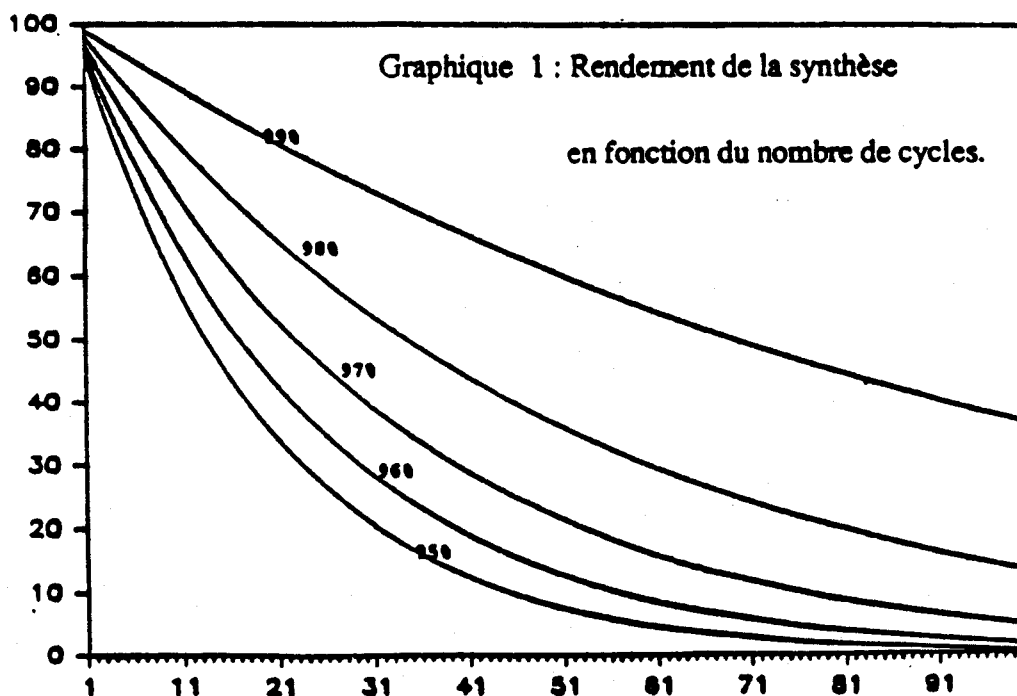
-1) La déprotection du 5' OH du désoxyribonucléotide fixé sur le support est réalisée par l'acide dichloroacétique à 2% dans le chlorure de méthylène.

- 2) Le couplage est ensuite réalisé grâce à un monomère comportant une partie phosphoroamidite en 3'. Le tétrazole est utilisé comme réactif de couplage, cet acide faible ( $pK_a = 4,9$ ) protone l'azote de la partie phosphoroamidite, et permet l'attaque nucléophile du 5' OH déprotégé sur le phosphore.
- 3) Le phosphore au degré d'oxydation III étant réactif, une oxydation à l'iode permet de lui conférer une structure phosphotriester (degré V) plus stable.
- 4) Une étape de capping est réalisée après chaque couplage, afin de terminer l'élongation des chaînes qui ne pourront plus obtenir l'enchaînement nucléotique souhaité. Les 5' OH qui n'ont pu réagir sont acétylés par l'anhydride acétique en présence de diméthylaminopyridine.

### 2.3 Contrôle de la synthèse

Avant l'addition de chaque unité monomérique, le groupement DMTr fixé sur le support est éliminé en milieu acide. La quantité de carbocation DMTr ainsi libérée à chaque cycle peut être mesurée par spectrophotométrie à 500 nm et peut permettre le calcul du rendement par cycle et du rendement global. Le dosage du carbocation DMTr est donc un moyen très utile pour déterminer avant purification la qualité de la synthèse.

Le graphique 1 montre l'évolution du rendement global de synthèse en fonction du nombre de cycles pour un rendement de couplage donné.



Calcul du rendement global pour un oligonucléotide de n-mères.

Soient  $DO_1$  et  $DO_n$  les mesures respectives des quantités de carbocation initiale et finale.

Soit  $R$  le rendement global de synthèse.

On a  $R = DO_n/DO_1$

Calcul du rendement moyen par cycle supposé constant :  $C$

On a alors  $R = C^{(n-1)}$  d'où  $C = \exp(\text{Log}(R) / (n-1))$ .

## **2.4 Déprotection et purification**

Il est primordial que les groupes protecteurs soient enlevés dans le bon ordre. Le groupement phosphate est d'abord déprotégé, puis les bases exocycliques. Le traitement 1 heure à froid par une solution ammoniacale concentrée clive l'oligonucléotide de sa résine et libère les liaisons phosphates, puis on porte à 55°C pendant 5 heures pour déacyler les fonctions amines.

On obtient ainsi un brut de synthèse qu'il faut purifier de ces impuretés. Les impuretés sont de nature différente, mais généralement peu nombreuses :

- Il y a d'abord les chaînes tronquées (acétylées en cours de synthèse).
- Les chaînes à bases modifiées, et celles provenant de la rupture internucléotidique pendant les déprotections.
- Les groupes protecteurs éliminés.

# **C) PURIFICATIONS ET CONTROLES**

## ***1) TECHNIQUES DE PURIFICATION***

### **1.1 Chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse**

Dans l'HPLC phase inversée, la phase stationnaire est moins polaire que la phase mobile. Les supports utilisés sont des billes de silice sur lesquelles sont greffées des chaînes hydrocarbonées. L'éluant est constitué d'un gradient de solvants aqueux et organiques. Les solvants d'élution sont

choisis en fonction de leur viscosité, leur hydrophobie et leur capacité à solubiliser les échantillons. Les molécules sont séparées en fonction de leur affinité vis à vis des phases stationnaires et mobiles. Le temps de rétention augmente donc avec leur caractère hydrophobe. L'éluat est détecté par spectrophotométrie ultra-violette à 260 nm.

Après le dernier cycle de la synthèse, on prend soin de ne pas éliminer le groupement protecteur DMTr du 5' OH. Après traitement à l'ammoniaque on dépose le brut de synthèse en tête de colonne, puis on élue par un gradient d'hydrophobie croissante. Le produit protégé se distingue des chaînes tronquées par un temps de rétention plus élevé et peut donc être récupéré aisément. Sur ce dernier échantillon un traitement à l'acide acétique 80% libère l'extrémité 5' OH.

### 1.2 Purification par colonne OPC (oligonucléotides purification cartridge)

Le principe de purification sur ces colonnes obtenues dans le commerce est le suivant : Le brut de synthèse est déposé en tête de colonne, dans un premier temps l'élution avec un tampon approprié décroche les chaînes tronquées mais pas l'oligonucléotide 5' DMTr. Dans un deuxième temps l'élution par une solution acide permet de récupérer l'oligonucléotide 5' OH pur.

### 1.3 Purification par chromatographie liquide haute performance échange d'anions

Il n'est pas nécessaire de conserver le dernier groupe protecteur pour déposer le brut sur la colonne. Un gradient salin décroche les oligonucléotides par charge et donc par taille croissante, le dernier produit élué correspond donc au produit désiré.

### 1.4 Purification par gel d'électrophorèse

Les oligonucléotides étant de par leur groupements phosphates des espèces négativement chargées, une des méthodes de purification employées est l'électrophorèse sur gel. Pratiquement il s'agit de faire migrer le brut de synthèse de la cathode vers l'anode. La migration vers la borne positive est d'autant plus rapide que la taille de l'oligonucléotide est petite. Ainsi après quelques

heures sous tension le gel présente une série de bandes (détectées en U.V) dont la majoritaire, (celle se trouvant la plus proche de la cathode) correspond au produit désiré. Il faut ensuite découper cette bande, et en extraire l'oligonucléotide.

## **2) CONTROLES**

### **2.1 Chromatographie sur couche mince**

Les chromatographies sont effectuées sur un gel de silice comportant un marqueur fluorescent. L'oligonucléotide déposé en spot en bas de la plaque est séparé selon son coefficient de partage entre la phase stationnaire très polaire la silice, et la phase mobile constituée d'un mélange solvant approprié. Les plaques observées sous une lampe U.V. révèlent la position des produits. Chaque produit est caractérisé par son Rf (rapport de la distance de migration du produit sur la distance de migration du solvant). Toutefois cette technique n'est bien résolutive que pour les oligonucléotides de petite taille (inférieur à quatre bases).

### **2.2 Chromatographie liquide haute performance en phase inverse**

Le principe est identique à celui de l'HPLC préparative, la différence provient des quantités d'échantillon injectées. Cependant les quantités ne dépassant jamais 1 mg, c'est la même colonne qui sert pour la purification et le contrôle.

### **2.3 Digestion enzymatique couplée à l'HPLC phase inverse**

L'action de deux enzymes phosphodiesterase et phosphatase sur un oligodésoxyribonucléotide, le scinde en ses quatre nucléotides de base. la chromatographie liquide haute performance de ce brut peut permettre de déterminer la proportion relative de ces quatre nucléosides dans l'oligodésoxyribonucléotide de départ.

## 2.4 Spectrométrie de masse TOF (Time of Flight)

La source d'ionisation est le Californium 252, qui a une demie vie de 2,65 années. Il se décompose selon deux voies.

- en majorité (96,9%) par rayonnement alpha, celui-ci étant rapidement absorbé.
- pour 3,1% par fragmentation issu d'une fragmentation spontanée.

Les produits de fission, chargés positivement se repoussent, et l'angle entre leur trajectoire est de  $180^\circ$ . Au début de chaque cycle, un des fragments de fission vient heurter une feuille d'aluminium. Celle-ci émet des électrons collectés par un détecteur, ce dernier servant de chronomètre fixant le temps de départ. L'autre fragment de fission émis dans le sens opposé, provoque par collision avec le support échantillon, la désorption et l'ionisation de l'échantillon se trouvant dans la zone d'impact. Les ions formés soumis à une différence de potentiel (positive ou négative) sont accélérés dans un tube où règne le vide. Le temps de vol de l'ion entre le support échantillon et le détecteur est mesuré en tenant compte du temps de départ donné par le premier détecteur (Figure 10 B). La vitesse de l'ion étant uniquement fonction de la charge, l'information peut être convertie à l'aide d'un logiciel pour donner la masse moléculaire.

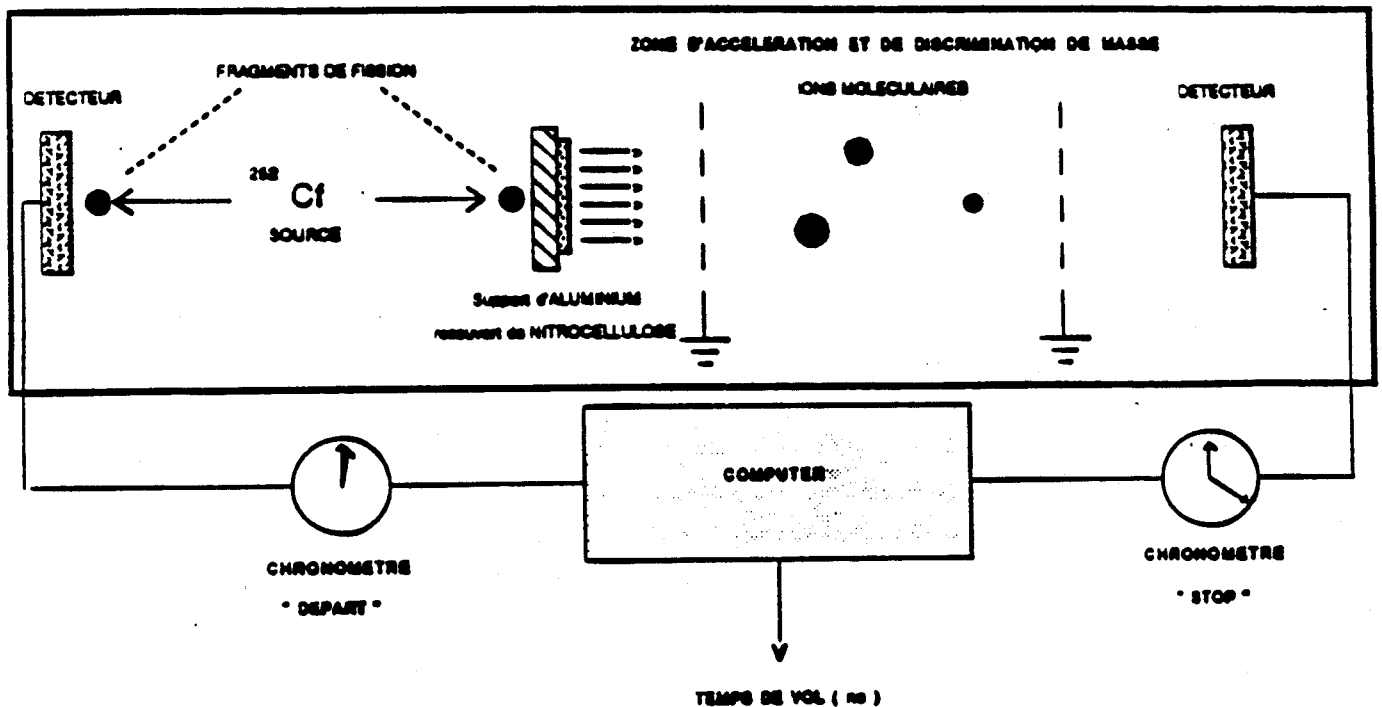


Figure 10 B : Schéma général du spectromètre de masse TOF

**MODIFICATION D'OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES**

**EN PHASE SOLIDE SUR L'EXTREMITE 5'**

## A) INTERET DE MODIFIER LES OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES EN 5'

### 1) *HYBRIDATION ET MISE EN EVIDENCE*

Les oligonucléotides synthétiques peuvent être utilisés pour mettre en évidence une séquence génomique cellulaire. Il faut pour cela, dans un premier temps, que l'oligonucléotide puisse s'hybrider correctement à cette séquence en portant un signal détectable.

#### 1.1. Hybridation non perturbée

Une modification chimique, sur l'extrémité 5' d'un oligodésoxyribonucléotide, ne perturbe pas l'établissement des liaisons hydrogènes responsables de l'hybridation si le groupe reporter n'est pas trop encombrant ou s'il est fixé par un bras suffisamment long. Par contre l'incorporation d'une molécule signal sur une amine exocyclique perturbera inmanquablement l'hybridation.

#### 1.2. Mise en évidence de l'hybridation

La méthode employée pour détecter l'hybridation est le marquage de l'oligodésoxyribonucléotide synthétique qui jouera ainsi le rôle de sonde. La plus répandue des techniques de marquage est l'incorporation du phosphore 32 radioactif sous la forme d'un groupe phosphate en 5'. La radioactivité du complexe hybridé est repérée par autoradiographie. Bien qu'une haute sensibilité de détection puisse être obtenue, cette méthode de marquage, très coûteuse, doit être appliquée dans des laboratoires habilités.

C'est pourquoi de nombreux travaux visent à remplacer le marquage radioactif par un marquage utilisant des molécules froides, en tentant de limiter les pertes dues à ce transfert technologique (en général perte de sensibilité d'un facteur 20 à 50).



- Marquage à la biotine

La sonde oligonucléotidique peut être porteuse en 5' d'une molécule m détectable par une molécule M ayant une bonne affinité pour la partie m. C'est à cette classe qu'appartient le système biotine-avidine. La fixation de la biotine en 5' est de plus en plus employée pour le marquage des sondes oligodésoxyribonucléotidiques (Chu, 1985), (Chollet, 1985), (Kempe, 1985), (Cocuzza, 1985). En effet, l'utilisation des sondes biotinylées en association avec l'avidine et un système de détection enzyme-substrat fait apparaître une forte coloration de l'hybridation (Figure 11).

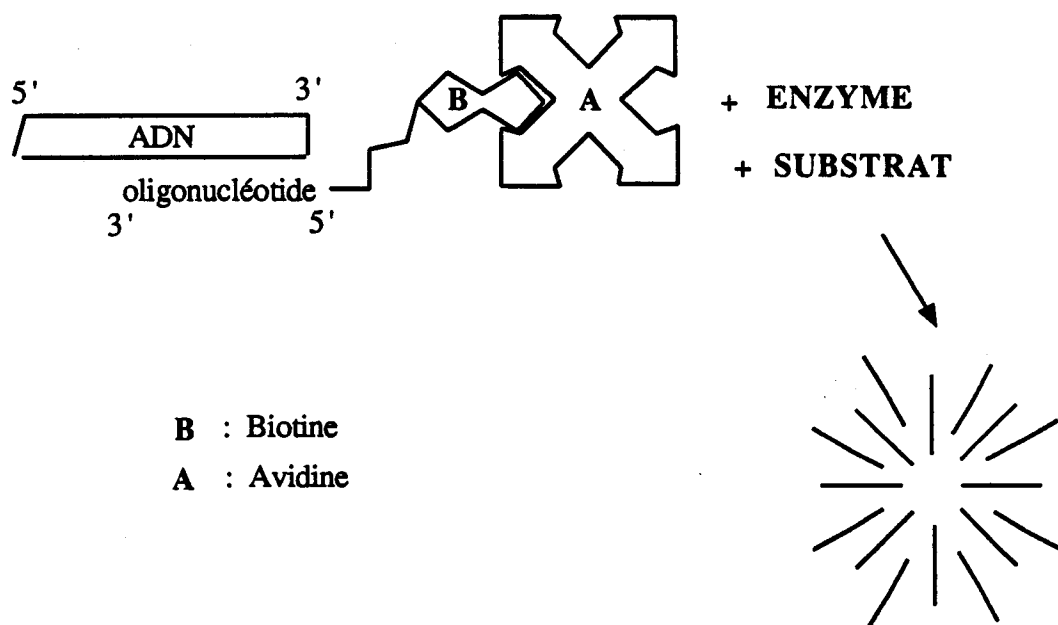


Figure 11 : Détection de l'hybridation grâce au système biotine-avidine

- Marquage par des groupements fluorescents.

Un oligodésoxyribonucléotide fluorescent peut servir à la détection d'une hybridation (Bains, 1989), et à sa localisation cellulaire (Loke, 1989). La fluorescéine est souvent employée pour marquer de tels oligonucléotides.

## 2) UTILISATION DE GROUPES FLUORESCENTS POUR LE SEQUENCAGE DE L'ADN

La détermination d'une séquence d'ADN est un des outils fondamentaux en biologie moléculaire. Deux méthodes de séquençage existent :

- La méthode de la dégradation chimique (Maxam et Gilbert, 1980)
- La méthode enzymatique de Sanger, 1977.

Initialement ces méthodes utilisaient un mode de détection basé sur la radioactivité du phosphore 32. Maintenant l'utilisation d'oligonucléotides comportant un groupe fluorescent en 5' (fluorescéine, tétraméthyl - rhodamine, rouge de texas, nitrobenzooxotriazole) dans les techniques de séquençage de l'ADN permet d'éviter l'emploi de la radio-activité.

### 3) OPTIMISATION DU PHENOMENE D' HYBRIDATION

Des agents intercalants (dérivés de l'acridine) ont été fixés de façon covalente sur un oligonucléotide (Hélène, 1985), (Asseline, 1984), (Wakelin, 1986).

L'oligonucléotide conserve la propriété de se lier de façon spécifique à la séquence complémentaire. Mais la partie aromatique de l'intercalant apporte une énergie d'interaction supplémentaire qui stabilise fortement le complexe formé. Ceci est représenté sur la figure 12.

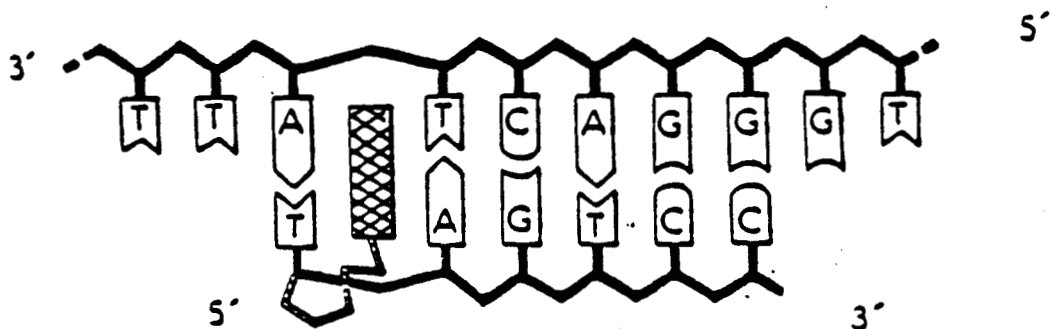


Figure 12 : Représentation schématique de la structure du complexe entre l'oligonucléotide lié à l'acridine et sa séquence complémentaire

## B) INTERET DE REALISER LES MODIFICATIONS EN PHASE SOLIDE

### *1) ELIMINATION DES REACTIFS EN EXCES PAR LAVAGE*

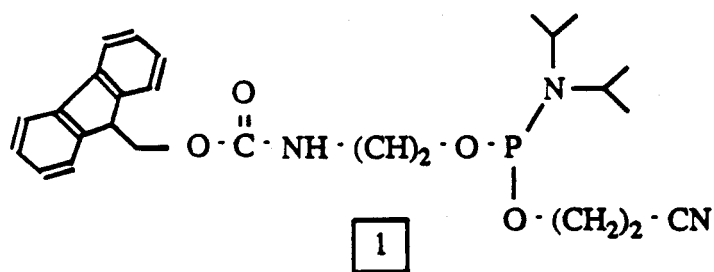
La transformation d'un produit en plusieurs étapes, impose que chaque étape se déroule avec un rendement optimal. L'utilisation en excès des réactifs nécessaires à chaque transformation contribue bien sûr à favoriser ce rendement. Ceci est d'autant plus recommandable en phase solide où les réactifs excédentaires sont facilement éliminés par essorage et lavage, le produit intéressant restant toujours fixé sur la résine.

La modification d'oligodésoxyribonucléotide en phase homogène, exige de travailler avec un excès de réactifs par rapport au polymère. Deux étapes de purification sont ensuite nécessaires. La première est réalisée par gel-filtration, où les molécules sont séparées en fonction de leur taille, on sépare ainsi la partie oligonucléotidique. La deuxième purification est réalisée par HPLC ou électrophorèse pour isoler l'oligonucléotide modifié.

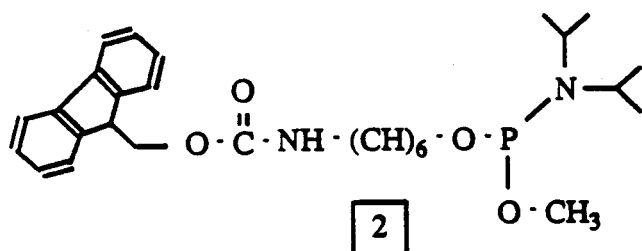
### *2) MINIMISATION DES REACTIONS SECONDAIRES*

A la fin de la synthèse l'oligodésoxyribonucléotide désiré est toujours fixé sur sa résine. Lui seul pourra réagir par son extrémité 5'OH. En effet, les chaînes plus courtes (tronquées) ont été acétylées en 5'.

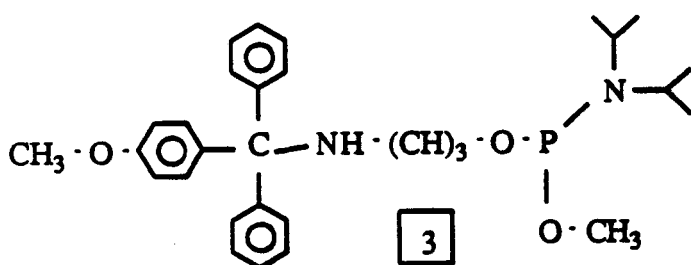
De même les fonctions amines exocycliques des bases ainsi que les groupements phosphates sont toujours protégés.



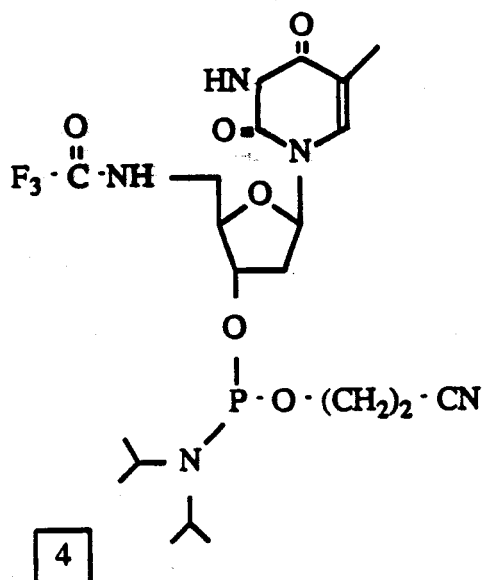
AGRAWAL, 1986



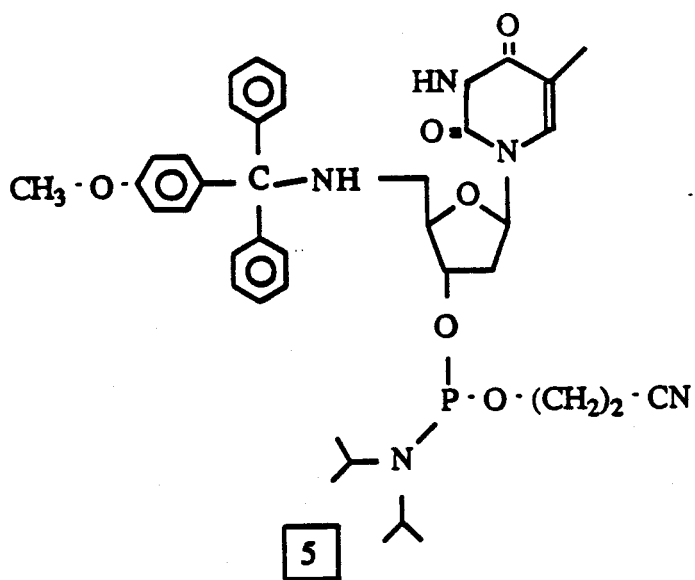
AGRAWAL, 1989



CONNOLLY, 1987



SPROAT, 1987



SMITH, 1987

Figure 13 : Molécules décrites dans la littérature

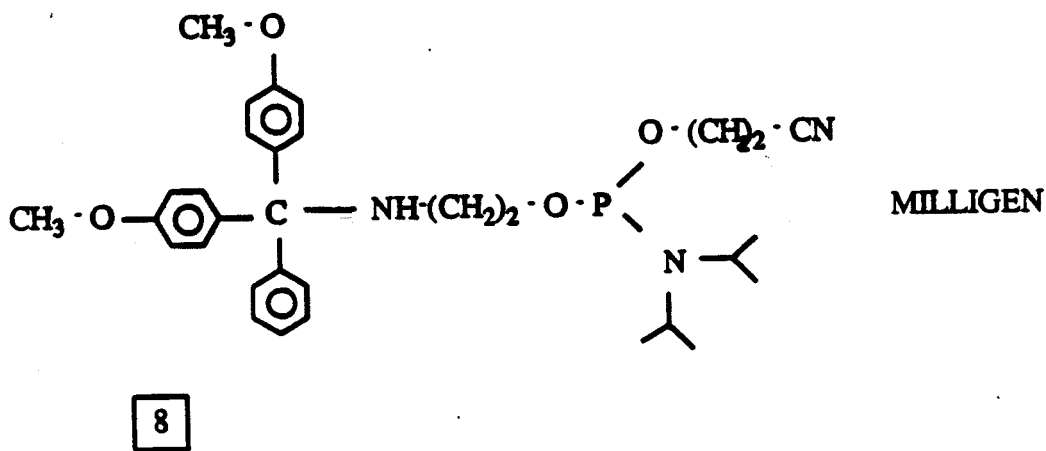
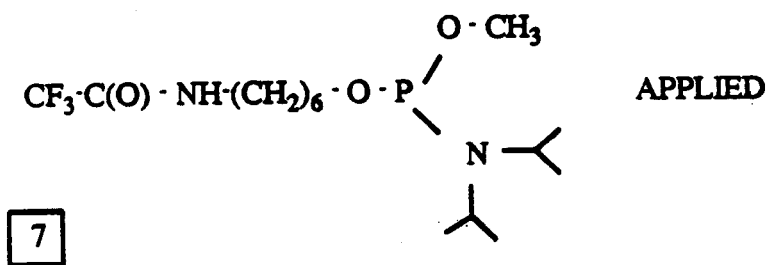
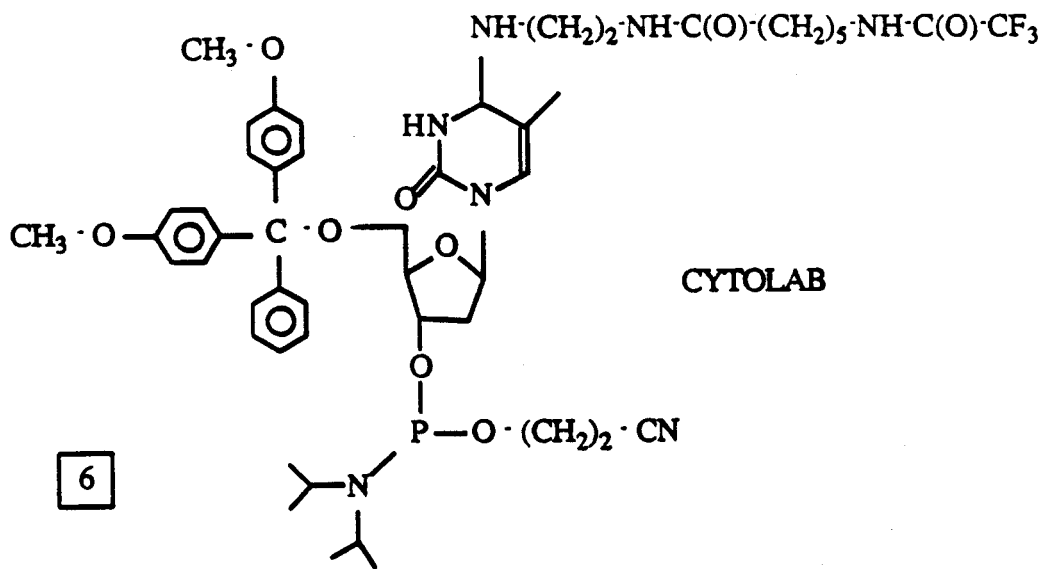


Figure 14 : Molécules commerciales

## C) METHODE GENERALE POUR LA MODIFICATION EN 5'

### 1) INTRODUCTION

Quand on désire modifier un oligodésoxyribonucléotide au niveau de son extrémité 5', la réactivité moyenne de la fonction alcool amène généralement à la substituer par une fonction amine primaire.

### 2) FONCTIONNALISATION DU 5'OH EN 5'NH<sub>2</sub>

#### 2.1. Etude bibliographique

##### 2.1.1 Méthode des phosphoroamidites

L'élongation de la chaîne nucléotidique en phase solide par la méthode des phosphoroamidites, doit son succès en partie, à la très bonne réactivité du groupe phosphoroamidite sur l'alcool en 5'. Cette réactivité peut être utilisée pour la fixation en 5' d'une molécule possédant outre le groupe phosphoroamidite, une fonction amine protégée.

La fonctionnalisation est alors réalisée en deux étapes. La première étape consiste à coupler cette molécule sur le 5' OH d'un oligonucléotide sur résine avec le tétrazole comme activateur.

La deuxième étape comprend l'oxydation du phosphore III en phosphore V, puis la déprotection de la fonction amine.

L'avantage de cette méthode tient en ce que les réactifs sont utilisables directement, sur le synthétiseur. Seulement ces réactifs sont peu stables et leur synthèse est réalisée à partir de réactifs très coûteux.

#### Exemple de molécules

- Molécules décrites dans la littérature (Figure 13).
- Molécules commerciales (Figure 14).

Les molécules protégeant leur fonction amine par des (Fmoc) fluorénylméthoxy-carbonyle, 1 et 2 ou par un groupement trifluoroacétyle 4, 6 et 7 sont prévues pour libérer l'amine en solution

ammoniacale. Ainsi les aminooligonucléotides obtenus ne peuvent qu'être modifiés en phase homogène.

Les groupements méthoxy protégeant le phosphore [2], [3] et [7] ont l'avantage de résister aux conditions ammoniacales de déprotection. Ainsi au lieu d'obtenir une liaison phosphate, on obtient une liaison phosphotriester plus résistante aux nucléases.

### 2.1.2 Méthode de Watcher, 1986.

Cette méthode utilise le carbonyl-dimidazole en large excès dans le dioxane pour activer l'hydroxyle en 5'. Le groupement imidazole est ensuite déplacé par le diaminohexane dans un mélange dioxane-eau (Figure 15).

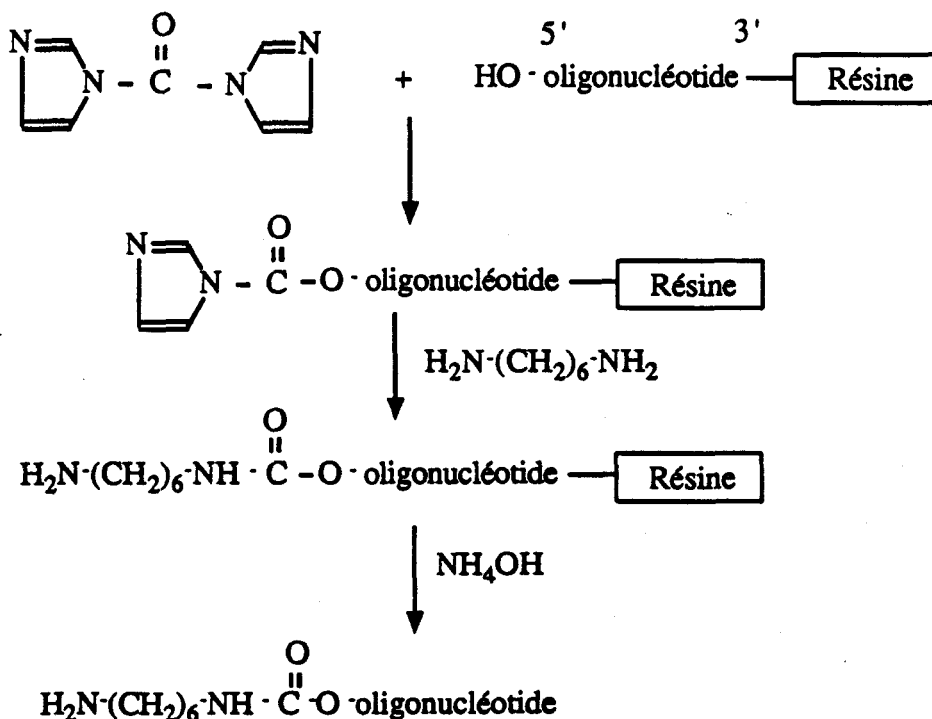


Figure 15 : Synthèse d'un aminooligonucléotide par la méthode de WATCHER

La réaction est totale en 30 minutes.

La liaison carbamate ainsi générée supporte les conditions ammoniacales normales de déprotection et de clivage. Watcher a montré également que l'action du diaminohexane ne provoquait pas la rupture de la liaison ester succinate fixant l'oligonucléotide à la résine.

### 2.1.3 Conclusion

Les réactifs phosphoroamidites commerciaux s'utilisent sur les synthétiseurs automatiques dans un conditionnement prévu pour réaliser au moins dix couplages.

Pour rentabiliser leur utilisation il faut donc :

- s'assurer de l'excellente qualité du tétrazole (agent couplant) .
- avoir un grand nombre d'oligonucléotides à fonctionnaliser en 5'NH<sub>2</sub>, car une fois dilués dans l'acétonitrile, ces réactifs phosphoroamidites doivent être impérativement utilisés dans la semaine qui suit.

La méthode de Watcher, utilise des produits commerciaux peu coûteux, et permet d'obtenir un amino-oligonucléotide en un temps assez court (1 heure).

Cette méthode est aussi d'utilisation beaucoup plus souple car les réactions de couplage peuvent être réalisées dans de simples tubes Eppendorf.

Pour ces différentes raisons, nous avons donc décidé d'adopter cette dernière méthode.

## 3) REACTION POSSIBLES SUR LE 5' NH<sub>2</sub>

### 3.1 Etude bibliographique

Dans la littérature deux types de réactions ont été décrites par la fixation de molécules sur un 5' aminooligodésoxyribonucléotide en phase solide.

#### 3.1.1. Couplage avec des esters activés

Une des méthodes pour former une liaison amide entre l'aminooligonucléotide et une molécule acide, est d'activer la fonction carboxylique de cette dernière. La N-hydroxysuccinimide est



particulièrement employée pour l'obtention d'ester de N-hydroxysuccinimide, beaucoup plus réactif que l'acide correspondant vis-à-vis des fonctions amines (Figure 16) .

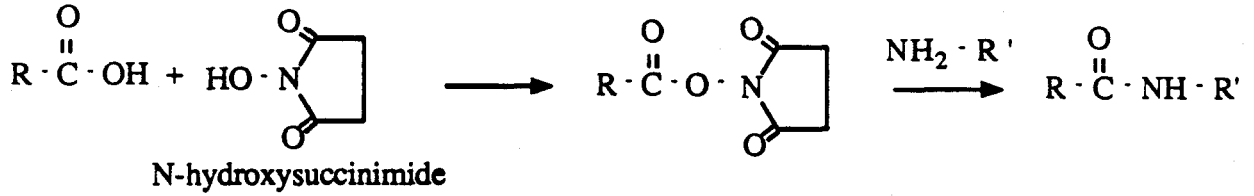


Figure 16 : Couplage grâce à l'activation par la N-hydroxysuccinimide

Watcher (1986) a appliqué cette technique à la biotine (qui possède une fonction carboxylique). Un excès d'ester activé de la biotine (biotine-OSu) mis en réaction (4 heures dans le DMF) avec un amino-oligonucléotide toujours fixé sur résine est transformé quasi-totalement (Figure 17) .

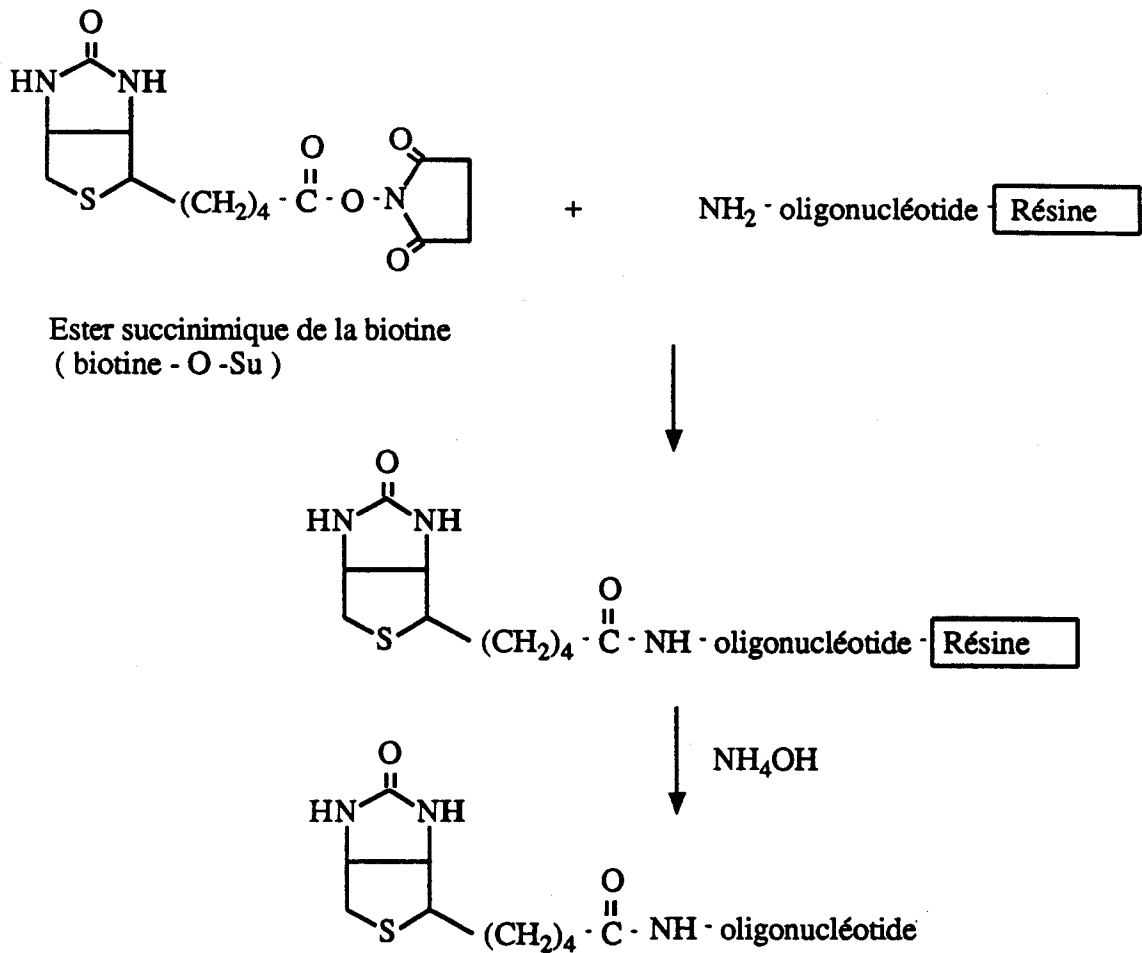
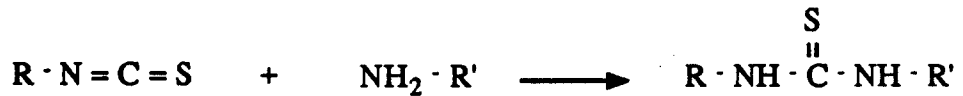


Figure 17 : Synthèse d'un oligonucléotide biotinylé grâce à l'emploi de la biotine-O-Su

### 3.1.2. Couplage avec des isothiocyanates

Les isothiocyanates réagissent rapidement avec les amines primaires en milieu basique.

Réaction :



Ainsi l'isothiocyanate de fluorescéine a été couplé en phase solide sur un amino-oligonucléotide par Smith (1985). Un large excès de fluorophore dans un mélange DMF-DIEA donne 80% de transformation en une nuit.

### 3.1.3. Conclusion

L'étude bibliographique montre que peu de réactifs ont été couplés sur un amino-oligonucléotide en phase solide.

La formation d'ester activé ou l'incorporation de la fonction isothiocyanate n'étant pas toujours commode ou envisageable, nous avons cherché d'autres méthodes permettant le couplage direct d'une molécule à fonction carboxylique sur l'aminooligodésoxiribonucléotide en phase solide.

## 3.2 Autres méthodes envisagées

A température ambiante, la réaction entre une amine aliphatique et un acide carboxylique aboutit à la formation d'un sel. Pour obtenir une liaison amide, l'énergie d'activation nécessaire peut être obtenue par effet de température, ce qui peut poser des problèmes de dégradation.

Aussi la liaison amide est le plus souvent obtenue en activant le partenaire carboxylique. L'activation de la fonction carboxylique est effectuée à l'aide d'un groupe électroattracteur, bon groupe partant, la rendant plus électrophile et donc plus sensible à l'attaque nucléophile du doublet de l'azote du partenaire aminé. L'intérêt de passer par la méthode des esters activés est qu'ils peuvent aussi être formé *in situ* à partir de l'acide.

Dans cette optique, nous avons utilisé pour la première fois des agents couplant comme la Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ou l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthyl-amino-phosphonium (Bop), (Castro, 1975), couramment utilisés en synthèse peptidique en phase solide.

### 3.2.1 Couplage d'acide grâce à la DCC

Dans le cas des carbodiimides, l'activation résulte de l'addition du carboxyle sur la double liaison de la carbodiimide menant à une O-acylisourée.

La réaction de couplage par attaque du doublet de l' $\alpha$  amine peut cependant être concurrencée par un réarrangement de la O-acylisourée réactive, en N-acylurée non réactive (Figure 18).

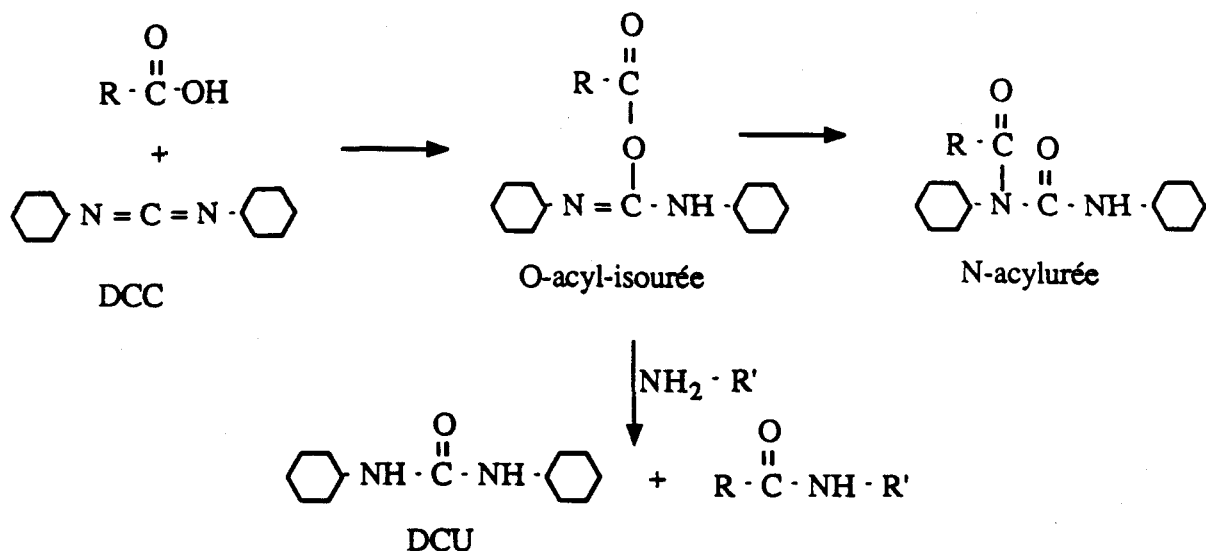


Figure 18 : Agent de couplage : DCC

Dans la mesure où la quantité d'acide disponible et de DCC était importante, nous avons choisi de travailler avec un gros excès de façon à optimiser des rendements de couplage.

### 3.2.2. Couplage d'acide grace au Bop.

Le Bop (hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthyl-amino-phosphonium) ou réactif de Castro est généralement présenté comme le réactif de couplage idéal aussi bien pour la cinétique de réaction que pour les bons rendements obtenus. Préparé pour la première fois par Castro par action de la tris diméthylaminophosphine sur l'hydroxybenzotriazole, en présence de tétrachlorure de carbone et réaction subséquente avec l'hexafluorophosphate de potassium. Il a été principalement utilisé en synthèse en phase homogène à ses débuts et progressivement étendu à la synthèse en phase solide.

Ce sel stable, non hygroscopique est soluble dans la plupart des solvants utilisés lors des synthèses (dichlorométhane, diméthylformamide)

Mécanisme de réaction (Figure 19) :

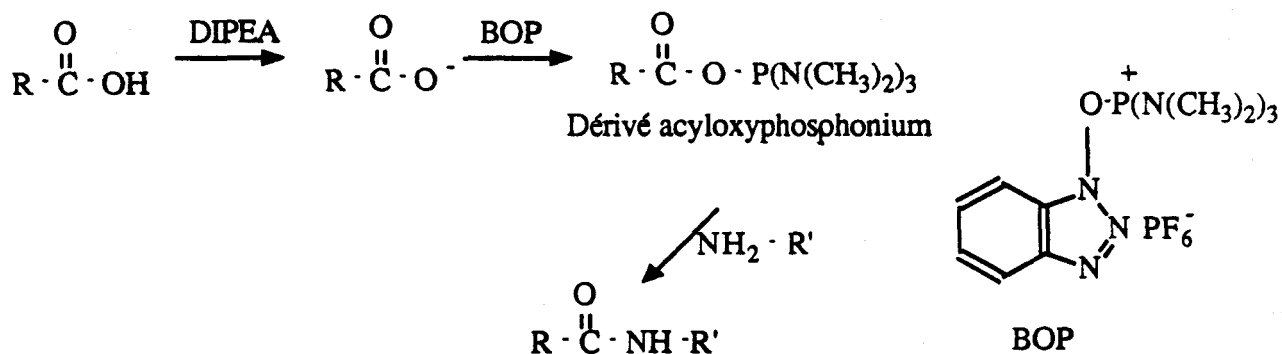
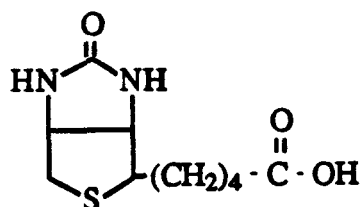


Figure 19 : Agent de couplage : BOP

L'acide salifié par la présence de diisopropylethylamine réagit avec le Bop pour donner un intermédiaire acyloxyphosphonium. L'attaque nucléophile du partenaire aminé va alors réaliser la formation de la liaison amide.

### 3.3 Application au couplage de trois acides différents en 5' d'un aminooligodésoxyribonucléotide.

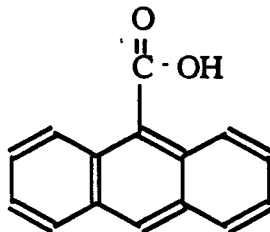
#### 3.3.1. La biotine



Biotine

La biotine souvent couplée sous forme d'ester activé, présente de nombreuses utilisations en biologie moléculaire.

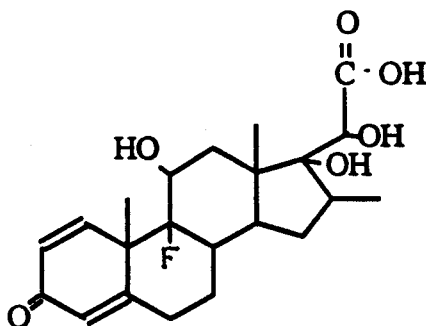
### 3.3.2. L'acide anthracène-9-carboxylique



Acide anthracène-9-carboxylique

Molécule fluorescente pouvant par exemple servir à détecter une hybridation.

### 3.3.3. Acide dérivé de la dexaméthasone



Acide dérivé de la Dexaméthasone

La synthèse de cet acide sera détaillée ultérieurement (D.3.1.)

Le choix de la dexaméthasone s'explique par l'existence d'un récepteur cytoplasmique pour ce glucocorticoïde laissant envisager lors de leur translocation nucléaire, le transport de l'oligonucléotide couplé et son interaction au niveau de l'ADN du noyau.

## 4) SUIVI ET CONTROLE DES DIFFERENTES REACTIONS

### 4.1. Démarche entreprise

Pour suivre et contrôler les différentes réactions effectuées en phase solide sur un oligonucléotide, on procède de la manière suivante :

A chaque étape on traite un échantillon de résine avec une solution ammoniacale concentrée (pour cliver l'oligonucléotide de sa résine et lui enlever ses groupes protecteurs).

Le brut est analysé en HPLC phase inverse, le ou les nouveaux produits qui apparaissent sont purifiés par chromatographie sur couche épaisse ou par HPLC. Enfin ces oligonucléotides purifiés sont contrôlés en spectrométrie de masse TOF.

#### 4.2. Réactions sur des oligonucléotides de petite taille

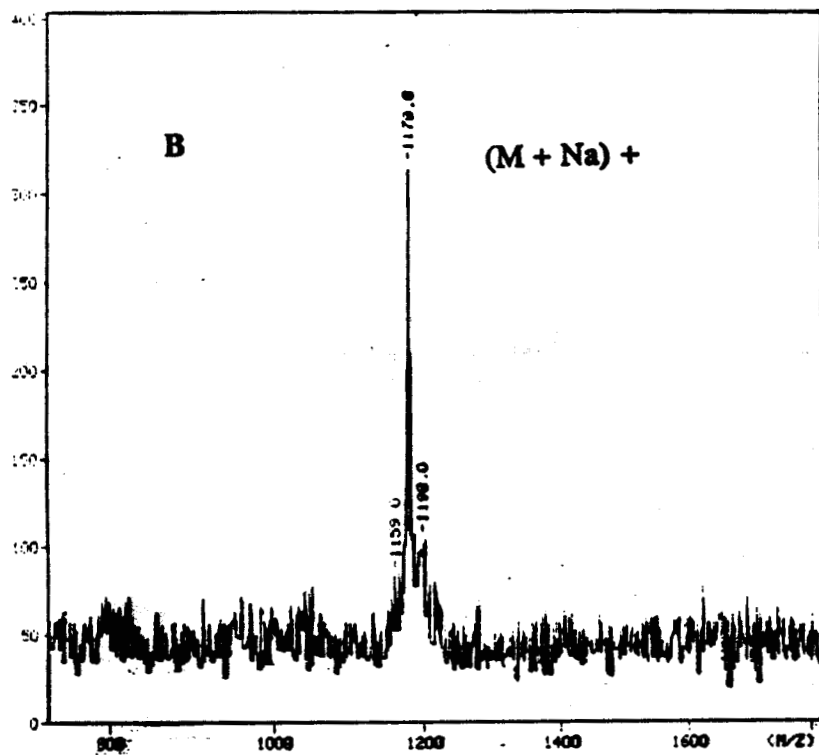
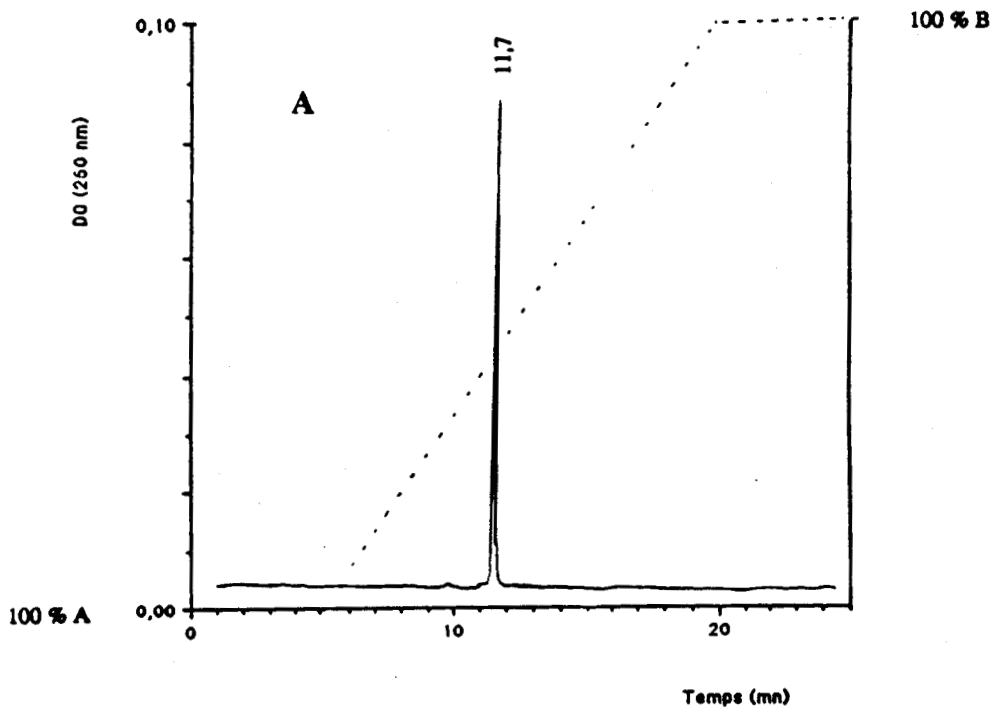
Pour que les spectres HPLC soient exploitables, il est nécessaire que les produits obtenus puissent être caractérisés par des temps de rétention différents les uns des autres.

Ceci n'est réalisable que si les oligonucléotides sont de petite taille, mais pas trop quand même, car l'absorption à 260nm due aux bases puriques et pyrimidiques s'en trouverait trop diminuée et rendrait difficile la détection en HPLC.

D'autre part les oligonucléotides possédant une charge négative au niveau de chaque groupe phosphate internucléotidique sont des espèces fortement chargées (et donc très peu "volatiles"), et seuls les petits oligomères sont susceptibles d'être caractérisés par spectrométrie de masse "TOF" (Time of Flight).

Pour toutes ces raisons, l'utilisation d'oligotétramères nous a semblé un bon compromis et plus précisément les tétrathymidylates car non protégés au niveau de la base, ils sont clivés de leur résine par simple traitement à froid.

Le clivage de l'oligo de sa résine ainsi que les déprotections ont été réalisés dans une solution d'ammoniaque concentrée suivant le protocole standard: une heure à température ambiante, puis 5 heures à 55°C. Ceci, afin de s'assurer que l'ammoniac ne soit pas la source de réactions secondaires. Cependant les réactions sur un tétrathymidylate peuvent être contrôlées après un traitement ammoniacal d'une heure seulement, à température ambiante car la thymidine n'a pas d'amine exocyclique à déprotéger.



(M+Na)+ : Masse moléculaire théorique : 1177

observée : 1178,8

Figure 20 : Spectres HPLC (A) et TOF (B) de 5' HO - T<sub>4</sub>



## 5) RESULTATS

### 5.1. Synthèse de l'aminotétrathymidilate.

Après avoir synthétisé un tétrathymidilate 5'OH nous avons effectué les deux transformations nécessaires à l'obtention de l'aminotétrathymidilate correspondant.

#### 5.1.1. Synthèse du tétrathymidilate 5'OH

Cette synthèse est réalisée sur le synthétiseur Milligène 7500 selon la chimie des phosphoramidites. La charge de la colonne de synthèse utilisée est de 1 $\mu$ mol. Après s'être assuré du bon déroulement de la synthèse, par l'étude du profil des détritylations (voir histogramme), on traite une partie de cette résine en solution ammoniacale.

Trityl Data for Notebook: T4 Column: 1 Yield: 126.1%  
Run: Oct 16, 1989 - 1:52 pm through Oct 16, 1989 - 4:19 pm

1.	4901	T	*****
2.	4331	T	*****
3.	4638	T	*****
4.	5337	T	*****

#### Histogramme des détritylations du tétrathymidylate

Les spectres HPLC et TOF sont présentés (Figure 20).

Les deux systèmes solvants utilisée en HPLC sont les suivants :

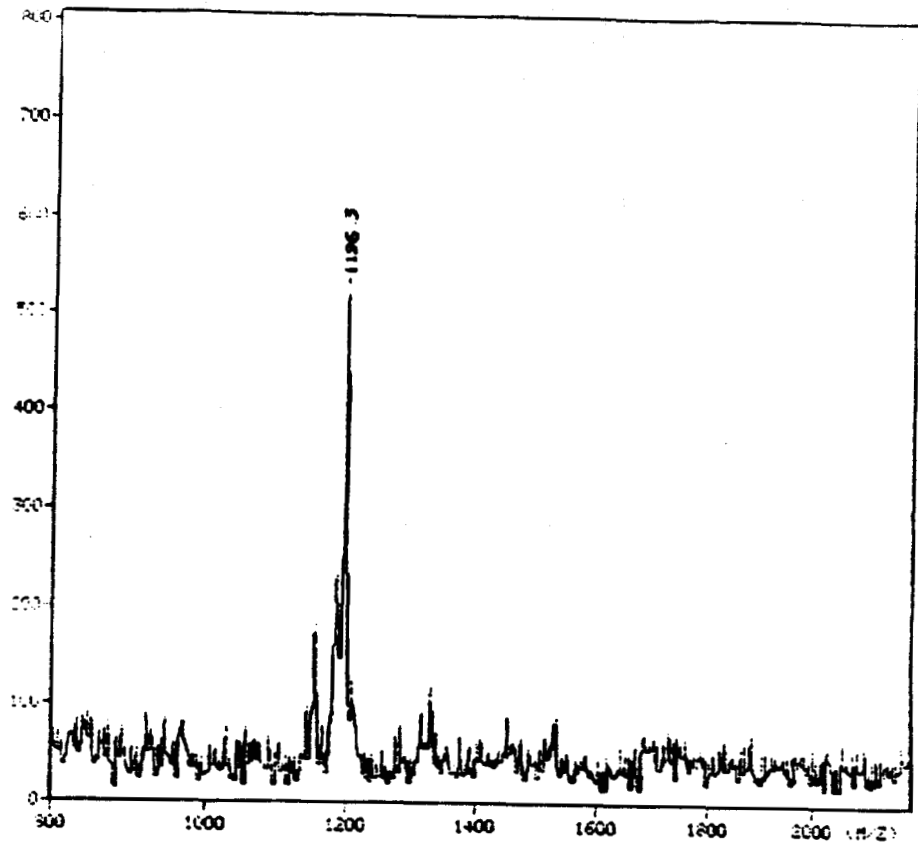
Système A : Acétate d'ammonium 0,1 M

Système B : Acétate d'ammonium 0,1 M / acétonitrik(50:50)

Le gradient est représenté sur la figure 20-A. Dans la suite, toutes les HPLC seront réalisées avec les conditions de gradient décrites ici.

#### 5.1.2. Activation du 5'OH par le carbonyldiimidazole

La résine précédente est mise en solution dans la pyridine (meilleur solvant que le dioxane) avec 500 équivalents de carbonyldiimidazole, ce milieu réactionnel est agité une demie heure à température



(M-H) - : Masse moléculaire théorique : 1196  
 observée : 1196,3

Figure 21 : Spectre de masse TOF de 5' NH<sub>2</sub>-C(O)O-T<sub>4</sub>

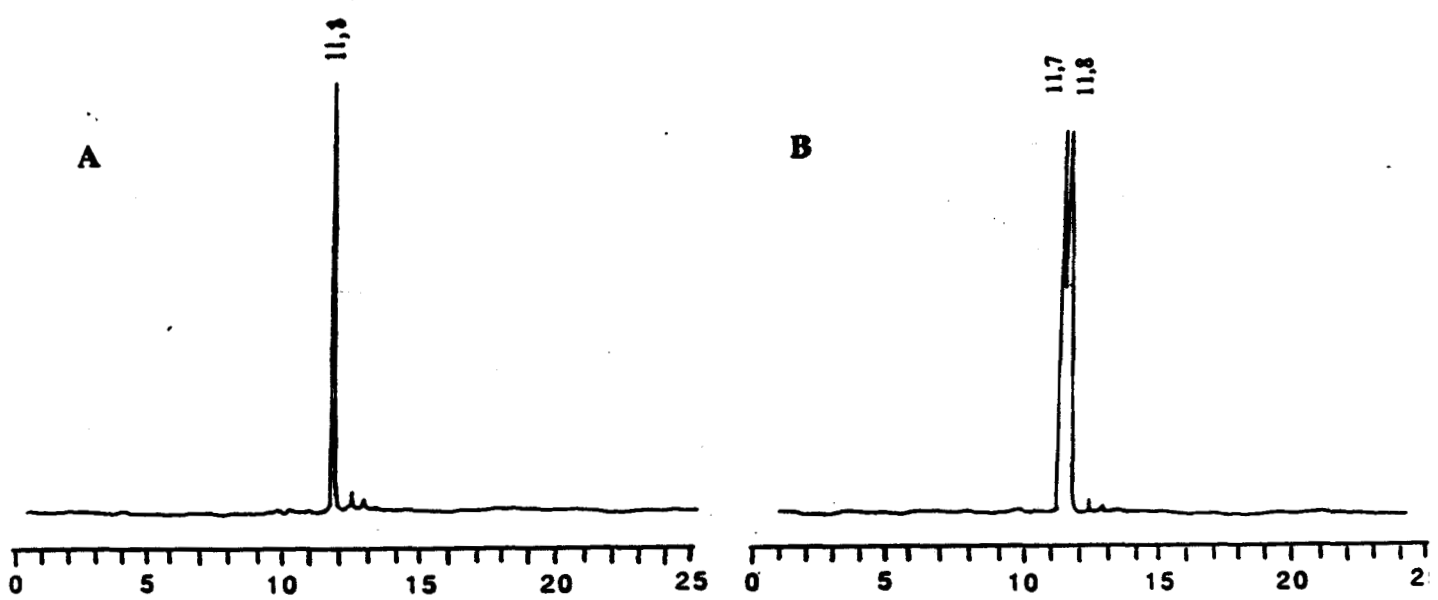
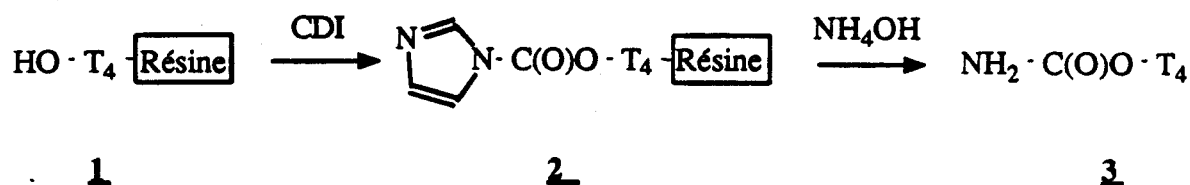


Figure 22 : HPLC de (A) : 5' NH<sub>2</sub>-C(O)O-T<sub>4</sub>

(B) : mélange de 5' HO - T<sub>4</sub> et de 5' NH<sub>2</sub>-C(O)O-T<sub>4</sub>

ambiante pour donner l'alcool activé **2**. Le produit **2**, ne peut être mis en évidence que sous forme carboxamide **3** comme le prouve le contrôle TOF (Figure 21) puisque le clivage de la résine nécessite un traitement ammoniacal préalable.

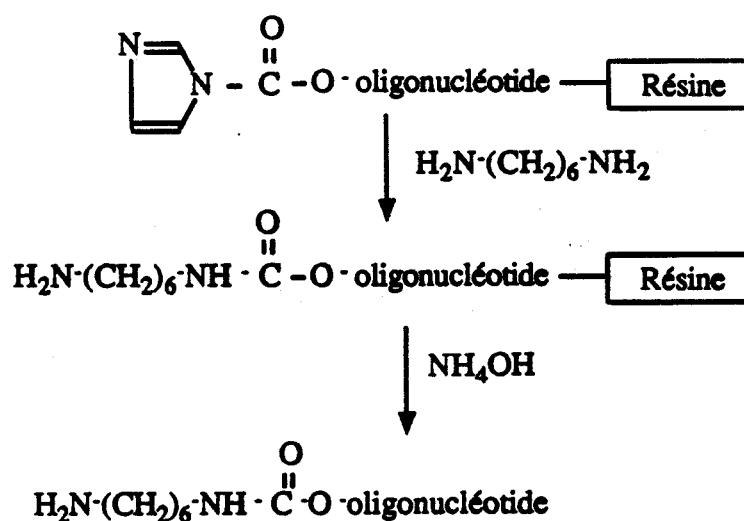


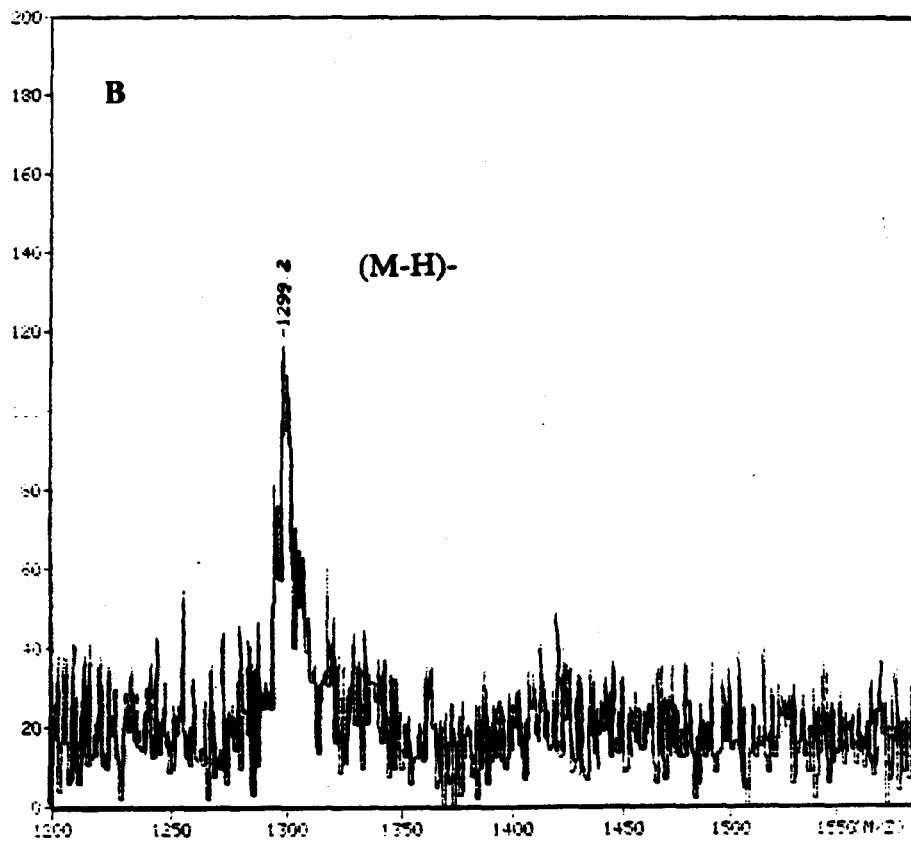
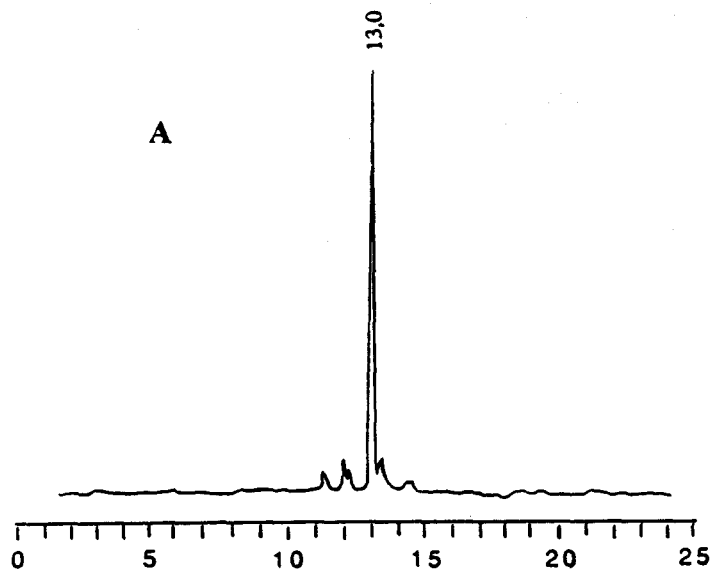
L'HPLC prouve que la réaction est complète (Figure 22) en 30 minutes et l'intérêt du choix de la pyridine, comme solvant.

### 5.1.3. Action du 1-6 diaminohexane

La résine, supportant le tétratimidylate activé ainsi que 100 équivalents de diaminohexane sont agités pendant 30 minutes à température ambiante. Nous avons utilisé la pyridine car elle solubilise parfaitement le diaminohexane. Ce n'est pas le cas du mélange dioxane-eau 9-1 utilisé par Watcher.

Réaction :





(M-H) - : Masse moléculaire théorique : 1298

observée : 1299,2

Figure 23 : HPLC (A) et TOF (B) de 5' NH<sub>2</sub> - T4

Les contrôles HPLC et TOF sont présentés (Figure 23) .

Le spectre HPLC montre que la réaction est totale en 30 minutes dans la pyridine et que l'excès de diamine utilisé évite la réaction secondaire de formation du dimère (Figure 24) .

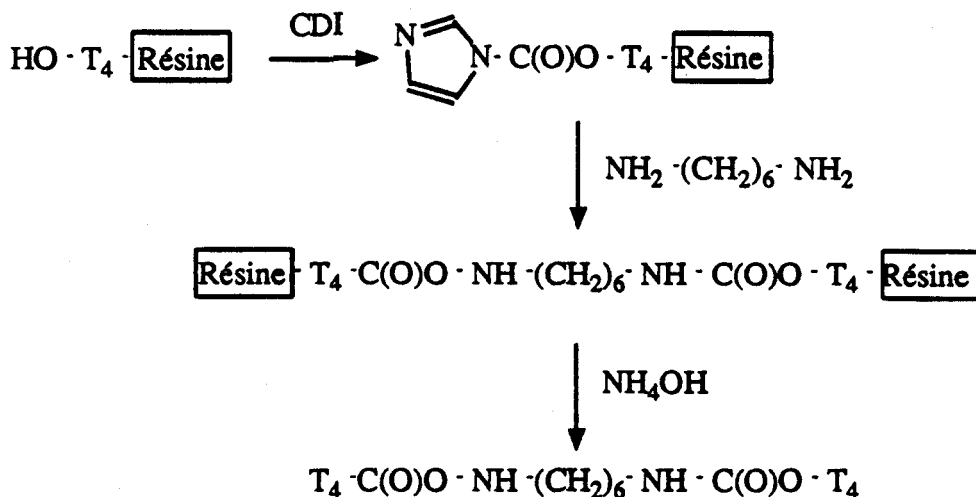


Figure 24 : Réaction de formation du dimère

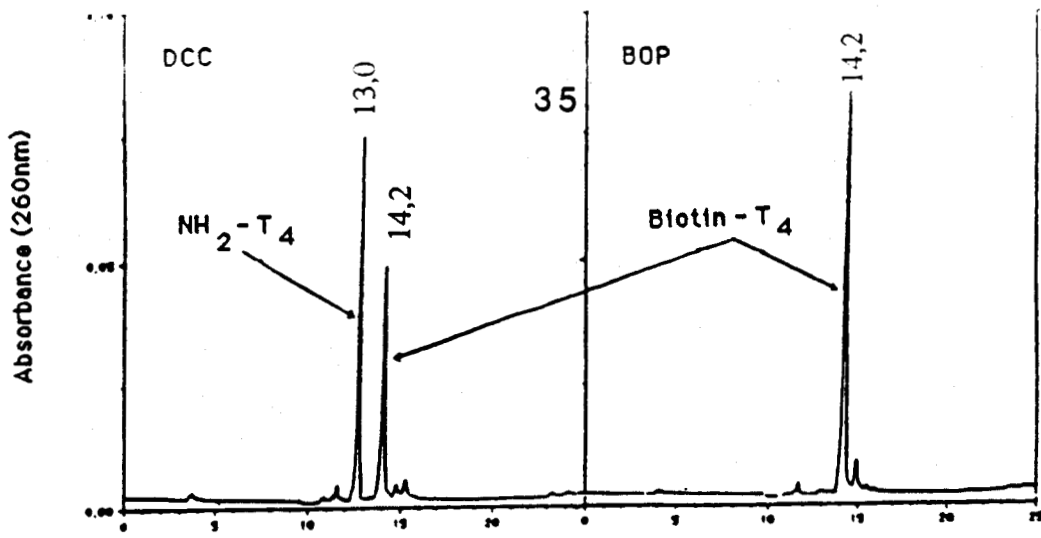
Par conséquent, il n'est pas nécessaire de protéger une des deux fonctions amines du diaminohexane pour cette dernière transformation.

Le spectre de masse confirme que la liaison uréthane, ainsi générée est stable dans les conditions normales de déprotection en solution ammoniacale.

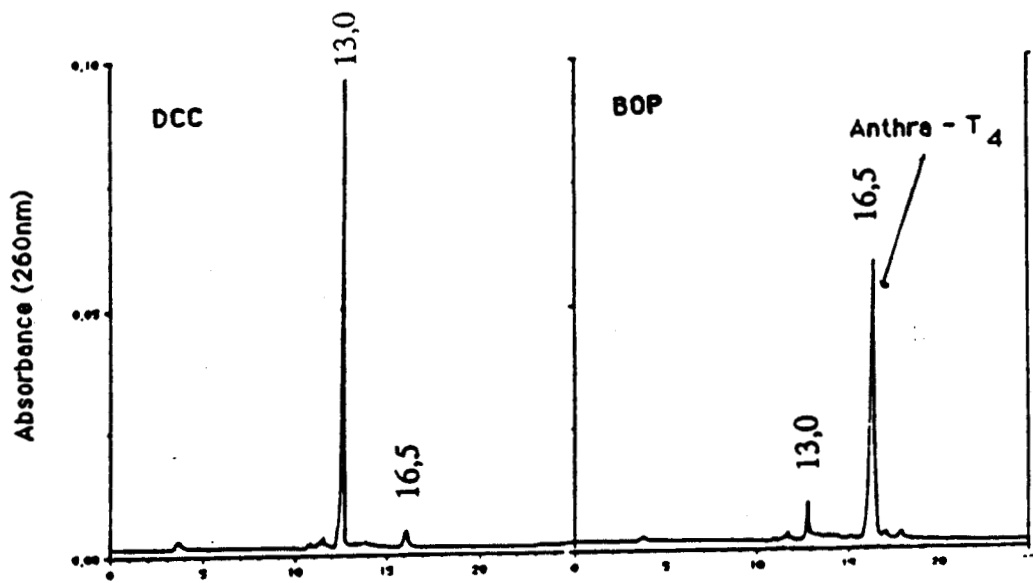
## 5.2. Comparaison des méthodes de couplage (Bop-DCC)

Un lot d'aminotétrathymidylate fixé sur la résine a été préparé (environ 2  $\mu\text{mol}$  de produit). Cette résine est partagée en six parties relativement égales, de façon à pouvoir réaliser le couplage des trois acides par les deux méthodes.

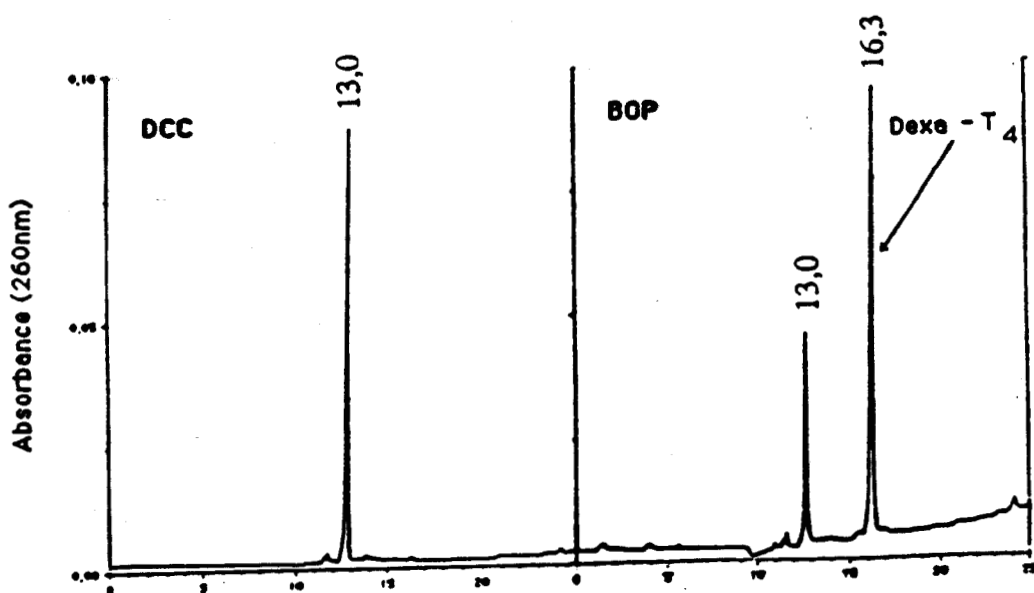
Le but de cette étude était de prouver l'utilisation possible de ces agents couplants en synthèse d'oligonucléotides en phase solide. C'est pourquoi nous avons employé des conditions de couplage optimales:



HPLC du brut de BIOTINE - T<sub>4</sub>

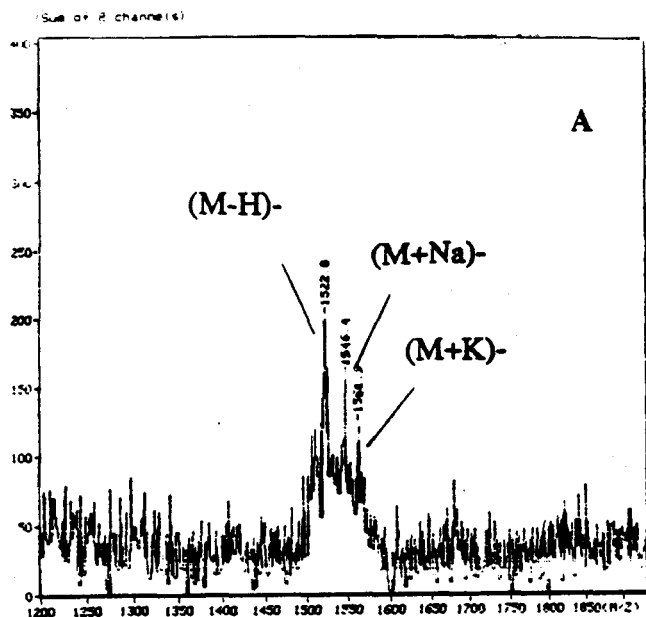


HPLC du brut de ANTHRA - T<sub>4</sub>

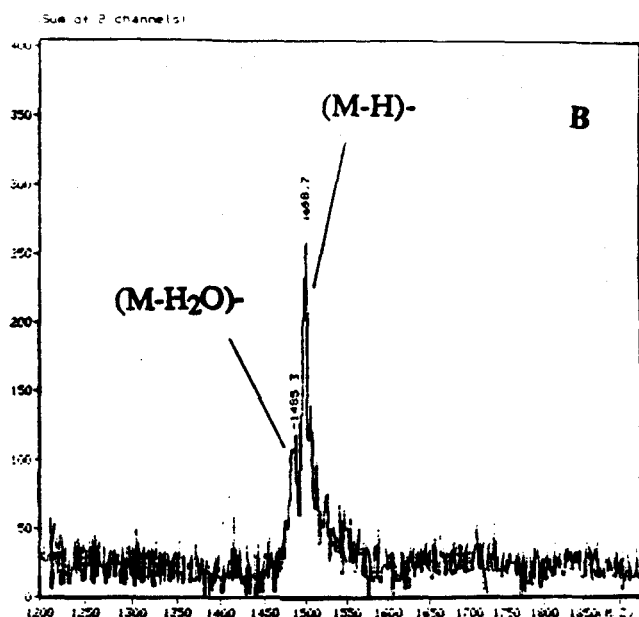


HPLC du brut de DEXA - T<sub>4</sub>

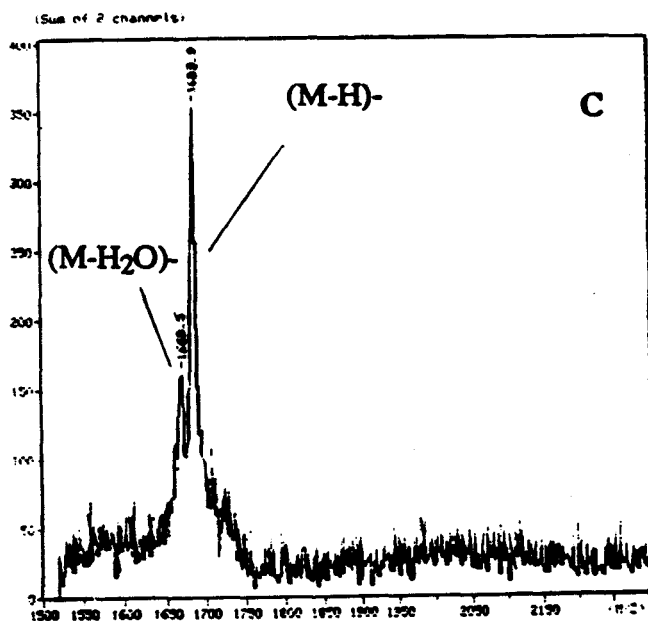
Figure 24 : HPLC des différents couplages



(M-H) - : Masse moléculaire théorique : 1521  
 observée : 11522,8



(M-H) - : Masse moléculaire théorique : 1499  
 observée : 1498,7



(M-H) - : Masse moléculaire théorique : 11685  
 observée : 11683,9

Figure 25 : Spectre de masse TOF de A) 5' BIOTINE - T<sub>4</sub>  
 B) 5' ANTHRA - T<sub>4</sub>  
 C) 5' DEXA - T<sub>4</sub>

- un excès de réactif est employé dans les deux cas :

Méthode du Bop (Bop , acide , DIEA) (125 : 125 : 500)

Méthode DCC (DCC , acide) (125 : 125)

- un temps de couplage relativement long (une nuit)

- le solvant de réaction choisi est le diméthylformamide (DMF) car il assure une bonne homogénéité du surnageant.

Après lavage et déprotection, les six milieux réactionnels ont été analysés (Figure 24 ).

Les nouveaux produits obtenus ont été purifiés par HPLC et contrôlés en spectrométrie de masse TOF (Figure 25).

### 5.3. Conclusion

Les nouvelles molécules résultant du couplage des acides sur l'amino-tétrathymidilate correspondent bien aux produits désirés.

Nous avons déjà remarqué que la liaison uréthane ne souffrait aucunement des conditions de déprotection basique, nous constatons également qu'il en est de même pour les groupes acides incorporés.

Toutefois l'activation par la DCC ne se révèle pas satisfaisante, seule la biotine ayant partiellement réagi. Cette technique pourrait cependant être améliorée en utilisant l'agent d'activation DCC en présence d'un additif nucléophile comme l'hydroxybenzotriazole (HOBT) (Konig, 1970), l'O-acylisourée réagissant avec celui-ci pour former un composé intermédiaire plus stable, l'ester activé d'HOBT (Bodansky, 1984 (Figure 26 ).



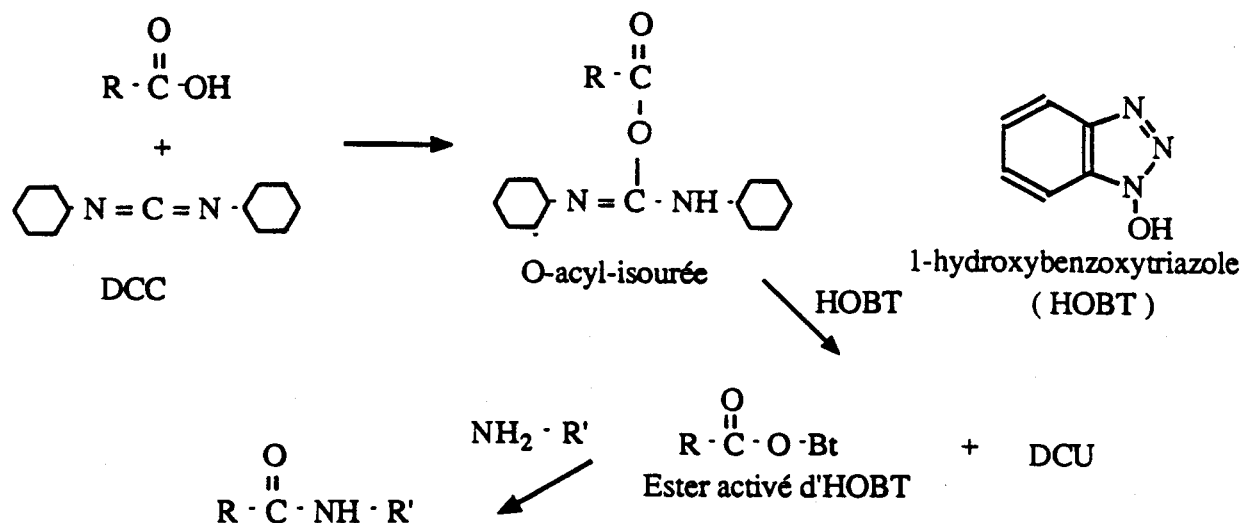


Figure 26 : Agents de couplage DCC-HOBT

En revanche l'action du Bop permet de coupler les acides employés avec un bon rendement, en particulier si la molécule est petite, et la fonction carboxylique peu encombrée (c'est le cas pour la biotine).

Pour des molécules plus encombrées, le couplage est largement suffisant pour que le produit puisse être purifié et obtenu en quantité utilisable par ailleurs, le réactif Bop largement utilisé en synthèse peptidique, peut donc l'être également en synthèse d'oligonucléotides pour greffer directement des molécules à fonction carboxylique.

Les essais réalisés sur le tétrathymidylate doivent être continués et être poursuivis sur des oligonucléotides plus longs de manière à pouvoir fixer les limites des deux techniques de contrôles HPLC et TOF.

## 6) SYNTHÈSE D'AUTRES OLIGONUCLEOTIDES MODIFIÉS

Quatre oligonucléotides ont été choisis :

- un tétrathymidylate
- un octathymidylate
- un octamère
- un icosamère

Sur chacune de ces molécules nous avons couplé la biotine, l'acide 9 anthracénoïque, un acide dérivé de la dexaméthasone, un acide dérivé du cholestérol et l'isothiocyanate de fluorescéine.

La synthèse des acides issus de la dexaméthasone et du cholestérol est décrite aux paragraphes D.3.1. et D.3.2.

Nous avons repris les conditions opératoires employées pour le tétrathymidylate. Les acides ont été mis en réaction une nuit dans le DMF, à température ambiante avec les amino-oligonucléotides, les réactifs ont été utilisés dans les proportions Bop, acide et DIEA (125 : 125 : 500).

### 6.1. Contrôle par HPLC

Les rendements estimés d'après les profils HPLC sont meilleurs pour les tétra et octamères (50 à 80%) que pour les 20mères (30 à 60%).

La biotine et la fluorescéine s'incorporent très bien, comparativement à la dexaméthasone et au cholestérol.

Dans le tableau suivant, figurent les temps de rétention des différents oligonucléotides synthétisés.

Extrémité 5'	T4	T8	octamère	icosamère
HO	11.7	12.0	11.8	12.2
NH <sub>2</sub>	13.0	12.2	11.9	12.2
Biotine	14.2	13.8		13.2
Anthracène	16.5	15.2	15.5	14
Dexaméthasone	16.3	15.6	15.0	14.7
Cholesterol	23.2		22.5	
Fluoresceine	14.5	14.3	14.2	13.4

De ce tableau nous pouvons tirer plusieurs enseignements :

- Plus l'oligonucléotide est grand (icosamère), plus la modification apportée en 5' devient globalement moins importante, et plus le temps de rétention a tendance à se rapprocher de celui de l'oligonucléotide parent 5'OH.

Il en résulte une purification par HPLC plus difficile. Fort heureusement pour des polymères de 20 nucléotides (les plus utilisés en biologie moléculaire), le plus faible écart observé pour l'oligobiotinylé reste de l'ordre de la minute. Ainsi jusqu'aux 20mers la purification de tous les oligonucléotides que nous avons modifiés a été facilement réalisable par HPLC.

- La séparation des deux oligos 5'NH<sub>2</sub> et 5'OH semble être possible jusqu'à 8 mères. Au delà de cette taille l'hydrophobie de la chaîne hexaméthylénique du diamino hexane n'est plus suffisante pour démarquer l'amino-oligonucléotide.

Quand on doit modifier un oligonudésoxyribocléotide de grande taille, il est donc impossible de contrôler l'étape de fixation de l'amine et seul le produit de condensation avec l'acide ou l'isothiocyanate est repérable par HPLC.

Pour les petits polymères inférieurs à 8 unités monomériques le suivi par HPLC est d'un intérêt primordial. En effet c'est sur ces produits que les premiers essais de couplage sont réalisés, avant de généraliser ces méthodes sur des polymères plus longs. Si la fonctionnalisation du 5' OH en 5'NH<sub>2</sub> est une méthode bien mise au point, en revanche pour chaque acide les conditions doivent être optimisées afin d'obtenir un bon rendement dans le minimum de temps.

On jouera donc sur les paramètres suivants :

- Quantité de réactifs utilisés .
- Temps de couplage.

## 6.2. Contrôle par Spectrométrie de masse TOF

La spectrométrie de masse TOF est particulièrement adaptée à la caractérisation de peptides et de protéines de poids moléculaire compris entre 500 et 25000 (Jonsson, 1986), (Cotter, 1988).

Cependant cette technique, peut aussi s'appliquer aux oligonucléotides de petite taille, comme l'a montré Viari (1987), (1988) pour des hexamères.

L'inconvénient majeur des oligonucléotides en ce qui concerne la spectrométrie de masse TOF, est causé par les groupements phosphates qui contribuent à charger plusieurs fois négativement la molécule. Ces charges empêchent la molécule de se désorber de son support pour être analysée.

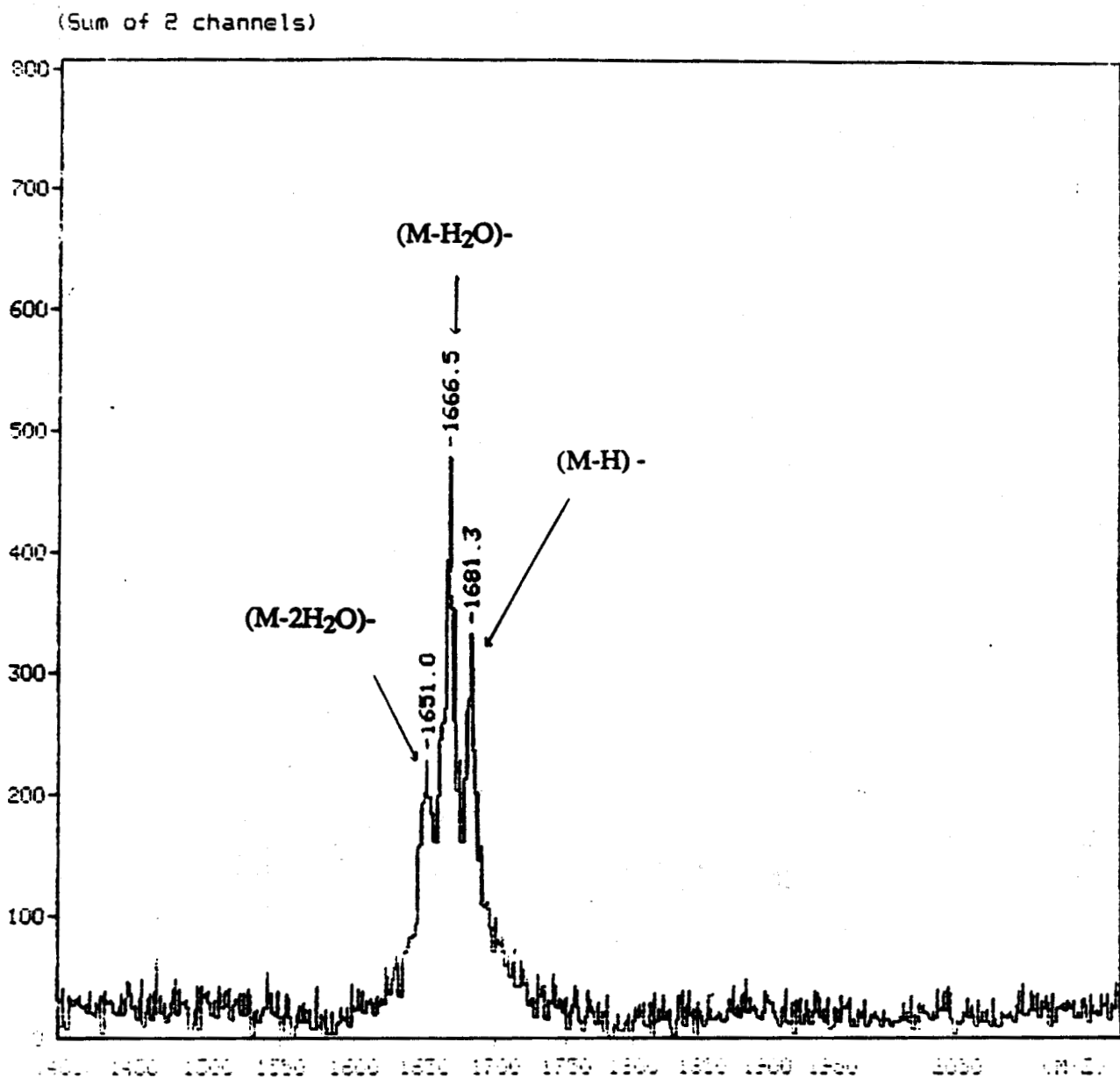


Figure 27 : Spectre de masse TOF de 5' FLUO - T<sub>4</sub>

$(M-H)^-$  - : M. M. théorique : 1684. ( observée : 1681,3)

$(M-H_2O)^-$  - : M. M. théorique : 1667. ( observée : 1666,5)

$(M-2H_2O)^-$  - : M. M. théorique : 1649. ( observée : 1651,0)

Par contre le spectre de masse TOF d'un oligonucléotide phosphotriester a été obtenu pour un 12 mère (McNeal, 1982).

Tous les oligonucléotides du tableau précédent ont été purifiés et analysés sur le spectromètre de masse TOF. Conformément à la littérature sur le sujet, cette méthode d'analyse ne semble s'appliquer qu'aux petits oligodésoxyribonucléotides. Nous avons pu cependant obtenir des spectres d'octamères modifiés jamais décrits jusqu'ici, l'élargissement des pics obtenus soulignant pourtant les limites de la technique.

Les phénomènes responsables de l'élargissement des pics, induisant une incertitude sur la détermination de la masse moléculaire sont maintenant étudiés.

### 6.2.1. Perte d'H<sub>2</sub>O en détection négative

D'abord nous avons remarqué que pour pratiquement tous les tétrathymidylates modifiés et analysés en détection négative (-12kV), le pic de l'ion moléculaire est toujours accompagné d'un pic correspondant à une perte d'eau. Dans certains cas, une perte d'une deuxième molécule d'eau est observée. Les pics relatifs aux produits déshydratés peuvent même être majoritaires, toutes ces remarques sont résumées sur le spectre de Fluo-T4 (Figure 27).

Cette perte d'eau a aussi été constatée par Viari (1987) qui propose le mécanisme suivant (Figure 28). Tous les pics de ces produits déshydratés apparaissent à gauche et très proches du pic de l'ion moléculaire.

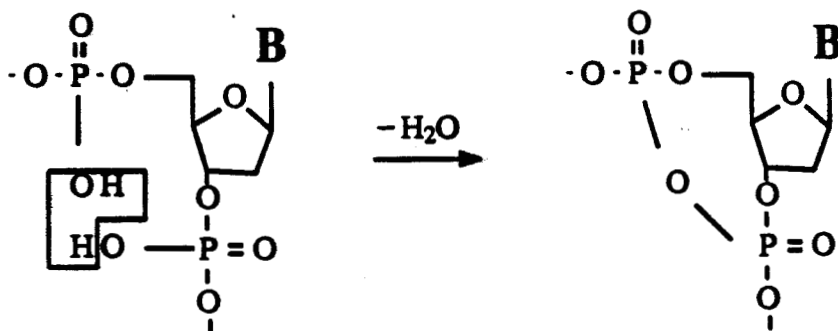


Figure 28 : perte d'une molécule d'eau selon le mécanisme proposé par VIARI

### 6.2.2. Ions sodium et potassium

(Sum of 2 channels)

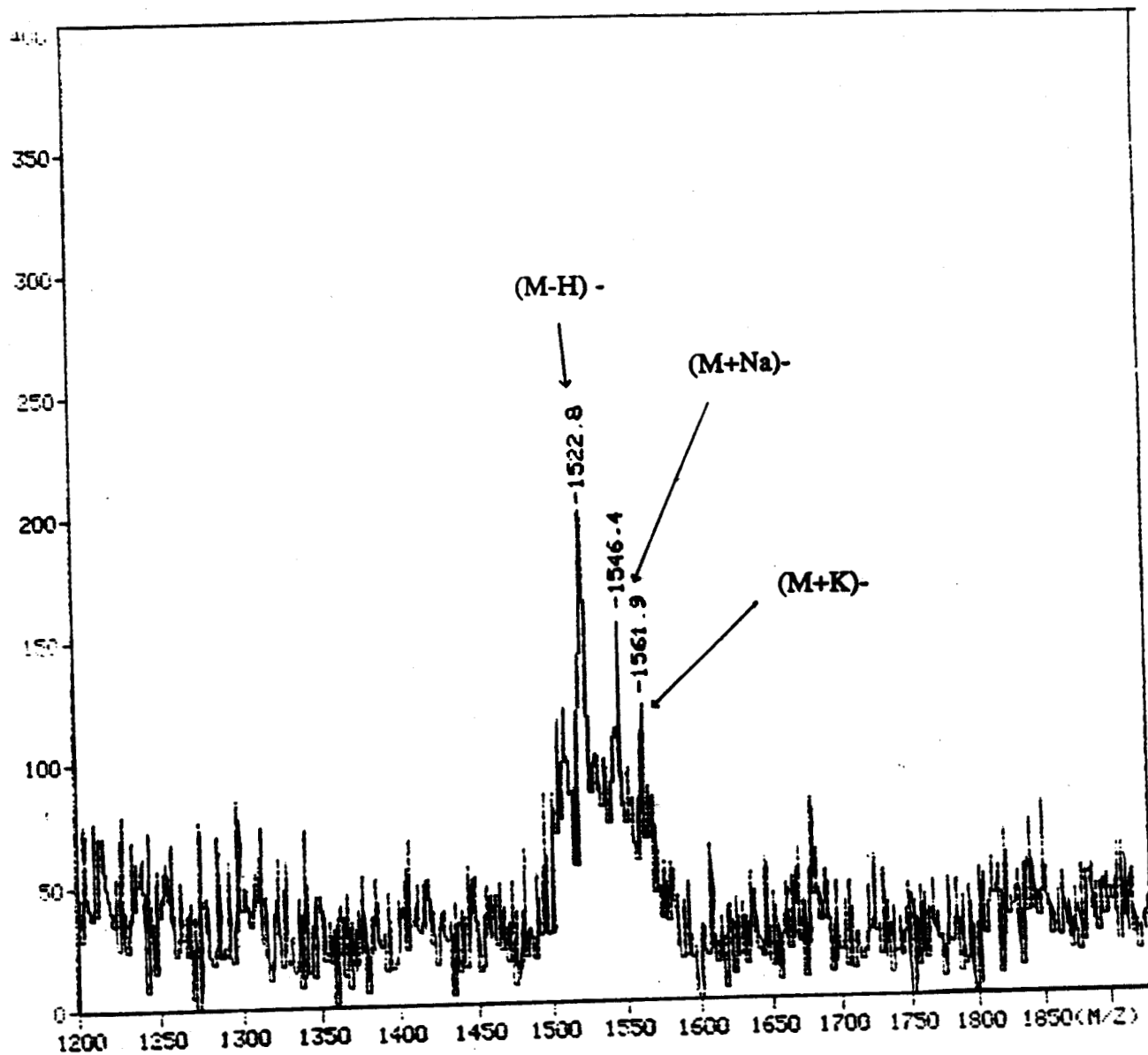


Figure 29 : Spectre de masse TOF de 5' BIOTINE - T<sub>4</sub>

(M-H) - : M. M. théorique : 1521. ( observée : 1522,8)

(M+Na)- : M. M. théorique : 1544. ( observée : 1546,4)

(M+K)- : M. M. théorique : 1561. ( observée : 1561,9)

Même en détection négative il n'est pas rare de voir des pics correspondant au produit  $M + Na$ ,  $M + K$  et  $M+Na+K$  (Allmaier, 1990) (McNéal, 1982). Ces pics ne sont pas toujours minoritaires par rapport à celui de l'ion moléculaire, et viennent se placer à droite du pic intéressant. Spectre de Biotine-T4 (Figure 29).

### 6.2.3. Elimination des pics ( $M+Na$ ) et ( $M+K$ )

#### 6.2.3.1. Rinçage du support

Après avoir déposé l'oligonucléotide en solution aqueuse sur la fine couche de nitrocellulose, le support est rincé avec quelques gouttes d'eau pour éliminer les ions sodium et potassium.

Seulement si l'eau permet de se débarrasser des cations, elle entraîne aussi l'oligonucléotide très hydrophile.

Afin d'augmenter l'hydrophobie de la solution de lavage nous avons rincé l'échantillon avec des solutions aqueuses éthanoliques de différentes concentrations, mais sans amélioration notable.

#### 6.2.3.2. Emploi d'éther couronne

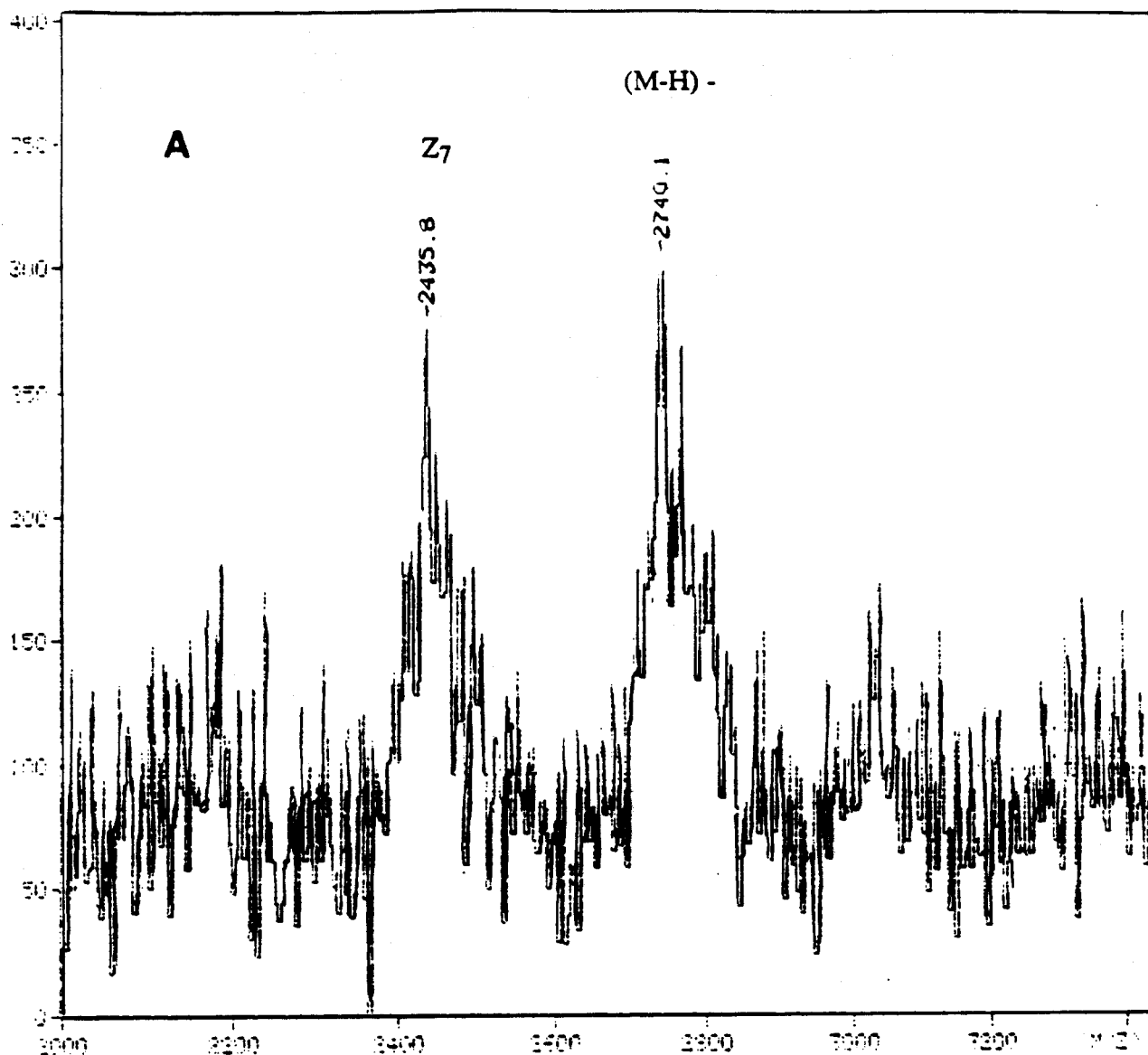
Les éthers couronne présentant la cavité adéquate ont la propriété remarquable de complexer spécifiquement les ions  $Na^+$  et  $K^+$  (Malthotra, 1990).

Une solution d'éther couronne a été additionnée à une solution d'oligonucléotide à analyser. Après 5 minutes de contact, l'échantillon a été déposé sur nitrocellulose, puis analysé. Bien que l'éther couronne ait pu être détecté seul et complexé avec le sodium et le potassium, malheureusement, les pics parasites  $M+Na$  et  $M+K$  étaient toujours présents sur le spectre.

#### 6.2.3.3. Fragmentation résultant de la rupture internucléotidique

La structure des principaux fragments résultant de la rupture de la liaison phosphodiester est représentée (Figure 30).

5 channels

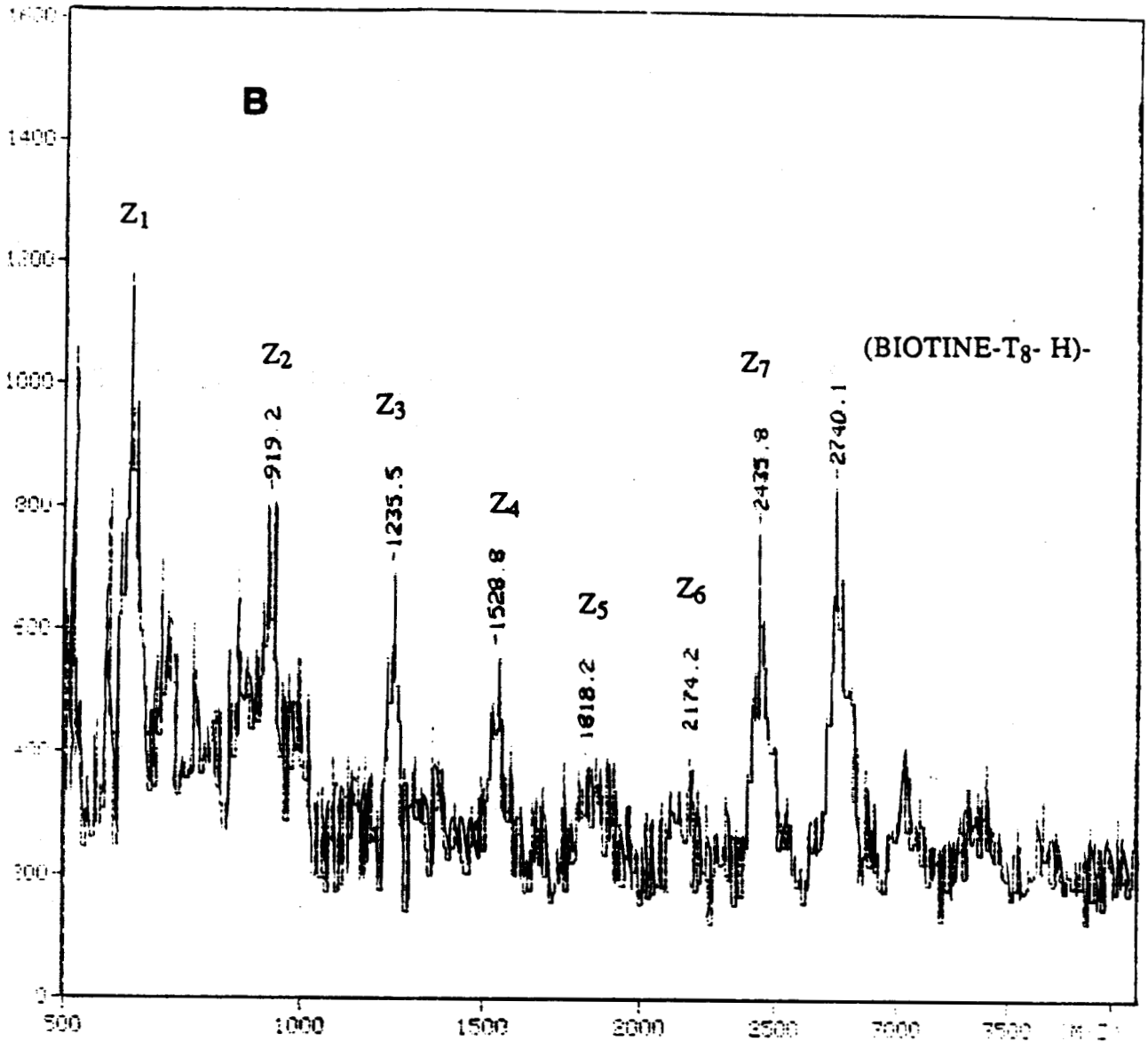


(M-H) - : M. M. théorique : 2737. ( observée : 2740,1)

Fragmentation Z<sub>7</sub> : M. M. théorique : 2434. ( observée : 2435)

Figure 31 : Spectre de masse de 5' BIOTINE - T<sub>8</sub> . Fragmentation de type Z  
Fragmentation Z<sub>7</sub> et (BIOTINE-T<sub>8</sub> - H)-





Fragmentations : Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub>, Z<sub>4</sub>, Z<sub>5</sub>, Z<sub>6</sub>, Z<sub>7</sub> et (BIOTINE-T<sub>8</sub>-H)-

Figure 31 : Spectre de masse de 5' BIOTINE - T<sub>8</sub> . Fragmentation de type Z

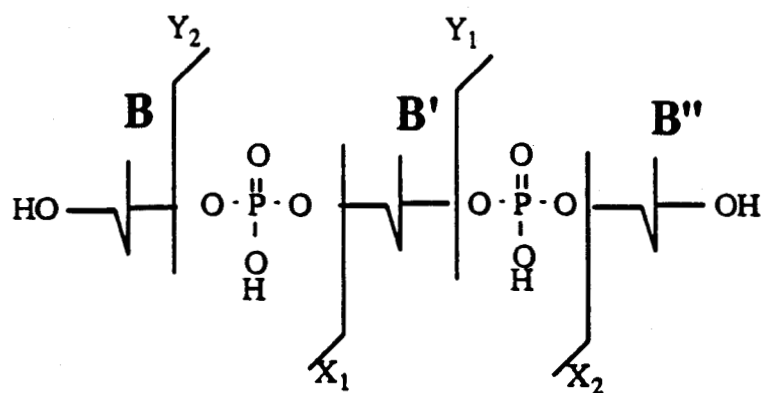
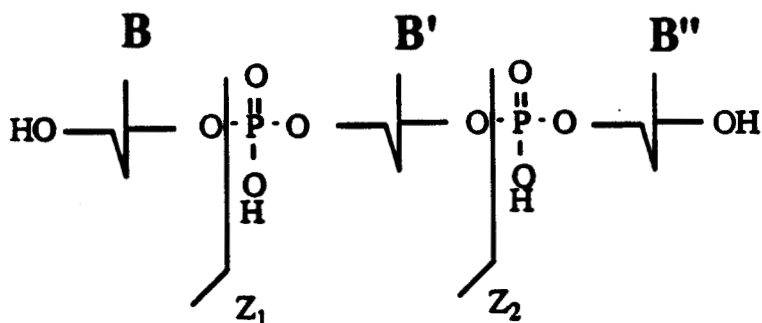


Figure 30 : Fragmentation résultant de la rupture internucléotidique

Deux types de fragments peuvent être produits. Ceux du type X, où le groupe phosphate négativement chargé, est lié en 3' du fragment et ceux de type Y où le groupe phosphate négativement chargé est lié en 5'. En général, les fragments de type Y, quand ils sont observés sont plus présents que ceux du type X.

En ce qui nous concerne, nous avons observé uniquement pour l'octatétrathymidylate avec une biotine ou avec un dexaméthane en 5' une fragmentation encore différente.

Il semblerait que la rupture se fasse après l'oxygène en 3'.



Ceci est surtout observé pour la première fragmentation (Figure 31,A). Par exemple pour la biotine-T8 en plus du pic de l'ion moléculaire on observe une fragmentation à 2435 alors que la fragmentation théorique est à 2434.

Les autres fragmentations (Figure 31,B) plus petites semblent aussi vérifier ce type de fragmentation. Toutefois, on note des écarts importants par rapport aux valeurs théoriques.

#### 6.2.4 Conclusion

Nous avons pu pour la première fois, caractériser en TOF des octamères modifiés, mais dans les conditions de connaissance actuelle de la technique, la résolution reste impossible pour les oligos plus longs, ces derniers donnant des massifs très élargis ou trop peu prononcés.

## D) APPLICATION A LA STRATEGIE ANTI-SENS

### 1) INTRODUCTION

Il s'agit d'effectuer la synthèse d'oligodésoxyribonucléotides dont la séquence est complémentaire d'une fraction du génôme viral dont on connaît le caractère indispensable à la réplication du VIH.

Cet oligonucléotide "Anti-sens" doit interagir au niveau cellulaire avec la séquence correspondante du génôme viral en formant un hybride et en réduisant ainsi l'efficacité de la traduction, la stabilité ou le transport de l'ARN messager concerné ou en agissant au niveau de l'ADN proviral nucléaire.

### 2) PROBLEMES POSES

Deux problèmes sont posés par cette stratégie anti-sens : la pénétration intracellulaire des oligodésoxyribonucléotides et leur localisation dans les différents compartiments de la cellule justifiant une interaction au niveau de l'ARN ou de l'ADN.

### 3) SOLUTIONS ENVISAGEES

La présence d'un reste hydrophobe en 5' (ex : cholestérol) peut faciliter le franchissement de la membrane cellulaire et augmenter la résistance aux exonucléases par le polyanion. Pour préciser simultanément le second point, nous avons songé à fixer en position 5' d'un oligo anti-sens un

reste glucocorticoïde analogue de la dexaméthasone, que ses récepteurs cytoplasmiques étaient susceptibles d'entraîner dans leur translocation nucléaire avec formation d'un duplex avec la séquence complémentaire d'ADN. La dexaméthasone présente une hydrophobie comparable à celle du cholestérol.

Un oligodésoxyribonucléotide de 8 bases 5' TCTTAACC 3' complémentaire d'une séquence consensus trouvée dans le gène pol (souche HIV III B) qui code pour les enzymes intervenant dans le cycle répliatif viral a été synthétisé. Nous y avons fixé en 5' par la méthode du Bop un reste dexaméthasone ; l'analogue 5' cholestérol a été également préparé en référence.

#### **4) SYNTHÈSE DES DERIVES DEXAMETHASONE ET CHOLESTEROL-ANTISENS**

Pour fixer la dexaméthasone ou le cholestérol sur un oligonucléotide, nous avons utilisé la technique habituelle consistant à coupler un dérivé acide carboxylique sur un amino oligodésoxyribonucléotide. Il nous a fallu faire apparaître une fonction acide sur le dexaméthasone et sur le cholestérol.

##### **4.1. Synthèse d'un dérivé acide de la dexaméthasone**

Nous avons repris en parallèle les travaux de Lebwart et Mattox réalisés sur la fonction 21 de la cortisone (Figure 32).

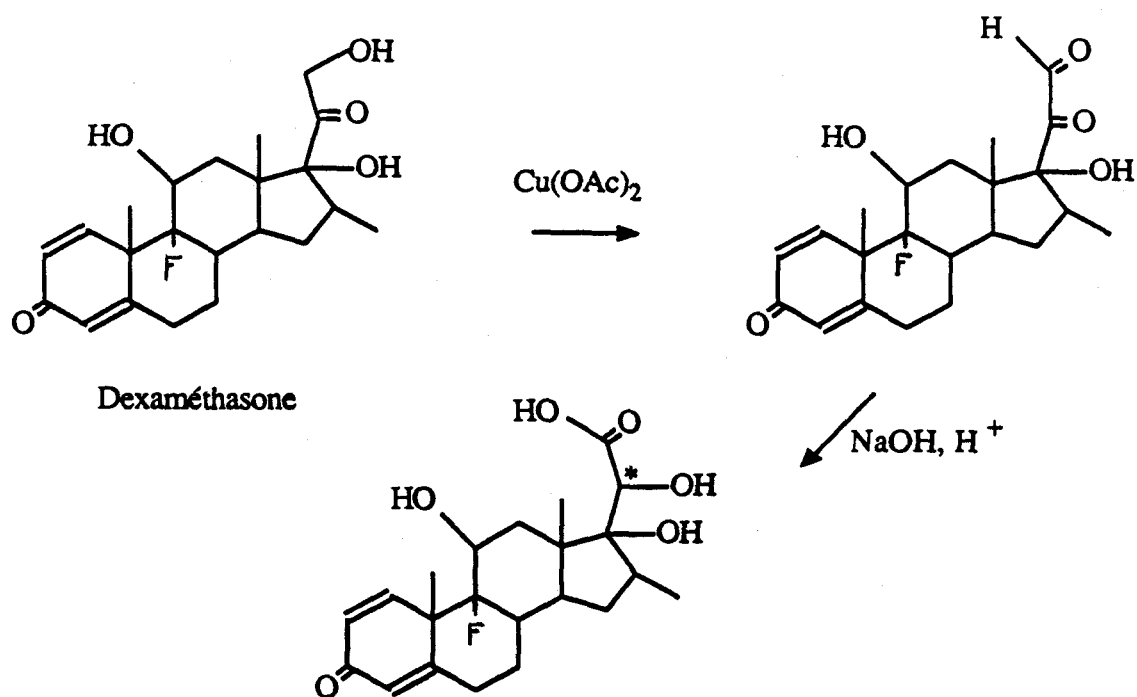
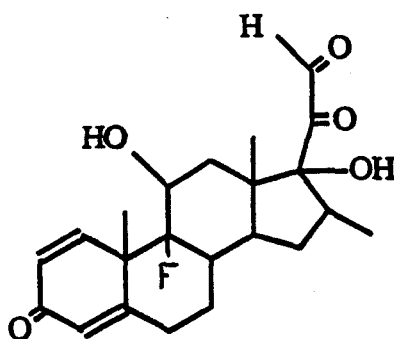


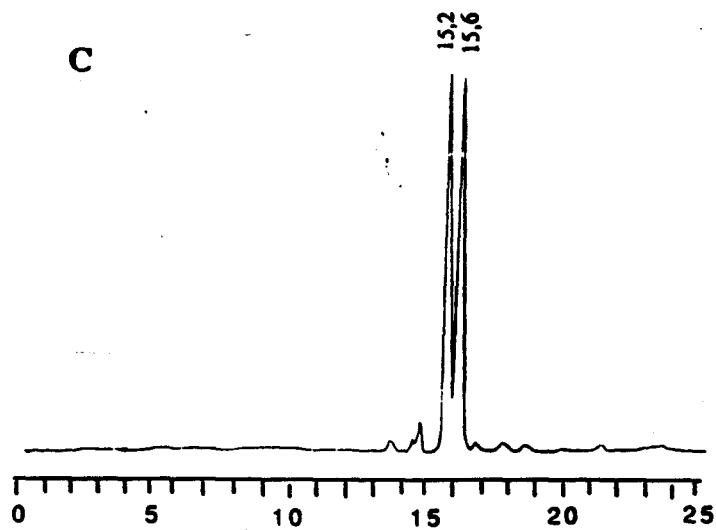
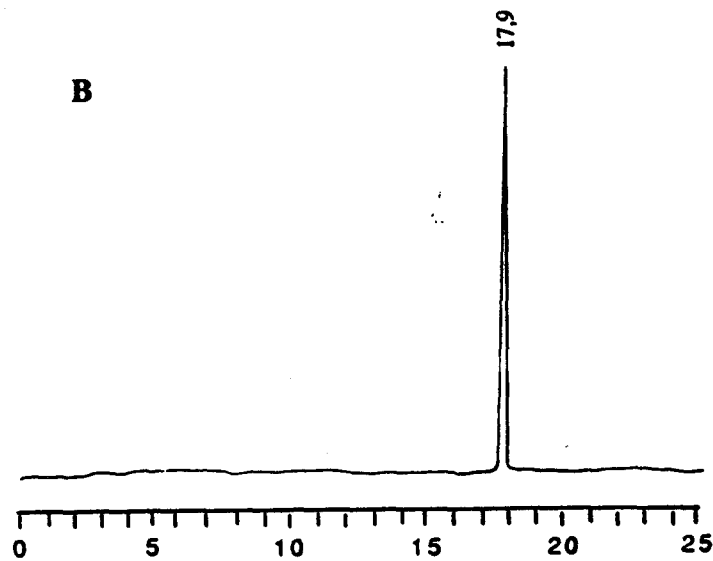
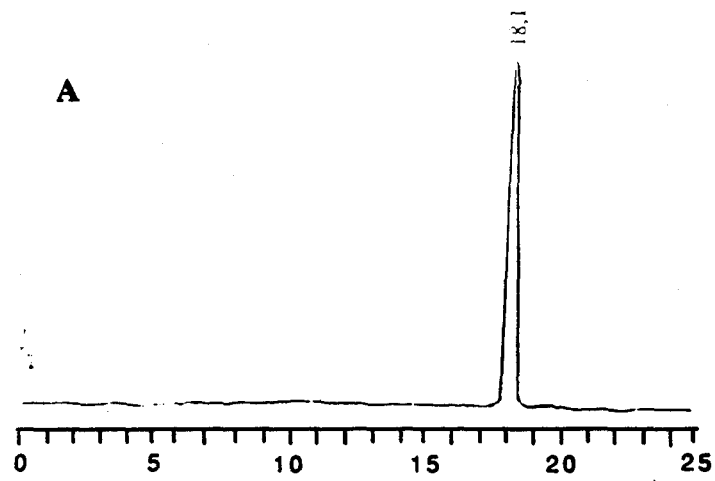
Figure 32 : synthèse d'un dérivé acide de la Dexaméthasone

#### 4.1.1. Synthèse du 11,17 $\alpha$ -dihydroxy-9fluoro-16-méthyl-1,4 pregnandiène-18-one-21-al



La fonction alcool en 21 de la dexaméthasone peut être oxydée en aldéhyde par traitement avec une solution méthanolique d'acétate de cuivre. La réaction est totale en deux heures. Le glyoxal de la dexaméthasone est ainsi obtenu après avoir lavé et évaporé la phase chloroformique.

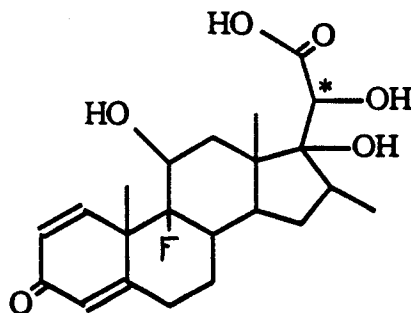
#### 4.1.2. Synthèse de l'acide 11,17 $\alpha$ -18 $\alpha$ , $\beta$ dihydroxy-9-fluoro-16-méthyl-1,4-pregnandiène-21-oïque



**Figure 33 : HPLC de A) Dexaméthasone**

**B) Glyoxal de la dexaméthasone**

**C) Acide dérivé de la dexaméthasone**



Le traitement d'une solution de glyoxal dans un mélange méthanol-eau avec 30 équivalents d'hydroxyde de sodium permet une réaction d'oxydoréduction intramoléculaire comparable à une réaction de Cannizzaro.

Après modification du milieu réactionnel, on obtient deux diastéréoisomères du dérivé acide de la dexaméthasone, correspondant aux deux configurations possibles du carbone 20 mis en évidence par HPLC (Figure 33). Le produit est caractérisé par spectrométrie de masse FAB, et microanalyse.

#### 4.2. Synthèse du 3 $\beta$ -(2'-carboxyethoxy)-cholest-5'-ène

Cette synthèse est réalisée en trois étapes (Figure 34), le réactif de départ étant le cholestérol (Ahmad et Logani, 1971). Les modes opératoires étant décrits de façon très brève, il a fallu apporter les modifications nécessaires (cristallisation et purification) pour obtenir les différents produits.

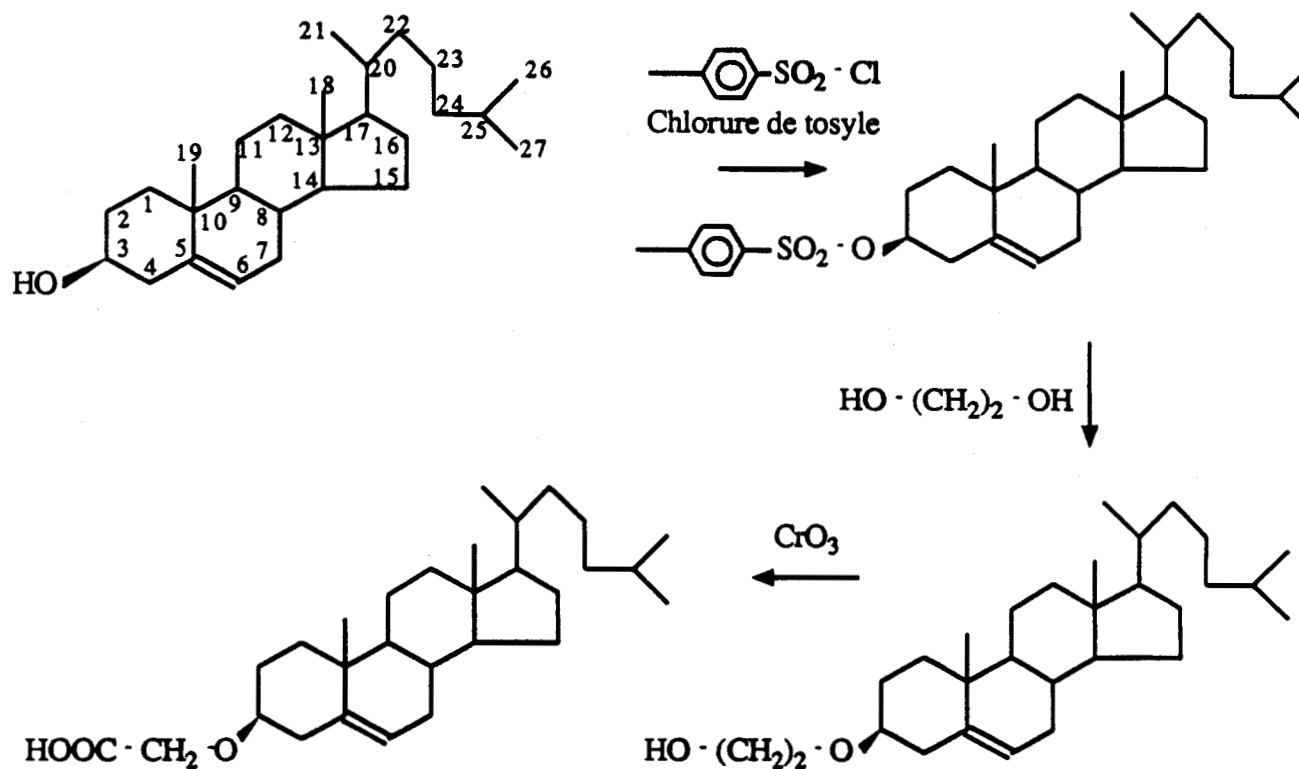
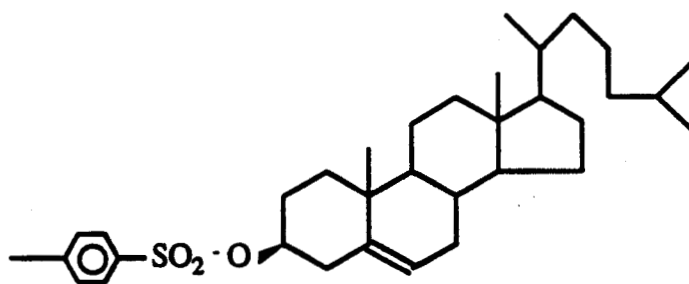


Figure 34 : Synthèse du 3b-(2'-carboxyéthoxy)-cholest-5-ène

#### 4.2.1. Synthèse du paratoluène sulfonate de cholestéryle



Le tosylate de cholestéryle est obtenu par estérification du cholestérol sur le chlorure de tosylo en excès dans la pyridine. Les groupements sulfonates, en particulier le groupement tosylate, sont de très bons "groupements partants", exceptionnellement réactifs dans les réactions de substitution nucléophile sur le carbone. La transformation en sulfonate (tosylate) est un moyen souvent utilisé pour activer la fonction alcool vis-à-vis de nombreux réactifs nucléophiles. Pour la préparation d'ester

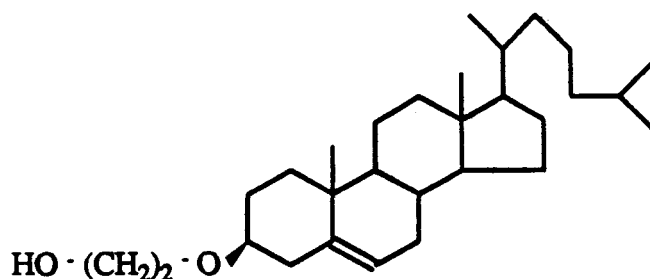


sulfonique, on utilise le chlorure de tosylo préférentiellement à l'acide sulfonique correspondant (Allinger, 1976).

La pyridine est utilisée en tant que solvant et catalyseur basique.

Le paratoluène sulfonate de cholestéryle est obtenu après évaporation de la pyridine et cristallisation du résidu après solubilisation dans l'acétone chaud ( $t^{\circ} < 55^{\circ}\text{C}$ ).

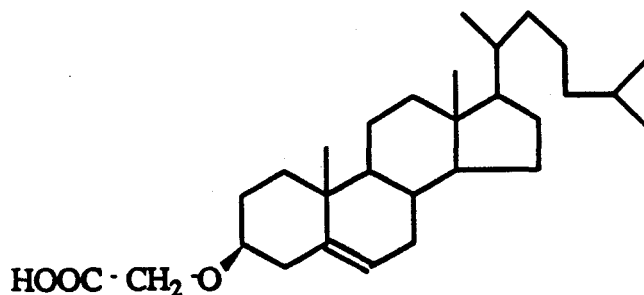
#### 4.2.2. Synthèse du 3 $\beta$ -(2'-hydroxyéthoxy)-cholest-5-ène

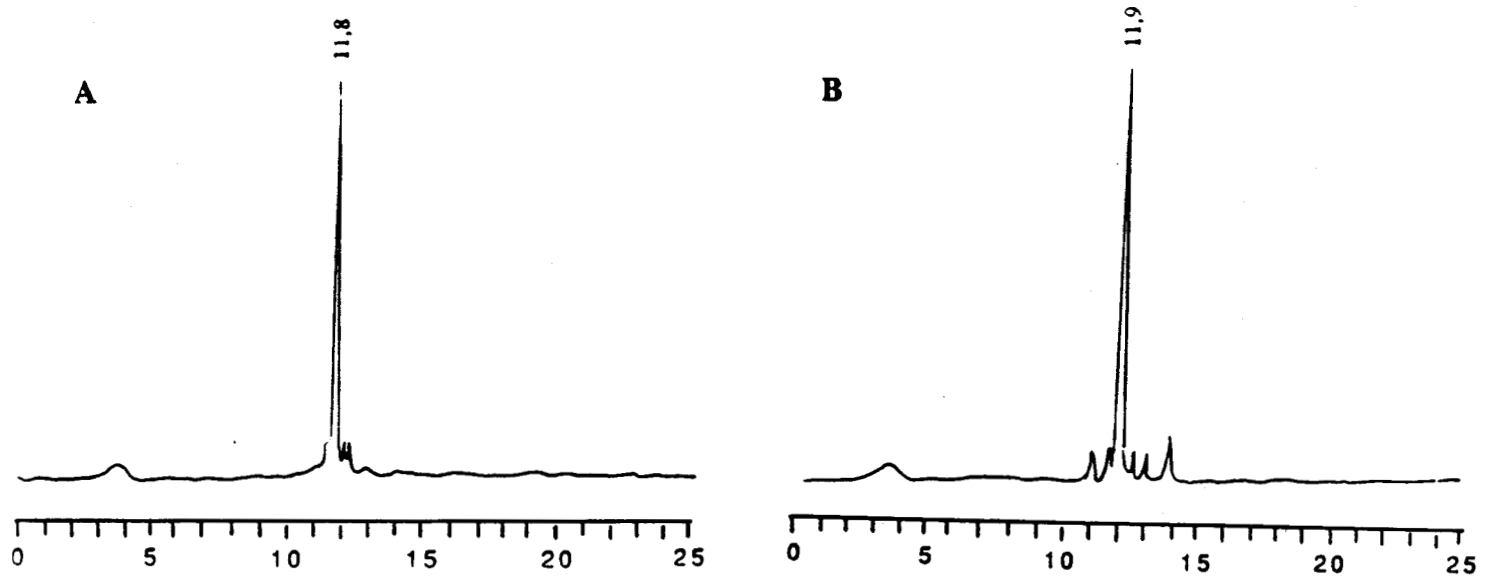


Le 3 $\beta$ -(2'-hydroxyéthoxy)-cholest-5-ène est obtenu par substitution nucléophile d'ordre 1 de l'éthylène glycol en excès sur le paratoluène sulfonate de cholestéryle dans le solvant dioxane ( $\epsilon = 2,2$ ). La température élevée ( $120^{\circ}\text{C}$ ) favorise une réaction  $\text{S}_{\text{N}}1$ . Le groupement  $\text{HOCH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH}$  vient se fixer sur le carbone 3 du cation formé après départ du groupement  $\text{-o-tosyl}$ . La face  $\alpha$  du cholestérol étant encombrée, l'éthylène glycol attaque préférentiellement du côté de la face  $\beta$ , et se fixe en position équatoriale.

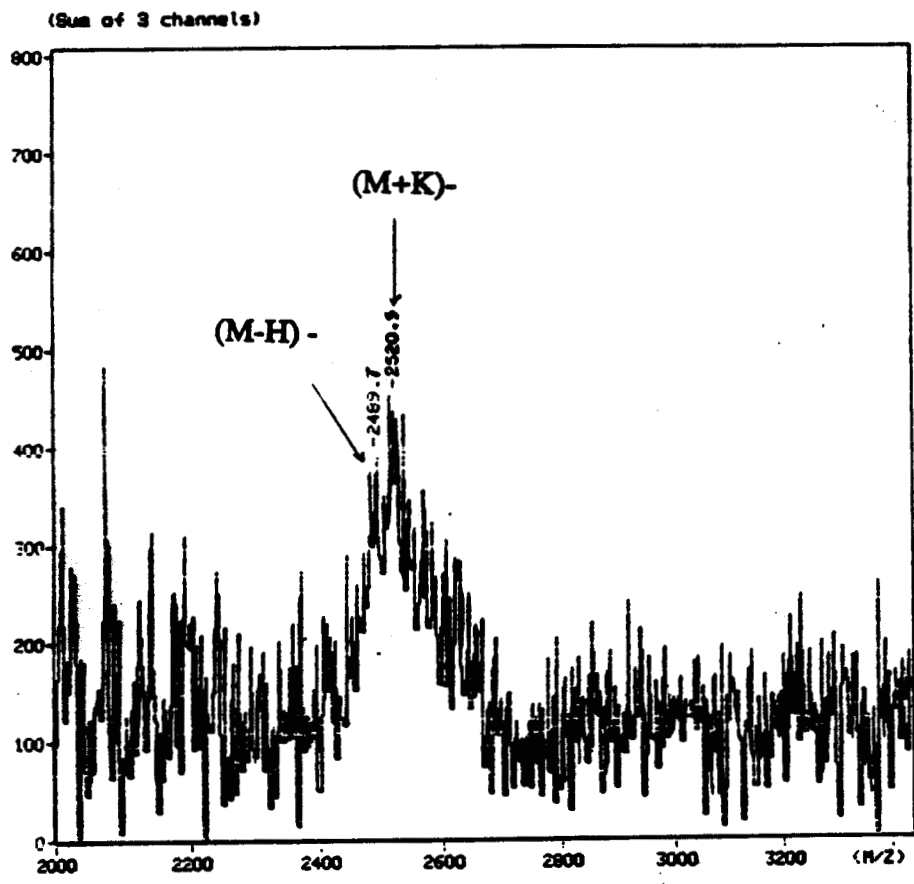
Le 3 $\beta$ -(2'-hydroxyéthoxy)-cholest-5-ène est extrait par l'éther diéthylique. Le résidu obtenu après évaporation à la pompe à vide, cristallise dans le pentane. La cristallisation est amorcée par frottement et poursuivie à  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.3. Synthèse du 3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxy)-cholest-5-ène





HPLC de A) : 5' HO-8 M ère  
 de B) : 5' H<sub>2</sub>N-8 Mers



Spectre de masse TOF de 5' H<sub>2</sub>N- octamère (M-H) - : M. M. théorique : 2484. ( observée : 2489,7)  
 (M+K)- : M. M. théorique : 2525. ( observée : 2520,9)

Figure 35 : HPLC et TOF de 5' HO- octamère et de 5' NH<sub>2</sub>-octamère

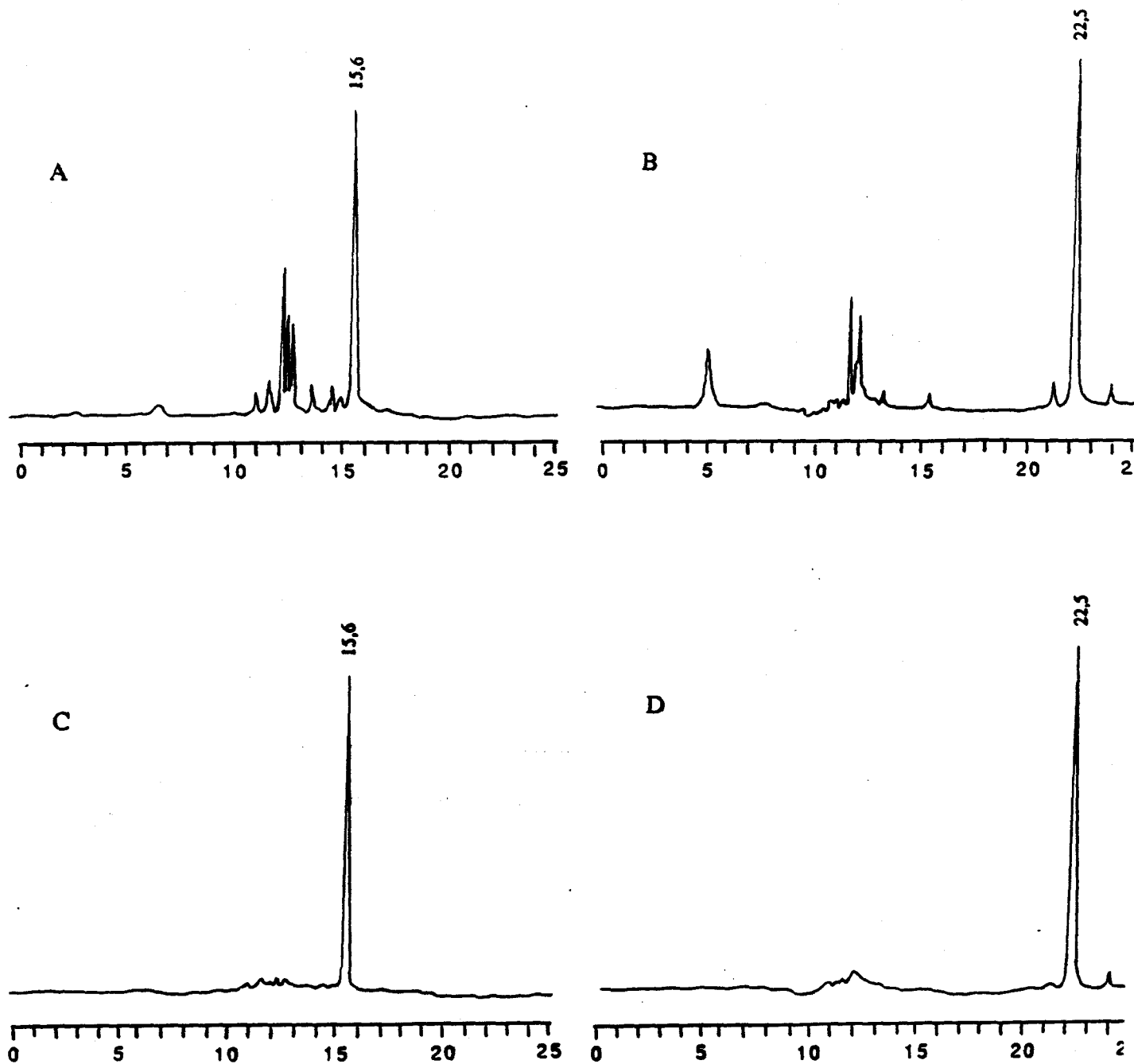


Figure 36: HPLC de A) brut de DEXA- octamère  
B) brut de CHOL- octamère  
C) DEXA- octamère pur  
D) CHOL- octamère pur

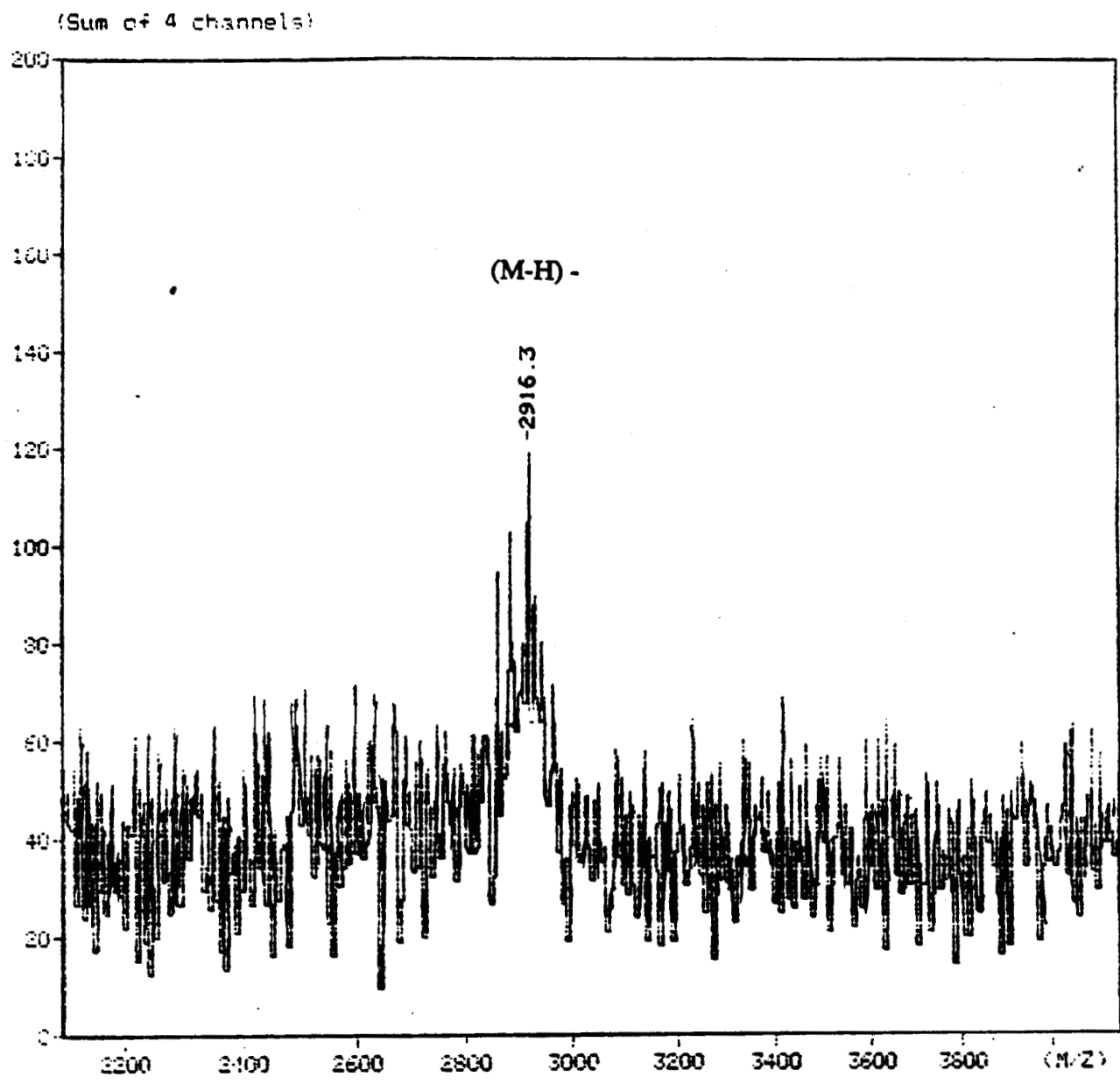


Figure 37 : Spectre de masse TOF de 5' CHOL-8 Mère  
(M-H) - : M. M. théorique : 2911. ( observée : 2916,3)

La synthèse est réalisée par oxydation de la fonction alcool à l'aide du réactif de Jones (acide sulfurique et anhydride chromique dissous dans l'eau distillée) Le milieu réactionnel est repris dans l'eau distillée, l'extraction du 3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxy)-cholest-5ène se fait dans l'acétate d'éthyle. Après lavage de la phase organique et évaporation de celle-ci, le résidu huileux obtenu est additionné de quelques gouttes d'éther de pétrole. Le produit cristallise à froid (4°C).

### 4.3. Réaction des deux acides sur l'amino-oligonucléotide

#### 4.3.1. Réaction de couplage

L'amino-oligonucléotide préparé suivant la méthode classique subit les deux contrôles habituels (Figure 35 ). Après s'être assuré de la bonne transformation du 5'OH en 5'NH<sub>2</sub>, on peut alors passer aux couplages des acides.

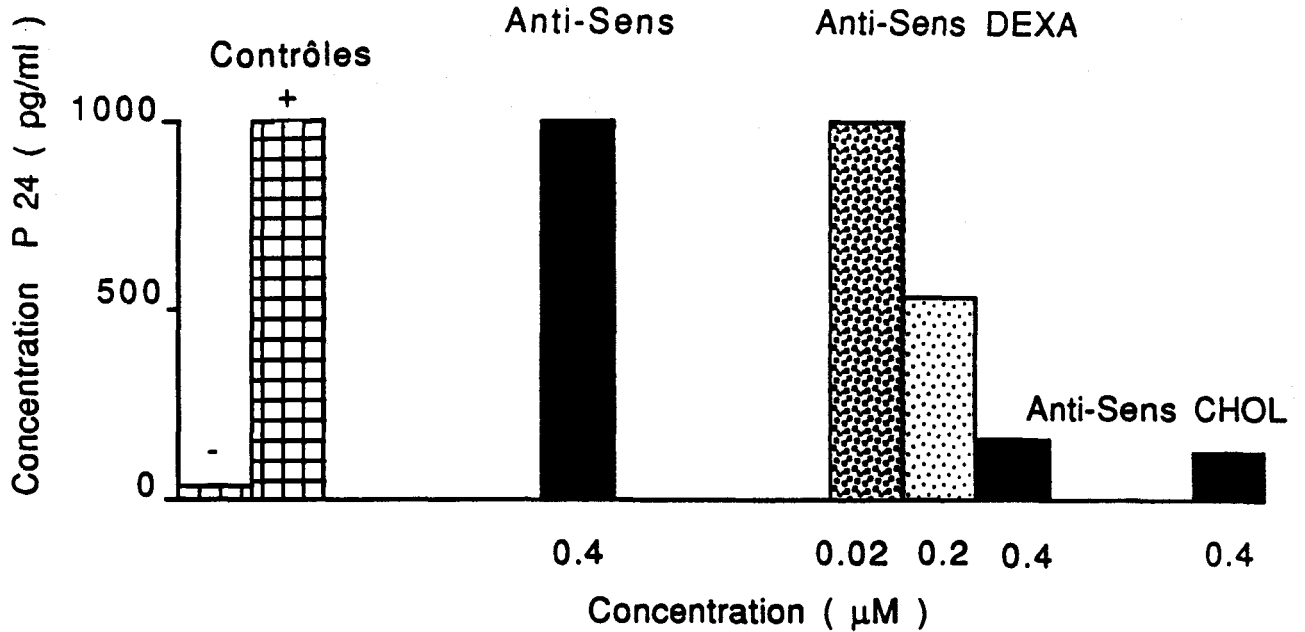
Les couplages sont réalisés dans le DMF avec un excès de réactifs Bop, acide, DIEA (125, 125, 900). Les réactions se déroulent une nuit à température ambiante. Après lavage, les bruts de synthèse sont analysés en HPLC (Figure 36).

Les nouveaux produits apparus aux dépens de l'amino-oligonucléotide sont purifiés par HPLC et contrôlés par spectrométrie de masse TOF. Nous n'avons pu obtenir que le spectre de masse du CHOL- octamère (Figure 37).

## 5 ) **ACTIVITE BIOLOGIQUE**

La mesure de l'activité anti-virale de ces produits a été réalisée par Franck Rouaix (Laboratoire de Jean-Claude Ameisen). Des cellules infectées par le VIH reçoivent des doses variables d'oligodesoxyribonucléotides modifiés. Le dosage de la protéine virale P24 permet d'en déduire l'activité inhibitrice trouvée selon :

DEXA-anti-sens  $\approx$  CHOL-anti-sens  $\gg$  Anti-sens (comme le montre le graphique suivant )



## 6) CONCLUSION

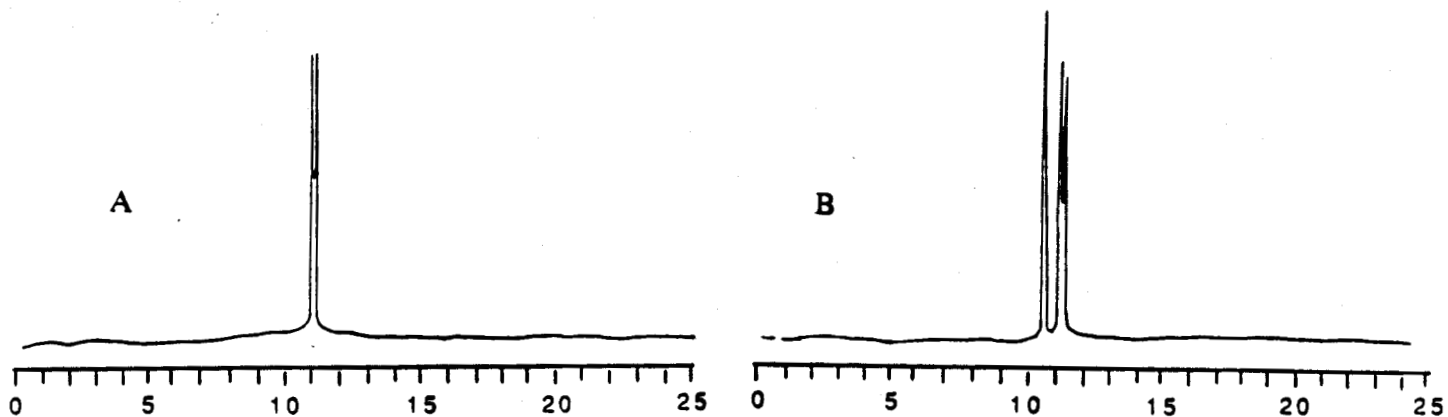
L'anti-sens à dexaméthasone ne semble pas avoir d'avantage par rapport à l'anti-sens à cholestérol.

- L'hydrophobie de la dexaméthasone voisine de celle du cholestérol lui permettrait seulement de jouer le même rôle d'aide au franchissement membranaire.
- L'étude de l'affinité de l'oligodésoxyribonucléotide dexaméthasone pour le récepteur à glucocorticoïde devrait être testée pour savoir s'il y a réellement reconnaissance.

## 7) SYNTHÈSE D'OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES THIOPHOSPHATES

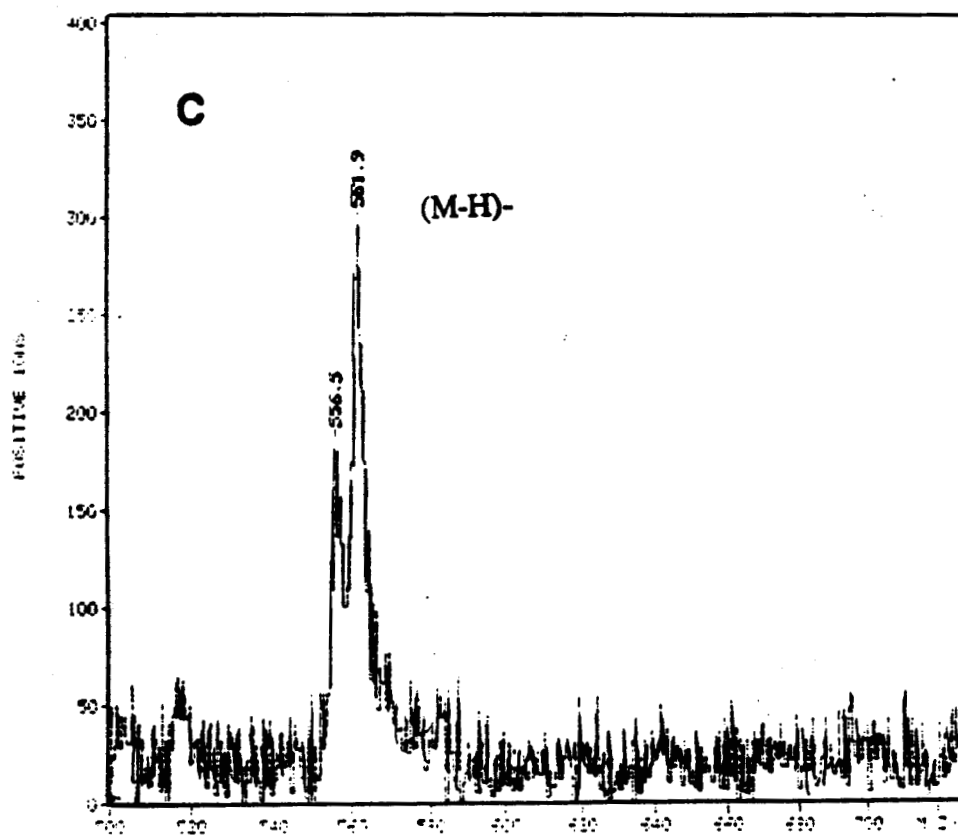
La mise au point des conditions opératoires du dosage de l'activité anti-HIV de nos produits, a été réalisée grâce à un oligodésoxyribonucléotide témoin. Il s'agit d'un 20 mères thiophosphate de séquence 5' ACACCCAATTCTGAAAATGG 3' utilisé par Letsinger en 1989.

Le remplacement de la liaison phosphate internucléotidique par une liaison thiophosphate est obtenue par oxydation du phosphore trivalent par une solution de soufre dans un mélange disulfure de carbone-pyridine pendant deux minutes.



HPLC A) T2 Thiophosphate

B) mélange de T2 Thiophosphate et T2 Phosphate

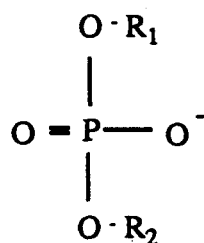


(M-H)-: Masse Moléculaire théorique: 561

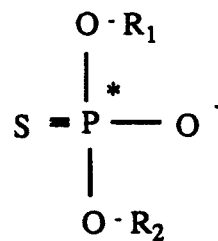
observée: 561,9

(Figure 37 bis) : HPLC et Spectre de masse TOF de T2 Thiophosphate

Cette oxydation d'abord a été réalisée sur le dithymidylate : T2 . L'HPLC du thiophosphate fait apparaitre un doublet correspondant au deux configurations possibles du phosphore qui sort avec un temps de rétention supérieur à celui du dithymidylate phosphate (Figure 37 bis A,B).



Liaison phosphate



Liaison thiophosphate

La masse moléculaire du thiophosphate a été confirmée par spectrométrie de masse TOF(Figure 37 bis C).



**MULTIPLICATION EN PHASE SOLIDE DES  
FONCTIONS AMINES EN 5' D'UN OLIGO-  
DESOXYRIBONUCLEOTIDE**

## A) INTERET

La détection de l'hybridation moléculaire mettant en jeu un oligodésoxyribonucléotide peut se faire par l'addition préalable à l'extrémité le plus souvent 5' de la sonde d'un reste phosphate P<sup>32</sup> (transfert induit par une kinase de bactériophage). Pour éviter l'emploi de la radioactivité, on a recours à des sondes froides : l'oligo est couplé à un fluorophore (ex : fluorescéine), à une enzyme de révélation (ex : peroxydase) ou à une molécule détectable par son affinité pour une autre (ex : couple biotine-avidine). Mais ce transfert technologique est mauvais (perte de sensibilité d'un facteur 20 à 50) ce qui explique la quasi-absence de systèmes de détection par hybridation moléculaire dans le domaine du diagnostic médical à côté des tests biochimiques, immunologiques et bactériologiques. Toutes ces sondes froides ont un seuil de détection pratiquement identique, aussi recherche-t-on, plutôt que de nouveaux groupes reporters, la conception de systèmes de "hérissons moléculaires" consistant à amener simultanément plusieurs de ces groupes signaux d'un oligonucléotide comportant à l'extrémité 5' non plus une, mais plusieurs fonctions amines susceptibles de réagir ensuite avec le groupe reporter choisi.

## B) BIBLIOGRAPHIE

### *1) METHODE DES PHOSPHOROAMIDITES*

- Nelson (1989) a synthétisé une molécule comportant trois fonctions en 3 étapes à partir du 3-amino-1,2-propane diol (Figure 38) :

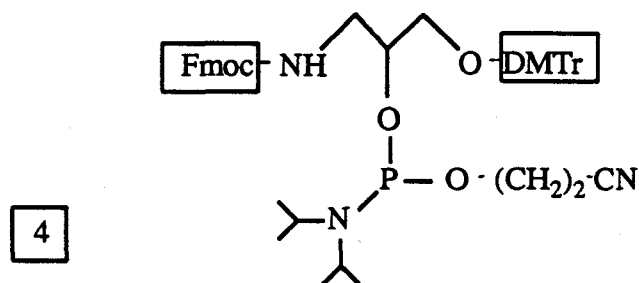


Figure 38 : Réactif de NELSON

- une fonction phosphoroamidite (qui peut être couplée sur un alcool en présence de tétrazole)
- une fonction alcool protégée par un groupement DMTr
- une fonction amine protégée par un groupement Fmoc labile en milieu basique.

Ainsi après l'assemblage de la chaîne nucléotidique le couplage du composé 4 fournit une amine et un alcool protégés. L'oxydation par l'iode, et la déprotection acide de l'alcool permettent un nouveau cycle de couplage du composé 4, et donne l'accès à une nouvelle fonction amine incorporée. La répétition du procédé permet d'obtenir le nombre de fonctions amines désirées. Le traitement ammoniacal final libère les amines de leur groupe protecteur Fmoc (Figure 39).

**Résine**-oligonucléotide-OH

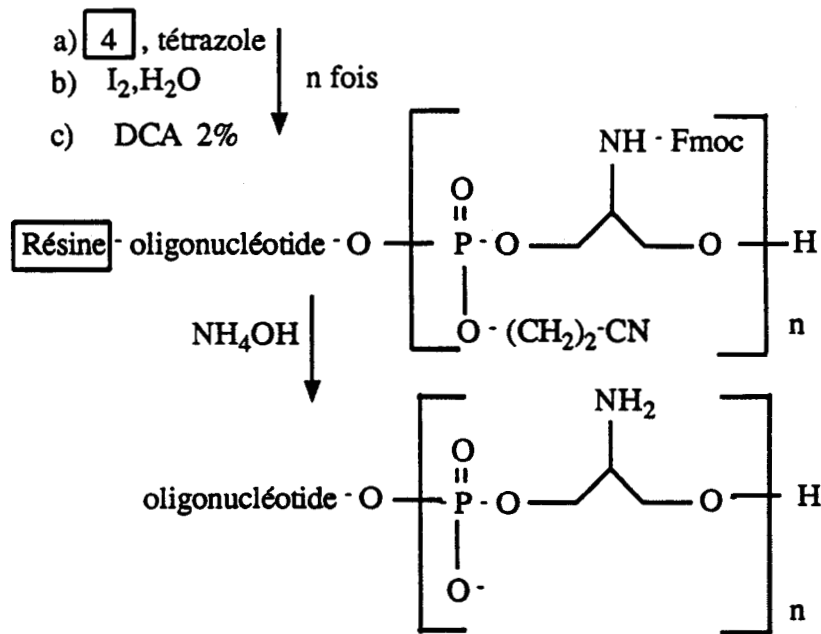


Figure 39 : Principe d'utilisation du réactif de NELSON

L'addition des groupes reporters qui sont des biotines se fait après clivage en milieu homogène.

- Urdéa (1988) a utilisé le même principe avec un dérivé de la thymidine où les fonctions amines apportées sont protégées par trifluoroacétylation (Figure 40). Le principe d'utilisation est le même que pour la molécule de Nelson. Toutefois l'utilisation successive de cette molécule apporte des bases nucléotidiques modifiées supplémentaires qui peuvent perturber les propriétés d'hybridation de l'oligonucléotide.

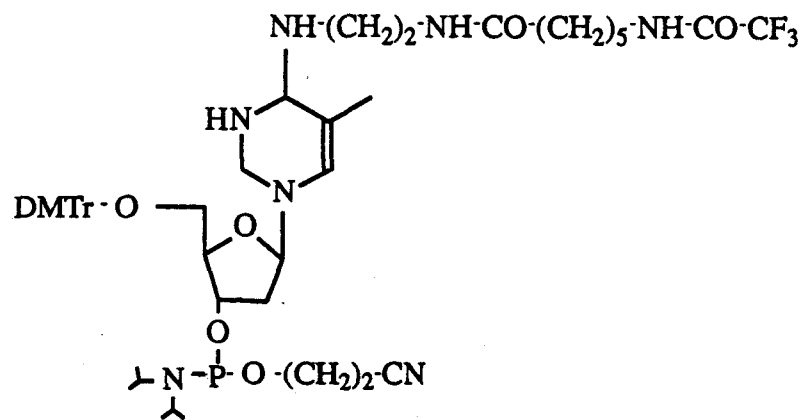


Figure 40 : Réactif d'URDEA

## 2) CONCLUSION

Les avantages et les inconvénients des réactifs type phosphoroamidite ont été soulignés précédemment. Nous avons donc préféré rechercher une voie originale en développant une nouvelle stratégie de multiplication simple des groupes reporters basée sur l'emploi du Bop, réactif dont l'utilisation possible en phase hétérogène sur les oligo-désoxyribonucléotides a été vérifiée et décrite dans le chapitre précédent.

## C) STRATEGIE EMPLOYEE

### 1) COUPLAGES SUCCESSIFS DE LA LYSINE SUR UN AMINOOLIGONUCLEOTIDE

#### 1.1. Utilisation de la lysine

Pour multiplier les fonctions amines d'un oligo nous disposons de la technique de couplage au Bop qui nous permettait d'incorporer en phase solide une molécule à fonction carboxylique. Comme molécule simple, susceptible par couplages successifs de multiplier les fonctions amines, figurait la lysine (Figure 41) que nous avons choisie.

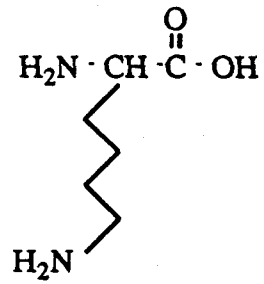


Figure 41 : La lysine

## 1.2. Principe

Le principe de multiplication des fonctions amines est représenté (Figure 42).

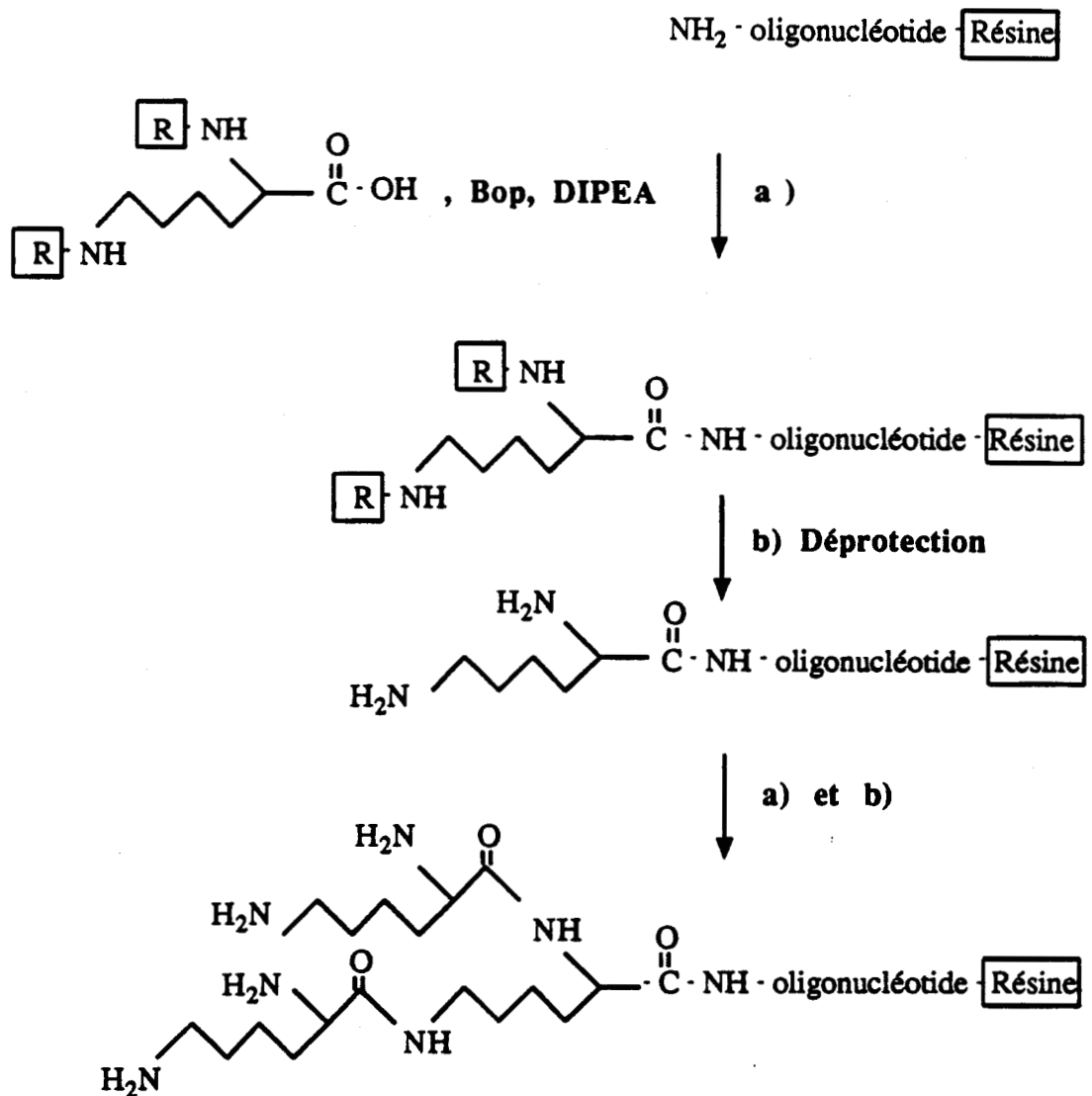


Figure 42 : Utilisation de la lysine protégée pour multiplier les fonctions amines d'un aminooligonucléotide

La première étape consiste en la synthèse d'un amino-oligonucléotide, selon la méthode de Watcher.

La deuxième étape correspond au couplage de la lysine protégée par la méthode du Bop.

La déprotection des fonctions amines, permet à nouveau le couplage de la lysine protégée.

Ainsi l'utilisation de la lysine, pouvait elle permettre de doubler le nombre de fonctions amines à chaque couplage.

Le succès de cette méthode réside d'une part dans la qualité du couplage de la lysine et d'autre part dans la qualité des déprotections des groupements protecteurs de la lysine.

Nous avons donc utilisé différentes protections pour la lysine en évaluant simultanément les rendements de couplage.

## 2) UTILISATION DE LA DI-FMOC-LYSINE

### 2.1. Etude bibliographique

Le groupe fluorénylméthylloxycarbonyle (Fmoc) (Figure 43) introduit par Carpino et Han en 1970 est souvent utilisé pour protéger les amines primaires. Il doit son intérêt au fait qu'il est sélectivement clivable en milieu basique. Ce clivage s'opère par un mécanisme de  $\beta$  élimination en présence d'une amine secondaire comme la pipéridine.

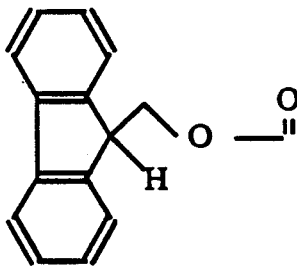


Figure 43 : Le groupe Fluorénylméthylloxycarbonyle ( Fmoc)

Après élimination de l'hydrogène  $\beta$ , le Fmoc se décompose en dibenzofulvène et en gaz carbonique pour libérer l'amine (Figure 44).



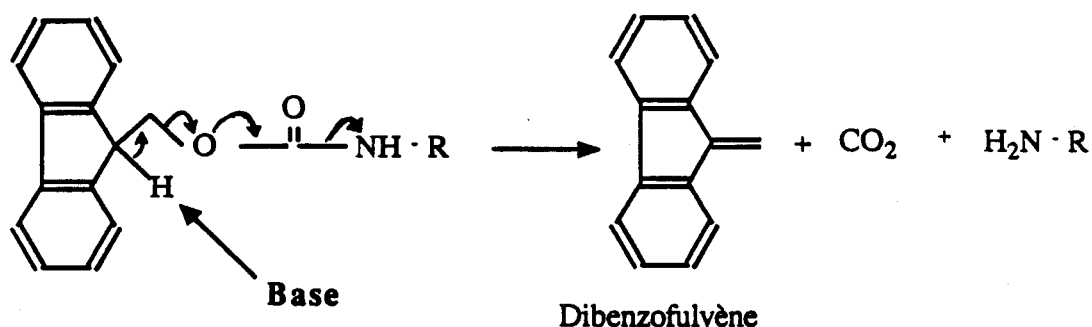


Figure 44 : Mécanisme de déprotection du groupe Fmoc

Le groupement Fmoc avait déjà été utilisé en synthèse d'oligo-ribonucléotide pour protéger l'hydroxyle en 5' (Lehmann, 1989). Les déprotections étaient réalisées par le 1,8-diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ène (DBU) (Figure 45) 0.1M dans l'acétonitrile. Si le traitement par cette base enlève proprement les groupes cyanoéthoxy (groupe protecteur des phosphates), (Smith, 1987) elle ne clive pas l'oligo de sa résine (Smith, 1987).

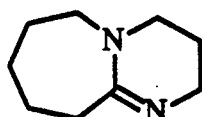


Figure 45 : Le 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7 ène (DBU).

## 2.2. Couplages successifs de la Di-Fmoc-lysine sur un amino tétrathymidylate.

Après avoir synthétisé un aminotétrathymidylate nous avons couplé par la méthode du Bop, la di-Fmoc-lysine en une nuit dans le DMF. Les conditions de couplage étant choisies afin d'obtenir une réaction totale. Le clivage des Fmoc était réalisé par une solution de DBU 0.1M pendant 2 minutes. Puis cette résine subit un nouveau couplage avec la di-Fmoc-lysine pendant une nuit, ainsi qu'une nouvelle déprotection au DBU.

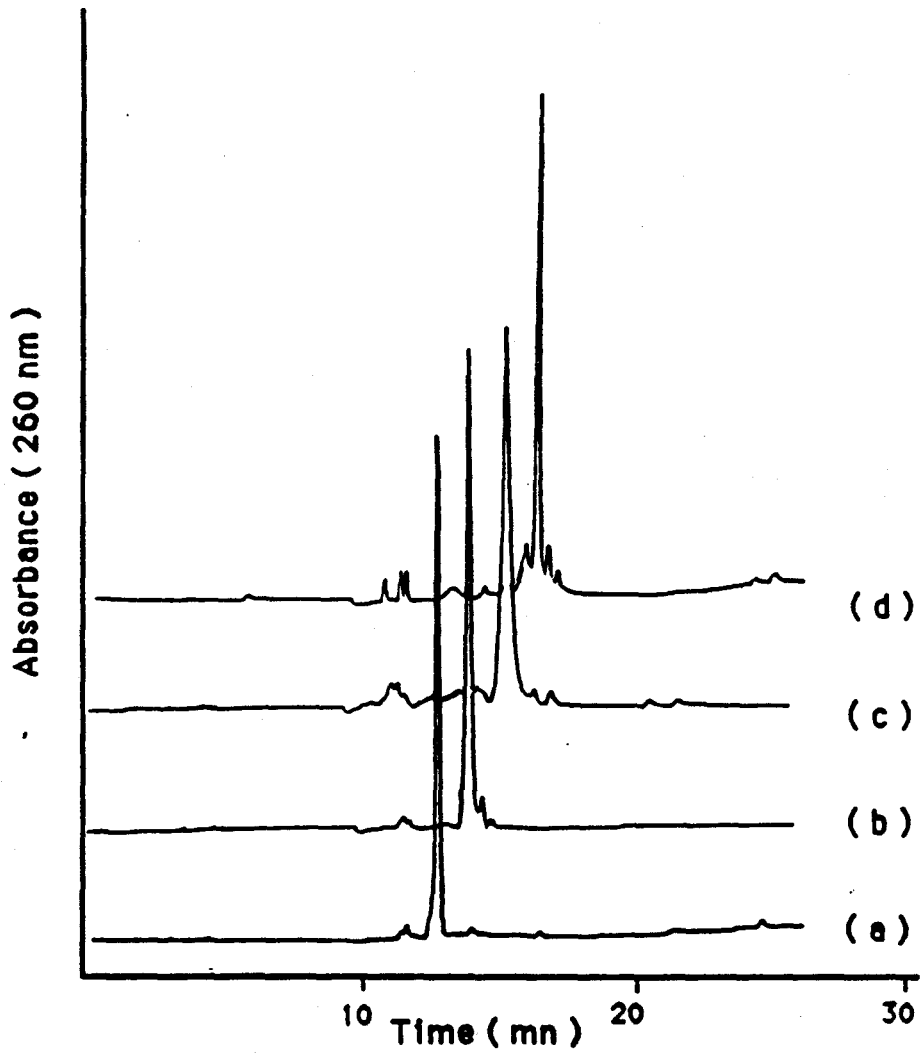
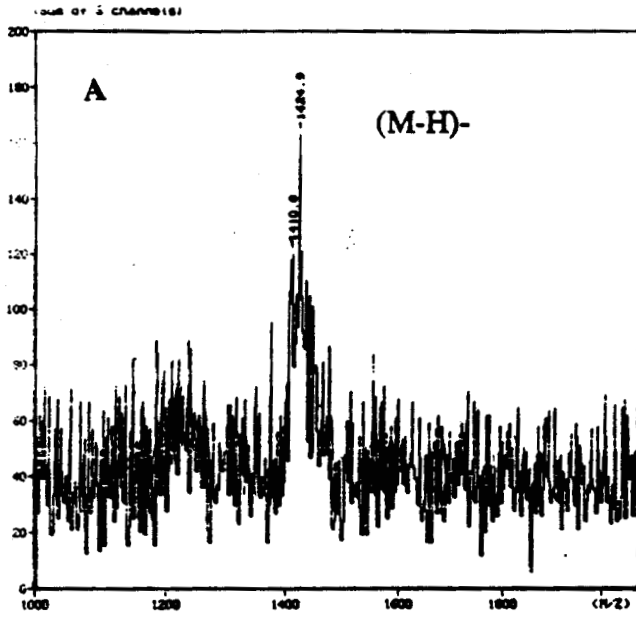
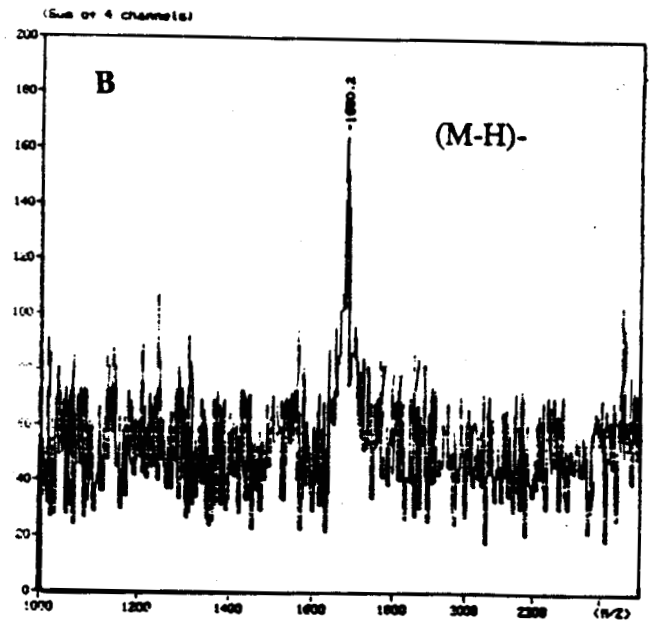


Figure 46 : HPLC des bruts de

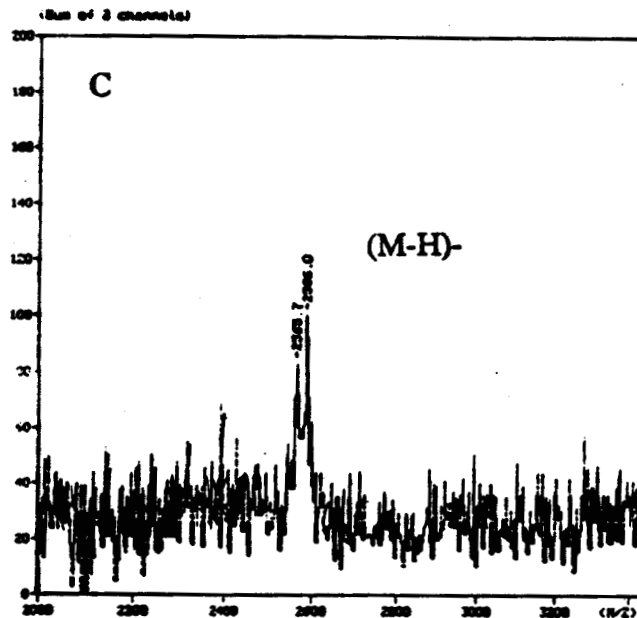
- a)  $\text{NH}_2\text{-T4}$
- b)  $\text{Lys-NH-T4}$
- c)  $(\text{Lys})_2\text{-NH-T4}$
- d)  $(\text{Biotine})_4\text{-(Lys)}_2\text{-(Lys)-NH-T4}$



(M-H) - : Masse moléculaire théorique : 1423  
 observée : 1424,9



(M-H) - : Masse moléculaire théorique : 1679  
 observée : 1679,3



(M-H) - : Masse moléculaire théorique : 2583  
 observée : 2586,0

Figure 47 : Spectre de masse TOF de

- A) Lys-NH-T4
- B) (Lys)2-NH-T4
- C) (Biotine)4-(Lys)2-(Lys)-NH-T4

A ce stade, si les couplages et les déprotections ont bien fonctionné, quatre fonctions amines libres sont apparues en 5' du tétrathymidylate.

### 2.2.1. Fonctionnalisation avec la biotine

Il fallait s'assurer que le multiaminotétrathymidilate pouvait bien réagir, nous avons donc couplé à ce stade un groupe reporter. La biotine étant pour nous (voir chapitre III, C, 6) la molécule signal la plus facilement incorporable, c'est elle qui a été choisie.

Après chaque étape un échantillon de résine a été prélevé et l'oligonucléotide modifié a été séparé de sa résine. Les différents bruts de synthèse ont été examinés en HPLC (Figure 46) et les produits obtenus analysés en TOF (Figure 47).

## 2.3. Résultats

Les différents produits obtenus sont bien les produits désirés. De plus le profil HPLC montre que les différentes réactions sont pratiquement totales. Aussi l'utilisation ultérieure de la di-Fmoc-lysine et de la biotine se fera toujours dans les mêmes conditions opératoires, dans le but d'obtenir un rendement maximum.

La déprotection au DBU élimine bien les Fmoc sans cliver l'oligo de sa résine, il fallait s'assurer cependant que ces conditions basiques de déprotection soient bien inoffensives dans le cas de bases autres que la thymidine, protégées au niveau des fonctions amines exocycliques. La même technique de couplages et déprotections successifs a donc été testée sur un tétramère ACGT.

## 2.4. Application à un tétramère de séquence ACGT

### 2.4.1. Résultats

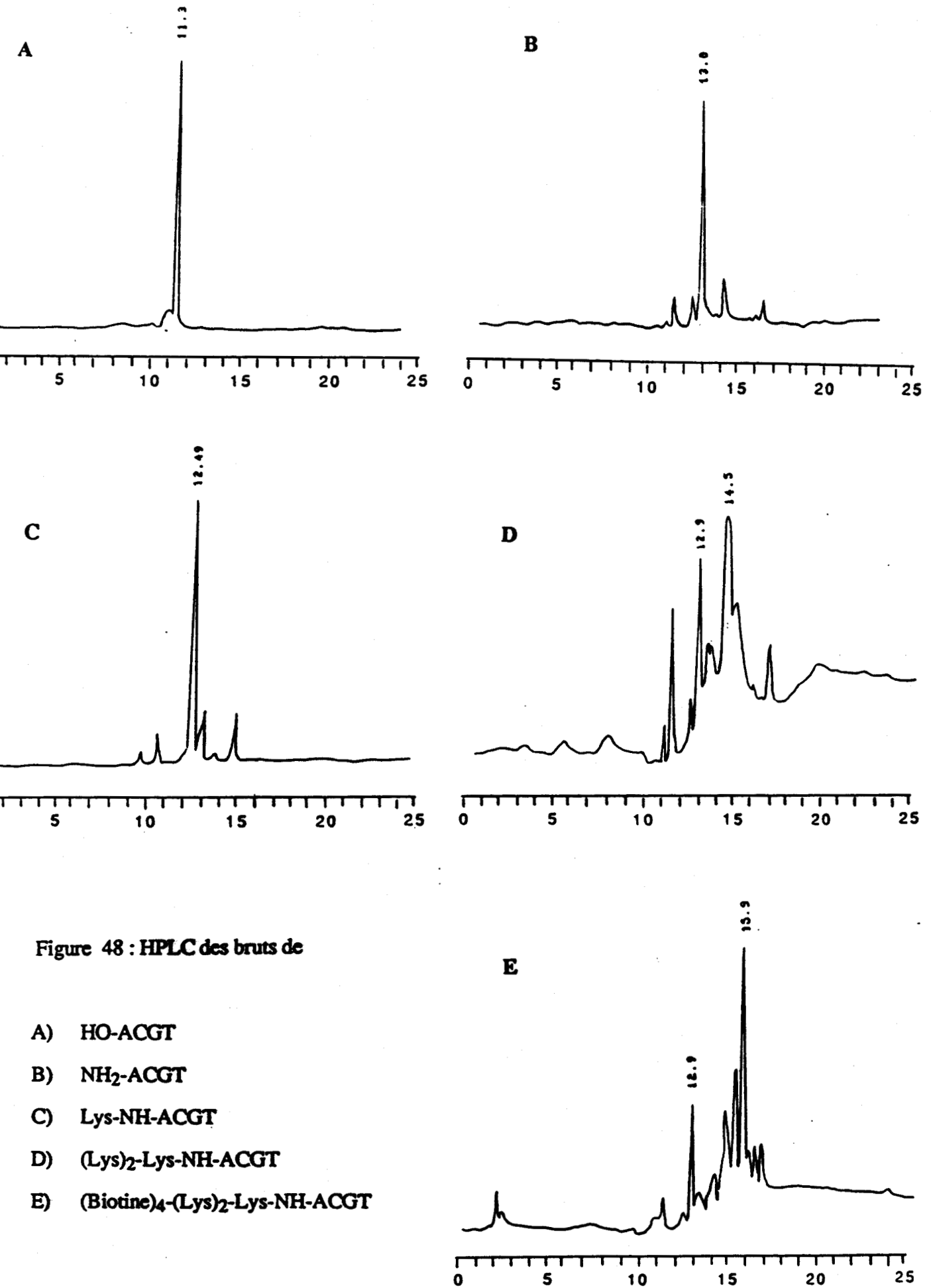
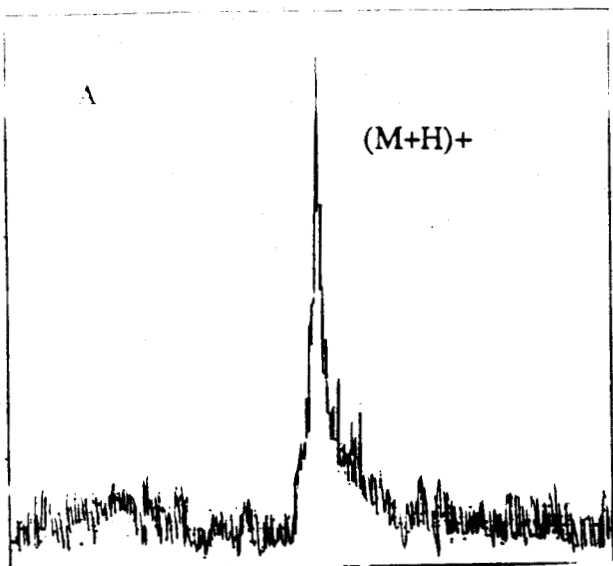
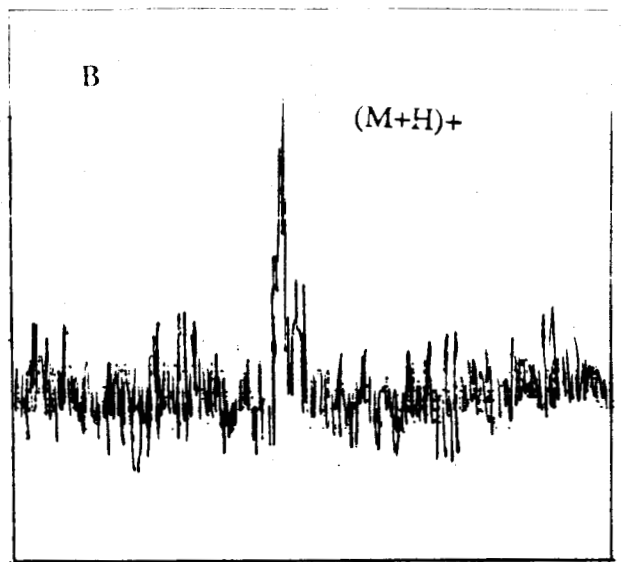


Figure 48 : HPLC des bruts de

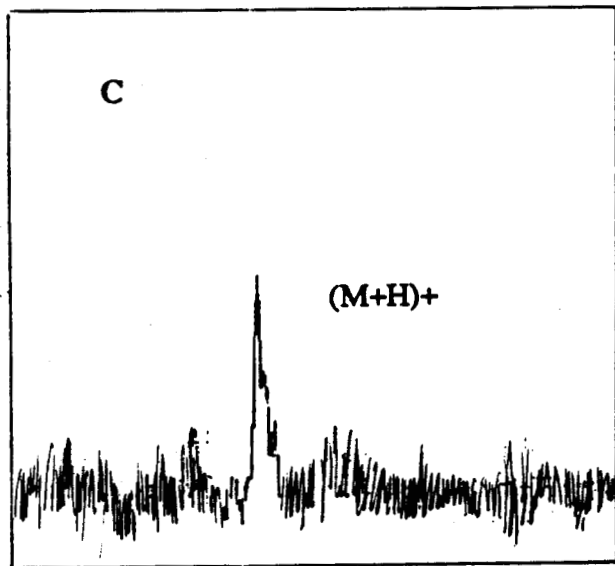
- A) HO-ACGT
- B) NH<sub>2</sub>-ACGT
- C) Lys-NH-ACGT
- D) (Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH-ACGT
- E) (Biotine)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH-ACGT



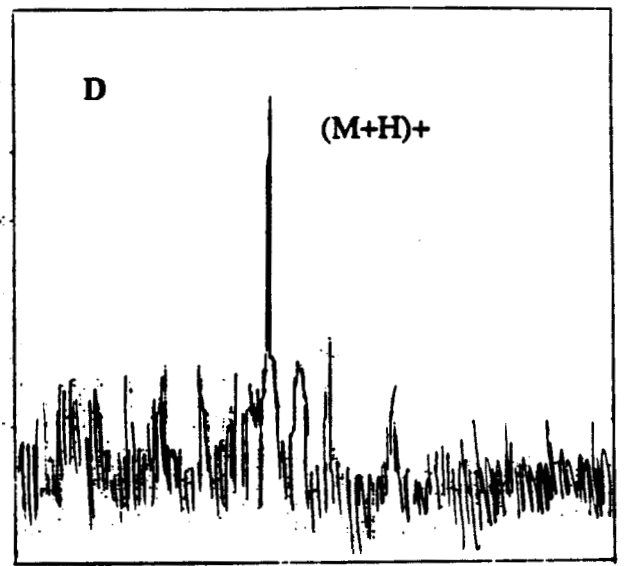
(M+H) + : Masse moléculaire théorique : 1174  
observée : 1173,0



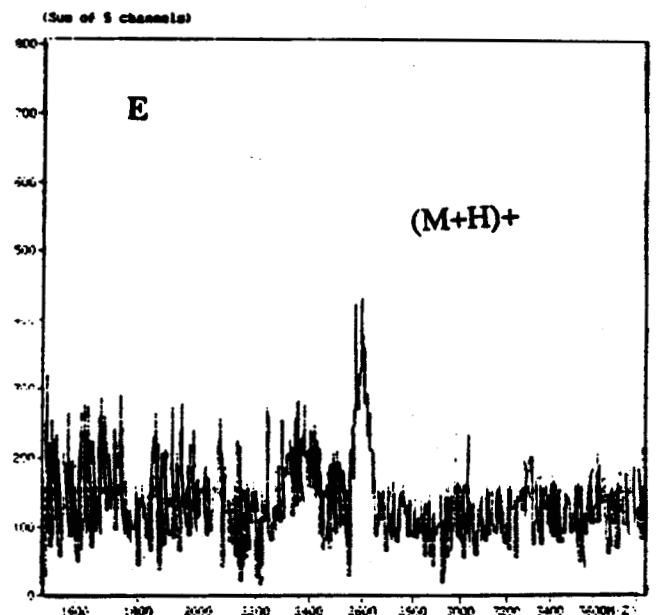
(M+H) + : Masse moléculaire théorique : 1316  
observée : 1317,4



(M+H) + : Masse moléculaire théorique : 1700  
observée : 1702,3



(M+H) + : Masse moléculaire théorique : 1444  
observée : 1446,0



(M+H) + : Masse moléculaire théorique : 2604  
observée : 2605,1

Figure 49 : Spectre demasse TOF de

- A) HO-ACGT
- B) NH<sub>2</sub>-ACGT
- C) Lys-NH-ACGT
- D) (Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH-ACGT
- E) (Biotine)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH-ACGT

Chaque étape est contrôlée par HPLC (Figure 48) :

- Synthèse de OH-ACGT
- Synthèse de NH<sub>2</sub>-ACGT
- Synthèse de Lys-NH-ACGT
- Synthèse de (Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH-ACGT
- Synthèse de (Bio)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH-ACGT

L'utilisation de la di-Fmoc-lysine pour multiplier les fonctions amines ne s'applique pas aussi bien sur le tétramère ACGT que sur le tétramère T4. En effet, les différents profils d'HPLC font apparaître des pics de produits secondaires au fur et à mesure que le nombre de couplages et de déprotection croît.

On retrouve cependant pour les dérivés de l'oligo ACGT, les mêmes profils, et les mêmes évolutions de temps de rétention que pour les dérivés du tétrathymidylate.

Ainsi après chaque transformation on constate ici encore :

- une augmentation du temps de rétention du produit formé,
- que plus les fonctions amines du composé sont nombreuses, plus le pic correspondant est large,
- que la fixation des biotines se traduit par un pic beaucoup plus fin.

La masse moléculaire des différents produits a été obtenue par spectrométrie de masse TOF. Ceci prouve que les produits sont majoritaires (Figure 49)

Si des produits secondaires apparaissent après couplage de la di-Fmoc-lysine ou de la biotine, il est à remarquer :

- que le couplage de la di-Fmoc-lysine par la méthode du Bop sur le tétramère est totale,
- qu'aucun produit de réaction secondaire n'apparaît. Ainsi la diisopropyléthylamine utilisée lors du couplage ne peut être la source d'aucune réaction indésirée,
- que les conditions de couplage de la biotine montrent une transformation totale du tétraaminotétramère pour donner l'oligonucléotide tétrabiotinylé.

Le traitement au DBU étant la cause de l'apparition de produits secondaires, nous avons essayé de diminuer sa concentration lors des étapes de déprotection, et employé comme autre réactif de déprotection des Fmoc la pipéridine.

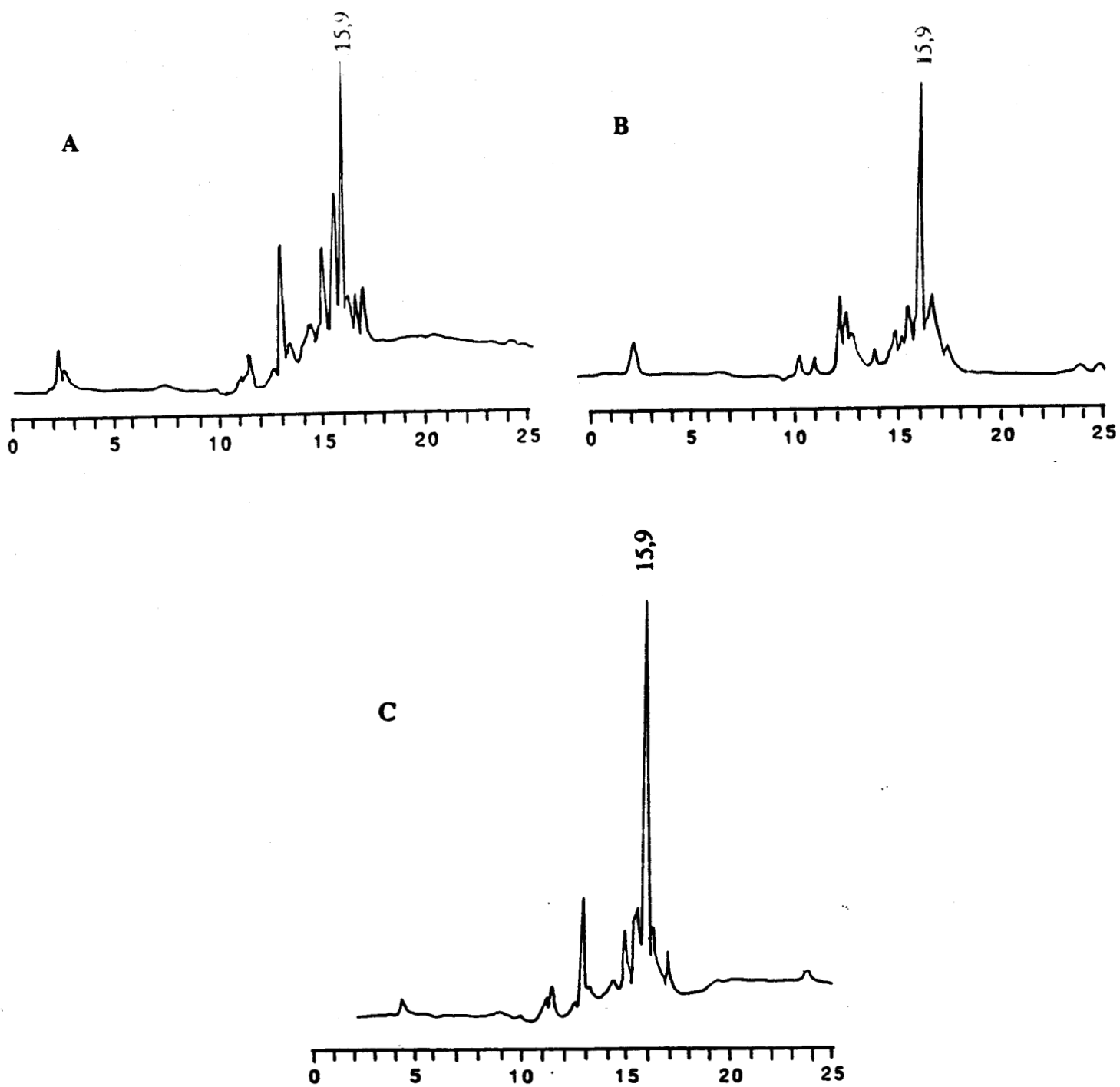


Figure 50 : HPLC des bruts de (Biotine)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH-ACGT :

- A) déprotection DBU 0,01 M 2'
- B) déprotection DBU 0,005 M 2'
- C) déprotection pipéridine 20 % DMF



### 2.4.2 Autres conditions de déprotection

- Diminution de la concentration en DBU

Les conditions de déprotection des Fmoc utilisées jusqu'à présent étaient : traitement par 1ml de DBU 0,1M dans l'acétonitrile pendant 2 minutes. Les résines de synthèse utilisées comportent au départ 1 $\mu$ mol de produit, ainsi le DBU était en excès de 100.

Ainsi, nous avons décidé d'employer deux concentrations plus faibles 0,01 M et 0,005 M, en espérant toujours déprotéger les fonctions Fmoc mais sans cette fois, provoquer de réactions secondaires au niveau des fonctions amines exocycliques.

- Emploi de la piperidine 20% dans le DMF

En synthèse peptidique, la piperidine (20% dans le DMF pendant 20 minutes) est souvent employée pour éliminer les groupements protecteurs Fmoc. (Oferall, 1970). Nous avons essayé ce mode opératoire dans nos cycles successifs de couplage et déprotections.

Nous avons entrepris la synthèse du tétramère ACGT tétrabiotinylé en employant les mêmes conditions que pour le couplage de la di Fmoc lysine, mais en déprotégeant les fonctions amines de trois manières différentes :

- 1ml de DBU 0,01 M dans l'acétonitrile pendant 2'
- 1ml de DBU 0,005 M dans l'acétonitrile pendant 2'
- 1ml de pipéridine 20% dans le DMF pendant 20 minutes.

### 2.4.3 Résultats

L'examen des bruts de synthèse de (Bio)<sub>4</sub> ACGT avec les déprotections suivantes (Figure 50) :

A - DBU 0,01 M 2'

B - DBU 0,005 M 2'

C - pipéridine 20% DMF 20 minutes

permet d'obtenir un même profil d'HPLC. La diminution de la concentration en DBU n'a pas permis de diminuer les réactions secondaires.

On constate que la pipéridine peut aussi être employée pour déprotéger les amines de la lysine, seulement son emploi entraîne aussi la formation de produits indésirables.

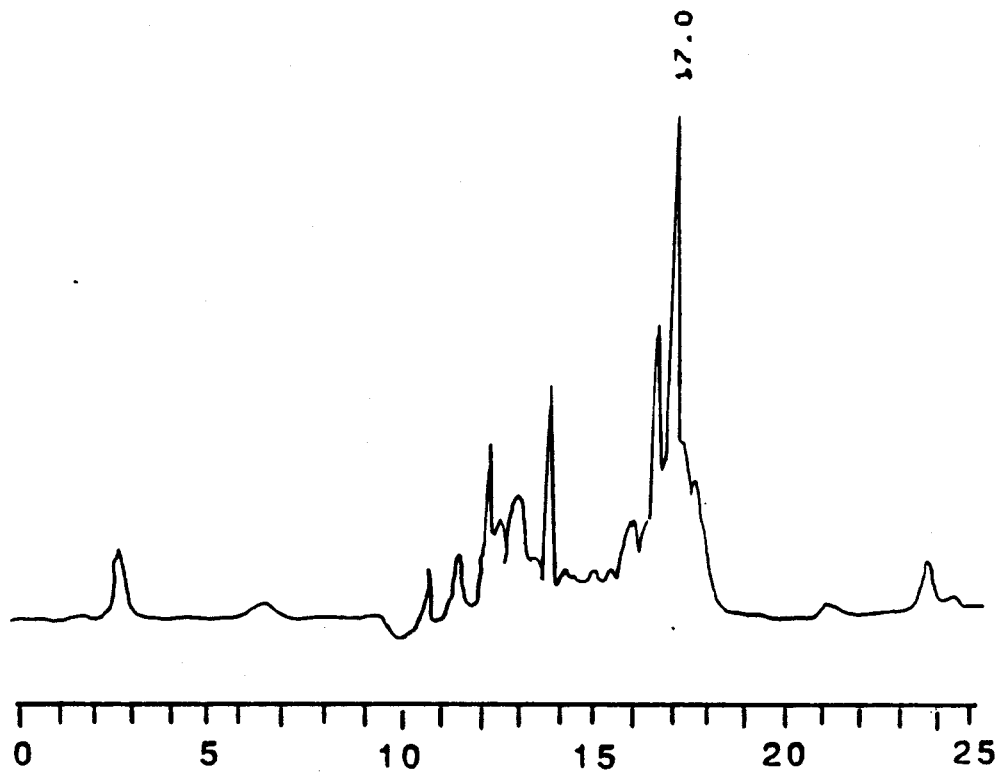


Figure 51 : HPLC du brut de (Biotine)<sub>8</sub>-(Lys)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-NH-ACGT

#### 2.4.4 Limite de l'utilisation de la Di-Fmoc-lysine

Nous avons ajouté un cycle de multiplication des fonctions amines sur le tétraaminotétramère, puis nous avons fixé la biotine. Nous avons utilisé la déprotection du DBU 0,005 M pendant 2' puisqu'elle semblait plus fiable.

L'oligooctabiotinylé semble être le pic à 17 minutes, qui sort au milieu du massif (Figure 51). Toutefois la masse moléculaire de ce produit n'a pu être obtenue.

#### 2.5. Conclusion

L'utilisation de la di-Fmoc-lysine pour multiplier les fonctions amines en 5' d'un oligonucléotide n'est pas envisageable de façon routinière avec des polymères nucléotidiques comportant des amines exocycliques protégées.

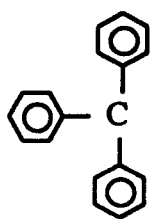
Le passage à l'octabiotinylé s'accompagne de beaucoup trop de produits secondaires.

Ayant observé dans toute cette étude que la di-Fmoc-lysine se couplait correctement et que seules les conditions de déprotection basique semblaient générer des produits indésirables, nous avons étudié la protection de la lysine par des groupements protecteurs labiles en milieu acide.

### 3) *UTILISATION DE LA DITRITYL-LYSINE*

#### 3.1. Intérêt d'utiliser la Di-trityl-lysine

Le sel de diéthylamine de la di-trityl-lysine (Figure 52) a déjà été employé en synthèse peptidique (Amiard, 1957), (Stelakatos, 1958). Amiard et Goffinet ont montré qu'on peut libérer sélectivement la fonction  $\alpha$ -aminée par hydrolyse acide ménagée. En effet, si le groupe tritylé en  $\epsilon$  est éliminé par hydrolyse en acide acétique aqueux à chaud, il résiste par contre à l'acide chlorhydrique dans l'acétone, alors que les groupes  $N\alpha$ -tritylés sont hydrolysés dans tous les cas.



Groupe Trityle ( Tr)

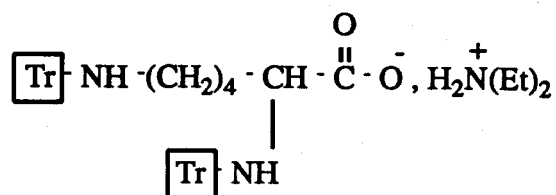


Figure 52 : Sel de diéthylamine de la ditrityl-lysine

Les conditions de déprotection du groupement trityle devaient évidemment respecter l'intégrité de l'oligodésoxyribonucléotide. L'utilisation de la forme sel devait permettre de s'affranchir de l'acidité induite par la fonction carboxylique.

### 3.2. Synthèse de la N $\alpha$ .N $\epsilon$ Di trityl-lysine (sel de diéthylamine)

Le sel de di-trityl-lysine est obtenu en trois étapes à partir du monochlorhydrate de lysine commercial (Figure 53), (Amiard, 1957). Le monochlorhydrate de lysine n'étant vraiment soluble que dans l'eau, il nous a fallu pour réaliser l'étape de tritylation, d'abord former l'ester méthylique soluble en milieu organique en présence de diisopropyléthylamine. L'ester di-tritylé est ensuite saponifié par la potasse à chaud. Après neutralisation l'ajout de diéthylamine permet l'obtention du sel désiré.

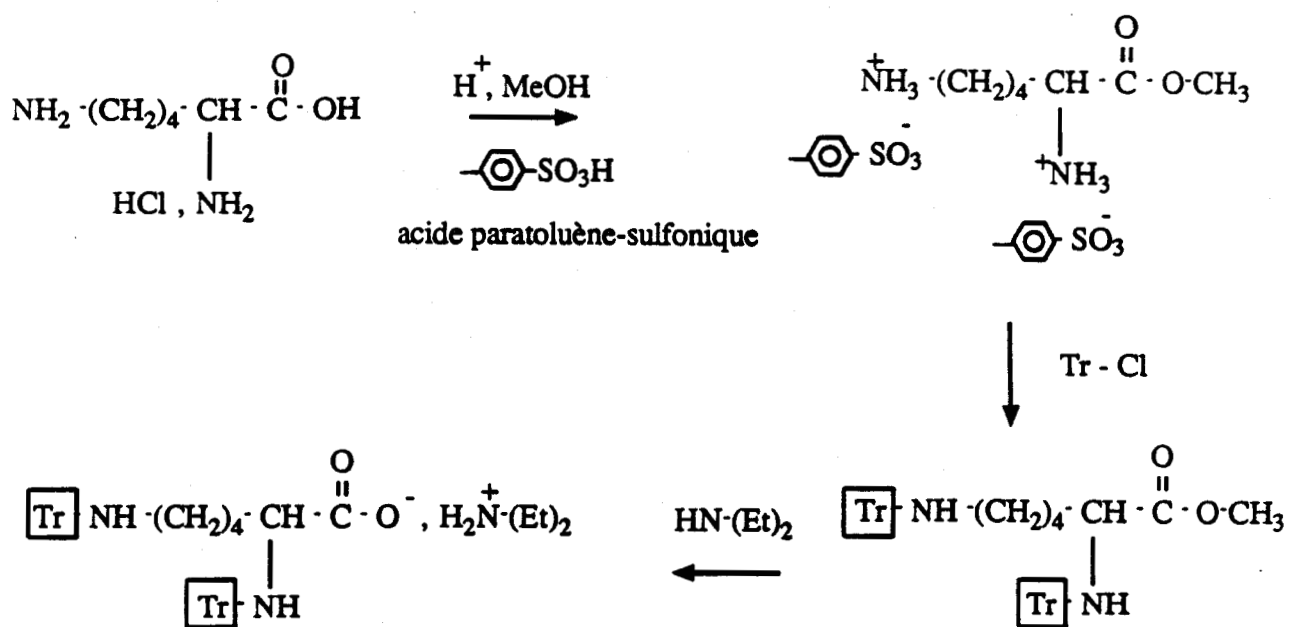
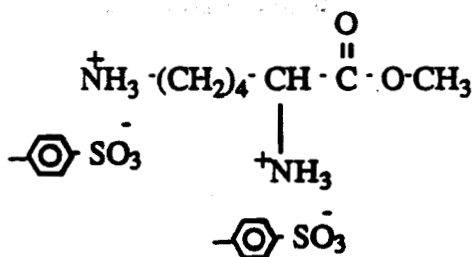


Figure 53 : Synthèse du sel de diéthylamine de la ditrityl-lysine

### 3.2.1. Synthèse du lysinate de méthyle



L'estérification a été réalisée selon la méthode décrite par Bodansky (1984). Le monochlorure de lysine réagit pendant 24 heures à reflux dans le méthanol en présence d'acide paratoluènesulfonique. Le lysinate de méthyl-di-paratoluène sulfonate est isolé de l'éther éthylique.

### 3.2.2. Synthèse du N $\alpha$ ,N $\epsilon$ Di-trityl-lysinate de méthyle

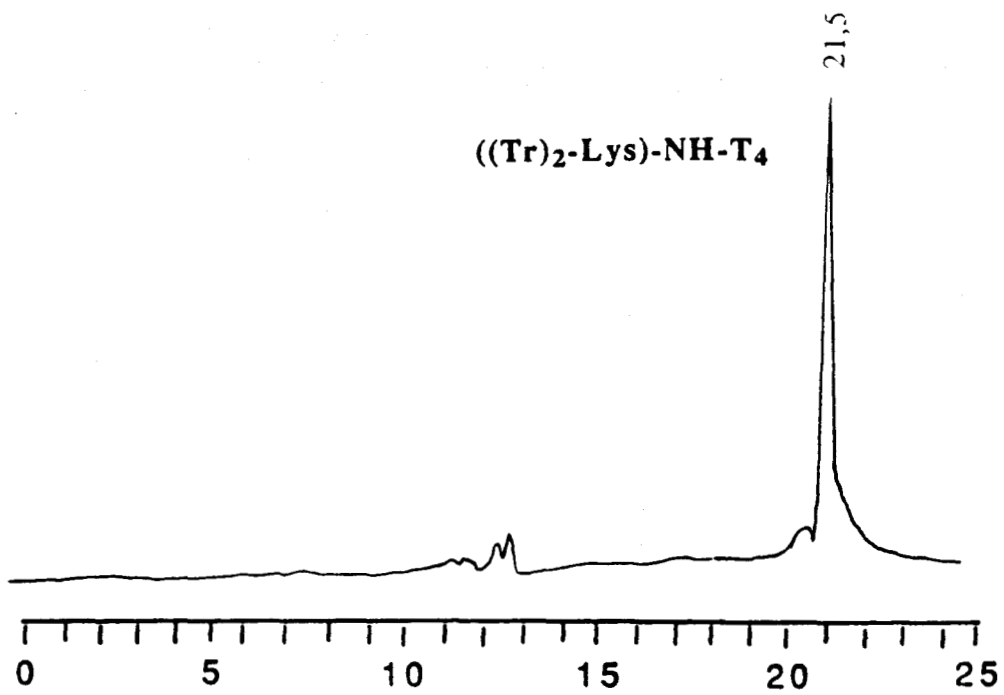


Figure 54 : HPLC du brut de ((Tr)<sub>2</sub>-Lys)-NH-T<sub>4</sub>

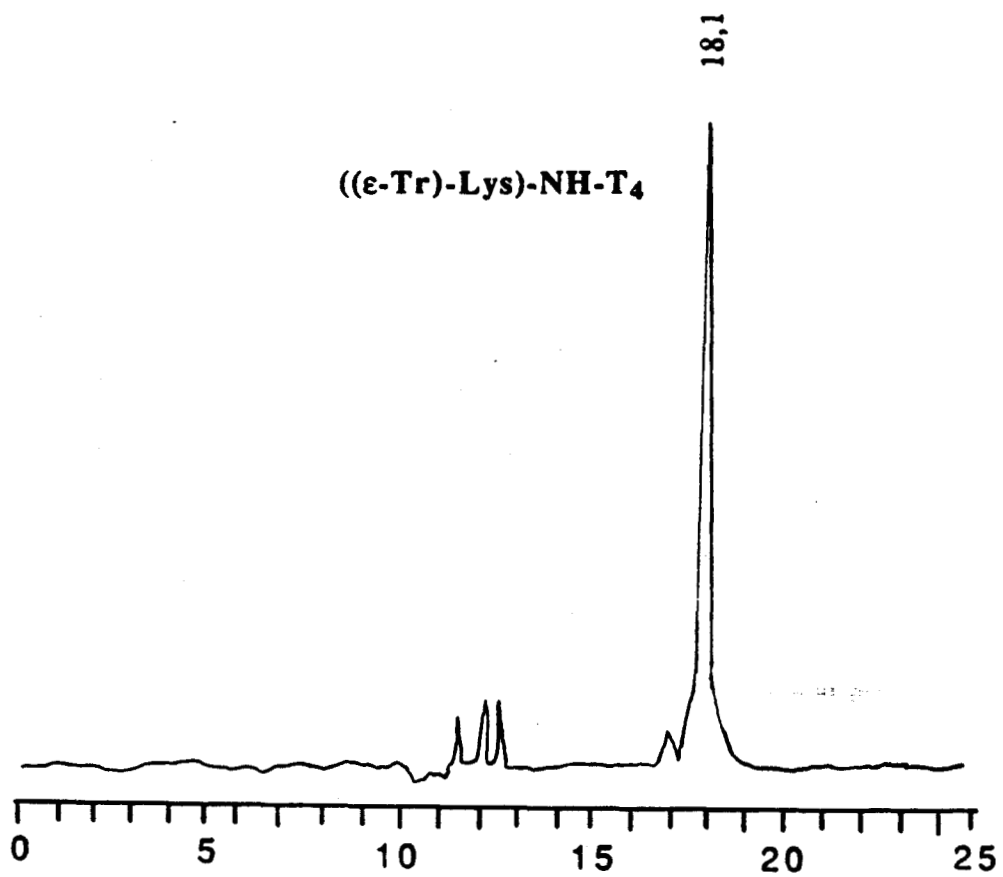
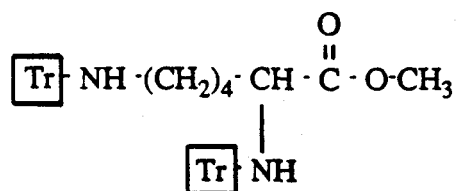
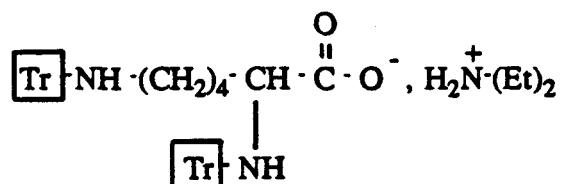


Figure 55 : HPLC du brut de ((Tr)<sub>2</sub>-Lys)-NH-T<sub>4</sub> après traitement au TCA 3 %



Le lysinate de méthyl-di-paratoluène sulfonate se solubilise dans le chloroforme en présence de diisopropyléthylamine. La substitution nucléophile se déroule alors avec 2,5 équivalents de chlorure de trityle en deux heures.

### 3.2.3. Synthèse de la N $\alpha$ ,N $\epsilon$ -Di-trityl-lysine (sel de diéthylamine)



La saponification du N $\alpha$ ,N $\epsilon$ -Di-trityl-lysinate de méthyle est réalisée par la potasse dans le propylène-glycol. Après neutralisation par l'acide acétique, on ajoute la diéthylamine pour salifier la fonction carboxylique sous forme de sel cristallin.

### 3.3. Couplage sur un amino tétrathymidilate

Le sel de diéthylamine de la ditrityl-lysine a été couplé sur un amino-tétrathymidylate. Les conditions employées étaient les suivantes (ditrityl-lysine : Bop : DIPEA) (125 : 125 : 500). Le brut de synthèse a été examiné en HPLC (Figure 54), on remarque que la ditrityl-lysine s'est couplée avec un excellent rendement. Malheureusement nous n'avons pu obtenir la masse moléculaire du produit. L'oligo ditritylé présente un temps de rétention relativement élevé, dû à la présence des deux groupes trityles très hydrophobes.

#### 3.3.1. Détritylation du tétrathymidylate

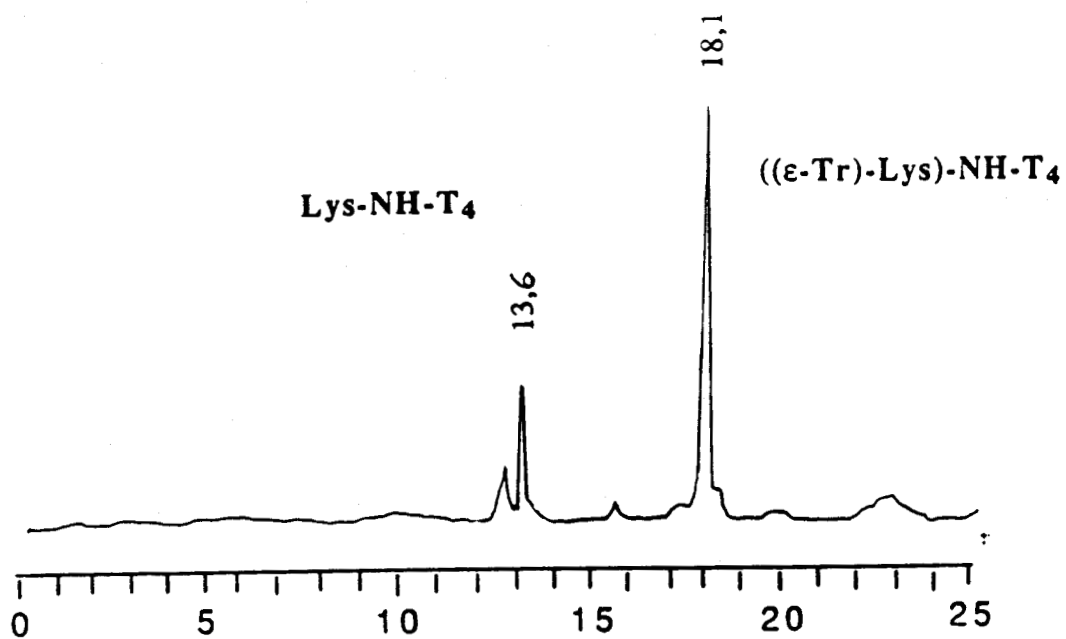


Figure 56 : HPLC du brut de ((Tr)<sub>2</sub>-Lys)-NH-T<sub>4</sub> après traitement au DCA 50 %

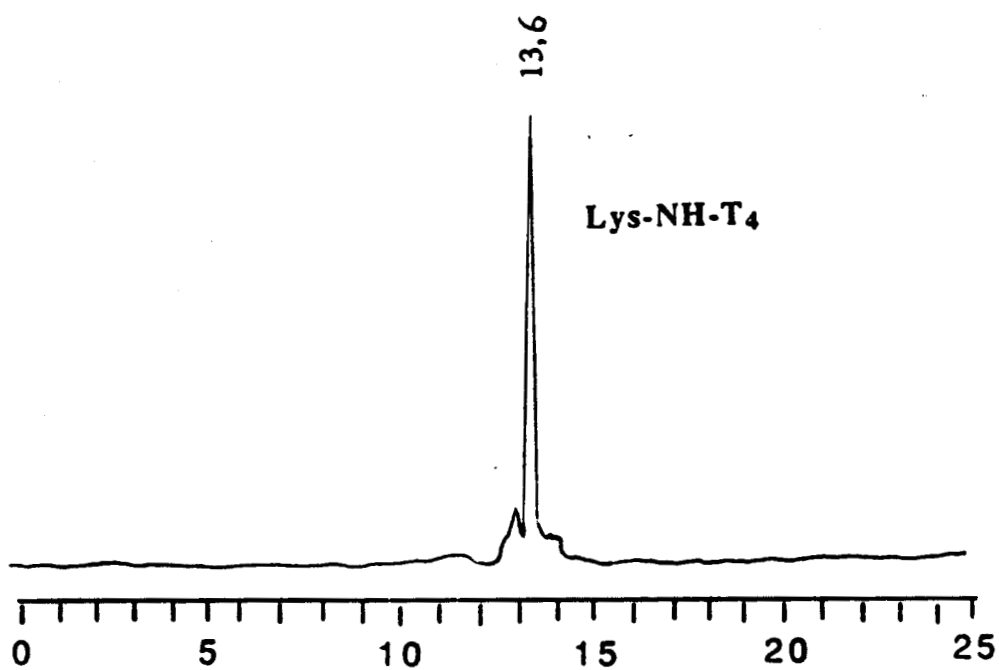


Figure 57 : HPLC du brut de ((Tr)<sub>2</sub>-Lys)-NH-T<sub>4</sub> après traitement par l'acide acétique à 80 % pendant 6'



Agent choisi : acide trichloroacétique 3% dans le chlorure de méthylène. En synthèse d'oligonucléotide on peut utiliser une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 3% dans le chlorure de méthylène pour déprotéger les hydroxyles en 5' protégés par un groupement DMTr. Ces solutions acides sont d'ailleurs commercialisées et sont utilisées directement sur synthétiseur.

Ainsi nous avons traité le tétrathymidilate ditritylé sur résine par le TCA 3% pendant 2'.

Il y a jaunissement de la solution de chlorure de méthylène du à la présence des carbocations trityles libérés. Le contrôle HPLC de cette déprotection (Figure 55) montre que l'oligoditrylé (21,5') a disparu au profit de l'oligomonotrylé en  $\epsilon$  (18,1') ceci confirmant la possibilité de déprotection sélectivement (Amiard et Goffinet, 1952). Il nous fallait donc des conditions de déprotection acide plus sévères.

#### Acide dichloroacétique à 50% dans le chlorure de méthylène.

La déprotection par l'acide dichloroacétique (DCA) à 50% dans le chlorure de méthylène a été réalisée en deux minutes puis en quatre minutes.

Ce traitement clive la fonction trityle en  $\alpha$  et une partie de trityle en  $\epsilon$  (Figure 56).

Les profils de déprotection sont identiques pour deux minutes et 4 minutes de réaction. Cependant, le pic correspondant au tétratymidylate sur lequel est fixée la lysine (13,6') commence à apparaître.

#### Acide acétique aqueux à 80%, 5 minutes à 100%

La déprotection a d'abord été réalisée par l'acide acétique à 80% à froid pendant une demi-heure et une heure. Seulement les conditions à froid ne sont pas suffisantes pour déprotéger le trityle en  $\epsilon$ . C'est pourquoi, nous avons repris les conditions de Amiard pour libérer cette fonction amine. Le résultat du traitement par l'acide acétique concentré pendant 5' à ébullition donne le résultat montré. On constate qu'il ne reste pratiquement plus de monotryl ( $\epsilon$ )-T4 et que la lysine-T4 devient le produit majoritaire. En prolongeant d'une minute le traitement acide à chaud (Figure 57), la transformation du monotryl-T4 en lysine T4 est totale (le pic à 13,6' a été contrôlé en spectrométrie de masse TOF pour confirmer qu'il s'agissait bien de Lys-NH-T4).

### 3.4. Conclusion

Nous avons montré que le sel de diéthylamine de la di-trityl-lysine pouvait se coupler par la méthode du Bop sur un aminotétrathymidylate avec un très bon rendement. Les problèmes apparaissent lors de la déprotection des fonctions amines. La fonction amine en  $\alpha$  peut être déprotégée par une solution de TCA 3% (solution qui ne dégrade pas l'oligonucléotide puisqu'elle est utilisée dans les synthétiseurs automatiques).

En ce qui concerne la fonction amine en  $\epsilon$ , elle ne peut être déprotégée que par l'acide acétique concentré bouillant, condition incompatible en particulier avec la stabilité de la liaison N1-C1'.

Ainsi nous-a-t-il fallu utilisé un groupement protecteur plus labile en milieu acide.

#### 4) UTILISATION DE SEL DE LA DI-DIMETHOXYTRITYL-LYSINE

##### 4.1. Intérêt d'utiliser un sel de la di-diméthoxytrityl-lysine

Le groupement DMTr, largement utilisé en synthèse d'oligonucléotide est extrêmement labile en milieu acide. Cette grande labilité des fonctions DMTr, rend vraiment indispensable le maintien de la fonction acide de la lysine sous forme carboxylate (Figure 58). La lysine sous forme acide carboxylique libre pourrait en effet causer une auto-déprotection.

Le groupe 4,4'-Didiméthoxytrityle (DMTr)

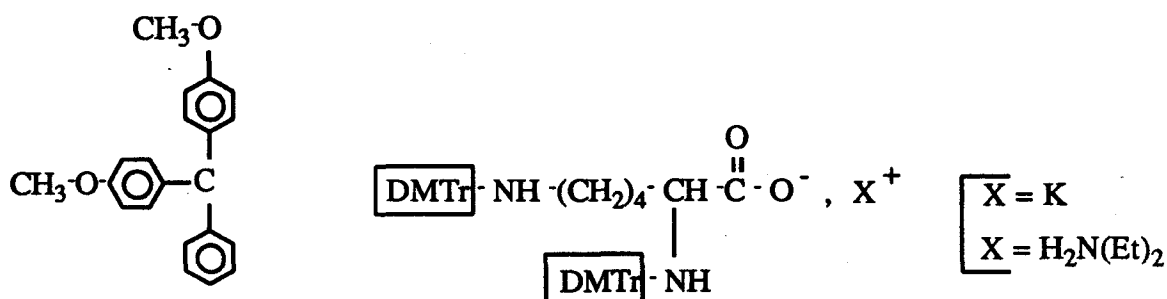


Figure 58 : Sels de la didiméthoxytrityl-lysine

##### 4.2. Synthèses de sels de la di-diméthoxytrityl-lysine

Nous avons synthétisé deux sels de la di-diméthoxytrityl-lysine. La première méthode utilisée, était celle employée pour la synthèse du sel de diéthylamine de la di-trityl-lysine. Seulement, la dernière réaction de saponification de l'ester méthylique n'a pu être effectuée par la potasse méthanolique dans l'éthylène glycol à haute température (188°C).

Le suivi de la saponification par chromatographie sur couche mince, mettait en évidence la dégradation de l'ester par la perte des fonctions diméthoxytrityles. La saponification par le tertiobutylate de potassium nous a permis en revanche d'obtenir le sel de potassium de la N $\alpha$ , N $\epsilon$ - di diméthoxytrityl-lysine.

Simultanément dans une autre approche nous avons obtenu la di-DMTr lysine sous sa forme estérifiée par le 9 fluorenylméthanol, forme ester beaucoup plus facilement saponifiable par exemple sous l'action de la diéthylamine.

#### 4.2.1. Synthèse du sel de potassium de la N $\alpha$ , N $\epsilon$ , di-diméthoxytrityl-lysine (Figure 59)

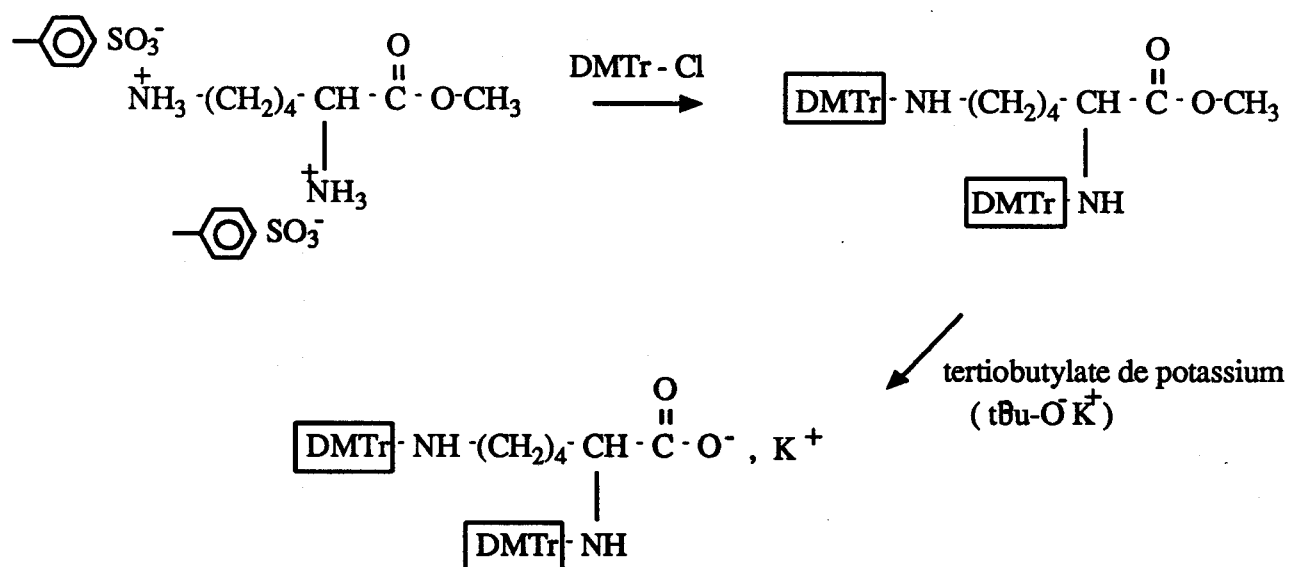
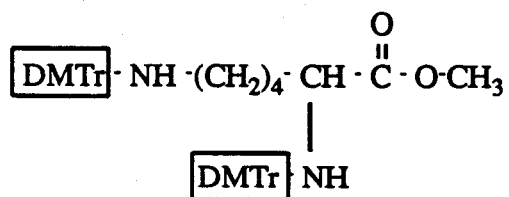


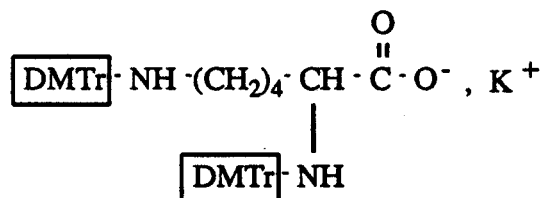
Figure 59 : Synthèse de sel de potassium de la di-diméthoxytrityl-lysine

##### 4.2.1.1. Synthèse du N $\alpha$ , N $\epsilon$ , di-diméthoxytrityl-lysinate de méthyle



Les conditions opératoires sont les mêmes que celles employées pour la synthèse du N $\alpha$ , N $\epsilon$ , di-trityl-lysinate de méthyle. Cependant il nous a fallu purifier cet ester, pour ôter toute trace de chlorure de diméthoxytrityl n'ayant pas réagi. Ceci nous a permis de contrôler en chromatographie sur couche mince qu'aucune dédiméthoxytritylation ne se produit lors de la saponification. La purification a été réalisée par chromatographie sur couche épaisse de silice (éluant : chlorure de méthylène ; acétate d'éthyle) mais en présence de 5% de diéthylamine pour respecter la labilité des groupements DMTr par une certaine basicité.

#### 4.2.1.2. Synthèse du sel de potassium de la N $\alpha$ , N $\epsilon$ -di-diméthoxytrityl-lysine



L'action du tertiobutylate de potassium en excès a permis de cliver la liaison ester méthylique, condition respectant l'intégrité des groupements DMTr.

La saponification du N $\alpha$ , N $\epsilon$ -di-diméthoxytrityl-lysinate de méthyle est réalisée dans le tétrahydrofurane en deux heures à température ambiante avec 20 équivalents de tertiobutylate de potassium. On ajoute ensuite un peu d'eau pour transformer le tertiobutylate de potassium en tertiobutanol et en hydroxyde de potassium, l'évaporation du solvant fournit un résidu repris par eau et chloroforme. La phase organique donne une huile directement utilisable pour le couplage au Bop.

#### 4.2.2. Synthèse du sel de diéthylamine de la N $\alpha$ , N $\epsilon$ -di-diméthoxytrityl-lysine

Pour préparer cet ester il a fallu protéger les fonctions amines de la lysine par des groupements labiles en milieu acide.

Cette protection est réalisée par le groupe tertibutyloxy-carbonyl (Boc) (Carpino, 1957), clivable à l'aide d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 50% dans le chlorure de méthylène.

Ainsi la di-Boc-lysine commerciale est transformée en ester nitrophénolique de di-Boc-lysine en présence de DCC. L'ester fluorénylméthylrique est obtenu par transestérification catalysée par l'imidazole. Le traitement au TFA 50% déprotège les fonctions amines, qui peuvent être ensuite diméthoxytritylées. Et enfin la saponification par la diéthylamine fournit le sel de diéthylamine de la N $\alpha$ , N $\epsilon$ , diméthoxytrityl-lysine (Figure 60).

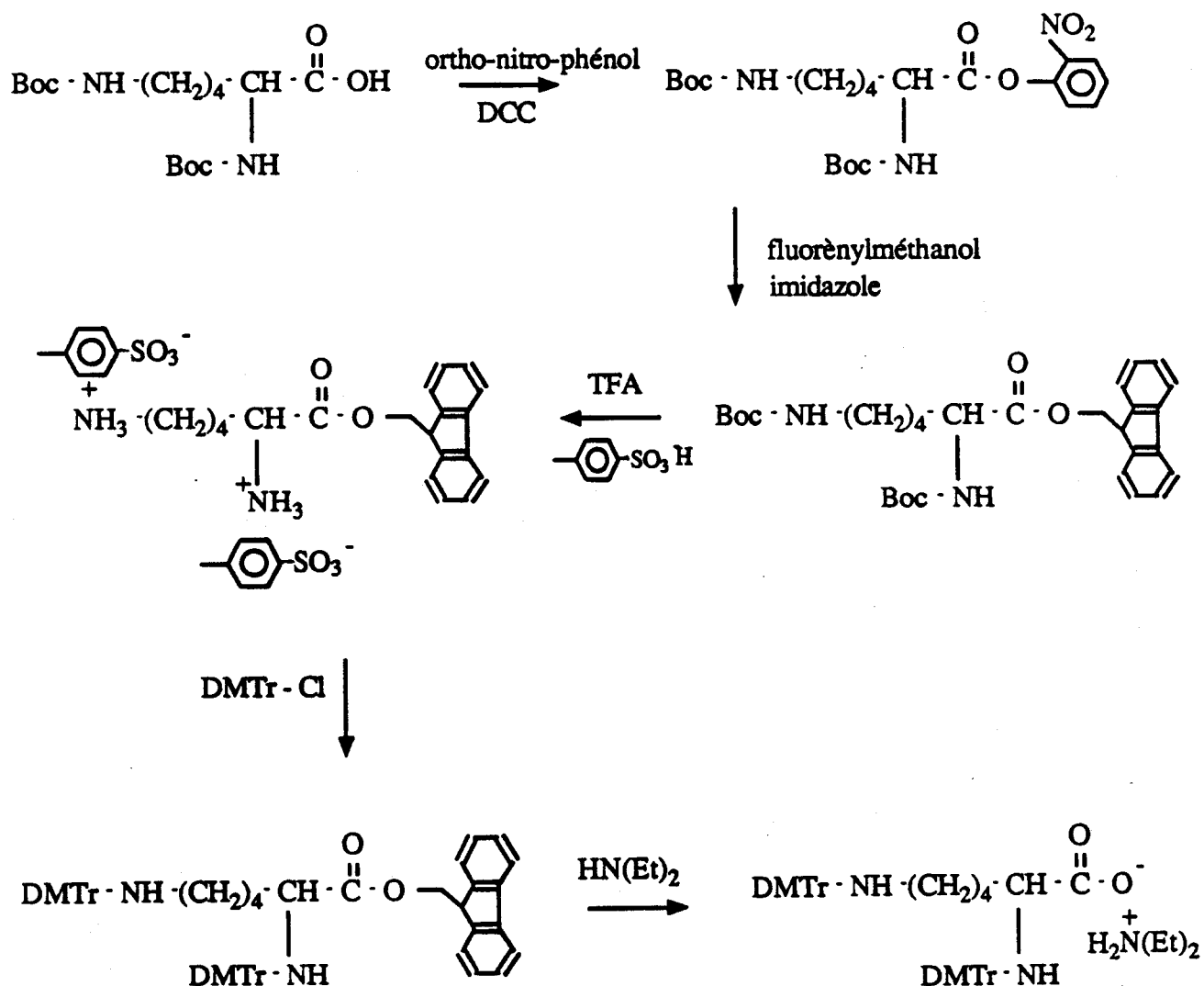
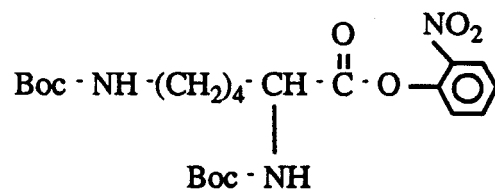
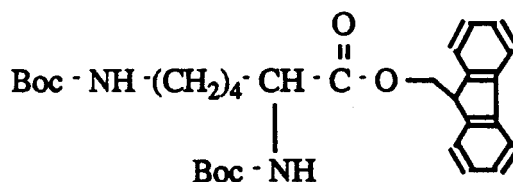


Figure 60 : Synthèse du sel de diéthylamine de la di-diméthoxytrityl-lysine

4.2.2.1. Synthèse de l'ester nitrophénolique de la N $\alpha$ , N $\epsilon$ -di-Boc-lysine

La synthèse de l'ester nitrophénolique de la N $\alpha$ , N $\epsilon$ -di-Boc lysine a été obtenue en nous basant sur le protocole employé par Bodansky, 1984.

La di-Boc-lysine réagit avec la DCC pour former l'O-acylisourée qui subit ensuite l'attaque nucléophile de l'orthonitrophénol en excès. La DCU est filtrée et le milieu réactionnel est lavé par des solutions basiques et acides pour éliminer l'orthonitrophénol. On obtient ainsi l'ester nitrophénolique de la N $\alpha$ , N $\epsilon$ , di-Boc-lysine.

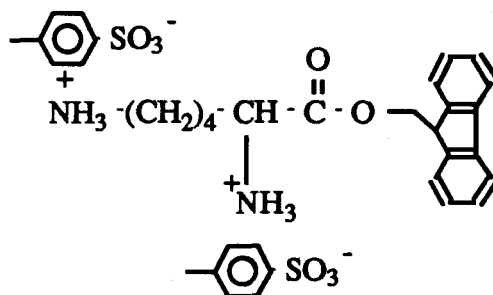
4.2.2.2. Synthèse de l'ester fluorénylméthyle de la N $\alpha$ , N $\epsilon$ -di-Boc lysine

Cette trans- $\epsilon$ -térification a lieu dans le toluène en présence de fluorenylméthanol et d'imidazole. L'imidazole active l'hydroxyle de l'alcool qui vient attaquer le carbone  $\delta^+$  du carboxylique pour former l'ester fluorénylméthyle.

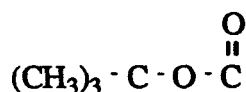
Toutefois l'imidazole, en tant que base, peut provoquer la saponification de l'ester désiré.

C'est pourquoi il est impératif d'arrêter la réaction quand la conversion de l'ester nitrophénolique est terminée. La purification de ce produit est réalisée par chromatographie sur couches épaisses de silice.

4.2.2.3. Synthèse du sel de N $\alpha$ , N $\epsilon$ -diparatoluène sulfonate de lysinate de fluorénylméthyle



\* La déprotection des fonctions amines est effectuée grâce au TFA 50% dans le chlorure de méthylène pour donner l'amine protonnée, les carbocations tertio-butyliques, et du gaz carbonique (Figure 61). Cette réaction est totale en un quart d'heure, cependant pour éviter les risques de trifluoroacétylation des amines, (Bednarek, 1982) on ajoute deux équivalents d'acide paratoluène sulfonique. C'est ce dernier acide plus fort que le TFA qui protonne alors les fonctions amines. Après avoir chassé le solvant, le produit est précipité et lavé par une solution d'éther éthylique.



Groupe tertibutyloxycarbonyle (Boc)

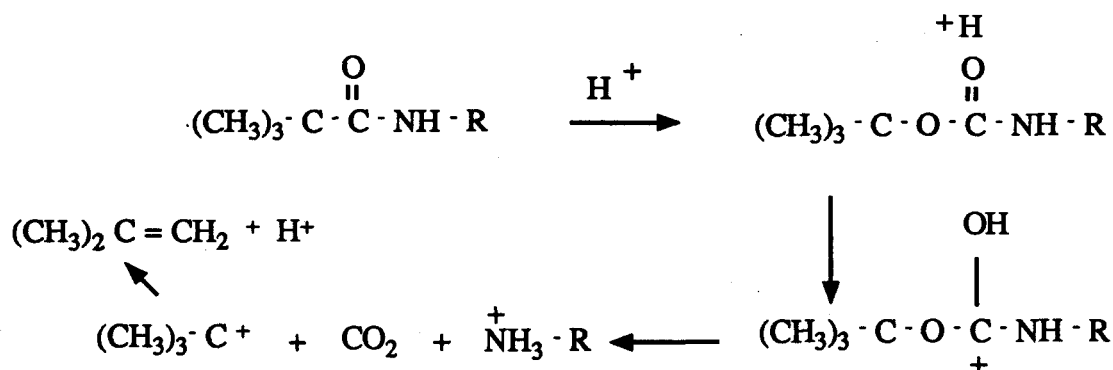
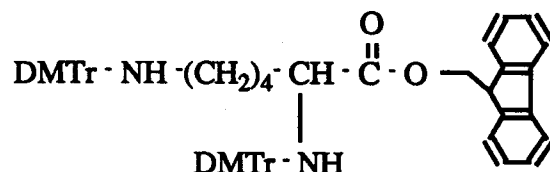


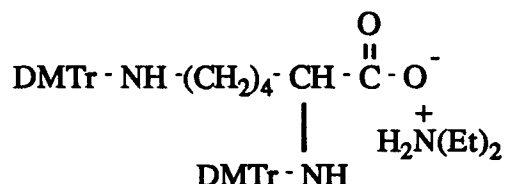
Figure 61 : Déprotection du groupe tertibutyloxycarbonyle en milieu acide

#### 4.2.2.4. Synthèse du N $\alpha$ , N $\epsilon$ -di-diméthoxytrityl-lysinate de fluorènylméthyle



\* Cette diméthoxytritylation s'effectue de façon classique dans le chloroforme en présence de 2,5 équivalents de chlorure de diméthoxytrityle et de 6 équivalents de diisopropyléthylamine. En deux heures la réaction est terminée, le contrôle chromatographie sur couche mince nous prouve que la diisopropyléthylamine ne provoque pas la moindre saponification. Après lavage et séchage cet ester est purifié sur couche épaisse (éther de pétrole - acétate d'éthyle) 8-2 en présence de diisopropyléthylamine.

#### 4.2.2.5. Synthèse du sel de diéthylamine de la di-diméthoxytrityl-lysine



La saponification de l'ester a lieu dans le chloroforme avec 40 équivalents de diéthylamine. Sous l'influence de la base, la protection ester disparaît par un mécanisme de  $\beta$ -élimination, pour donner le dibenzofulvène et le carboxylate (Figure 62) (Bednarec, 1983). Après avoir évaporé le solvant, il est nécessaire d'éliminer le dibenzofulvène sans nuire aux fonctions diméthoxytrityles. Aussi lave-t-on le résidu avec une solution de diéthylamine à 5% dans l'éther de pétrole.



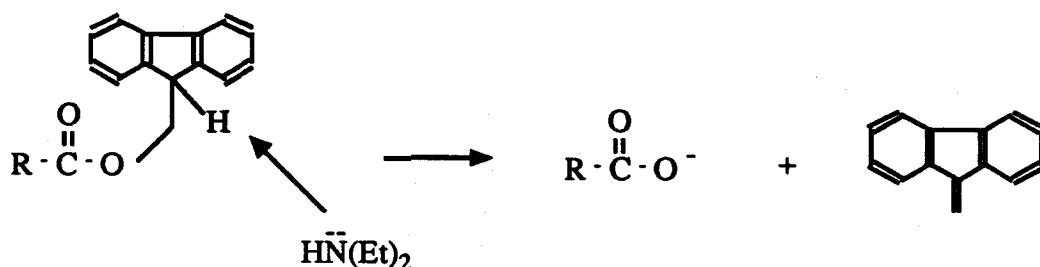


Figure 62 : Mécanisme de saponification de l'ester fluorénylméthyle

#### 4.3. Couplages sur un amino-tétrathymidylate

Un aminotétrathymidylate a été synthétisé pour vérifier les couplages possibles des sels de diméthoxytrityl lysine. Les conditions de réaction sont les suivantes : (sel de di-diméthoxytrityl lysine, Bop, DIPEA) (125 : 125 : 500). La résine est ensuite lavée et déprotégée par une solution de DCA 2% dans le chlorure de méthylène 2 minutes, les fonctions amines sont neutralisées par une solution de DIPEA à 5% dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . On réalise un deuxième couplage de la di-diméthoxytrityl-lysine, suivi d'un lavage et d'une nouvelle déprotection au DCA.

##### 4.3.1. Premiers couplages des sels de di-diméthoxytrityl-lysine sur un amino tétrathymidylate

###### 4.3.1.1. Déprotection

Le premier couplage a été réalisé par le sel de potassium et le sel de diéthylamine, les bruts de synthèse montrent des profils identiques en HPLC. Nous comparons les spectres avant déprotection au DCA, et après déprotection au DCA (Figure 63). Le pic du produit protégé apparaît à 24,4 minutes, mais déjà de nombreux produits indésirables sont mis en évidence avec des temps de rétention de 12 à 15 minutes. Les deux pics à 19,4 et 19,7 peuvent être attribués aux produits ayant perdu un groupe diméthoxytrityle en  $\alpha$  ou en  $\epsilon$ , dans les conditions de gradient (acétate d'ammonium-acétonitrile) d'HPLC. Le traitement de cette résine par le DCA fait apparaître le pic correspondant à la fixation d'une lysine sur le tétrathymidylate.

Ainsi les conditions acides utilisées sont suffisantes pour déprotéger totalement les fonctions amines.

Figure 64 : HPLC des bruts de A)  $\text{NH}_2\text{-T4}$   
B)  $\text{Lys-NH-T4}$   
C)  $(\text{Lys})_2\text{-Lys-NH-T4}$

(obtenus par couplage du sel de potassium de la didiméthoxytrityl-lysine)

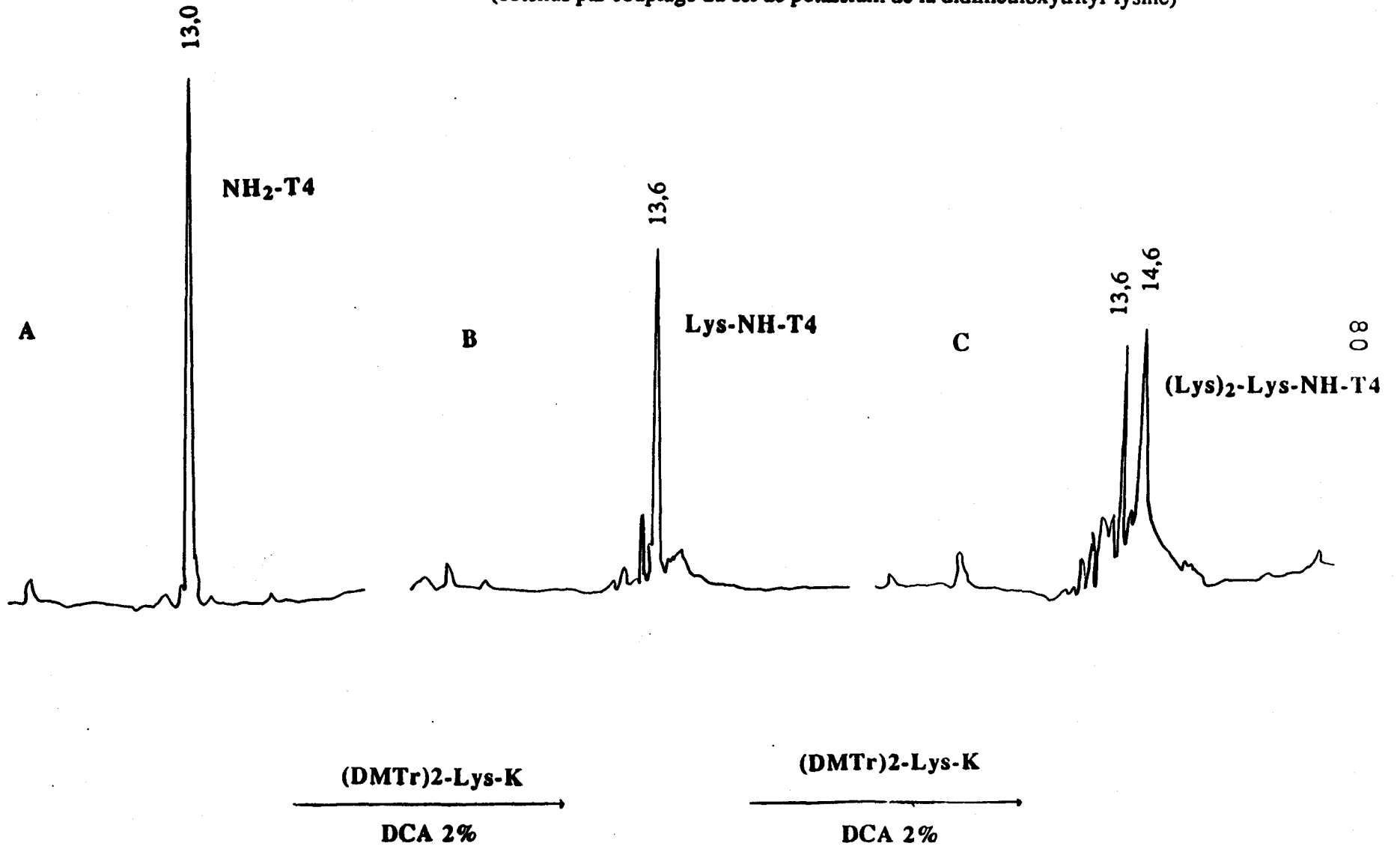
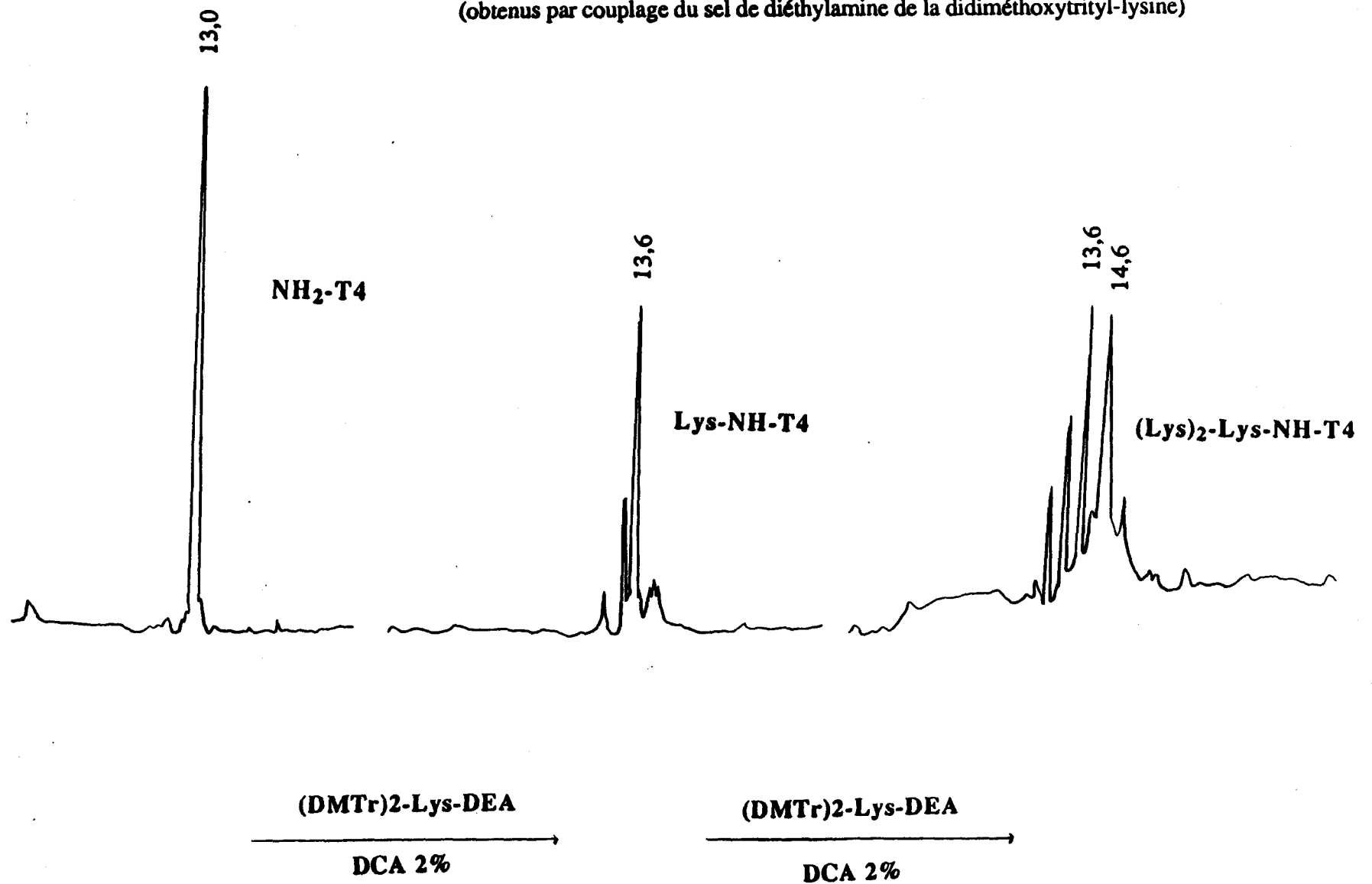


Figure 65 : HPLC des bruts de

- A)  $\text{NH}_2\text{-T4}$
- B)  $\text{Lys-NH-T4}$
- C)  $(\text{Lys})_2\text{-Lys-NH-T4}$

(obtenus par couplage du sel de diéthylamine de la didiméthoxytrityl-lysine)



#### 4.3.2. Deuxième couplage réalisé par le sel de Potassium

Les différents spectres HPLC sont représentés (Figure 64). Le produit correspondant au double couplage de la lysine est bien observé à 14,6 minutes, mais il est accompagné de bien trop de produits secondaires pour que l'on puisse envisager de nouveaux couplages.

#### 4.3.3. Deuxième couplage réalisé par le sel de diéthylamine

Les mêmes profils de couplage sont obtenus pour le sel de diéthylamine (Figure 65). Même si pour le dernier couplage le produit de départ ne semble pas avoir réagi totalement, nous constatons une fois de plus la présence de nombreux produits secondaires.

### 4.4. Conclusions

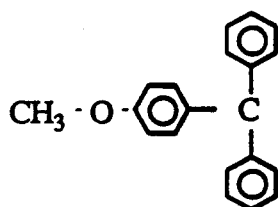
Nous avons employé deux différents sels de la didiméthoxytrityl-lysine pour multiplier les fonctions amines d'un tétrathymidylate par la méthode du Bop. Les conditions acides utilisées pour déprotéger les fonctions amines (DCA 2% dans le chlorure de méthylène) sont suffisantes, et ne peuvent pas dégrader l'oligonucléotide par dépurination. Seulement après deux couplages successifs de ces sels de trop nombreux produits secondaires sont apparus. Sans doute est-dû à la trop grande fragilité du DMTr dans les conditions de couplage utilisées. Il nous restait donc à utiliser un dernier groupe protecteur plus stable que le diméthoxytrityle mais plus labile que le trityle : le monométhoxytrityle dans la même famille, pouvait s'avérer convenable.

## **5) UTILISATION DU SEL DE POTASSIUM DE LA DI-MONOMETHOXYTRITYL- LYSINE**

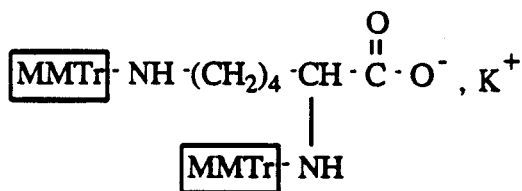
### **5.1. Synthèse du sel de potassium de la N $\alpha$ . N $\epsilon$ - dimonométhoxytrityl-lysine**

Les deux sels de la di-diméthoxytrityl-lysine se couplent de façon identique sur un aminotétrathymidilate. Puisque l'obtention du sel de potassium est plus aisée que celle du sel de diéthylamine, nous avons choisi le premier pour la di-monométhoxytrityl-lysine (en reprenant les

mêmes conditions opératoires que celles employées pour la synthèse du sel de potassium de la diméthoxytrityl-lysine).



Groupe 4-monométhoxytrityle ( MMTr)



Sel de potassium de la dimonométhoxytrityl-lysine

## 5.2. Couplages sur un aminotétrathymidylate

### 5.2.1. Premier couplage sur un aminotétrathymidylate

Le couplage du sel est effectué selon le protocole déjà décrit.

#### 5.2.1.1. Déprotection

Le clivage des monométhoxytrityles a été réalisé par l'acide dichloroacétique 2% pendant deux minutes, puis par l'acide trichloroacétique 3% pendant deux minutes.

La comparaison des spectres avant et après déprotections (Figure 66) montre le pic du produit désiré à 22,9 majoritaire mais d'autres pics sont également détectés entre 11 et 15 minutes.

La déprotection au TCA pendant 2 minutes n'est pas totale, le pic à 19,3 correspond à la présence du produit ayant perdu un seul monométhoxytrityle.

La déprotection au TCA 3% pendant deux minutes, libère totalement les fonctions aminées.

### 5.2.2. Deuxième couplage sur un aminotétrathymidylate

La résine résultant du premier couplage du sel de potassium de la dimonométhoxytrityl-lysine a donc été déprotégée au TCA 3% pendant deux minutes puis neutralisée par une solution de diisopropyléthylamine à 5% dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

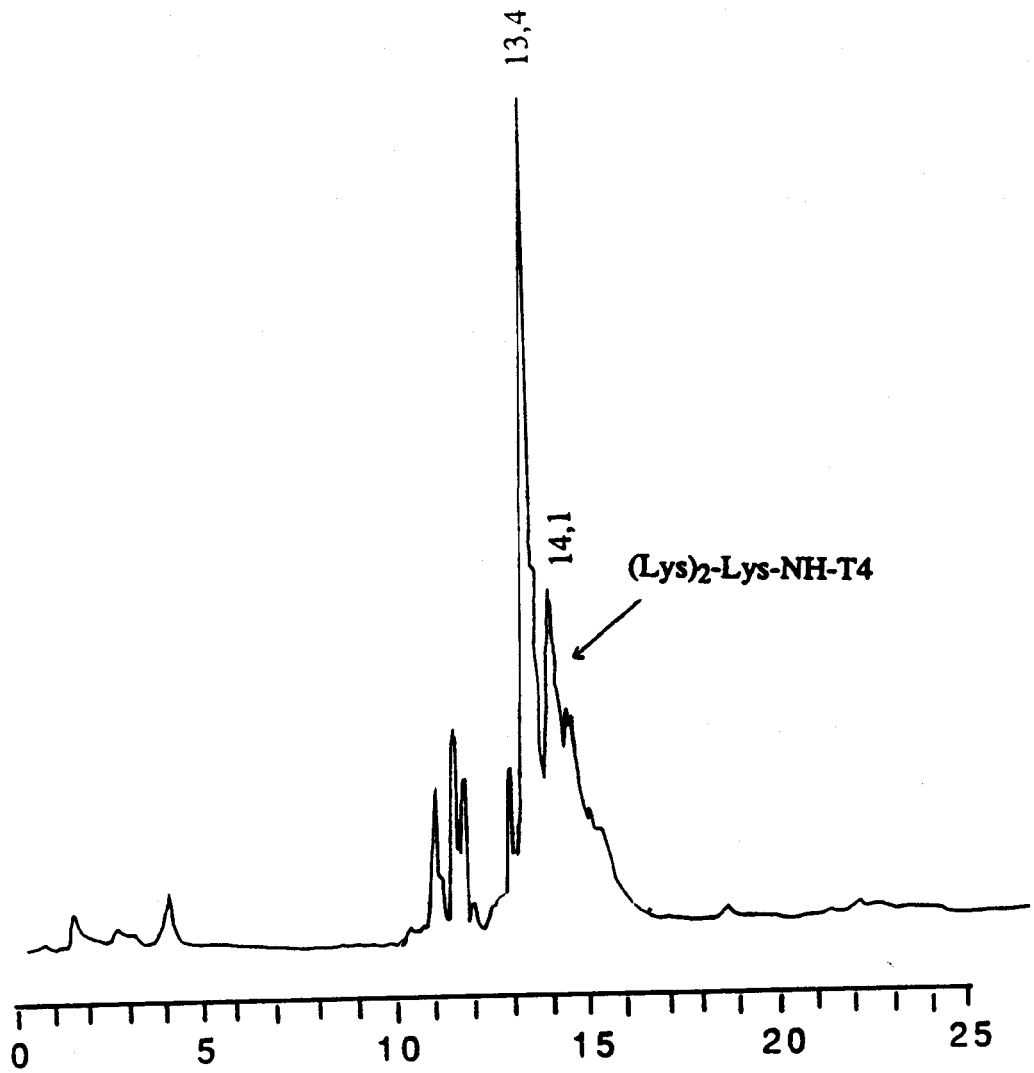


Figure 67 : HPLC du brut de  $(Lys)_2-Lys-NH-T4$  obtenu par couplage du sel de potassium de la dimonométhoxytrityl-lysine

Le sel est ensuite couplé, et la résine traitée au TCA. L'analyse HPLC montre que le produit de départ n'a pas totalement réagi et que déjà de nombreux produits secondaires apparaissent (massif de 14 à 16 minutes) (Figure 67).

### 5.3. Conclusions

L'emploi du sel de di N $\alpha$ , N $\epsilon$ -dimonométhoxytrityl-lysine ne peut pas être employé lui non plus pour la multiplication des fonctions amines d'un oligonucléotide. Pourtant les conditions de déprotection des fonctions monométhoxytrityles utilisées (acide trichloroacétique 3% pendant 2 minutes) sont satisfaisantes, car elles ne dégradent pas l'oligonucléotide.

## 6) *CONCLUSION*

Nous avons tenté de multiplier les fonctions amines d'un oligonucléotide en employant les couplages successifs de la lysine.

Il fallait d'abord pour cela, protéger les fonctions amines de la lysine. Les groupements protecteurs suivants ont été utilisés :

- le fluorenylméthoxycarbonyle (Fmoc)
- le trityle (Tr)
- le diméthoxytrityle (DMTr)
- le monométhoxytrityle (MMTr)

Le premier couplage de la lysine protégée sur un aminotétramère se déroule avec un très bon rendement, ceci quelque soient les groupes protecteurs utilisés. Les problèmes commencent avec l'élimination des protections de la lysine fixée sur l'oligonucléotide.

Pour ce qui est du groupement Fmoc, les déprotections réalisées dans diverses conditions basiques ne permettent pas plus de deux couplages en routine. En effet, certains groupes protecteurs des amines exocycliques doivent être partiellement déprotégés, lors de la déprotection des Fmocs et ainsi donner des réactions de couplage parasites avec la di-Fmoc-lysine. Toutefois des tétramères tétrabiotinylés peuvent être obtenus par cette méthode.

En ce qui concerne, l'emploi des trois autres groupes protecteurs labiles en milieu acide, on peut faire les remarques suivantes :

- Le trityl n'est pas du tout adapté, car il requiert des conditions trop acides pour être clivé sans dégrader l'oligonucléotide par dépurination.
- Les groupes DMTr, et MMTr semblent eux, être trop labiles dans les conditions de couplage utilisées.

## D) AUTRE STRATEGIE

### 1) UTILISATION DE LA SPERMINE

#### 1.1. La spermine

La spermine est une longue chaîne carbonée symétrique comportant quatre fonctions amines dont deux primaires et deux secondaires (Figure 68).



Figure 68 : Structure de la spermine.

#### 1.2. Intérêt

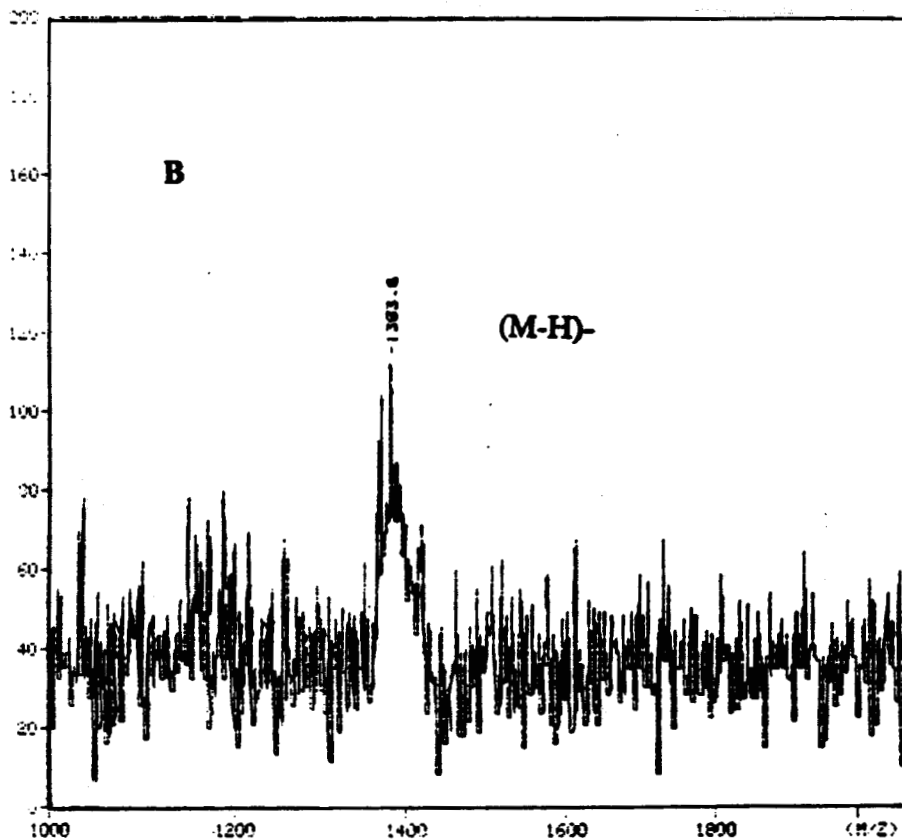
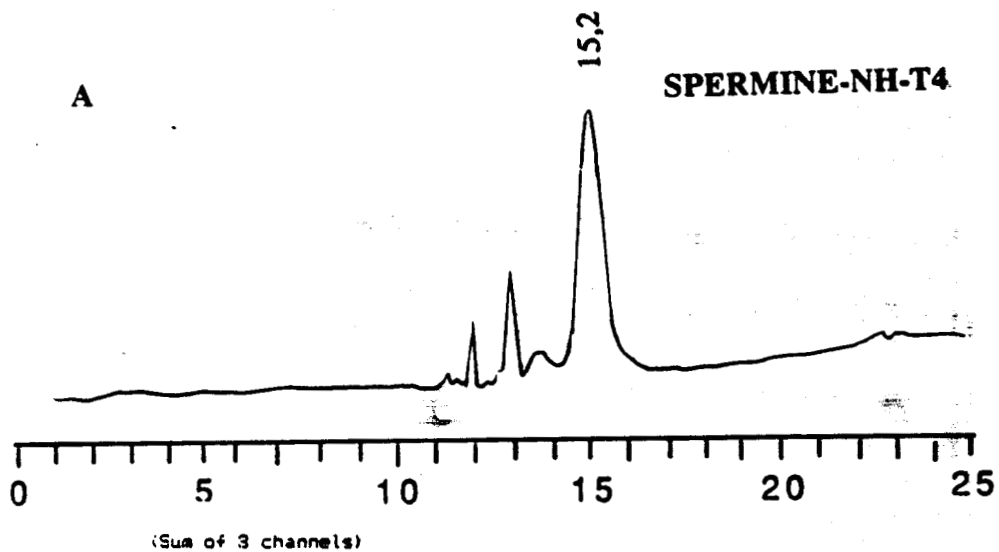
La méthode de Watcher permet de fixer une fonction amine sur l'alcool en 5' préalablement activé par le CDI, par l'intermédiaire du diaminohexane.

La fonction de la liaison uréthane par la spermine correspond aussi à l'incorporation de trois fonctions amines sur l'oligodésoxyribonucléotide. D'autre part la molécule étant symétrique, un seul produit majoritaire devait être formé.

Les amines secondaires, comme les amines primaires, peuvent alors réagir sur une fonction réactive.

Nous avons ainsi réalisé le couplage de la biotine (Figure 69).





(M-H)<sup>-</sup> : Masse moléculaire théorique : 1381

observée : 1383,8

Figure 70 : HPLC (A) et spectre de masse TOF (B) de SPERMINE-NH-T4

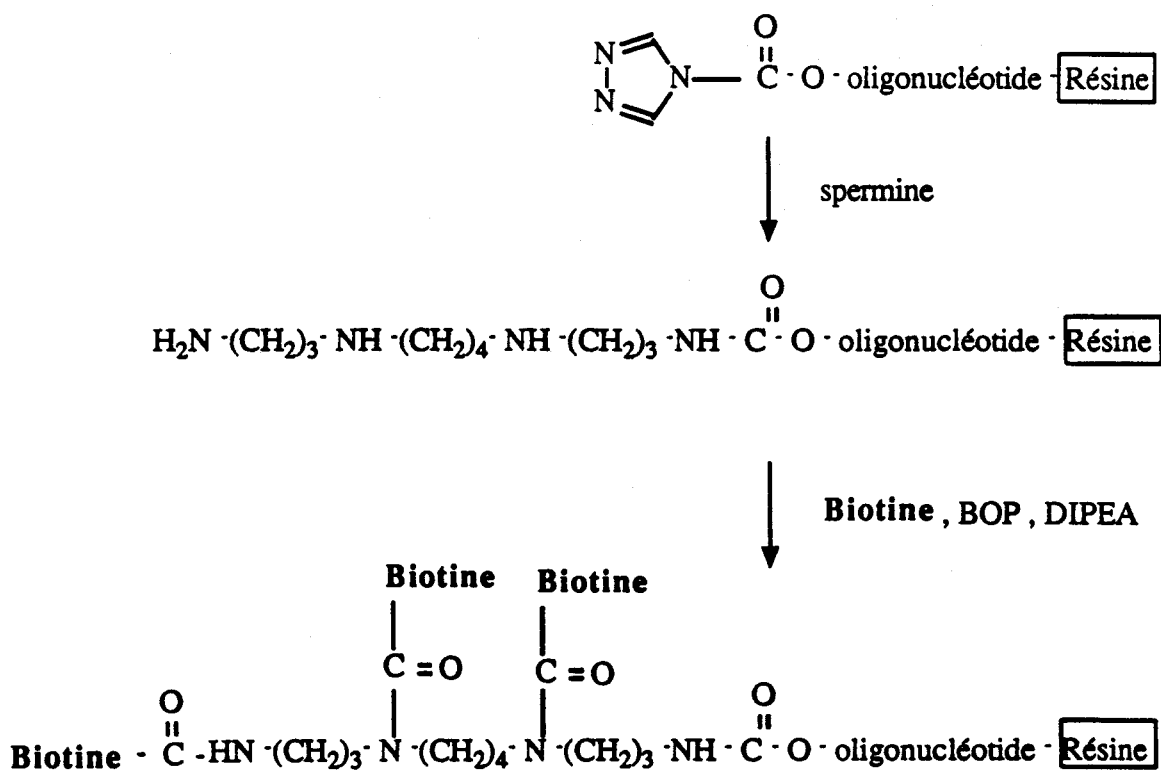


Figure 69 : Synthèse d'un triamino oligonucleotide grâce à la spermine, et couplage avec la biotine

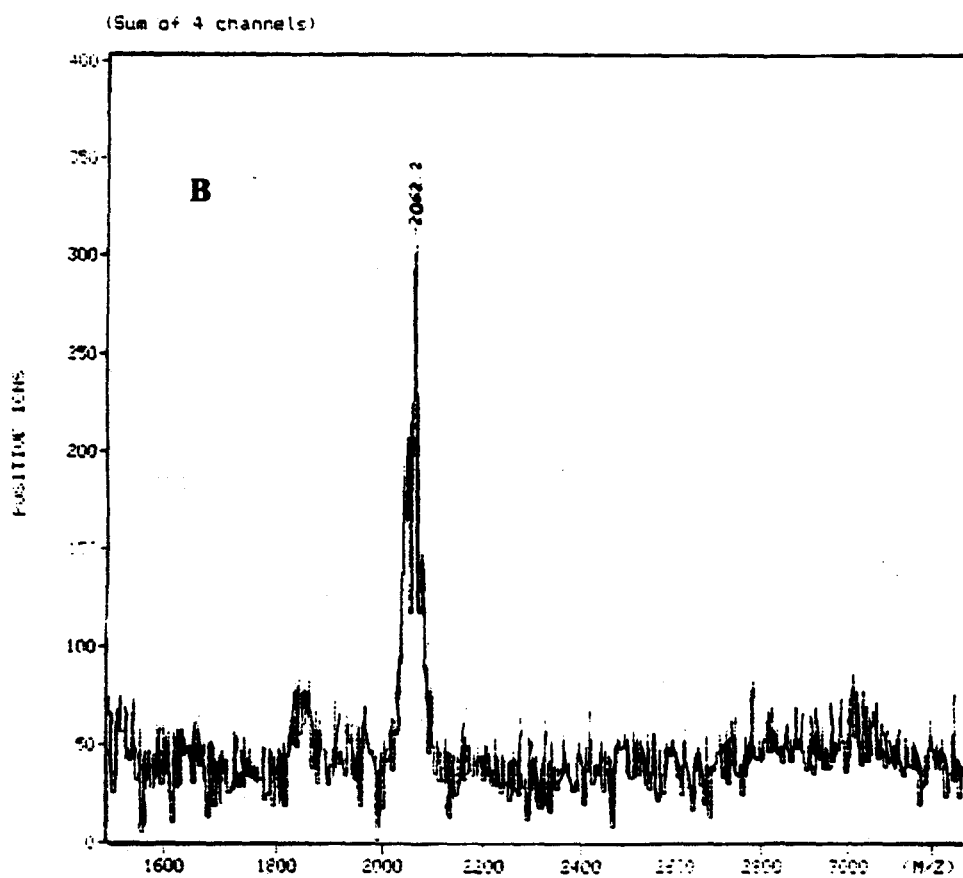
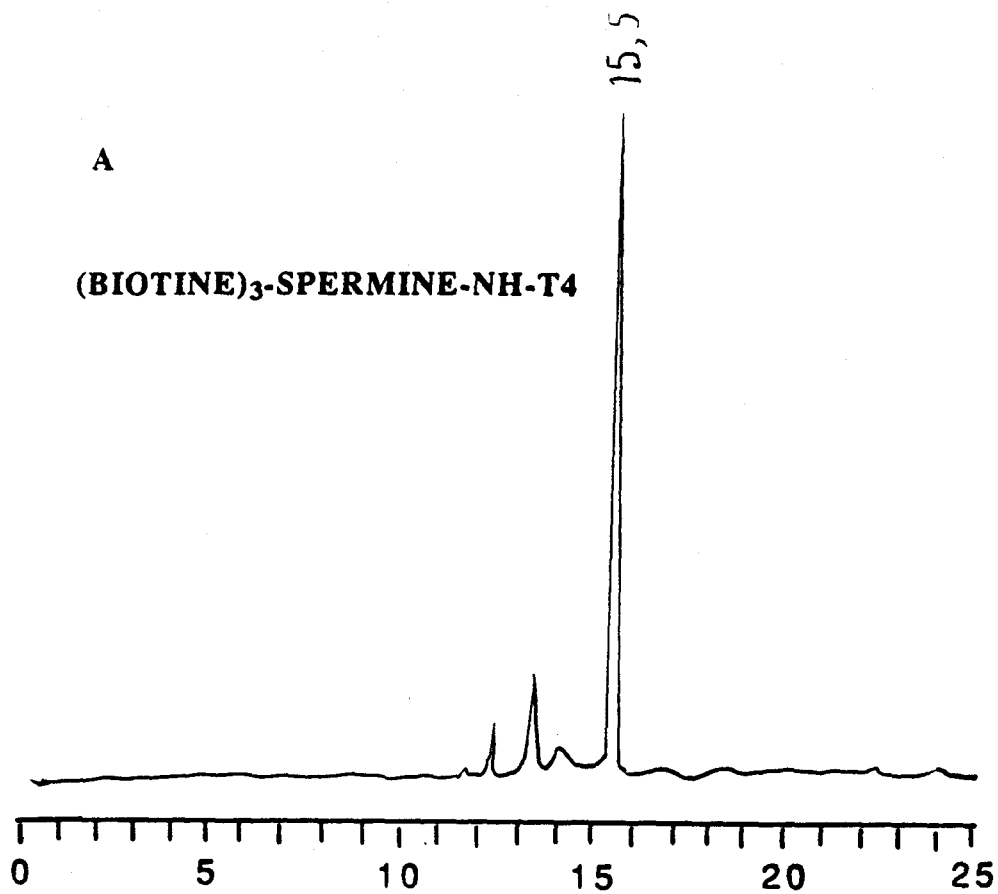
### 1.3. Couplage de la spermine sur un tétrathymidylate

Les conditions utilisées pour la spermine sont celles décrites pour le diaminohexane. L'HPLC montre un pic majoritaire arrondi, dû aux trois fonctions amines, le spectre de masse TOF confirme la fixation de la spermine (Figure 70)

### 1.4. Fonctionnalisation avec la biotine

Les conditions habituelles de couplage de la biotine sont employées sur le triaminotétrathymidylate précédent.

L'HPLC montre la disparition total du pic arrondi au profil d'un nouveau pic fin qui correspond bien à l'oligotribiotinylé confirmé par le TOF (Figure 71 ).



(M-H) - : Masse moléculaire théorique : 2059

observée : 2062,2

Figure 71 : HPLC (A) et spectre de masse TOF (B) de (BIOTINE)<sub>3</sub>-SPERMINE-NH-T4

## **2) CONCLUSION**

Cette méthode utilisant la spermine permet d'incorporer simultanément trois fonctions amines en un temps très court (1 heure) et en utilisant des réactifs commerciaux peu coûteux. Sur un exemple nous avons vu que toutes les fonctions amines étaient réactives. La réalisation d'un second couplage (voire d'un troisième) mettant en jeu cette fois la di-Fmoc-lysine doit permettre l'accès à des dérivés 6 fois (voire 12 fois) biotinylés.

**CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE PRODRUGUES  
DU D4T EN VUE DE L'INHIBITION D'HIV**

## A) LE D4T

### 1) SA STRUCTURE

Le 2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-Thymidine ou encore (D4T) est un dérivé de la thymidine (Figure 72).

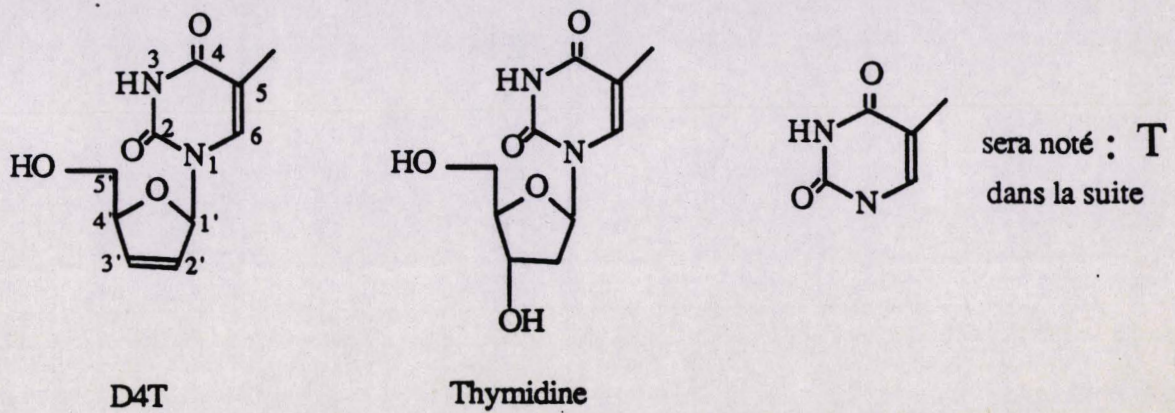


Figure 72 : Structure du D4T et de la Thymidine

### 2) SES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

#### 2.1. Solubilité

Le D4T est soluble dans les solvants polaires, il est parfaitement soluble dans l'eau, mais se dissout un peu moins bien dans le méthanol, l'acétone ou le tétrahydrofurane. Par contre, il ne se solubilise pas dans des solvants comme le chlorure de méthylène ou le chloroforme.

#### 2.2. Réactions chimiques possibles

La seule fonction vraiment réactive du D4T est l'alcool primaire en 5'. Toutes les réactions de substitution nucléophile pourront se faire avec un excès de réactif car aucune autre fonction du D4T ne pourra réagir simultanément.

### 2.3. Mise en évidence du D4T par chromatographie couche mince

- Après avoir déposé et fait migrer un échantillon de D4T sur une couche mince de chromatographie, on repère facilement le nucléoside modifié par examen de la plaque éclairée par une lampe UV. Ceci est dû à la forte absorption du noyau pyrimidique qui absorbe à 260nm.
- Nous avons pu remarquer également que l'oxydation de la double liaison du D4T par l'acide penchlorique (par simple vaporisation de la solution oxydante sur plaque de chromatographie) se traduisait par une coloration marron après chauffage. Cette révélation nous a permis de mettre en évidence tous les dérivés du D4T à condition qu'ils possèdent la double liaison 2',3'.

### **3) PREMIERE METHODE DE SYNTHESE DU D4T**

La méthode décrite par Horwitz, en 1966, permet de synthétiser le D4T à partir de la thymidine en quatre étapes (Figure 73 ).

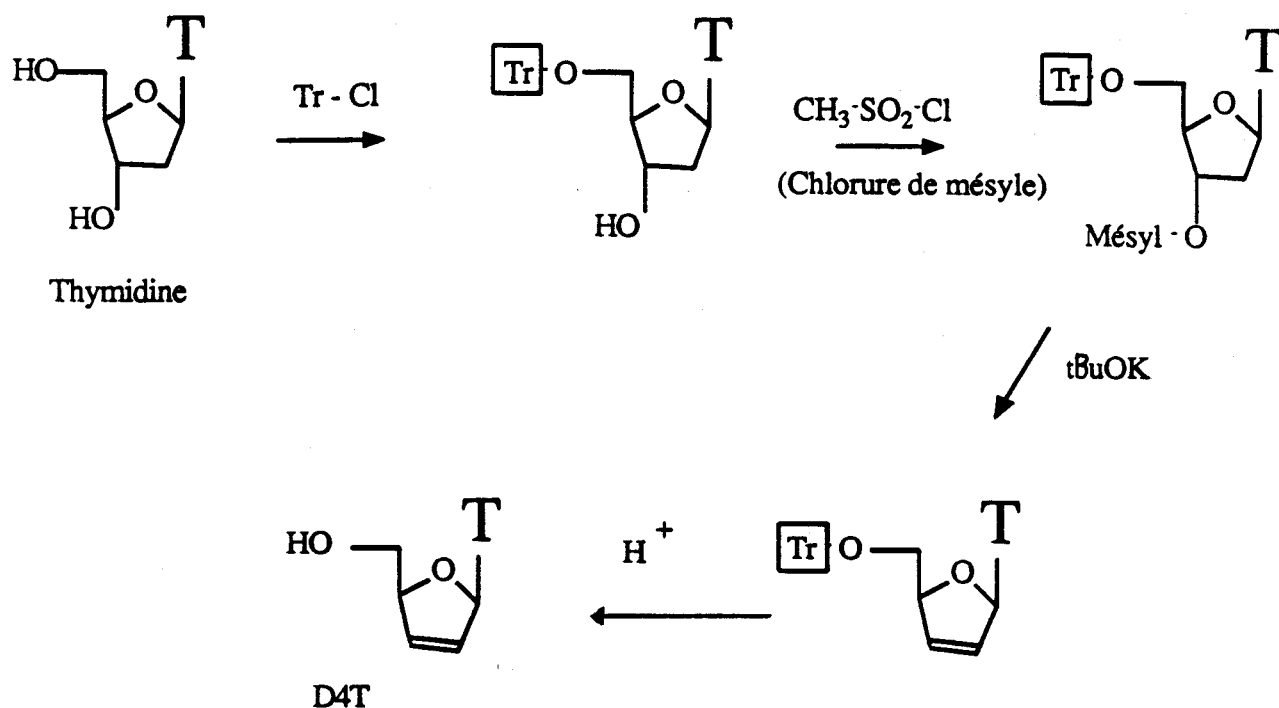


Figure 73 : Synthèse du D4T (Première méthode)

Horwitz a montré que l'insaturation entre les carbones 2' et 3' pouvait être obtenue par une réaction d'élimination catalysée par une base, si l'hydroxyle en 3' était préalablement converti en ester sulfonique. Le tertiobutylate de potassium dans le diméthyl-sulfoxyde (DMSO) en tant que base arrache le proton en 2' forme la double liaison et provoque l'expulsion du mésylate (Figure 74).

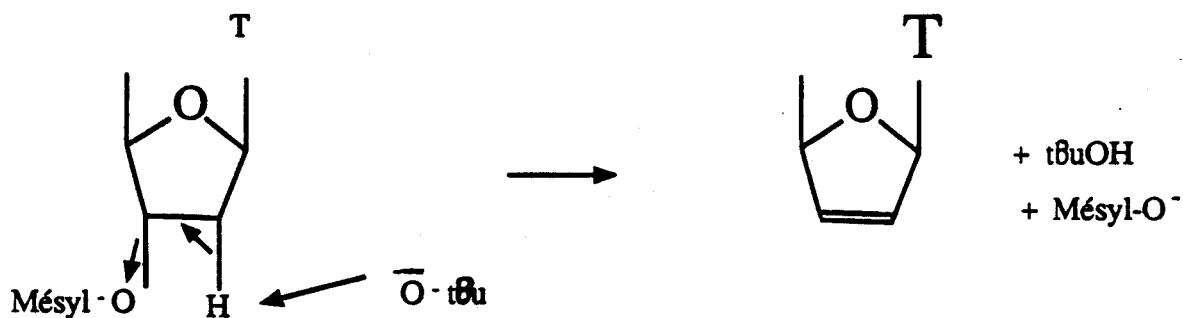
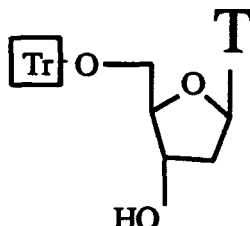


Figure 74 : Formation de la double liaison



Pour que la mésylation se produise uniquement en 3', il faut protéger préalablement l'alcool en 5'. Cette protection est réalisée spécifiquement en 5' par le chlorure de trityle, éliminé lors de la dernière étape par traitement acide.

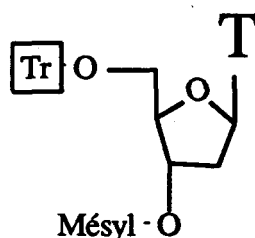
### 3.1. Synthèse du 5'-O-Trityl-Thymidine



La tritylation de la thymidine se fait préférentiellement sur la fonction de l'alcool en 5' favorisée par la classe de l'alcool (primaire) et l'encombrement du groupe trityle. C'est pourquoi il est possible d'utiliser un léger excès de chlorure de trityle. La réaction de substitution nucléophile est rapide, elle s'opère dans la pyridine à 100°C pendant 45 minutes.

Le contrôle par chromatographie couche mince montre la presque totale disparition du chlorure de trityl au profit d'un nouveau produit, qui développe une coloration jaune par vaporisation d'une solution acide sur la plaque de chromatographie. (Ceci prouve bien la présence du groupe trityle dans le composé). L'addition d'un grand volume d'eau glacée au milieu réactionnel permet d'obtenir directement par précipitation le composé tritylé. Pour séparer la 5'-O-tritylthymidine de ses impuretés (chlorure de trityle en excès) on peut purifier le mélange par chromatographie sur colonne de silice (rendement 58%).

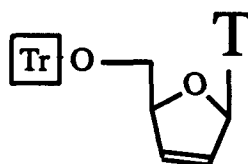
### 3.2. Synthèse du 5'-O-Trityl-3'-O-Mésyl-Thymidine



La fonction 5'-OH de la thymidine étant tritylée, l'ester sulfonique est synthétisé par action du chlorure de mésyle. Cette réaction est très exothermique, aussi l'addition de 1,3 équivalents de

chlorure de mésyle se fait lentement et à 0°C dans la pyridine. Le mélange est agité une nuit à 4° C, l'introduction d'un grand volume d'eau glacée permet la précipitation du 5'-O-trityl-3'-O-Mésyl-Thymidine pratiquement pur en chromatographie couche mince (rendement 53%). Une étape de purification par chromatographie sur colonne de silice fournit l'échantillon pour analyses.

### 3.3. Synthèse du 5'-O-Trityl-2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-Thymidine

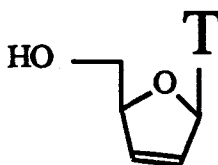


La formation de la double liaison est réalisée par action de 2,3 équivalents de tBuOH dans le DMSO pendant 3/4 heure. Après addition d'eau et neutralisation du milieu réactionnel par l'acide acétique, le produit désiré est filtré et obtenu sous forme d'un précipité gélatineux (rendement 45%).

#### 3.3.1. Détritylation par une solution chlorydrique chloroformique

Horwitz et Coll éliminent le groupement trityle protecteur du 5'OH par action d'une solution de chlorure d'hydrogène dans le chloroforme. Les solutions obtenues par barbotage d'HCl à froid dans le chloroforme ne nous ont pas permis d'obtenir une détritylation dans des conditions de rendement satisfaisant. Si le produit de départ disparaît bien totalement de nombreux produits de dégradation sont en effet observés en chromatographie couche mince.

### 3.4. Synthèse du 2',3'-didésoxy-2',3' didéhydro-Thymidine



Un nouvel essai de déprotection du 5'OH a été effectué dans une solution d'acide acétique à 80% portée à reflux pendant six minutes (Pfitzner, 1964). Cette fois encore après purification, un rendement catastrophique de 20% environ est obtenu.

### **3.5. Conclusion**

Cette méthode d'obtention du D4T en quatre étapes ne pose de véritables problèmes que lors de l'étape de détritylation.

La première étape de tritylation est rapide, et permet d'obtenir le dérivé tritylé par précipitation. La méthylation peut être effectuée sur le dérivé tritylé non purifié. Cependant, nous avons constaté qu'il était préférable de partir du dérivé 5'-O-Trityl-3'-O-Mésyl-Thymidine pur pour la formation du produit tritylé insaturé. Nous n'avons pas pu trouver de méthode correcte pour cliver le groupement trityl, et obtenir le D4T en quantité suffisante. Nous avons donc conclu à la trop grande stabilité du groupe trityl dans les conditions acides utilisées, et choisi de protéger la fonction alcool en 5' par un groupe protecteur plus labile, le monométhoxytrityle.

### **4) MODIFICATION DE LA PREMIERE METHODE**

Dans une première étape, la fonction alcool en 5' de la thymidine est protégée cette fois par le groupement monométhoxytrityle, ceci devrait nous permettre d'améliorer le rendement de la dernière étape de déprotection de l'hydroxyle en 5'(Figure 75).

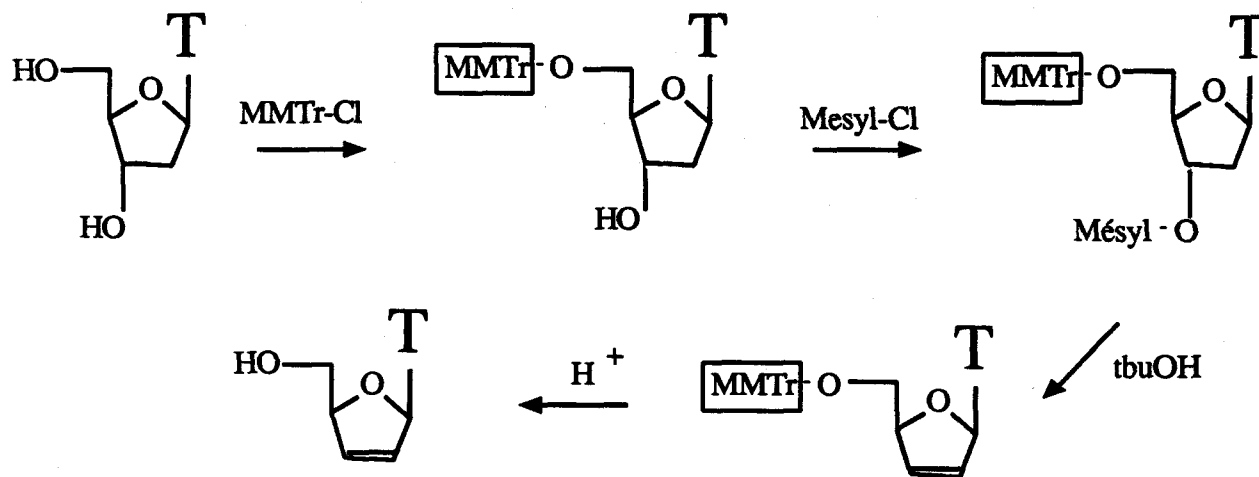
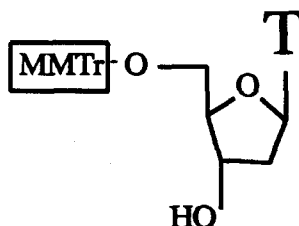


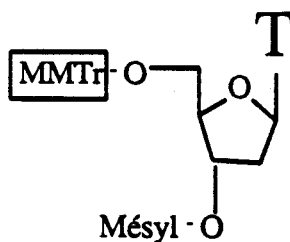
Figure 75 : Synthèse du D4T (modification de la première méthode)

#### 4.1. Synthèse du 5'-O-Monométhoxytrityl-Thymidine



Le milieu réactionnel de (monométhoxy)tritylation fournit en chromatographie couche mince une tache majoritaire colorée en jaune orangé par vaporisation d'acide dichloroacétique à 2% dans le chlorure de méthylène. Contrairement à la réaction de tritylation, l'ajout d'eau glacée dans le milieu réactionnel ne fait pas précipiter le composé monométhoxytritylé. Il faut donc chasser la pyridine, reprendre le résidu par du chlorure de méthylène et laver avec des solutions aqueuses basiques. L'évaporation de cette phase organique fournit le produit brut, éventuellement purifié par chromatographie sur colonne de SiO<sub>2</sub>.

#### 4.2. Synthèse du 5'-O-Monométhoxytrityl-3'-O-Mésyl-Thymidine

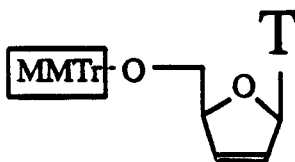


La méthylation est réalisée par action du chlorure de méthyle dans la pyridine. Là encore l'addition d'eau glacée au milieu réactionnel ne permet pas de précipiter le produit désiré. Il faut d'abord chasser la pyridine, reprendre le résidu par du chlorure de méthylène, puis effectuer les lavages de cette phase organique par des solutions aqueuses basiques.

La purification du produit est nécessaire pour passer à l'étape suivante. Malheureusement, nous avons constaté que la dégradation du produit commencée lors de l'évaporation de la pyridine s'accroît lors de la purification sur colonne de silice. (acétate d'éthyle,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , triéthylamine).

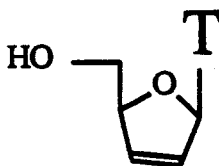
Le 5'-O-Monométhoxytrityl-3'-O-Méthyl-Thymidine est donc obtenu avec un faible rendement.

#### 4.3. Synthèse du 5'-O-Monométhoxytrityl-2',3'- didésoxy-2',3' -didéhydro-Thymidine



Aucune modification n'est apportée par rapport à la synthèse du dérivé tritylé.

#### 4.4. Synthèse du 2',3' - didésoxy-2',3' - didéhydro-Thymidine



La déprotection de la fonction alcool est réalisée avec deux équivalents d'acide trichloroacétique dans le chlorure de méthylène (solution 0,1M) pendant 10 minutes. Le suivi en chromatographie couche mince de la réaction montre l'apparition de deux produits le D4T et le carbocation

monométhoxytrityle. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur couche épaisse pour donner le D4T.

#### 4.5. Conclusion

L'emploi du groupe protecteur monométhoxytrityle peut être enlevé facilement et rapidement sans dégrader le D4T. Seulement la synthèse du composé 5'-O-Monométhoxytrityl-3'-O-Mésyl-Thymidine se fait avec un très mauvais rendement à cause de son instabilité. L'emploi du monométhoxytrityl ne permet pas d'obtenir le D4T en quantité suffisante. Nous avons donc testé une autre stratégie de synthèse développée également par Horwitz (1962).

#### 5) *DEUXIEME METHODE DE SYNTHESE DU D4T*

Cette synthèse est réalisée en trois étapes à partir de la thymidine (Figure 76).

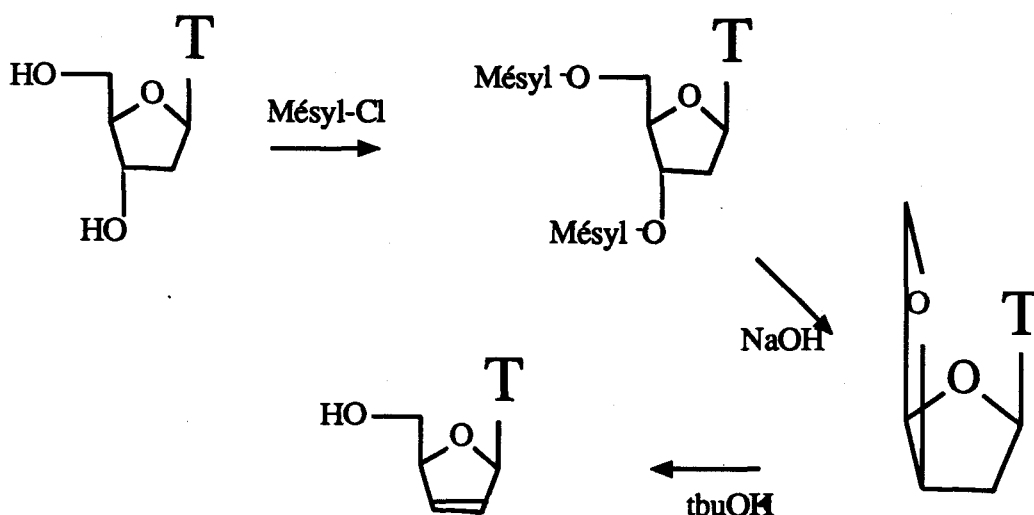
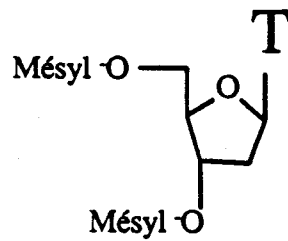


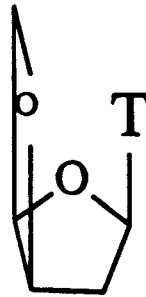
Figure 76 : Synthèse du D4T (deuxième méthode)

#### 5.1. Synthèse du 5'-O-3'-O-Dimésyl-Thymidine



Les deux fonctions hydroxyles de la thymidine sont estérifiées par le chlorure de mésyle en excès dans la pyridine. L'addition d'un grand volume d'eau glacée précipite le composé dimésylé.

### 5.2. Synthèse du 1(2 Déoxy-3,5-époxy-β-D-Thréo-pentofuanosyl) Thymine



Cette synthèse est réalisée en solution aqueuse avec trois équivalents de soude.

Le mécanisme réactionnel suivant a été avancé (figure 76).

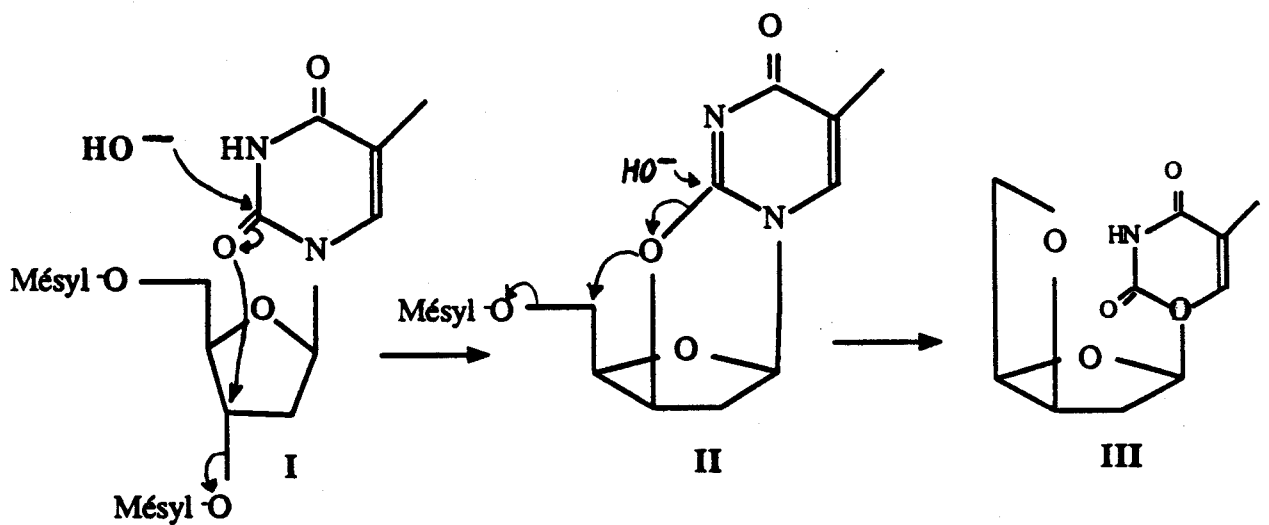
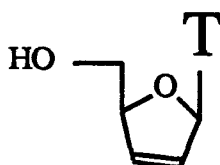


Figure 77 : Mécanisme de formation de l'anhydro

Le composé intermédiaire II peut être obtenu en faisant réagir la di-Mésyl-thymidine avec un seul équivalent de soude (Horwitz, 1962, 1966, 1967 ; Fox, 1962). En présence d'un excès d'hydroxyde de sodium le composé II perd son dernier groupement mésyle pour donner III.

Le produit III est obtenu par précipitation après neutralisation et concentration du milieu réactionnel.

### 5.3. Synthèse du 2',3' didésoxy-2',3' didéhydro-Thymidine



Dans le protocole initial le composé anhydro précédent est mis en réaction avec deux équivalents de tertibutylate de potassium dans le DMSO pendant deux heures (Figure 78). Après neutralisation par l'acide acétique, le solvant est évaporé sous vide poussé et le résidu est extrait avec plusieurs fractions d'acétone à chaud.

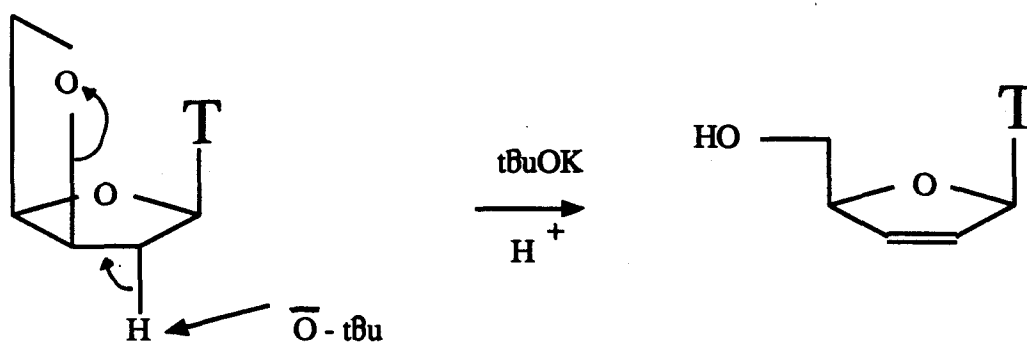


Figure 78 : Mécanisme réactionnel de la formation du D4T

Ce mode opératoire pose plusieurs problèmes :

- le DMSO est un solvant peu volatile et nécessite un vide poussé pour être éliminé à température peu élevée.
- en plusieurs jours de réaction, nous n'avons constaté que 30% de transformation (évaluation faite par CCM)
- l'extraction du résidu par l'acétone ne permet d'obtenir que de faibles quantités de D4T.



#### 5.4. Conclusion

Pour ce second protocole de préparation du D4T, les deux premières étapes permettent des rendements satisfaisants et les produits désirés sont obtenus rapidement par précipitation. Les conditions opératoires de la dernière étape devaient être améliorées pour pouvoir obtenir le D4T en bonne quantité. Pour cela nous avons cherché à jouer sur plusieurs paramètres :

- le choix du solvant de réaction
- la quantité de tertibutylate utilisée
- le temps de réaction
- la technique de neutralisation du milieu réactionnel
- la méthode de purification finale

### **6) AMELIORATION DE LA DEUXIEME METHODE**

#### **6.1. Amélioration de la dernière étape de synthèse du D4T**

##### 6.1.1. Choix du solvant

##### 6.1.1.1. Le DMSO

L'évaporation du DMSO sous pression réduite, requiert un chauffage prolongé qui cause la rupture de la liaison glycosidique et donne la thymine comme produit secondaire (Mansuri, 1989). Sur de grandes quantités de produit (100 g ; préparation industrielle du D4T : Bristol-Myers), Mansuri et Coll, ont montré qu'il n'était pas nécessaire d'éliminer le DMSO pour obtenir le D4T. Toujours en travaillant avec deux équivalents de tertibutylate de potassium, et après deux heures de réaction, un grand volume de toluène est ajouté au milieu réactionnel, le D4T précipite avec le tBuOK. Le précipité est ensuite dissous dans l'eau et l'ajout de chlorure de potassium permet de récupérer le D4T par filtration.

Il est évident que nous n'avons pu reproduire les conditions de la préparation industrielle du D4T (la thymidine est d'ailleurs contingentée). Nous n'avons pu transposer ces conditions de précipitation du D4T à une échelle moindre.



### 6.1.1.2. Le THF

Le tétrahydrofurane (THF) peut remplacer le DMSO dans la dernière étape. Cependant la faible solubilité du produit de départ et du tBu OH donne de plus faibles rendements (Mansuri, 1989).

L'utilisation de deux équivalents du tBu OH est décrite comme provoquant la dégradation du D4T formé en thymidine selon (Figure 79) :

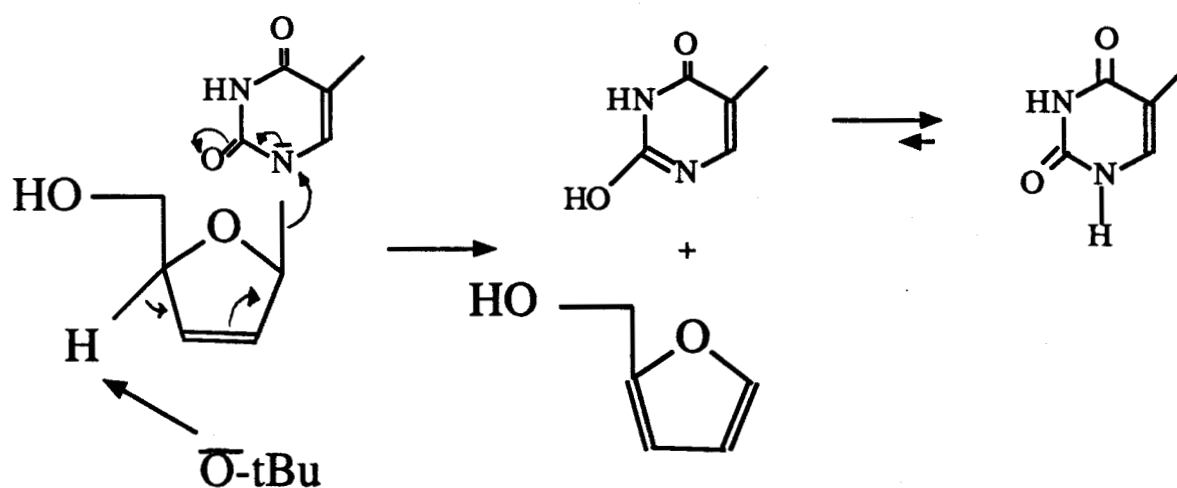


Figure 79 : Dégradation du D4T en présence de tBuOK

### 6.1.1.3. Le THF et l'Ether couronne

Pour augmenter la solubilité du tertiobutylate de potassium dans le THF, nous avons employé un éther couronne (le 1-4-7-10-13-hexaoxocyclooctadécane)(Figure 80) présentant un bon indice de complexation de l'ion potassium, et susceptible d'amplifier l'action de l'ion alcoolate. En fait, l'emploi de deux équivalents d'éther couronne et de deux équivalents de tBu OH à froid ou à reflux pendant plusieurs jours, ne provoque la formation que d'une toute petite quantité de D4T.

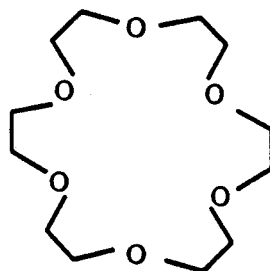


Figure 80 : 1-4-7-10-13-16-hexaoxocyclooctadécane

#### 6.1.1.4. Le THF et le tertiobutanol

Le tertiobutanol est parfois employé comme solvant de réaction lorsqu'on emploie le tertiobutylate de potassium comme réactif. Nous avons utilisé des mélanges variables tertiobutanol-THF mais là encore le D4T n'a pas été obtenu en quantité suffisante.

#### 6.1.2. Utilisation de plusieurs équivalents de tBuOK

Nous savons que le tBuOK est responsable de deux réactions :

- la formation du D4T
- la dégradation du D4T

Pour vérifier si les quantités de tBuOK engagées dans la réaction pouvaient nous permettre d'augmenter la formation de D4T, nous avons contrôlé en CCM l'apparition et la dégradation du D4T en fonction du temps avec respectivement 2, 3, 4, 5 ou 6 équivalents de tBuOK dans le THF (Figure 81).

On constate alors que plus les quantités de tBuOK mises en jeu sont importantes, plus le D4T se forme rapidement, mais plus vite il se dégrade.

Le profil cinétique nous a montré que la quantité de D4T maximale est obtenue pour 5 équivalents de tBuOK pour 10 minutes de réaction.

#### 6.1.3. Neutralisation du milieu réactionnel

La neutralisation est une étape importante qui doit être réalisée rapidement. Le contrôle au papier pH est une méthode trop lente et peu précise.

Nous avons trouvé que l'ajout dans la solution de quatre équivalents d'acide acétique permettait de conserver le milieu réactionnel intact. Une quantité supérieure d'acide provoque un changement de coloration de la solution qui passe du jaune au rouge foncé, correspondant à la formation de produits secondaires détectés en CCM.

#### 6.1.4. Purification du D4T

Après neutralisation, le solvant est évaporé, pour donner un résidu cristallin jaunâtre composé principalement de D4T et d'acétate de potassium. L'extraction par l'acétone à chaud, ne permet pas d'extraire totalement le D4T.

D'autre part, la purification de ce brut n'a pu se faire sur colonne de silice, car le brut du D4T ne pouvait être déposé que dans des solutions trop éluantes comme avec le méthanol ou l'acétone.

La purification du D4T a donc été réalisée par chromatographie sur couches épaisses de silice, l'extraction du D4T se faisant après migration par l'acétone et le méthanol. Un rendement satisfaisant de 50% est obtenu. Pour cette dernière étape, permettant l'obtention d'environ 400mg de produit en trois heures à partir du dérivé anhydro stocké.

#### 6.1.5. Conclusion

Les travaux effectués sur la dernière étape de la synthèse du D4T nous ont permis de mettre au point un nouveau mode opératoire pour l'obtention rapide et simple des quantités de D4T nécessaires à la production de prodrogues.

### 7) CONCLUSION

Horwitz avait proposé deux méthodes de synthèse pour le D4T. La première méthode nécessitait la protection de la fonction hydroxyle en 5' par un groupe éliminable en milieu acide. Le groupement trityl initialement choisi, exigeait des conditions trop acides pour être éliminé sans dégrader le D4T. Le remplacement du trityle par le monométhoxytrityl, ne nous a pas permis non plus l'obtention du D4T en quantité suffisante.

La deuxième méthode est plus courte puisque trois étapes seulement sont nécessaires. La dernière de ces étapes excluait là encore l'obtention du D4T en quantité suffisante pour les synthèses d'analogues.

La synthèse du D4T a été décrite, pour produire des quantités industrielles, par la firme Bristol-Myers (Mansuri, 1989). Mais il n'a pas été possible de transposer la technique de préparation utilisée de la centaine de grammes à quelques grammes de produit.

En ce qui nous concerne, la mise au point d'un nouveau mode opératoire permet d'envisager la synthèse de prodrogue du D4T.

## B) CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE PRODRUGUES DU D4T

### 1) *MODE D'ACTION DU D4T*

Une des premières étapes du cycle répliatif du VIH est la transcription de son acide ribonucléique (ARN) en acide désoxyribonucléique (ADN) qui s'incorpore à l'ADN cellulaire. L'enzyme du virus qui réalise cette opération, la transcriptase inverse, utilise pour transcrire l'ARN viral les nucléotides thymidine, guanosine, cytidine, adénosine triphosphorylés présents dans la cellule pour les incorporer successivement jusqu'à ce que la chaîne d'ARN soit entièrement copiée.

Certains nucléosides modifiés comme l'AZT ou le D4T trisphosphorylés dans la cellule peuvent être utilisés préférentiellement à la thymidine triphosphorylée et leurent ainsi la transcriptase inverse.

Cette substitution pourra se traduire par une inhibition compétitive vis-à-vis du substrat naturel et par la terminaison du brin en construction.

Pour qu'une molécule puisse manifester une activité anti VIH en jouant son rôle d'inhibiteur au niveau de la transcriptase inverse du virus, elle doit répondre à un certain nombre de critères (Dormont, 1988).

- être un analogue de désoxyribonucléoside possédant une structure très proche de la base purique ou pyrimidique.

- être substituée à un niveau tel qu'il y ait empêchement de la formation de la liaison 5'-3'-phosphodiester nécessaire à l'élongation de la chaîne d'acide nucléique. Ceci implique une substitution au niveau du OH en 3' du désoxyribose, ou bien une liaison de type insaturé entre les carbones C-2' et C-3'.
- elle doit pouvoir traverser la membrane cellulaire, et ne peut donc pas être présenté sous forme mono, di ou triphosphate pour des raisons évidentes de polarité.
- elle doit pouvoir subir une triphosphorylation cellulaire, puisque seuls les dérivés triphosphorylés sont reconnus par la transcriptase inverse pour l'élongation de la chaîne nucléique.
- son effet sur l'ADN polymérase doit être le plus faible possible afin d'utiliser la réplication virale sans altération de la croissance cellulaire.

## **2) AVANTAGE DU D4T PAR RAPPORT A L'AZT**

L'importance de la phosphorylation intracellulaire des analogues nucléosidiques dans l'activité anti-HIV a été clairement démontrée (Balzarini, 1988). Le D4T et l'AZT présentent après triphosphorylation une activité inhibitrice très voisine.

L'AZT est plus rapidement converti sous sa forme monophosphate, mais inhibe la thymidylate kinase responsable des di et tri phosphorylations (ceci peut en partie expliquer la toxicité de l'AZT).

Le D4T est moins rapidement converti sous la forme monophosphate mais n'inhibe pas la thymidylate kinase, et les étapes de phosphorylation suivantes se font plus rapidement que pour l'AZT. Le D4T sous forme monophosphate présente donc un avantage métabolique potentiel sur l'AZT que nous avons cherché à exploiter.

## **3) CONCEPTION DE PRODRUGUES DU D4T**

### **3.1. Dérivés phosphates et phototriesters du D4T**

Pour surmonter l'obstacle de la première phosphorylation nous avons préparé une série d'analogues du D4T monophosphate susceptibles de franchir la membrane cellulaire et de libérer intracellulairement la drogue (ou molécule parent) sous l'action des phosphatases présentes.

Pour faciliter le passage membranaire de ces prodrogues nous y avons incorporé un groupement hydrophobe sur le reste phosphate, un reste cholestérol et une chaîne grasse palmitique ont été choisis. Les phosphates triesters correspondants où le groupe cyanoéthoxy élimine la charge négative ont également été préparés. (Figure 82).

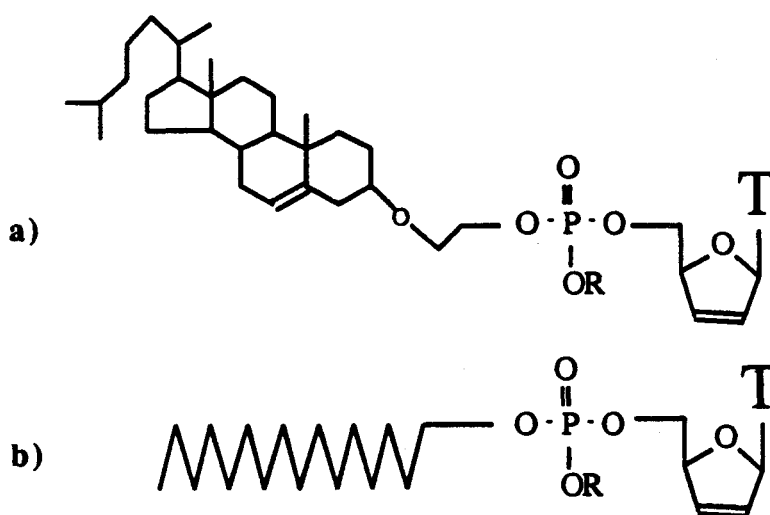


Figure 82 : Dérivés phosphotriesters ( $R = (CH_2)_2CN$ ) et phosphodiesters ( $R = H$ ) du D4T avec a) un reste cholestérol  
b) un reste palmitique

Les composés phospho-tri ou di-esters peuvent libérer, dans la cellule, le nucléoside au lieu du nucléotide. Ceci dépend de l'endroit où s'effectue la coupure de la liaison P-O comme indiqué sur la figure 82 Bis.

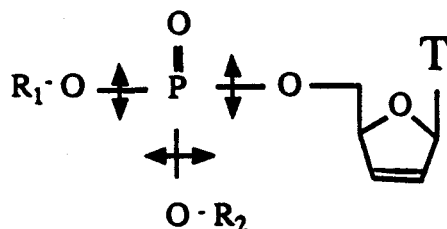


Figure 82 Bis: Coupures possibles des liaisons P-O

C'est pourquoi les bis-D4T-phospho-tri et di-esters ont également été préparés (Figure 83).

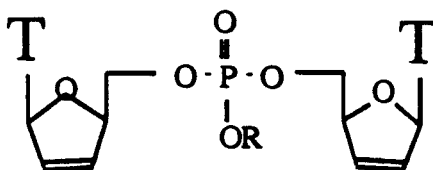


Figure 83 : Dérivés phosphotriester ( $R = (CH_2)_2CN$ ) et phosphodiester ( $R = H$ ) du bis-D4T

### 3.2. Esters du D4T

Pour contrôler les avantages de la partie phosphate, le D4T a été simplement estérifié par l'acide palmitique, et l'acide dérivé du cholestérol (Figure 84).

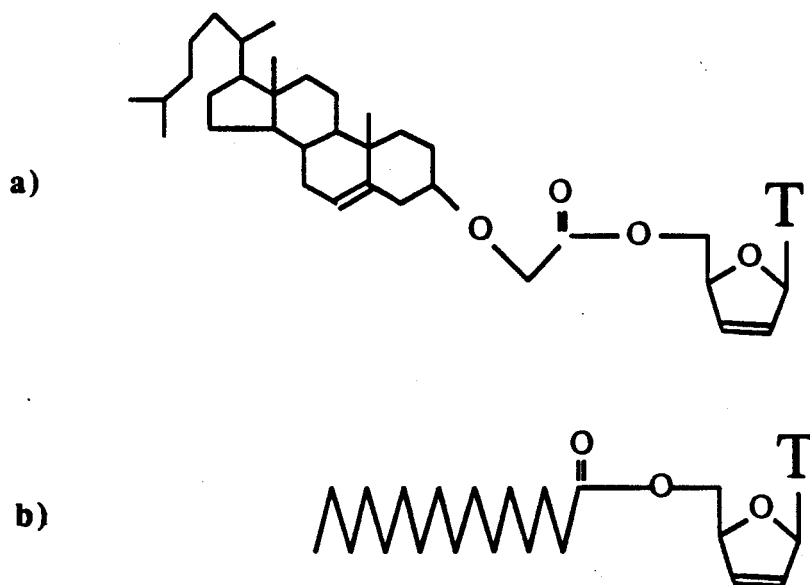


Figure 84 : Dérivés esters du D4T avec a) un reste cholestérol  
b) un reste palmitique

L'importance de la nature de la chaîne grasse a été ensuite étudiée en réalisant l'estérification du D4T par différents acides gras insaturés (acide linoléique, acide linoléique) (Figure 85).



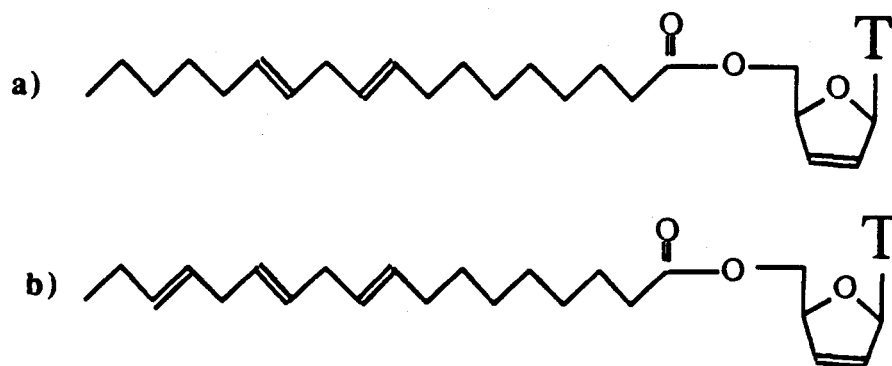


Figure 85 : Esters linoléique ( a ) et linoléique ( b ) du D4T

Quant à l'importance du nombre de chaînes grasses, elle a été évaluée en préparant l'ester du D4T et de la di-palmityl-lysine(Figure 86).

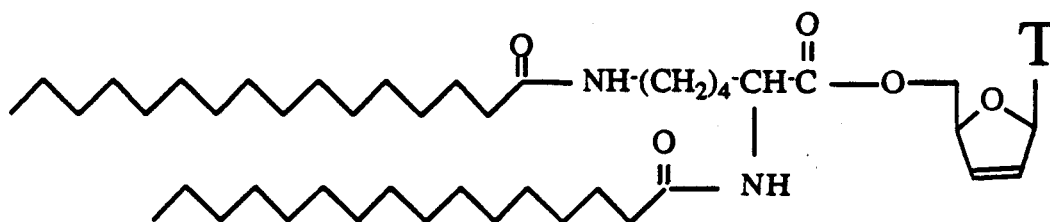


Figure 86 : Ester de D4T comportant deux chaînes palmitiques

### 3.3. Dérivés carbonate et carbamate du D4T

Afin d'étudier l'importance de la nature de la liaison entre le D4T et la partie hydrophobe, nous avons lié la chaîne palmitique au D4T respectivement par une liaison carbonate ou par une liaison carbamate( Figure 87).

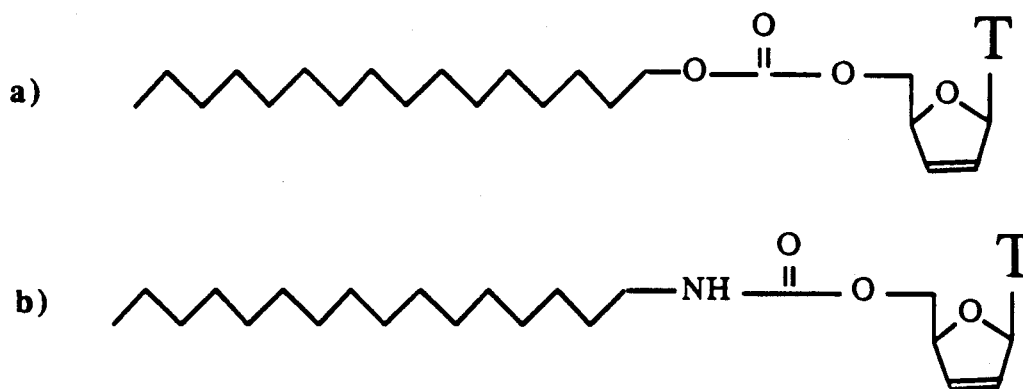


Figure 87 : Dérivé carbonate (a) et carbamate (b) du D4T comportant une chaîne palmitique

#### 4) SYNTHÈSES DE DÉRIVÉS PHOSPHO-TRI ET DI-ESTERS DU D4T

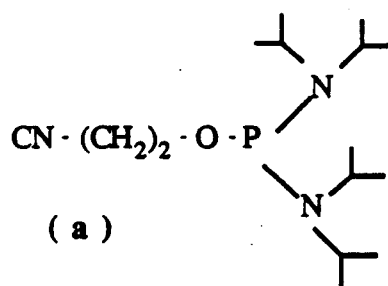


Figure 88 : 2-cyanoéthoxy-N,N,N',N'-tétraisopropylphosphorodiamidite : composé (a)

Pour synthétiser les dérivés phosphotriesters et phosphodiester du D4T nous avons utilisé le réactif commercial 2-cyanoéthoxy-N,N,N',N'-tétraisopropylphosphorodiamidite (a) (Figure 88) pouvant grâce à ces deux fonctions diisopropylamines être couplé successivement à deux molécules d'alcool différentes en présence de tétrazole, jouant le rôle d'agent couplant. L'oxydation du phosphore trivalent en phosphore pentavalent est réalisée ensuite par l'iode pour fournir les dérivés phosphotriesters. Par traitement ammoniacal, le clivage du groupe cyanoéthoxy fournit les composés phosphodiester correspondants (Figure 89).

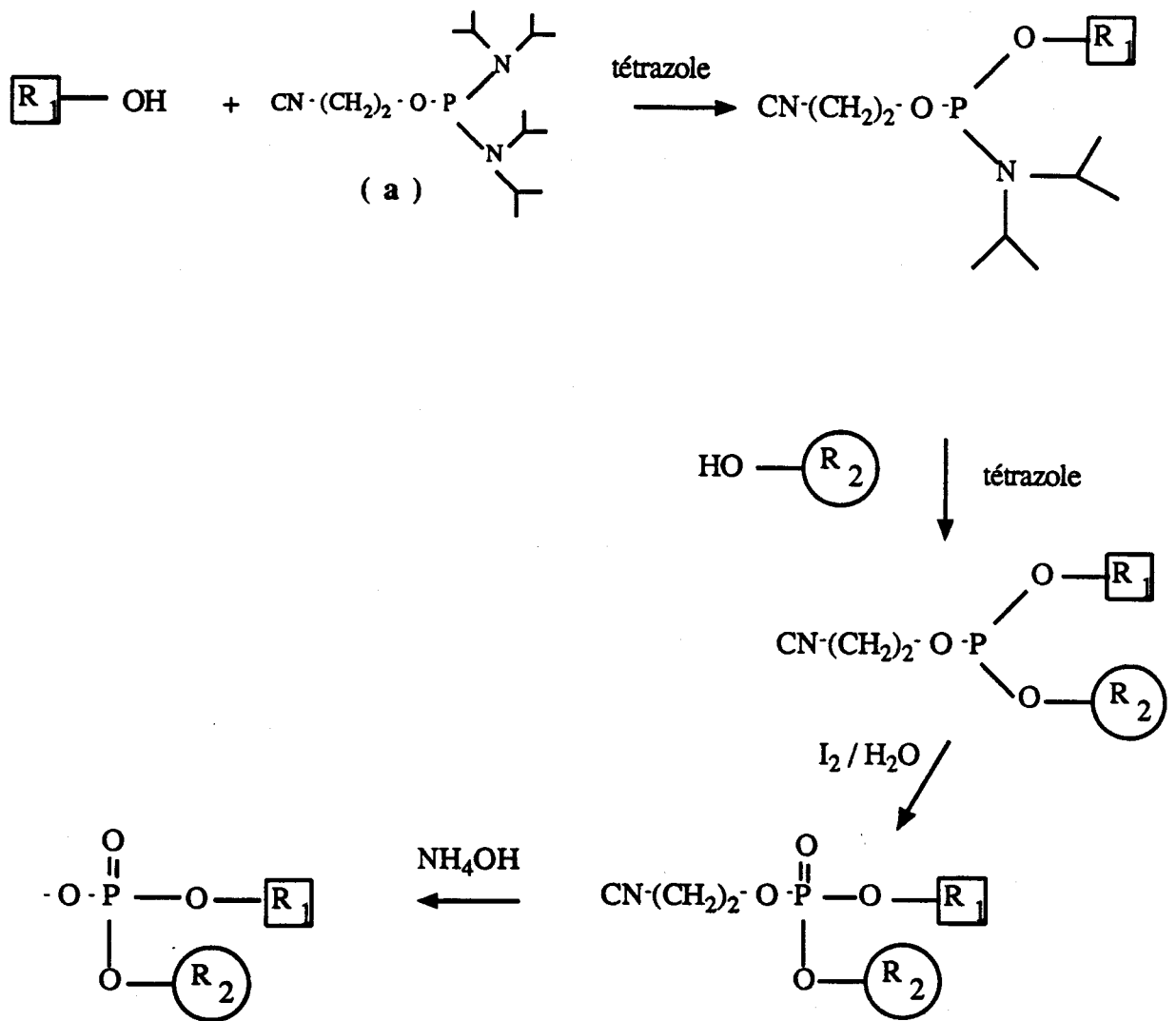


Figure 89 : Stratégie de synthèse utilisée pour l'obtention des dérivés phospho-tri et di-esters

Cette stratégie de synthèse requiert donc le couplage d'alcools. Outre le D4T pouvant être couplé par sa fonction 5'OH libre, les groupes hydrophobes choisis devaient comporter également une fonction alcool. Dans l'incorporation du reste cholestérol, le dérivé alcool synthétisé en (III-D-4-2) a été utilisé. Dans le cas de la chaîne grasse nous avons employé le 1-hexadécanol commercial.

Les composés phosphotriesters trivalents n'étant pas d'une grande stabilité, il ne nous a pas paru intéressant d'entreprendre d'étape de purification avant la réaction d'oxydation.

#### 4.1. Première méthode

Nous avons choisi de coupler le D4T comme premier alcool car son évolution est facile à suivre en chromatographie couche mince.

##### 4.1.1. Réaction du D4T sur le composé (a)

Le réactif (a) a déjà été couplé sur un nucléoside en 3' (Nielsen, 1986). Les mêmes conditions opératoires ont été reprises pour la réaction avec le D4T. La réaction a été réalisée dans l'acétonitrile en présence d'un équivalent du réactif (a) et de tétrazole. Après 30 minutes, la réaction n'évolue plus, on constate toutefois que le D4T n'est pas entièrement transformé et qu'une partie du dimère **2** est apparue avec le produit **1** (Figure 90). A ce stade, l'ajout de tétrazole ne favorise plus la transformation du D4T en produit **1**. Pour éviter la formation du dimère **2**, il faudrait utiliser le composé (a) en excès, ce qui exigerait ensuite l'utilisation d'alcool hydrophobe en grande quantité.

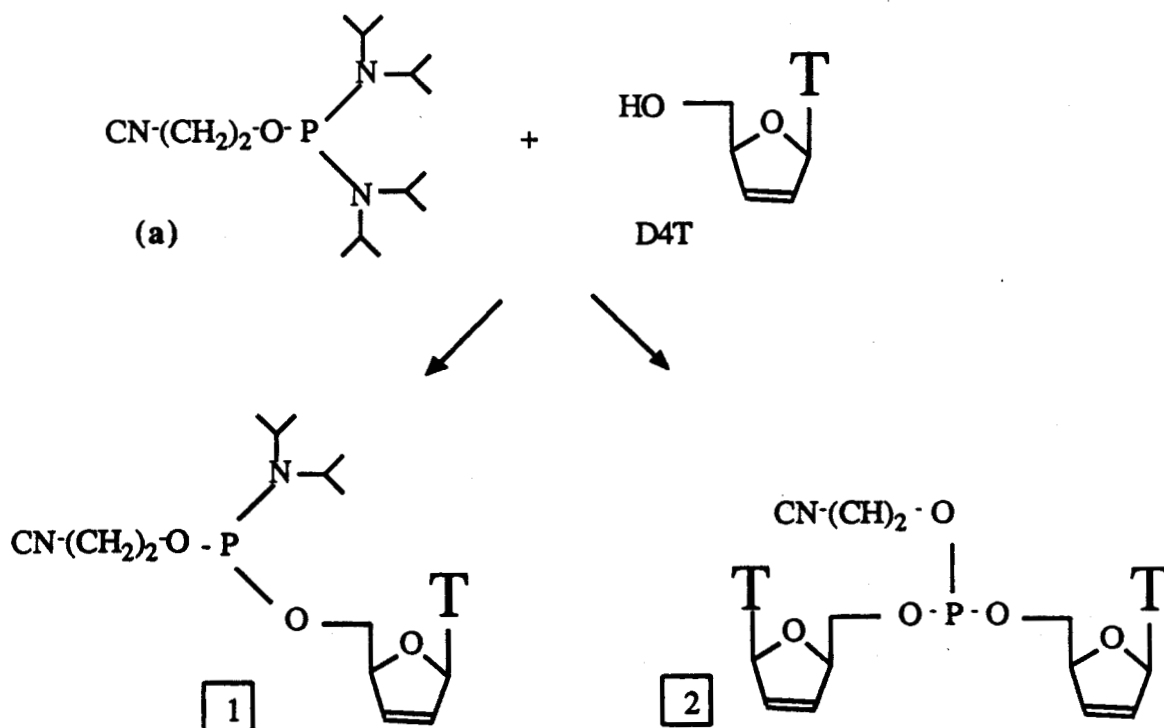


Figure 90 : Produits résultant de la réaction du composé (a) sur le D4T

#### 4.1.2. Suivi difficile en chromatographie couche mince

Outre le phosphoroamidite **1** et le dimère **2** caractérisables par la présence de deux bandes proches, on observe déjà en chromatographie couche mince des traces de leur produit d'oxydation à l'air, s'amplifiant bien lors du traitement ( $I_2$  / THF /  $H_2O$ ).

#### 4.1.3. Conclusion

L'utilisation du D4T comme alcool de départ, ne s'est pas révélée satisfaisante. le D4T en présence d'un équivalent de phosphorodiamidite (a), et de tétrazole réagit surtout pour former le dimère **2**.

Un excès de phosphorodiamidite (a) entraîne inévitablement l'emploi d'alcool hydrophobe en excès. Ces réactions sont difficilement contrôlables en chromatographie couche mince à cause des diastéréoisomères formés et des réactions d'oxydation sur plaque de silice.

#### 4.2. Deuxième méthode

Le réactif (a) est d'abord mis en réaction avec l'alcool hydrophobe, puis avec le D4T (Figure 91).

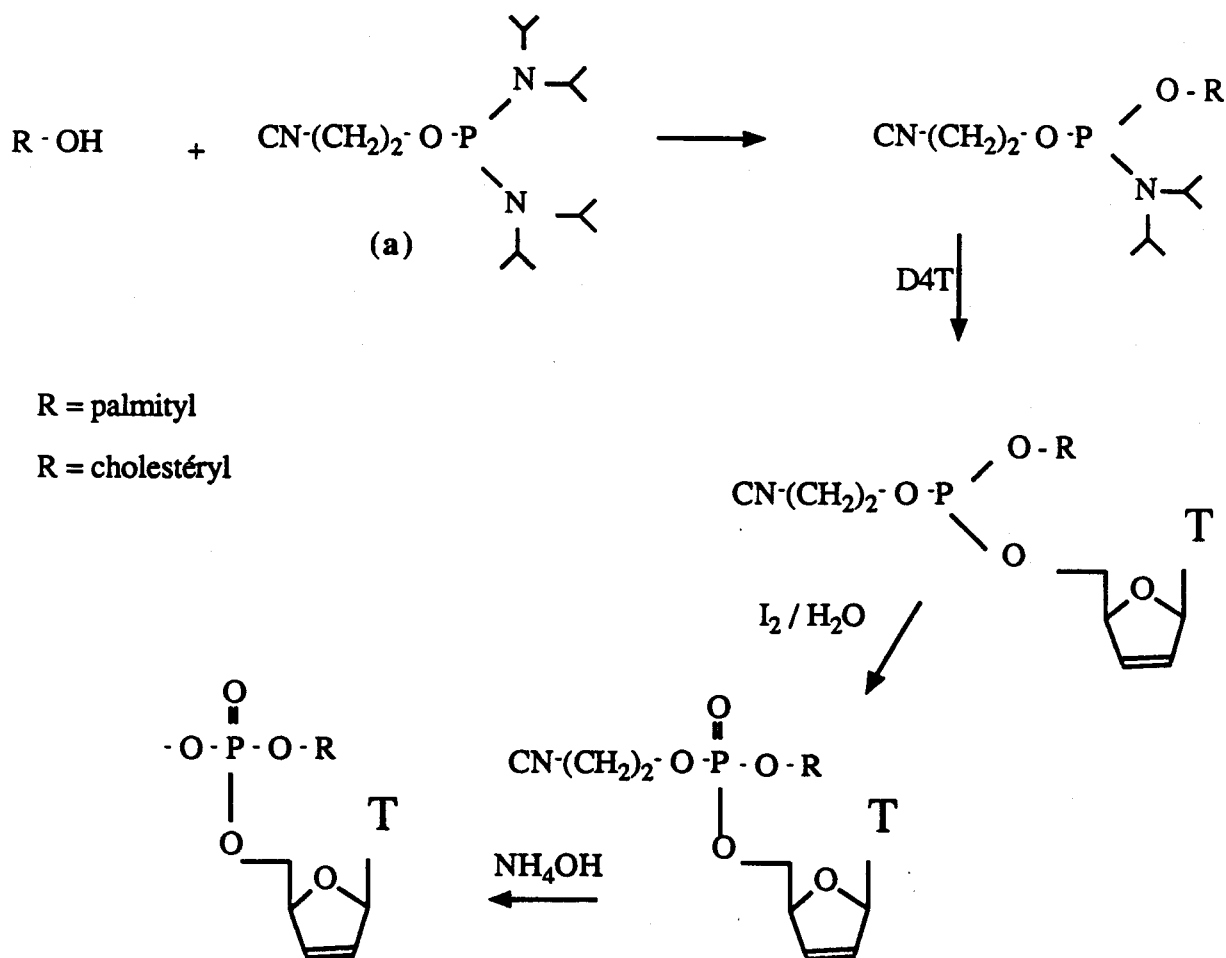


Figure 91 : Stratégie de synthèse utilisée pour l'obtention des dérivés phospho-tri et di-esters en utilisant d'abord l'alcool hydrophobe puis le D4T

#### 4.2.1. Réaction de l'alcool hydrophobe sur le composé (a)

Comme l'ont montré Ji et Coll en 1990, les alcools réagissent sur un excès de réactif (a), en présence de tétrazolate de diisopropylammonium pour donner le phosphoroamidite correspondant. Ce dernier était fortement soluble dans le chloroforme, les lavages aqueux permettent d'éliminer l'excès de phosphorodiamidite et le tétrazolate de diisopropylammonium.

Le dimère éventuellement formé, ne pose plus de problème car il n'est pas détectable en chromatographie couche mince et il n'est plus susceptible de réagir ultérieurement.

#### 4.2.2. Réaction du D4T

Le milieu réactionnel contenant le dérivé phosphoroamidite à reste hydrophobe est soumis sans purification à l'addition de D4T en présence de tétrazole. Le contrôle chromatographique sur couche mince montre clairement l'apparition d'un nouveau produit détecté sous la forme de deux bandes très proches.

#### 4.2.3. Réaction avec l'iode

L'ajout à ce même milieu réactionnel d'un équivalent d'iode apporté dans un mélange THF-H<sub>2</sub>O provoque une oxydation instantanée.

Une purification sur couche épaisse de silice permet d'obtenir le dérivé phosphotriester.

#### 4.2.4. Traitement ammoniacal

Le milieu réactionnel précédent, ou le phosphotriester purifié, sont traités en solution ammoniacale concentrée pour éliminer le groupement cyanoéthoxy et fournir le composé phosphodiester correspondant.

Ce dernier est purifié sur couche épaisse de silice.

### 4.3. Synthèse des dérivés phospho-tri et di ester du bis D4T

La formation du composé dimère 2 a été signalée lors de la mise en réaction d'un équivalent du D4T avec un équivalent de (a) en présence de tétrazole. La formation du dimère 2 devient exclusive avec un équivalent de (a) en présence de deux équivalents de D4T et de tétrazole. L'oxydation à l'iode, et le traitement ammoniacal fournissant alors respectivement, le dimère phosphotriester, et le dimère phosphodiester (Figure 92).

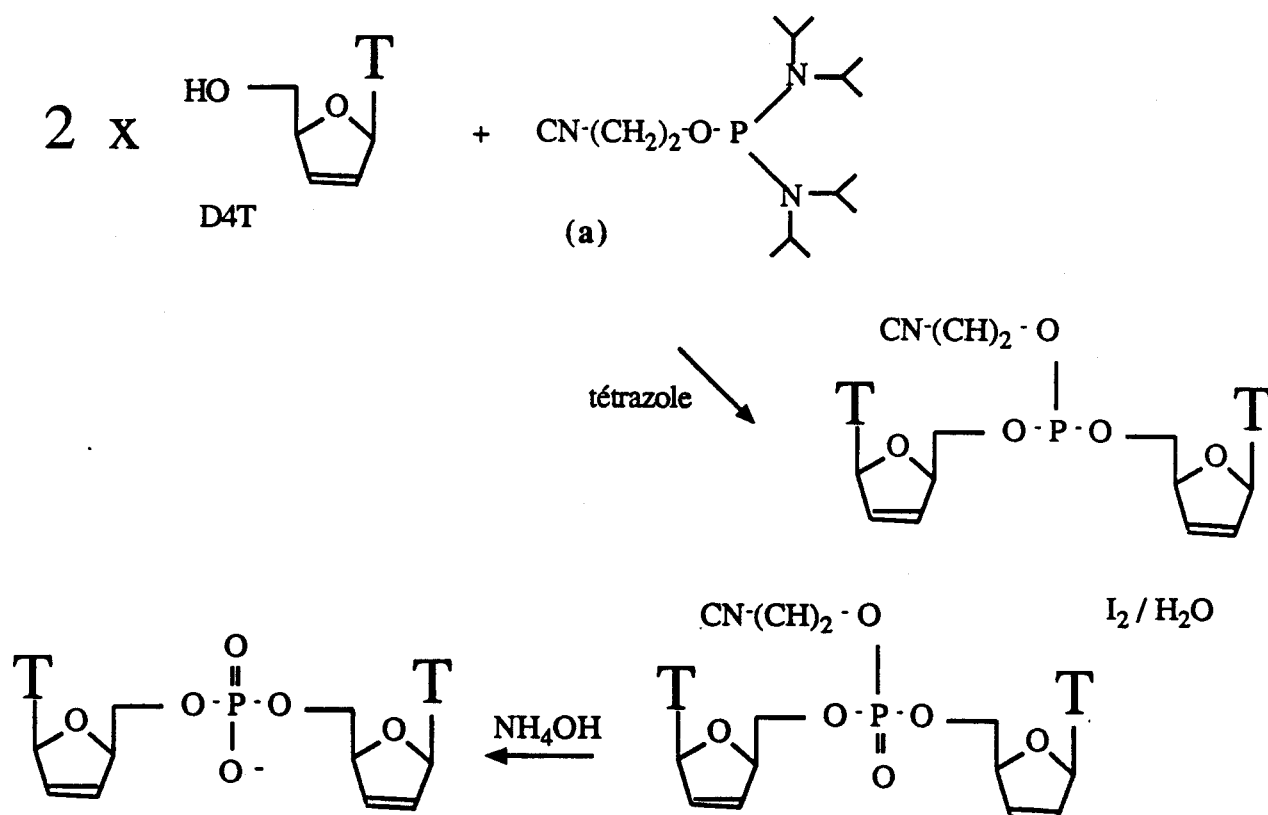


Figure 92 : Synthèse des dérivés phospho-tri et di-esters du bis-D4T

Ces composés sont purifiables par chromatographie sur couche épaisse de silice.

### 5) SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS ESTERS DU D4T

Les carbodiimides et en particulier la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) peuvent être utilisés comme agent couplant dans les réactions d'estérification, avec la 4 diméthylaminopyridine (DMAP) comme catalyseur (Bodansky, 1984).

Les réactions d'estérification du D4T dans les conditions décrites pour l'AZT par Aggarwal (1990) (DCC : 1,2 équivalent, DMAP : 1,5 équivalent, Acide : 1,1 équivalent) se sont révélées incomplètes après plusieurs jours.

La modification des proportions de réactifs (excès de DCC 2,4 équivalents, et d'acide 2,2 équivalents) nous a permis d'obtenir les différents esters avec des rendements de 40 à 60%.

Ces estérifications ont été réalisées avec les acides hydrophobes suivants :



- acide palmitique
  - acide dérivé du cholestérol
  - acide linoléique
  - acide linoléique
  - dipalmityl-lysine
- La dipalmityl-lysine a été synthétisée par réaction de deux équivalents du chlorure de palmitoyl sur l'ester fluorénéméthyle de la lysine. La saponification a été réalisée par l'utilisation d'un excès de diéthylamine, et est facilement contrôlable en chromatographie couche mince grâce à l'apparition du dibenzofulvène libéré.

### 6) SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS CARBONATE ET CARBAMATE DU D4T

Les dérivés carbonate et carbamate du D4T peuvent être obtenus par activation de l'alcool de départ par le carbonyldiimidazole, puis par la réaction avec le nucléophile (Figure 93) alcool ou amine.

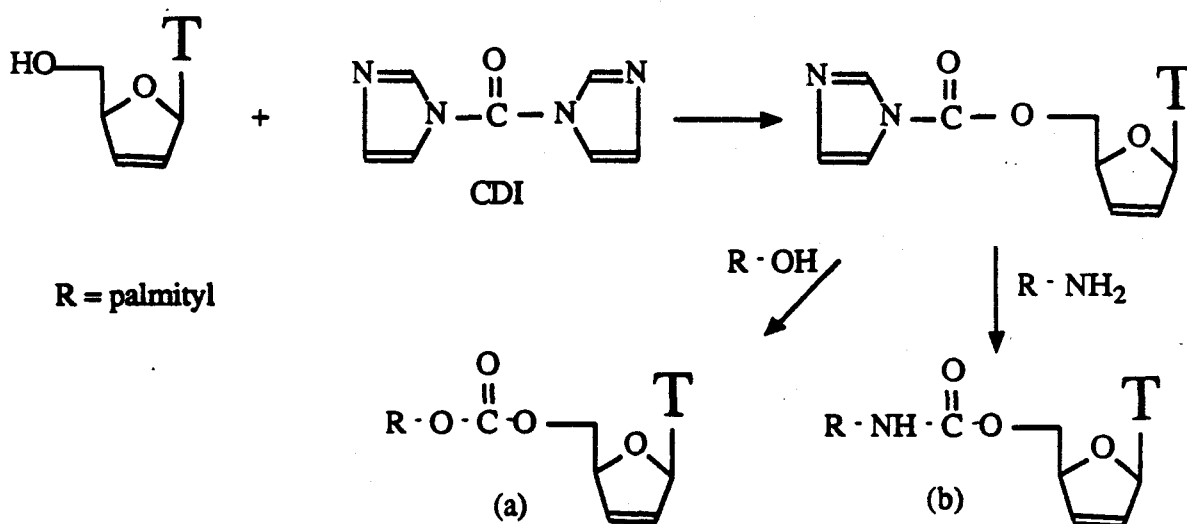


Figure 93 : Synthèse des dérivés carbonate (a) et carbamate (b) du D4T

Le D4T est activé en présence de 5 équivalents de carbonyldiimidazole dans l'acétonitrile. Après évaporation du solvant, le résidu est essoré de l'acétate d'éthyle, solubilisé dans l'acétonitrile et mis à reflux une nuit en présence de 1-hexadécanol ou de 1-hexadécylamine. Les dérivés carbonate et carbamate sont purifiés par chromatographie sur couche épaisse.

## C) ACTIVITE ANTI-HIV

### 1) GENERALITES

Deux paramètres sont à définir quand on mesure l'activité anti VIH d'un produit :

- son effet cytotoxique

Le médicament introduit dans la cellule doit perturber le moins possible la croissance des cellules saines. L'effet cytotoxique correspondant à la dose donnant 50% d'effet cytotoxique ou cytostatique.

- son effet inhibiteur

L'effet inhibiteur d'un médicament est caractérisé par son ( $EC_{50}$ ), correspondant à la dose donnant 50% d'efficacité. L' $EC_{50}$  est mesurable de plusieurs façons (Lemaitre M., 1990). Dans nos résultats, cette  $EC_{50}$  correspond soit à l'inhibition de la réplication virale mesurée par l'effet cytopathogène (ecp) qu'il induit, ou à l'inhibition mesurée par la diminution de la transcriptase inverse (rt).

L'activité thérapeutique de la drogue sera d'autant meilleure que sa  $CC_{50}$  est grande et que son  $EC_{50}$  est petite. Les deux termes sont associés dans le troisième paramètre appelé indice de sélectivité du composé (IS) correspondant au rapport  $CC_{50} / EC_{50}$ .

### 2) RESULTATS

Les dosages d'activité ont été réalisés par les docteurs M. Lemaître et Y. Hénin ( Société RHONE-POULENC) sur plusieurs types de cellules. Dans le tableau suivant figurent les activités du D4T monophosphate à reste palmitique ou cholestérol, des esters correspondant et du dimère D4T phosphate par rapport aux témoins AZT et D4T.

Produit	CC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	IS	IS
	μM	e <sub>cp</sub> (μM)	rt (μM)	e <sub>cp</sub>	rt
AZT	>20	0,01	>0,009	>2000	2222
	20	0,003	0,06	6666	667
D4T	10	>0,009	>0,009	1111	1111
	10	0,08	0,1	125	100
Palmi-P-D4T	10	0,12	0,5	50	20
	>20	4	NT	>5	
Chol-P-D4T	>20	0,015	0,05	1333	>400
	100	2	NT	50	
D4T-P-D4T	>20	0,009	0,01	>2222	2000
	100	0,5	1	200	100
Palmi-D4T	4	>0,009	0,009	<444	<4444
	>20	0,05	0,5	>400	>40
Chol-D4T	4	0,009	0,027	444	148
	>20	0,74	NT	>27	

Tableau 94

Les dérivés phosphodiester du D4T avec un reste cholestérol ou avec une chaîne grasse montrent une nette perte d'activité par rapport au D4T. Les esters correspondants, au reste cholestérol et surtout au reste palmitique montrent une activité intéressante, alors que le dimère bis D4T phosphate démontre un bon compromis activité-toxicité.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu étudier l'influence de la charge encore présente dans les composés phosphodiesters, en testant les phosphotriesters isolés à l'étape précédente et possédant encore le groupe cyanoéthoxy.

D'autre part, la chaîne palmitique fixée sous forme d'ester sur le D4T semblant lui conférer des propriétés anti HIV intéressantes, nous avons cherché à évaluer l'importance de cette liaison, et de la chaîne palmitique. C'est pourquoi nous avons incorporé cette même chaîne palmitique sur le D4T par des liaisons carbonate et carbamate.

Enfin des chaînes grasses différentes ont été fixées par estérification sur le D4T, en vue d'étudier l'influence de la partie hydrophobe( Tableau 95).

produit	CC50 $\mu\text{M}$	EC50 ecp ( $\mu\text{M}$ )	EC50 rt ( $\mu\text{M}$ )	IS ecp	IS rt
Palmi-POCE-D4T	17	4,3		4	
D4T-POCE-D4T	>17	1		>17	
(Palmi)2-lys-D4T	206	>206		<1	
Linoléic-D4T	50	0,04	0,02	1250	2500
Linoléic-D4T	24	0,1	0,04	240	600
Palmi-carbo-D4T	>20	3		>6	
Palmi-carba-D4T	>20	>20		1	

Tableau 95

La disparition de la charge au niveau des phosphodiesters liée à la conservation du groupe cyanoéthoxy n'améliore en rien l'activité anti virale.

Les liaisons carbonate et carbamate introduites pour fixer la chaîne palmitique sur le D4T, font apparaître une baisse d'activité par rapport à l'ester.

Les esters linoléique et linoléique tout en étant intéressants, ne se révèlent pas supérieurs à l'ester palmitique du D4T. Quant à la double incorporation de la chaîne palmitique par l'intermédiaire de la lysine sur le D4T elle fait disparaître toute activité ( $EC_{50} > 200$ ).

### 3) *CONCLUSIONS*

La plupart des produits testés sont actifs ( $IS > 1$ ). Un composé est jugé actif lorsqu'il inhibe la production de la transcriptase inverse d'au moins 50% tout en conférant au moins 50% de protection vis-à-vis de l'effet cytopathogène).

Nous avons cherché à améliorer l'activité du D4T. Mais les dérivés phosphotri et di esters testés n'ont pas permis d'apporter un gain d'activité par rapport à la molécule mère. Le remplacement de la liaison ester, ou la modification de la chaîne grasse ne contribuent pas à une augmentation d'activité.

L'estérfication du D4T par l'acide palmitique aboutit à la formation d'un dérivé très intéressant ayant des  $EC_{50}$  et  $CC_{50}$  voisines du D4T. Une étude pharmacocinétique approfondie devrait permettre de montrer que ce composé présente bien des avantages sur le D4T au niveau de la demi-vie plasmatique, du passage de la barrière hémato-encéphalique ou encore de la toxicité liée aux doses administrées.

**VECTORISATION DE MEDICAMENTS PAR LES  
LES LIPOPROTEINES DE BASSE DENSITE (LDL)**

## A) INTRODUCTION

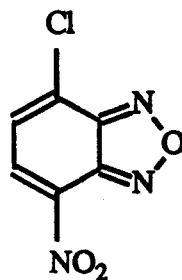
Les thérapeutiques associées au cancer et au SIDA sont actuellement encore lourdes et traumatisantes. L'utilisation des drogues médicamenteuses est limitée, à la fois par leur manque de discrimination entre les cellules saines et les cellules malignes, et par leur importante cytotoxicité.

La vectorisation a pour but ici d'augmenter l'efficacité de la molécule antivirale, tout en réduisant ses effets secondaires. Un des transporteurs naturels du cholestérol, en l'occurrence les lipoprotéines de base densité (LDL), peut être utilisé pour vectoriser des molécules anti-HIV.

## B) SYNTHÈSE DE MOLECULES DERIVES DU D4T INCORPORABLES DANS LES LDL

Les travaux effectués en collaboration avec l'équipe du professeur P. DURIEZ ont montré que les esters du D4T à reste palmitique et cholestérol (produits ayant une activité anti-HIV) pouvaient s'incorporer dans les LDL à raison de de 150 molécules par LDL.

Pour prouver la pénétration réelle de la molécule anti-HIV dans la cellule grâce aux LDL, nous avons synthétisé des dérivés fluorescents du D4T, susceptibles d'être mis en évidence dans les compartiments cellulaires. Le groupe fluorescent choisi est un dérivé du 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole (chlorure de NBD).



Chlorure de NBD

2 produits ont été synthétisés pour leur hydrophobie différente:

- un ester du D4T comportant un reste NBD.

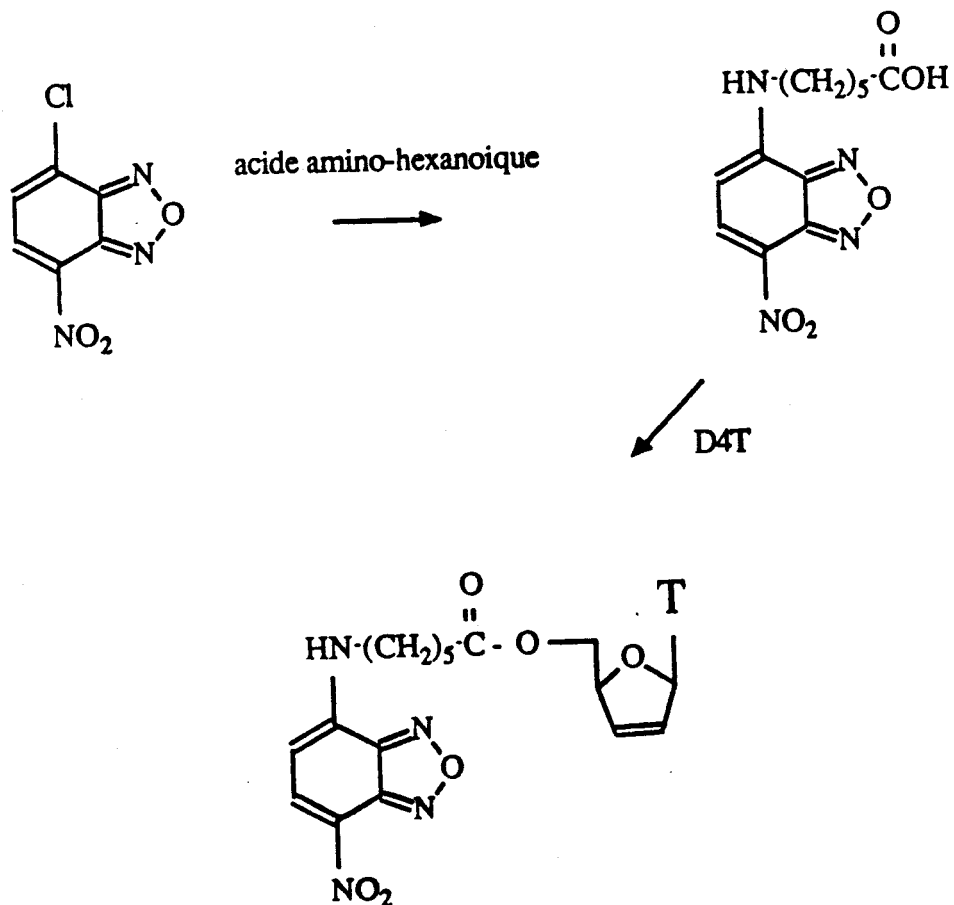
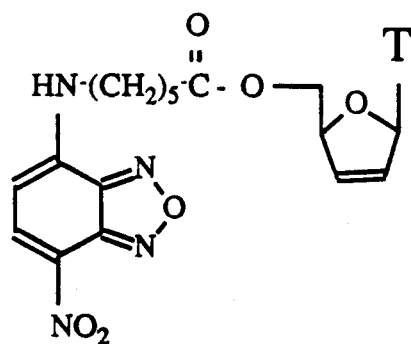


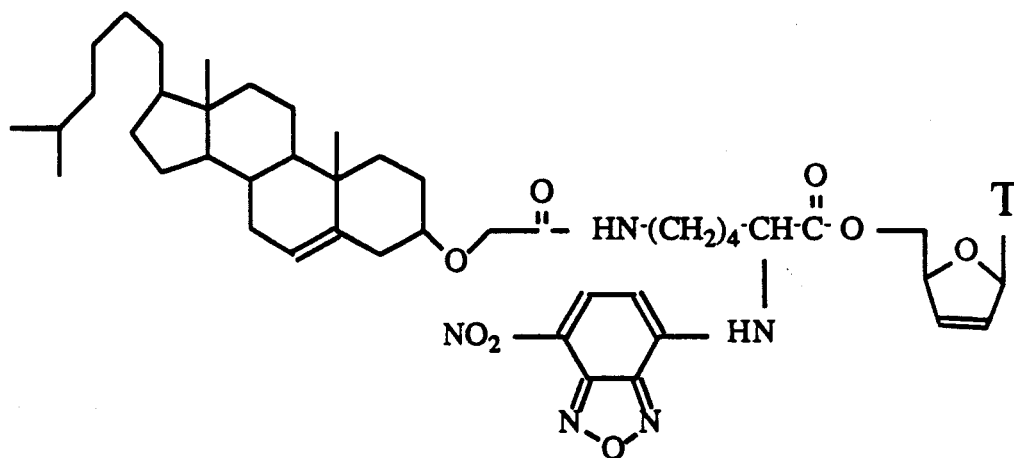
Figure 9\* Synthèse du N-4-(7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)amino hexanoate de 5'-O-(2',3'-didéoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)





N-4-(7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-1,3-diazole)aminohexanoate de 5'-O-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)

- un ester du D4T comportant un reste NBD et cholestérol, en utilisant la lysine .

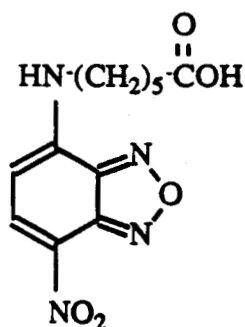


N $\alpha$ -4-(7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-1,3-diazole)-N $\epsilon$ -(3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxycholestène))-lysinate de 5'-O-(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)

**1)SYNTHESE DU N-4-(7-NITROBENZO-2-OXO-1,3-DIAZOLE)AMINOHEXANOATE DE 5'-O-(2',3'-DIDESOXY-2',3'-DIDEHYDRO-THYMIDINYLE)**

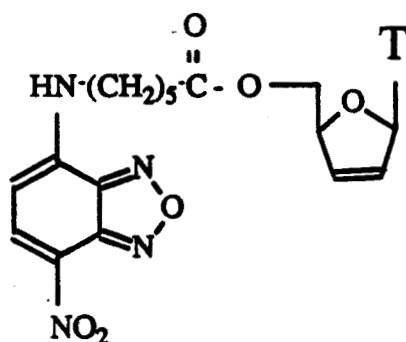
Cette synthèse est réalisée en deux étapes selon le schéma de la figure 94. La substitution nucléophile sur le chlorure de NBD est effectuée par l'acide aminohexanoïque, l'estérification se déroule en présence de D4T.

**1.1. Synthèse de l'acide N-4-(7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)aminohexanoïque**



La substitution nucléophile avec l'acide aminohexanoïque se déroule en milieu basifié par le bicarbonate de sodium; la réaction terminée (quelques heures), l'acidification du milieu par HCl permet d'obtenir l'acide fluorescent par précipitation.

**1.2. Synthèse de l'acide N-4-(7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)aminohexanoate de 5'-O-(2',3'-didésoxy-2',3'-dihydro-thymidinyle)**



L'estérification est réalisée dans l'acétate d'éthyle en présence de DCC et de DMAP. La purification du produit est réalisée par chromatographie sur couches épaisses de silice.

**2) SYNTHÈSE DU N $\alpha$ -4-(7-NITROBENZO-2-OXO-1,3-DIAZOLE)-N $\epsilon$ -(3 $\beta$ -(2'-CARBOXYMETHOXYCHOLESTÈNE))-LYSINATE DE 5'-O-(2',3'-DIDESOXY-2',3'-DIDÉHYDRO-THYMINYLE)**

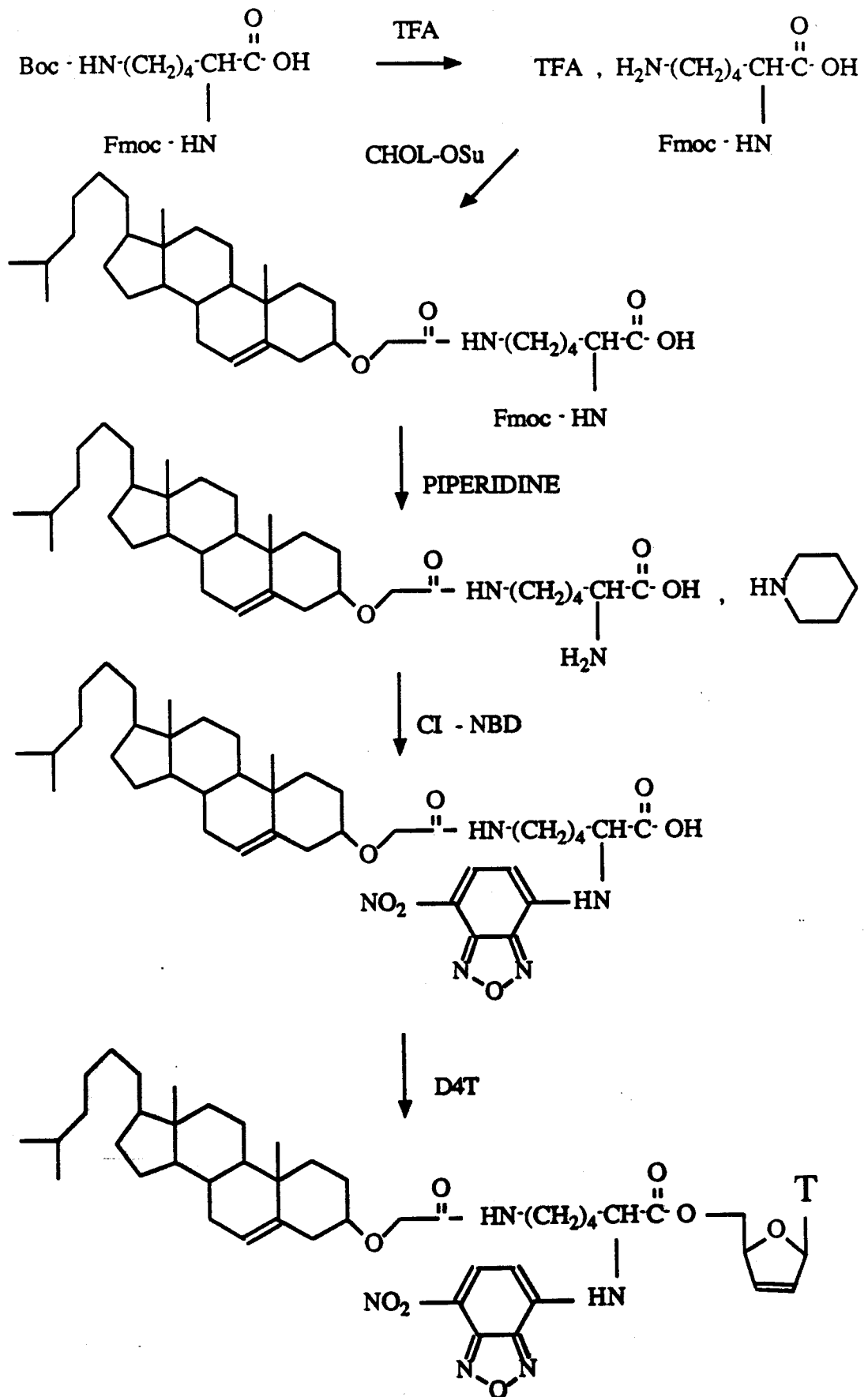
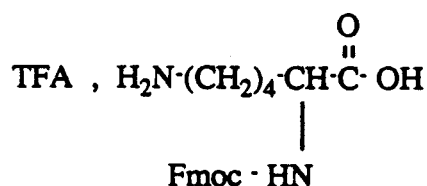


Figure 95: Synthèse du N $\alpha$  4-(7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)-N $\epsilon$ -(3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxycholestérol de 5'-O-(2',3'-didéoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)

Cette synthèse est effectuée en deux temps (Figure 95) :

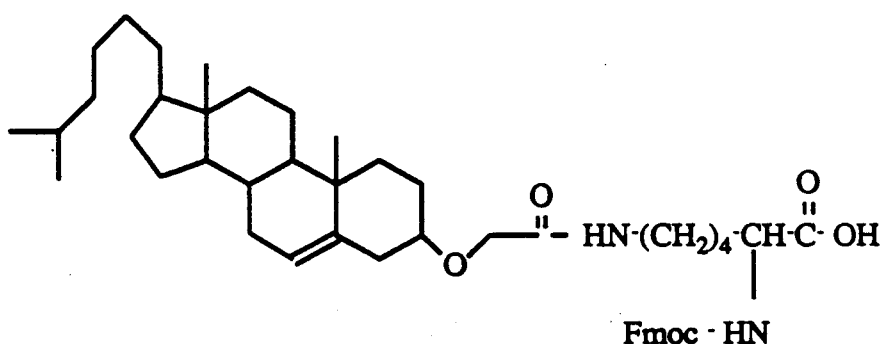
- alternance de déprotections et de couplages sur la N $\alpha$ -Fmoc-N $\epsilon$ -Boc-lysine pour obtenir un composé carboxylique comportant un reste NBD et Cholestérol.
- L'estérication du dérivé de la lysine avec le D4T.

### 2.1. Trifluoroacétate de N $\alpha$ -Fmoc-lysine



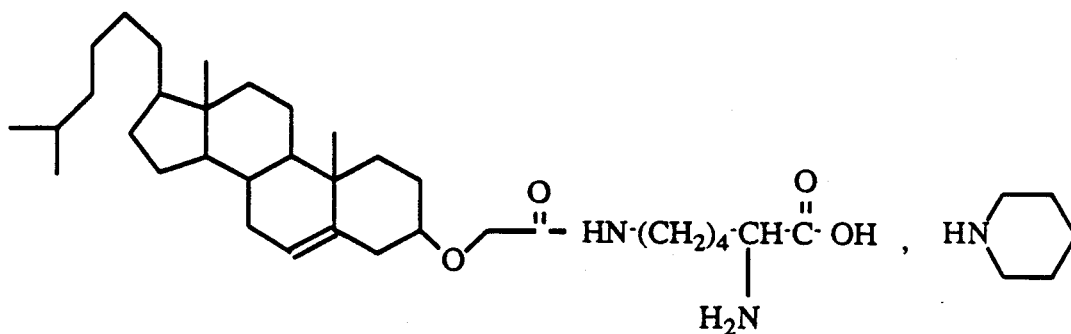
La N $\alpha$ -Fmoc-N $\epsilon$ -Boc-lysine commerciale est traitée par une solution de TFA à 50 % dans le chlorure de méthylène pour éliminer le groupe protecteur Boc. Après évaporation du solvant le précipité est lavé par de l'éther éthylique.

### 2.2. N $\alpha$ -Fmoc-N $\epsilon$ -(3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxycholestène))-lysine



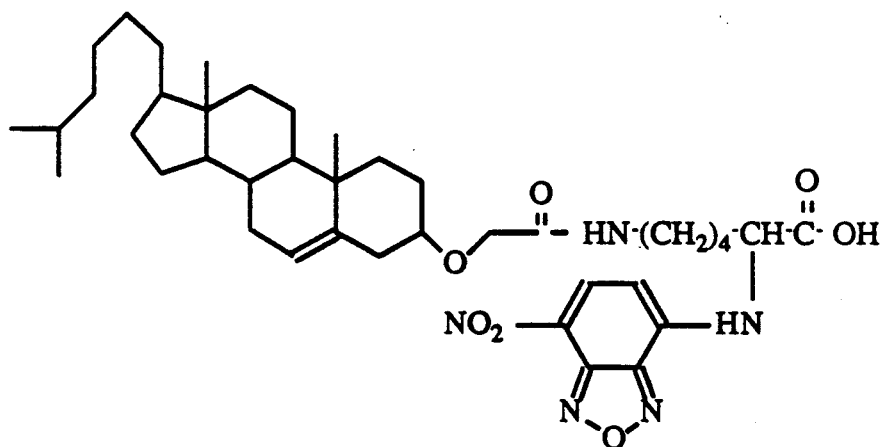
L'ester de N-hydroxysuccinimide du 3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxycholestène) réagit sur l'amine en  $\alpha$  de la N $\alpha$ -Fmoc-lysine dans le chlorure de méthylène en présence de TEA.

### 2.3 N $\epsilon$ -(3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxycholestène))-lysine (sel de pipéridine)



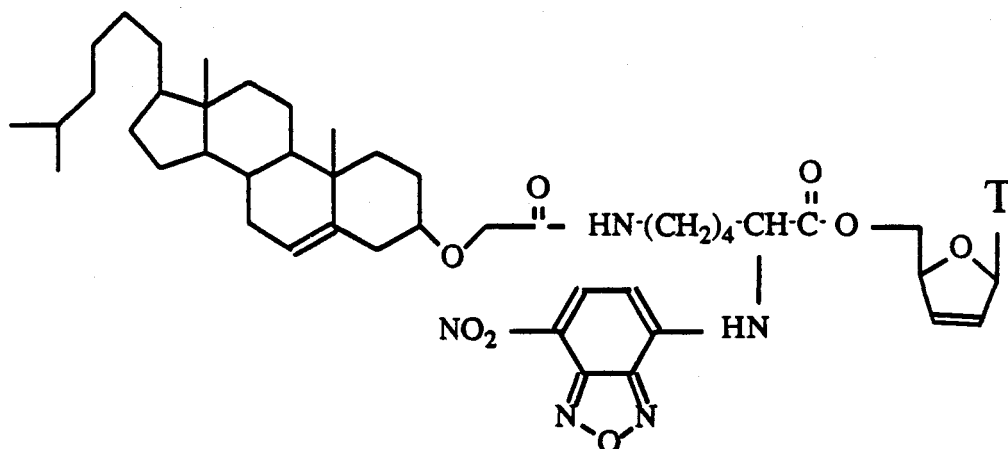
Le traitement de la  $N\alpha$ -Fmoc- $N\epsilon$ -(3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxycholestène))-lysine dans une solution de pipéridine à 20 % dans le DMF permet la précipitation du composé déprotégé sous forme de sel de pipéridine.

2.4.  $N\alpha$ -4-(7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)- $N\epsilon$ -(3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxycholestène))-lysine



Le sel de pipéridine de la  $N\epsilon$ -(3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxycholestène))-lysine réagit sur le chlorure de NBD dans le chloroforme en présence de triéthylamine. Après acidification du milieu le produit est purifié par chromatographie sur couche épaisse de silice.

2.5.  $N\alpha$ -4-(7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)- $N\epsilon$ -(3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxycholestène))-lysinate de 5'-O--(2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyle)



L'estérification est réalisée en présence de l'acide dérivé de la lysine, du D4T, de DCC et de DMAP dans l'acétate d'éthyle. La réaction terminée (2 jours), la DCU est filtrée et le produit est purifié par chromatographie sur couche épaisse de silice.

## C) MESURE DE LA QUANTITE DE MEDICAMENT INCORPOREE DANS LES LDL

### 1) EVALUATION PAR CCM

Pour les esters simples à reste palmitique et cholestérol, l'évaluation des quantités de médicament incorporée se fait de la façon suivante :

- on dépose un échantillon (médicament incorporé dans les LDL) sur une plaque de silice comportant un marqueur de fluorescence on dépose également à côté de ce premier dépôt des quantités connues de médicament seul, la migration de ces différents échantillons est réalisée avec le mélange solvant suivant: acétate d'éthyle-chlorure de méthylène (50-50). L'intensité de la tache du médicament incorporé dans les LDL est comparée à la gamme étalon (Figure 96), on en déduit alors la quantité de molécules incorporées par LDL (environ 150).

### 2) DOSAGE PAR SPECTOPHOTOMETRIE

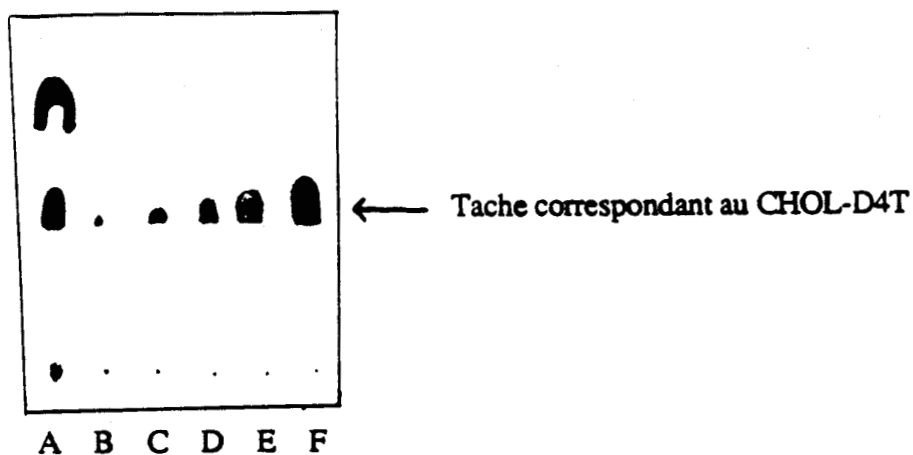


Figure 96 : CCM du médicament (CHOL-D4T) incorporé dans les LDL (A) et de la gamme étalon (B, C, D, E, F)

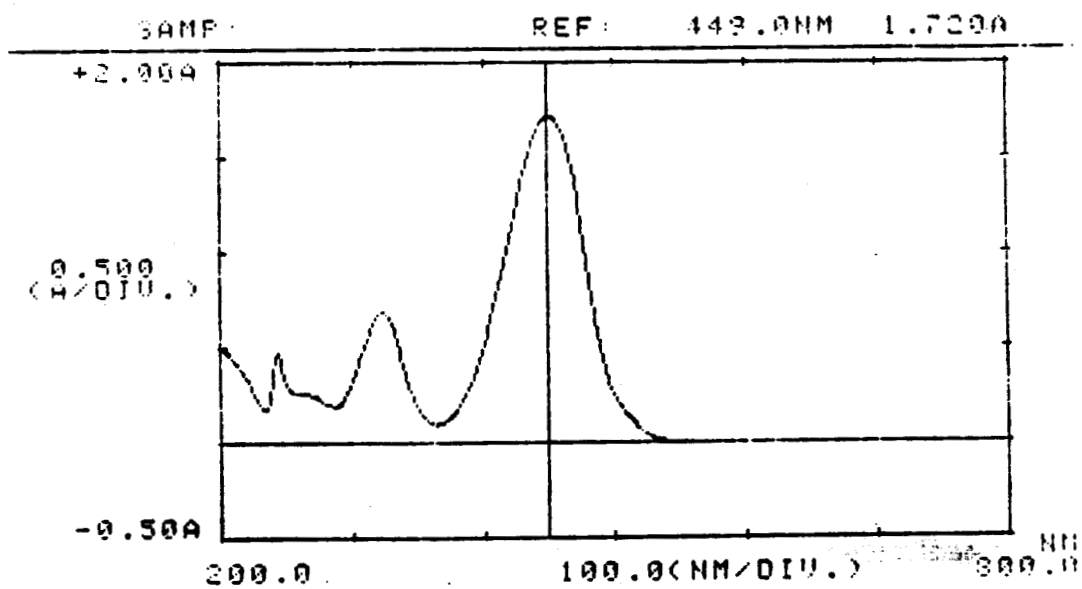


Figure 97 : Spectre d'absorption du NBD-CHOL-D4T entre 200 et 800 nm

L'ester de D4T comportant uniquement le reste NBD ne présente pas d'intérêt car il ne s'incorpore pas de façon correcte sans doute par manque de caractère hydrophobe. Pour l'ester de D4T comportant le fluorophore NBD et un reste cholestérol la mesure de la quantité de médicament incorporée par LDL n'a pu se faire par chromatographie sur couche de silice, à cause de la trop grande fluorescence provoquée par le NBD. Le dosage a donc été effectué par spectrophotométrie, le spectre d'absorption de ce composé entre 200 et 800 nm révèle la présence de plusieurs maximums à 243, 324 et 449 nm (l'absorption à 449 nm étant la plus importante) (Figure 97). Après s'être assuré que les LDL n'absorbaient pas vers 449 nm, on dose l'échantillon (médicament incorporé dans les LDL) par son absorbance à 449 nm. La comparaison de cette mesure avec les mesures de la gamme étalon constitue une détermination du nombre de molécules incorporées dans les LDL. Les premiers résultats obtenus montrent une incorporation d'environ 150 molécules par LDL pour cet ester.

### 3) INCORPORATION CELLULAIRE DES LDL MÉDICAMENTEUSES

le dernier ester synthétisé (NBD-CHOL-D4T) a été utilisé pour l'incorporation cellulaire. L'incubation des LDL médicamenteuses, et du médicament seul, a été réalisée sur des cellules U 937 (lignée continue de macrophages) pendant 5 heures à 37 °C. La concentration est de l'ordre de 2 µg / ml . Après incubation on porte en abscisse la fluorescence émise et en ordonnée le nombre de cellules.

La comparaison des deux courbes obtenues :(Figure 97 B)

a) incubation du médicament seul

b) incubation du médicament incorporé dans les LDL

montre clairement que le médicament pénètre mieux dans la cellule quand il est préalablement incorporé dans les LDL.

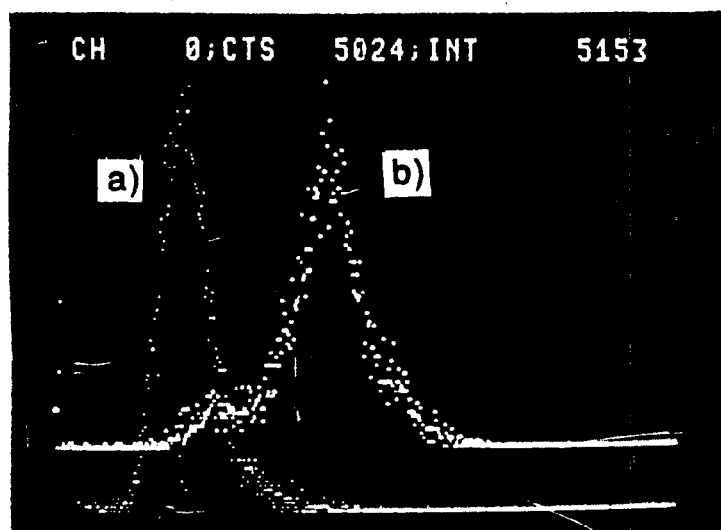


Figure 97 B



**CONCLUSION      GENERALE**

Dans la première partie de cette thèse nous nous sommes attachés à la modification chimique d'oligodésoxyribonucléotides en 5' en phase solide. Pour suivre toutes ces transformations chimiques nous avons employé deux méthodes de contrôle: L'HPLC et la spectrométrie de masse TOF . L'HPLC nous permet d'évaluer la qualité de la transformation et la spectrométrie de masse nous confirme la structure des produits obtenus. Le spectre de masse d'un octamère à reste cholestérol a même été obtenu.

Après avoir fonctionnalisé l'extrémité 5' OH en 5' NH<sub>2</sub>, nous avons testé pour la première fois en chimie des oligodésoxyribonucléotides en phase solide, l'utilisation du réactif BOP, pour coupler différents acides ou sels d'acides. C'est ainsi que selon la stratégie anti-sens, un oligodésoxyribonucléotide de huit bases complémentaires d'une séquence consensus trouvée dans le gène pol ( souche HIV III B ) a été fonctionnalisé en 5' par un reste dexaméthasone susceptible de l'amener au noyau par translocation du récepteur cytoplasmique. L'analogue cholestérol testé en témoin a montré une activité inhibitrice anti-HIV analogue.

Toujours par la méthode du BOP nous avons multiplié les fonctions amines d'un tétramère grâce à la lysine. Cette technique peut permettre d'incorporer quatre fonctions amines, et à partir de là, quatre groupes reporters comme la biotine peuvent être fixés. Pour optimiser cette technique nous avons utilisé divers groupes protecteurs pour la lysine , ainsi que différentes conditions de déprotection. Toutefois cette méthode relativement longue et qui tend à générer beaucoup de produits secondaires, ne pourra pas être utilisée en routine.

La deuxième partie de ce travail concerne le D4T et ses dérivés. Après avoir mis au point une méthode de synthèse nous permettant d'obtenir plusieurs centaines de milligrammes de D4T en quelques heures, différents produits ont été synthétisés:

- Les phospho-tri et di-esters ont été obtenus à l'aide du réactif phosphorodiamidite.
- les esters, grâce aux acides correspondants.
- les carbonate et carbamate, après activation du D4T par le carbonyldiimidazole.

Les activités biologiques évaluées pour tous ces produits soulignent l'intérêt des dérivés phosphates et esters.

La vectorisation de plusieurs dérivés du D4T comportant en particulier un reste fluorescent a été étudiée dans les LDL. Les premières études démontrent clairement l'incorporation des drogues et intéressent maintenant leur passage membranaire via les récepteurs LDL sur plusieurs lignées cellulaires.

**PARTIE**

**EXPERIMENTALE**

## A) PARTIE OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES

### 1) *SYNTHESE D'OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES*

#### 1.1 Synthétiseur d'oligodésoxyribonucléotides

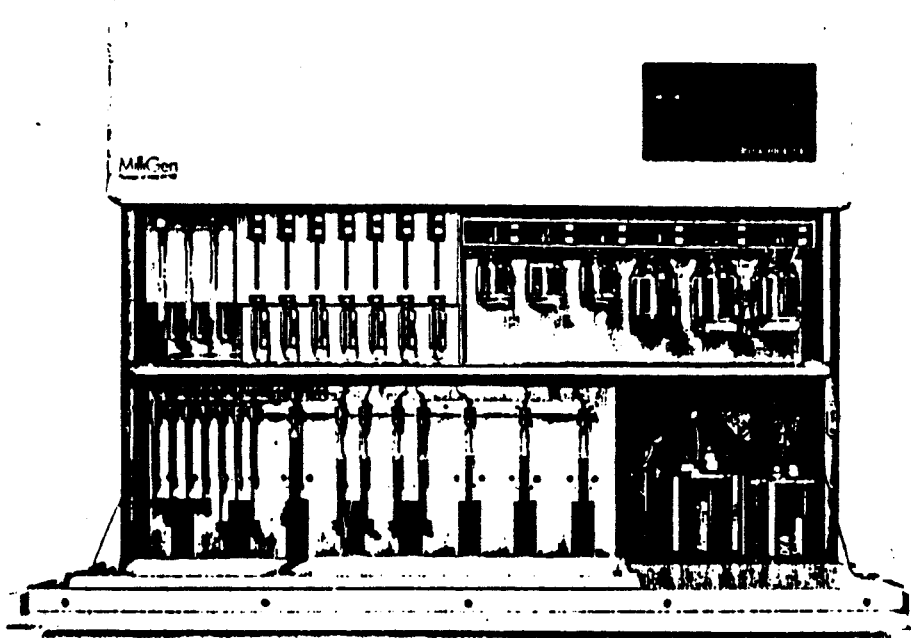
##### 1.1.1 Description et fonctionnement du synthétiseur Milligen 7500 DNA

Les oligodésoxyribonucléotides 5' OH ont été synthétisés sur synthétiseur Milligen 7500 DNA. Cet appareil, commandé à partir d'un ordinateur IBM PC, est basé sur les principes de la chimie en phase solide en utilisant la méthode des phosphoroamidites. Les cycles successivement répétés comprennent :

- déprotection du DMTr de l'oligo fixé sur la résine
- couplage avec le phosphoroamidite
- oxydation
- capping

Les réactifs nécessaires à chaque étape du cycle sont stockés dans des flacons sous azote. ce sont respectivement :

- la solution de lavage (acétonitrile à 50 ppm d'eau)
- la solution de déprotection ( acide dichloroacétique à 2 % dans le chlorure de méthylène)
- la solution de tétrazole (tétrazole 0,4 M dans l'acétonitrile)
- la solution oxydante (iode-eau-THF)
- les deux solutions de capping
  - solution d'anhydride acétique dans le THF
  - solution d'activateur(DMAP)
- les 4 solutions de phosphoroamidites protégées correspondant aux bases A,C,G,T. Ces solutions de phosphoroamidites sont préparées juste avant emploi en diluant les amidites cristallines dans de l'acétonitrile anhydre. Toutes ces solutions et réactifs sont commerciaux (Milligen, Applied, Cytolab).



Synthétiseur Milligen 7500 DNA

La synthèse est effectuée sur une colonne renfermant quelques micromoles de nucléosides fixés sur des particules de verre par l'intermédiaire d'une liaison succinate.

Sur le synthétiseur 7500, le cheminement des réactifs est réalisé par l'intermédiaire de seringues, la course des piston étant contrôlée par ordinateur. Les seringues se remplissent totalement en prélevant la solution du flacon mère, puis la translation du piston est effectuée pour délivrer la quantité de réactifs nécessaire sur la colonne.

### 1.1.2 Capacité de synthèse

Le synthétiseur peut réaliser 3 synthèses simultanément, dans ces conditions la durée d'un cycle est de 15 minutes. Le temps de cycle est ramené à 6 minutes lorsque l'appareil ne fonctionne que pour une seule synthèse.

### 1.1.3 Contrôle de la synthèse

Le synthétiseur mesure la quantité de carbocation diméthoxytrityle libéré après chaque déprotection par spectrophotométrie à 500 nm. Ceci nous renseigne sur la rendement par cycle et global.

## 1.2 Traitement des résines

Ce traitement est valable pour des colonnes de 0,2 ou 1  $\mu$ mol. La synthèse terminée, la colonne doit d'abord être séchée (une nuit à température ambiante ou quelques minutes avec un sèche-cheveux). Ceci évite à la résine d'adhérer aux parois internes de la colonne. Après avoir décapsulé la colonne de synthèse, la résine est récupérée dans un tube Eppendorf, 1 ml de solution ammoniacale concentrée est ajoutée. le tube est agité quelques secondes et laissé une heure à température ambiante, pour être ensuite porté à 55°C pendant 5 heures ou une nuit. La solution ammoniacale est évaporée et le résidu est repris par de l'eau.

## 2) **MODIFICATION D'OLIGONUCLEOTIDES SUR RESINE**

## 2.1 Fonctionnalisation du 5' OH en 5' NH<sub>2</sub>

### 2.1.1 Réaction avec le carbonyldiimidazole

La résine, contenant 1  $\mu\text{mol}$  d'oligodésoxyribonucléotide 5' OH, dans un tube Eppendorf est agitée avec 23 mg (150 équivalents) de carbonyldiimidazole dans 1 ml de pyridine pendant 30 minutes à température ambiante.

#### Lavage de la résine :

L'agitation arrêtée on laisse la résine se déposer dans le fond du tube, puis on enlève le surnageant. On lave ainsi plusieurs fois(5) la résine avec la pyridine.

### 2.1.2 Réaction avec le diaminohexane

La résine précédente est agitée dans 1 ml de pyridine, puis on additionne 50 mg (430 équivalents) de 1-6-diaminohexane. La réaction se déroule pendant 30 minutes à température ambiante.

#### Lavage de la résine

pyridine 3 fois

acétonitrile 3 fois

## 3) ***COUPLAGE D'UN ACIDE (OU D'UN SEL) SUR L'AMINO-OLIGONUCLEOTIDE***

La résine, contenant environ 1  $\mu\text{mol}$  d'amino- oligonucléotide, dans un tube Eppendorf est agité dans 1 ml de DMF, on ajoute ensuite l'acide ou le sel correspondant (125 équivalents), le Bop 55 mg (125 équivalents), et la DIPEA 70  $\mu\text{l}$  (500 équivalents). La réaction se déroule pendant 1 nuit à température ambiante.

#### Lavage de la résine



DMF 3 fois

acétonitrile 3 fois

#### Déprotection

Les éventuelles déprotections des fonctions amines en 5' de l'oligonucléotide sont réalisées avec les solutions de concentrations appropriées dans un volume de 1 ml. Le temps de déprotection est fonction des réactifs utilisés.

Toutefois lorsque les déprotections des fonctions amines se font en milieu acide, on déprotonne ces amines par une solution de DIPEA à 5 % dans le DMF, pour permettre un éventuel nouveau couplage.

Le clivage et les déprotection se font suivant le protocole classique.

#### **4) COUPLAGE DE LA FITC**

La résine, contenant environ 1  $\mu\text{mol}$  d'amino-oligonucléotide, dans un tube Eppendorf est agité dans 1 ml de solution DMF-DIPEA (9/1), 30 mg (77 équivalents) d'isothiocyanate de fluoresceine sont ajoutés . La réaction se déroule pendant une nuit à l'obscurité.

#### Lavage de la résine

DMF 3 fois

MeOH 3 fois

acétonitrile 3 fois

Le clivage et les déprotections se font suivant le protocole classique .

#### **5) CONTROLES**

##### **5.1 Controle HPLC**

L'HPLC phase inverse analytique est réalisée sur un appareil GILSON équipé de 2 pompes, d'une vanne rhéodyne munie d'une boucle d'injection de 25  $\mu\text{l}$ , d'un spectrophotomètre réglé sur

260 nm et d'un enregistreur de papier SHIMADZU (CR 3A) . La colonne de dimension 120x4,6mm est garnie d'une phase Vydac C4, 7  $\mu$  de porosité 7 A.

L'élution des composés est réalisée à l'aide de 2 systèmes solvants :

- Solvant A : Acétate d'ammonium 0,1 M
- Solvant B : Acétate d'ammonium 0,1 M / Acétonitrile (50:50)

Le gradient de solvant est le suivant :

- 5 minutes d'isocratique en solvant A
- 15 minutes de gradient linéaire de A (100 %) vers B (100 %)
- 15 minutes d'isocratique en solvant B
- 5 minutes de gradient linéaire de B (100 %) vers A (100 %)
- 5 minutes d'isocratique en solvant A

Le flux est de 0,7 ml par minute .

## 5.2 Contrôle par spectrométrie de masse TOF

### 5.2.1 Préparation des échantillons

L'échantillon (15  $\mu$ l d'une solution 1  $\mu$ g/10  $\mu$ l d'eau)de l'oligonucléotide purifié est déposé sur la fine couche de nitrocellulose qui recouvre la pastille de laiton. Après avoir séché la nitrocellulose sous flux d'azote, la pastille contenant l'échantillon est prêts pour l'analyse.

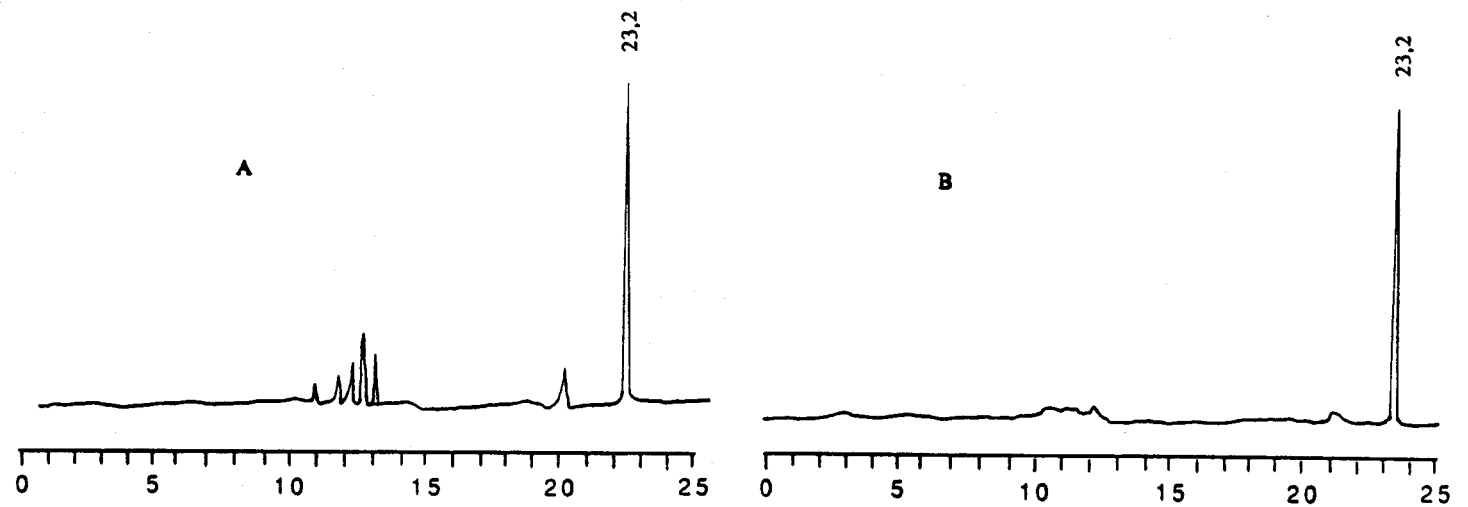
### 5.2.2 Tension d'accélération

Les spectres d'oligonucléotides sont le plus souvent obtenus quand la tension d'accélération est négative. Seulement l'obtention de la tension négative nécessaire (-12kV) à la désorption peut prendre plusieurs heures. C'est pourquoi, l'analyse des échantillons est d'abord réalisée avec une tension positive de 15 kV. Si les spectres ne sont pas exploitables le travail est alors réalisé en détection négative.

### 5.2.3 Temps d'accumulation

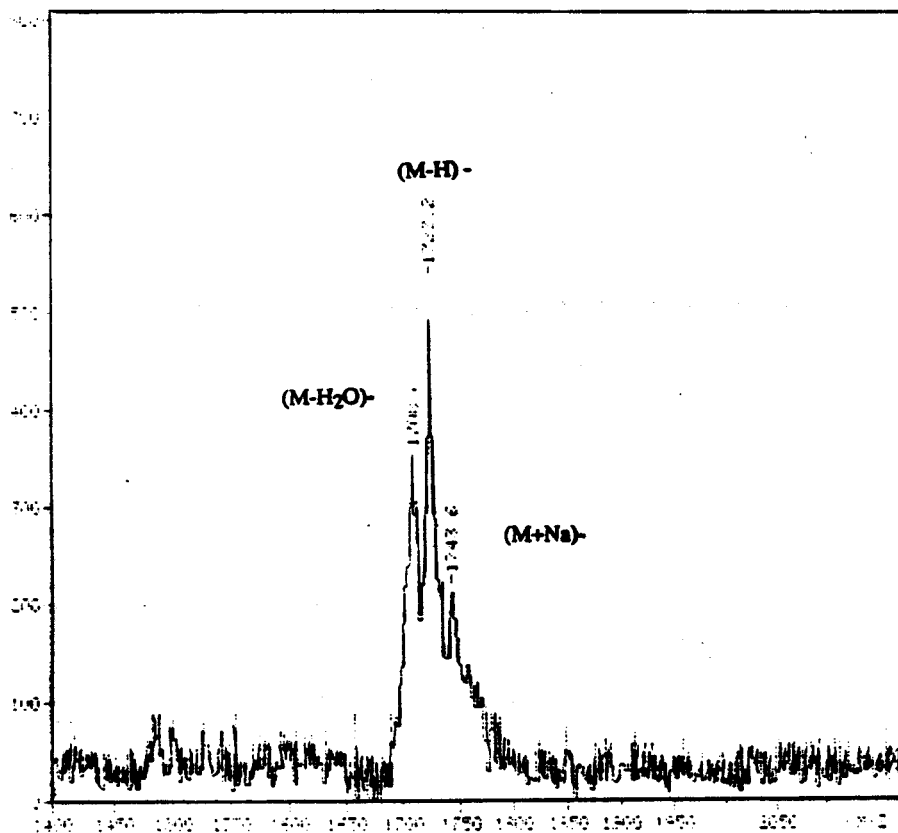
A chaque fois qu'une particule est détectée par le spectromètre de masse, elle est enregistrée. Aussi lorsque le nombre de particules enregistrées dépasse le nombre imposé (généralement 1 million de coups), l'appareil arrête d'accumuler les données. Quand l'accumulation de coups n'est pas suffisante pour mettre en évidence le pic du produit par rapport au bruit de fond, on recommence une analyse de l'échantillon avec une accumulation de coups supérieure ( de 2 à 10 millions de coups).

### **5.3. HPLC et TOF de différents oligodésoxyribonucléotides modifiés**



HPLC de A) brut de CHOL-T4  
B) CHOL-T4 pur

Sum of 8 channels:

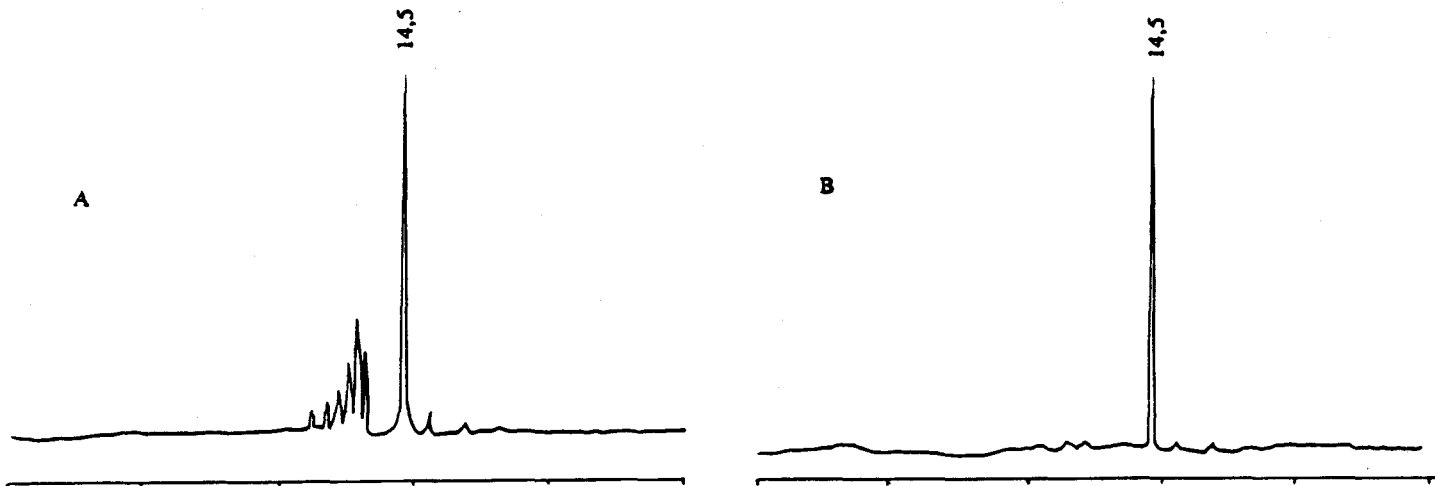


**Spectre de masse TOF de CHOL-T4**

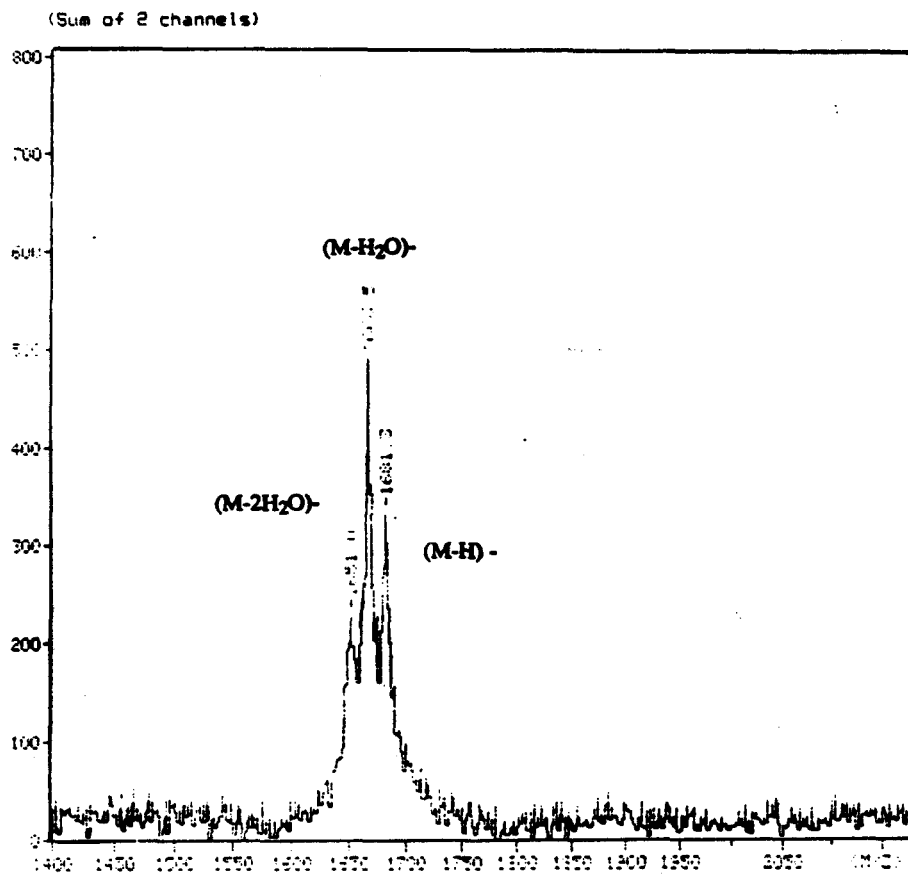
(M-H) - : M. M. théorique : 1722. ( observée : 1723,2)

(M+Na) - : M. M. théorique : 1746. ( observée : 1743,6)

(M-H<sub>2</sub>O) - : M. M. théorique : 1705. ( observée : 1708,6)



HPLC de A) brut de FLUO-T4  
B) FLUO-T4 pur

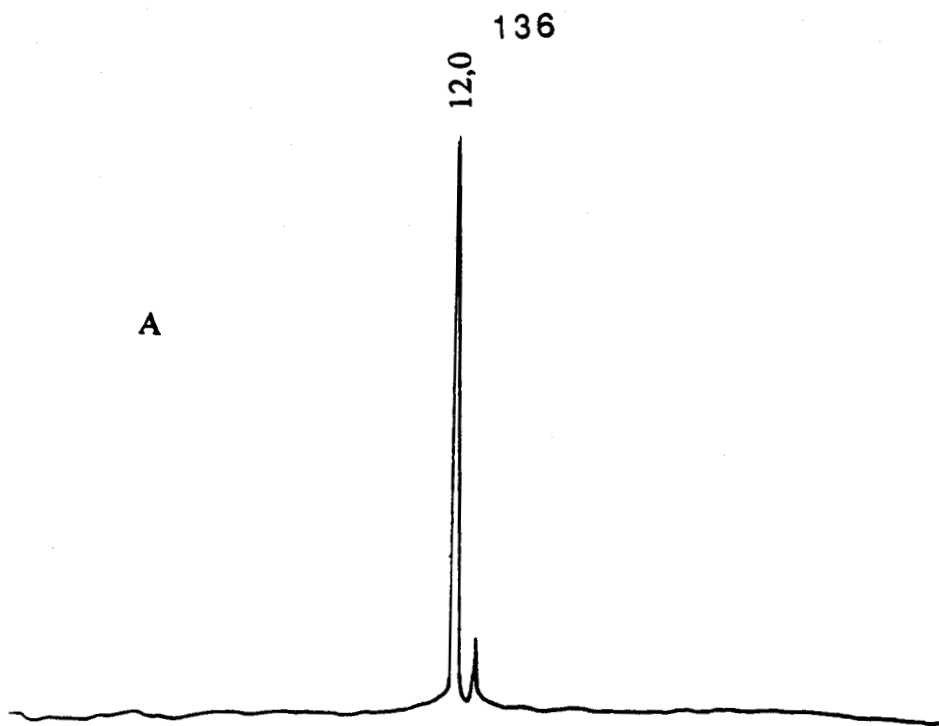


**Spectre de masse TOF de FLUO - T<sub>4</sub>**

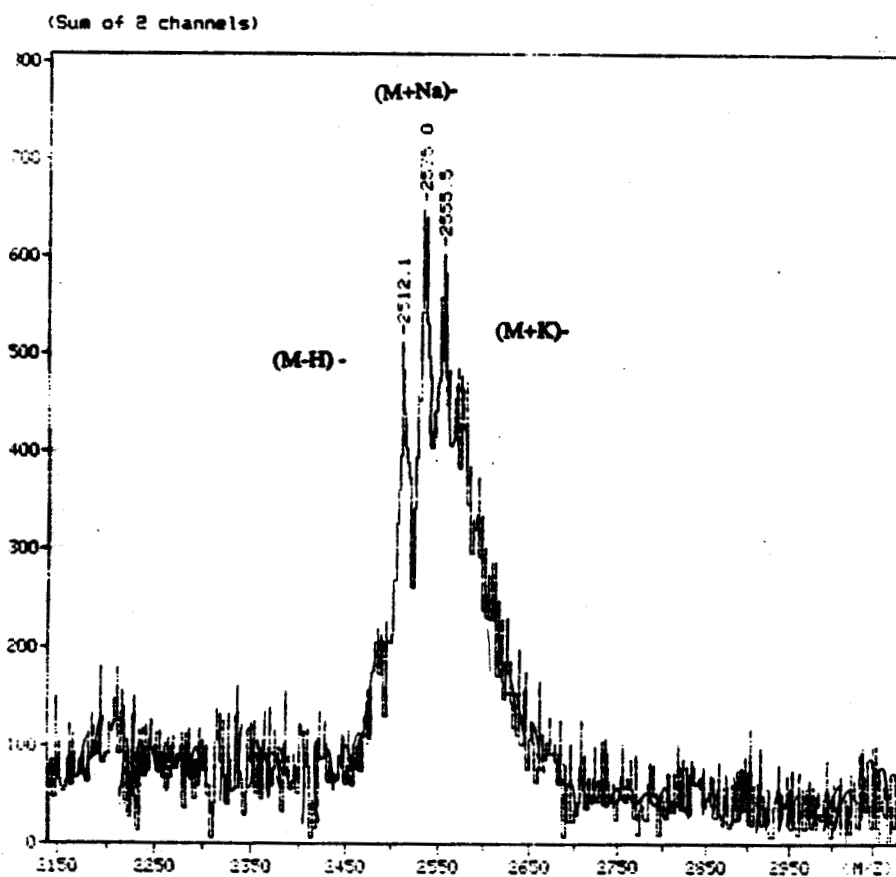
(M-H) - : M. M. théorique : 1684. ( observée : 1681,3)

(M-H<sub>2</sub>O)- : M. M. théorique : 1667. ( observée : 1666,5)

(M-2H<sub>2</sub>O)- : M. M. théorique : 1649. ( observée : 1651,0)



HPLC de : A) brut de HO-T8

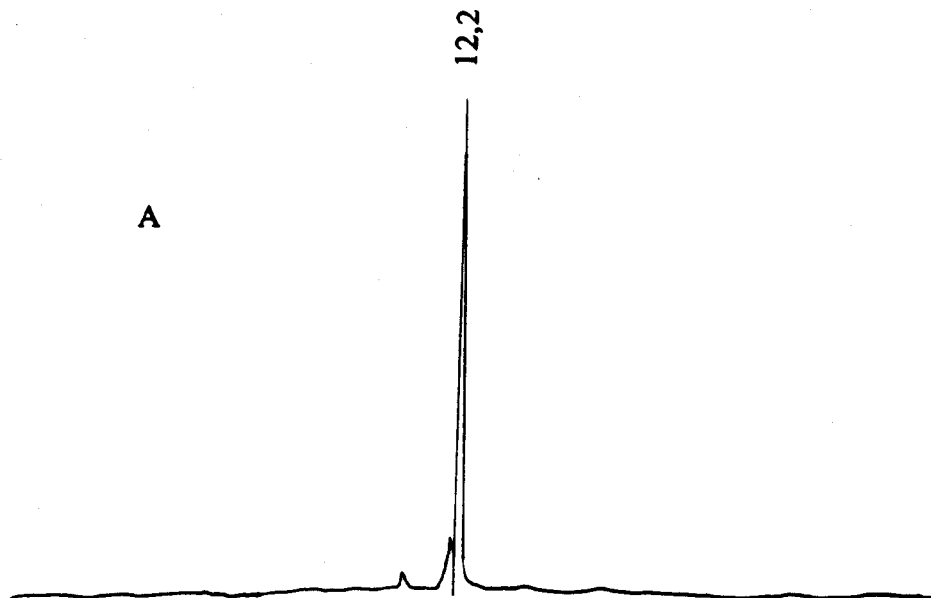


Spectre de masse TOF de HO-T8

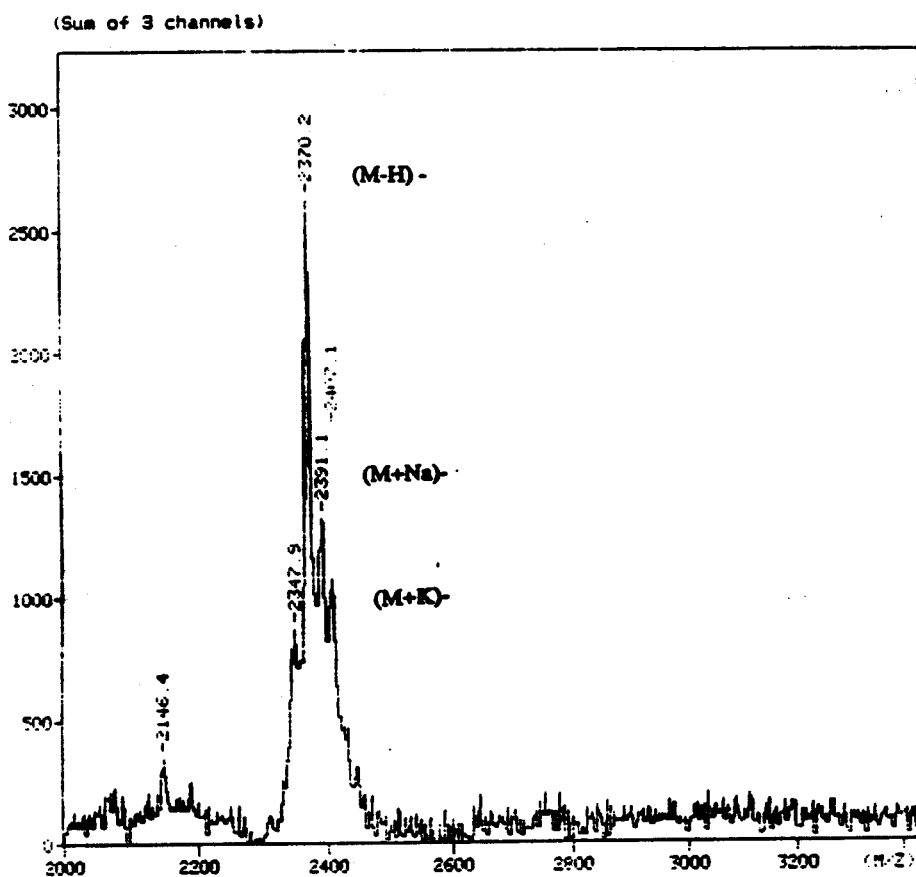
(M-H) - : M. M. théorique : 2369. ( observée : 2370,2)

(M+Na)- : M. M. théorique : 2393. ( observée : 2391,1)

(M+K)- : M. M. théorique : 2410. ( observée : 2407)



HPLC de : A) brut de NH<sub>2</sub>-T8

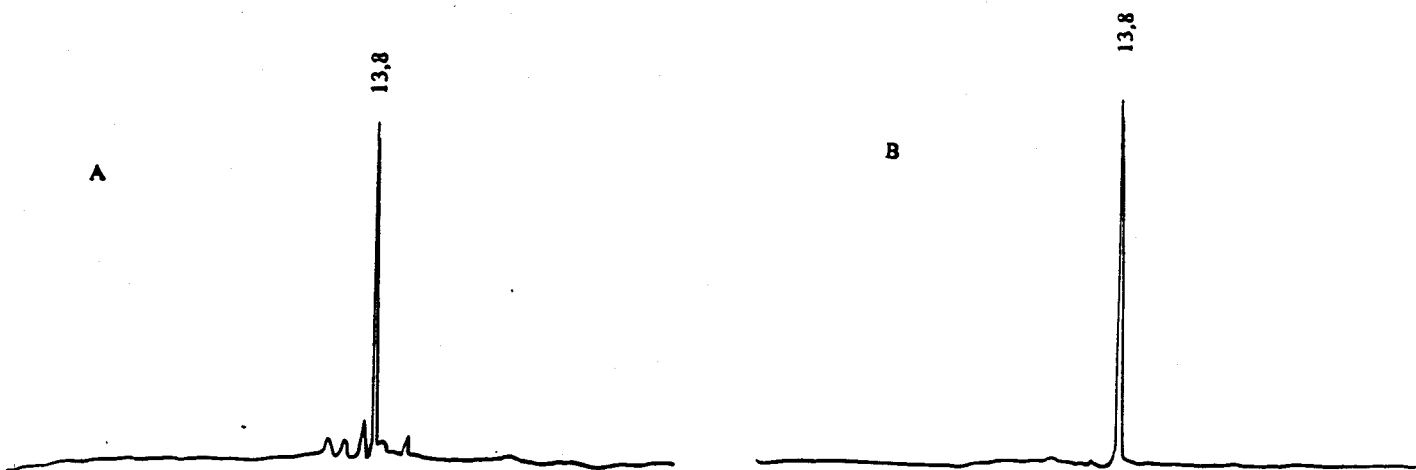


Spectre de masse TOF de NH<sub>2</sub>-T8

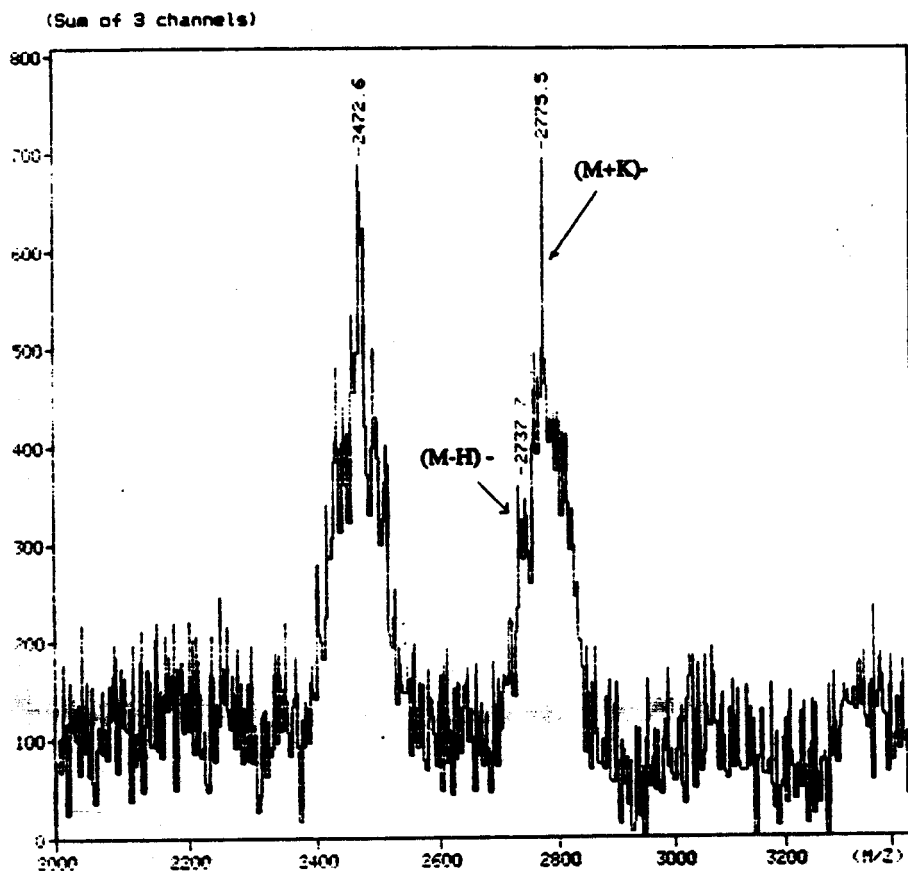
(M-H) - : M. M. théorique : 2511. ( observée : 2512,1)

(M+Na)- : M. M. théorique : 2535. ( observée : 2535,0)

(M+K)- : M. M. théorique : 2551. ( observée : 2555,5)



HPLC de : A) brut de BIOTINE-T8  
B) BIOTINE-T8 pur

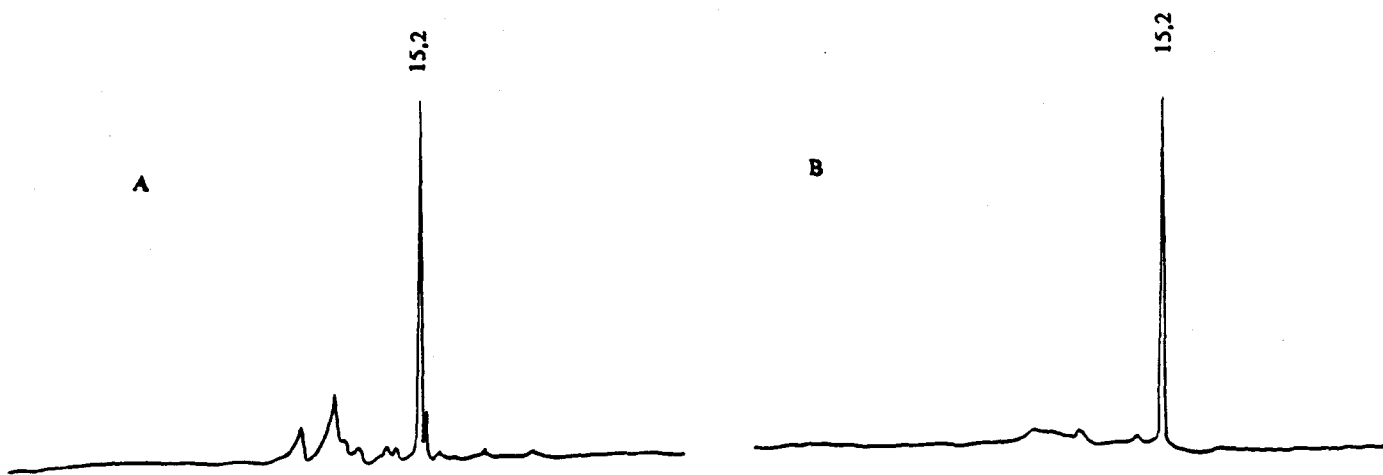


**Spectre de masse TOF de BIOTINE-T8**

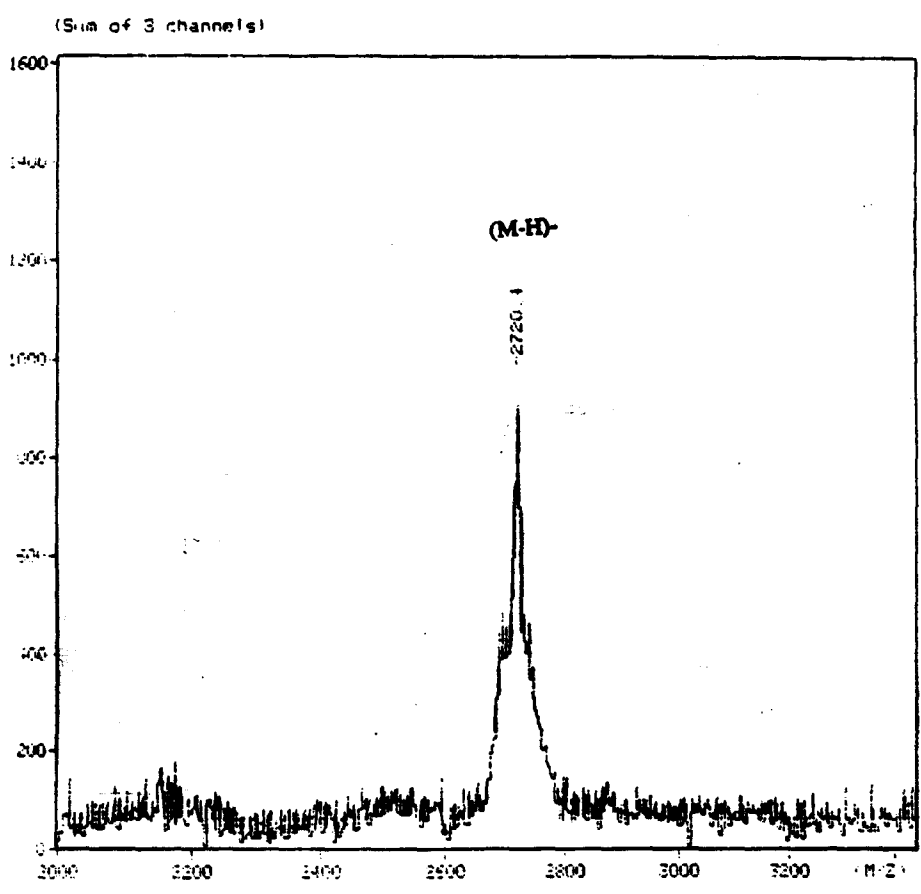
(M-H) - : M. M. théorique : 2737. ( observée : 2337,7)

(M+K)- : M. M. théorique : 2777. ( observée : 2775,5)

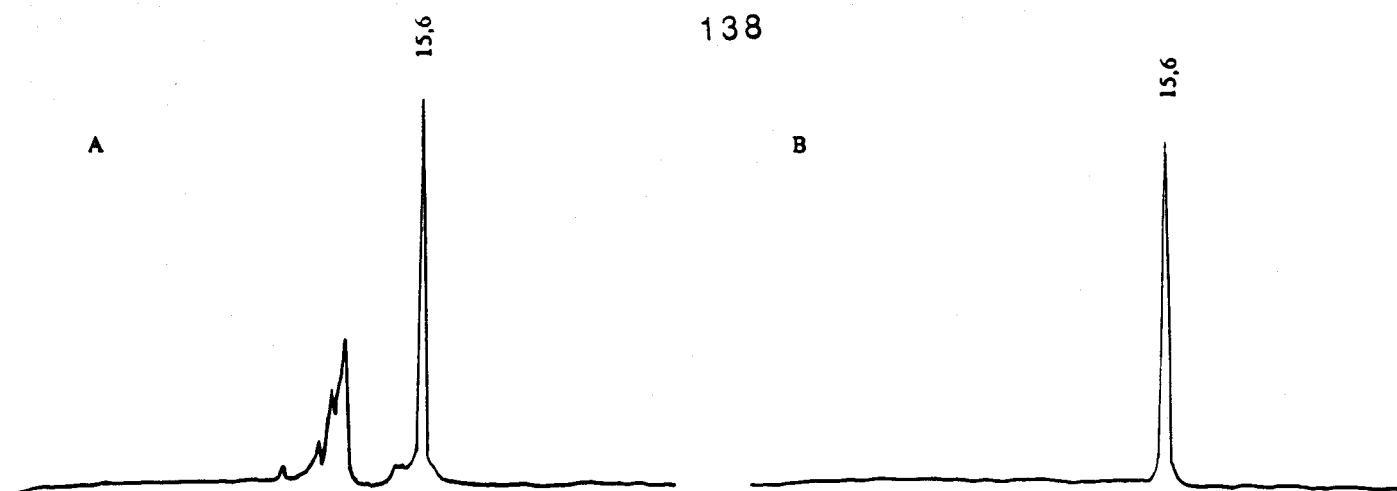




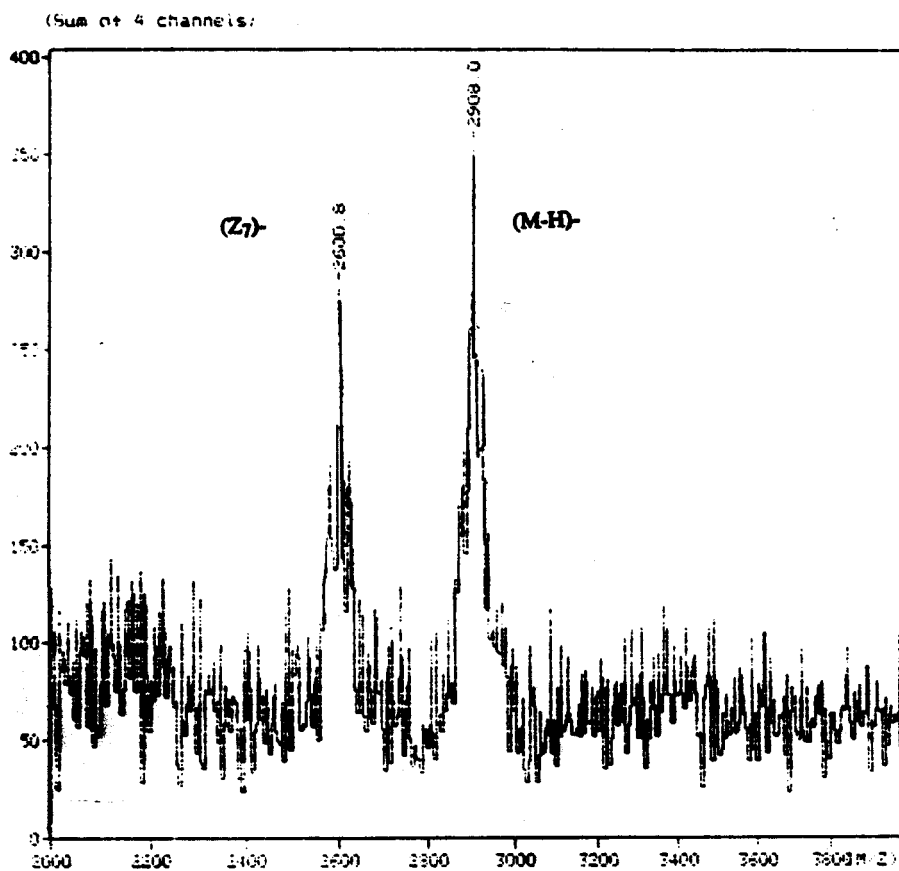
HPLC de : A) brut de ANTHRA-T8  
 B) ANTHRA-T8 pur



Spectre de masse TOF de ANTHRA-T8  
 (M-H)<sup>-</sup> : M. M. théorique : 2715. ( observée : 2720,4)



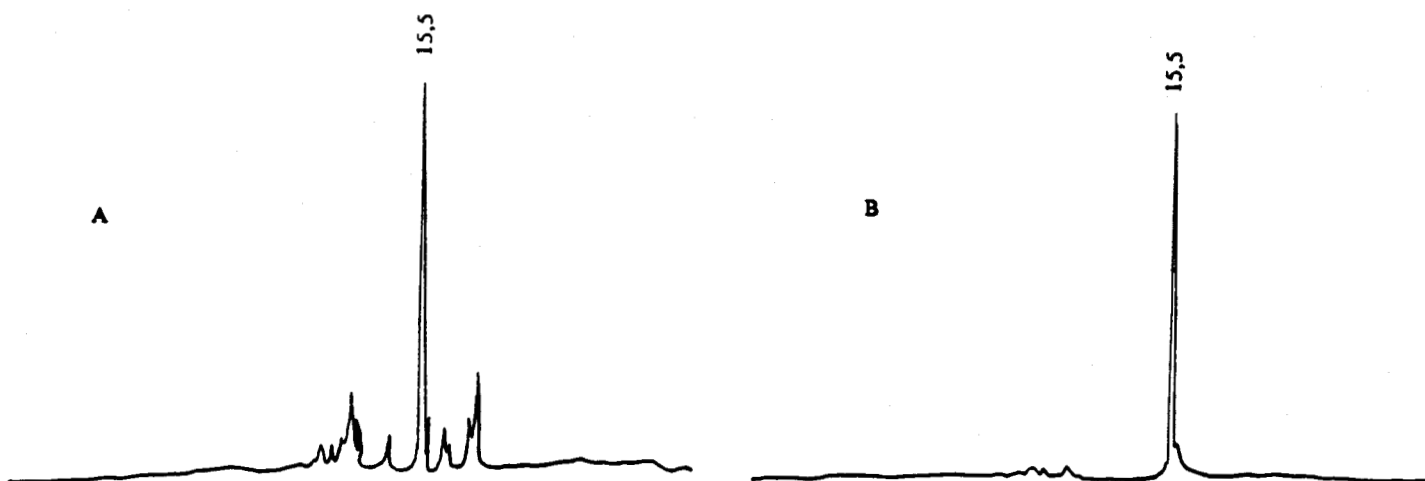
HPLC de : A) brut de DEXA-T8  
B) DEXA-T8 pur



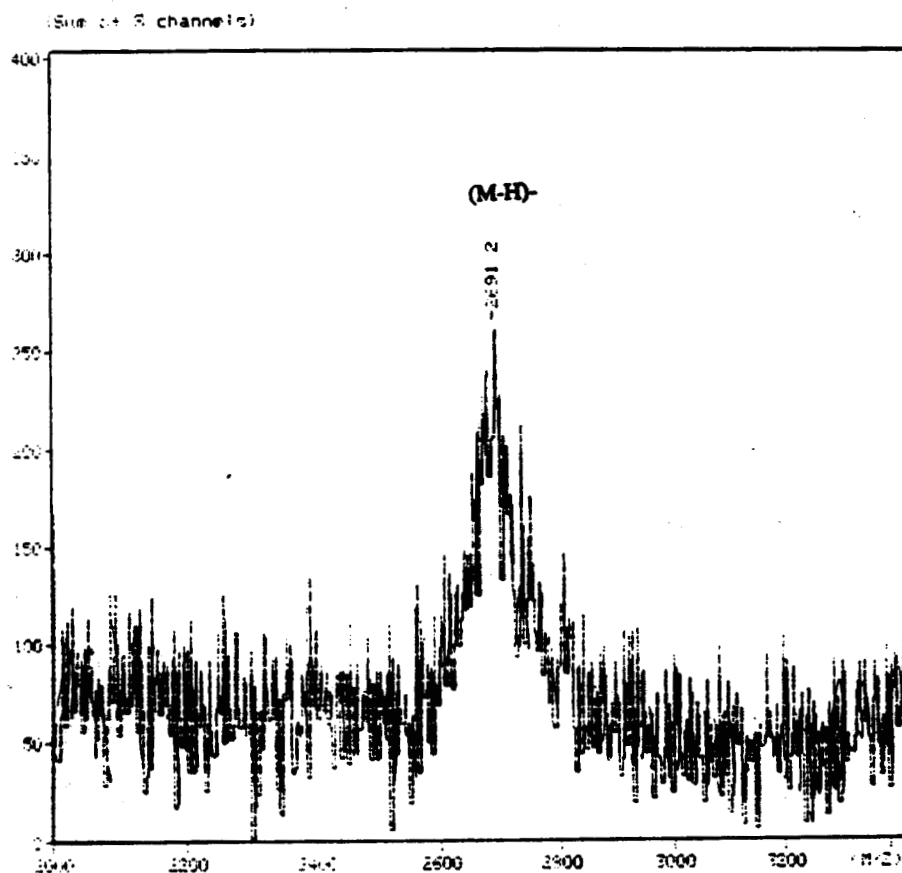
**Spectre de masse TOF de DEXA-T8**

(M-H)- : M. M. théorique : 2901. ( observée : 2908,0)

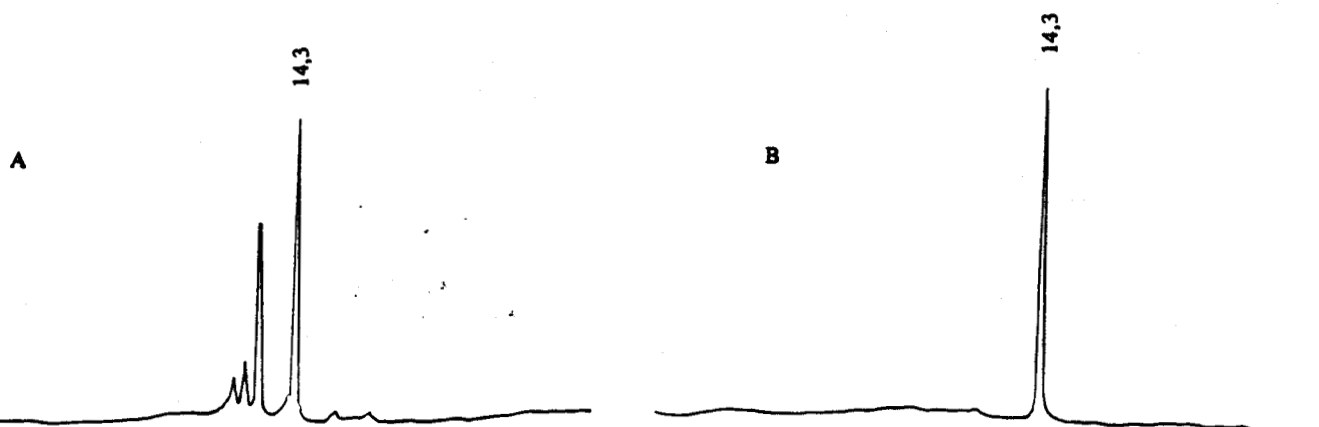
(Z7)- : M. M. théorique : 2598. ( observée : 2600,6)



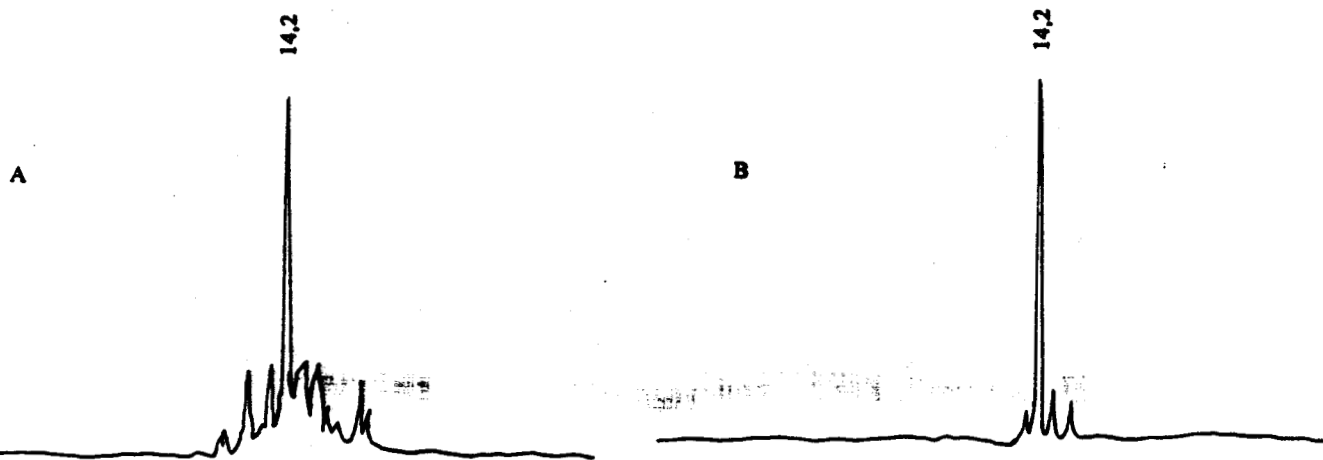
HPLC de : A) brut de ANTHRA-8 Mère  
 B) ANTHRA-8 Mère pur



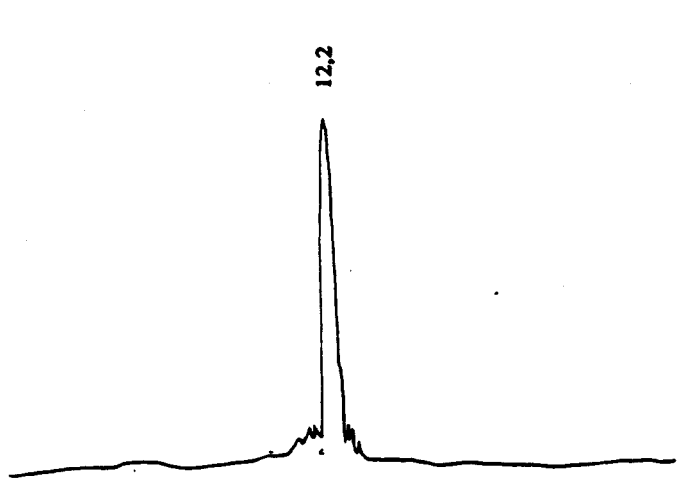
Spectre de masse TOF de ANTHRA-8 Mère  
 (M-H)- : M. M. théorique : 2688. ( observée : 2691,2)



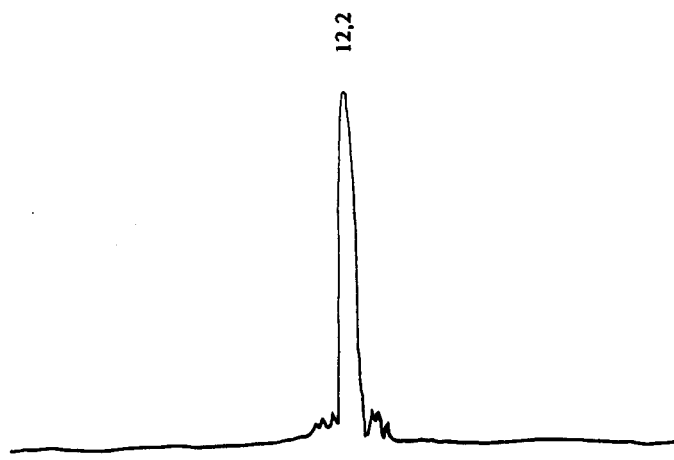
HPLC de : A) brut de FLUO-T8  
B) FLUO-T8 pur



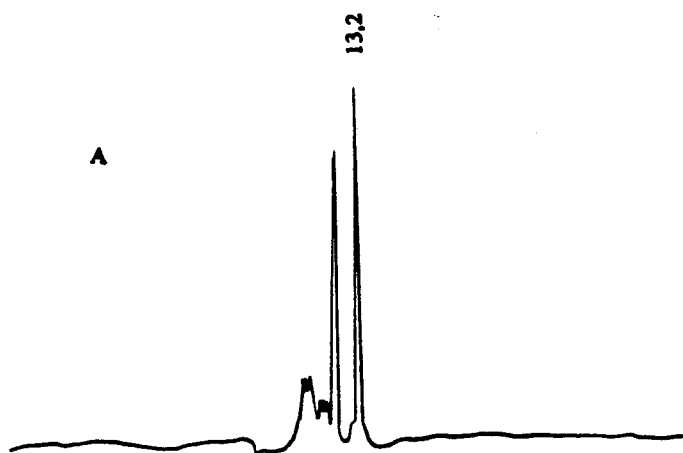
HPLC de : A) brut de FLUO-8 Merc  
B) FLUO-8 Merc pur



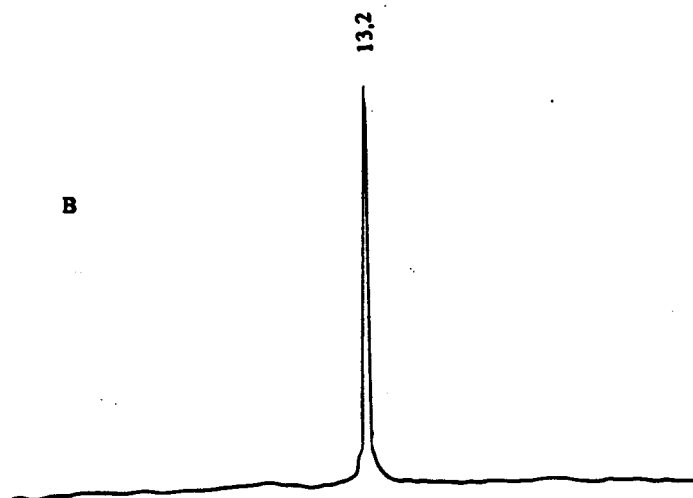
HPLC de : A) brut de HO-20 Mère



HPLC de : A) brut de NH<sub>2</sub>-20 Mère

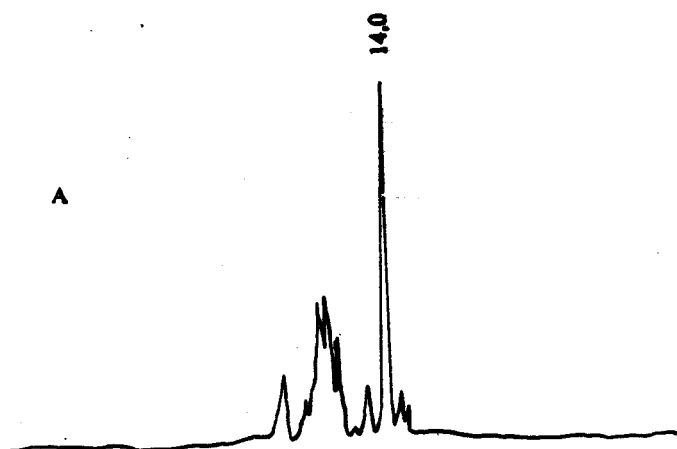


A

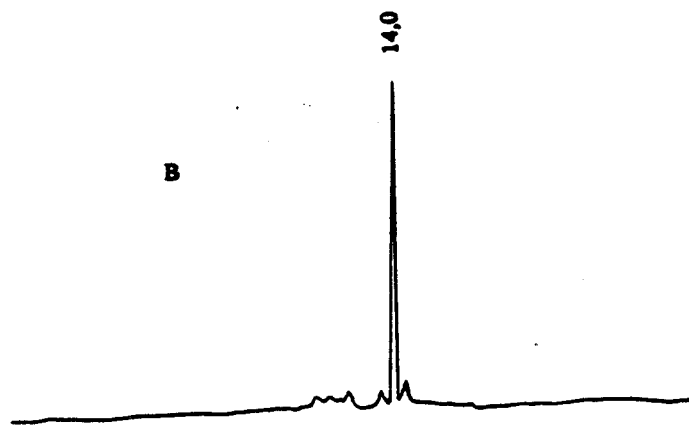


B

HPLC de : A) brut de BIOTINE-20 Mère  
B) BIOTINE-20 Mère pur

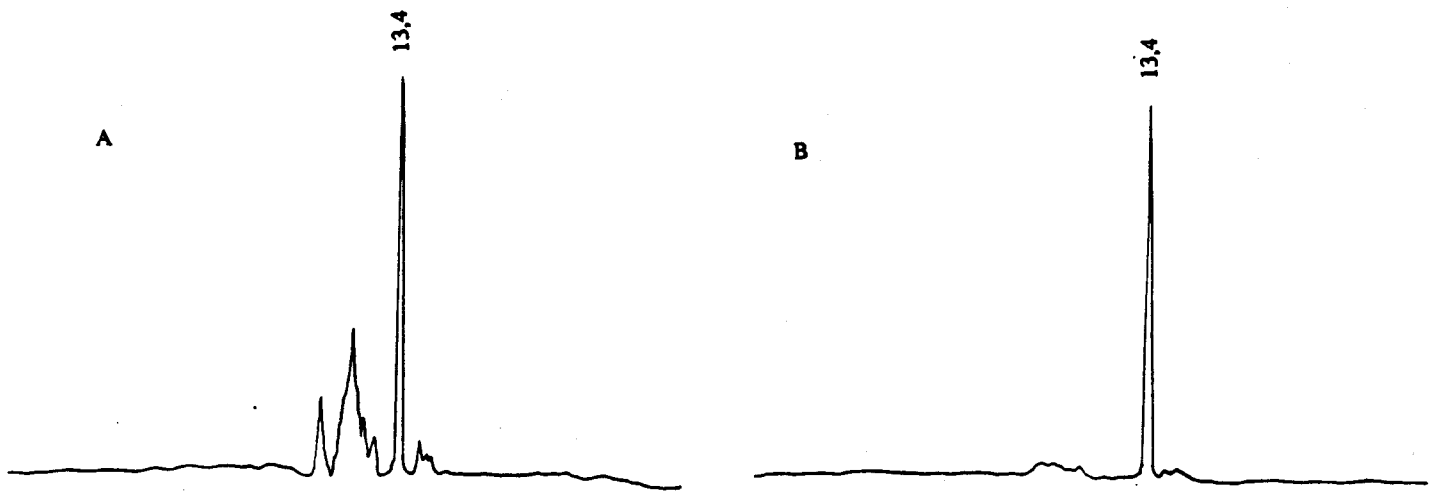


A

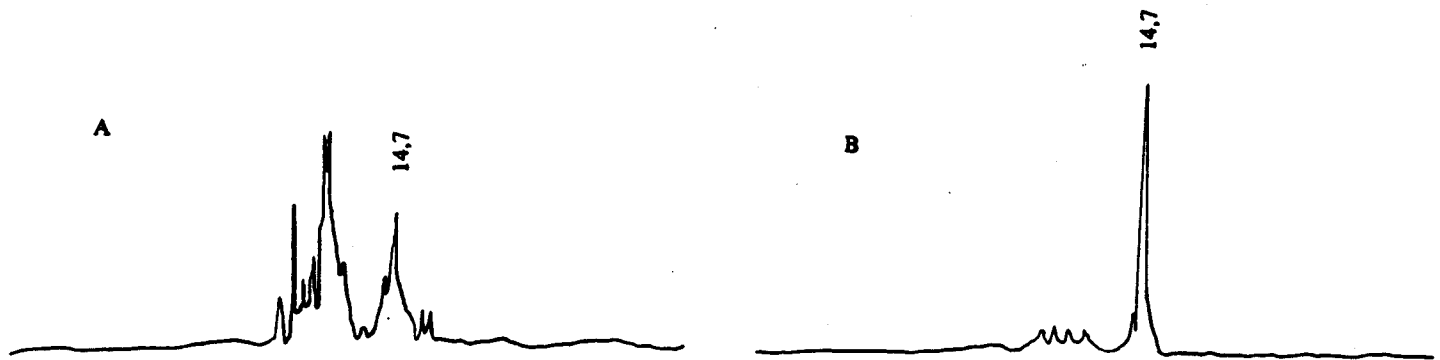


B

HPLC de : A) brut de ANTHRA-20 Mère  
B) ANTHRA-20 Mère pur



HPLC de : A) brut de FLUO-20 Mère  
B) FLUO-20 Mère pur



HPLC de : A) brut de DEXA-20 Mère  
B) DEXA-20 Mère pur

## B) PARTIE MOLECULES ORGANIQUES

### 1) MOLECULES DERIVEES DE LA LYSINE

#### 1.1. Introduction

Les systèmes solvants utilisés pour les dérivés de la lysine sont :

Système A : (hexane, acétate d'éthyle) (7/3)

Système B : (Isopropanol, H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>OH) (90/ 10/ 10 )

La présence des groupes Trityles, Monométhoxytrityles, et Diméthoxytrityles sur un composé est mise en évidence en vaporisant une solution de TCA 50% dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sur la couche mince : on constate alors les effets suivants :

Composé avec groupe Tr --> Coloration jaune

Composé avec groupe MMTr --> Coloration jaune-orangée

Composé avec groupe DMTr --> Coloration orange

#### 1.2. Sel de diparatoluène sulfonate de lysinate de méthyle

A une suspension de 2,045 g (0,04 mmole) de monochlorhydrate de lysine dans 100 ml de méthanol, on ajoute l'acide paratoluène sulfonique monohydraté, la solution est portée à reflux pendant 24 heures. L'évaporation du solvant, et la trituration du résidu permet l'obtention de cristaux blancs filtrés et lavé par de l'éther éthylique.

On obtient 5,155 g soit 91% de rendement.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>21</sub> H<sub>32</sub> N<sub>2</sub> O<sub>8</sub> S<sub>2</sub>

Masse moléculaire: 504,6 (molécule sans sel : 160,2)

Point de fusion: 148 °C

Spectre de masse TOF: 160 (M+H)<sup>+</sup>

Spectre de masse FAB: 160 (M+H)<sup>+</sup>

Microanalyse: Calculée C 49,98 ; H 6,39 ; N 5,53 ; S 12,71

Trouvée C 48,77 ; H 6,35 ; N 5,58 ; S 11,92

RMN du H (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  (ppm) : 1,6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH); 1,8 (m, 2H, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1,9 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH); 2,4 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-aromatique); 3,0 (t, 2H, NH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 3,9(s, 3H, CH<sub>3</sub>-O); 4,2 (t, 1H, CH), 7,4-7,8 (2d, 8H, aromatique).

### 1.3. N $\alpha$ , N $\epsilon$ , ditrityl lysinate de méthyle

A une suspension de 3,9 g (7,7 mmoles) de di-paratoluène sulfonate de lysinate de méthyle dans 100 ml de chloroforme refroidi à 0°C, on ajoute 8,05 ml (46,1 mmoles) de diisopropylamine et 5,351 (19,25 mmoles) de chlorure de trityle.

Après deux heures d'agitation à température ambiante, la solution chloroformique est lavée à l'eau, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée à sec sous vide. Le résidu est cristallisé en éther-méthanol. Masse obtenue 4,242 g soit 45% de rendement.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>45</sub> H<sub>44</sub> N<sub>2</sub> O<sub>2</sub>

Masse moléculaire: 644,8

Point de fusion: 69-72 °C

Rf A : 0,5

### 1.4. N $\alpha$ , N $\epsilon$ , ditrityl lysine (sel de diéthylamine)

On dissout à reflux 3,2 g (5 mmoles) de N $\alpha$ , N $\epsilon$ -ditrityl-lysinate de méthyle dans 25ml de propylène-glycol et 50 ml de xylène, et on ajoute 20 ml de potasse à 20% dans le propylène-glycol et 5ml de xylène. On chauffe encore 5 minutes à ébullition pour éliminer le xylène, on ajoute 100 cm<sup>3</sup> d'eau glacée, on refroidit à 0°C, et on neutralise par l'acide acétique (pH = 7). On extrait au chloroforme, après lavage et séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de la phase organique on ajoute 2ml de



diéthylamine. Après évaporation du solvant, le résidu est repris par 30 ml d'éther et recristallisé en acétone : masse obtenue 2,347 g soit 75% de rendement.

Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>48</sub> H<sub>53</sub> N<sub>3</sub> O<sub>2</sub>

Masse moléculaire: 630

Point de fusion: 152 ° C (littérature 150 ° C)

Rf B : 0,7

1.5. Di-N $\alpha$ . N $\epsilon$ . -Monométhoxytrityl lysinate de méthyle

A une suspension de 458 g (0,91 mmol) de diparatoluène sulfonate de lysinate de méthyl dans 20 ml de chloroforme refroidi à 0°C, on ajoute 95,2  $\mu$ l (5,46 mmoles) de DIPEA et 700 mg (2,27 mmoles) de chlorure de monométhoxytrityle. Après deux heures d'agitation à température ambiante, la solution organique est lavée par 50 ml d'une solution à 5% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La phase organique est ensuite concentrée et purifiée sur couches épaisses de silice mélange éluant (Ether de pétrole, Acétate d'éthyle, diisopropyléthylamine) (8; 2; 0, 5).

Le produit est extrait de la silice par l'acétone. Après évaporation du solvant on récupère 352 mg soit 55 % de rendement.

Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>47</sub> H<sub>48</sub> N<sub>2</sub> O<sub>4</sub>

Masse moléculaire: 704,9

Point de fusion: 95 ° C

Rf A : 0,4

Spectre de masse TOF: 704 (M+H)<sup>+</sup>

1.6. Di-N $\alpha$ . N $\epsilon$ -di-monométhoxytrityl lysine (sel de potassium)

300 mg (0,43 mmole) de  $N\alpha, N\epsilon$ -di-monométhoxytrityl lysinate de méthyle sont dissous dans 5ml de THF, on ajoute ensuite 954 mg (8,6 mmoles) de tertiobutylate de potassium. En 4 heures de réaction, le contrôle chromatographie sur couche mince montre la disparition de l'ester ( $R_f$  : 0,6) pour donner le sel ( $R_f$  : 0). On ajoute 20 ml d'eau, puis on évapore le THF, le produit est extrait grâce au chloroforme (2x50ml). La phase organique est lavée avec une solution de  $Na_2CO_3$  à 5%, puis séchée sur  $Na_2SO_4$ , puis évaporée à sec. Le résidu huileux est séché une nuit sur  $P_2O_5$  : masse récupérée 163 mg, 52 % de rendement.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute:  $C_{46} H_{45} N_2 O_4$

Masse moléculaire: 690,9

Point de fusion:

$R_f$  B : 0,65

Spectre de masse TOF: 736 (M+K)+

#### 1.7. Di- $N\alpha, N\epsilon$ -diméthoxytrityl lysinate de méthyle

Reprendre le mode opératoire utilisé pour la synthèse du  $N\alpha, N\epsilon$ -di-monométhoxytrityl lysinate de méthyle. L'ester di-tritylé est obtenu avec un rendement de 52%.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute:  $C_{49} H_{52} N_2 O_6$

Masse moléculaire: 764,9

Point de fusion: 60-62 ° C

$R_f$  A : 0,3

Spectre de masse TOF: 763 (M+H)+

Spectre de masse FAB: 763 (M+H)+, 461 (M-DMTr)+, 303 (DMTr)+

Microanalyse: Calculée C 76,93 ; H 6,85 ; N 3,66

Trouvée C 74,57 ; H 6,62 ; N 3,14

RMN du H (CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) : 1,3-1,5-1,7-2,1 (m, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>); 3,7 (m, 15H, CH<sub>3</sub>OC(O), CH<sub>3</sub>-O-aromatiques); 6,7-7,3 (2m, 26H, aromatiques)

### 1.8. N $\alpha$ , N $\epsilon$ -didiméthoxytrityl lysine (Sel de potassium)

Reprendre le mode opératoire utilisé pour la synthèse du N $\alpha$ , N $\epsilon$ -dimonométhoxytrityl lysine (sel de potassium). Le sel est obtenu avec un rendement de 45%.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>48</sub> H<sub>50</sub> N<sub>2</sub> O<sub>6</sub> K

Masse moléculaire: 790 (752 forme acide)

Rf B : 0,6

Spectre de masse TOF: 778 (M+Na)+

Microanalyse: Calculée C 72,97 ; H 6,38 ; N 3,54

Trouvée C 73,84 ; H 7,06 ; N 3,15

RMN du H (CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) : 0,9-1-1,1-1,3 (4m, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>); 3,7 (s, 12H, CH<sub>3</sub>-O); 6,7-7,3 (2m, 26H, aromatiques)

### 1.9. Ester nitrophénolique de la N $\alpha$ , N $\epsilon$ -di-Boc-lysine

2g (5,8 mmoles) de di-Boc-lysine et 1,61 g (11,6 mmoles) d'orthonitrophénol sont ajoutés dans 20 ml d'acétate d'éthyle refroidi à 0°C. On ajoute 1,07 g (5,22 mmoles) de DCC, la réaction se déroule en une heure à 0°C puis une nuit à température ambiante. Le DCU est filtré, le milieu réactionnel est évaporé et repris par 50ml de chlorure de méthylène. La phase organique est lavée avec une solution d'acide citrique 5% (2x50ml), puis avec une solution de soude 0,1M (2x50 ml), puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée. On obtient 2,120 g d'ester soit 79% de rendement.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>22</sub> H<sub>33</sub> N<sub>3</sub> O<sub>8</sub>

Masse moléculaire: 467,5

Point de fusion: 71 ° C

Rf A: 0,4

Microanalyse: Calculée C 56,52 ; H 7,11 ; N 8,98

Trouvée C 58,01 ; H 7,65 ; N 9,03

RMN du H (CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) : 1,3-1,7-1,9-2,1 (m, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>); 1,4 (m, 18H, CH<sub>3</sub>); 7,3 (d, 1H, aromatique), 7,4 (t, 1H, aromatique); 7,7 (t, 1H, aromatique); 8,1 (d, 1H, aromatique)

#### 1.10. Ester fluorèneméthyle de la N $\alpha$ , N $\epsilon$ -di-Boc-lysine

1g (2,15 mmoles) d'esternitrophénolique de la N $\alpha$ , N $\epsilon$ -di-Boc lysine est agité avec 464 mg (2,3 mmoles) de fluorèneméthanol et 219 mg (3,2 mmoles) d'imidazole dans 20ml de toluène pendant une nuit. Le milieu réactionnel est évaporé et repris par 50ml de chlorure de méthylène, cette phase organique est lavée successivement par une solution acide citrique 1% (50ml), une solution d'eau (50ml), une solution à 5% de NaHCO<sub>3</sub>, puis par une solution d'eau, puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis rotovapée. Le résidu est précipité et lavé avec de l'éther éthylique. Masse obtenue 750 mg soit 66% de rendement.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>30</sub> H<sub>40</sub> N<sub>2</sub> O<sub>6</sub>

Masse moléculaire: 524,6

Point de fusion: 110 ° C

Rf A: 0,2

Spectre de masse FAB: 524 (M+H)<sup>+</sup>, 1048 (2M)<sup>+</sup>

Microanalyse: Calculée C 68,68 ; H 7,68 ; N 5,34

Trouvée C 68,50 ; H 7,71 ; N 5,31

RMN du H (CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) : 1,2-1,7 (m, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>); 1,4 (m, 18H, CH<sub>3</sub>); 4,5 (m, 2H CH<sub>2</sub>-fluorène); 7,3 (d, 2H, aromatiques), 7,4 (t, 2H, aromatiques); 7,6 (t, 2H, aromatiques); 7,8 (d, 2H, aromatiques)

### 1.11. Sel de diparatoluène sulfonate du lysinate de fluorèneméthyle

300 mg (0,57 mmole) d'ester fluorèneméthyle de la di Boc lysine sont agités dans 10 ml de chlorure de méthylène, on ajoute 3,35 ml (41mmoles) et acide trifluoroacétique.

Après 15 minutes de réaction 216 mg d'acide paratoluène sulfonique monohydraté sont additionnés.

Le solvant est chassé, le résidu est précipité, lavé par de l'éther éthylique. Masse obtenue : 210 mg soit un rendement de 55%.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>34</sub> H<sub>40</sub> N<sub>2</sub> O<sub>8</sub> S<sub>2</sub>

Masse moléculaire: 668,8 (324,2 pour la molécule sans sel)

Point de fusion: 122 ° C

Spectre de masse TOF: 325 (M+H)<sup>+</sup>

Spectre de masse FAB: 325 (M+H)<sup>+</sup>

Microanalyse: Calculée C 61,09 ; H 6,02 ; N 4,18 ; S 9,58

Trouvée C 59,90 ; H 5,98 ; N 4,40 ; S 9,34

RMN du H (D<sub>2</sub>O) : δ (ppm) : 0,8-0,9 (2m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH); 1,3 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH); 2,4 (s,6H,CH<sub>3</sub>-aromatique); 2,8 (t, 2H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>); 3,7 (t, 1H , fluorène), 4,3 (1H, CH-C(O)O), 5,1 (d, 2H,CH<sub>2</sub>-fluorène), 7,4 (d, 4H, benzénique); 7,5 (m, 4H, fluorénique); 7,6 (m, 2H, fluorénique); 7,7 (d, 4H, benzénique); 7,9 (m, 2H, fluorénique).

### 1.12. Na<sub>2</sub> Ne. di diméthoxytrityl lysinate de fluorène méthyle

177 mg (0,26 mmole) de sel de diparatoluène sulfonate de lysinate de fluorèneméthyle sont agités avec 277 µl (1,56 mmole) de diisopropyl éthyl amine et 219 mg (0,65 mmole) de chlorure de diméthoxytrityle dans 10ml de chloroforme.

Après deux heures de réaction, la phase organique est lavée par 20 ml d'une solution aqueuse 5% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Cette phase est ensuite concentrée, et purifiée sur couches

épaisses de silice. Mélange éluant (Ether de pétrole, Acétate d'éthyle, diisopropyléthylamine) (8, 2, 0, 5). Le produit est extrait à l'acétone, après évaporation on récupère 167 mg, soit un rendement de 70%.

Caractéristiques du produit

Formule brute:  $C_{62} H_{60} N_2 O_6$

Masse moléculaire: 929,2

Point de fusion: 85 °C

Rf A : 0,4

Spectre de masse TOF: 929 (M+H)+

Spectre de masse FAB: 929 (M+H)+, 303 (DMTr)+

Microanalyse: Calculée C 80,14 ; H 6,50 ; N 3,01

Trouvée C 78,85 ; H 7,18 ; N 3,67

RMN du H : ( $CDCl_3$ ) : d (ppm) : 1,4-2,1 (m, 8H,  $(CH_2)_4$ ), 3,65 (s, 12H,  $CH_3-O$ ); 6,7 (m, 8H, benzénique); 7,0-7,5 (m, 24H, benzénique et fluorénique), 7,7 (d, 2H, fluorénique)

1.13. N $\alpha$ , N $\epsilon$ -di-diméthoxytrityl-lysine (sel de diéthylamine)

100mg (0,12 mmole) de N $\alpha$ , N $\epsilon$ -di-diméthoxytrityl-lysinate de fluoréneméthyle sont agités dans 5ml de chloroforme. On ajoute 454  $\mu$ l (4,4 mmoles) de diéthylamine.

Le suivi de la réaction par ccm montre la disparition de l'ester pour donner le dibenzofulène (Rf<sub>A</sub> : 0,9) et du sel (Rf<sub>A</sub> : 0). La phase chloroformique est lavée avec une solution de carbonate de sodium à 5%, puis séchée sur sulfate de sodium, et évaporée. Le résidu huileux est trituré avec de l'éther éthylique pour éliminer un maximum de dibenzofulène. Masse d'huile obtenue 70mg soit un rendement de 77%.

Caractéristiques du produit

Formule brute:  $C_{52} H_{62} N_3 O_6$

Masse moléculaire: 825,1 (750 pour la molécule sous forme acide)

Point de fusion:

Spectre de masse TOF: 796 (M+K)+, 1569 (2M+DEA)+

## 2) *SYNTHESE DU D4T*

Dans les chromatographies sur couche mince deux systèmes solvants ont été utilisés :

Système C : (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - Acétate d'éthyle - Triéthylamine) (45 - 45 - 10)

Système D : (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH) (9 - 1)

La présence des composés tritylés est mise en évidence par une coloration jaune après vaporisation d'acide TCA 50% dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Le D4T donne une coloration marron après vaporisation d'une solution d'acide perchlorique à 20%, puis par chauffage prolongé sous un sèche-cheveux.

### 2.1. Première méthode

#### 2.1.1. 5'-O-Trityl-thymidine

4,840 (20 mmoles) de thymidine sont dissous dans 50ml de pyridine contenant 6,67 g (24mmoles) de chlorure de trityle, et portés à ébullition pendant 45 minutes.

Après avoir refroidi la solution, celle-ci est plongée dans 1 litre d'eau glacée, après 30 minutes d'agitation, le précipité est filtré et lavé avec de l'eau. La purification sur colonne de silice, le mélange éluant (chlorure de méthylène - acétate d'éthyle - triéthylamine) (45 - 45 - 10) donne 5,619 g soit 58% de rendement.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>29</sub> H<sub>28</sub> N<sub>2</sub> O<sub>5</sub>

Masse moléculaire: 484,5

Point de fusion : 110-112 ° C

Rf C : 0,5

### 2.1.2. 5'-O-trityl-3'-O-mésyl-thymidine

1,115ml (14,3 mmoles) de chlorure de mésyle sont additionnés lentement à une solution de 5,4 g (11mmoles) de 5'-O-trityl thymidine dans 18ml de pyridine à 0°C. Le milieu réactionnel est agité une nuit à 4°C, puis versé dans 800ml d'eau glacée. Le produit est filtré et lavé deux fois avec 100ml d'eau glacée. La purification par chromatographie sur colonne de silice. Mélange éluant (chlorure de méthylène - Acétate d'éthyle - Triéthylamine) (45 - 45 - 10) donne 3,292 g de produit soit 53% de rendement.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>30</sub> H<sub>30</sub> N<sub>2</sub> O<sub>8</sub> S

Masse moléculaire: 578,6

Point de fusion : Pas de point de fusion défini (conforme à la littérature)

Rf C : 0,75

### 2.1.3. 5'-O-trityl-2'-3'-didésoxy-2'-3'-dédihydro-thymidine

Une solution d'1,477 g (12,7 mmoles) de tertibutylate de potassium et 3,11 g (5,5 mmoles) de 5'-O-trityl-3'-O-mésyl thymidine dans 20 ml de DMSO est agité pendant 45 minutes. La solution est ensuite plongée dans 400ml d'eau glacée, neutralisée par l'acide acétique (pH = 7), le produit gélatineux est filtré et lavé avec de l'eau glacée (2 fois 100ml). La purification par chromatographie sur colonne de silice mélange éluant (chlorure de méthylène, acétate d'éthyle, triéthylamine) (45, 45, 10) donne 1,153 g (R : 45%).

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>29</sub> H<sub>26</sub> N<sub>2</sub> O<sub>5</sub>

Masse moléculaire: 482,5

Point de fusion : 92-104 ° C (littérature 92-109 ° C)

Rf C : 0,8

### 2.1.4. 2'-3'-didésoxy-2'.3'-dédihydro-thymidine



Une solution de 950 mg (2 mmoles) de 5'-O-trityl-2'3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidine dans 10 ml d'acide acétique à 80% est portée à reflux pendant 6 minutes. Le solvant est éliminé sous pression réduite, le résidu est purifié sur couches épaisses de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH) (9, 1). Après extraction à l'acétone et au méthanol on obtient 90 mg soit 20 % de rendement.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>10</sub> H<sub>12</sub> N<sub>2</sub> O<sub>4</sub>

Masse moléculaire: 224,2

Point de fusion : 164 ° C (littérature 165 -166 ° C)

Rf C : 0,3 ; Rf D : 0,5

Spectre de masse FAB : 223 (M-H)-

RMN du H : ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) : δ (ppm) : 1,75 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 3,6 (m, 2H, 5'-H); 4,8 (m, 1H,4'-H); 5,9 (m, 1H,3'-H, vinyle); 6,4 (m, 1H, 2'-H, vinyle), 6,85 (m, 1H, 1'-H); 7,65 (s, 1H, 6-H).

### 2.2. Modification de la première méthode

#### 2.2.1. 5'-O-Monométhoxy-trityl-thymidine

4,84 g (20 mmoles) de thymidine et 7,392 (24 mmoles) de chlorure de diméthoxytrityle sont dissous dans 50 ml de pyridine anhydre. La solution est portée à reflux pendant 45 minutes. Après évaporation du solvant, l'huile obtenue est reprise par 100ml de chlorure de méthylène puis lavée avec Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1M (2 fois 100ml), une solution saturée de NaCl, la phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis concentrée. La purification par chromatographie sur colonne de silice mélange éluant (chlorure de méthylène, acétate d'éthyle, triéthylamine) (45, 45, 10) permet l'obtention de 7,781 g de produit soit 63% de rendement.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>30</sub> H<sub>30</sub> N<sub>2</sub> O<sub>6</sub>

Masse moléculaire: 514,6

Point de fusion : 75-80 ° C

Rf C : 0,45

Spectre de masse FAB : 513 (M-H)-

### 2.2.2. 5'-O-monométhoxytrityl-3'-O-mésyl-thymidine

470 ml (18,85 mmoles) de chlorure de mésyle sont additionnés lentement à une solution de 7,5 g (14,5 mmoles) de 5'-O-monométhoxytrityl thymidine dans 20ml de pyridine à 0°C. Le milieu réactionnel est agité une nuit à 4°C. Après évaporation du solvant, l'huile obtenue est reprise par 100ml de chlorure de méthylène puis lavée avec Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 fois 100ml), et une solution saturée de NaCl, puis concentrée. La purification par chromatographie sur colonne de silice : mélange éluant (chlorure de méthylène, acétate d'éthyle, triéthylamine) (45, 45, 10) permet l'obtention de 1,373 g de produit, rendement 16%).

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>31</sub> H<sub>32</sub> N<sub>2</sub> O<sub>8</sub> S

Masse moléculaire: 592,7

Point de fusion : 95 ° C

Rf C : 0,7

Spectre de masse FAB : 592 (M+H)+, 273 (MMTr)+

### 2.2.3. 5'-O-monométhoxy-trityl-2'-3'-didésoxy -2'-3'- didéhydro-thymidine

Le produit est obtenu dans les mêmes conditions que le 5'-O-trityl-2'-3'-didésoxy -2'-3'-didéhydro-thymidine Rendement 62%

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>30</sub> H<sub>28</sub> N<sub>2</sub> O<sub>5</sub>

Masse moléculaire: 496,2

Point de fusion : 97 ° C

Rf C : 0,75

Spectre de masse FAB : 497 (M+H)<sup>+</sup>

#### 2.2.4. 2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidine

4,08 mg (0,82 mmoles) de 5'-O-monométhoxytrityl-2'-3'-didésoxy-2'-3'-didéhydro-Thymidine sont agités dans 16,4ml d'une solution 0,1 M d'acide dichloroacétique dans le chlorure de méthylène pendant 30 minutes. Le milieu réactionnel est purifié sur couches épaisses de silice, Mélange éluant (chlorure de méthylène, MeOH) (9, 1) le D4T est extrait avec de l'acétone, et du méthanol : masse récupérée 120 mg rendement 65%.

### 2.3. Deuxième méthode

#### 2.3.1. 5'-O-3'-O-Dimésyl-thymidine

A une solution de 5,4 g (22 mmoles) de thymidine dans 40 ml de pyridine, refroidie à 0°C, on ajoute lentement 6,778 ml (88 mmoles) de chlorure de mésyle. Le milieu réactionnel est agité une nuit à 4°C, puis plongé dans 100ml d'eau glacée, le précipité est filtré et lavé avec de l'eau froide, puis séché sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Masse obtenue 7,8 g soit 89 % de rendement.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>12</sub> H<sub>18</sub> N<sub>2</sub> O<sub>9</sub> S<sub>1</sub>

Masse moléculaire: 398,7

Point de fusion : 169 ° C (littérature 169-171 ° C)

Rf D : 0,3

#### 2.3.2. 1-(3', 5'-anhydro-2-désoxy-β-D-thréo-pentofuranosyl) thymidine

A une solution de 1,61 g (40mmoles) de soude dans 35ml d'eau on ajoute 2,35 g (13 mmoles) du 5'-O-3'-O-di-Mésyl thymidine, puis on porte à reflux pendant 45 minutes. La solution orange est refroidie, puis neutralisée par HCl concentré (pH = 7). Le milieu réactionnel est concentré de moitié

par évaporation du solvant, puis mis sous agitation à 0°C pendant deux heures. Le précipité est filtré et lavé avec de l'eau froide. Le filtrat est concentré, jusqu'à 10ml, puis agité deux heures à 0°C. Le nouveau précipité est filtré et lavé avec de l'eau froide. Les deux portions réunies sont séchées sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, masse obtenue 2,119 g soit un rendement de 70%.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>10</sub> H<sub>12</sub> N<sub>2</sub> O<sub>4</sub>

Masse moléculaire: 224,2

Point de fusion : 190 ° C (littérature 190-193 ° C)

Rf D : 0,6

#### 2.3.3. 2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidine

500mg (2,2 mmoles) d'1-(3', 5'-anhydro-2-désoxy-β-D-threo-pentofuranosyl) thymidine sont dissous dans 30ml de THF, on ajoute 1,250 g (11 mmoles) de tertiobutylate de potassium, après 10 minutes de réaction on ajoute 510μl (8,8 mmoles) d'acide acétique. Le solvant est évaporé, le résidu est repris plusieurs fois par du méthanol pour être déposé sur couche épaisse de silice. La migration s'effectue avec le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 9/1 comme mélange éluant. Le produit est extrait au méthanol et à l'acétone à chaud. Masse obtenue 272 mg soit 55 % de rendement.

### **3) SYNTHÈSE DES DERIVES PHOSPHO-TRI ET DI-ESTERS DU D4T**

Dans les chromatographies sur couche mince deux systèmes solvants ont été utilisés :

Système D : (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH) (9 - 1)

Système E : (Isopropanol-ammoniac-eau) (85-5-10)

#### **3.1. 1-(hexadécyl)-5'-(2'-3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidinyl)-2-cyanoéthoxy phosphotri-ester.**

106 mg (0,44 mmole) de 1 hexadécanol sont dissous dans 3 ml de chloroforme, on ajoute sous atmosphère d'azote 38 mg (0,22 mmole) de tétrazolate de diisopropyl ammonium et 171  $\mu$ l (0,54 mmol) de 2-Cyanoéthoxy N,N,N',N'-tétraisopropyl phosphorodiamidite. Après quatre heures d'agitation, on ajoute 10 ml d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, et on extrait plusieurs fois avec du chloroforme. La phase organique est séchée sur NaSO<sub>4</sub>, évaporée, et le résidu est séché une nuit sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Le résidu précédent est dissous dans 3ml de THF, on ajoute sous atmosphère d'azote 100mg (0,44 mmole) de D4T et 31 mg (0,44 mmole de tétrazole). Après quatre heures de réaction, une solution de 111 mg (0,44 mmole) d'iode dans 3ml de THF-H<sub>2</sub>O (2 : 1) est additionnée. La purification sur couche épaisse de silice CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH (95 : 5), et l'extraction par l'acétone et le chlorure de méthylène donne 28mg d'un résidu huileux (11%).

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>29</sub> H<sub>48</sub> N<sub>3</sub> O<sub>7</sub> P

Masse moléculaire: 581,7

Rf D : 0,6

Spectre de masse FAB : 580 (M-H)-, 527 (M-CN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)-

RMN du H : (CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) : 0,9 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-C); 1,25 (m, 26H, (CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>); 1,7 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-O-P); 1,95 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 2,75 (t, 2H, CN-CH<sub>2</sub>) ;4,1-4,3 (2d, 2H, 5'-H); 4,35 (m,2H,CN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 4,8 (m, 1H,4'-H); 5,9 (m, 1H, 3'-H, vinyle); 6,35 (m, 1H, 2'-H, vinyle), 7,0 (m, 1H, 1'-H); 7,3 (s, 1H, 6-H); 8,5 (s, 1H, 3-H).

#### 3.2. Sel d'ammonium du 1-(hexadécyl)-5'(2', 3'-didésoxy-2', 3'-didéhydro-thymidinyl) monophosphate.

28 mg 1-(hexadécyl)-5'(2', 3'-didésoxy-2', 3'-didéhydro-thymidinyl) de sont agités une nuit dans 5ml d'une solution ammoniacale à 25%. La purification est réalisée sur couche épaisse de silice Isopropanol - NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O (85 - 5 - 10). L'extraction au méthanol et à l'acétone donne 7mg d'un résidu huileux, soit un rendement de 27%.

Caractéristiques du produitFormule brute: C<sub>26</sub> H<sub>48</sub> N<sub>3</sub> O<sub>7</sub> P

Masse moléculaire: 545,6 (528,6 si contre ion = H)

Rf E : 0,5

Spectre de masse FAB : 527 (M-H)-

RMN du H : ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) : δ (ppm) : 0,9 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-C); 1,25 (m, 26H, (CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>); 1,8 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 3,6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-O-P); 3,75-3,85 (2m, 2H, 5'-H); 4,9 (m, 1H, 4'-H); 5,85 (m, 1H, 3'-H, vinyle); 6,45 (m, 1H, 2'-H, vinyle), 6,8 (m, 1H, 1'-H); 7,75 (s, 1H, 6-H).

RMN du P : ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) : δ (ppm) : -0,35Microanalyse: Pour C<sub>26</sub> H<sub>48</sub> N<sub>3</sub> O<sub>7</sub> P, 6 H<sub>2</sub>O

Calculée C 47,77 ; H 9,12 ; N 6,49 ; P 4,78

Trouvée C 46,54 ; H 8,04 ; N 6,42 ; P 4,47

3.3. 3-(2'-hydroxyéthoxy-cholestène)-5'-(2', 3'- didésoxy-2', 3'- dédihydro-thymidinyl)-2-cyanoéthoxy- phosphotriester.

192 mg (0,44 mmole) de 3-(2'-hydroxyéthoxy-cholestène) sont dissous dans 3ml de chloroforme, on ajoute sous atmosphère d'azote 38 mg (0,22 mmole) de tétrazolate de diisopropylammonium et 172 µl (0,54 mmole) de 2 cyanoéthoxy-N,N,N',N'-tétraisopropyl phosphorodiamidite. Après 4 heures d'agitation, on ajoute 10ml d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> et on extrait plusieurs fois au chloroforme. La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, évaporée et le résidu est séché une nuit sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Le résidu précédent est dissous dans 3ml de THF, on ajoute sous atmosphère d'azote 100mg (0,44 mmole) d'iode dans 3ml de THF-H<sub>2</sub>O (2 : 1) .

La purification sur couche épaisse de silice CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH (95-5) et l'extraction par l'acétone et le chlorure de méthylène donnent 25mg d'un résidu huileux (7%).

Caractéristiques du produitFormule brute: C<sub>42</sub> H<sub>64</sub> N<sub>3</sub> O<sub>8</sub> P

Masse moléculaire: 769,9

Rf D : 0,65

Spectre de masse TOF : 794 (M+Na)+

Spectre de masse FAB : 792 (M+Na)+

3.4. Sel d'ammonium du 3-(2'-hydroxyéthoxy-cholestène)-5'-(2', 3'-didésoxy-2', 3'-didéhydro-thymidiny)- mono phosphate.

25 mg du 3-(2'-hydroxyéthoxy-cholestène)-5'-(2', 3'-didésoxy-2', 3'-didéhydro-thymidiny)-2-cyanoethoxy-phosphatriester sont agités une nuit dans 5ml d'une solution ammoniacale à 25%. La purification est réalisée sur couche épaisse de silice Isopropanol - NH<sub>4</sub>OH - H<sub>2</sub>O (85 - 5 - 10) l'extraction au méthanol et à l'acétone donne 11 mg d'un résidu obtenu sous forme d'huile (46%).

Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>39</sub> H<sub>64</sub> N<sub>3</sub> O<sub>8</sub> P

Masse moléculaire: 733,9 ( 716,9 si contre-ion = H)

Rf E : 0,45

Spectre de masse TOF : 741 ( M+Na)+

Spectre de masse FAB : 739 ( M+Na)+

RMN du H : ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) : δ (ppm) : 0,65 (s,3H, 18''-H<sub>3</sub>); 0,85 (m, 6H, 26''-H, 27''-H);

0,9 (d, 3H, 21''-H); 1,0 (s, 3H, 19''-H); 1,85 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 3,65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-O-P);

3,75-3,85 (2m, 2H, 5'-H); 4,85 (m, 1H,4'-H); 5,3 (m, 1H, 6''-H, vinyle); 5,9 (m, 1H, 3'-H,vinyle); 6,4 (m, 1H, 2'-H, vinyle); 6,8 (m, 1H, 1'-H); 7,75 (s, 1H, 6-H).

RMN du P : ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) : δ (ppm) : -0,31

Microanalyse: Pour C<sub>39</sub> H<sub>64</sub> N<sub>3</sub> O<sub>8</sub> P , 3H<sub>2</sub>O

Calculée C 59,46 ; H 8,81 ; N 5,38 ; P 3,98

Trouvée C 57,03 ; H 8,56 ; N 6,57; P 4,43

### 3.5. Bis 5', 5'-(2', 3'-didesoxy-2', 3'-didéhydro-thymidiny)-2-cyanoéthoxy phosphotriester

200 mg (0,88 mmole) de D4T sont dissous dans 10 ml d'acétonitrile anhydre. On ajoute sous atmosphère d'azote 133  $\mu$ l (0,42 mmole) de 2 cyanoéthoxy-N,N,N',N',-tétraisopropyl phosphorodiamidite, et 62 mg (0,88 mmole) de tétrazole. Après 10 minutes de réaction, une solution de 22 mg (0,88 mmole) d'iode dans 3ml de THF - H<sub>2</sub>O (2 - 1) est additionnée. Le milieu réactionnel est concentré et purifié par chromatographie sur couche épaisse de silice CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH (95 - 5), l'extraction au méthanol donne 82mg (17%).

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>23</sub> H<sub>26</sub> N<sub>5</sub> O<sub>10</sub> P

Masse moléculaire: 563,4

Point de fusion : 100-110 ° C

Rf D : 0,4

Spectre de masse FAB : 564 (M+H)<sup>+</sup>, 586 (M+Na)<sup>+</sup>

RMN du H : (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO:  $\delta$  (ppm) : 1,9 (s, 6H, 5-CH<sub>3</sub>); 2,8 (t, 4H, CN-CH<sub>2</sub>); 4,2 (m, 6H, CN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, 5'-H); 4,9 (m, 2H, 4'-H); 5,9 (m, 2H, 3'-H, vinyle); 6,35 (m, 2H, 2'-H, vinyle), 6,85 (m, 2H, 1'-H); 7,25 (s, 2H, 6-H); 9,0 (s, 2H, 3-H)

### 3.6. Sel d'ammonium du Bis 5', 5'-(2', 3'-didesoxy-2', 3'-didéhydro-thymidiny)-2-cyanoéthoxy phosphotriester

50 mg (0,094mmole) de 5', 5'-(2', 3'-didesoxy-2', 3'-didéhydro-thymidiny)-2-cyanoéthoxy-phosphotriester sont agités une nuit dans 5ml d'une solution ammoniacale à 58%. La purification est réalisée sur couche épaisse de silice Isopropanol - NH<sub>4</sub>OH- H<sub>2</sub>O (85 - 5 - 10), l'extraction au méthanol et à l'acétone donne 12 mg soit 25 % de rendement.

#### Caractéristiques du produit



Formule brute: C<sub>20</sub> H<sub>26</sub> N<sub>5</sub> O<sub>10</sub> P

Masse moléculaire: 527,4 (510,4 si contre-ion =H)

Point de fusion :

Rf E : 0,5

Spectre de masse FAB : 509 (M-H)-, 303 (M-D4T)-

RMN du H : (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO: δ (ppm) : 1,85 (s, 6H, 5-CH<sub>3</sub>); 3,7-3,85 (2m, 4H, 5'-H); 4,8 (m, 2H, 4'-H); 5,85 (m, 2H, 3'-H, vinyle); 6,35 (m, 2H, 2'-H, vinyle), 6,80 (m, 2H, 1'-H); 7,65 (s, 2H, 6-H).

RMN du P : ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) : δ (ppm) : -0,74

Microanalyse: Pour C<sub>20</sub> H<sub>26</sub> N<sub>5</sub> O<sub>10</sub> P, H<sub>2</sub>O

Calculée C 44,02 ; H 5,16 ; N 12,82 ; P 5,61

Trouvée C 45,14 ; H 5,61 ; N 9,79 ; P 4,88

#### 4) *SYNTHESE DES DERIVES ESTERS DU D4T*

##### 4.1. Procédé général pour l'estérification du D4T

La DCC (2,4 équivalents) est additionnée à une solution de D4T (1 équivalent), de DMAP (1,5 équivalent) et d'acide approprié (2,2 équivalents) dans de l'acétate d'éthyle (100 ml/ g de D4T). L'évolution de la réaction est suivie par CCM, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH (9 - 1). Quand la réaction est totale (1 ou 2 jours), la DCU est filtrée. Le filtrat est concentré sous pression réduite, et purifié par chromatographie sur plaque de silice : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH (95 - 5) rendement 40 - 60 %.

##### 4.2. Palmitate de 5'-(2', 3'-disésoxy - 2', 3'-didéhydro - thymidinyle).

###### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>26</sub> H<sub>42</sub> N<sub>2</sub> O<sub>5</sub>

Masse moléculaire: 462,6

Point de fusion : 75 ° C

Rf D : 0,74

Spectre de masse TOF : 463 (M+H)+

Spectre de masse FAB : 463 (M+H)+

Microanalyse: Calculée C 67,50 ; H 9,15 ; N 6,05

Trouvée C 67,31 ; H 9,02 ; N 5,88

RMN du H : (CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) : 0,85 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-C); 1,2 (m, 24H, (CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>); 1,6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)O); 1,95 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 2,3 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-C(O)O); 4,15-4,4 (2d, 2H, 5'-H); 5,05 (m, 1H, 4'-H); 5,9 (m, 1H, 3'-H, vinyle); 6,25 (m, 1H, 2'-H, vinyle), 6,95 (m, 1H, 1'-H); 7,25 (s, 1H, 6-H); 8,2 (s, 1H, 3-H).

4.3. 3β-(2'-carboxyméthoxy-cholest-5-ène)-5'-(2', 3'-disésoxy - 2', 3'-didéhydro - thymidinyle).

Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>39</sub> H<sub>58</sub> N<sub>2</sub> O<sub>6</sub>

Masse moléculaire: 674,2

Point de fusion : 185 ° C

Rf D : 0,70

Spectre de masse TOF : 692 (M+K)+

Spectre de masse FAB : 673 (M+Na)+, 689 (M+K)+

Microanalyse: Calculée C 71,97 ; H 8,98 ; N 4,30

Trouvée C 71,66 ; H 8,88 ; N 4,26

RMN du H : (CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) : 0,65(s, 3H, 18''-H); 0,85 (m, 6H, 26''-H, 27''-H); 0,9 (d, 3H, 21''-H); 1,0 (s, 3H, 19''-H); 1,95 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 4,15 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-C(O)O); 4,3-4,45(2d, 2H, 5'-H); 5,05 (m, 1H, 4'-H); 5,35 (m, 1H, 6'' -H, vinyle); 5,9 (m, 1H, 3'-H, vinyle); 6,35(m, 1H, 2'-H, vinyle), 6,95 (m, 1H, 1'-H); 7,2 (s, 1H, H); 8,25 (s, 1H, 3-H).

4.4. Linoléate de 5'-(2', 3'-disésoxy - 2', 3'-didéhydro - thymidinyle).

Caractéristiques du produitFormule brute: C<sub>28</sub> H<sub>42</sub> N<sub>2</sub> O<sub>5</sub>

Masse moléculaire: 486,7

Point de fusion : 82 ° C

Rf D : 0,74

Spectre de masse FAB : 487 (M+H)<sup>+</sup>

Microanalyse: Calculée C 69,11 ; H 8,69 ; N 5,75

Trouvée C 67,42 ; H 8,56 ; N 5,97

RMN du H : (CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) : 0,85 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-C); 1,25 (m, 14 H, CH<sub>2</sub>); 1,65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)O); 1,9 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 2,05 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH=CH-); 2,3 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-C(O)O); 2,75 (t, 2H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH); 4,15-4,4 (2d, 2H, 5'-H); 5,05 (m, 1H, 4'-H); 5,35 (m, 4H, -CH=CH-); 5,9 (m, 1H, 3'-H, vinyle); 6,25 (m, 1H, 2'-H, vinyle); 7,0 (m, 1H, 1'-H); 7,25 (s, 1H, 6-H) ; 8,55 (s, 1H, 3-H).

4.5. Linoléate de 5'-(2', 3'-disésoxy - 2', 3'-didéhydro - thymidinyle).Caractéristiques du produitFormule brute: C<sub>28</sub> H<sub>40</sub> N<sub>2</sub> O<sub>5</sub>

Masse moléculaire: 484,6

Point de fusion : 70-120 ° C

Rf D : 0,74

Spectre de masse FAB : 485 (M+H)<sup>+</sup>

Microanalyse: Calculée C 69,39 ; H 8,31 ; N 5,78

Trouvée C 68,76 ; H 8,72 ; N 6,36

RMN du H : (CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) : 0,95 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-C); 1,3 (m, 6H, CH<sub>2</sub>); 1,65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)O); 1,95 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 2,05 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH=CH-); 2,3 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-C(O)O); 2,8 (t, 4H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH); 4,2-4,4 (2d, 2H, 5'-H); 5,05 (m, 1H, 4'-H);

5,35 (m, 6H, -CH=CH-); 5,9 (m, 1H,3'-H, vinyle); 6,25 (m, 1H, 2'-H, vinyle); 7,0 (m, 1H, 1'-H); 7,25 (s, 1H, 6-H) ; 8,5 (s, 1H, 3-H).

4.6. N $\alpha$ .N $\epsilon$ -Dipalmitoyl-lysinate de 5'-(2', 3'-disésoxy - 2', 3'-didéhydro - thymidinyle).

Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>48</sub> H<sub>84</sub> N<sub>4</sub> O<sub>7</sub>

Masse moléculaire: 829,1

Point de fusion : 138 ° C

Rf D : 0,6

Spectre demasse TOF : 830 (M+H)+

Spectre de masse FAB : 829 (M+H)+

Microanalyse: Calculée C 69,52 ; H 10,21 ; N 6,75

Trouvée C 64,70 ; H 9,78 ; N 5,83

RMN du H : (CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) : 0,9 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-C); 1,2 (m, 52H, (CH<sub>2</sub>)<sub>26</sub>); 1,95 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 4,25-4,4 (2d, 2H, 5'-H); 5,05 (m, 1H,4'-H); 5,9 (2m, 2H,NH-C(O)); 6,15 (m, 1H,3'-H, vinyle); 6,3 (m, 1H, 2'-H, vinyle), 7,0 (m, 1H, 1'-H); 7,25 (s, 1H, 6-H); 8,0 (s, 1H,3- H).

4.7. N<sub>4</sub>-(7-Nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole)-aminohexanoate de 5'-(2', 3'-disésoxy - 2', 3'-didéhydro - thymidinyle).

Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>22</sub> H<sub>24</sub> N<sub>6</sub> O<sub>8</sub>

Masse moléculaire: 500,4

Point de fusion : 110 ° C

Rf D : 0,6

Spectre de masse FAB : 501 (M+H)+

**4.8. N $\alpha$ -4-(7-Nitro-4-benzo-2-oxo-1,3-diazole)-Ne-3 $\beta$ -(2'-carboxymethoxy-cholest-5 $\epsilon$ ne)lysinate de 5'-(2', 3'-dis $\acute{e}$ soxy - 2', 3'-did $\acute{e}$ hydro - thymidinyle).**

**Caractéristiques du produit**

Formule brute: C<sub>51</sub> H<sub>71</sub> N<sub>7</sub> O<sub>10</sub>      Masse moléculaire: 941,1

Point de fusion : 159 ° C      Rf D : 0,9

Spectre de masse FAB : 942,7 (M+H)<sup>+</sup>

Microanalyse; calculée C:64,89 H:7,63 N:10,31. Trouvée C:66,14 H:9,12 N:9,53

**5) *SYNTHESE DES DERIVES CARBONATE ET CARBAMATE DU D4T***

**5.1. 5'-O-(palmityl-oxy-carbonyl)-2',3'-did $\acute{e}$ soxy-2',3'-did $\acute{e}$ hydro-thymidine**

356 mg (2,2 mmole) de carbonyldiimidazole sont additionnés à une solution de 100 mg (0,4 mmole) de D4T dans 5 ml d'acétonitrile anhydre . La transformation du D4T en ester est complète en 30 minutes, le solvant est évaporé et le résidu est trituré par l'acétate d'éthyle le produit est récupéré par filtration (126 mg). L'ester et 943 mg (3,9 mmoles) de 1-hexadécanol est dissous dans de l'acétonitrile (5 ml), la solution est portée une nuit à reflux. La purification par chromatographie sur couche épaisse de silice (CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>-MeOH) (95-5) donne 20 mg de carbonate (9 %).

**Caractéristiques du produit**

Formule brute: C<sub>27</sub> H<sub>44</sub> N<sub>2</sub> O<sub>6</sub>

Masse moléculaire: 492,6

Point de fusion : 60-90 ° C

Rf D : 0,74

Spectre de masse TOF : 537 (M+H)<sup>+</sup>

Spectre de masse FAB : 493 (M+H)<sup>+</sup>

Microanalyse:    Calculée C 65,82 ; H 9,00 ; N 5,68

                    Trouvée C 65,66 ; H 8,81 ; N 5,81

RMN du H : (CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) : 0,9 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-C); 1,25 (m, 24H, (CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>); 1,6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)O); 1,95 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 3,65 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-O-C(O)O); 4,25-4,45 (2d, 2H, 5'-H); 5,0 (m, 1H,4'-H); 5,85 (m, 1H,3'-H, vinyle); 6,25 (m, 1H, 2'-H, vinyle); 7,05 (m, 1H, 1'-H); 7,4 (s, 1H, 6-H); 8,15 (s, 1H,3-H).

## 5.2. 5'-O-(palmityl-amino-carbonyl)-2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidine

110 mg (0,34 mmole) d'ester (comme obtenu précédemment) et 823 mg (3,4 mmoles) sont dissous dans 5 ml d'acétonitril, la solution est portée une nuit à reflux une nuit. La purification par chromatographie sur couche épaisse de silice (CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>-MeOH) (95-5) donne 15 mg (12 %).

### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>27</sub> H<sub>45</sub> N<sub>3</sub> O<sub>5</sub>

Masse moléculaire: 491,6

Point de fusion : 135-145 ° C

Rf D : 0,6

Spectre de masse TOF : 515 (M+Na)+

Spectre de masse FAB :492 (M+H)+

Microanalyse: Calculée C 65,95 ; H 9,22 ; N 8,53

Trouvée C 64,92 ; H 9,82 ; N 7,03

RMN du H : (CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) : 0,85 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-C); 1,25 (m, 26H, (CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>); 1,45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)O); 1,9 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 3,15 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH-C(O)O); 4,25-4,7 (2d, 2H, 5'-H); 5,0 (m, 1H,4'-H); 5,35 (m, 1H,3'-H, vinyle); 6,3 (m, 1H, 2'-H, vinyle), 6,95 (m, 1H, 1'-H); 7,2 (s, 1H, 6-H); 8,4 (s, 1H,3-H).

## 6) *SYNTHESE DES ACIDES UTILISES POUR L'ESTERIFICATION DU D4T*

### 6.1 Synthèse de la N $\alpha$ -N $\epsilon$ -Dipalmityl-lysine

### 6.1.1. N $\alpha$ -Ne-dipalmityl-lysinate de fluorèneméthyle

300 mg (0,3 mmole) de sel de diparatoluène sulfonate de lysinate de fluorèneméthyle sont agités avec 0,313 ml (1,8 mmoles) de DIPEA et 0,23 ml (0,7 mmol) de chlorure de palmitoyle dans 10 ml de CHCL<sub>3</sub>. Après 15 minutes la phase chloroformique est lavée à l'eau, puis rotovapée, le résidu est repris par de l'éther éthylique et le précipité filtré et lavé. m = 237 mg (90 %).

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>52</sub> H<sub>84</sub> N<sub>2</sub> O<sub>4</sub>

Masse moléculaire: 801,2

Point de fusion : 150-160 ° C

Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH) (95-5) : 0,4

Spectre de masse TOF : 802 (M+H)<sup>+</sup>

Spectre de masse FAB : 801 (M+H)<sup>+</sup>

### 6.1.2 N $\alpha$ -Ne-Dipalmityl-lysine

237 mg (0,27 mmole) de N $\alpha$ -Ne-Dipalmityl-lysinate de fluorène méthyle sont dissous avec 1,126 (1,08 mmoles) de DEA dans 5 ml de CHCL<sub>3</sub>. Après 3 heures de réaction, la phase organique est évaporée, le précipité est lavé avec de l'éther éthylique, puis dissous dans 20 ml de CHCL<sub>3</sub> chaud, on lave avec une solution aqueuse de KHSO<sub>4</sub> (PH=1) . L'évaporation de la phase organique donne 75 mg (45 %).

#### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>38</sub> H<sub>74</sub> N<sub>2</sub> O<sub>4</sub>

Masse moléculaire: 623,0

Point de fusion : 122-128 ° C

Spectre de masse TOF : 623 (M+H)<sup>+</sup>, 641 (M+Na)<sup>+</sup>, 1286(2M+K)<sup>+</sup>

Spectre de masse FAB : 623 (M+H)<sup>+</sup>

## 6.2. acide N-(7-Nitro-4-benzo-2-oxo-1,3-diazole)-aminohexanoïque

A une solution de 200 mg (1 mmole) de 4-Chloro-(7-Nitro-4-benzo-2-oxo-1,3-diazole) dans 30 ml de méthanol, on ajoute une solution de 146 mg (1,1 mmole) d'acide 1 aminohexadécanoïque dans 1,5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Le milieu réactionnel est agité une nuit à reflux, après refroidissement on ajoute 0,2 ml d'HCl 10 M, le solvant est évaporé, le précipité est filtré et lavé à l'eau. m = 220 mg (75 %).

### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>12</sub> H<sub>14</sub> N<sub>4</sub> O<sub>5</sub>

Masse moléculaire: 294,3

Point de fusion : 158° C (littérature 159 ° C)

Rf D : 0,4

## 6.3. N $\alpha$ -4-(7-Nitro-4-benzo-2-oxo-1,3-diazole)-N $\epsilon$ -3 $\beta$ -(2'-carboxymethoxy-cholest-5-ène)lysine

### 6.3.1 Trifluoroacétate de N $\alpha$ -Fmoc-lysine

4,84 g (1,03 mmole) de N $\alpha$ -Fmoc- N $\epsilon$  Boc-lysine sont agités dans 20 ml d'une solution de TFA 50 % dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Après 30 minutes le solvant est évaporé, et le résidu est filtré et lavé avec de l'éther éthylique. m = 3,042 g (65 %) .

### Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>23</sub> H<sub>26</sub> N<sub>2</sub> O<sub>6</sub> F<sub>3</sub>

Masse moléculaire: 483,4

### 6.3.2 N $\alpha$ -Fmoc-N $\epsilon$ -3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxy-cholest-5-ène)-lysine

830 mg (1,53 mmoles) de l'ester succinique du 3 $\beta$ -(2'-carboxymethoxy-cholest-5-ène) et 746 mg (1,53 mmoles) de trifluoroacétate de N $\alpha$ -Fmoc-lysine dans 5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en présence de 0,214 ml de TEA . Après un nuit, on ajoute 5 ml de méthanol puis 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la phase



organique est lavée avec une solution aqueuse d'HCl 0,01 M. Après évaporation du solvant on récupère 880 mg de produit (73 %).

Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>50</sub> H<sub>69</sub> N<sub>2</sub> O<sub>6</sub>

Masse moléculaire: 795,1

Point de fusion : 89 ° C

Rf D : 0,5 (coloration marron sous l'action d'HClO<sub>4</sub>)

5.3.3. Nε-3β-(2'-carboxymethoxy-cholest-5-ène)-lysine ( sel de piperidine)

860 mg (1,08 mmoles) de Nα-Fmoc-Nε-3β-(2'-carboxyméthoxy-cholest-5-ène)-lysine sont agités dans 5 ml d'une solution de pipéridine à 20 % dans le DMF, après 30 minutes le précipité est filtré et lavé avec de l'éther éthylique. m = 639 mg (91 %).

Caractéristiques du produit

Formule brute: C<sub>40</sub> H<sub>70</sub> N<sub>3</sub> O<sub>4</sub>

Masse moléculaire: 657,0

6.3.4 Nα-4-(7-Nitro-4-benzo-2-oxo-1,3-diazole)-Nε-3β-(2'-carboxymethoxy-cholest-5-ène)lysine

710 mg (1,08 mmoles) du sel de pipéridine de la Nε-3β-(2'-carboxymethoxy-cholest-5-ène)-lysine sont agités avec 220mg (1,1 mmoles) de 4-Chloro-(7-Nitro-4-benzo-2-oxo-1,3-diazole) dans 5 ml de CHCl<sub>3</sub> et 0,3 ml de TEA. Après une heure de réaction la phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'HCl 1 M, puis concentrée. La purification par chromatographie sur couche épaisse de silice CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>-MeOH (95/5), et l'extraction par CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>, MeOH et acétone donnent 180 mg (23 %).

Caractéristiques du produit

Formule brute:  $C_{41} H_{61} N_5 O_7$

Masse moléculaire: 735,9

Point de fusion : 159 ° C

Rf D : 0,3 (coloration marron sous l'action d' $HClO_4$ )

Spectre de masse FAB : 736 (M+H)<sup>+</sup>, 774 (M+K)<sup>+</sup>

6.4. Synthèse de l'acide 11,17 $\alpha$ ,18 $\alpha$ , $\epsilon$ -trihydroxy-9-fluoro-16-méthyl-1,4-pregndiène-21-oïque

6.4.1. 11,17 $\alpha$ -dihydroxy-9-fluoro-16-méthyl-1,4-pregndiène-18-one-21-al

500 mg (1,38 mmoles) de dexaméthasone sont dissous dans 25 ml de méthanol, on ajoute 150 mg (0,75 mmole) d'acétate de cuivre, la solution bleue foncée verdit . Après 3 heures de réaction, une solution d'EDTA (250 mg (0,65 mmole) dans 10 ml d'eau) est ajoutée. Après évaporation du méthanol le produit est extrait avec  $CH_2Cl_2$  pour donner 480 mg de produit (96 %).

Caractéristiques du produit

Formule brute:  $C_{22} H_{27} O_5 F$

Masse moléculaire: 390,4

Point de fusion : 130-132 ° C

Rf D : 0,4

Spectre de masse FAB : 390 (M+H)<sup>+</sup>

6.4.2. acide 11,17 $\alpha$ ,18 $\alpha$ , $\epsilon$ -trihydroxy-9-fluoro-16-méthyl-1,4-pregndiène-21-oïque

480 mg (1,32 mmoles) de 11,17 $\alpha$ -dihydroxy-9-fluoro-16-méthyl-1,4-pregndiène-18-one-21-al sont dissous dans 25 ml de méthanol, on ajoute 50 ml d'eau, puis 20 ml de soude 2 M. Après 3 heures de réaction le méthanol est évaporé, la phase aqueuse est acidifiée (pH=4) par une solution d'acide chlorhydrique 2 M pour précipiter l'acide. Le précipité est filtré et lavé avec de l'eau à 0 °C. Le produit est ensuite séché une nuit sous  $P_2O_5$ . m=412 mg soit 83 % de rendement.

Caractéristiques du produitFormule brute:  $C_{22} H_{29} O_6 F$ 

Masse moléculaire: 408,4

Point de fusion : 235 ° C

Rf D : 0,45

Spectre de masse FAB :408 (M+H)+

Microanalyse: Calculée C 64,72 ; H 7,12 ; N 4,72

Trouvée C 61,04 ; H 7,09 ; N 4,71

6.5. Synthèse du 3 $\beta$ -(2'-carboxyméthoxy-cholest-5-ène)

## 6.5.1 Paratoluène sulfonate de cholestéryle

Après dissolution de 10 g (25,8 mmoles) de cholestérol dans 10 ml de pyridine on ajoute 10 g (52,6 mmoles) de chlorure de tosylo. Après agitation pendant 12 heures, la pyridine est éliminée par évaporation . Le résidu est solubilisé dans 20 ml d'acétone à chaud. Après filtration le tosylate de cholestérol est obtenu par cristallisation à froid . On obtient 11,482 g soit 85 % de rendement.

Caractéristiques du produitFormule brute:  $C_{34} H_{52} O_3 S$ 

Masse moléculaire: 540,8

Point de fusion : 128 ° C (littérature : 131 ° C)

Rf ( Ether éthylique- éther de pétrole) (5-5) : 0,85 (coloration marron sous l'action d' $HClO_4$ )6.5.2 3 $\beta$ -(2'-hydroxyéthoxy-cholest-5-ène)

A 10 g (17,5 mmoles) de tosylate de cholestérol dissous dans 120 ml de dioxane, sont additionnés 30 ml (480 mmoles) d'éthylène glycol. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 4 heures. Après refroidissement il est repris dans 150 ml d'eau. Le dérivé alcool formé est extrait à l'ether éthylique (3 x 200 ml ), la phase étherée est lavée par  $NaHCO_3$  5%, puis par de l'eau. Après

séchage sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  la solution étherée est concentrée au maximum, l'ajout de 4 ml d'hexane permet la cristallisation du produit à 4 ° C. Masse récupérée : 2,558 g soit 34 % de rendement.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute:  $\text{C}_{29} \text{H}_{50} \text{O}_2$

Masse moléculaire: 430,7

Point de fusion : 99 ° C (littérature : 102 ° C)

Rf D : 0,85 (coloration marron sous l'action d' $\text{HClO}_4$ )

#### 6.5.3 $3\beta$ -(2'-carboxyméthoxy-cholest-5-ène)

On réalise préalablement la solution oxydante suivante: 2,67 g d'anhydride chromique, 2,3 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré, le volume est ajusté à 10 ml avec de l'eau. Le milieu oxydant est ajouté goutte à goutte à 2 g (4,66 mmoles) de  $3\beta$ -(2'-hydroxyéthoxy-cholest-5-ène) dissous dans 50 ml d'acétone. L'évolution de la réaction est contrôlée par CCM, la réaction achevée (quelques heures), le milieu réactionnel est repris dans 250 ml d'eau, le dérivé acide est extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 200 ml). La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , puis mise à sec par évaporation. L'ajout de 4 ml d'éther de pétrole permet la cristallisation du produit à 4 ° C. Le précipité est filtré et lavé par l'éther de pétrole, on récupère 620 mg soit 30 % de rendement.

#### Caractéristiques du produit

Formule brute:  $\text{C}_{29} \text{H}_{48} \text{O}_3$

Masse moléculaire: 444,7

Point de fusion : 157 ° C (littérature : 160 ° C)

Rf ( Ether éthylique- éther de pétrole-méthanol) (5-5-1,5) : 0,4 (coloration marron sous l'action d' $\text{HClO}_4$ )

Microanalyse: Calculée C 78,32 ; H 10,91

Trouvée C 76,25 ; H 10,9

RMN du C 13 :  $\text{CDCl}_3$  : d (ppm) : 172 ( $\text{C}2'$ ); 139,122 ( $\text{C}5, \text{C}6$ ); 79,2-80,5 ( $\text{C}1', \text{C}3$ ); 65-11 (fonctions alcanes).

## BIBLIOGRAPHIE

1. Aggarwal S.K., Gogu S.R., Rangam S.R.S. and Agrawal K.C.  
Synthesis and biological evaluation of prodrugs of zidovudine.  
J. Med. Chem. (1990), 33, 1505-1510.
2. Agrawal S.  
Preparation of functionalized oligonucleoside methyl phosphonate suitable for non-radioactive label attachment.  
Tetrahedron Letters (1989), 30 (50), 7025-7028.
3. Agrawal S., Christodoulou C. and Gait M.J.  
Efficient methods for attaching non-radioactive labels to the 5' ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides.  
Nucleic Acids Research (1986), 14 (15), 6227-6245.
4. Ahmad M.S. and Logani S.C.  
Lithium aluminium hydride-aluminium chloride reduction of steroidal cyclic acetals.  
Aust. J. Chem. (1971), 24, 143-151.
5. Allmaier G., Schmid E.R. and Roepstorff P.  
Positive and negative ion  $^{252}\text{Cf}$  plasma desorption mass spectrometry of polar agrochemical metabolites.  
Biomedical and environmental mass spectrometry (1990), 19, 75-79.
6. Amiar G. et Goffinet B.  
Sur les N-trityl  $\alpha$ -amino-acides et leurs applications en synthèse peptidique. IV. Dérivés de la lysine.  
J. Org. Chem. (1957), 1133-1136.
7. Asseline U., Toulme F., Than Thuong N., Delarue M., Montenay-Garestier T. and Hélène C.  
Oligodesoxynucleotides covalently linked to intercalating dyes as base sequence-specific ligands. Influence of dye attachment site.  
The EMBO Journal (1984), 3 (4), 795-800.
8. Bains W.  
Disease, DNA and diagnosis  
New Scientist (1989), 48-51.
9. Balzarini J., Pauwels R., Baba M., Herdewijn P., De Clercq E., Broder S. and John D.G.  
The *in vitro* and *in vivo* anti-retrovirus activity, and intracellular metabolism of 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine and 2', 3'-dideoxycytidine are highly dependent on the cells species.  
Biochem. Pharmacol. (1988), 37, 897-903.
10. Bannwarth W. and Trzeciak A.  
Helv. Chimica Acta (1987), 70, 175-176.

11. Bednarek M.A. and Bodansky M.  
9-fluorenylmethyl esters.  
Int. J. Peptide Protein Res. (1983), 21, 196-201.
12. Bodansky M.  
Principles of peptide synthesis.  
Hafner K. et al. Eds. (1984), 307p., Springer Verlag : Berlin.
13. Bodansky M. and Bodansky A.  
The practise of peptide synthesis.  
Springer-Verlag (1984), 33-34.
14. Carpino L.A. and Han G.Y.  
J. Amer. Soc. (1957), 79, 4427-4431.
15. Castro B., Dormoy J.R., Evin G. and Selve C.  
Bop, hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium.  
Tetrahedron Letters (1975), 14, 1219-1222.
16. Chehab F.F. and Kan Y.M.  
Detection of specific DNA sequences by fluorescence amplification A color  
complementation assay.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989), 86, 9178-9182.
17. Chollet A. and Kawashima E.H.  
Biotin-labeled synthetic oligodesoxyribonucleotides : chemical synthesis and uses a  
hybridation probes.  
Nucleic Acids Research (1985), 13 (5), 1529-1540.
18. Chu B.C.F. and Orgel L.E.  
Detection fo specific DNA sequences with short Biotin-labeled probes.  
DNA (1985), 4 (4), 327-331.
19. Cocuzza A.  
A phosphoramidite reagent for automated solid phase synthesis of 5'-biotinylated  
oligonucleotides.  
Tetrahedron Letters (1989), 30 (46), 6287-6290.
20. Connolly B.A.  
The synthesis of oligonucleotides containing a primary amino group at the 5'-  
terminus.  
Nucleic Acids Research (1987), 15 (7), 3131-3139.
21. Cotter R.J.  
Plasma desorption mass spectrometry : coming of Age.  
Analytical Chemistry (1988), 60, 781A.
22. Dormont D.  
Bases biologiques de la thérapeutique anti-rétrovirale.  
Virologie et Immunologie (1988), 181-197.

23. Ens W., Standing K.G., Westmore J.B., Ogilvie K.K. and Nemer M.J.  
Secondary ion mass spectrometry of protected diribonucleoside monophosphates with a time of flight mass spectrometer.  
*Anal. Chem.* (1982), 54, 960-966.
24. Fox J.J. and Miller N.C.  
Nucleosides. XVI. Further studies of antichonucleosides.  
*J. Org. Chem.* (1962), 28, 936-941.
25. Furman P.A., Fyfe J.A., St Clair M.H., Weinhold K., Rideout J.L., Freeman G.A., Nusinofflehrman S., Bolognesi D.P., Broder S., Mitsuya H. and Barry D.W.  
Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immuno-deficiency virus reverse transcriptase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986), 83, 8333-8337.
26. Grotjahn L., Blocker H. and Frank R.  
Mass spectroscopic sequence analysis of oligonucleotides.  
*Biomedical mass sepectrometry* (1985), 12 (9), 514-524.
27. Grotjahn L., Frank R. and Blocker H.  
Ultra fast sequencing of oligodeoxyribonucleotides by FAB mass spectrometry.  
*Nucleic Acids Research* (1982), 10 (15), 6471-4678.
28. Haralambidis J., Duncan L. and Tregear G.W.  
The solid phase synthesis of oligonucleotides containing a 3'-peptide moiety.  
*Tetrahedron Letters* (1987), 28 (43), 5199-5202.
29. Haralambidis J., Duncan L., Angus K. and Tregear G.W.  
The synthesis of polyamide-oligonucleotides conjugate molecule.  
*Nucleic Acids Research* (1990), 18 (3), 493-499.
30. Hélène C., Montenay-Garestier T., Saison T., Takasugi M., Toulme J.J., Asseline U., Lancelot G., Maurizot J.C., Toulme F. and Tuong N.T.  
Oligodesoxynucleotides covalently linked to intercalating agents : a new class of gene regulatory substances.  
*Biochemie* (1985), 67, 777-783.
31. Herdewijn P., Pauwels R., Baba M., Balzarini J. and De Clercq E.  
Synthesis and anti-HIV activity of various 2' and 3'-substituted 2', 3' dideoxyadenosines : A structure-activity analysis.  
*J. Med. Chem.* (1987), 30, 2131-2137.
32. Horwitz J.P., Chua J., Da Rooge M.A., Noel M. and Klundt I.  
Nucleosides. IX. The formation of 2',3'-unsaturated pyrimidine nucleosides via a novel  $\beta$ -elimination reaction.  
*J. Org. Chem.* (1966), 205-211.
33. Horwitz J.P., Chua J., Noel M. and Donatti J.T.  
Nucleosides. XI. 2', 3'-dideoxycytidine.



34. Horwitz J.P., Chua J., Urbanski J.A. and Noel M.  
Nucleosides. III. 1-(2'-Deoxy-3', 5'-epoxy- $\beta$ -D-threo-pentofuranosyl) thymine.  
J. Org. Chem. (1962), 28, 942-944.
35. Ji Y.H., Bannwarth W.W. and Luu B.  
Tetrahedron (1990), 2, 487
36. Jonsson G.P., Hedin A.B., Hakanson P.L., Sundquist B.U.R., Save B.G.S., Nielsen P.F., Roepstorff P., Johansson K.E., Kamensky I. and Lindberg M.S.L.  
Plasma desorption mass spectrometry of Peptides and proteins adsorbed on nitrocellulose.  
Anal. Chem. (1986), 58, 1084-1087.
37. Kempe T., Sundquist W.I., Chow F. and Mu S.L.  
Chemical and enzymatic biotin-labelling of oligodesoxyribonucleotides.  
Nucleic Acids Research (1985), 13 (1), 45-57.
38. Konig W. and Geiger W.  
Chem. Ber. (1970), 103, 788-798.
39. Lebwart M.L. and Mattox V.R.  
Glycolic Acids and esters from cortisone.  
J. Org. Chem. (1963), 28, 1773-1779.
40. Lebwart M.L. and Mattox V.R.  
Conversion of steroid-17-yl glyoxals to epimeric glycolic esters.  
J. Org. Chem. (1963), 28, 1779-1786.
41. Lehmann C., Xy Y.Z., Christodoulou C., Tan Z.K. and Gait M.J.  
Solid phase synthesis of oligoribonucleotides 9-fluorenyl-methoxycarbonyl (Fmoc) for 5'-hydroxyl protection.  
Nucleic Acids Research (1989), 17 (7), 2379-2390.
42. Lemaître M. et Zérial A.  
Méthodes permettant le criblage et l'évaluation in vitro d'activités inhibitrices de la réplication du VIH.  
Revue française des laboratoires. (1990), 216, 43-50.
43. Letsinger R.L., Zhang G., Sun D.K., Ikeuchi T., and Sarin P.S.  
Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: Synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture  
P.N.A.S. (1989) 6553-6556
44. Loke S.L., Stein C.A., Zhang X.H., Mori K., Nakanishi M., Subasinghe L., Cohen J.S. and Neckers L.M.  
Characterization of oligonucleotide transport into living cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989), 88, 3474-3478.

45. Malhotra N., Roepstorff P., Hanssen T.K. and Becher J.  
Alkali metal ion complexation of crown ethers and related studied by californium-252 plasma desorption mass spectrometry.  
J. Am. Chem. (1990), 112, 3709-3710.
46. Mansuri M.M., Starrett J.E., Ghazzouli J.I., Hitchcock M.J.M., Sterzycki R.Z., Brankovan Y., Lin T.S., August E.M., Prusoff W.H., Sommadossi J.P. and Martin J.C.  
1-(2, 3-dideoxy-β-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)thymine. A highly potent and selective anti-HIV agent.  
J. Med. Chem. (1989), 32, 461-466.
47. Maxam A.M. and Gilbert W.  
Methods in Enz. (1980), 65, 499-559.
48. McNeal C.J., Olgivie K.K., Theriault N.Y. and Nemer M.J.  
A new method for sequencing fully protected oligonucleotides using <sup>252</sup>Cf plasma desorption mass spectrometry. 2. negative ions of subunits in the stepwise synthesis of a heptaribo-nucleotide.  
J. Am. Chem. Soc. (1982), 104, 976-980.
49. Nelson P.S., Frye R.A. and Liv E.  
Bifunctional oligonucleotide probes synthesised using a novel CPG support are able to detect single base pair mutations.  
Nucleic Acids Research (1989), 17 (18), 7187-7194.
50. Nelson P.S., Sherman-Gold R. and Leon R.  
A new and versatile reagent for incorporating multiple primary aliphatic amines into synthetic oligonucleotides.  
Nucleic Acids Research (1989), 17 (18), 7179-7186.
51. Nielsen J., Taagaard M., Marugg J.E., Van Boom J.H. and Dah L.O.  
Application of 2-cyanoethyl N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidite for *in situ* preparation of deoxyribonucleoside phosphoramidites and their use in polymer-supported synthesis of oligo-deoxyribonucleotides.  
Nucleic Acids Research (1986), 18 (14), 7391-7403.
52. O Ferral, Ram and Slae.  
J. Chem. Soc. (B) (1970), 260-277.
53. Pfitner K.E. AND Moffat J.G.  
The synthesis and hydrolysis of 2'-3'-Dideoxyuridine.  
J. Org. Chem. (1964), 1508-1511.
54. Pochet S., Kansal V., Destouesse F. and Sarfati S.R.  
Alkylglycoside carbonates of 3'-Azido-3'-deoxythymidine.  
Tetrahedron Letters (1990), 31 (42), 6021-6024.

55. Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1977), 74, 5463-5467.
56. Sheeman J.C. and Hess G.P.  
A new method of forming peptide bonds.  
J. Amer. Chem. Soc. (1985), 77, 1067-1068.
57. Smith L.M., Fung S., Hunkapiller M.W., Hunkapiller T.J. and Hoo L.E.  
The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus : synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis.  
Nucleic Acids Research (1985), 13 (7), 2399-2412.
58. Smith L.M., Kaiser J.K., Sanders J.Z. and Hoo L.E.  
The synthesis and use of fluorescent oligonucleotides in DNA sequence analysis.  
Methods in enzymology (1987), 155, 260-301.
59. Sproat B.S. and Brown.  
New linkage for solid phase synthesis oligodeoxyribonucleotides.  
Nucleic Acids Research (1985), 13 (8), 2979-2987.
60. Sproat B.S., Beijer B. and Rider P.  
The synthesis of protected 5'-amino-2', 5'-dideoxyribonucleoside-3'-O phosphoramidites ; applications of 5'-amino-oligodeoxyribonucleotides.  
Nucleic Acids Research (1987), 15 (15), 6181-6196.
61. Stelakatos G.C., Theodoropoulos D.M. and Zervas L.  
On the trityl method for peptide synthesis.  
J. Org. Chem. (1958), 81, 2884-2887.
62. Urdea M.S., Warner B.D., Running J.A., Stempien M., Clyne J. and Horn T.  
A comparison of non-radioisotopic hybridation assay method using fluorescent, chemiluminescent and enzyme labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide probes.  
Nucleic Acids Research (1988), 16 (11), 4937-4957.
63. Viari A., Ballini J.P., Meleard P., Vigny P., Dousset P., Blonski C. and Shire D.  
Characterisation and sequencing of normal and modified oligonucleotides by  $^{252}\text{Cf}$  plasma desorption mass spectrometry.  
Biomedical and environmental mass spectrometry (1988), 15, 225-228.
64. Viari A., Ballini J.P., Vigny P., Blonski P., Dousset P. and Shire D.  
Plasma desorption mass spectrometric analysis of oligonucleoside methyl phosphonates.  
Tetrahedron letters (1987), 28 (29), 3349-3352.
65. Viari A., Ballini J.P., Vigny P., Shire D. and Dousset P.  
Sequence analysis of unprotected tri-deoxyribonucleoside di phosphates by  $^{252}\text{Cf}$ -Plasma desorption mass spectrometry.  
Biomedical and environmental mass spectrometry (1987), 14, 83-90.

66. Wakelin L.P.G.

Polyfunctional DNA intercalating agents.

Medicinal Research Reviews (1986), 6 (3), 275-340.

67. Watcher L., Jablonski J.A. and Ramachandran K.L.

A simple and efficient procedure for the synthesis of 5'-aminoalkyl oligonucleotides.

Nucleic Acids Research (1986), 14 (20), 7985-7994.



PIERLOT Christel

CONCEPTION ET SYNTHÈSE EN SÉRIE NUCLEOTIDIQUE ET NUCLEOSIDIQUE DE MOLECULES A VISEE ANTI-HIV

RESUME

Ce travail consiste en l'obtention d'inhibiteurs du VIH, l'agent causal du SIDA.

La première partie intéresse la modification chimique en phase solide d'oligodésoxyribonucléotides à l'extrémité 5'. L'amino-fonctionnalisation a permis le couplage original par les réactifs Bop et DCC d'acides de nature différente. La modification a été appliquée à la stratégie anti-sens, ainsi la fixation d'un reste dexaméthasone en 5' d'une séquence susceptible de s'hybrider au niveau du gène pol viral a été réalisée et l'activité biologique évaluée.

Pour augmenter le seuil de détection des sondes froides, la multiplication simple de groupes reporters a été étudiée en phase solide à partir de la lysine : les produits obtenus ont été caractérisés par chromatographie liquide haute performance et spectrométrie de masse " temps de vol".

La deuxième partie est consacrée à la conception et à la synthèse de prodrogues de la 2',3'-didésoxy-2',3'-didéhydro-thymidine (D4T). Sur le dérivé monophosphate possédant un avantage métabolique par rapport à l'AZT ont été construits des analogues capables de traverser les membranes cellulaires et de présenter une pharmacocinétique favorable.

Dans le but d'une vectorisation par les LDL, l'incorporation d'un analogue fluorophore dans les LDL a été mise en évidence ainsi que le passage dans les cellules U937 via le récepteur spécifique.

MOTS-CLES

Oligodésoxyribonucléotides, Phase solide, Phosphoroamidite, Spectrométrie de masse TOF, Anti-sens, D4T, LDL.