



Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline : Chimie Organique

Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé

Présentée par

Ben Gaied Nouha

Synthèse et évaluation des propriétés de fluorescence et d'inhibition
d'une nouvelle classe d'analogues nucléosidiques dirigés contre la
Rétrotranscriptase de VIH-1.

Soutenue publiquement le 8 Novembre 2006

Membres du jury

Directeur de Thèse	Mr. ALAIN BURGER	Professeur	Université Nice Sophia-Antipolis
Co-directeur de Thèse	Mr. ROLAND MARQUET	Directeur de recherche	Université Louis Pasteur, Strasbourg I
Rapporteur Interne	Mr. MICHEL ROHMER	Professeur	Université Louis Pasteur, Strasbourg I
Rapporteur Externe	Mr. BRUNO CANARD	Directeur de recherche	Université d'Aix en Provence, Marseille
Rapporteur Externe	Mr. PIERRE VIERLING	Directeur de recherche	Université Nice Sophia-Antipolis

A mon Papinou, j'espère que de là haut, tu es fier de moi.

A Maman, Bibou, Mimou et Bilette.

Remerciements

Ce travail de thèse a débuté au Laboratoire des Protéines et des Récepteurs Membranaires à l'École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, dirigé par le Dr. Frank Pattus. Il s'est poursuivi à l'Université de Nice Sophia-Antipolis, au Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes dirigé par le Dr. Pierre Vierling et sous la direction du Pr. Alain Burger. Je tiens à vous remercier de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans vos équipes respectives.

A messieurs les membres du jury, les Docteurs Bruno Canard, Pierre Vierling et le Pr. Michel Rohmer. Je tiens à vous remercier pour l'honneur que vous me faites en jugeant ce manuscrit, consciente du travail que cela représente. Merci Encore.

Au Dr. Roland Marquet, Co-directeur de cette thèse, pour votre relecture du manuscrit, vos critiques et vos remarques et surtout votre rapidité de réponse à mes E-mails.

Au terme de ces quatre années de thèse, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont permis de la réaliser:

Le Ministère de la Recherche, Sidaction pour leur soutien financier ainsi que l'ANRS pour avoir financé ce projet.

Au Professeur Alain Burger, pour m'avoir confié ce sujet de recherche, pour nos conversations scientifiques, votre rigueur et vos encouragements quand je commençais à baisser les bras. Je crois que je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir fait quitter mon « Alsace d'adoption » pour Nissa la bella.

Aux Drs Valérie Vivet et Catherine Isel pour toutes les manips de bio, Philippe Wolf pour la synthèse des oligonucléotides modifiés par la « capricieuse » 8vdA ainsi qu'Alice Limonciel pour sa contribution à la caractérisation de la 8thdA.

Au Dr. Anne-Marie Aubertin, pour avoir accepté d'effectuer les tests biologiques de certains composés synthétisés durant cette thèse.

Mes remerciements vont également aux personnels des services de RMN à Strasbourg et à Nice pour leurs compétences et leur disponibilité.

Je tiens également à remercier la superbe équipe que j'ai quitté trop prématurément à Strasbourg. Françoise, Vivi, Gaëtan, même si je suis loin de vous, je pense à vous très souvent. J'ai passé en votre compagnie des moments inoubliables que ce soit au labo, ou en dehors. Merci pour votre bonne humeur, vos conseils et surtout un énorme Merci à toi Gaëtan, d'avoir été là cet été et pour le temps que tu as consacré à la lecture d'une partie de ce manuscrit.

Merci aussi à toute l'équipe niçoise, Nadia, Christophe, Jacques, Audrey, Danielle et Véro.

Je n'allais quand même pas oublier tous ceux avec qui j'ai partagé les « joies » de la thèse et les galères des commandes. Camille ma partenaire de paillasse, on était un peu isolé au 6^{ième} mais le temps est vite passé avec Lolo, Pascal, Greg, Loic, Vanessa, sans oublier le

boss de la chimie, le Dr. Momo. Durant ces derniers mois on a partagé les galères de l'écriture et de la correction, alors après tout ça, que je n'entende surtout pas que tu t'es recyclé dans l'informatique !!! Et enfin ma petite Marie. Faudra maintenant te débrouiller comme une grande mais j'ai confiance en toi et tu finiras par être une pro de la chimie des chromones. Tu commences déjà à l'être ! Courage pour la suite.

Ils ne sont plus au labo, mais c'est comme s'ils n'étaient jamais partis. Karine, Dom Guillaume, Corine, et Sergio. Merci pour ces deux superbes années, pour votre bonne humeur et votre disponibilité.

A ma Coco, Semsem, Salim, Moheb, Arzou, Skandy, Jiji et Martine. Vous êtes tous loin de moi, mais d'un simple coup de téléphone, je sens votre présence à mes cotés. Vous avez été toujours là dans les bons moments, mais aussi quand j'avais besoin d'être rassurée, réconfortée ou tout simplement de parler. Vous avez été ma nouvelle famille et rien que pour ça je vous dit un énorme Merci.

A Guigui. Merci d'avoir été là à mes cotés, de m'avoir fait découvrir et aimer cette belle région. Je ne garderais que les meilleurs moments de cette belle rencontre.

Je ne pouvais pas finir sans dire un ENORME MERCI à mon Papinou. Depuis le début, tu m'as fait confiance en me laissant partir vers l'inconnu. Tu nous as quitté beaucoup trop tôt sans que je puisse te dire au revoir. Il ne se passe pas un jour sans que je pense à toi et je suis sûr que de là haut tu seras avec moi pour ce premier moment important de ma vie. Il me reste ma Maminette, rabena yekhaliki leya ya aghla om fel donia, Bibou, Mimou, Vouta, Doudi et Sam, je ne vous dirais jamais assez Merci.

Abréviations et acronymes

A

Ac : Acétyle
Ac₂O: Anhydride acétique
ADN: Acide désoxyribonucléique
Ala : Alanine
2-AMP: 2-aminopyridine
2-AP: 2-aminopurine
ARN: Acide ribonucléique
ARNt: Acide ribonucléique de transfert
ATP: Adénosine triphosphate
AZT: Azidothymidine

B

BSA: *bis*-triméthylsilylacétamide
BrOP: Bromo-tris-(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate.
BSTFA: *bis*-triméthylsilyl-trifluoroacétamide
BTT: 5-benzylthio-1H-tétrazole
BuLi: Butyllithium
*t*BuOH: *Tertiobutanol*
Bu₃N: Tributylamine
*t*BuMgBr: Bromure de *ter*-butyl-magnésien

C

C: Cytosine
CE: Cyanoéthyle
CDI: Carbonyldiimidazole
CH₂Cl₂: Dichlorométhane
CH₃CN: Acétonitrile
CHCl₃: Chloroforme
CH₃NO₂: Nitrométhane
CLHP: Chromatographie liquide à haute pression
*m*CPBA: acide *méta*-chloro-*para*-benzoïque
CoCl₂ : Chlorure de Cobalt
CPG: Controlled Pore Glass
CSO: (1*S*)-(+)-(10-camphorsulfonyl)oxaziridine

D

dATP: Désoxyadénosine triphosphate
DBU: 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-ene
dCTP: Désoxycytidine triphosphate
DCA: Acide dichloroacétique
DCC: Dicyclohexycarbodiimide
dGTP: Désoxyguanosine triphosphate
DIPEA: Diisopropyl-éthylamine
dNTP: Désoxynucléoside triphosphate
DMAP: Diméthylaminopyridine
DMF: diméthylformamide
DMSO: Diméthylsulfoxyde

DMTr: Diméthoxytrityle
DMTrCl: Chlorure de diméthoxytrityle
dTTP: Désoxythymidine triphosphate
dUTP: Désoxyuridine triphosphate

E

EDC: 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
ESI: Electron Spray Ionisation
EtOH: Ethanol
ETT: 5-éthylthio-1H-tétrazole
Et₂O: Ether

G

G : Guanosine
GADPH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

H

H₂SO₄: Acide sulfurique
HATU: O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate
HBTU: O-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate.
HOBt: N-hydroxybenzotriazole
HCl: Acide chlorydrique

I

INRT: Inhibiteur nucléosidique de la Rétrotranscriptase
INRT-MP: Inhibiteur nucléosidique de la Rétrotranscriptase monophosphorylé
INRT-TP: Inhibiteur nucléosidique de la Rétrotranscriptase triphosphorylé
*i*PrPac: *isopropylphénoxyacétique*

K

K₂CO₃: Carbonate de potassium
K₂HPO₄: Hydrogénophosphate de potassium

L

LDA: Lithium-diisopropylamine
LCAA-CPG: Long Chain Alkyle Amine Controlled Pore Glass.
Lys: Lysine

M

M: Molaire
MeOH: Méthanol
MES: Acide 2-morpholinoéthane sulfonique

N

Na₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de sodium
NaHCO₃ : Hydrogénocarbonate de sodium
NaOMe: Méthanolate de sodium
NCp7 : Protéine de la nucléocapside
NEt₃: Triéthylamine
NH₄OH: Ammoniac

NMI: N-méthylimidazole
NMP: N-méthylpyrrolidone
NOE: Nuclear Overhauser Effect
NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

O

ODN: Oligonucléotide

P

Pac : Phénoxyacétyl
Pd(PPh₃) : Tétrakis
triphénylphosphine de palladium
Pd/C: Palladium sur charbon
PEG: Polyéthylène glycol
Phe: Phénylalanine
PNA : Peptide Nucleic Acid
PNO : 2-(phénylsulfonyl)-3-(3-nitrophényl)-oxaziridine
POCl₃ : Trichlorophosphate
ppm: Particule par million
PyBrOP: Bromo-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

R

RMN: Résonance magnétique nucléaire.
RT: Rétrotranscriptase

S

S_N: Substitution nucléophile
SnBu₃Cl: Chlorure de tributylétain

T

TAR: Trans Activating Response element
Tat: Trans Activator
TCA: Acide trichloroacétique
TEAA: Triéthylammonium acétate
TEAB : Triéthylammonium bicarbonate
TFA: Acide trifluoroacétique
THF: Tétrahydrofurane
Tm: Température de fusion

U

U: Uridine
UV: Ultra-Violet

V

VIH: virus d'immunodéficience humaine

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I. INTRODUCTION GENERALE

<i>I. Rappels préliminaires sur la structure de l'ADN</i>	1
1.1 Structure de l'ADN	1
1.2. Les différentes conformations adoptées par la base et le désoxyribose	2
1.3. Convention de numérotation.....	3
<i>II. Le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH).</i>	4
2.1. Le VIH en quelques chiffres.....	5
2.2. Historique de la maladie.....	6
2.3. Modes de transmission.....	7
2.4. L'agent pathogène.....	7
<i>III. La particule virale.</i>	9
3.1. La structure virale.	9
3.2. Le cycle de réplication.	11
3.2.1. L'entrée dans la cellule.....	11
3.2.2. Devenir dans la cellule hôte.....	13
3.2.3. Libération de la particule virale.....	13
3.3. Le génome viral.	14
3.3.1. Les protéines structurales.	14
3.3.2. Les protéines régulatrices.	15
3.3.3. Les protéines accessoires.....	16
3.4. Les enzymes virales.....	17
3.4.1. La Rétro Transcriptase (RT).....	17
3.4.2. L'Intégrase virale.....	21
3.4.3. La protéase virale.....	24
<i>IV. Les cibles thérapeutiques potentielles et chimiothérapie anti-VIH.</i>	25
4.1. La fusion membranaire.	25
4.2. Inhibition de L'Intégrase virale.....	28
4.3. Inhibition de la Protéase virale.....	29
4.4. La rétrotranscription.....	32
4.4.1. Les inhibiteurs non-nucléosidiques.....	32
4.4.2. Les inhibiteurs nucléosidiques.....	33
<i>V. Problème majeur : les résistances aux traitements.</i>	38
5.1. Les différents mécanismes de résistance.....	38
5.2. Exemple de l'AZT.....	39
<i>VI- La spectroscopie de fluorescence, concept et aspects généraux.</i>	40
6.1. Principe de la spectroscopie de fluorescence [145].....	40
6.2. Les paramètres de la fluorescence.....	42

VII. Conclusion.	43
VIII. Présentation du travail effectué au laboratoire.	43
CHAPITRE II. SYNTHÈSE DE NOUVELLES SONDÉS DE FLUORESCENCE	
I. Introduction.	47
II. Les différentes techniques de marquage des acides nucléiques	48
2.1. Marquage des acides nucléiques via un bras espaceur	48
2.2. Les sondes nucléosidiques fluorescentes	49
2.2.1. Les sondes de fluorescence dérivées des bases naturelles [173].....	50
2.2.2. Amélioration de propriétés de fluorescence par augmentation de la conjugaison des bases naturelles	52
2.2.3. Bases dérivées des noyaux polycycliques aromatiques	53
2.3. Etats des connaissances et objectifs	56
2.3.1. Interaction TAR- cTAR en présence de NCp7	56
2.3.2. Les outils fluorescents utilisés	57
2.3.3. Objectifs de travail.....	58
III. La 8vdA, une nouvelle sonde de fluorescence	60
3.1. Propriétés de la 8vdA	60
3.2. La synthèse en phase solide	61
3.2.1. Résines et supports	62
3.2.2. Principe de la synthèse des oligonucléotides en phase solide.....	63
3.3. Méthodologie employée pour la 8vdA	67
3.3.1. Synthèse du phosphoramidite de la 8vdA (5).....	67
3.3.1. La 8vdA dans les séquences d'oligonucléotides.....	69
3.3.2. La 8vdA et cTAR	71
IV. Synthèse de la 8-thiényl-désoxyadénosine (8thdA)	72
4.1. Synthèse et évaluation des propriétés de fluorescence de la 8thdA	75
4.1.1. Synthèse de la 8thdA nue (9).....	75
4.1.2. Tests de stabilité de la 8thdA.....	76
4.1.2. Conformation de la 8thdA	77
4.1.3. Les propriétés spectrales de la 8thdA	77
4.1.4. Effet de la nature du solvant sur les propriétés spectrales de la 8thdA.....	78
4.1.5. Influence du pH et nature du tampon.....	79
4.1.6. Récapitulatif	81
4.2. Synthèse des oligonucléotides modifiés par la 8thdA	82
4.2.1. Synthèse du synthon phosphoramidite de la 8thdA	83
V. Conclusion générale	84
Partie expérimentale	

CHAPITRE III. SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DES PROPRIÉTÉS ANTIVIRALES D'ANALOGUES NUCLEOSIDIQUES DE LA dA

***I- Hypothèses de travail et conception des analogues nucléosidiques* 96**

***II- Etude de l'effet de la 8vdA et de la 8edA sur les deux activités enzymatiques de la RT* 100**

2.1. Le choix des séquences synthétisées	101
2.1.1. La séquence "amorce"	101
2.1.2. La séquence "matrice"	101
2.2. Synthèse des séquences marquées	102
2.2.1. Synthèse des synthons phosphoramidites de la 8vdA et de la 8edA.....	102
2.2.2. Synthèse des séquences d'oligonucléotides marqués.....	103
2.4. Résultats et discussion	103
2.4.1. Effet des modifications dans le brin amorce.....	104
2.4.2. Effet des modification dans le brin matrice.....	105
2.4.3. Discussion.....	106
2.5. Conclusion	109

***III. Les analogues nucléosidiques de la dA* 110**

3.1. Synthèse de dérivés modifiés en position 8 de la dA sous leur forme nue.....	110
--	------------

***IV. Préparation des analogues phosphoramidates* 113**

4.1. L'approche prodrogue, définition et enjeux.....	113
4.2. Les aryloxyphosphoramidates de McGuigan	115
4.2.1. La méthode de McGuigan	118
4.2.2. Synthèse optimisée, cas du NB1011	119
4.2.3. Méthode d'Uchiyama	120
4.3. Application aux dérivés de la dA modifiés en position 8	121
4.3.1 Etude de la séquence réactionnelle par RMN du Phosphore ³¹ P.....	121
4.3.2. Synthèse des analogues phosphoramidate de la dA.....	122

***V. Evaluation de l'activité antivirale des nucléosides nus et de leurs homologues phosphoramidates* 124**

5.1. Principe du test biologique.....	124
5.2. Résultats obtenus	126
5.3. Discussion.....	127

***VI. Conclusion* 128**

Partie expérimentale

CHAPITRE IV. VERS LA SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE TRIPHOSPHATES

A. Les différentes méthodes de synthèse de dérivés triphosphorylés.	152
I. Les méthodes directes.....	152
1.1. La méthode de Poulter.....	152
1.2. Méthode d'Eckstein-Ludwig.....	153
1.3. Méthode d'Yoshikawa-Ludwig.....	154
1.4. Les méthodes enzymatiques.....	155
II. Méthodes nécessitant le passage par un monophosphate.....	157
2.1. Les réactifs de phosphitylation de degré (III).....	157
2.2. Les réactifs de degré d'oxydation P(V).....	158
2.3. Les méthodes moins conventionnelles.....	158
2.4. Les méthodes d'activation.....	160
III. Conclusion.....	162
B. Synthèse des nucléotides modifiés de la dA	163
I. Essai de synthèse des triphosphates selon des méthodes directes.....	163
1.1. Préparation du composé 3'-OAc-dA (33).....	164
1.2. Synthèse du triphosphate de la dA.....	166
II. Essai de Synthèse des analogues de triphosphates à partir des analogues monophosphates.....	168
2.1. Synthèse des monophosphates de la 8vdA et de la 8edA (8vdA-MP et 8edA-MP).....	168
2.2. La chimie des phosphonates, une alternative à la chimie des phosphoramidites ?.....	176
2.3. Synthèse des nucléosides monophosphates sur support solide.....	189
2.4. Synthèse des analogues boranophosphates.....	197
2.5. Synthèse des analogues triphosphates de la dA.....	201
C. Conclusion.....	204

Partie expérimentale

CHAPITRE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Rappels préliminaires sur la structure de l'ADN

1.1 Structure de l'ADN

L'acide désoxyribonucléoside ou ADN, est formé de deux brins d'hélice complémentaires, reliés par des liaisons hydrogènes de type Watson-Crick. L'unité de base de l'ADN est le désoxyribonucléoside formé d'une base purique (A et G) ou pyrimidique (C et T) lié à un désoxyribose par une liaison C-N (figure 1).

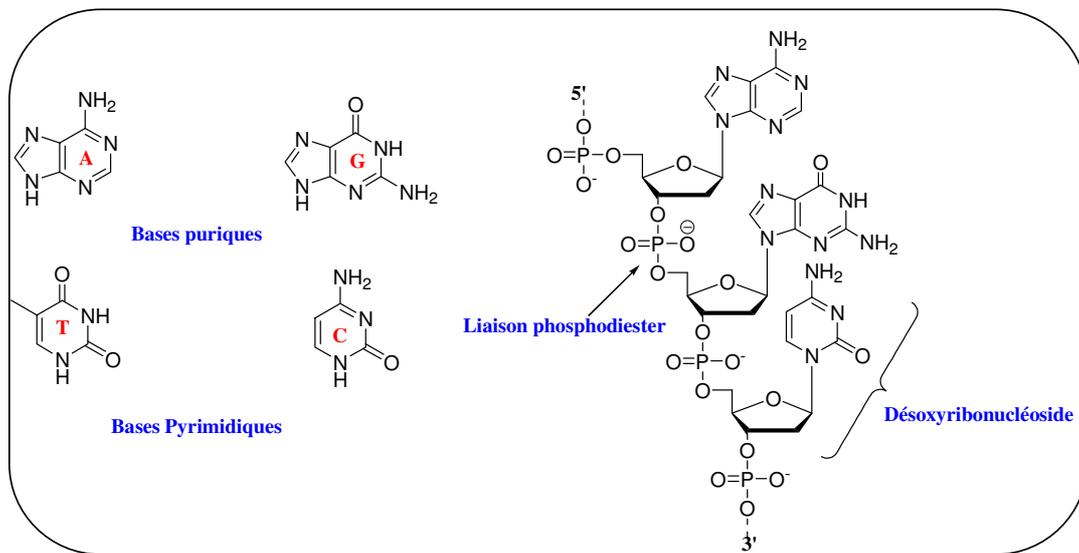


Figure 1: Structures des différentes bases nucléiques et d'un brin d'ADN.

L'enchaînement de ces unités est assuré par des liaisons phosphodiester. Formé d'une succession de nucléosides, l'ADN peut adopter trois conformations distinctes : A, B et Z (figure 2).

Ainsi en fonction de la composition en bases, des conditions physiologiques (hydratation, salinité), l'ADN adoptera l'une des trois conformations.

La forme la plus courante dans les conditions physiologiques est la forme B; l'hélice possède 10 nucléotides par tour, tous de conformation C2'-endo/ *Anti*. Les bases sont situées dans un plan perpendiculaire à l'axe de l'hélice d'ADN; on distingue alors deux sillons profonds l'un majeur, l'autre mineur.

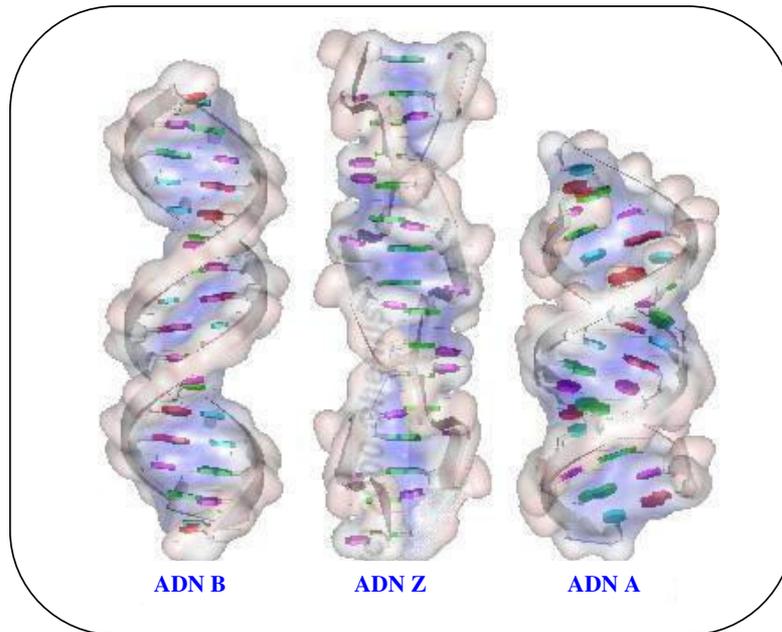


Figure 2: Différentes formes adaptées par l'ADN, A, B ou Z.

La forme A est quelques fois observée dans certaines régions de l'ADN surtout en présence de forte concentration en ions Mg^{2+} ou lorsque le taux d'hydratation diminue. Elle est également observée dans certains complexes ADN/protéine. Elle possède 11 nucléotides par tour d'hélice, tous de conformation C3'-endo/ *Anti*. On distingue également deux sillons, l'un étroit et profond, l'autre large et superficiel.

Quant à la forme Z, pour zigzag, elle est observée dans des séquences d'ADN riches en paire de base G-C. L'ADN Z possède une hélice gauche et un seul sillon profond résultant de l'alternance des nucléotides à base purique (C3'-endo/*syn*) et à base pyrimidique (C2'-endo/*anti*).

1.2. Les différentes conformations adoptées par la base et le désoxyribose

Les différentes formes adoptées par l'ADN ont essentiellement pour origine la conformation de la partie sucre (C2'-endo ou C3'-endo) et l'orientation de la base par rapport au sucre (*syn* ou *anti*) (figure 3).

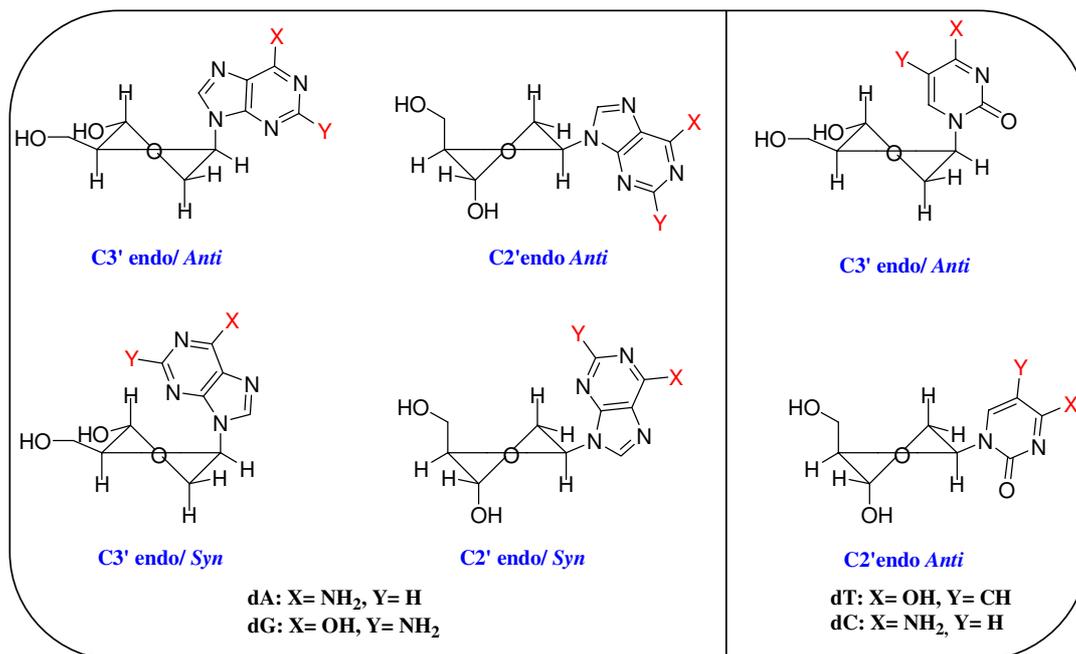


Figure 3: Les différentes conformations possibles que peut adopter un nucléoside dans l'ADN.

L'orientation de la base par rapport au sucre peut être soit *syn* soit *anti*. La conformation *anti* permet à la base d'établir des liaisons hydrogènes de type Watson-Crick avec le brin complémentaire alors qu'en orientation *syn* ce sont les interactions Hoogsteen qui priment. Quant à la conformation du sucre, elle sera déterminée en fonction de l'orientation des carbones C3' et C2' du désoxyribose. On définit ainsi les conformations C3' ou C2' endo lorsque les substituants des carbones sont placés vers le haut du plan moyen du cycle tétrahydrofurannique et C3' ou C2' exo lorsqu'ils sont respectivement vers le bas.

1.3. Convention de numérotation.

Pour une meilleure compréhension du manuscrit, la convention de numérotation de la base et du désoxyribose est rappelée ci-dessous. Les carbones et les azotes du cycle de la base sont numérotés normalement (1, 2, 3...) alors que ceux du désoxyribose, sont identifiés par l'exposant prime (1', 2', 3'...) (figure 4).

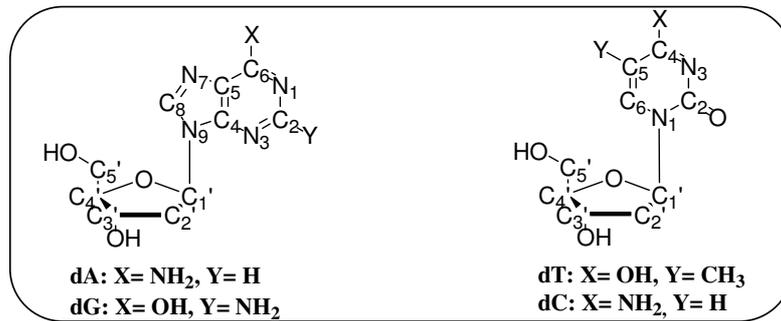


Figure 4 : convention de numérotation des bases puriques (dA et dG) et pyrimidiques (dT et dC).

II. Le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH).

Le SIDA représente une des principales causes de mortalité mondiale. Telle est la réalité à laquelle nous devons faire face. D'autant plus que le nombre de personnes infectées continue d'augmenter de façon inquiétante surtout dans les pays en voie de développement (Afrique, Asie du Sud) pour lesquels l'accès aux traitements reste encore très précaire.

La trithérapie actuelle combinant un inhibiteur de la protéase virale et deux inhibiteurs nucléosidiques de la Rétrotranscriptase virale (RT) a permis d'augmenter de façon considérable l'espérance de vie des malades essentiellement dans les pays riches, mais des progrès sont encore à faire. En effet les traitements actuels sont incapables d'éliminer complètement le virus de l'organisme, ils restent très longs, coûteux, notamment pour les pays en voie de développement avec l'apparition assez rapide de nombreux effets indésirables liés à la prise journalière des médicaments.

Différents problèmes demeurent encore que ce soit en raison du manque de tolérance et d'observance de la part des patients vis-à-vis des traitements ou encore le développement de résistances essentiellement dues à des mutations virales très fréquentes.

Toutes les étapes du cycle de réplication du VIH-1 font l'objet de recherches intenses dans le but d'inhiber la multiplication du virus depuis son entrée dans la cellule hôte jusqu'aux étapes les plus tardives de maturation virale. Ainsi, différentes molécules actives sont utilisées lors des traitements cliniques et diminuent considérablement la mortalité des patients atteints par le SIDA. Ces progrès sont considérables mais encore insuffisants, notamment à cause de l'augmentation constante du nombre de malades en échec thérapeutiques et ce même après avoir suivi la Thérapie Antirétrovirale Hautement Active (the Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART).

Nous exposerons dans ce premier chapitre l'état des connaissances concernant le VIH, que ce soit ses caractéristiques génomiques et structurales, les différentes enzymes impliquées dans les étapes de réplication du virus et nous accorderons une attention plus particulière aux nombreuses molécules, qu'elles soient déjà approuvées et utilisées en clinique humaine ou en cours de développement.

Nous aborderons dans une dernière partie un des problèmes majeurs dans la lutte contre le VIH et responsable de l'échec thérapeutique d'un très grand nombre de patients à savoir le développement des résistances.

2.1. Le VIH en quelques chiffres.

Les derniers chiffres publiés par ONUSIDA/ OMS [1] dénombrent 38,6 millions de personnes vivant avec le VIH-1 à la fin de l'année 2005. Les chiffres sont assez alarmants (figure 5) : 4,1 millions d'individus ont été infecté par le virus et quelque 2,8 millions de décès liés à la maladie. Les prédictions actuelles indiquent que 45 millions de personnes supplémentaires pourraient être infectées par le VIH dans 126 pays en voies de développement entre 2002 et 2010 si la pandémie continue sa progression avec la même virulence.

Le VIH/ SIDA connaît sa plus grande avancée en Afrique subsaharienne où 70% des cas sont enregistrés alors que la population africaine ne représente que 2 à 5% de la population mondiale.

Le combat est d'autant plus difficile que plusieurs sous-types viraux sont à éradiquer : il existe de nombreux rétrovirus réponsables d'immunodéficience mais seul deux virus, les VIH de type 1 et de type 2 (VIH-1 et VIH-2) infectent l'Homme. Il existe aussi plusieurs Virus d'immunodéficience simienne (SIV) responsable d'infections chez de nombreuses espèces de singes (chimpanzés, singes verts, mandrill, macaques...)

La classification est d'autant plus difficile que le VIH-1, majoritaire, se subdivise en plusieurs classes ; ainsi trois groupe de VIH-1 sont connus [2] :

- ❖ Les virus de groupe M (Main), majoritaires en Europe, en Amérique du Nord.
- ❖ Le groupe N (non M, non O)
- ❖ Et le groupe O (Outlier).

Des efforts considérables ont été menés dans différents pays pour essayer de mettre à disposition des malades les trithérapies, ainsi la gratuité des antirétroviraux a pu être obtenue

dans des pays tels que le Sénégal mais la maladie continue son avancée surtout en Asie et notamment en Chine où le nombre de personnes contaminées ne cesse d'augmenter.

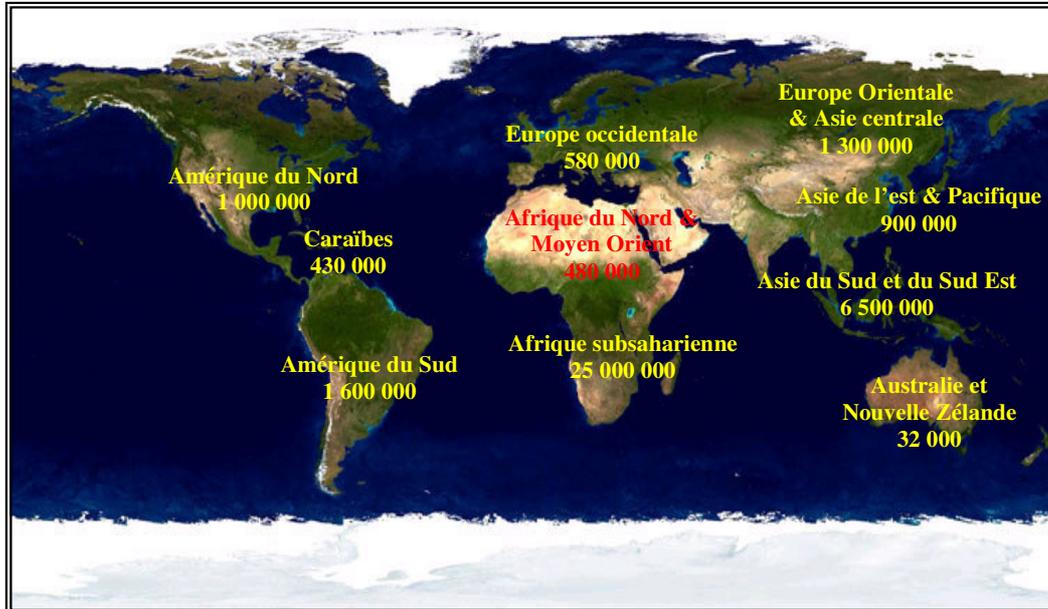


Figure 5: Personnes infectées par le VIH dans le monde fin 2003.

2.2. Historique de la maladie.

Les premiers cas de SIDA ont été observés en 1981 par des cliniciens à New York et Los Angeles au sein de la population homosexuelle masculine. Les patients présentaient souvent un sarcome de Kaposi, normalement très rare chez les personnes adultes mais également des pneumonies à pneumocystis carinii [3] [4]. Il est apparu par la suite qu'ils souffraient également d'une déficience immunitaire accompagnée d'une diminution considérable du nombre de cellules CD4 circulantes. Les premières hypothèses concernant l'origine rétroviral de l'infection furent établies. En 1983, l'équipe du Pr. Luc Montagnier à l'institut Pasteur visualisait et isolait le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) responsable du SIDA [5]. La maladie prendra plus d'ampleur, surtout en France, avec l'affaire du sang contaminé (1984-1985); le SIDA devient alors un problème de santé public auquel il faut faire face assez rapidement. Mais ce n'est qu'en 1987 qu'un premier médicament est disponible: l'AZT (Zidovudine®) qui permettra de diminuer de façon transitoire le taux de mortalité. Déjà synthétisée en 1978 par Lin et al [6], ce n'est qu'en 1985 qu'elle sera étudiée en temps que potentiel inhibiteur du VIH *in vitro* [7]. Des inhibiteurs ciblant d'autres étapes du cycle réplcatif du VIH-1 seront ensuite développés: en 1990 la première anti-protéase a

été présentée à un congrès à Bruxelles: le Saquinavir. Les molécules se succéderont, grâce à une meilleure connaissance du virus et des mécanismes qui régissent sa réplication.

2.3. Modes de transmission.

Le VIH se transmet uniquement par voie sanguine que ce soit lors de rapports sexuels entre partenaires homosexuels ou hétérosexuels ou par voie intraveineuse. Même si le dépistage du VIH est devenu systématique dans les pays développés lors des dons de sang, il reste encore à être financé dans les pays les plus pauvres pour lesquels le coût est encore beaucoup trop élevé.

L'épidémie connaît des records de progression dans la population toxicomane qui reste la plus touchée; la transmission se fait lors de la consommation de drogues injectables et l'échange des seringues entre consommateurs. Même si en France la distribution des seringues s'est démocratisée, des progrès restent à faire ailleurs.

Le dernier mode de transmission à mentionner est la transmission materno-fœtale qui peut avoir lieu soit pendant la grossesse, lors de l'accouchement ou par la suite, par allaitement. Le stade de transmission dépendra en l'occurrence de l'état d'infection de la mère. Ce mode de transmission est inquiétant en Afrique puisque 60% des personnes infectées sont des femmes. On estime que le SIDA a déjà provoqué une augmentation de plus de 19% de la mortalité infantile et de 36% de la mortalité des enfants de moins de 5 ans (WHO World Health report 2004).

2.4. L'agent pathogène.

Le VIH appartient à la famille des Rétrovirus et plus particulièrement au genre des *Lentivirus*. La structure ainsi que l'organisation du virus ont été très vite visualisés grâce à la microscopie électronique [8], et à la cryomicroscopie [9] ce qui a permis de visualiser le virus et ce malgré la nature unique de chaque virion (figure 6). Récemment la structure tridimensionnelle du virus a pu être mise à jour [10] permettant ainsi une meilleure compréhension de l'organisation virale.

La taille d'une particule virale varie entre 120 et 200 nm de diamètre [11]. La membrane lipidique externe est stabilisée par la protéine transmembranaire trimérique TMgp41, produit du gène *Env* [12]. A l'intérieur de la bicouche lipidique, un certain nombre de structures veillent à l'organisation du génome viral et des enzymes associées, pour une meilleure réplication dans la cellule hôte.

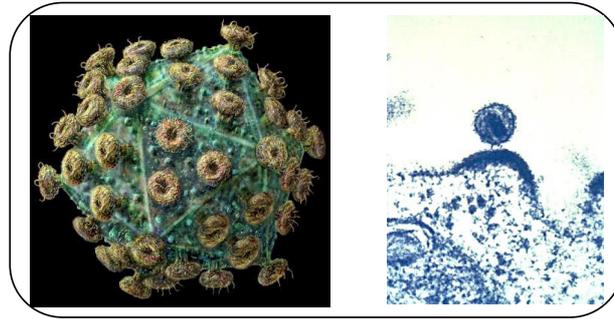


Figure 6: A) Modèle tridimensionnel du VIH basé sur des observations de microscopie électronique; B) Vue au microscope électronique d'une cellule infectée par le VIH-1

Le VIH infecte principalement les cellules du système immunitaire, particulièrement les lymphocytes T CD_4^+ et cause leur destruction, avec une demi vie de moins de deux jours [13]. D'autres cellules sont également touchées, que ce soient les cellules dendritiques de Langerhans [14] [15], ou encore les cellules épithéliales du système digestif [16].

Une fois que le virus a pénétré dans la cellule CD_4^+ , il se réplique de façon massive et continue (1 à 10 milliards virus produit par jour) activant de la production des lymphocytes CD_4^+ et CD_8^+ dont le rôle sera d'endiguer la multiplication virale. On assiste à une destruction progressive des lymphocytes CD_4 , accompagnée d'une diminution de leur production. Ce premier stade de la maladie est la Primo-infection (figure 7). Deux évènements vont alors suivre et se produire en parallèle: d'une part la remontée des CD_4 , qui aura pour conséquence logique la diminution progressive de la réplication virale.

Le niveau des cellules CD_4^+ et la charge virale atteignent alors un niveau constant ; cette phase est asymptomatique et peut durer plusieurs mois, voir des années. L'évolution de la maladie vers le stade SIDA sera caractérisée par une remontée fulgurante de la charge virale et une forte diminution des cellules CD_4^+ infectées. Le patient est alors plus sensible, devenant sujet à des co-infections (Hépatites B et C), des atteintes pulmonaires (pneumonie à *pneumocystis carinii*, tuberculose) des atteintes neurologiques (toxoplasmose cérébrale) et des atteintes digestives. Les traitements actuels permettent de prolonger l'espérance de vie des patients atteints par le VIH ce qui en soi, est un progrès considérable, mais le virus n'est pas éradiqué de l'organisme.

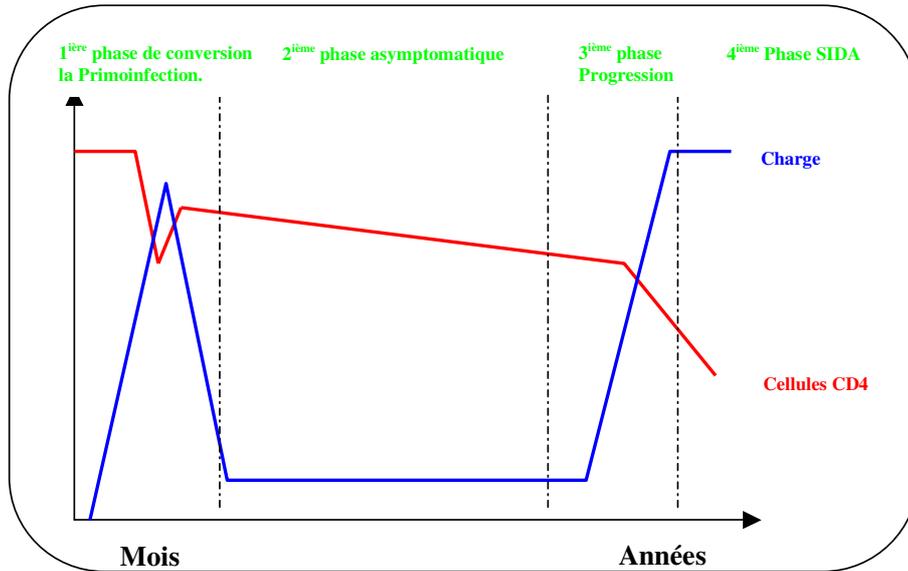


Figure 7: Evolution du nombre de cellule CD_4^+ et de la charge virale, de la primoinfection, au stade SIDA.

III. La particule virale.

3.1. La structure virale.

L'ensemble des *Lentivirus* possède une enveloppe formée d'une bicouche lipidique provenant de la cellule hôte. Deux protéines caractéristiques responsables de l'ancrage à la cellule cible, respectivement les protéines SUgp120 et TMgp41, sont présentes à la surface lipidique (figure 8).

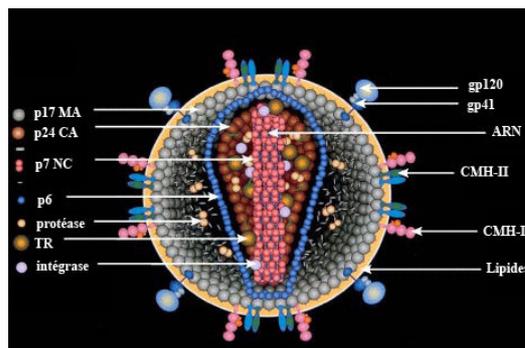


Figure 8: Représentation schématique de la particule virale, avec les principales protéines et enzymes.

La protéine gp120 est formée de 5 régions variables (V1-V5) riches en ponts disulfures [17] et des régions conservées (C1-C5) qui permettraient l'interaction non seulement avec gp41 mais également avec le récepteur de la cellule cible. Que ce soient les régions variables ou conservées, celles-ci sont fortement glycosylées [18]. Finalement, l'ensemble des amino-acides impliqués dans la liaison avec le récepteur CD₄ a été déterminé par mutagenèse dirigée [19] [20].

Dans le cas de la protéine gp41, il n'a pas encore été possible d'obtenir une structure détaillée de la protéine qu'elle soit seule ou en complexe avec gp120. Il a cependant été possible grâce à une technique de « protein-dissection » de visualiser les régions stables de la protéine. On distingue ainsi plusieurs régions fonctionnelles (figure 9) :

- ✓ La région 4-3 hydrophobic repeat, centrale.
- ✓ Le peptide de fusion (Pf), région hydrophobe et riche en acides aminés glycine dont le rôle présumé est de s'insérer à la membrane cellulaire de la cellule hôte lors du phénomène de fusion .
- ✓ L'ectodomaine, délimité par le peptide de fusion et la région transmembranaire, est une région stable, composée de deux fragments peptidiques N51 et C43 dérivés des régions N et C terminales respectivement. Ces peptides s'associent sous forme d'un trimère en adoptant une orientation antiparallèle [21].
- ✓ La région transmembranaire (Rt).

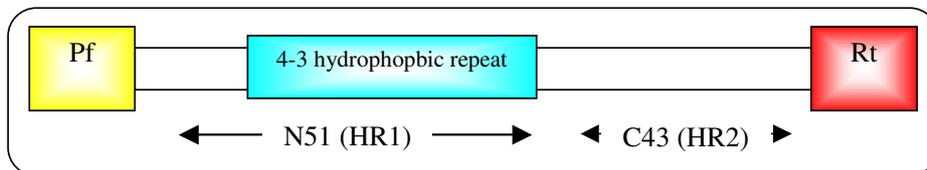


Figure 9: Différents peptides identifiés dans gp41.

Cette structure trimérique de la protéine gp41 sera également associée de façon non covalente à gp120 [22].

La bicouche lipidique contient également des protéines membranaires issues de la cellule hôte, telles que des antigènes du complexe d'histocompatibilité et d'autres protéines cellulaires qui seront incorporées dans les virions (actine, topoisomérase I, UNG-2...).

Le génome viral sous la forme d'un dimère de molécule d'ARN monocaténaire est encapsidé à l'intérieur de la particule et sera stabilisé grâce à des interactions avec la protéine de la nucléocapside, NCp7.

Le virus possède une organisation structurale des plus élaborée, avec trois enzymes spécifiques, indispensables à la réplication, l'intégration dans le génome de la cellule hôte et la maturation des particules virales. On distingue ainsi la Rétro Transcriptase (RT), l'Intégrase (IN), et la Protéase virale, intimement liées au génome viral.

3.2. Le cycle de réplication.

Dès que la particule virale se fixe à sa cellule cible, se succèdent une multitude d'étapes, représentées dans le schéma 1, qui permettront au virus de se multiplier.

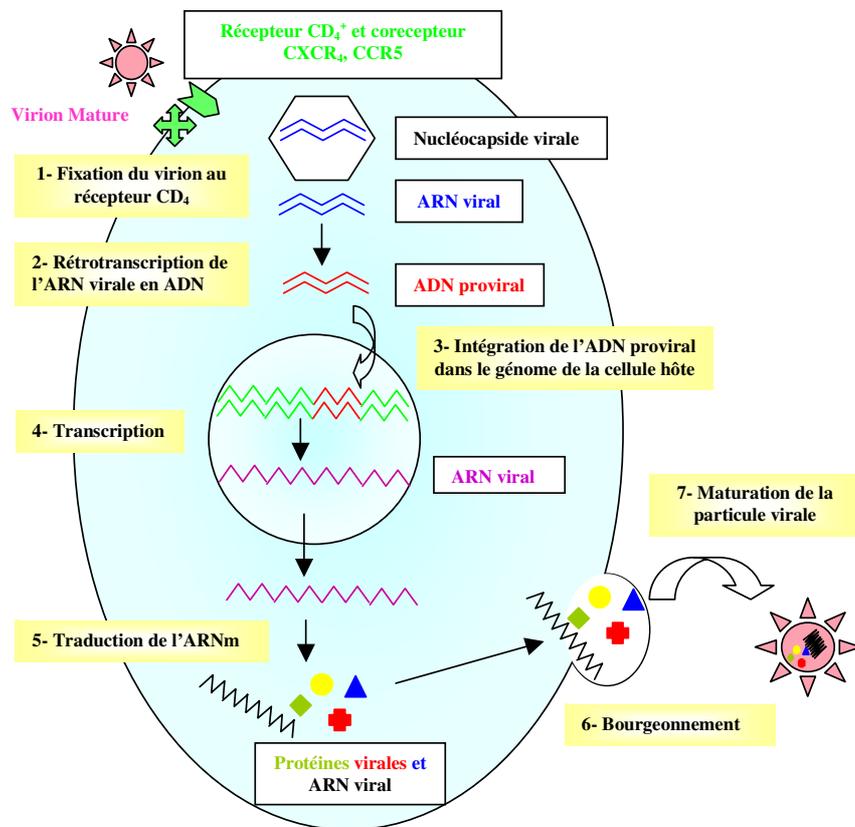


Schéma 1: Représentation Schématique du cycle de réplication virale.

3.2.1. L'entrée dans la cellule.

La première étape dans le processus d'entrée du virus dans la cellule cible est l'interaction entre la glycoprotéine membranaire gp120, présente au niveau de l'enveloppe externe du virion et les récepteurs CD₄ de la cellule hôte [23]. La structure cristallographique du complexe formé par la protéine gp120, le récepteur CD₄ et un anticorps monoclonal neutralisant a été établie [24]. Des modifications conformationnelles au niveau de la protéine

gp120 ont lieu dont le rôle serait de favoriser l'établissement d'interactions supplémentaires notamment avec les co-récepteurs CCR₅ et CXCR₄.

Ces co-récepteurs appartenant à la famille des protéines G à sept domaines transmembranaires [25] sont spécifiques des chimiokines, petites protéines dont le rôle est d'attirer et de stimuler les cellules du système immunitaire lors des processus d'inflammation chronique [26].

Il apparaît notamment que les corécepteurs CCR₅ jouent un rôle essentiel dans l'infection par le VIH, puisque des cellules de personnes homozygotes chez lesquelles 32 paires de bases du gène de CCR₅ ont été éliminées, ne peuvent pas être infectées par le virus, même après plusieurs expositions au virus. Ces personnes ne représentent néanmoins que 1% de la population [27].

Les co-récepteurs CXCR₄ quant à eux, sont spécifiques des cellules T [28] [29].

Ces interactions, ainsi que les changements ayant lieu à la suite de l'interaction gp120/CD₄ et les corécepteurs, permettent à la glycoprotéine gp41, par le biais des portions HR (Heptad Repeat) de s'accrocher à la membrane cellulaire mais également d'induire la fusion des deux membranes [30] (figure 10) .

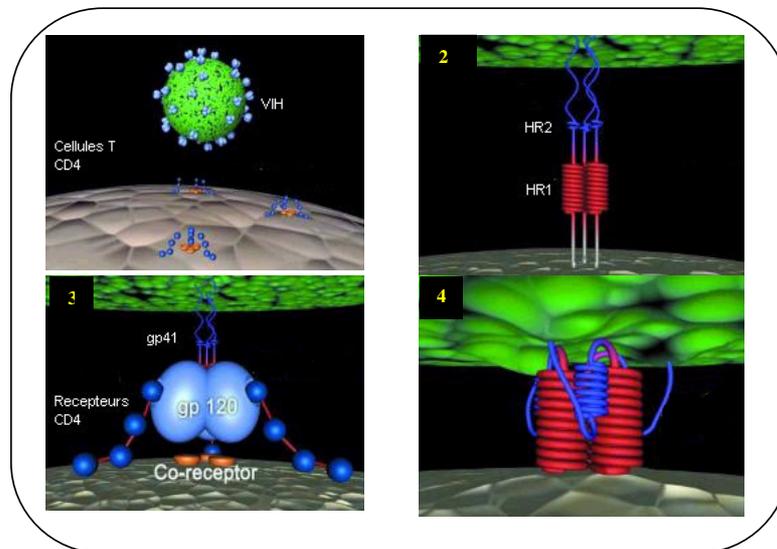


Figure 10: Mécanisme de fusion membranaire. (1) Juxtaposition de la particule virale et de la cellule hôte. (2) Libération de gp120 et fixation de gp41. (3) Fusion membranaire. (4) Repliement de HR2 [31].

On distingue ainsi au moins trois états conformationnels par lesquels passeraient gp41 :

1- Lorsque le virus est libre, gp41 adopterait sa forme native, stabilisée par des interactions avec gp120 [32].

2- Un état intermédiaire en épingle à cheveux.

3- Un état final énergétiquement stable, au niveau duquel deux copies des peptides HR1 et HR2 s'associent pour former le complexe trimérique hélicoïdal [33, 34].

Il en résulte alors l'apparition dans la membrane cellulaire de pores assez larges par lesquelles pourra pénétrer la nucléocapside virale.

3.2.2. Devenir dans la cellule hôte.

Le virus se désencapside dans le cytoplasme cellulaire libérant alors son matériel génomique sous la forme de complexe ARN/protéines.

La Rétro-transcriptase (RT) du VIH, première enzyme à intervenir dans le cycle répliatif, intervient alors pour rétrotranscrire l'ARN viral en ADN, en suivant un mécanisme qui sera illustré par la suite. L'ADN proviral nouvellement synthétisé sera intégré dans le génome de la cellule hôte par le biais de l'Intégrase virale. Un ADN viral peut être entièrement synthétisé au bout de 6 heures après l'entrée du virus dans la cellule, mais son intégration pourra durer plus longtemps [35].

Le virus utilise alors la machinerie de transcription de la cellule hôte pour synthétiser l'ARN génomique. Cet ARN peut subir de multiples réactions d'épissage alternatif qui génèrent de nombreux ARNm viraux qui sont traduits dans le cytoplasme, produisant ainsi les protéines virales. L'ARN génomique est lui-même utilisé comme messenger pour la synthèse des précurseurs Gag et Gag-Pol.

Dans un souci de clarté, n'est représenté dans le schéma que la partie concernant le virus. L'ensemble des réactions impliquant les molécules cellulaires (ADN, ARN, ARNm) sera omis.

3.2.3. Libération de la particule virale.

Les protéines virales subissent une maturation additionnelle, catalysée par la protéase virale. Cette dernière enzyme à intervenir dans le cycle de répliation joue un rôle crucial lors des étapes de bourgeonnement et de maturation virale. Le virion mature, une fois libéré, pourra infecter d'autres cellules saines.

3.3. Le génome viral.

Contenu dans la capsid virale le génome viral est formé de deux brins d'ARN monocaténaire dont la longueur peut atteindre 9,8 kilobases, avec aux extrémités du provirus une séquence répétée connue sous le nom de séquence LTR (Long Terminal Repeat). Le génome viral code pour au moins 9 protéines (figure 11).

Ces protéines sont regroupées en 3 classes :

- ✓ Les protéines structurales *Gag*, *Pol* et *Env*
- ✓ Les protéines régulatrices *Tat* et *Rev*.
- ✓ Les protéines accessoires *Vpu*, *Vpr*, *Vif* et *Nef*.

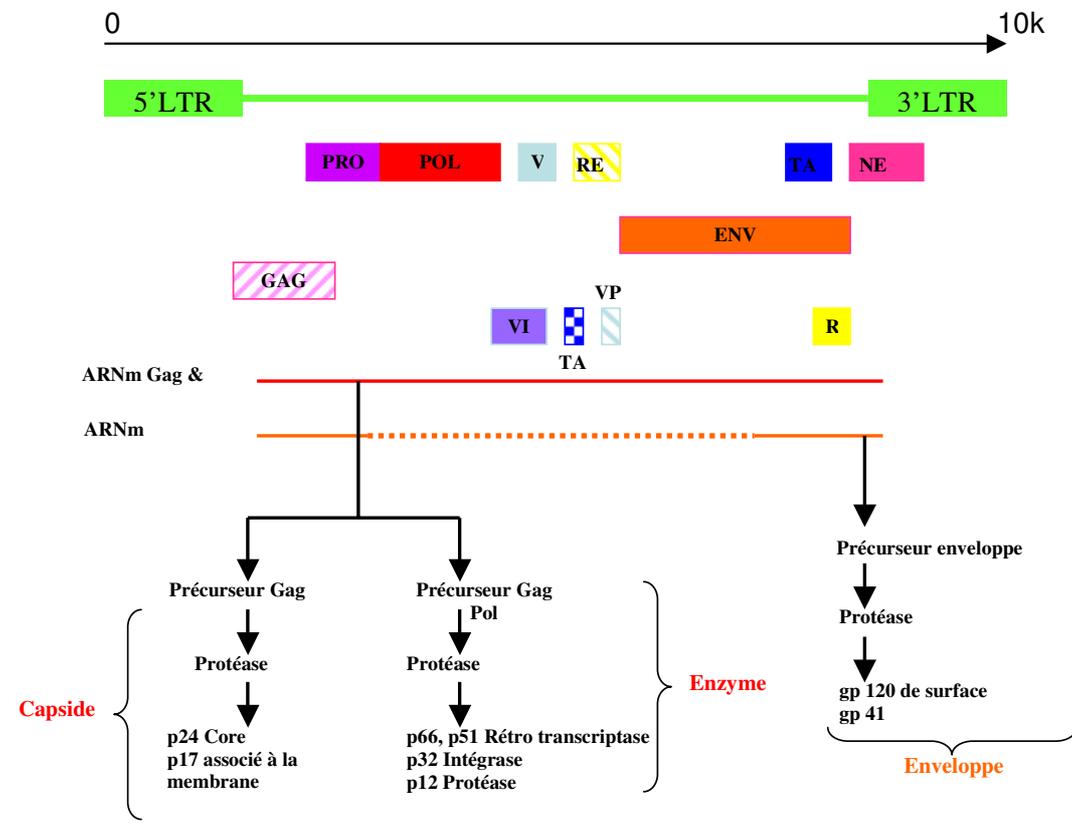


Figure 11: Structure du génome du VIH.

3.3.1. Les protéines structurales.

On dénombre trois gènes codant pour des protéines structurales : les gènes *gag*, *pol* et *env*. Ils sont exprimés en tant que précurseurs polyprotéiques et sont maturés par clivage protéolytique.

Le gène *pro* code pour la protéase virale, une aspartate protéase dimérique. L'activité de cette enzyme est nécessaire au clivage des précurseurs des polyprotéines *gag* et *gag-pol* pendant l'étape de maturation virale. Le gène *pol* code pour la Rétro Transcriptase qui possèdent une activité ADN polymérase ADN et/ou ARN dépendante. L'ensemble des protéines issues du gène *pol* peuvent être retrouvées dans la capsid du virion libre.

Le gène *env* code pour la protéine gp160 (160 kD), qui est un précurseur des protéines de l'enveloppe virale. Une étape supplémentaire de glycosylation sera nécessaire pour que le caractère infectieux du virion s'exprime. Ainsi 25 à 30 unités glycosidiques seront additionnées sur les résidus Asn. La protéine gp160 est clivée par une protéase cellulaire pour générer gp41 et gp120, deux protéines responsables de l'ancrage du virus à la cellule hôte.

3.3.2. Les protéines régulatrices.

La deuxième classe de protéines virale, comprend les protéines régulatrices, **Tat** et **Rev**.

Tat est un activateur de la transcription virale, nécessaire à la réplication du VIH [36] [37]. *Tat* peut être sous deux formes de 72 ou 101 acides aminés selon que l'épissage de l'ARNm s'est faite de manière totale ou partielle. Les deux formes sont actives et peuvent être retrouvées dans la cellule infectée. Tat agit comme activateur de la transcription en se liant à une région non codante de l'ARN viral, la région TAR (**T**ans-**A**cting **R**esponse element), située à l'extrémité 5' de l'ARN viral [38] [39]. L'interaction tat/TAR avec l'aide de facteurs cellulaires permet d'augmenter la transcription initiée dans la région LTR, d'un facteur 1000.

Le mécanisme d'action de Tat a été élucidé : elle agit comme un activateur de la phase d'initiation de l'élongation lors de la transcription et assure la production de transcripts correspondant à la totalité du génome du VIH-1 [40] [41]. Tat requiert néanmoins la présence d'un cofacteur cellulaire, la Cycline T1 qui en se liant à Tat, forme un complexe reconnu par la boucle de TAR [42].

Tat semble jouer un certain nombre de fonctions qui contribue à la pathogénèse. En effet elle pourrait induire ou contribuer à la mort cellulaire des lymphocytes T par apoptose [43] [44] soit en activant un certain nombre de gènes cellulaires tel que le facteur β de nécrose tumoral (TNF β) [45] soit en désactivant d'autres gènes tel que le gène bcl-2 [46].

Rev quant à elle est une protéine de liaison spécifique à l'ARN, de 13kD. Elle se lie à une région de 240 paires de bases de l'ARN viral appelée Rev Response Element (RRE). Cette interaction est à l'origine de l'exportation des ARNs non-épissé et mono-épissé du noyau, vers le cytoplasme [47]. La présence de *Rev* est indispensable à la réplication virale.

3.3.3. Les protéines accessoires.

La dernière catégorie regroupe les protéines accessoires, mais non moins primordiales à générer des virions actifs. On distingue ainsi les protéines **Nef**, **Vpr**, **Vpu** et **Vif**.

La première protéine est **Nef** (negative factor), protéine de 27 kD myristoylée dont le nom provient du rôle négatif qu'on lui a accordé dans les premières études, à savoir qu'elle supprimerait non seulement la réplication mais également l'activité transcriptionnelle de la région LTR [48] [49]. Elle représente une des premières protéines à être détectée dans la cellule, en suivant l'infection virale. Elle agit essentiellement de façon à désactiver l'expression des récepteurs CD₄ à la surface de la cellule en induisant leur endocytose et leur dégradation par les lysosomes [50]. Nef perturbe également l'activation cellulaire des lymphocytes T et stimule par la même occasion le caractère infectieux du VIH [51].

La deuxième protéine accessoire, **Vpr**, est une protéine qui sera incorporée dans les particules virales (~100 copies) pour faciliter l'infection des cellules saines en dirigeant le complexe de préintégration (CPI) vers le noyau de la cellule cible [52].

Vpu, la troisième protéine d'intérêt, dont la particularité est de n'avoir été décelée qu'au niveau de VIH-1 et plus particulièrement au niveau du cytoplasme des cellules infectées. La protéine Vpu est un polypeptide de 16kD, phosphorylé et membranaire [53]; Issue du même ARNm codant pour Env, elle est cependant retrouvée à un niveau 10 fois moins important que celle-ci et ce en raison d'une traduction non efficace du codon d'initiation. On lui accorde néanmoins deux fonctions bien distinctes. D'une part d'engendrer une dégradation des récepteurs CD4 dans le réticulum endoplasmique [54] [55] et d'autre part d'augmenter le taux de libération des virions à la surface des cellules infectées [56].

Finalement **Vif**, polypeptide de 23kD essentiel à la réplication virale dans les lymphocytes du système périphérique sanguin, les macrophages et certaines lignées cellulaires [57]. Le VIH-1 peut se répliquer en absence de Vif dans certaines lignées cellulaires appelées permissives. Le caractère permissif ou non-permissif dépend de la cellule qui produit le virus et non de celle qui est infectée. Vif neutralise deux protéines produites dans les cellules non permissives, APOBEC-3G et APOBEC-3F, qui inhibent la réplication virale en désaminant les cytidines lorsqu'elles sont incorporées dans les particules virales [58-61].

Il est à noter que la régulation des différents gènes, résulte d'une combinaison aussi bien de facteurs viraux que cellulaires. Elle pourra avoir lieu au niveau transcriptionnel ou traductionnel. Les gènes codés dans un premier temps tels que *Tat*, *Rev* et *Nef* seront exprimés

de façon Rev indépendante, alors que les gènes *Gag*, *Pol*, *Env*, *Vpr*, *Vpu* et *Vif* requiert la présence de la protéine Rev afin d'être exprimés et dirigés vers le cytoplasme.

3.4. Les enzymes virales.

Trois enzymes virales interviennent dans la réplication du virus lorsque celui-ci se trouve dans la cellule hôte :

La Rétro transcriptase (RT)

L'Intégrase (IN).

La Protéase virale (PV).

3.4.1. La Rétro Transcriptase (RT).

3.4.1.1. Structure et fonction

La première enzyme à intervenir une fois que le virus est libéré dans le cytoplasme, est la **Rétro Transcriptase (RT)**. Elle sera présente dans le cytoplasme de la cellule hôte sous la forme d'un précurseur *Gag-pol*, qui par clivage protéolytique donne une sous-unité homodimérique constitué de deux molécules p66. Cette sous-unité possède deux domaines ; un domaine polymérase (ADN ou ARN dépendant) et un autre lui conférant son activité RNaseH. Un clivage protéolytique supplémentaire d'un des domaines RNaseH de la sous-unité p66 permet d'atteindre l'hétérodimère mature p66 / p51.

Il est intéressant de noter que le domaine p66 de la RT présente une analogie structurale avec le domaine ADN polymérase d'*Escherichia coli* laissant penser à la présence d'un motif structural conservé parmi les polymérases.

La structure cristallographique de la RT en présence d'un inhibiteur non-nucléosidique, la Névirapine, a permis de mettre en évidence la présence de quatre domaines communs aux deux sous-unités. On distingue ainsi les domaines « paume », « pouce », « doigt » et « connecteur » par analogie entre la structure de la RT et une main droite [62].

Le domaine « doigt » est formé de trois hélices α et de plusieurs feuillets β . La « paume » est formée de 5 feuillets β qui établissent des liaisons hydrogène avec 4 feuillets β positionnés à la base du domaine « pouce ». Le domaine « connecteur » est formé quant à lui de feuillets β et de deux hélices α assurant la connexion entre les domaines RNaseH et polymérase. Dans cette conformation de main ouverte, les résidus catalytiques du domaine polymérase Asp110, Asp185 et Asp186 sont exposés.

La sous-unité p51 quant à elle possède les mêmes structures primaires et secondaires mais sa structure tertiaire est totalement différente. En effet les « doigts » sont complètement repliés sur la « paume » rendant les résidus catalytiques inaccessibles. Même si la sous-unité p51 ne présente qu'une faible activité catalytique [63], elle est néanmoins importante pour maintenir la structure générale de la RT notamment en interagissant avec le domaine RNaseH de l'hétérodimère.

Plusieurs structures cristallographiques de l'enzyme ont été obtenues (figure 12), que ce soit sous la forme libre [64-66], en présence d'un inhibiteur non nucléosidique, tel que la névirapine [62, 67, 68], à 3,5 Å de résolution et sous la forme d'un complexe RT/ ADN double brin / fragment Fab monoclonal à 3,0 Å de résolution [69, 70].

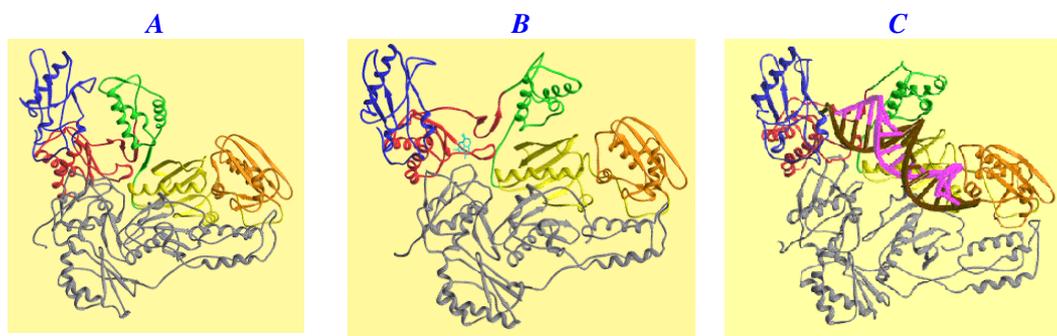


Figure 12: Structures cristallographiques des différents complexes de la RT [71].

A) RT seule; B) complexe RT/Névirapine ; C) complexe RT/ADN double brin. p51 (gris), domaine RNaseH (orange), "connecteur" (jaune), "paume" (rouge), "doigts" (bleu), "pouce" (vert).

3.4.1.2. Production de l'ADN proviral.

La RT possède une activité ADN polymérase, ARN et ADN dépendante, ce qui lui permet de transformer le matériel génétique du virus constitué d'ARN, en ADN double brin. (schéma 2).

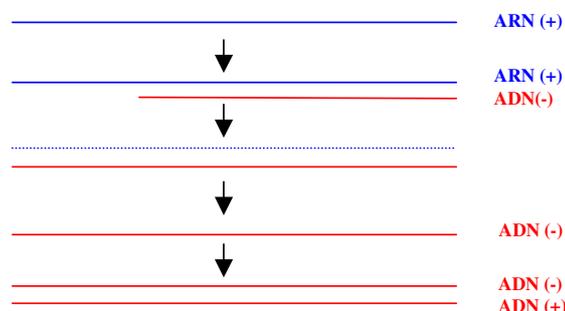


Schéma 2: Représentation simplifiée de la rétrotranscription.

Le mécanisme de la rétrotranscription est en fait beaucoup plus complexe et certaines étapes sont encore mal connues et sujet à un débat. Il est représenté dans le schéma 3 qui suit.

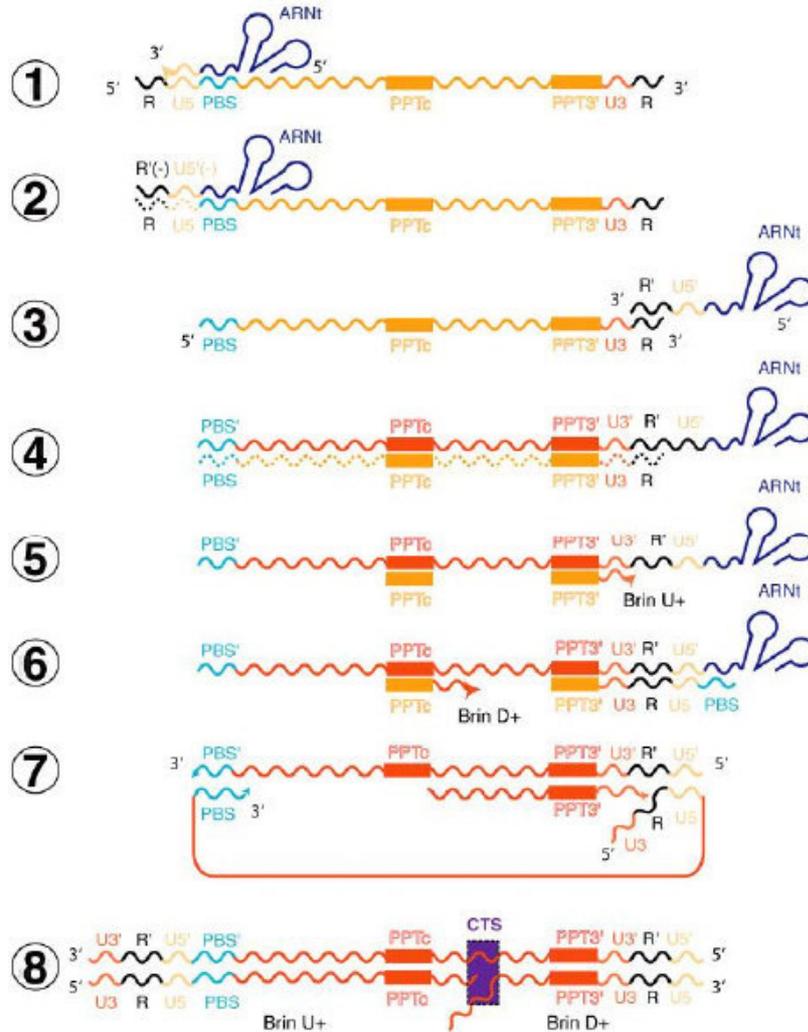


Schéma 3: Mécanisme de répllication de l'ADN viral par la RT [72].

La rétrotranscription est initiée à partir d'un ARN de transfert servant d'amorce l'ARNt^{Lys3} qui par le biais de son extrémité 3' s'associe à la région PBS à proximité de l'extrémité 5' de l'ARN viral. La RT catalyse alors l'élongation de l'amorce pour aboutir à la synthèse d'un simple brin d'ADN (-) qui contient une copie des régions "Repeat" (R) et "Unique" (U5) de la séquence d'ARN. Une fois le simple brin d'ADN (-) synthétisé, l'activité RNaseH de la RT, dégrade la région 5' de l'ARN qui vient d'être rétro-transcrit.

S'en suit alors un premier transfert du brin ADN (-), avec l'amorce ARN_t fixée, vers l'extrémité 3' de l'ARN viral. Ce transfert de brin est rendu possible par la présence de la région R à l'extrémité 3' de l'ARN viral, qui est complémentaire du simple brin d'ADN (-).

Ce premier transfert implique une autre protéine importante au virus, la protéine de la nucléocapside (NCp7), essentiellement connue pour ses propriétés chaperonnes. Le mécanisme exact par lequel la protéine NCp7 agit n'est pas totalement connu, mais son rôle est directement lié à son activité chaperonne de l'ARN. Il a été montré que la protéine NCp7 en plus de contribuer au transfert de brin [73-77], faciliterait la renaturation du brin d'ADN complémentaire [78]. Elle facilite également la reconnaissance entre l'ARN_t amorce et la séquence PBS [79], et réduit les pauses effectués par la RT lors de l'élongation [80, 81].

Après le premier transfert de brin, l'ADN (-) est allongé et les séquences d'ARN génomiques sont progressivement dégradées par la RNaseH. La synthèse du brin d'ADN (+), complémentaire, peut alors commencer; elle est initiée par une amorce polypurine (PPT). La RT copie les séquences 3' du brin (-) à savoir u3, r, et u5, de même que les 18 nucléotides de l'extrémité 3' et provenant de l'ARN_t^{Lys3} complémentaires du PBS. La RNaseH intervient une dernière fois pour éliminer la région PPT ainsi que l'ARN_t amorce. Un deuxième transfert de brin a alors lieu: le simple brin d'ADN (+) est transféré vers l'extrémité 3' de l'ADN (-). On parle alors du transfert de brin (+). Ce transfert de brin est facilité grâce à la complémentarité des séquences PBS (-) et (+) aux extrémités 3' des brins d'ADN.

Lors de ce transfert, les deux brins d'ADN passeraient par un état circulaire temporaire.

3.4.1.3. Elongation du brin d'ADN.

En s'intéressant plus particulièrement à l'activité polymérase de la RT impliquée dans la synthèse du brin d'ADN (+), plusieurs étapes peuvent être décrites (schéma 4). Tout commence par l'association entre l'enzyme libre (E) et le brin d'ADN (amorce : matrice). Cette association aura pour conséquence d'induire des modifications conformationnelles au niveau de l'enzyme, passant d'une forme fermée à une forme ouverte (E') [64, 66, 69, 82, 83]. Le complexe ouvert accueille le nucléotide entrant [83] au niveau du site de liaison du nucléotide plus communément appelé « site N ». Cette interaction ne peut avoir lieu que si l'extrémité 3' du brin amorce se trouve dans le « site P » éloigné du « site N » d'une paire de bases [84].

Le passage du complexe ouvert (E'/ADN/dNTP) à un complexe activé fermé (E*/ADN/dNTP), est vraisemblablement l'étape limitante du processus d'élongation [85, 86].

On assiste alors à l'attaque nucléophile de l'extrémité 3'OH du brin amorce sur le phosphate α électrophile du dNTP créant ainsi une nouvelle liaison phosphodiester. Cette réaction est accompagnée de la libération de phosphore inorganique (PPi) qui pourra être libéré à la suite de l'ouverture du domaine « doigt » de la RT. A l'issue de cette réaction, le dernier nucléotide est au niveau du « site N ». Une étape de translocation du brin d'ADN du « site N » vers le « site P », permet l'addition d'un nucléotide supplémentaire. Le PPi libéré n'entre pas en compétition avec le dNTP en raison d'une affinité supérieure du dNTP vis-à-vis de l'enzyme.

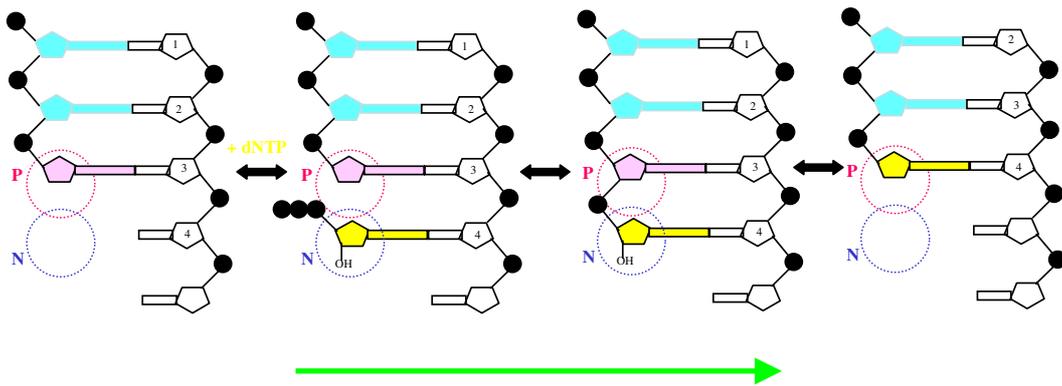


Schéma 4: Mécanisme d'élongation de l'ADN viral [87].

3.4.2. L'Intégrase virale.

Le double brin d'ADN synthétisé par la RT est pris en charge par une deuxième enzyme virale, l'**Intégrase** (IN) dont la fonction est de l'intégrer au sein de l'ADN chromosomique de la cellule cible.

L'IN est une enzyme de 32kD, dimérique, formée de trois domaines qui apparaissent complètement indépendants les uns des autres autant d'un point de vue structural et fonctionnel. L'état d'oligomérisation de la forme active de l'intégrase reste controversé : il s'agit d'un dimère, voire d'un tétramère. Chaque monomère est formé d'une extrémité N terminale contenant un motif HHCC liant du Zinc, un domaine catalytique central et une extrémité C terminale, liant l'ADN de façon non spécifique (figure 13).

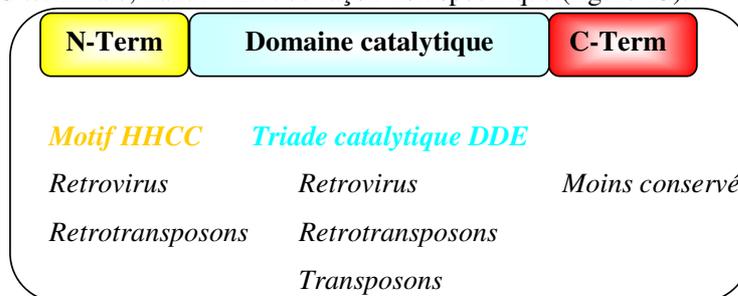


Figure 13: Les différents domaines de l'Intégrase virale.

La structure du domaine catalytique (figure 14) a été déterminée par cristallographie par Davies et al. [88]. Elle a été reprise par Mikol en présence et en absence d'ions divalents [89]. La technique de RMN à l'état solide a été utilisée quant à elle, pour déterminer la structure du domaine N-ter liant le Zn [90] et C-ter liant l'ADN [91, 92]. Les domaines N et C terminaux semblent s'associer sous la forme d'un tétramère, qui serait la forme active de l'enzyme [93].

L'activité catalytique de l'enzyme requiert la présence d'une triade catalytique formée par les résidus Asp⁶⁴- Asp¹¹⁶-Glu¹⁵² (D-D-35-E) coordonnant des ions métalliques Mn²⁺ ou Mg²⁺ [94, 95]. Cette région du site actif semble être très flexible.

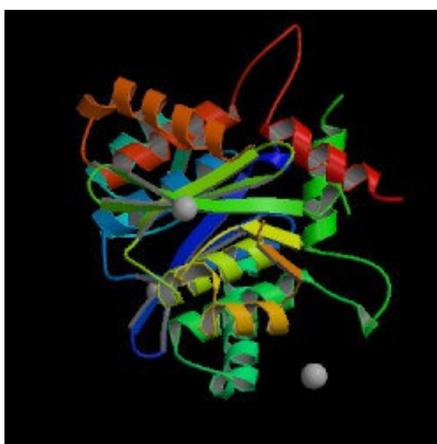


Figure 14: Structure cristallographique du domaine catalytique de l'IN à 2,5 Å en présence d'ions Mg²⁺ (pdb : 1BIU).

L'Intégrase viral du VIH est capable de reconnaître la séquence LTR présente aux extrémités 5' et 3' du double brin d'ADN viral nouvellement synthétisé. Deux, voir trois bases sont alors clivées à l'extrémité 3' de l'ADN viral par l'Intégrase: ce processus est appelé « 3' processing ». Cette étape génère une extrémité CA-3'OH hautement conservée parmi les rétrovirus, les rétrotransposons et les transposons.

L'étape suivante consiste en une succession de deux réactions de trans-estérification qui conduisent à l'insertion de l'ADN proviral au sein de l'ADN cellulaire; c'est l'étape de transfert de brin. Dans le cas du VIH, les sites d'insertion dans l'ADN cible sont séparés par 5 paires de base qui sont dupliquées au cours de l'intégration. Il s'en suit alors une étape de réparation, au cours de laquelle les deux paires de bases non appariées à l'extrémité 5' de

l'ADN viral sont éliminées, les régions en simple brin sont transformées en double brin et les brins d'ADN sont ligaturés. L'ensemble de ces étapes est représenté dans le schéma 5.

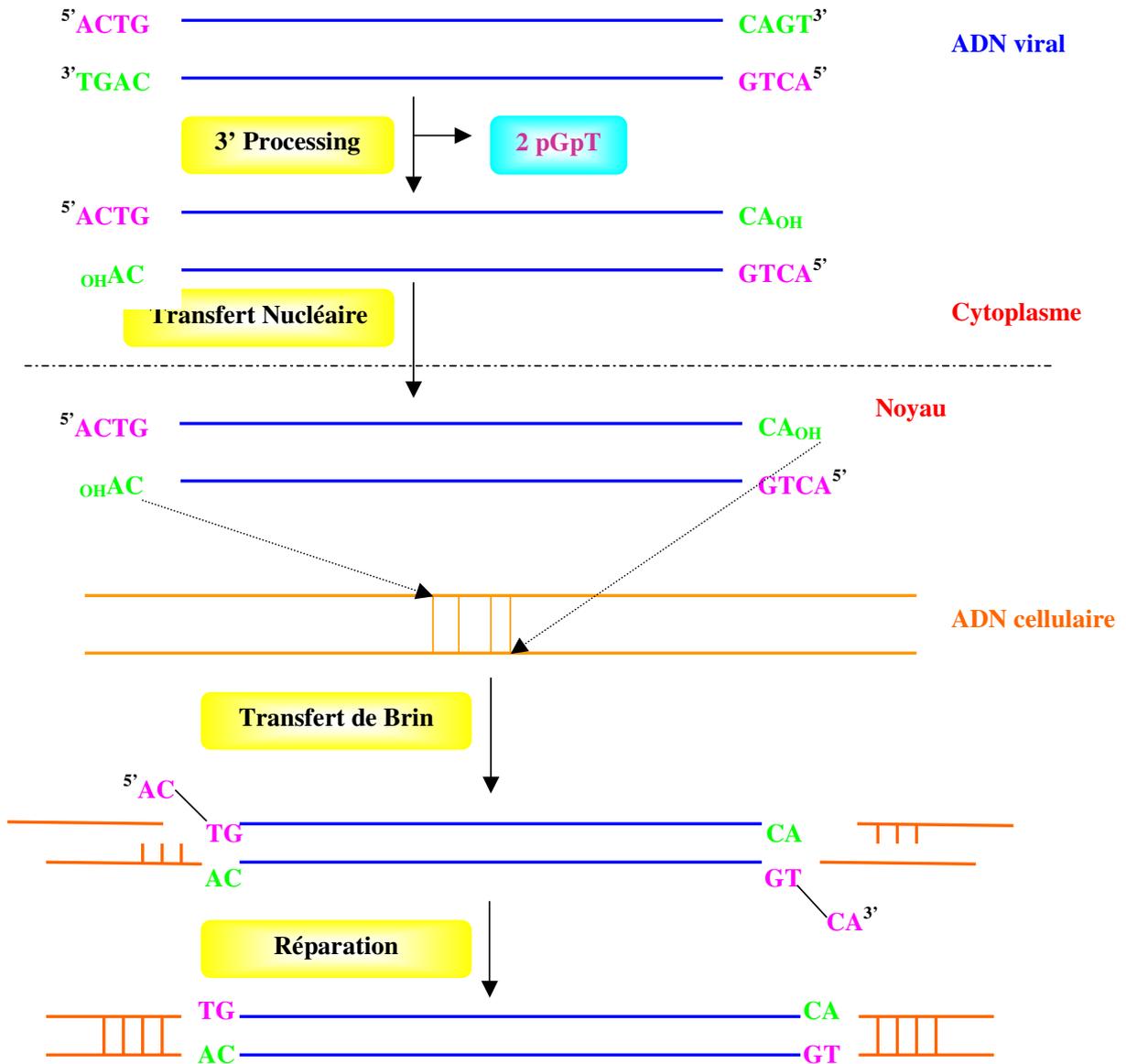


Schéma 5: Mécanisme d'intégration.

Sur un plan moléculaire, l'IN positionne l'extrémité 3'-OH de l'ADN viral de façon à pouvoir effectuer une attaque nucléophile sur la liaison phosphodiester de l'ADN hôte [96].

L'intégrase catalyse l'ensemble des étapes de 3' processing et de transfert de brin, alors que l'étape de réparation semble être catalysée par des enzymes cellulaires [97, 98].

3.4.3. La protéase virale.

L'ultime étape permettant d'aboutir à la particule virale infectieuse est la maturation des protéines virales. Tandis que le précurseur Env est clivé par des enzymes cellulaires, la maturation des précurseurs Gag et Gag-Pol est catalysée par la Protéase virale, première enzyme virale à être caractérisée [99, 100]. Entre 1989 et 1993, plus de 160 structures cristallographiques de la protéase libre, ou en complexe avec un inhibiteur ont été obtenues.

La protéase virale est un homodimère symétrique, de 99 acides aminés, dont la structure est similaire aux aspartates protéases de la famille des pepsines.

Le site actif de l'enzyme (figure 15) est situé à l'interface des deux sous-unités et formé d'une triade catalytique (Asp25- Thr26- Gly27) responsable des réactions de clivage.

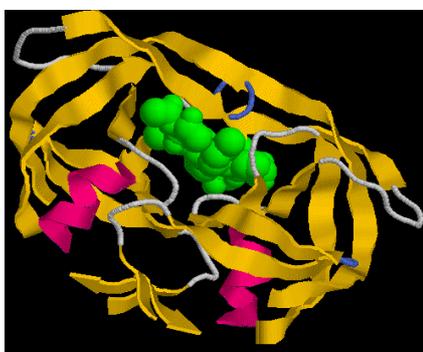


Figure 15: Structure de la Protéase virale complexée à un inhibiteur.

Les aspartates protéases catalysent la réaction d'hydrolyse des liaisons amides selon une catalyse générale acide-base dont le mécanisme est décrit dans le schéma 6.

Les deux résidus acides aspartiques présents au niveau du site catalytique jouent le rôle d'acide et de base et interviennent dans la réaction pour faciliter l'addition d'une molécule d'eau sur la fonction carbonyle de la liaison amide à rompre. On passe alors par un état intermédiaire tétraédrique à haute énergie, stabilisé essentiellement par des liaisons hydrogènes [101].

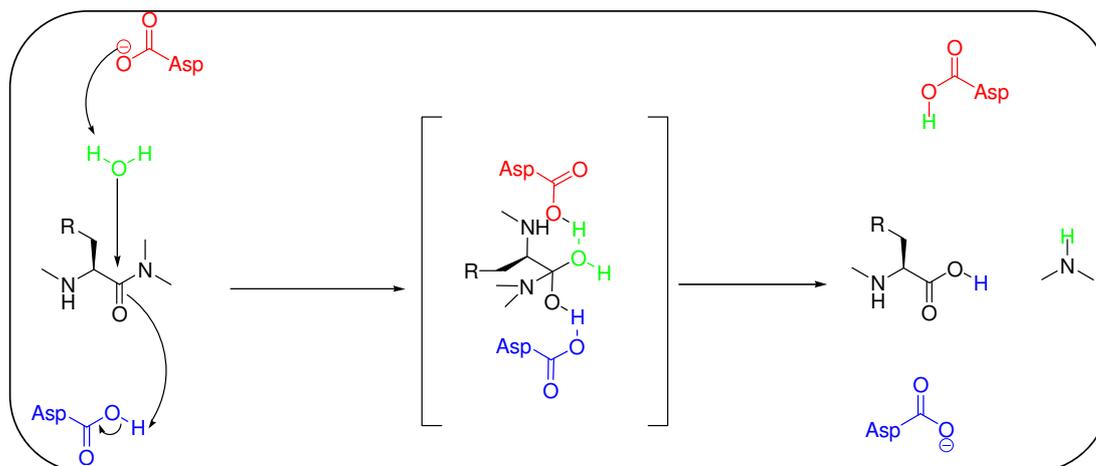


Schéma 6: Mécanisme d'action de la protéase virale, avec formation d'un état intermédiaire.

IV. Les cibles thérapeutiques potentielles et chimiothérapie anti-VIH.

L'ensemble des antiviraux actuellement utilisés dans le traitement du VIH a permis des avancées considérables dans la lutte contre la maladie en diminuant la mortalité et la morbidité. Néanmoins la nécessité de développer de nouvelles molécules thérapeutiques est toujours d'actualité puisqu'un certain nombre de patients sont en échec thérapeutique. Il est alors nécessaire de modifier les combinaisons thérapeutiques pour essayer de contrer le problème des souches résistantes, de diminuer les effets indésirables ou encore dans le but d'améliorer leur capacité à atteindre les réservoirs viraux. Ainsi toutes les étapes du cycle de réplication et d'infection du virus sont des cibles potentielles dans la recherche de nouvelles molécules actives.

4.1. La fusion membranaire.

L'entrée du virion dans la cellule représente depuis quelques années une cible de choix dans la recherche d'un traitement efficace. On s'intéresse dans ce cas à une inhibition extracellulaire durant laquelle on s'affranchit de l'ensemble des barrières membranaires et nucléaires évitant ainsi tous les problèmes liés à la pénétration du composé actif dans la cellule.

Dans le cas de la fusion membranaire où plusieurs événements successifs ont lieu, chacune de ces étapes représente une cible potentielle.

Ainsi l'Enfuvirtide[®] ou **T20** (Fuzeon, laboratoire Roche, figure 16) a été approuvé en mars 2003 comme le premier inhibiteur de fusion membranaire [102]. Peptide de 36 acides aminés dont la séquence est très similaire à la région C-terminale de HR₂ de gp41. Le T20 se lie à gp41 et l'empêche d'adopter sa conformation active permettant la fusion membranaire.

CH₃CO-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Gln-Glu-leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH₂

Figure 16: Séquence de l'Enfuvirtide[®] ou **T20**.

Le T20 a ouvert la voie vers de nouveaux agents antiviraux ciblant la fusion. Ainsi d'autres classes de molécules ont été développées, mais dans un soucis de clarté, seules les plus prometteuses seront présentées.

Le récepteur CD4 représente le premier maillon sur lequel vient se fixer la particule virale. La classe des Cyclo-triaza-disulfonamides (CADA, figure 17) a récemment montré sa capacité à moduler de façon négative l'expression du récepteur au niveau post-traductionnel [103, 104]. Plus de 50 analogues ont été synthétisés montrant une activité sur l'ensemble des sous-types du virus VIH-1, VIH-2 et VIS, en se révélant spécifique des récepteurs CD4 (n'affectant ni CCR5 ou CXCR4).

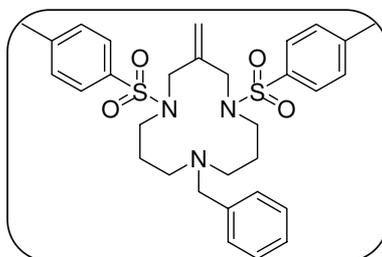


Figure 17: Structure du 9-benzyl-3-méthylène-1,5-di-*p*-toluènesulfonyl-1,5,9-triaza-cyclododécane chef de file de la classe des CADA.

Ils agissent de façon synergique avec l'ensemble des autres classes d'inhibiteurs anti-VIH (NRTIs, NNRTIs, T20, et antagonistes de CXCR4) [105].

Une autre approche consiste à développer des microbicides visant la protéine gp120. On distingue ainsi les extraits GNA isolés de *Galanthus nivalis* et HHA isolés d'hybrides *Hippeastrum*, utilisés surtout dans le but de prévenir une transmission sexuelle de l'agent infectieux [106].

Un autre exemple de microbicide est le cyanovirine-N. Isolé d'une cyanobactérie *Nostoc ellipsosporum*, il présente une forte affinité pour la gp120 libre ou liée au récepteur CD4. Il agirait après fixation à gp120, liée au récepteur CD4 en bloquant l'interaction entre gp120 et CXCR4 [107].

Le complexe CD4-gp120 est également la cible de molécules actives, telle que le **BMS 806** (figure 18) qui se lie à la gp120 en temps qu'inhibiteur compétitif réversible [108]. Le BMS 806 est d'autant plus prometteur qu'il peut administré par voie orale.

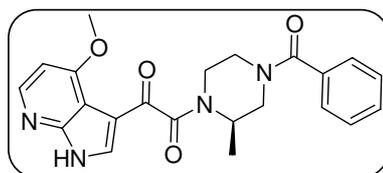


Figure 18 : Structure de BMS-806.

D'autres molécules antivirales en développement visent à bloquer l'interaction avec les co-récepteurs CCR₅ et CXCR₄. La famille de molécules la plus prometteuse actuellement est le groupe des bicyclames dont le chef de file est l'**AMD-3100** (figure 19). Cette molécule a montré son efficacité en ciblant de manière spécifique les récepteurs CXCR₄ [109]. Elle agirait en inhibant la signalisation intracellulaire due au flux d'ions Ca²⁺.

L'inconvénient majeur à son emploi dans un traitement anti-VIH-1 à long terme, est son mode d'administration, par voie intraveineuse. D'autres dérivés ont été préparés afin d'éviter cet inconvénient. Parmi les nouvelles molécules, l'**AMD-3465** (figure 19) [110], un monocyclame qui semble répondre à cette attente avec une activité identique voir améliorée vis-à-vis de CXCR₄ comparée à l'AMD-3100.

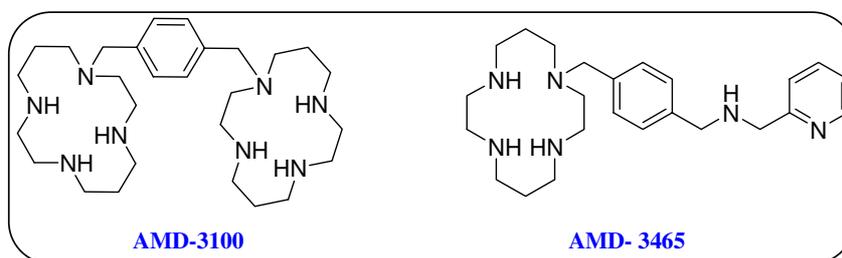


Figure 19: Structure des inhibiteurs AMD-3100 et AMD-3465 visant le corécepteur CXCR₄.

Du côté du co-récepteur CCR₅, un antagoniste semble se distinguer, le Vicriviroc. Déjà en études cliniques avancées (phase III), il a montré une activité sur des modèles

animaux, avec une excellente biodisponibilité et une administration par voie orale. Dans la même lignée de molécules, on distingue le SCH-D, un autre antagoniste des co-récepteurs CCR₅ ayant atteint les essais cliniques de phase II. Le mode d'action proposé pour ces deux molécules est une perturbation de la conformation adoptée par le domaine extracellulaire du co-récepteur à la suite de l'interaction de l'inhibiteur avec le domaine transmembranaire. Cette interaction induirait une modification de la boucle externe de CCR₅ empêchant l'interaction avec la boucle V3 de gp120 [111].

4.2. Inhibition de L'Intégrase virale.

Cette étape constitue une phase cruciale dans le stade de développement du virus, puisqu'une fois l'ARN virale transcrit en ADN proviral, il sera incorporé dans le génome de la cellule hôte. En dépit de son rôle important dans le cycle viral, la conception d'inhibiteurs de l'Intégrase ne fait l'objet d'études que depuis une dizaine d'années.

La première classe de molécule ayant montré une certaine efficacité en temps qu'inhibiteur de l'intégrase viral a été la famille des dicéto-acides, développée essentiellement par Merck. Ces composés inhibent préférentiellement l'étape de transfert de brin en culture cellulaire et pour certains d'entre eux chez l'animal [112, 113]. Un des inhibiteurs de cette classe ayant atteint les essais cliniques de phase II est le **S-1360** (figure 20) (GlaxoSmithKline & Shionogi pharmaceutical). Le S-1360 est administré par voie orale et a montré une très bonne sélectivité. Il a permis de mieux comprendre le mécanisme par lequel cette classe de molécules agirait. Il semblerait qu'elles séquestrent le métal cofacteur présent au niveau du site actif de l'enzyme [114]. Ce mode d'action a d'ailleurs permis de classer les dicéto-acides selon qu'ils sont efficaces en présence de Mn²⁺ et/ou Mg²⁺. Une autre molécule également développée par Merck est en cours d'essais cliniques de phase III et semble être prometteuse puisque les études préliminaires ont montré une diminution de 98% de la charge virale auprès de patients naïfs.

Récemment, une nouvelle classe de molécule a été identifiée, les 5H-pyrano-[2,3-d:-6,5-d']dipyrimidines (PDPs) [115] (figure 20). Leur mode d'action n'est pas totalement élucidé, mais semble être différent de celui des dicéto-acides d'autant plus que les mutations observées en présence de cette classe de molécules sont absentes dans le cas des PDPs.

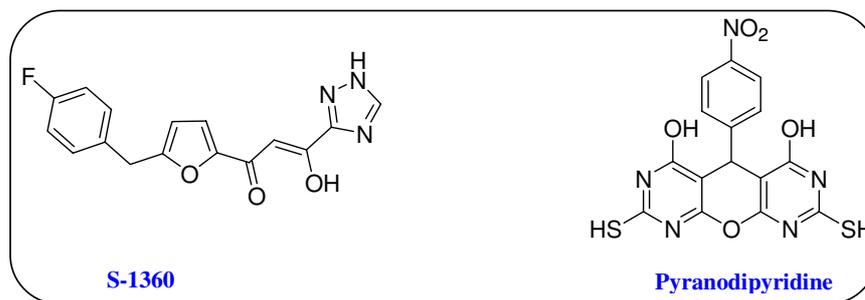


Figure 20: Exemple de deux nouveaux inhibiteurs de l'Intégrase virale.

4.3. Inhibition de la Protéase virale.

La protéase virale de VIH-1 est l'enzyme la mieux connue d'un point de vue structurale et cela grâce à d'innombrables structures cristallographiques disponibles. C'est d'ailleurs pour cela que le développement d'inhibiteurs de la Protéase virale connaît un réel essor.

Tous résultent d'une conception rationnelle et logique, puisqu'ils miment l'état de transition par lequel passe le substrat lors de son clivage par l'enzyme. Ils possèdent tous à la place de la liaison amide, une liaison non hydrolysable, isostère de l'état de transition. Ils bloquent la maturation des virus et les particules virales résultantes sont non infectieuses.

Sept molécules sont déjà utilisées en thérapie clinique: les inhibiteurs de première génération dont le **Saquinavir**, l'**Indinavir** [116], le **Ritonavir** [117], utilisé comme booster et le **Nelfinavir** [118]. Deux inhibiteurs de 2^{ème} génération ont par la suite été développés, le **Lopinavir** [119] et l'**Amprenavir** (figure 21).

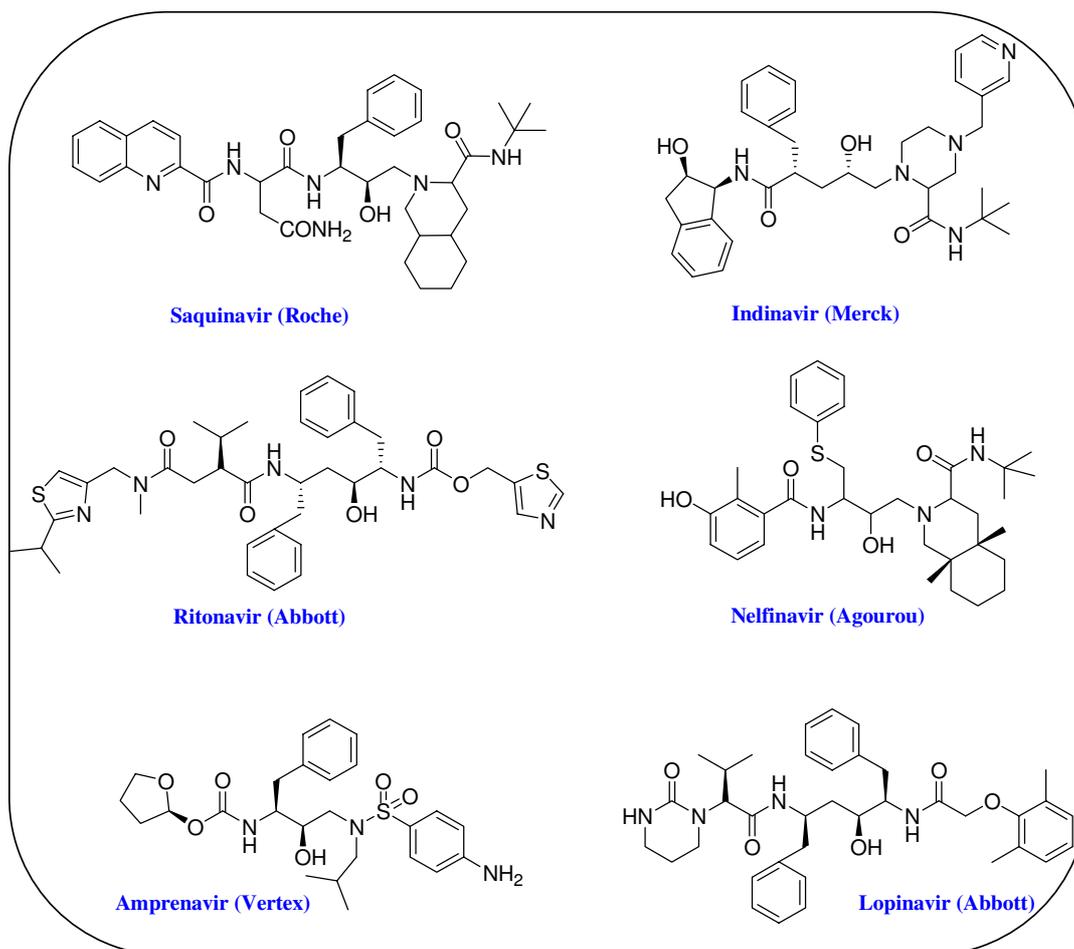


Figure 21 : Structure des inhibiteurs de la protéase virale de 1^{ère} et 2^{ème} génération.

La dernière molécule à être mise sur le marché (Juin 2003) est l'**Atazanavir** (figure 22) [120] ou Reyataz®. L'Atazanavir ne nécessite pas d'être associé au Ritonavir, comme c'est le cas pour le Lopinavir par exemple. Aucune augmentation du taux de cholestérol ou des triglycérides n'a été observée avec ce composé, alors que c'est généralement un problème majeur lors de l'utilisation des autres inhibiteurs de la protéase. Enfin il est administré sous la forme d'une seule dose journalière.

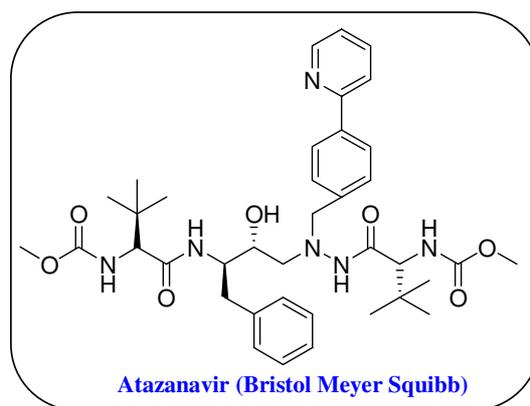


Figure 22 : Structure de l'Atazanavir, inhibiteur de 3^{ème} génération.

D'autres inhibiteurs sont en cours de développement avec la volonté d'améliorer leur efficacité vis-à-vis des souches résistantes tout en diminuant leur toxicité. Ainsi deux molécules ont été tout récemment mise sur le marché: le **Darunavir** [121, 122] et le **Tipranavir** (PNU- 140690) [123, 124] (figure 23). Ces deux nouvelles molécules sont d'ailleurs utilisées en combinaison avec le Ritonavir.

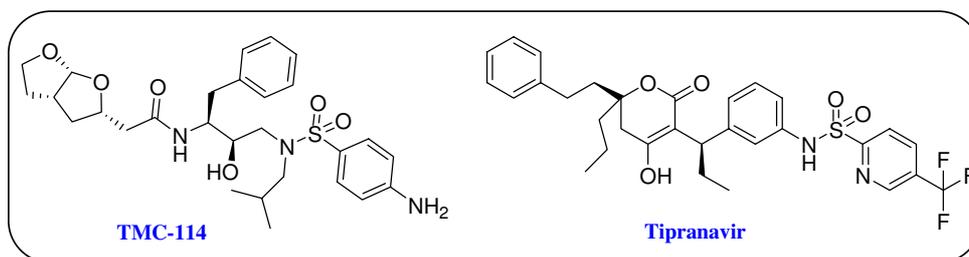


Figure 23 : Structure des nouveaux Inhibiteurs de la Protéase virale, le Darunavir et le Tipranavir.

Il est cependant à noter que le développement de nouveaux inhibiteurs de la protéase virale connaît un certain ralentissement et ce à cause d'un certain nombre d'effets secondaires liés à leur administration, à leur coût important mais également à leurs propriétés pharmacocinétiques. De plus leur caractère peptidique leur confère une très faible biodisponibilité et une très faible solubilité dans les milieux aqueux ce qui les rend d'autant plus sensible aux dégradation protéolytiques, au métabolisme hépatique et à une excrétion biliaire assez rapide.

4.4. La rétrotranscription.

Les inhibiteurs de la RT représentent de loin le groupe le plus riche en terme de nombre de molécules développées et mises sur le marché.

On distingue deux classes d'inhibiteurs de la RT, la première regroupe les inhibiteurs non-nucléosidiques alors que la deuxième, beaucoup plus riche en molécules, englobe les inhibiteurs nucléosidiques.

4.4.1. Les inhibiteurs non-nucléosidiques.

Le groupe des inhibiteurs non-nucléosidiques est certes peu fourni en molécules, mais regroupe des molécules de structure chimique assez diversifiée et est très important dans le traitement anti-VIH.

Déjà en 1987, l'équipe de Janssen [125] s'était intéressée au développement d'inhibiteurs non-nucléosidiques dont les dérivés du TIBO (4,5,6,7-tetrahydro-5-methylimidazole-[4,5,1-jk](1,4)-benzodiazépine-2(1H)-one) font partie. Ils ont cependant très vite été confrontés au développement de résistances.

C'est grâce à un large programme de criblage visant à développer des inhibiteurs de la RT que la Névirapine (Viramune®, 1996) [126], le Délaviridine (Rescriptor®, 1997) [127] et l'Efavirenz (Sustiva®, 1998) [128] ont été développés (figure 24). Ils ciblent la RT en se liant de manière non compétitive à un site allostérique, lipophile, à proximité du site polymérase de l'enzyme [68, 129].

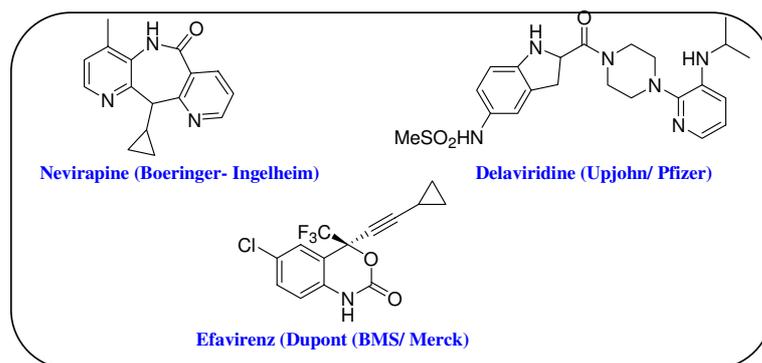


Figure 24: Les inhibiteurs non-nucléosidiques.

Tous les inhibiteurs non-nucléosidiques adoptent une conformation similaire au niveau de leur site de liaison sur la RT rappelant une forme de papillon [130]. Cette organisation est stabilisée que les interactions hydrophobes qui s'établissent entre les électrons π des

groupements aromatiques et certains résidus (Tyr 181 et Tyr188) présents au niveau de la poche de fixation.

Le problème majeur rencontré par les inhibiteurs non-nucléosidiques de première génération est une résistance forte et croisée conférée par une seule mutation de résistance. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles molécules qui permettraient de contrer ce problème. C'est effectivement le cas avec le **TMC 125** ou l'étravirine [131] (figure 25), qui représente actuellement la molécule active la plus prometteuse en essai clinique de phase II. Appartenant à la famille des diaryles pyrimidines (DAPY), il s'est avéré être actif sur la majorité des souches résistantes aux actuels inhibiteurs non-nucléosidiques actuels ce qui pourrait s'expliquer par sa capacité à se fixer à la RT en adoptant différentes conformations [132].

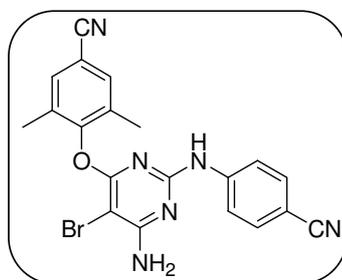


Figure 25 : Structure du TMC125

4.4.2. Les inhibiteurs nucléosidiques.

La deuxième classe de molécules visant la RT, regroupe les inhibiteurs nucléosidiques. Le chef de file de cette famille est le Retrovir[®], plus connu sous le nom d'**AZT**, approuvé en 1987 par la FDA. L'**AZT** résulte d'un processus de criblage destiné à développer des molécules anti-cancéreuses. Il s'est avéré peu actif comme anticancéreux, mais a été la première molécule développée avec succès contre le VIH [6, 7]. Plusieurs autres molécules ont été développées par la suite, comme le **ddI** (Videx[®], 1991), le **ddC** (Hivid[®], 1992), le **d4T** (Zerit[®], 1994), le **3TC** (Epivir[®], 1995) et l'**Abacavir** (Ziagen[®], 1998) (figure 26). Elles appartiennent toutes à la famille des 2',3'-didésoxynucléosides et agissent comme terminateur d'élongation de la chaîne d'ADN à cause de l'absence de groupement hydroxyle en 3' sur le ribose. Ce sont des inhibiteurs compétitifs de la RT, se liant au même site de fixation que les dNTP.

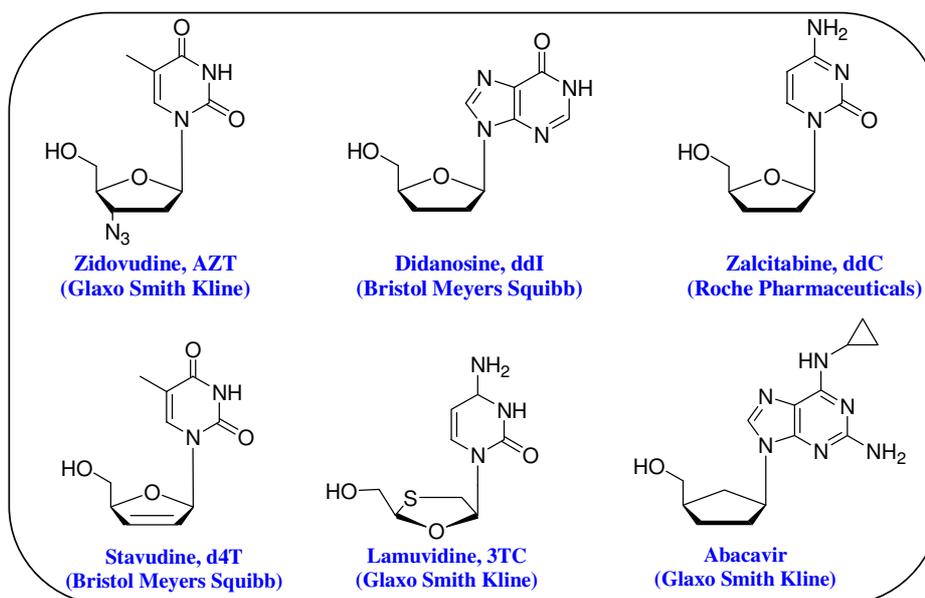


Figure 26 : Structure des inhibiteurs nucléosidiques de la RT.

Des combinaisons de molécules actives sont venues renchérir le panel des inhibiteurs nucléosidiques déjà disponibles et simplifier les traitements. C'est le cas du **Combivir®** (AZT & 3TC) et du **Trizivir®** (AZT, 3TC, Abacavir).

Contrairement aux autres classes d'inhibiteurs, les inhibiteurs nucléosidiques nécessitent plusieurs étapes d'activation avant d'être actif au niveau cellulaire. Ainsi dans le cas de l'AZT par exemple, pour pouvoir être incorporé par la RT dans un brin d'ADN viral et en terminant l'élongation, l'AZT doit être triphosphorylé par les kinases et les nucléotidases intracellulaires avant de pouvoir agir sur la RT [133]. Le schéma 7 illustre ce mécanisme de triphosphorylation.

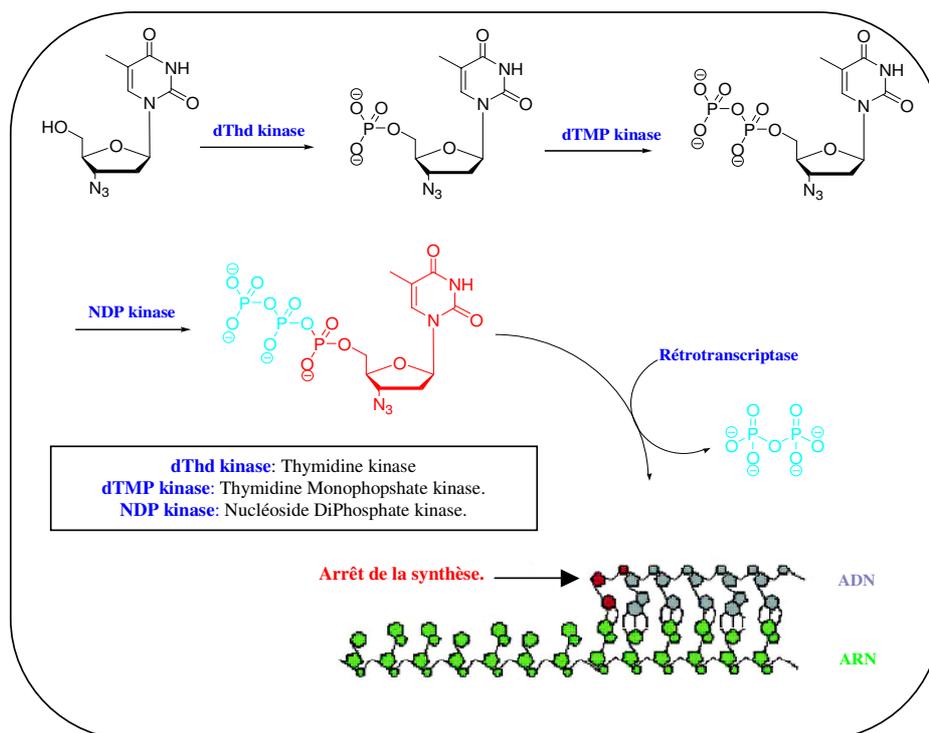


Schéma 7 : Mécanisme de phosphorylation de l'AZT par les kinases cellulaires et incorporation au sein de l'ADN en cours d'élongation par la RT [134].

La famille des didésoxynucléosides s'est agrandie dernièrement avec l'**Emtricitabine** (FTC, Emtriva®, Juillet 2003). Généralement administré sous la forme d'une dose unique journalière en présence de ddI et d'Efavirenz, l'emtricitabine a montré une bonne activité antivirale. Il pourrait être assez rapidement intégré dans la trithérapie HAART, d'autant plus que des essais de co-formulation avec le Tenofovir sous la forme d'une gélule unique sont en cours.

Plusieurs autres molécules (figure 27) sont en cours d'étude et pourraient améliorer l'efficacité des traitements ; c'est le cas du **DOTC** ((±)-2'-deoxy-3'-oxa-4'-thiocytidine) et de son analogue fluoré, **FdOTC** [135]. Le DOTC, sous la forme d'un mélange racémique, s'est révélé être actif sur des isolats de VIH résistants au 3TC [136] ; il ne diffère de celui-ci que par l'inversion du soufre et de l'oxygène au niveau du sucre.

La molécule la plus avancée en terme d'études cliniques (phase II) est l'**Amdoxovir** ou DAPD pour (-)-β-D-2,6-diaminopurine dioxalane [137]. Le DAPD est transformé par l'adénosine déaminase en guanine dioxalane (DXG) qui est triphosphorylé en DXG-TP, la forme active, inhibitrice de la RT [138]. L'Amdoxovir s'est révélé actif contre une grande

majorité de souches résistantes à l'AZT à la lamivudine, mais également à des souches multirésistantes, ce qui pourrait offrir une alternative aux combinaisons thérapeutiques actuelles.

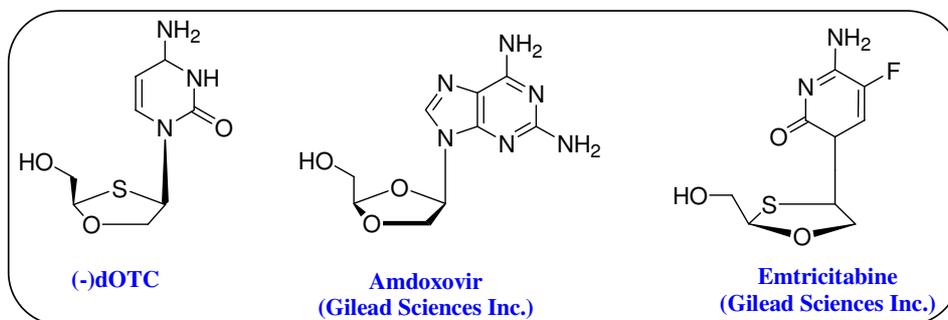


Figure 27: Structure des nouveaux inhibiteurs nucléosidiques.

Une autre classe d'inhibiteurs du VIH-1 en voie de développement: les inhibiteurs nucléotidiques. Le Ténofovir (2001) pro-drogue monophosphorylée, reste pour le moment le seul exemple utilisé en clinique (figure 28).

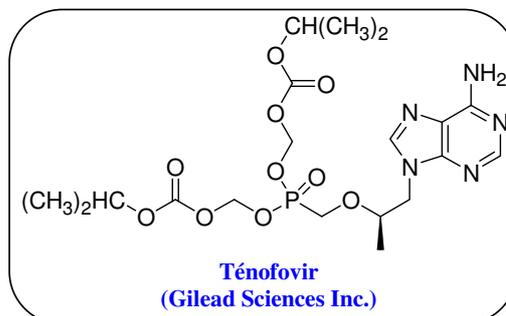


Figure 28 : Le Ténofovir, un inhibiteur nucléotidique.

Un récapitulatif des différentes molécules actives utilisées en clinique et leur date de validation par la FDA est présenté dans le tableau 1 qui suit.

Les inhibiteurs nucléosidiques	
Retrovir (Zidovudine, AZT)	Mars 1987
Videx (Didanosine, ddI)	Octobre 1991
Hivid (Zalcitabine, ddC)	Juin 1992
Zerit (Stavudine, d4T)	Juin 1994
Epivir (Lamivudine, 3TC)	Novembre 1995
Combivir (AZT & 3TC)	Septembre 1997
Ziagen (Abacavir)	Décembre 1998
Trizivir (AZT, 3TC, abacavir)	Novembre 2000
Viread (Tenofovir)	Octobre 2001
Emtriva (Emtricitabine, (-)FTC)	Juillet 2003
Inhibiteurs de la protéase virale	
Invirase (Saquinavir, HGC)	Décembre 1995
Norvir (Ritonavir)	Mars 1996
Crixivan (Indinavir)	Mars 1996
Frotovase (Saquinavir)	Novembre 1997
Agenerase (Amprenavir)	Avril 1999
Kaletra (Lopinavir & ritonavir)	Septembre 2000
Reyataz (Atazanavir)	Juin 2003
Aptivus (Tipranavir)	Juin 2005
Prezista (Darunavir)	Juin 2006
Inhibiteurs non nucléosidiques de la RT	
Sustiva (Efavirenz)	Septembre 1998
Viramune (Nevirapine)	Juin 1996
Rescriptor (Delavirdine)	Avril 1997
Inhibiteur de fusion	
Fuzeon (Enfuvirtide, T20)	Mars 2003

Tableau 1 : Récapitulatif de l'ensemble des molécules approuvées par la FDA.

A la vue de ce tableau récapitulatif, on aurait tendance à penser que le nombre de molécules sur le marché est suffisant pour contrer l'infection virale. Cependant le combat reste permanent et il est impératif de développer de nouveaux inhibiteurs dont les effets secondaires ainsi que les résistances induites seraient moins importantes car un certain nombre de résistance croisée commence à être mis en évidence.

NB : Il est à noter que cette partie bibliographique s'est aussi appuyée sur plusieurs références de De Clercq, E [139, 140] et De Corte [141].

V. Problème majeur : les résistances aux traitements.

Malgré les énormes avancées thérapeutiques obtenues grâce aux traitements et plus globalement à la thérapie HAART, le virus réussi encore à contrer ces efforts par le biais de mutations ponctuelles, responsables de l'apparition de souches résistantes. Les traitements deviennent alors moins efficaces conduisant à la situation où un nombre important de patients se retrouve en échec thérapeutique.

5.1. Les différents mécanismes de résistance.

Les différentes classes d'inhibiteurs actuellement utilisées en clinique humaine doivent de plus en plus faire face à l'apparition de souches résistantes. C'est le cas par exemple des inhibiteurs de fusion dont l'activité est altérée en raison de nombreuses mutations au niveau de la protéine gp120. Les inhibiteurs de la protéase virale sont également concernés avec l'apparition de mutations localisées soit au niveau du site actif et modifiant l'interaction enzyme-inhibiteur, soit au niveau d'une zone externe au site actif. Mais la classe de molécules la plus confrontée à ce problème majeur reste la famille des inhibiteurs nucléosidiques de la RT. Pour cette famille de composés on distingue principalement deux mécanismes liés à ce phénomène.

Le mécanisme le plus classique consiste en une mutation ponctuelle dont les conséquences sont de diminuer l'affinité et/ou la vitesse d'incorporation de l'inhibiteur par rapport au substrat. Ce type de mutation a pour effet de modifier le rapport k_{cat}/K_M de l'inhibiteur triphosphorylé et le plus souvent aussi celui des dNTP naturels. C'est le cas par exemple des mutations K65R, L74V ou M184V/I qui touchent essentiellement des acides aminés proches du site de fixation du substrat dNTP [142]. Des données cristallographiques ont d'ailleurs montré que l'encombrement stérique généré par la mutation M184V est à l'origine de la résistance au 3TC par exemple [143]. Une mutation ponctuelle suffit généralement à modifier de manière significative le rapport k_{cat}/K_M de l'inhibiteur par rapport à celui du substrat naturel.

Le deuxième mécanisme de résistance largement étudié est la phosphorolyse ou l'ATPlyse. Il sera présenté dans le paragraphe qui suit en s'appuyant sur l'exemple de l'AZT. Il nécessite généralement l'accumulation de plusieurs mutations de résistance.

5.2. Exemple de l'AZT.

Les didésoxynucléosides en général et l'AZT en particulier, sont reconnus par la RT sous leur forme triphosphate. Ils sont ajoutés au cours du processus d'élongation de la chaîne d'ADN et agissent comme terminateur d'élongation. L'absence de l'hydroxyle en 3' empêche l'addition du dNTP suivant et contraint la RT à arrêter la synthèse. Très vite une résistance à l'AZT apparaît, générée par les mutations M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q. Ces mutations n'affectent ni l'affinité de la RT pour l'AZTTP, ni la vitesse d'incorporation de cet inhibiteur dans l'ADN. De manière surprenante, ces mutations favorisent l'ATP-lyse, une réaction analogue à la pyrophosphorolyse qui utilise l'ATP comme substrat [144]. En présence des mutations de résistances, l'ATP présent dans la cellule à une concentration millimolaire induit l'excision de l'AZT-MP en bout de chaîne par attaque nucléophile sur la dernière liaison phosphodiester impliquant l'AZT. On génère alors une extrémité 3'OH libre qui pourra à nouveau former une liaison phosphodiester avec un nucléotide entrant. L'élongation du brin d'ADN pourra alors reprendre alors qu'un dinucléoside tétraphosphate A/AZT (5'pppp5' AZT) est libéré (schéma 8).

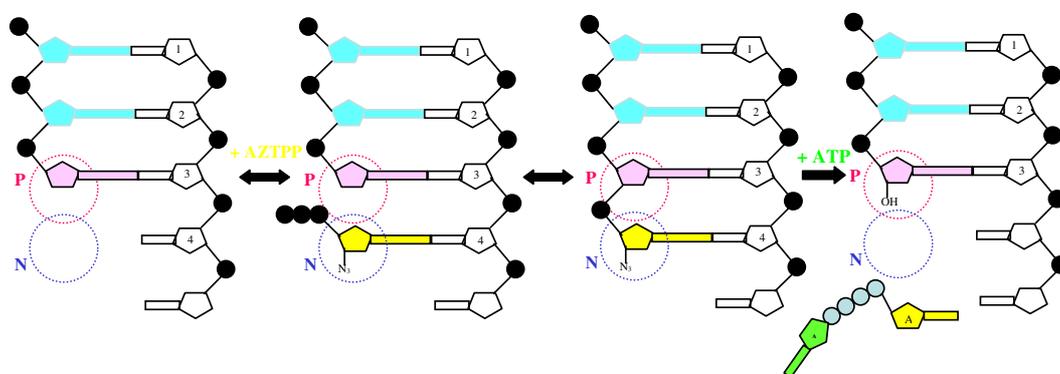


Schéma 8: Mécanisme d'excision de l'AZT en présence d'ATP [87].

Il est important de rappeler que tous les inhibiteurs du VIH sont touchés par le phénomène de résistance et de ce fait des mutations de résistances se développeront inexorablement lorsque certaines combinaisons médicamenteuses sont administrées. On peut citer la mutation K103N que l'on observe lorsque l'AZT est associée à un traitement comprenant la névirapine ou lorsque des analogues de la thymidine sont associés au ddI.

Après cette introduction générale concernant les caractéristiques génétiques et structurales du virus, il apparaît clairement que malgré l'avancée de nos connaissances, le

VIH-1 continue à faire des ravages. Le nombre de personnes infectées par le VIH ne cesse d'augmenter malgré les efforts considérables fournis pour développer de nouveaux traitements. Une des causes essentielles des échecs thérapeutiques est le très fort taux de mutations du virus qui peut devenir résistant à de nombreux médicaments, ce qui rend nécessaire le recours à de nouvelles combinaisons thérapeutiques. Il est donc urgent de développer de nouvelles molécules insensibles aux mutations de résistance générées par les traitements actuels, mais également de mieux comprendre d'un point de vue fondamental les différentes étapes du cycle de réplication viral. Pour apporter quelques éléments de réponse, nous nous sommes basés sur la spectroscopie de fluorescence. Nous aborderons dans cette dernière partie les principaux aspects qui régissent la fluorescence ainsi que les paramètres importants à déterminer dans le but de caractériser les molécules.

VI- La spectroscopie de fluorescence, concept et aspects généraux.

Par sa grande sensibilité et la variété des paramètres qui peuvent être mesurés, la spectroscopie de fluorescence permet d'apporter de nombreuses informations structurales et fonctionnelles sur les systèmes étudiés. L'ensemble de ces caractéristiques a valu à cette technique d'être utilisée intensivement dans des domaines aussi variés que la physique, la chimie, mais également la biologie ou la médecine.

Les études mettant en jeu la spectroscopie de fluorescence, sont le plus souvent effectuées à l'état stationnaire ce qui permet notamment de mesurer des variations du signal de fluorescence, de mesurer la mobilité des macromolécules en solution par anisotropie de fluorescence ou encore de déterminer les distances récepteur-ligand grâce à la technique de FRET. Les expériences de fluorescence résolue en temps permettent quant à elles d'atteindre un niveau de compréhension supérieur, du système étudié.

6.1. Principe de la spectroscopie de fluorescence [145].

C'est en 1853 que fut introduit pour la première fois par Stokes, le terme de fluorescence. Le phénomène de fluorescence résulte d'une interaction entre la matière et la lumière. En effet, lorsque la matière absorbe un photon d'énergie appropriée, les électrons passent de l'état fondamental (S_0) vers un état excité, atteignant ainsi des orbitales vacantes d'énergie supérieure (S_1 - S_2 ...). Le retour à l'état fondamental peut se faire de manière totalement spontanée, avec émission de lumière. Le processus d'absorption est très court, de l'ordre de 10^{-15} s et cesse directement par arrêt de l'excitation.

D'autres processus peuvent avoir lieu lors du retour à l'état fondamental, en plus de la fluorescence; l'ensemble de ces phénomènes est représenté de façon schématisée dans le diagramme de Perrin-Jablonski (figure 29).

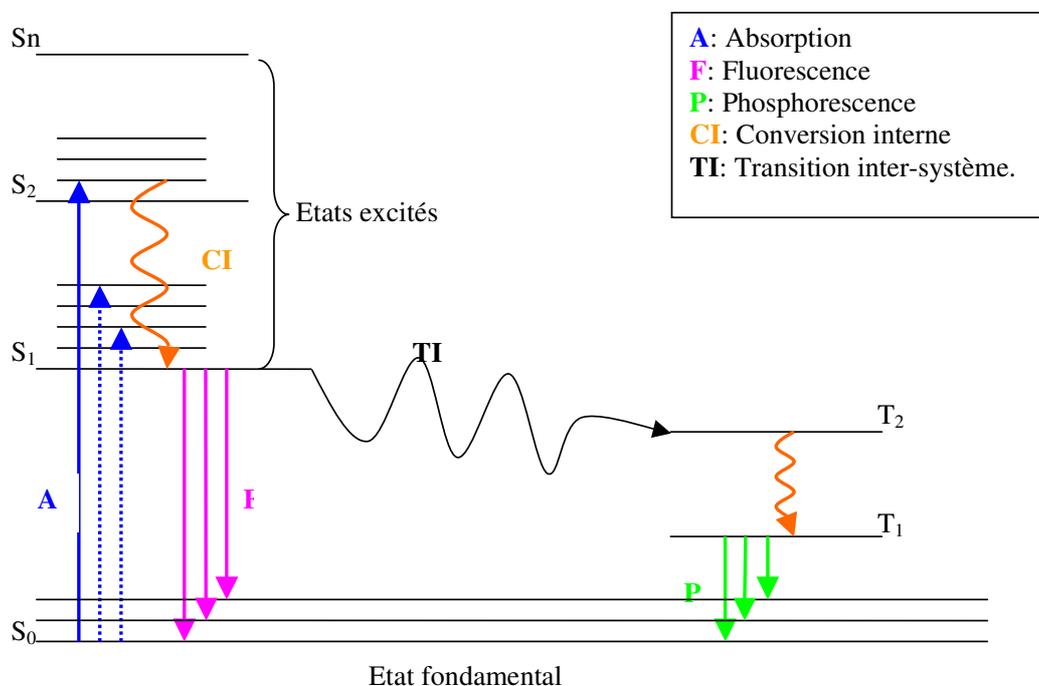


Figure 29: Diagramme de Perrin-Jablonski.

Selon le diagramme de Perrin-Jablonski, une fois un photon absorbé, les électrons excités passent à un niveau d'énergie supérieur S₁, S₂, S₃...caractérisé par une durée de vie généralement comprise entre 10⁻¹⁰ et 10⁻⁷s. Des niveaux vibrationnels sont associés à chaque état électronique, caractérisés par S₁₁, S₁₂, S₁₃...Le retour à l'état fondamental est précédé d'une relaxation vibrationnelle vers l'état de plus basse énergie et éventuellement d'une conversion interne entre deux états électroniques. L'énergie est dissipée dans l'environnement soit par sauts d'énergie de vibration ou de rotation, soit à la suite de collisions entre molécules. Le retour du niveau S₁ vers S₀ peut éventuellement avoir lieu par émission de photons, caractéristique de la fluorescence, un phénomène qui a lieu sans changement de spin de l'électron.

Le retour à l'état fondamental peut aussi se produire *via* une transition inter-système durant laquelle les électrons passent d'abord par un niveau T_n. Cette transition non radiative et normalement interdite, s'effectue entre des niveaux vibrationnels n'ayant pas la même multiplicité de spin puisque les électrons passent d'un état singulet vers un état triplet. Cette

transition peut avoir lieu lorsque le couplage entre les moments magnétiques orbital et de spin est suffisamment important. Après conversion interne entre les différents niveaux T_n , le retour à l'état fondamental peut se faire par émission de photons au cours d'un processus appelé phosphorescence.

6.2. Les paramètres de la fluorescence.

Toute molécule capable d'absorber des photons est appelée chromophore alors que l'émission de lumière selon le processus de fluorescence caractérise un fluorophore. Plusieurs paramètres permettent de caractériser une molécule fluorescente la rendant ainsi plus ou moins intéressante pour une utilisation en tant que sonde de fluorescence.

L'intensité de fluorescence qui représente la quantité de photons émis par unité de temps et par unité de volume de solution se définit de façon suivante.

$$I = fct(\Phi, \epsilon, c)$$

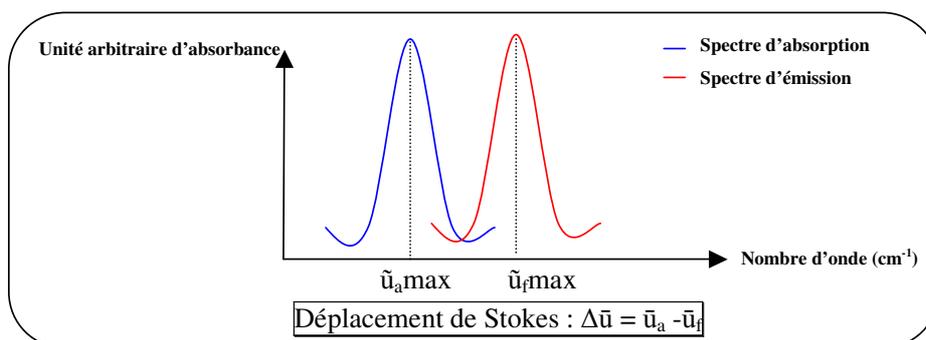
Cette valeur étant directement proportionnelle à la concentration de l'échantillon (c), une sonde est d'autant plus sensible que de faibles concentrations en produits peuvent être détectées. Cela suppose que les autres paramètres de fluorescence soient élevés, notamment le rendement quantique (Φ), mais aussi le coefficient d'extinction molaire (ϵ).

Le *rendement quantique* de fluorescence correspond au rapport du nombre de photons émis, par rapport au nombre de photons absorbés. Sa valeur théorique maximale est de 1.

$$\Phi = \text{Nbre de photons émis} / \text{Nbre de photons absorbés}$$

Le troisième paramètre important est la *durée de vie de fluorescence*. Elle représente le temps moyen au cours duquel les molécules activées se trouvent dans un état excité avant de revenir à l'état fondamental. La durée de vie d'une molécule fluorescente est en général de l'ordre de la nanoseconde voir de la picoseconde. Ce paramètre va déterminer la fenêtre d'observation, permettant ainsi de mesurer des changements conformationnels très rapides.

Un dernier paramètre important à considérer est le déplacement de Stokes qui correspond à la différence entre les maxima d'absorption et d'émission, exprimés en nombre d'onde.



La détection d'une espèce fluorescente est d'autant plus facile que le déplacement de Stokes est important.

VII. Conclusion.

A travers cette introduction non exhaustive, nous avons voulu montrer la complexité de la lutte contre le virus du SIDA. Le nombre de personnes atteintes par le VIH ne cesse d'augmenter malgré les efforts considérables menés dans le but de développer de nouveaux traitements.

Toutes les étapes du cycle de réplication du virus font l'objet de recherches fondamentales dans le but d'inhiber sa multiplication depuis son entrée dans la cellule hôte jusqu'aux étapes les plus tardives de maturation virale. Les progrès sont considérables mais encore insuffisants, notamment à cause de l'augmentation constante du nombre de malades en échec thérapeutiques et cela même après avoir suivi la thérapie HAART.

Des efforts considérables sont également menés dans le but de développer un vaccin contre le VIH-1, mais sa mise sur le marché n'est pas encore d'actualité.

VIII. Présentation du travail effectué au laboratoire.

Dans le cadre du sujet de thèse qui m'a été confié, nous nous sommes particulièrement intéressés à une étape clé du cycle de réplication virale: la rétrotranscription.

Pour cela deux approches ont été entreprises visant cette étape cruciale:

✓ Le *développement de nouveaux analogues nucléosidiques fluorescents*, qui grâce à leurs propriétés spectrales permettraient d'étudier les interactions qui s'établissent entre les protéines virales et les acides nucléiques. La spectroscopie de fluorescence requiert en effet l'utilisation de sondes suffisamment sensibles qui permettent de mesurer et de

visualiser des changements conformationnels et structuraux rapides avec une grande précision.

Nous avons donc choisi de développer une nouvelle famille de molécules, analogues de la dA modifiés en position 8 de la base.

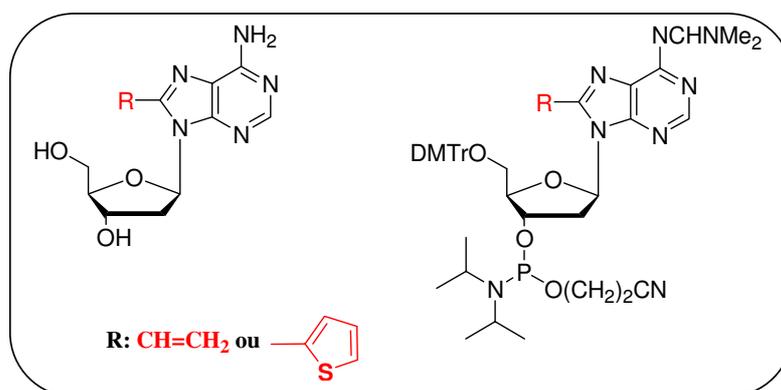


Figure 30 : Structure des deux sondes nucléosidiques synthétisés sous leur forme nue et sous la forme de synthon phosphoramidate.

Le premier chapitre s'articulera autour de deux points : d'une part la *synthèse* de ces deux analogues modifiés de la dA et l'*évaluation de leurs propriétés spectrales* en fonction de différents paramètres. D'autre part, l'incorporation de ces deux bases modifiées dans des séquences d'oligonucléotides afin de déterminer l'influence de telles modifications sur la stabilité de la double hélice d'ADN.

L'étude et l'évaluation des propriétés inhibitrices d'une nouvelle classe de nucléosides modifiés, dirigés contre la RT du VIH-1. Grâce à une meilleure connaissance du complexe qui s'établit entre l'enzyme, un duplex d'ADN et un nucléotide entrant, nous souhaitons inhiber l'activité enzymatique selon un mécanisme original et différent des inhibiteurs nucléosidiques actuellement utilisés en thérapie clinique. Cette étude sera tout d'abord menée sur deux composés modèles, la *8-vinyl-désoxyadénosine (8vda)* et la *8-éthyl-désoxyadénosine (8eda)* en préparant les analogues correspondants sous leur forme phosphoramidites pour qu'ils puissent être insérés dans des séquences appropriées d'oligonucléotides.

Nous avons également voulu tester l'effet de ces modifications (vinyle, éthyle) et d'autres encore (Br, OMe, thiényl) sur la réplication du virus en culture cellulaire. Pour cela les nucléosides nus modifiés devront être préparés.

Cependant, pour qu'une molécule soit substrat de la RT, elle doit être sous sa forme phosphorylée. Nous avons donc entrepris de préparer les *dérivés aryloxyphosphoramidates* de nos analogues, dont la conception repose sur la stratégie prodrogue. Nous espérons ainsi contourner la première étape de phosphorylation qui pour certains inhibiteurs est une étape limitante.

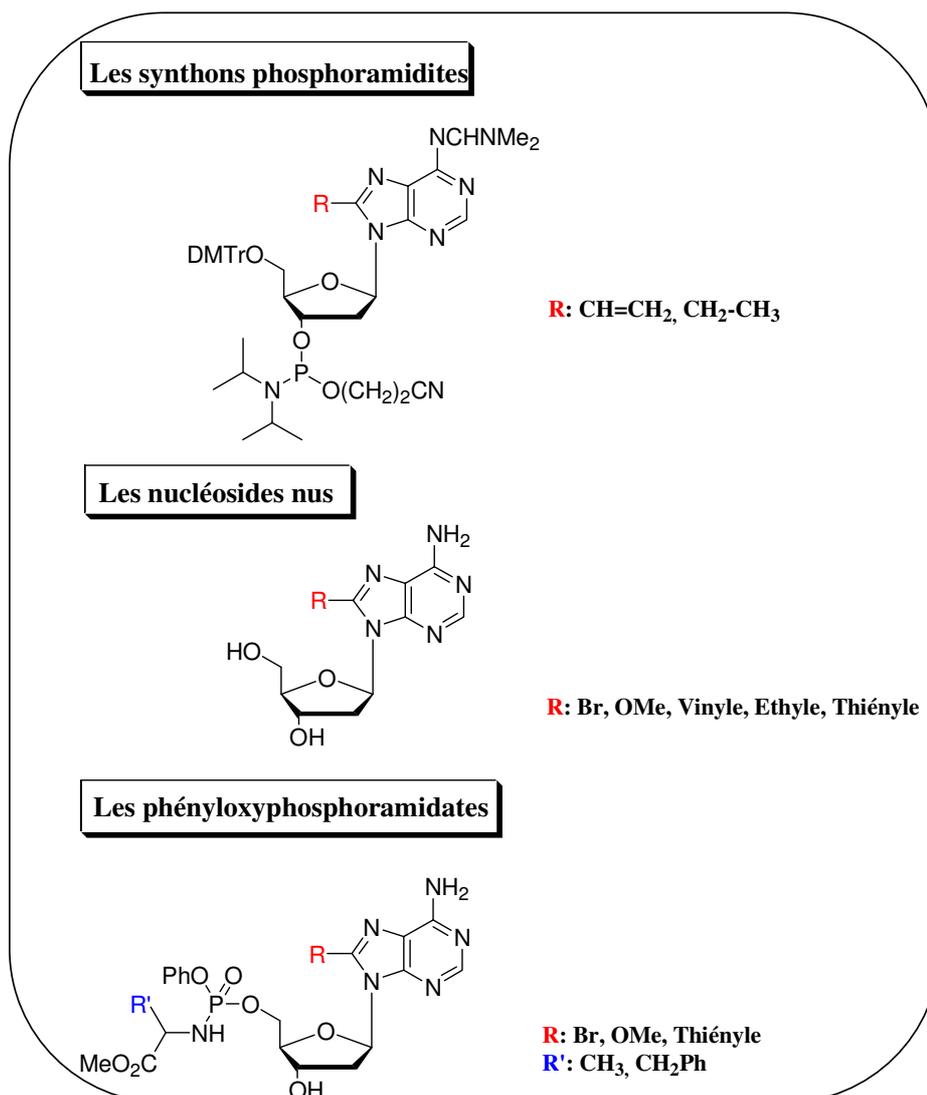


Figure 31: Structures envisagées des nucléosides modifiés sous leurs formes phosphoramidites, nus, et phosphoramidates.

Enfin nous nous sommes intéressés à *la synthèse des analogues nucléosidiques triphosphorylés*.

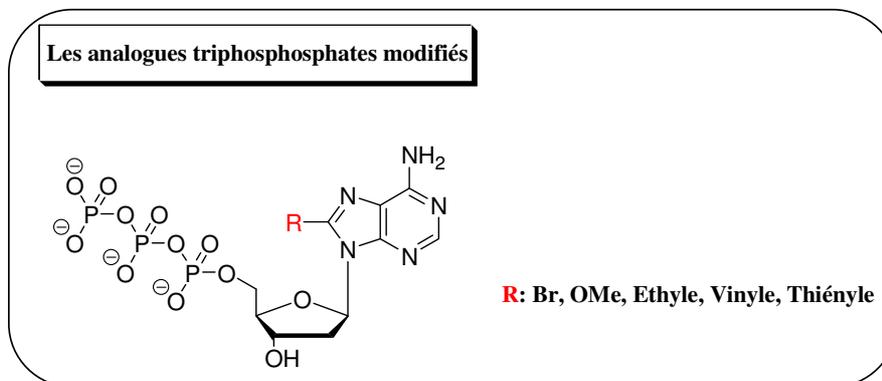


Figure 32 : Structure générale des nucléosides triphosphates.

En effet c'est sous cette forme qu'ils pourront être reconnus par l'enzyme et pourront éventuellement avoir une activité inhibitrice. Les dérivés triphosphates sont indispensables à une étude détaillée de l'inhibition de la rétro-transcription *in vitro*. Plusieurs tentatives de synthèse seront présentées pour finalement aboutir à la mise au point d'une stratégie de *synthèse sur support solide* qui nous a permis de préparer nos analogues modifiés en position 8 sous leur forme *monophosphorylée*.

Ce manuscrit sera divisé en trois chapitres.

La première partie concernera la synthèse de nouvelles sondes de fluorescence et l'évaluation de leurs propriétés spectrales.

La deuxième partie sera consacrée à la présentation des résultats obtenus sur une étude modèle portant sur l'évaluation des propriétés inhibitrices d'une nouvelle classe d'analogues nucléosidiques dirigés contre la rétrotranscriptase.

Le dernier chapitre sera une illustration de l'ensemble des méthodes que nous avons essayé dans le but d'aboutir aux analogues nucléotidiques modifiés et à la mise au point d'une nouvelle stratégie de synthèse des dérivés monophosphates de la dA sur support solide. Cette nouvelle stratégie de synthèse a également été étendue à d'autres dérivés phosphorylés, tels que les boranophosphates connus pour leur grande stabilité comparée aux monophosphates.

Nous concluons en reprenant l'ensemble des points importants abordés dans ce manuscrit et en évoquant quelques perspectives à ce travail.

I. Introduction.

La rétrotranscription, la transcription, la réparation d'ADN etc... sont autant d'exemples de machineries faisant intervenir des assemblages biologiques d'acides nucléiques et de protéines. La compréhension de la fonction biologique de ces assemblages nécessite l'utilisation d'outils d'analyse sensibles. Par son extrême sensibilité (possibilité de détecter une molécule unique) et par la diversité des paramètres qu'elle permet de mesurer, la spectroscopie de fluorescence est un outil de choix pour l'étude des interactions inter et intramoléculaires de ces complexes et de leur dynamique.

Par ailleurs le développement de nouvelles pistes thérapeutiques contre le VIH, nécessite une connaissance approfondie des mécanismes moléculaires qui régissent les interactions des protéines et des acides nucléiques viraux au cours de la réplication. Parmi les cibles potentielles, la protéine **NCp7** a particulièrement retenu notre attention[146-148]. En effet cette protéine interagit avec des séquences d'acides nucléiques, notamment les séquences TAR (ARN) et cTAR (ADN) lors de la rétrotranscription, notamment grâce à ses propriétés de chaperonne de l'ARN. Le mécanisme par lequel la protéine NCp7 agirait fait l'objet de nombreuses recherches, mais une controverse subsiste en ce qui concerne son mode d'action.

Pour résoudre cette contradiction, il est nécessaire de disposer de sondes de fluorescence sensibles, afin de caractériser le mécanisme moléculaire de NCp7 au contact de sa cible. Cependant les fluorophores actuels capables de sonder de manière sensible et site-spécifique les changements environnementaux des acides nucléiques présentent des inconvénients majeurs (faible rendement quantique, sensibilité limitée...) qui limitent leur utilisation.

Dans ce contexte, mon objectif a été de développer des analogues fluorescents de nucléosides dotés de meilleures propriétés spectroscopiques qui seraient utilisés pour marquer sélectivement les cibles moléculaires de la NCp7 et ainsi mieux caractériser ses propriétés de chaperonne.

Avant de détailler plus amplement la stratégie employée pour la synthèse de deux nouvelles sondes ainsi que leur propriétés spectrales, nous aborderons dans un premier temps les différentes techniques et voies utilisées pour marquer un acide nucléique, en exposant les avantages et les inconvénients de chacune d'elles.

II. Les différentes techniques de marquage des acides nucléiques

Les bases nucléiques naturelles courantes et *à fortiori* les nucléosides correspondants, sont très faiblement fluorescents. Deux stratégies ont été développées pour rendre un acide nucléique fluorescent : la première consiste à rajouter un groupement fluorescent sur le nucléoside, *via* un bras espaceur, alors que la deuxième stratégie consiste à remplacer la base naturelle du nucléoside par une base modifiée ayant des propriétés de fluorescence intéressantes.

2.1. Marquage des acides nucléiques via un bras espaceur

Dans une séquence d'oligonucléotide, différentes positions peuvent être marquées par un groupe fluorescent [149] (figure 1). Ainsi, des sondes ont pu être rajoutées aux extrémités 5'[150-153] ou 3'[154-157] en utilisant généralement des dérivés de la fluorescéine, de la rhodamine ou des groupements dansyles. Des modifications ont également été effectuées au niveau du lien phosphate [158-163] notamment sur les dérivés phosphorothioates en ajoutant des aziridines, des sulfonamides ou des bromo-carbonyl- α,β -insaturés. Cette position est d'autant plus intéressante qu'elle n'intervient pas dans l'appariement des bases et ne perturbe pas ou plus faiblement la stabilité du duplex d'acide nucléique. La base nucléique [164-167] ainsi que le ribose [168, 169] ont également fait l'objet de modifications visant à rendre l'oligonucléotide fluorescent. Par exemple la fluorescéine et ses dérivés ont été incorporés directement sur la fonction amine de la base (A, C, G) *via* une fonction urée [170] ou un lien éthyne en position 5 de la T [171] (figure 1).

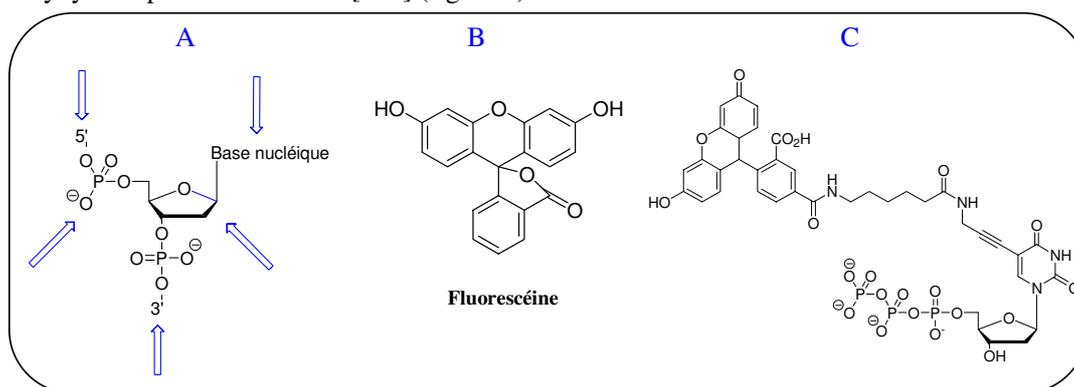


Figure 1 : *A-* Les différentes flèches indiquent les positions de marquage sur lesquelles les sondes ont pu être introduites ; *B-* Structure de la fluorescéine ; *C-* Monomère dUTP modifié par la fluorescéine *via* un bras espaceur.

Quelle que soit la position de marquage souhaitée sur l'oligonucléotide, celle-ci peut se faire de façon spécifique en adoptant une stratégie chimique ou enzymatique. La synthèse en phase solide d'oligonucléotides a permis une grande avancée dans ce domaine, d'autant plus qu'un certain nombre de ces sondes fluorescentes sont désormais commerciales sous forme de phosphoramidite. Quant à la voie enzymatique, le marquage peut avoir lieu en position 5' ou 3', mais également à l'intérieur d'une séquence en utilisant des nucléosides triphosphorylés modifiés par un groupement fluorescent tel que la rhodamine ou la coumarine. La sonde est fixée sur la base *via* un bras plus ou moins long, afin d'empêcher des interactions supplémentaires avec l'acide nucléique. Ces composés sont pour certains d'entre eux également commerciaux.

2.2. Les sondes nucléosidiques fluorescentes

La deuxième voie de marquage a recours à l'utilisation d'une base nucléosidique modifiée, ayant des propriétés fluorescentes. Comme nous l'avons mentionné précédemment les bases nucléotidiques les plus courantes ne sont que très faiblement fluorescentes. Il existe cependant des exceptions comme la wyosine (Y_T) une base rare présente dans la boucle de l'anticodon de l'ARNt^{Phe} [172]. Il est néanmoins possible de tirer un avantage de cette absence de fluorescence des bases naturelles puisque ces dernières ne masqueront pas le signal de la sonde introduite. Une interférence peut néanmoins avoir lieu avec les protéines en raison des résidus indole et phénol des acides aminés tryptophane et tyrosine, respectivement.

Schématiquement, les analogues nucléosidiques fluorescents peuvent être répertoriés en trois classes de produits. La première contient les analogues nucléosidiques avec une modification fonctionnelle de la base. La seconde regroupe les analogues nucléosidiques qui présentent une extension de la conjugaison du système π de la base naturelle. La dernière classe quant à elle, regroupe les composés dont la base naturelle a été substituée par un polycycle. Idéalement ces sondes doivent perturber à minima la structure et la fonction des acides nucléiques marqués.

Ce chapitre sera plus détaillé en raison de la très grande diversité des modifications possibles pour rendre les bases nucléiques fluorescentes.

2.2.1. Les sondes de fluorescence dérivées des bases naturelles [173]

Cette classe de composés comprend des dérivés des quatre bases puriques et pyrimidiques. Les premiers exemples décrits concernent surtout des dérivés de l'adénosine, comme la formycine, la 2,6-diaminopurine désoxyriboside et la 2-aminopurine désoxyriboside (2-AP) [174] (figure 2).

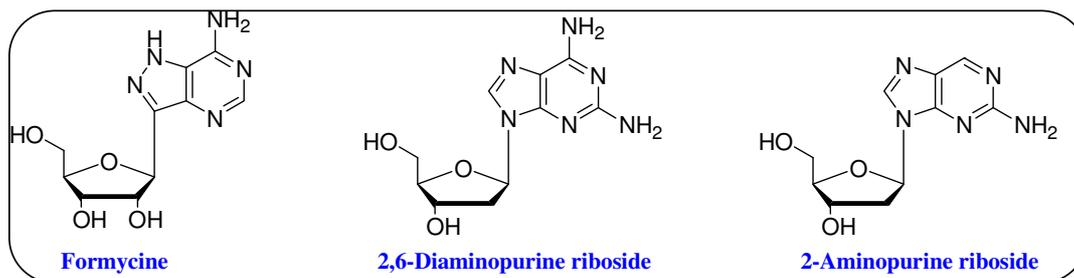


Figure 2: Structure des analogues fluorescents de l'adénosine.

Ces trois analogues absorbent la lumière sur un intervalle de longueur d'onde distinct des acides aminés et des bases naturelles. Ils permettent ainsi une excitation sélective sans qu'il n'y ait d'interférences avec le système étudié et présentent un maximum d'émission décalé vers le rouge. Cependant, seule la 2-AP a connu un réel essor en raison de son rendement quantique élevé ($\Phi = 0,68$) et constant sur une large gamme de pH. Elle est également capable d'établir des liaisons Watson-Crick avec la T d'un brin complémentaire, sans altérer la structure de l'acide nucléique. Sa dernière caractéristique, et non des moindre, est la possibilité d'être incorporée de façon spécifique dans des séquences d'oligonucléotides, assurant ainsi un marquage sélectif.

La 2-AP est par ailleurs disponible commercialement sous sa forme libre, phosphoramidite, triphosphate ou encore incorporée dans un oligonucléotide. Pour toutes ces raisons, la 2-AP est actuellement l'analogue fluorescent le plus employé [175-181]. Elle présente cependant un certain nombre d'inconvénients (décrits dans plus loin) qui limitent son utilisation.

Une autre famille comprend des dérivés de la famille des ptéridines [182], comme la 4-amino-6-méthyl-8-(2'-désoxy- β -D-ribofuranosyl)-7(8*H*)-ptéridone (6-MAP) [183] et la 4-amino-2,6-diméthyl-8-(2'-désoxy- β -D-ribofuranosyl)-7(8*H*)-ptéridone (DMAP) (figure 3). Ces deux analogues nucléosidiques peuvent être excités entre 310-330 nm et présentent un maximum d'émission vers 430 nm. Les rendements quantiques de ces fluorophores sont de

0,39 et 0,48 respectivement [184]. Cependant leur utilisation est limitée, car ces sondes ont une durée de vie de fluorescence assez faible et surtout une diminution de l'intensité de fluorescence est observée lorsqu'elles sont incorporées dans des oligonucléotides.

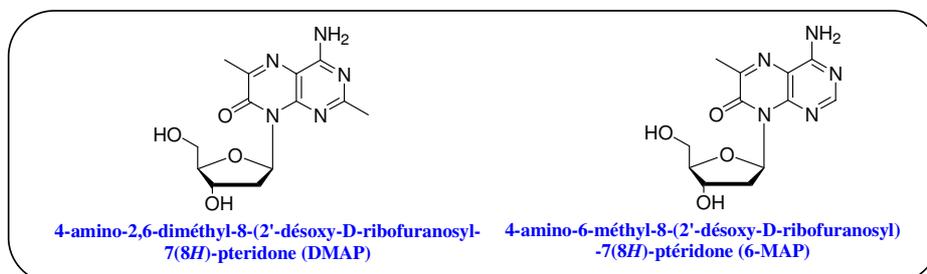


Figure 3: Structure des analogues de la dA.

D'autres bases ont également été modifiées dans le but de développer de nouveaux analogues fluorescents (figure 4); c'est le cas des dérivés de la xanthosine et plus particulièrement la 5-aza-7-déazaxanthine dont la conception est basée sur le motif 5-aza-7-déazapurine présent dans la wyosine [185].

Plus récemment, un nouvel analogue de la C a été synthétisé et incorporé dans un brin d'ADN. Grâce à ses propriétés intrinsèques de fluorescence, la 5-méthyl-pyrimidine-2-one a été placée à différentes positions afin d'étudier le complexe qui se forme entre la protéine RecA, qui joue un rôle important dans les processus de détection et de réparation des lésions chez *Escherichia coli*, et un ADN simple brin [186].

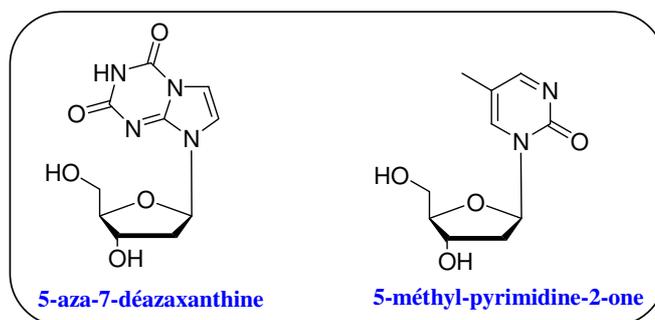


Figure 4: Structure de deux analogues fluorescents dérivés de la wyosine et de la cytosine.

2.2.2. Amélioration de propriétés de fluorescence par augmentation de la conjugaison des bases naturelles

Outre les modifications fonctionnelles des bases naturelles, il est également possible d'accéder à de nouveaux analogues fluorescents en augmentant la conjugaison au niveau des noyaux puriques ou pyrimidiques.

Des analogues fluorescents des bases pyrimidiques et plus particulièrement la cytosine, ont ainsi été développés (figure 5). Ainsi la 3,5-diaza-4-oxophénothiazine ($\Phi = 0,20$) est capable d'établir une paire G-C dans différents types de duplex ADN-ARN [187], ADN-PNA et PNA-PNA [188]. Le cycle aromatique étant plus étendu par rapport à celui de la cytosine, les duplex contenant cette base sont plus stables, probablement à cause d'un meilleur empilement des bases [189]. Par ailleurs, lorsqu'elle est incorporée dans un simple ou double brin d'oligonucléotide, le rendement quantique de fluorescence n'est pas affecté [189]. Cet avantage a d'ailleurs été utilisé pour des études de FRET en tandem avec la rhodamine [190]. Cependant la très faible variation de fluorescence entre un simple et double brin d'oligonucléotide est une limite pour l'utilisation de cette base dans des séquences simplement marquées. La pyrrolo-dC (figure 5) est une autre sonde fluorescente dérivée de la C, développée dans le but de caractériser la boucle de transcription du complexe d'élongation de l'ARN T7 polymérase [191]. En dépit de la formation d'une paire G-C, l'intensité de fluorescence de la pyrrolo-dC décroît fortement lorsqu'elle se trouve dans un simple ou double brin d'ADN.

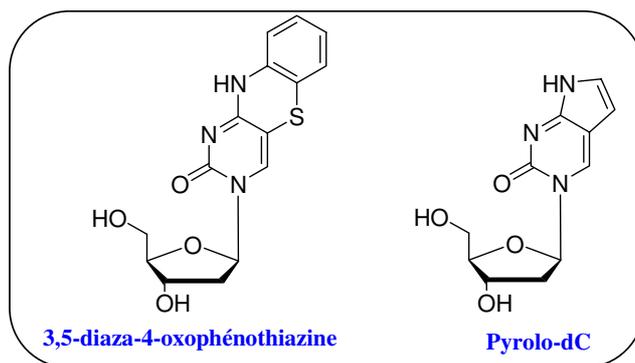


Figure 5 : Analogues fluorescents de la cytosine.

Les benzo[g]quinazolines sont d'autres exemples de bases modifiées (figure 6). Ainsi la benzo[g]quinazoline-2,4-(1*H*,3*H*)-dione, un analogue de la thymidine, offre un rendement quantique de fluorescence de 0,82 et a été essentiellement utilisée pour des études de

formation de structures en triple hélice par des oligonucléotides. Aucune modification de l'intensité de fluorescence n'a été observée lorsque cet analogue est dans un simple ou double brin d'oligonucléotide. Cependant, une diminution de l'intensité de fluorescence et un déplacement du maximum d'émission vers les longueurs d'onde plus courtes sont observés, lorsque le brin contenant l'analogue modifié établit des interactions Hoogsteen dans une structure en triple hélice [192].

Un autre exemple de cette classe dérive de la cytosine: le 4-amino-1*H*-benzo[g]quinazoline-2-one est utilisé afin de déterminer l'état de protonation des bases présentes dans une structure en triple hélice [193] (figure 6).

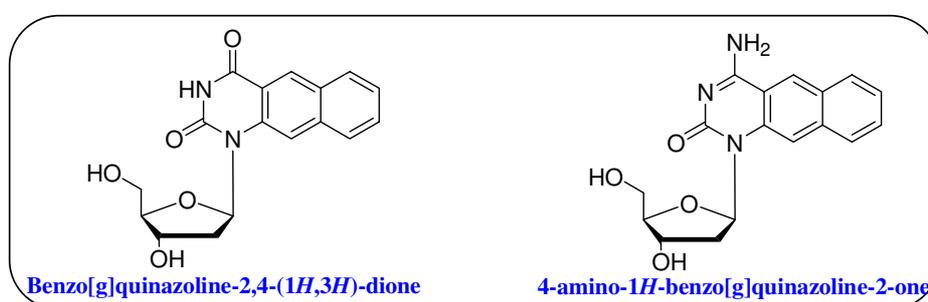


Figure 6: Analogues fluorescents des bases T et C.

2.2.3. Bases dérivées des noyaux polycycliques aromatiques

La dernière famille de composés a été élaborée selon une approche qui consiste à introduire une structure polycyclique aromatique soit en remplacement de la base, soit sur la base elle-même.

Ainsi lorsque la base est remplacée par une structure polycyclique, la perte des liaisons hydrogène des appariements peut être compensée par des forces d'empilement qui peuvent être supérieures à celles qu'établissent les bases naturelles. Des systèmes cycliques tels que le phénanthrène, le pyrène ou le 4-méthyl-1*H*-indole ont ainsi été introduit en position C1' du 2'-désoxyribose [194] (figure 7). Les rendements quantiques de ces analogues sont cependant assez modestes et sont encore plus faibles lorsqu'ils sont incorporés dans un brin d'ADN ou d'ARN.

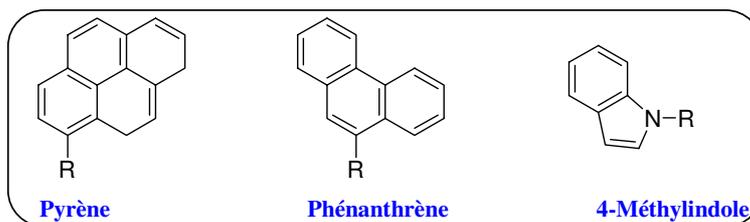


Figure 7: Exemples d'analogues nucléosidiques à noyaux aromatiques polycycliques où R représente la partie désoxyribosyle ou ribosyle.

En suivant la même approche, d'autres structures cycliques modifiées ont été décrites. C'est le cas par exemple des dérivés du stilbène, des terphényles, des tertiothiophènes, et des benzoterthiophènes introduits en position C-1'α du désoxyribose (figure 8). Ces fluorophores ont la particularité d'induire un déplacement vers le rouge des λ_{max} d'absorption et d'émission lorsqu'ils sont incorporés dans une séquence d'acide nucléique.

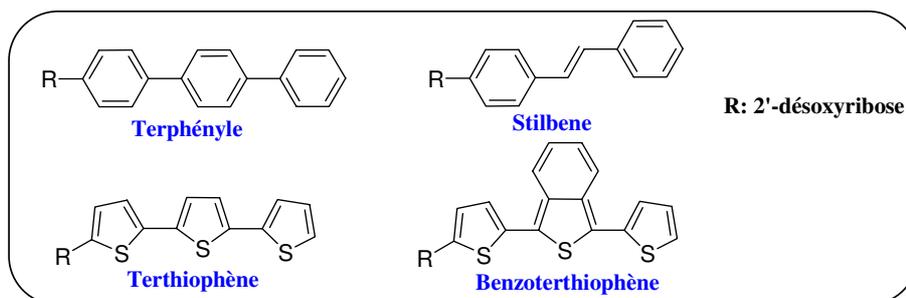


Figure 8: Analogues du 2'-désoxyribose modifiés par des structures polycycliques.

Une deuxième approche consiste à conjuguer un polycycle aromatique sur la base naturelle (figure 9). Cette approche a été particulièrement étudiée avec des polycycles de type pyrène. Le pyrène présente en effet des propriétés spectrales intéressantes avec un rendement quantique élevé et la possibilité de former des excimères. La littérature est donc riche en exemples dans lesquels le groupement pyrène a été introduit au niveau de bases naturelles. Au nombre de ceux-ci on trouve des analogues de la dA (dAPy) et de la dU (dUPy) pour lesquels le noyau pyrénique a été introduit, *via* un bras acétylénique, en position 8 et 5 respectivement, par un couplage de Sonogashira [195] (figure 9).

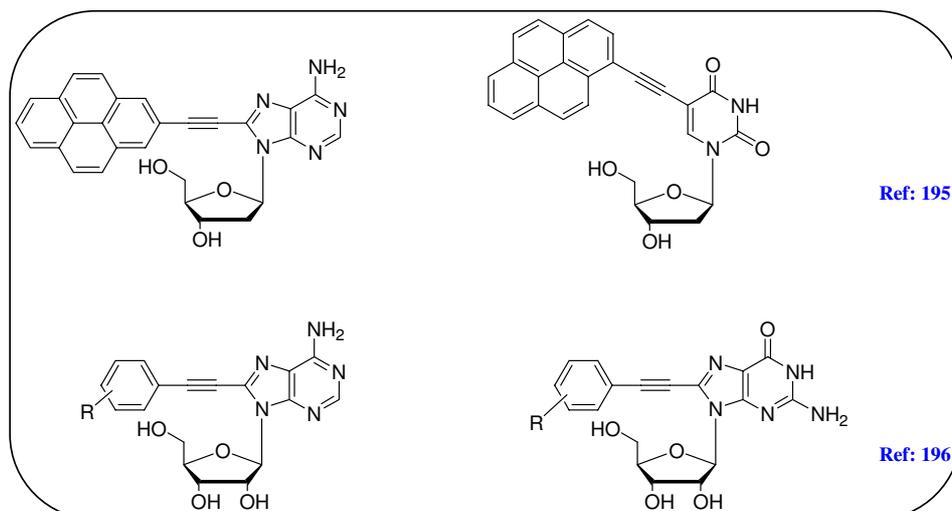


Figure 9 : Bases nucléiques conjuguées à un pyrène ou à un cycle phénylique via un lien acétylénique.

Les nucléosides modifiés correspondants ont été incorporés dans des duplex d'ADN et il apparaît clairement que la perte des liaisons hydrogène est nettement compensée par l'empilement des noyaux pyréniques qui assurent une grande stabilité au système.

Trois observations ont pu être relevées: pour le couple dAPy-dAPy, une augmentation importante de l'intensité de fluorescence est observée. Elle est modérée pour le couple dAPy-dUPy, alors que l'émission de fluorescence diminue de manière drastique dans le cas de la paire dUPy-dUPy. Ces différences semblent être liées à des modifications de l'environnement proche des résidus pyrènes, mais également à leur emplacement au niveau du grand ou du petit sillon.

Tout récemment, des analogues de la A et de la G ont été modifiés en position 8 du noyau purique par des groupements phénylacétylène substitués (figure 9). Les premières données quant à leurs propriétés de fluorescence montrent un net déplacement des maxima d'émission vers le rouge [196].

Après cette présentation non exhaustive des différentes modifications susceptibles d'être introduites sur les bases nucléiques pour les rendre fluorescentes, un certain nombre de limites persistent. Elles concernent essentiellement le faible rendement quantique de ces bases lorsqu'elles sont incorporées dans des duplex d'ADN, et surtout les perturbations importantes de la structure de l'acide nucléique induites par certains de ces analogues. C'est d'ailleurs pour cette raison que leur utilisation s'est limitée à quelques applications bien spécifiques.

2.3. Etats des connaissances et objectifs

2.3.1. Interaction TAR- cTAR en présence de NCp7

L'hybridation de la séquence TAR avec sa séquence complémentaire cTAR est le facteur limitant du premier transfert de brin et nécessite les propriétés chaperonnes de la protéine NCp7. Ces propriétés stimulent fortement la cinétique d'appariement des séquences cTAR et TAR [74] et évitent les réactions parasites d'auto-amorçage [197, 198]. Dans des études précédentes, l'équipe d'Y. Mély a montré que la phase d'initiation de l'activation du complexe TAR/cTAR repose sur une déstabilisation de la structure secondaire de cTAR [199-203].

Plus récemment, des études cinétiques ont été entreprises pour comprendre le mécanisme d'hybridation intermoléculaire TAR/cTAR en présence et en absence de NCp7. Ces travaux ont montré que les cinétiques d'hybridation sont fortement accélérées par la protéine chaperonne et reposent sur un mécanisme d'hybridation par « invasion de brin » au niveau du bas de la tige (schéma 1).

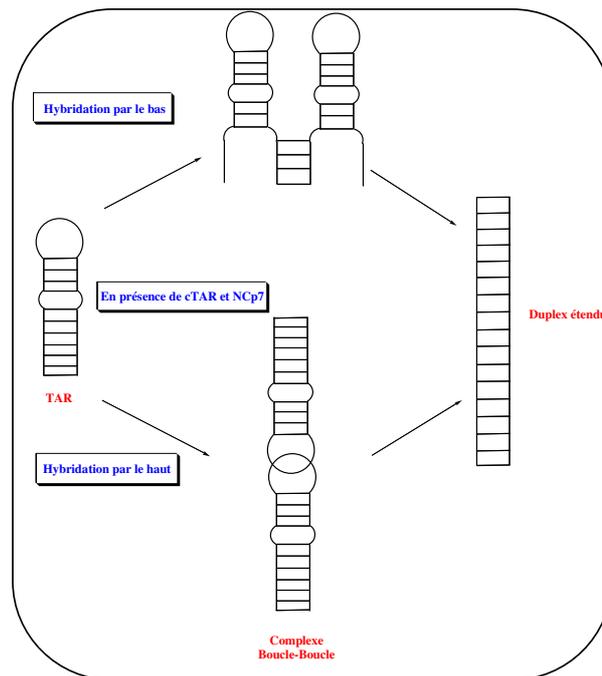


Schéma 1 : Représentation schématique des deux mécanismes proposés d'hybridation de cTAR/TAR induite par NCp7.

Ce mécanisme d'invasion de brins est cependant remis en question par plusieurs équipes qui avancent le passage par une structure de type boucle-boucle [204-206] (schéma 1). Il faut cependant préciser que ces études ont été réalisées dans des conditions expérimentales différentes et sur des séquences de TAR et cTAR de souches différentes. Il est également à noter qu'un mécanisme de type boucle-boucle a également été observé par l'équipe d'Y. Mély, en utilisant des mutants tronqués de cTAR [207].

Dans ce contexte, notre objectif est de développer de nouvelles sondes qui grâce à leur propriétés de fluorescence devraient permettre de déterminer si le mécanisme d'hybridation TAR/cTAR promu par NCp7 peut selon les conditions ou la nature des séquences, passer par l'une ou l'autre des voies.

2.3.2. Les outils fluorescents utilisés

Jusqu'à présent les études par spectroscopie de fluorescence ont été menées avec des séquences tige-boucle de cTAR doublement marquées aux extrémités 3' et 5' respectivement par un groupement accepteur et un groupement donneur. Cette première stratégie est basée principalement sur le transfert d'énergie par résonance (FRET) et repose en particulier sur le concept des « balises moléculaires ».

En raison de la proximité des deux fluorophores dans la forme fermée de la tige, l'ensemble n'est pas fluorescent à cause d'un couplage excitonique. Par contre en présence de la séquence complémentaire de cTAR ou de NCp7, on assiste au dépliement de celle-ci et à l'éloignement des groupements accepteur et donneur qui sont sujets au FRET (figure 10) [199]. Lorsque les deux sondes s'éloignent, la fluorescence est alors restaurée. En présence de la protéine NCp7, les cinétiques d'hybridation entre TAR et cTAR sont fortement accélérées.

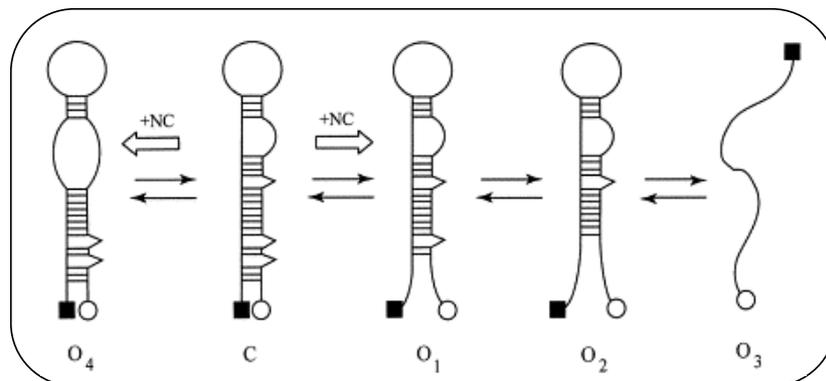


Figure 10: Illustration de l'utilisation des balises moléculaires lors de l'étude de l'interaction de NCp7 avec cTAR.

En l'absence de la protéine NCp7, la forme fermée C est favorisée, mais toujours en équilibre avec les formes O₁ à O₄. En présence de la protéine chaperonne, l'équilibre est déplacé vers la forme ouverte.

Cette approche permet de suivre en temps réel le mécanisme d'hybridation de la séquence marquée avec sa séquence complémentaire sur les positions terminales. En revanche pour suivre les mécanismes moléculaires sur des positions internes d'un duplexe, l'introduction de sondes de fluorescence telles que les balises moléculaires est exclue en raison des perturbations structurales et/ou fonctionnelles qui pourraient affecter l'oligonucléotide.

2.3.3. Objectifs de travail

Une autre approche consisterait à remplacer une base naturelle par un analogue fluorescent perturbant à *minima* la structure et la fonction de l'acide nucléique. Cette stratégie présente aussi l'avantage d'éviter un double marquage de l'acide nucléique et repose essentiellement sur la 2-aminopurine (désoxy)ribosyle [208-210]

La 2-AP reste à ce jour la sonde de fluorescence la plus utilisée, d'autant plus qu'elle est un excellent mime de la dA pouvant la remplacer aussi bien sur des positions internes qu'externes et cela en raison des nombreux avantages évoqués précédemment. Elle présente néanmoins un certain nombre d'inconvénients [174]. En effet, lorsque la 2-AP se trouve incorporée dans un oligonucléotide, son rendement quantique décroît d'un facteur qui peut atteindre deux ordres de grandeur, ce qui nécessite l'utilisation de concentrations importantes d'oligonucléotides marqués. De plus, l'emploi de sondes peu sensibles ne se prête guère à la détermination de constantes d'affinité de complexes très affins et de constantes de vitesse très rapides pour lesquelles des concentrations très faibles en oligomères sont nécessaires pour étudier la formation des complexes. Par ailleurs, les interactions acides nucléiques/acides nucléiques et acides nucléiques/protéines qui n'induisent pas un changement de l'état empilement, sont difficiles à suivre et requièrent des méthodes spectroscopiques plus sophistiquées [211, 212].

Dans ce contexte, mon objectif a été de synthétiser de nouveaux analogues nucléosidiques fluorescents qui perturbent à minima la structure et la fonction des acides nucléiques. L'utilisation de telles sondes devrait permettre de lever les ambiguïtés en ce qui concerne le mécanisme d'hybridation entre TAR et cTAR sous l'effet de la protéine NCp7.

En étudiant les cinétiques d'hybridation par spectroscopie de fluorescence avec des

séquences marquées à différentes positions, nous devrions être capable de distinguer l'un ou l'autre mécanisme (schéma 2).

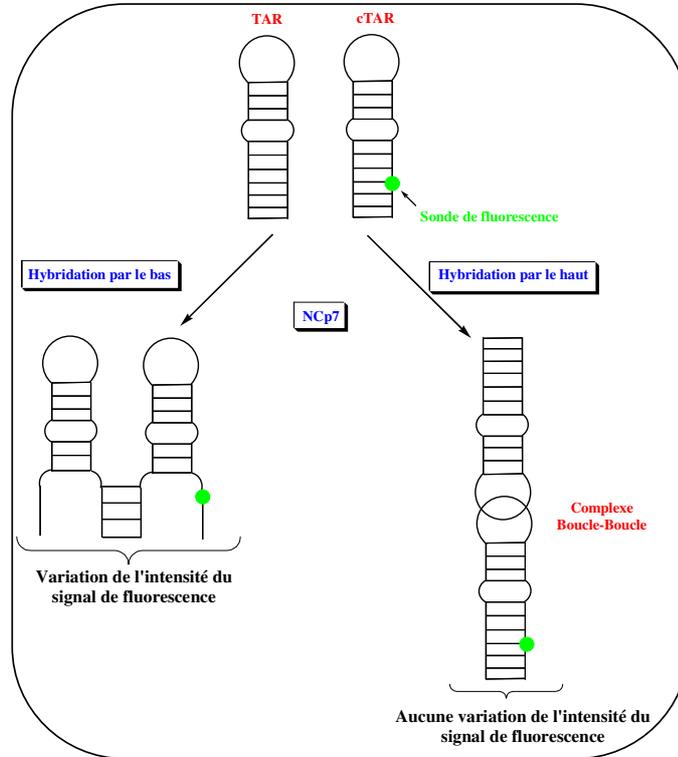


Schéma 2: Représentation schématique des informations attendues par spectroscopie de fluorescence en fonction du mécanisme d'hybridation TAR/cTAR sous l'effet de la protéine NCp7 avec une séquence cTAR marquée avec une base fluorescente

Idéalement les sondes nucléosidiques fluorescentes à préparer dans le cadre de cette thèse doivent répondre à plusieurs critères :

- ✓ Qu'elles puissent être introduites facilement dans l'acide nucléique.
- ✓ Qu'elles soient capables d'établir des liaisons hydrogène avec le brin complémentaire, tout en maintenant la structure et la fonction de l'acide nucléique.
- ✓ Qu'elles soient facilement détectées même à de faibles concentrations.
- ✓ Qu'elles induisent une différence de signal importante lors des contacts entre l'acide nucléique et sa cible.

Des recherches ont été menées dans ce sens avec la 8-vinyl-désoxyadénosine et la 8-thiényl-désoxyadénosine (8thdA).

III. La 8vdA, une nouvelle sonde de fluorescence

3.1. Propriétés de la 8vdA

Notre choix s'est porté sur la 8-vinyl-désoxyadénosine (8vdA) qui s'est révélée être un bon candidat en tant que sonde de fluorescence puisque l'introduction d'un groupement aussi petit que le groupement vinyle suffit à rendre la désoxyadénosine (dA) fluorescente. Nous avons donc cherché dans un premier temps à caractériser cette nouvelle sonde (UV, stabilité en fonction du pH, de la température) avant d'exploiter ses propriétés de fluorescence dans le cadre de l'étude qui nous intéresse.

La 8vdA possède un maximum d'absorption à 294 nm et d'émission à 396 nm et peut être excitée de façon sélective sans qu'il n'y ait d'interférences avec les résidus tyrosines ou tryptophanes des protéines. Avec un rendement quantique mesuré de 0,65 et un coefficient d'extinction molaire de $12600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, la 8vdA est environ deux fois plus sensible que la 2-AP (figure 12).

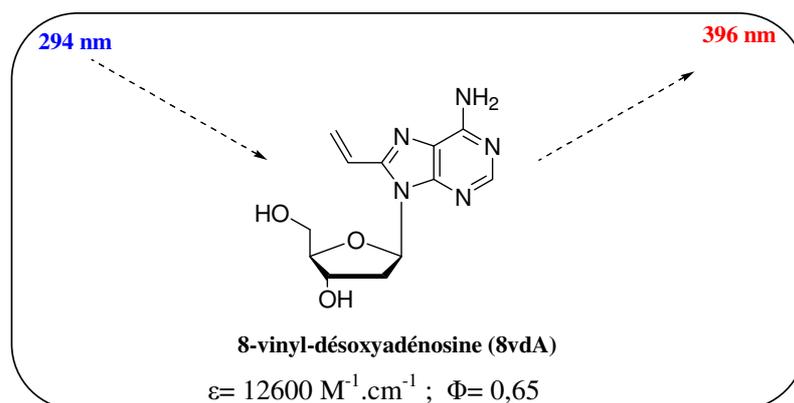


Figure 12 : Caractéristiques spectrales de la 8vdA.

Il était également important de vérifier l'influence du groupement vinyle sur l'orientation *syn* ou *anti* de la base par rapport au sucre. Dans ce but, une étude par RMN NOESY a été effectuée et il apparaît clairement que la base peut adopter une conformation *anti*, compatible avec l'établissement de liaisons Watson-Crick avec la base complémentaire.

La préparation des oligonucléotides marqués de façon sélective par la 8vdA pouvait donc à présent être envisagée. Une des méthodes de choix pour atteindre cet objectif, est la synthèse en phase solide, qui permet d'introduire la sonde fluorescente de façon spécifique,

Pour cela nous avons eu recours à la chimie des phosphoramidites pour préparer le synthon de la 8vdA correspondant et ainsi l'incorporer dans différentes séquences (schéma 3).

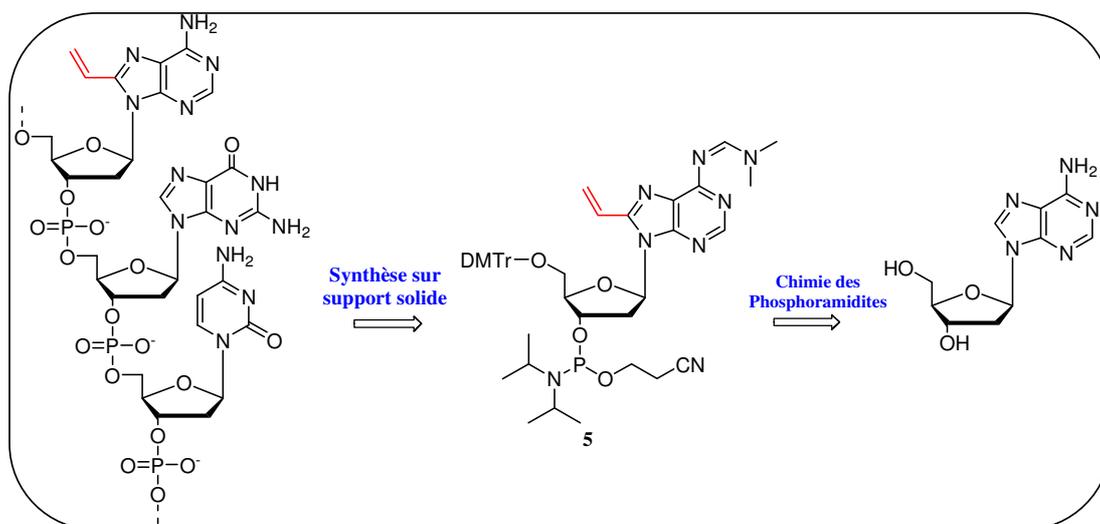


Schéma 3: Schéma rétrosynthétique pour accéder aux séquences incorporant la 8vdA.

Ces séquences d'oligonucléotides marqués nous ont permis :

- ✓ D'étudier l'influence de la base sur la stabilité du duplex,
- ✓ D'étudier la sélectivité d'appariement,
- ✓ De mesurer les rendements quantiques.

Après un bref rappel du principe de la synthèse en phase solide des oligonucléotides utilisant la chimie des phosphoramidites, j'exposerai la stratégie de synthèse suivie pour la préparation du synthon phosphoramidite et pour les séquences marquées par la 8vdA.

L'ensemble de ce travail ayant fait l'objet d'une publication, je ne reprendrai dans cette partie du manuscrit que les points les plus importants.

3.2. La synthèse en phase solide

La synthèse en phase solide a été développée dans les années 50-60 par Merrifield [213] qui, grâce à une technique simple et ingénieuse, a pu synthétiser des polypeptides. Il a démontré que le succès d'une synthèse polypeptidique était lié à l'immobilisation du premier acide aminé sur un support solide. Les acides aminés suivants peuvent alors être rajoutés successivement sur la chaîne en cours de synthèse, jusqu'à atteindre la taille et la séquence désirée. Le polypeptide est ensuite détaché du support solide avant d'être purifié. Ce procédé s'est révélé être très efficace en permettant de réelles avancées dans le domaine de la chimie et de la biochimie des hormones, des enzymes et des peptides. Les travaux de Merrifield ont d'ailleurs été récompensés par le prix Nobel en 1984.

L'utilisation et les applications de cette technique ont donc été étendues tout naturellement à la synthèse d'oligonucléotides [214], remplaçant ainsi la synthèse en solution ou par voie enzymatique, beaucoup plus contraignantes et fastidieuses.

La synthèse d'oligonucléotides en phase solide a connu un essor considérable en particulier grâce au développement d'outils de synthèse automatisés permettant de préparer rapidement des séquences pouvant atteindre une centaine de résidus, en évitant les étapes de purification intermédiaires effectuées lors de la chimie en solution. Outre des temps de réaction réduits, la phase solide offre la possibilité d'utiliser l'ensemble des réactifs en excès ce qui permet une augmentation des rendements de couplage, ou de déprotection, pour chaque étape du cycle. L'excès de réactif agit alors comme « moteur » poussant la réaction vers un rendement quasi quantitatif. La fixation du produit sur le support permet d'éliminer l'excès de réactif par simple lavage de la résine à l'aide d'un solvant approprié.

Ainsi si l'on considère qu'un cycle de synthèse dure en moyenne 8 minutes, il devient possible de synthétiser des oligonucléotides de taille allant jusqu'à 50 résidus en une seule journée.

Une des contraintes principales de cette stratégie de synthèse linéaire est que chaque étape du cycle doit être effectuée avec une efficacité élevée afin d'obtenir un rendement final en oligonucléotide satisfaisant. Ceci explique aussi pourquoi les réactifs sont utilisés en excès.

A ce stade, il convient de mentionner que la synthèse en phase solide d'oligonucléotides s'effectue de l'extrémité 3' vers 5' (puisque le premier nucléoside sera fixé en 3' sur la résine), alors que la biosynthèse de l'ADN a lieu de 5' vers 3'.

3.2.1. Résines et supports

Le support solide généralement utilisé est de type CPG (Controlled Pore Glass). Cette résine de synthèse, composée essentiellement de silice, a été largement utilisée comme phase stationnaire en chromatographie en raison de ses excellentes propriétés mécaniques. La CPG se distingue par une large gamme de porosités (25 à 300 nm) et de taille de particules assurant une bonne distribution spatiale des ligands ainsi qu'un débit homogène.

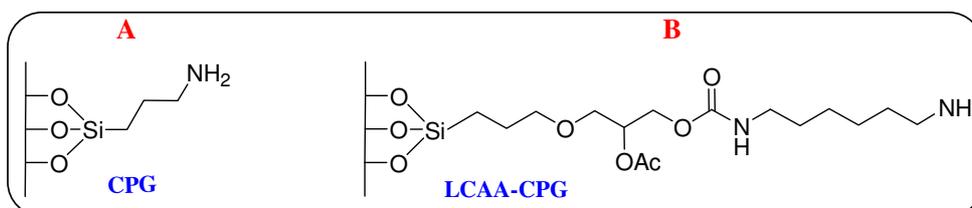


Figure 13 : A) Structure de la CPG ; B) Structure de la LCAA-CPG.

Un autre support solide tend actuellement à succéder à la CPG, le LCAA-CPG (Long Chain Alkylamine-Controlled Pore Glass) [215, 216], qui se distingue par la présence d'un bras espaceur de longue taille (figure 13). Le premier monomère est fixé sur la résine *via* un lien succinique[217], diglycolique [218] ou plus récemment le « Q-linker » désignant le lien hydroquinone-*O-O'*-acidediacétique [219]. Ce dernier assure des temps de clivage de la résine beaucoup plus courts (2 min de clivage en présence d' NH_4OH) mais surtout une plus grande stabilité lors du stockage de la résine.

Les résines actuellement commercialisées possèdent déjà un premier monomère fixé (A, C, G ou T) par son extrémité 3', ce qui permet de contourner la première étape de couplage entre le monomère et la résine. Cette réaction souvent fastidieuse en terme de temps de réaction (généralement 24h) est également handicapante en terme de rendement de réaction.

3.2.2. Principe de la synthèse des oligonucléotides en phase solide

La grande majorité des synthèses d'oligonucléotides effectuées en phase solide, repose sur la chimie des phosphoramidites. La synthèse peut également faire appel à la chimie des phosphonates mais son utilisation est moins répandue.

Un premier monomère nucléosidique est immobilisé sur un support solide *via* un bras espaceur de longueur variable et les monomères phosphoramidites des bases nucléiques naturelles sont rajoutés au fur et à mesure de l'avancement du cycle de synthèse. Une succession de réactions chimiques effectuées grâce à un synthétiseur automatique permet d'aboutir à un enchaînement de nucléosides, dont la cohésion est assurée par des liaisons phosphodiester.

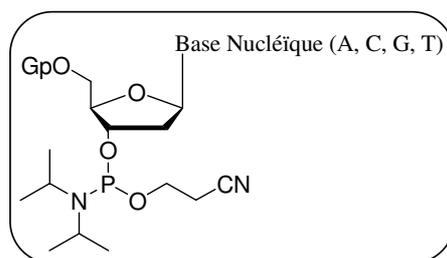


Figure 14: Structure générale des monomères phosphoramidite employés en synthèse solide d'oligonucléotides.

Rem : La nature du groupement protecteur (Gp) sera explicitée plus tard.

Des groupements protecteurs sont nécessaires au niveau de la base et du ribose afin d'éviter les réactions secondaires et d'assurer ainsi les meilleurs rendements de couplage. La fonction amine exocyclique de l'adénine et de la guanine est ainsi particulièrement réactive en présence notamment du réactif de phosphitylation; elle est protégée par des groupements benzoyle ou formamidine. Ces groupes protecteurs sont éliminés en fin de synthèse par traitement basique. Quant à l'alcool en 5', le choix s'est tourné vers un groupe protecteur orthogonal tel que le groupement diméthoxytrityle (DMTr), sélectif des alcools primaires (hydroxyle en 5') du sucre.

Le cycle de synthèse et de couplage d'un nucléoside peut être divisé en 4 étapes successives, détaillées ci-après (schéma 4).

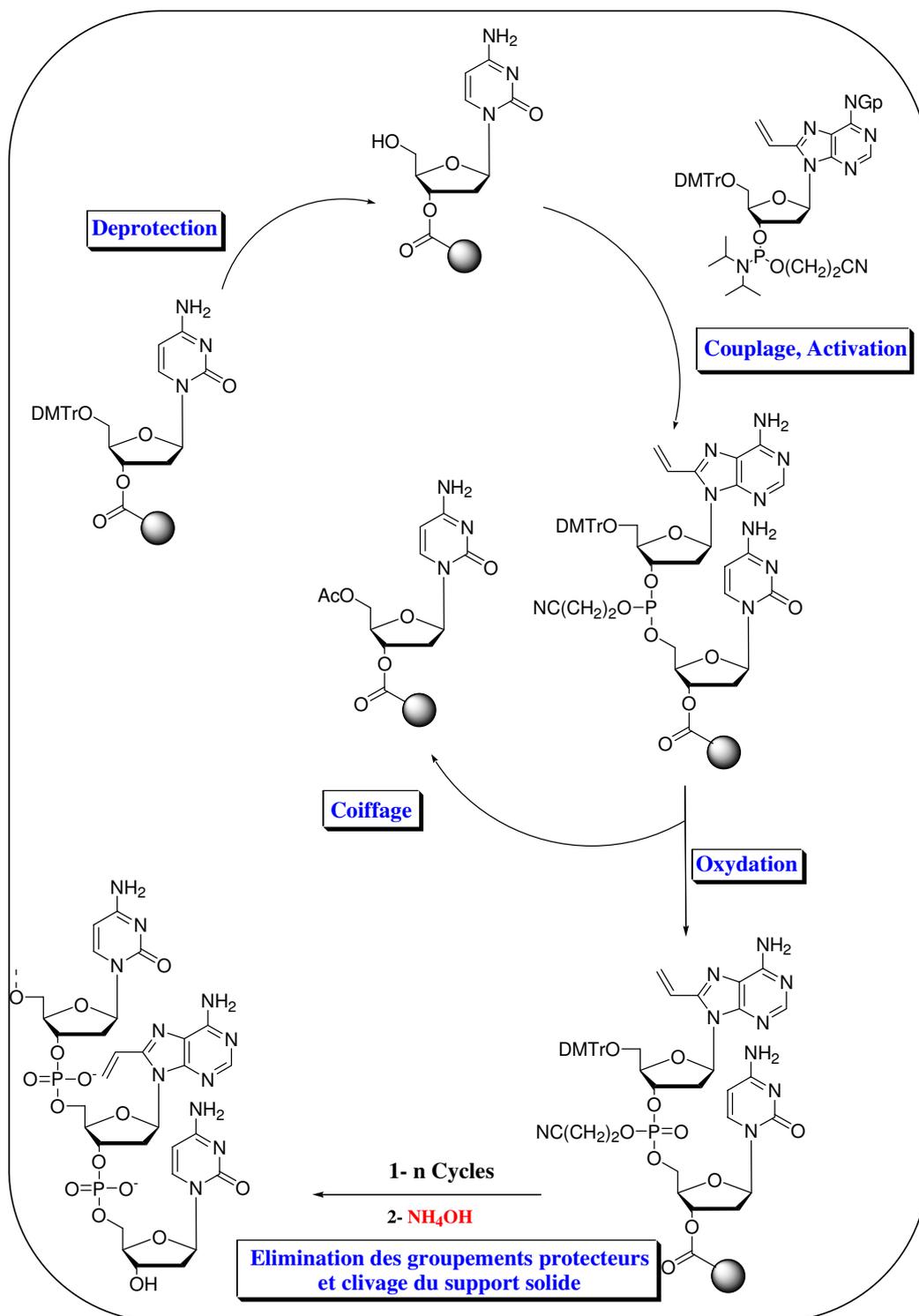


Schéma 4: Schéma type de synthèse d'un oligonucléotide sur support solide.

1- La déprotection

La première étape du cycle consiste à libérer la fonction alcool du ribose en 5' dans des conditions acides douces. Le cation DMTr⁺ ainsi libéré permet, grâce à un test colorimétrique, de mesurer l'efficacité de couplage de chaque nucléoside et de déterminer ainsi un rendement moyen de synthèse.

2- Le couplage.

Une fois l'alcool en 5' libéré, il peut réagir avec le phosphoramidite en 3' du nucléoside suivant en présence de tétrazole, l'agent de couplage le plus communément utilisé. De plus en plus, de nouveaux agents de couplage tentent de remplacer le tétrazole, composé pouvant causer incendies et explosions. Au nombre de ceux-ci, on peut mentionner l'ETT (5-ethylthio-1*H*-tetrazole) et plus récemment le BTT (5-benzylthio-1*H*-tetrazole) qui assurent des temps de couplage beaucoup plus courts [220].

3- Le « Capping » ou coiffage.

L'étape de couplage est directement suivie de la protection des alcools libres n'ayant pas réagi, sous la forme d'acétate, empêchant ainsi toute réaction lors des cycles ultérieurs, ce qui évite l'apparition de séquences de tailles proche à celle de l'oligomère désiré et facilitera la purification de ce dernier en fin de synthèse.

4- L'oxydation.

Le phosphite intermédiaire formé est oxydé en phosphate, mettant fin au premier cycle de synthèse.

Le cycle réactionnel est répété autant de fois que la séquence le nécessite.

Afin d'obtenir l'oligonucléotide de taille et de séquence désirées, ce dernier est clivé du support solide dans des conditions basiques permettant ainsi, par la même occasion, de déprotéger l'ensemble des groupements protecteurs des bases nucléiques. Les oligonucléotides sont finalement purifiés sur gel d'électrophorèse et/ou par CLHP et caractérisés par spectrométrie de masse MALDI ou ESI.

3.3. Méthodologie employée pour la 8vdA

3.3.1. Synthèse du phosphoramidite de la 8vdA (5)

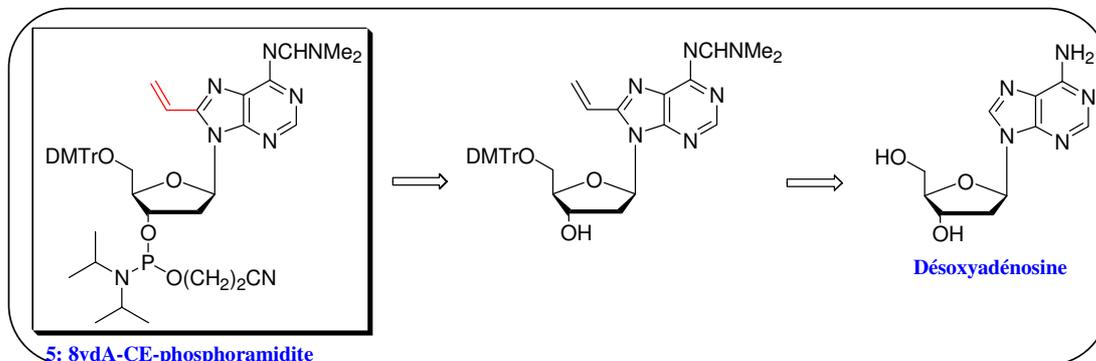


Schéma 5 : Schéma rétrosynthétique du synthon phosphoramidite de la 8vdA.

La synthèse du phosphoramidite de la 8vdA a fait l'objet d'une publication, insérée dans ce manuscrit [221], c'est pour cela que ne seront données dans cette partie que quelques précisions concernant deux étapes particulières du schéma synthétique: l'introduction du groupement vinyle en position 8 et la dernière étape de phosphitylation.

En effet l'étape clé de la synthèse du synthon phosphoramidite de la 8vdA est l'introduction du groupement vinyle en position 8 de la base. Une des méthodes de choix pour former des liaisons C-C est un couplage au palladium. Plusieurs méthodes de couplage sont connues dans la littérature et dépendent de la nature du substrat (aryle alcynes...) et du dérivé choisi (borate, stannane...). Notre choix s'est porté sur le couplage de Stille [222], dont le cycle catalytique est représenté dans le schéma 6.

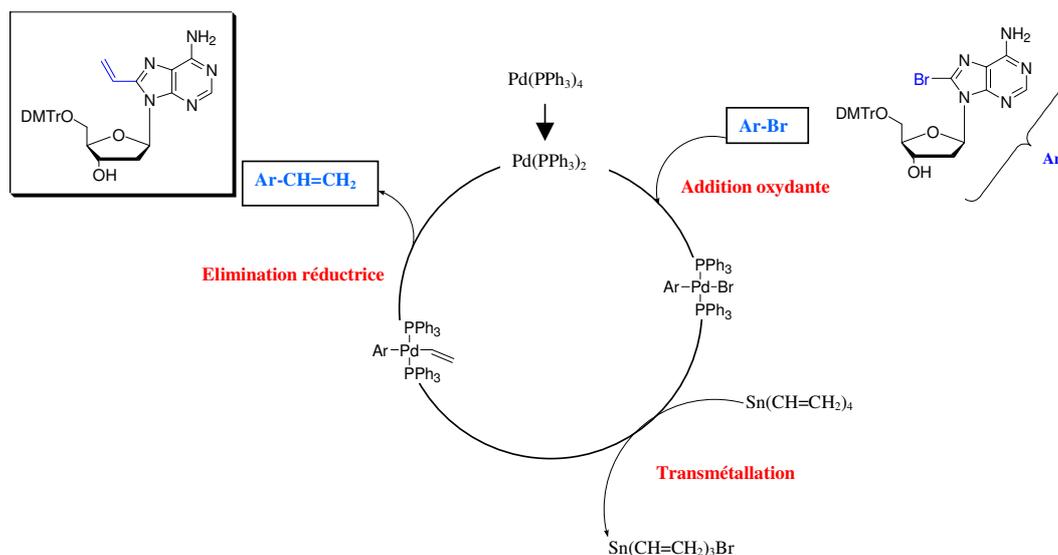


Schéma 6: Mécanisme de formation d'une liaison C-C selon le couplage de Stille, appliqué à notre synthèse.

En perdant deux ligands triphénylphosphines, le catalyseur sous la forme $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2$ peut initier le cycle catalytique. Il débute par une insertion du palladium au niveau de la liaison Aryle-halogène (Ar-Br), formant ainsi un complexe dans lequel le palladium est passé du degré d'oxydation (0) à (+II). On parle d'addition oxydante. Cette étape est suivie par l'étape de transmétallation au cours de laquelle on assiste à un échange entre l'halogène (Br) et un des groupements vinyloxygénéralisés coordonnés à l'étain. Le cycle catalytique s'achève par une élimination réductrice, au cours de laquelle $\text{Ar-CH}=\text{CH}_2$ est libéré, permettant de régénérer l'espèce catalytique réactive au degré d'oxydation (0).

La deuxième étape délicate de cette synthèse a été l'introduction du groupement phosphoramidite en 3' du composé totalement protégé (DMTr en 5' et N,N' -diméthylformamidine en N6). Ainsi, le réactif usuel préconisé lors de cette étape, le chloro- N,N' -diisopropyl-cyanoéthyl-phosphoramidite n'a pas été utilisé en raison des risques d'addition d'une molécule d' HCl sur la double liaison. Pour contourner ce problème, nous avons utilisé un autre réactif, le N,N' -diisopropyl-cyanoéthylphosphorodiamidite, malgré sa grande sensibilité. Le synthon phosphoramidite de la 8vdA a été obtenu avec un rendement de 60% après purification.

3.3.1. La 8vdA dans les séquences d'oligonucléotides

Une fois le synthon phosphoramidite de la 8vdA préparé, 4 séquences modifiées par la 8vdA ont été synthétisées sur un support CPG-dC, à l'échelle de la micromole. Les séquences ont été choisies de telle sorte que la 8vdA soit en position centrale de séquences palindromiques, non auto-complémentaires. Nous avons également cherché à étudier l'effet de la nature des 4 bases (A, C, G, T) lorsqu'elles sont directement à proximité de la 8vdA. La synthèse des séquences marquées a été effectuée en collaboration avec l'équipe du Dr. R. Marquet (UPR 9002 du CNRS, IBMC, Strasbourg).

Les phosphoramidites commerciaux (dA, dC, T, dG) utilisés lors de la synthèse des oligonucléotides marqués sont protégés par un groupement DMTr pour l'alcool primaire en 5' et les groupements phénoxyacétyles et *isopropylphénoxyacétyles* pour la fonction amine des bases puriques (respectivement dA et dG) et acétyle pour dC.

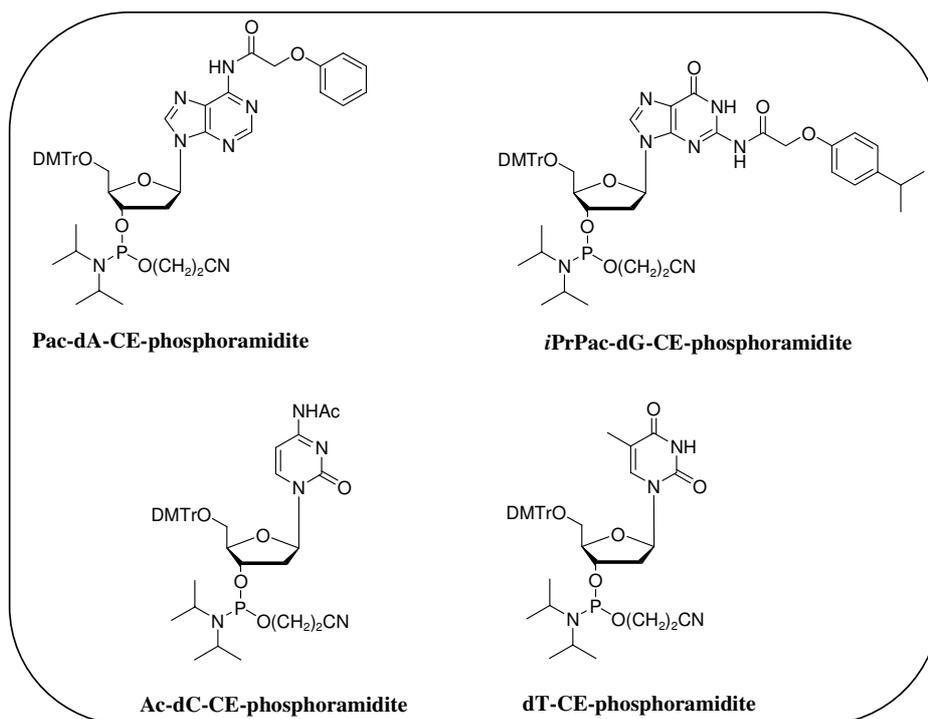


Figure 14: Synthons phosphoramidites utilisés en synthèse solide.

Il a fallu également prendre en compte la sensibilité du groupement vinyle lors des différentes étapes de synthèse en phase solide en modifiant les conditions réactionnelles de certaines étapes :

✓ Les temps de couplage ont été augmentés (35 secondes) assurant ainsi un rendement de couplage supérieur à 97%.

✓ L'anhydride acétique a été remplacé par l'anhydride phénoxyacétique évitant ainsi la formation de dG-N6 acétylés.

✓ Quant à l'étape d'oxydation, nous avons préféré remplacer l'agent d'oxydation habituellement utilisé en synthèse d'oligonucléotides (I₂, Pyridine, H₂O, THF) par de la butanone peroxyde [223], qui assure des conditions d'oxydation douces, plus adéquates avec le groupement protecteur formamidine.

✓ Les oligonucléotides ont été déprotégés du support solide par traitement avec une solution aqueuse d'NH₄OH à 28%. Une cinétique de déprotection de l'oligonucléotide sur 24h a été effectuée avec un suivi par CLHP (Cf. figure 7 partie supplémentaire). Cette étude a permis de mettre en évidence la formation d'un produit secondaire qui s'accumule au cours du temps et qui résulterait de l'addition d'une molécule d'ammoniaque sur la double liaison. La formation de ce sous-produit a également été confirmée par spectrométrie de masse MALDI-Tof. Les temps de déprotection du support solide ont donc été fortement réduits puisque 4 heures suffissent pour récupérer l'oligonucléotide marqué.

Des séquences modèles ont été synthétisées pour lesquelles la 8vdA et la dA ont été incorporées en position centrale. Une étude comparative avec les oligomères contenant soit la 8vdA, soit la 2-AP, soit la désoxyadénosine a été menée en collaboration avec l'équipe du Pr. Y. Mély (UMR 7034 du CNRS, faculté de pharmacie, Strasbourg) et nous a permis de montrer que :

- ✓ Comparativement à la dA, la 8vdA ne déstabilise que très faiblement le duplex.
- ✓ Comme la dA, la 8vdA s'associe préférentiellement avec la dT en formant un appariement Watson-Crick.
- ✓ La 8vdA est un meilleur mime de l'adénosine que la 2-AP puisque dans 2 séquences sur 3 la déstabilisation du duplex est moindre.
- ✓ Dans toutes les séquences et comparativement aux oligonucléotides contenant la 2-AP, un gain en sensibilité d'un facteur 3 à 4 a été mesuré dans les études de fluorescence.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

8-vinyl-deoxyadenosine, an alternative fluorescent nucleoside analog to 2'-deoxyribosyl-2-aminopurine with improved properties

Nouha Ben Gaied, Nicole Glasser, Nick Ramalanjaona, Hervé Beltz, Philippe Wolff, Roland Marquet, Alain Burger and Yves Mély

Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, 1031–1039

Pages 1031 à 1039 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/33/3/1031>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Supporting information

8-vinyl-deoxyadenosine, an alternative fluorescent nucleoside analogue to 2'-deoxyribosyl-2-aminopurine with improved properties.

Nouha Ben Gaied^{a,#}, Nicole Glasser^{b,#}, Nick Ramalanjaona^b, Hervé Beltz^b, Philippe Wolff^c, Roland Marquet^c, Alain Burger^{a,*}, Yves Mely^b.

Synthesis: General information.

All nucleoside derivatives were dried twice by coevaporation with dry pyridine before use. Pyridine was distilled and stored over KOH. EtOAc was distilled over CaH₂; CH₂Cl₂ was distilled over P₂O₅, stored over molecular sieves (4Å) and filtered through an activated alumina column before use. Tetrazole was sublimated (P= 0.1 mBar, oil bath = 85°C, caution do not exceed 100°C). Pd(PPh₃)₄ was synthesised according to the procedure of Heck (43). Flash chromatography was made on silica gel purchased from Merck (40-63 µm) treated with NEt₃ to prevent dimethoxytrityl degradation. Thin layer chromatography was performed on Merck 60F₂₅₄ coated plates. Chromatography of the phosphoramidite was done on silica gel pre-treated as followed: silica gel was washed successively with HCl (1N), water, NH₄OH (10%) and water and finally, dried under reduced pressure. The phosphoramidite **6** was dissolved in CH₃CN (0.1M) (high quality for DNA synthesis, Fluka), stored overnight over activated 3Å molecular sieves (Merck) and filtered through a 0.45µm filter (Millex®-HV, Millipore) before use in oligonucleotide synthesis.

NMR spectra were recorded at 200, 300 or 500 MHz on a Bruker Advance Spectrometer. The NMR chemical shifts are reported in ppm downfield from TMS for ¹H and ¹³C NMR and 85% H₃PO₄ for ³¹P NMR. Mass spectra were recorded on an Esquire 3000 Plus equipment, in either positive or negative Electron Spray Ionisation (ESI) mode.

5'-Dimethoxytrityl-8-vinyl -2'-deoxyadenosine (4):

In a Schlenk flask, compound **3** (500 mg, 0.8 mmol) was dissolved in N-methylpyrrolidone (NMP, 2.7 mL). Pd(PPh₃)₄ (90 mg, 0.078 mmol) was added and the

reaction mixture was degassed three times before adding tetravinyltin under Ar (290 μ L, 1.58 mmol). The reaction was then heated in an oil bath at 110°C and followed by TLC (CHCl₃/MeOH/NEt₃ 93:5:1). After 1h, the reaction mixture was cooled to room temperature, and EtOAc and H₂O were added. The mixture was filtered over celite and the filtrate was washed twice with H₂O (40 mL), a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (20 mL), and brine (20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. An oily residue was obtained and purified on pretreated silica gel. The product was eluted with CH₂Cl₂/ MeOH (0 \rightarrow 5%). An amorphous solid was obtained in 82% yield (656 mg). Mp:151°C (decomp.). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 8.1 (1H, s, H₂), 7.38-7.12 (9H, m, DMTr), 7.07-7.01 (1H, dd, J₁= 11 Hz & J₂= 17 Hz, H_{vinyl}), 6.76- 6.72 (4H, m, DMTr), 6.48-6.43 (2H, t, J= 7 Hz, H₁ & dd: J₁= 1.5 and J₂= 17 Hz, H_{trans}), 5.93 (2H, s, NH₂), 5.48-5.44 (1H, dd, J₁= 1.5 Hz & J₂= 11 Hz, H_{cis}), 4.82-4.77 (1H, m, H_{4'}), 4.04-4.0 (1H, m, H_{3'}), 3.66 (6H, s, OCH₃ DMTr), 3.42-3.2 (3H, 2H_{5'} & H_{2'}), 2.3- 2.21 (1H, m, H₂). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.4 MHz): 158.4 (q), 154.9 (q), 152.3 (t), 150.5 (q), 144.6 (q), 135.8 (t), 130.1 (t), 128.3 (t), 128.1 (t), 127.8 (t), 126.8 (t), 124.1 (s), 119.2 (q) 113.6 (t), 85.7 (t), 83.5 (t), 72.1 (t), 63.3 (s), 55.2 (p), 38.5 (s). ESI MS (m/z): 614.0 [M+ Cl]⁻.

5'-Dimethoxytrityl-6-N,N-dimethylformamidine-8-vinyl-2'-deoxyadenosine (5):

Compound **4** (500 mg, 0.86 mmol) was dissolved in MeOH (3 mL) and N,N-dimethyl-dimethoxyformamide (575 μ L, 4.3 mmol) was added. After completion (TLC: CHCl₃/ MeOH/ NEt₃ 94:5:1), EtOAc was added and the organic phase was extracted with H₂O (15 mL), a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (30 mL), and brine (15 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The resulting product (802 mg, 93%) was pure enough to be used in the next step without further purification. Mp:146°C (decomp.). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 8.90 (1H, s, N=CH), 8.38 (1H, s, H₂), 7.41-7.07 (9H, m, DMTr), 7.03-6.8 (1H, dd, J₁=

11.2 Hz & $J_2= 17.2$ Hz, H_{vinyl}), 6.8- 6.7 (4H, m, DMTr), 6.6- 6.5 (2H, $J_1= 1.3$ Hz & $J_2= 17.2$ Hz, H_1' and H_{trans}), 5.55- 5.50 (1H, dd, $J_1= 1.3$ Hz & $J_2= 11.2$ Hz, H_{Cis}), 4.92- 4.87 (1H, m, H_4'), 4.17- 4.08 (1H, m, H_3'), 3.7 (6H, s, CH_3 DMTr), 3.43- 3.21 (3H, H_5' & H_2'), 3.16 (3H, s, NCH_3), 3.15 (3H, s, NCH_3), 2.36- 2.30 (1H, m, H_2'). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.4 MHz): 159 (q), 158.4 (q), 158 (t), 152.4 (q), 152 (t), 150 (q), 144.65 (q), 135.8 (t), 130.0 (t), 128.3 (t), 128.1 (t), 127.8 (t), 126.8 (t), 124.5 (s), 124 (q), 113 (t), 85.5 (t), 83.3 (t), 72.2 (t) 63.3 (s), 55.2 (p), 38.6 (p), 35.2 (s), 29.6 (p). ESI MS (m/z): 635.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 657.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 680.1 $[\text{M}+ 2\text{Na}]^+$.

3'-N,N'-diisopropylcyanoethylphosphoramidite-5'-dimethoxytrityl-6-N,N-dimethylformamidine-8-vinyl-2'-deoxyadenosine (6):

Compound **5** (300 mg, 0.473 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (1.4 mL) under Ar. Tetrazole (16.6 mg, 0.28 mmol) was added, followed by a freshly prepared solution of N,N'-diisopropyl-cyanoethyl-phosphorodiamidite (225 μL , 0.71 mmol) in dry CH_2Cl_2 (200 μL). After 4h stirring (TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}/\text{NEt}_3$ 45:45:10), EtOAc and NEt_3 were added and the organic phase was washed with a saturated solution of NaHCO_3 and brine; dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The oily residue obtained was purified on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}/\text{NEt}_3$ 45:45:10). The phosphoramidite monomer was dissolved in toluene so that a 35% solution was obtained. The solution was slowly added to a rapidly stirred and cooled solution of hexane (-20°C , 20-25 volumes). The precipitated phosphoramidite **6** (237 mg, 0.284 mmol) was obtained in 60% yield. ^1H NMR (CD_2Cl_2 , 300 MHz): 8.9 (1H, s, $\text{N}=\text{CH}$), 8.3 (1H, s, H_2), 7.4- 7.2 (9H, m, DMTr), 7.1-6.90 (1H, dd, $J_1= 11$ Hz & $J_2= 17$ Hz, H_{vinyl}), 6.80- 6.75 (4H, m, DMTr), 6.6- 6.4 (2H, m, H_1' and H_{trans}), 5.6- 5.5 (1H, m, H_{Cis}), 5- 4.9 (1H, m, H_3'), 4.2 (1H, m, H_4'), 3.8 (6H, s, CH_3 DMTr), 3.7- 3.6 (5H, m, CH_2O , $H_{\text{isopropyl}}$, H_2' ; H_5'), 3.24- 3.21 (6H, s, CH_3), 2.67- 2.60 (1H, s, H_2'), 2.58- 2.48 (2H, m, CH_2CN), 1.35- 1.10 (12H, m, CH_3

isopropyl). ^{31}P NMR (200 MHz, CD_2Cl_2): 149.9 and 149.2 ppm. ES MS (m/z): 835.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Solid phase oligonucleotide synthesis.

Three 15 mer sequences (ODN1 to ODN3) differing by the closest neighbors to the nucleoside analogue (N= 8vdA or 2AP) were synthesized in this study. Their sequences are d(CGT TTT **XX** TTT TGC) with X=T, A, and C for ODN1, ODN2 and ODN3, respectively.

Oligodeoxyribonucleotides containing 8vdA were synthesized on an Applied Biosystem 392 synthesizer using fast-deprotecting phosphoramidite chemistry at a 1 μmol scale. Pac-dA, iPr-Pac-dG, Ac-dC and T phosphoramidites were purchased from Eurogentec Glen Research. The following modifications to the standard procedure were applied. A longer coupling time (35 s) for 8vdA was used to ensure a high coupling yield. Dichloroacetic acid (3%) in acetonitrile was used for removal of the dimethoxytrityl group (DMTr) (32). Phenoxyacetic anhydride (Pac_2O) was used in Cap A (33). Phosphite oxidation was realized with 2-butanone peroxide in CH_2Cl_2 (0.1 M) (36). The 5'-terminal DMTr group of the synthesized ODNs was removed prior to its cleavage from the solid support. Each oligonucleotide was then cleaved and deprotected by treating the solid support with concentrated ammonia (28%) during 4 hours at room temperature. They were further evaporated to dryness and finally purified by HPLC on a DNAPACTM PA-100 column (9 \times 250 mm) purchased from Dionex. HPLC conditions (50 $^\circ\text{C}$): solution A = 4M urea 10% acetonitrile-20mM Mes buffer pH 6.5-1mM NaClO_4 and solution B = 400 mM NaClO_4 ; gradient = 85%A-15%B to 35%A-65%B in 50 min at a flow rate of 1ml/min. The oligomers were desalted by gel filtration on Sephadex G25 purchased from Pharmacia. The final oligonucleotide concentration was determined by UV absorption at 260 nm. Prior to mass spectrometry, metallic cations of the oligonucleotides were exchanged with ammonium

(diammonium hydrogen citrate) using C₄ Reverse Phase ZipTip[®] purchased from Millipore. MALDI TOF MS analysis was realized on a Bruker Biflex III in a linear negative mode. All samples were analysed using 3-hydroxypicolinic acid as matrix (Aldrich).

ODN1: DO_{260nm}= 30 (24%), MS [M-H]⁻ calc. 4555 found 4556; ODN2 : DO_{260nm}= 28 (20%), MS [M-H]⁻ calc. 4573 found 4571. ODN3 : DO_{260nm}= 32 (25%), MS [M-H]⁻ calc. 4525 found 4528;

Nonlabeled (N= A) or 2AP-labeled (N= 2AP) ODN1 to ODN3 oligonucleotides as well as their complementary sequences were purchased by IBA GmbH Nucleic Acids Product Supply (Göttingen, Germany).

Figure 7: HPLC chromatograms of the 8vdA-labeled ODN3 crude product obtained after 4 hours (a) and 24 hours (b) treatment with NH₄OH.

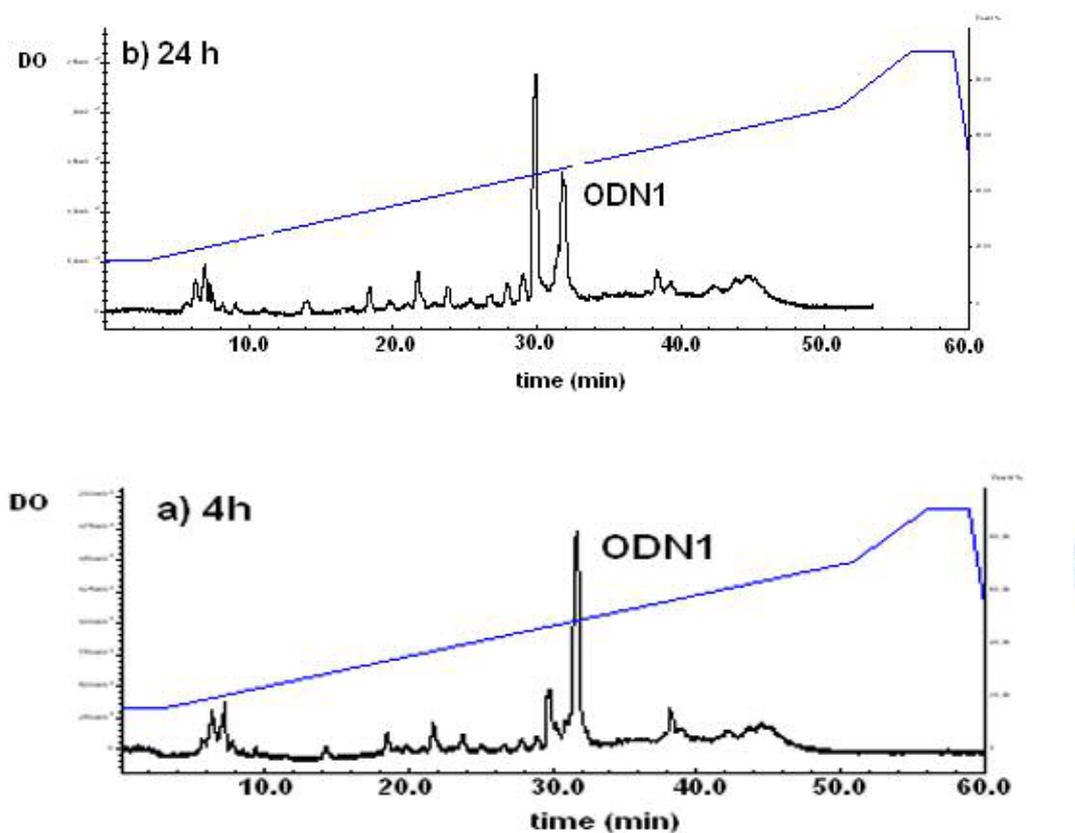
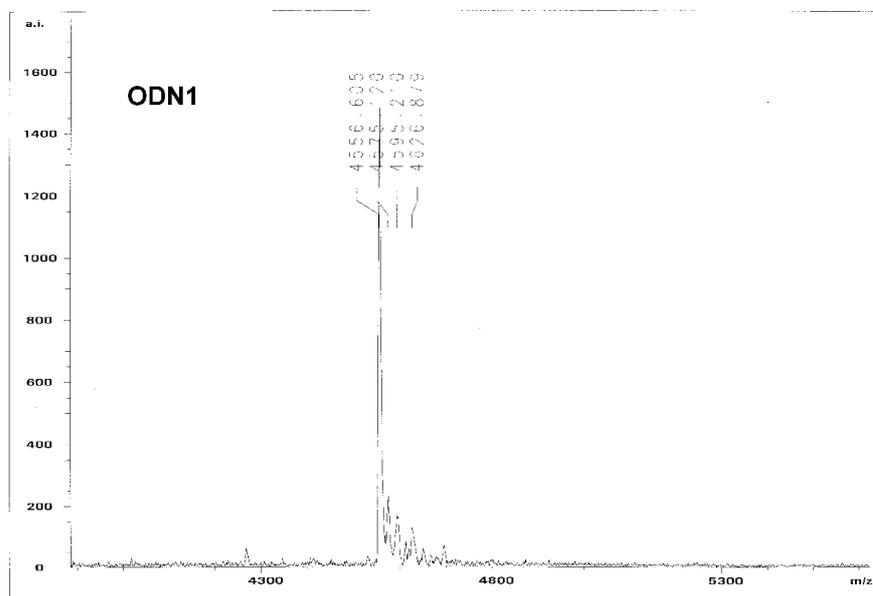
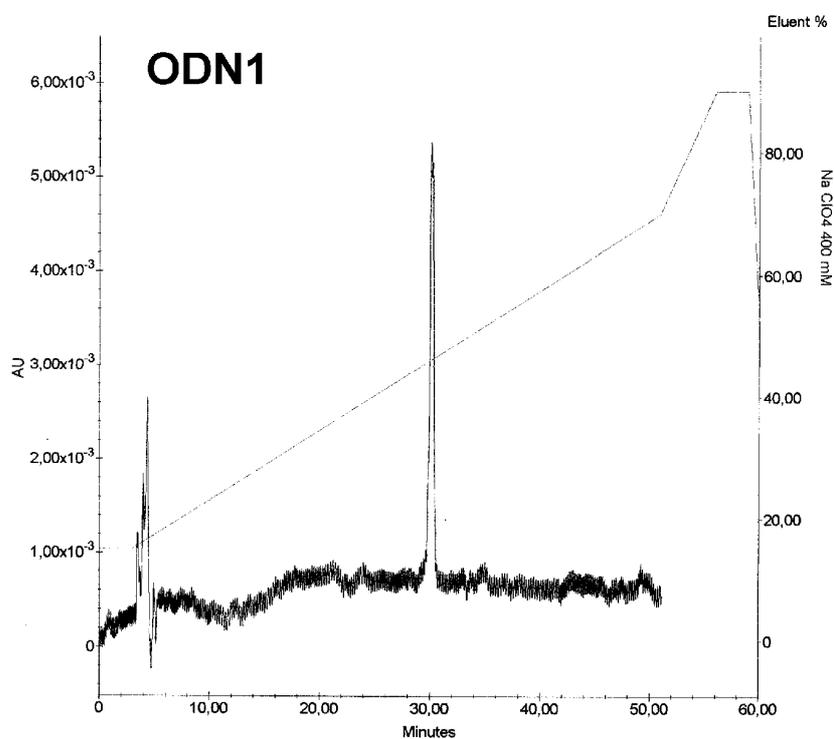
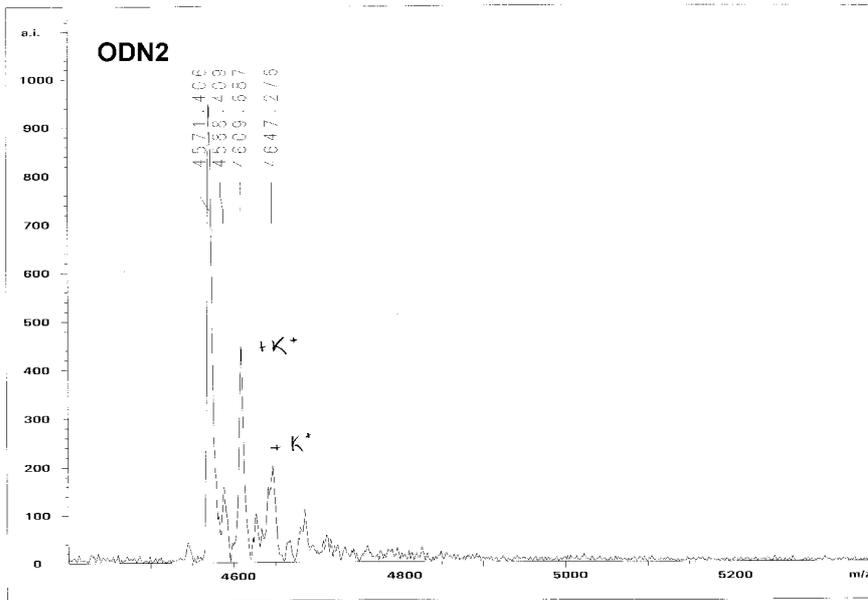
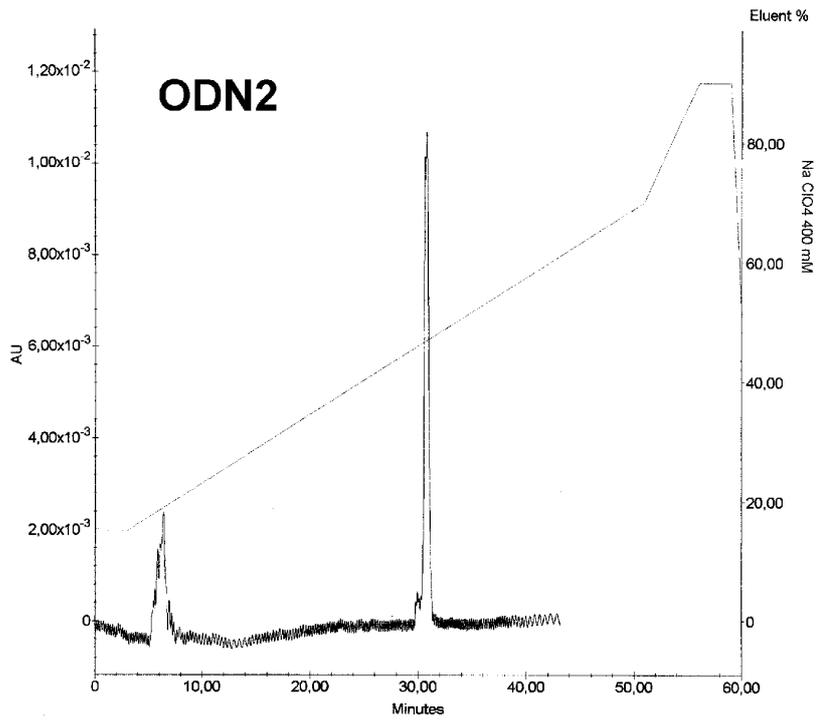
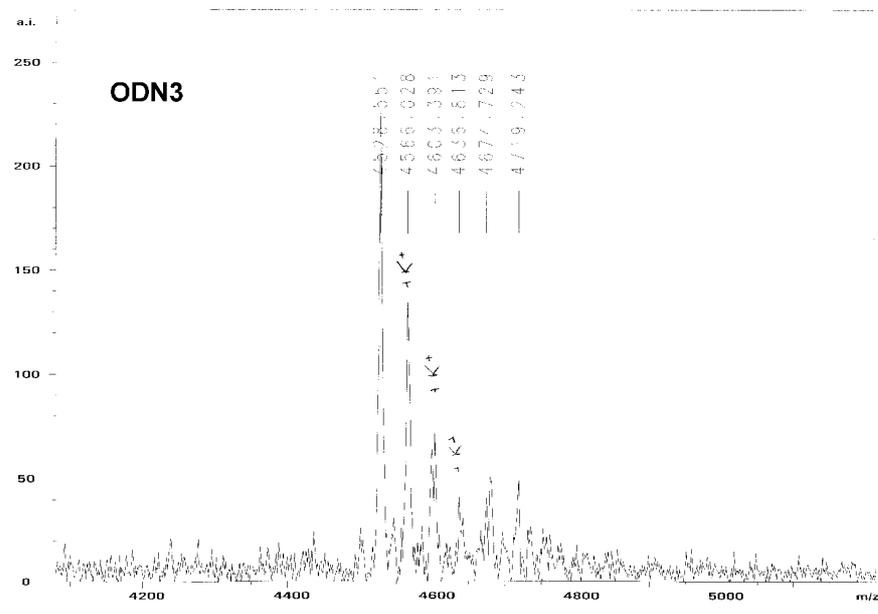
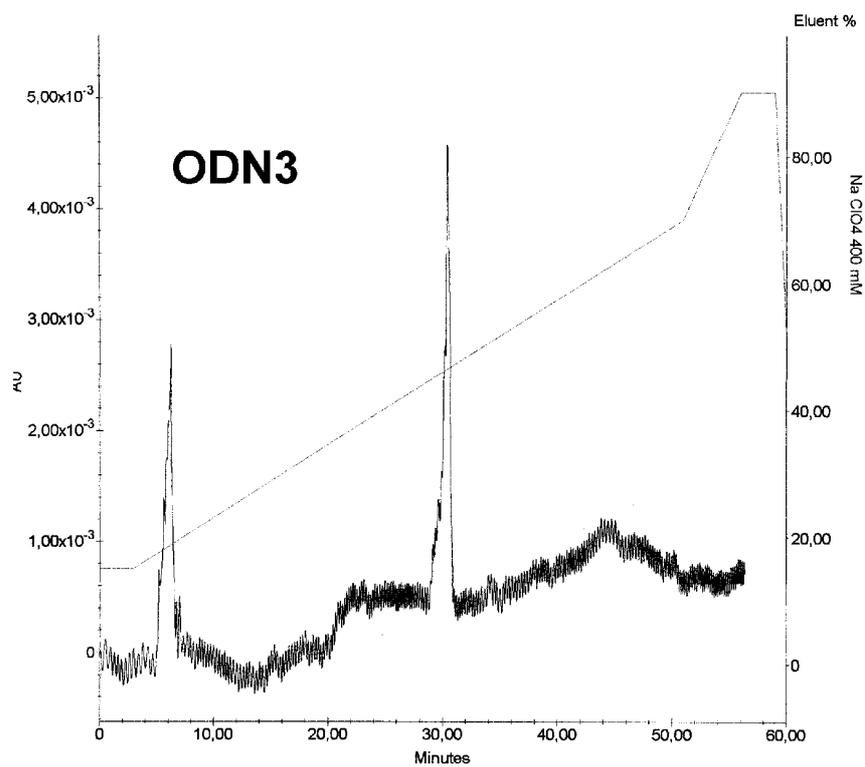


Figure 8: Anion exchange HPLC chromatograms and MALDI-TOF mass spectra of purified ODN1, ODN2 and ODN3





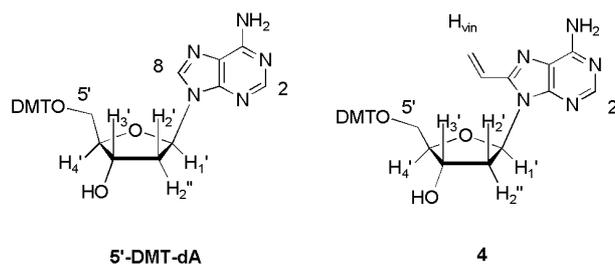


Conformational analysis

A) Sugar ring conformation analysis

The fraction of the South type conformer was deduced from the graphical method developed by Rinkel and Altona using the sums of J coupling constants (*J. Biomol. Struct. Dyn.* **4**, 621-649 (1987)).

Proton numbering



Sums of J coupling

Compound	$\Sigma_{1'}$	$\Sigma_{2'}$	$\Sigma_{2''}$	$\Sigma_{3'}$
4	13.4	27.4	24.7	15.5
5'-DMT-dA	13.0	26.4	24.2	14.1

Sums of J coupling constants Σ in Hz determined by ^1H NMR (500MHz, CD_2Cl_2) at 300K: $\Sigma_{1'} = J_{1'2'} + J_{1'2''}$, $\Sigma_{2'} = J_{1'2'} + J_{2'3'} + J_{2'2''}$, $\Sigma_{2''} = J_{1'2''} + J_{2''3'} + J_{2'2''}$, $\Sigma_{3'} = J_{2'3'} + J_{2''3'} + J_{3'4'}$

Figure 9a: 1D ¹H NMR, COSY and NOESY spectra of 5'-DMT-dA

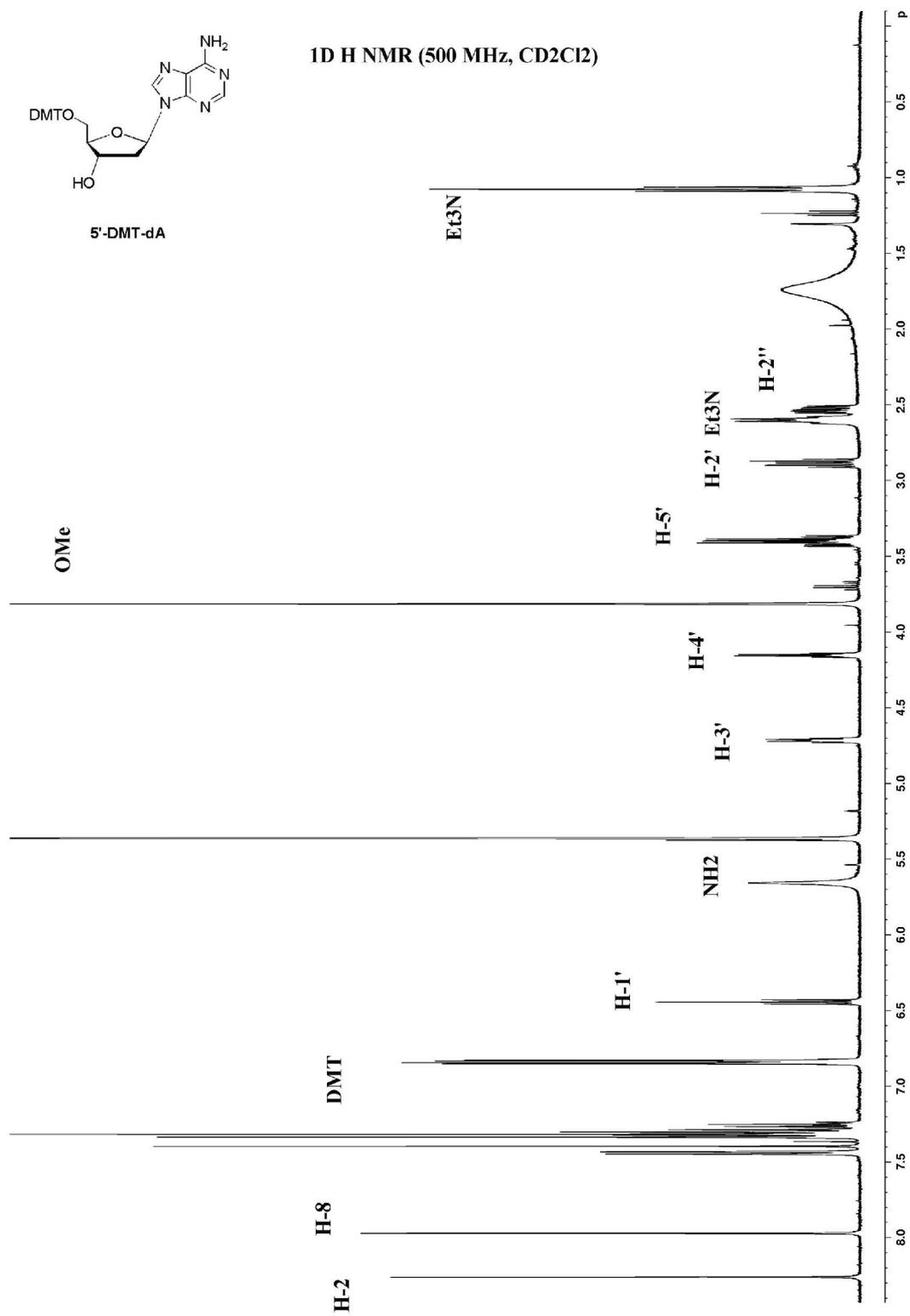
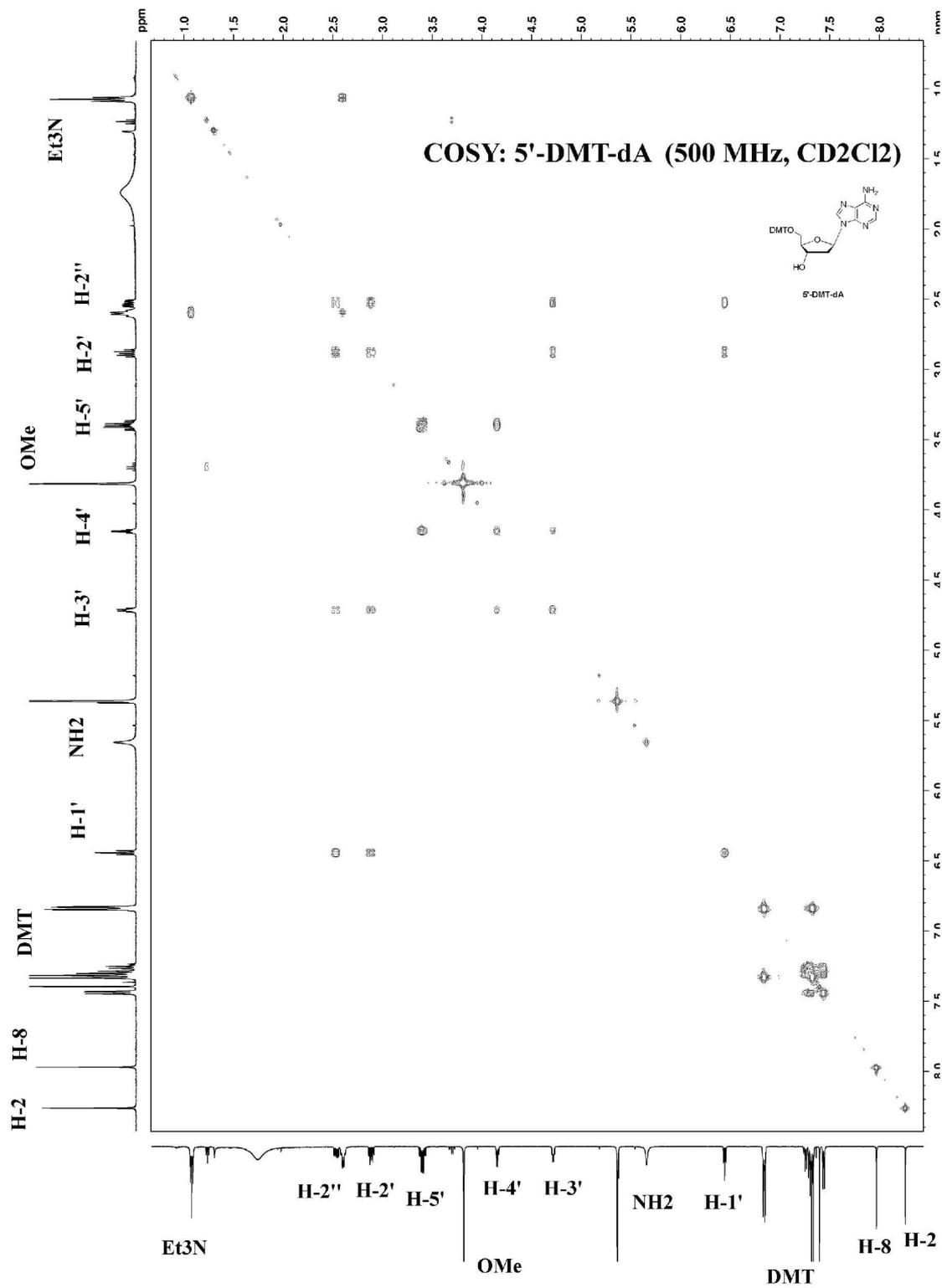
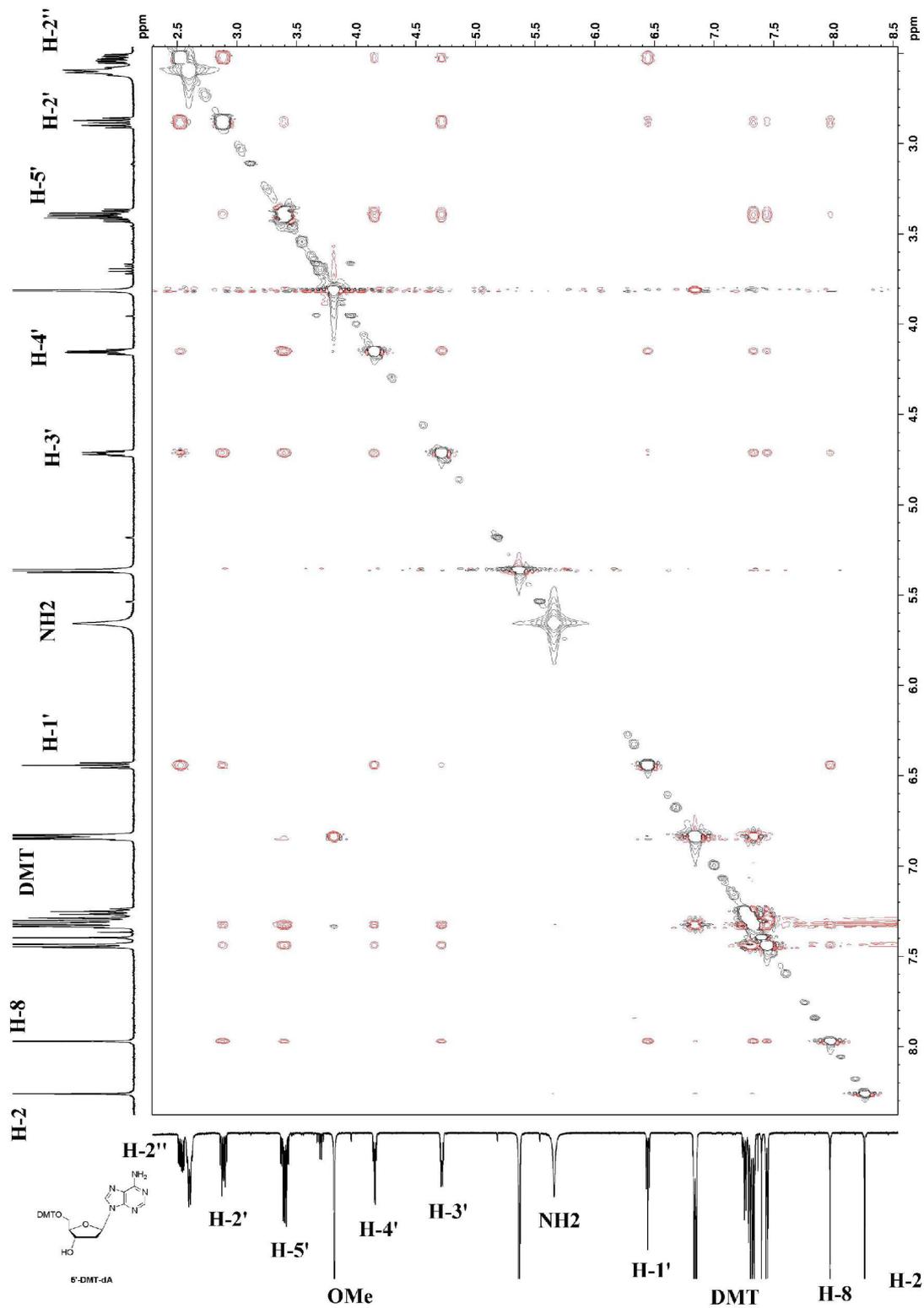


Figure 9 : spectra of 5'-DMT-dA



NOESY, 5'-DMT-dA (500 Mhz, CD2Cl2)



NOESY, 5'-DMT-dA (500 Mz, CD₂Cl₂)

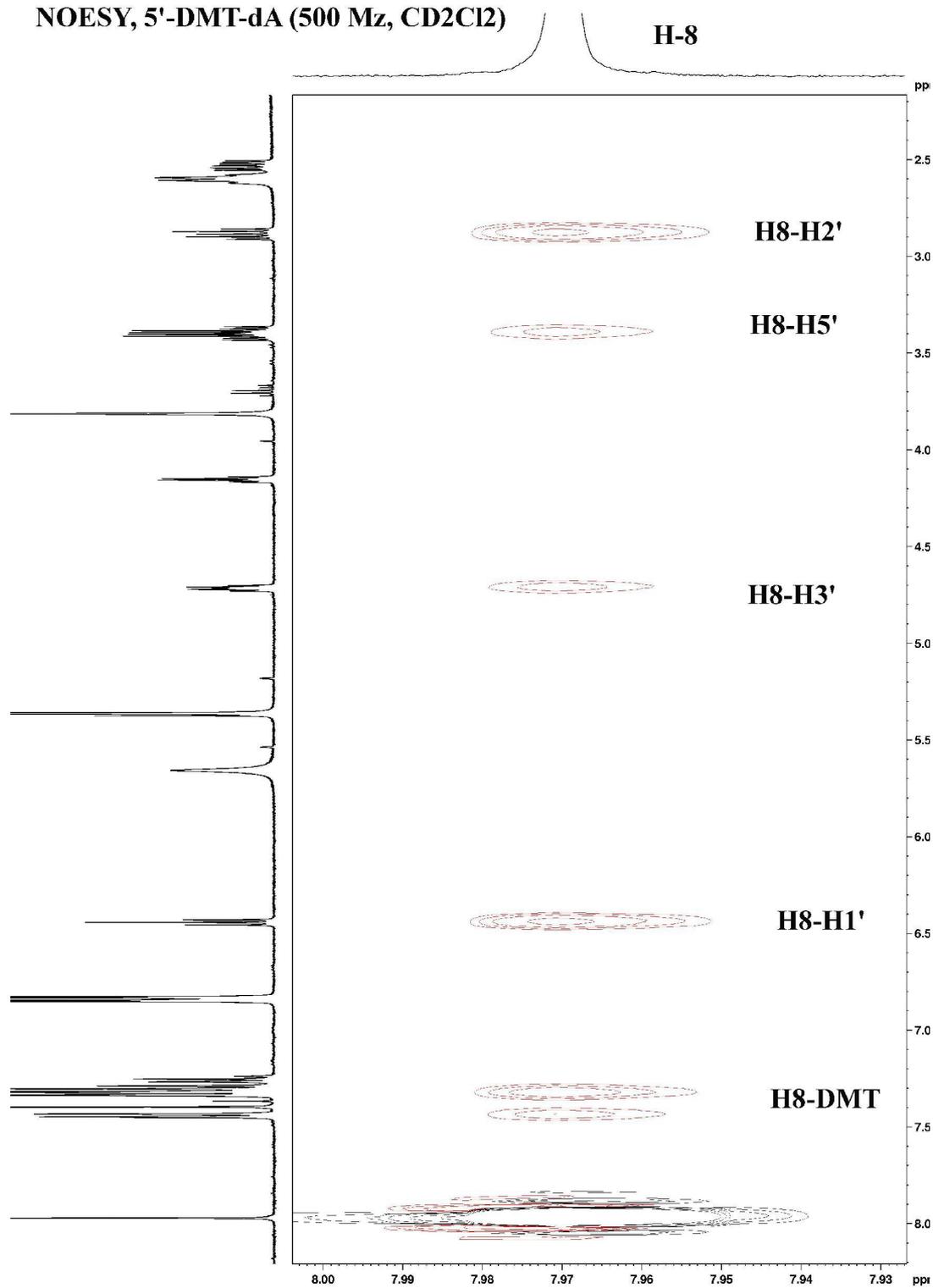
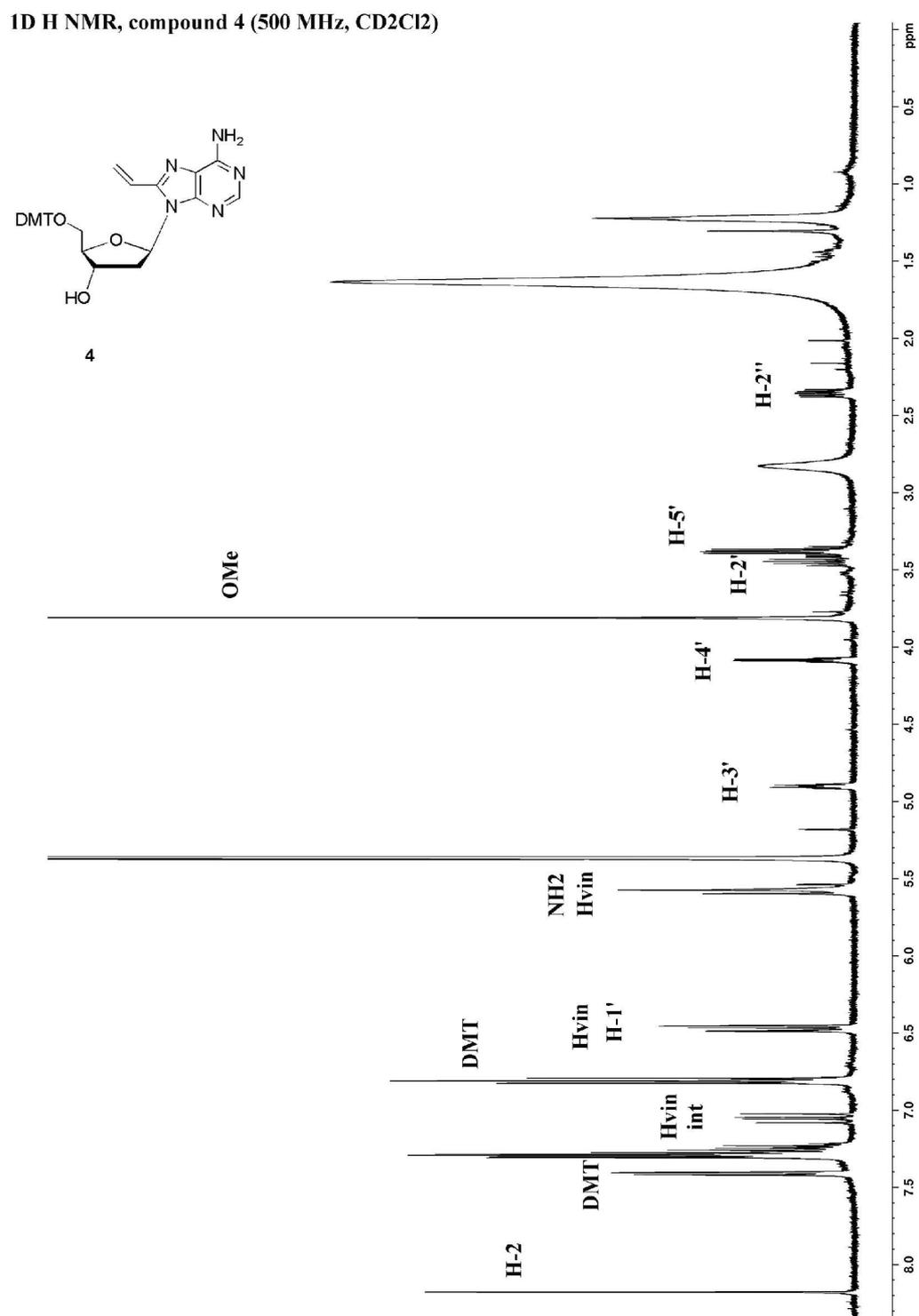
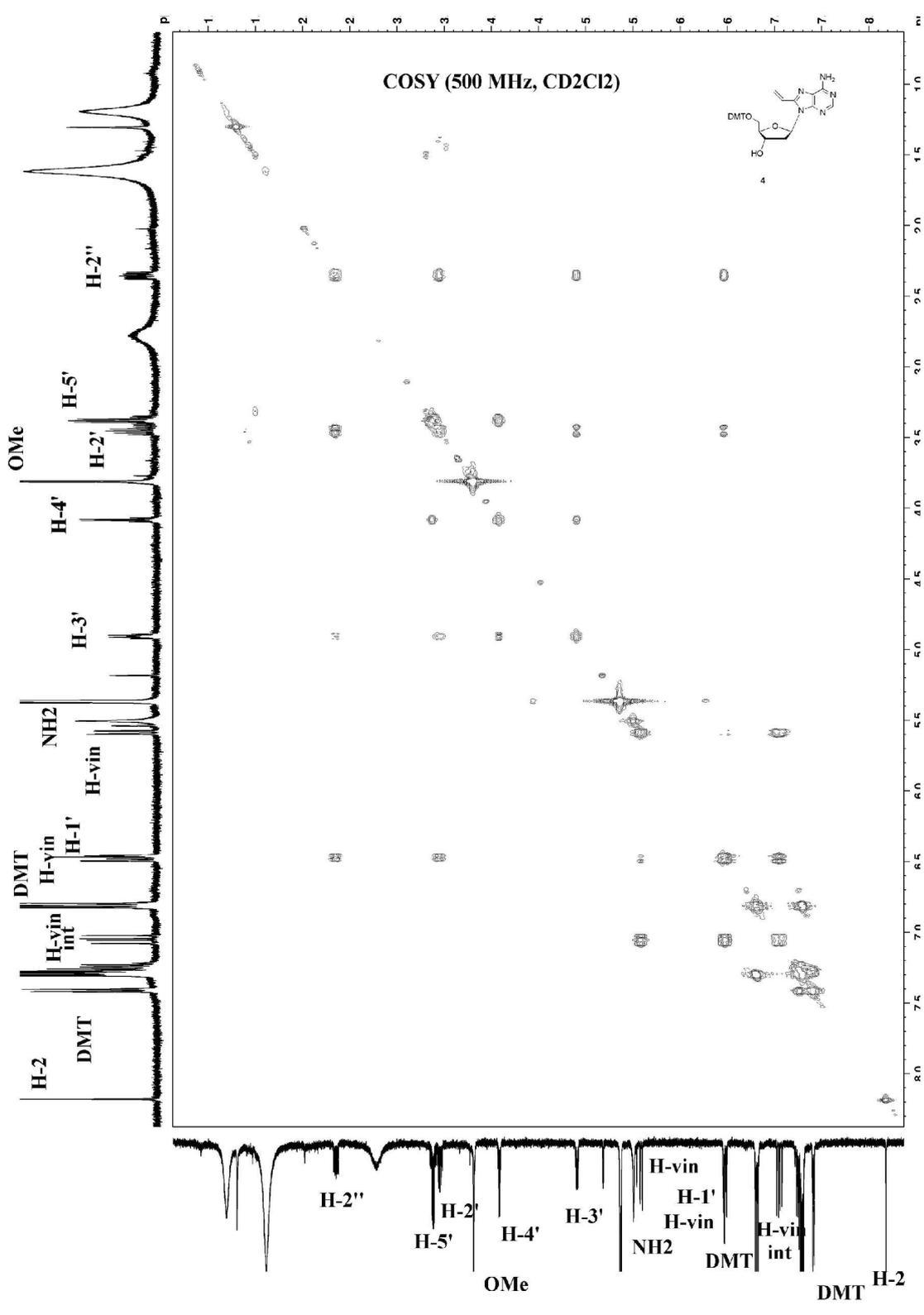
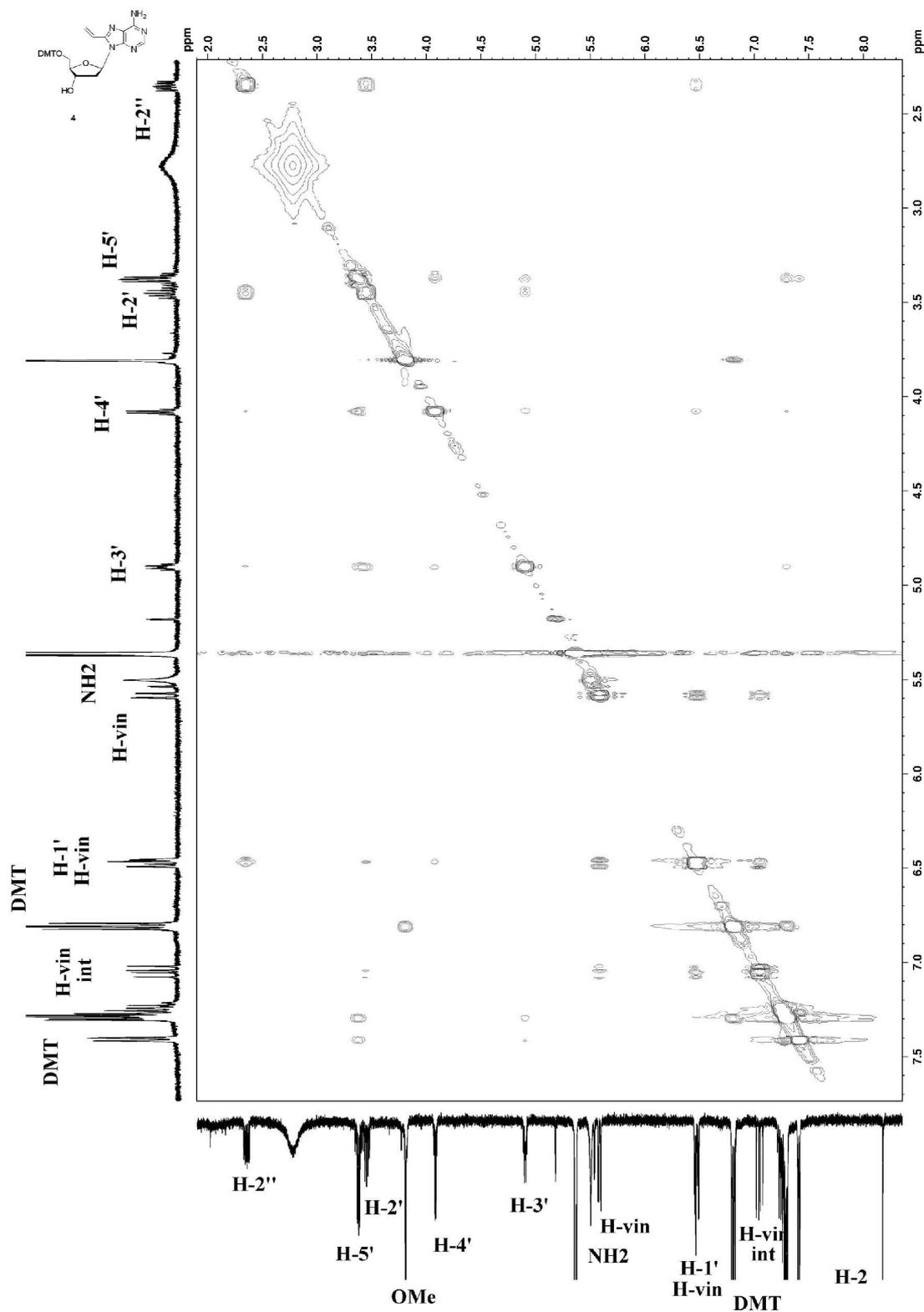


Figure 10 : 1D ¹H NMR, COSY and NOESY spectra of compound 4

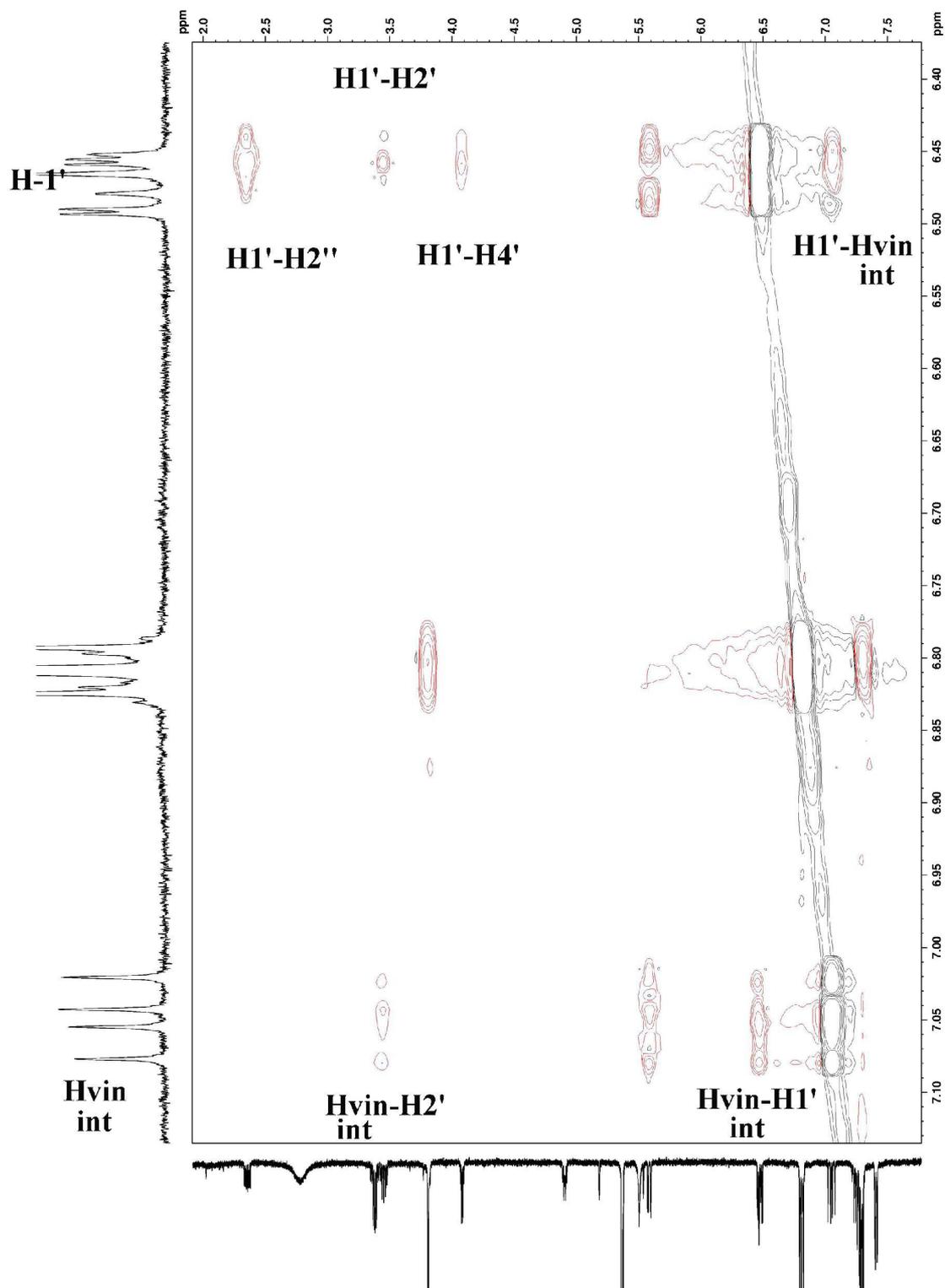




NOESY, Compound 4 (500 MHz, CD₂Cl₂)



NOESY, Compound 4 (500 MHz, CD₂Cl₂)



3.3.2. La 8vdA et cTAR

Compte tenu des propriétés spectrales et de fluorescence supérieures de la 8vdA, nous avons cherché à exploiter ces qualités en préparant des séquences de cTAR marquées avec notre sonde. Pour comparaison, les mêmes séquences marquées à la 2-AP seront également étudiées. Avec ces séquences, nous souhaitons étudier les cinétiques d'appariement avec la séquence complémentaire de TAR avec et sans NCp7 et sous différentes conditions. Différentes positions de la boucle, du renflement et de la tige ont été choisies pour être marquées (figure 15).

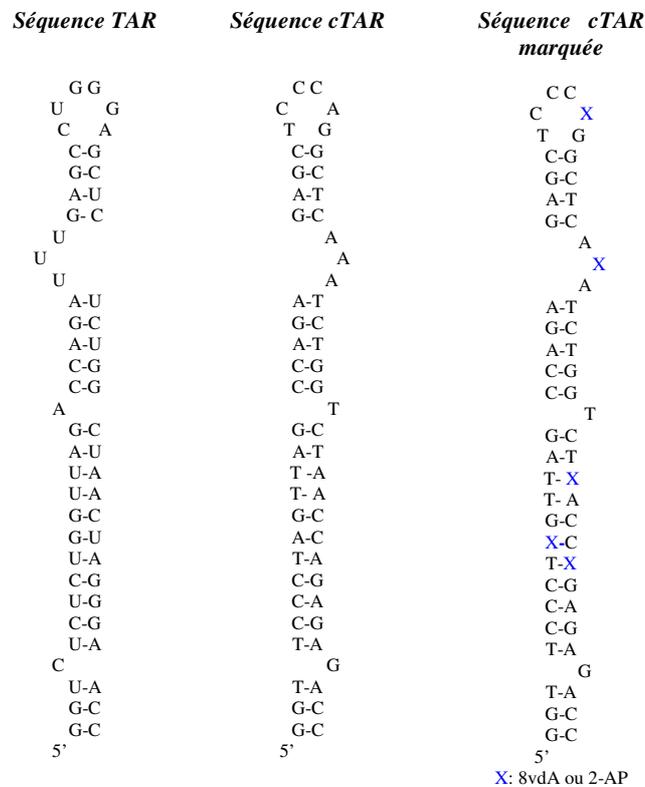


Figure 15 : Structure des séquences TAR, cTAR et cTAR marquée.

X indique dans la séquence cTAR, la position où soit de la 2-AP soit de la 8vdA a été incorporée ponctuellement à la place de la dA.

Les séquences retenues pour mener ces études sont indiquées ci-dessous:

Séquences longues (X : 8vdA ou 2-AP) :

ODN 5: 5'-GGT TCC CTX GTT AGC CAG AGA GCT CCC AGG CTC AAA TCT GGT CTA ACC AGA GAG ACC-3'

ODN 6: 5'-GGT TCC CTA GTT AGC CAG AGA GCT CCC XGG CTC AAA TCT GGT CTA ACC AGA GAG ACC-3'

ODN 7: 5'-GGT TCC CTA GTT AGC CAG AGA GCT CCC AGG CTC AXA TCT GGT CTA ACC AGA GAG ACC-3'

ODN 8: 5'-GGT TCC CTA GTT AGC CAG AGA GCT CCC AGG CTC AAA TCT GGT CTX ACC AGA GAG ACC-3'

ODN 9: 5'-GGT TCC CTA GTT AGC CAG AGA GCT CCC AGG CTC AAA TCT GGT CTA ACC XGA GAG ACC-3'

Des séquences plus courtes :

ODN 10: 5'-CCA GAG AGC TCC CXG GCT CAA ATC TGG-3'

ODN 11: 5'-CCA GAG AGC TCC CAG GCT CAX ATC TGG-3'

Pour accéder à ces séquences, les oligonucléotides marqués à la 8vdA ont été synthétisés comme décrit [221], alors que les séquences marquées à la 2-AP ont été achetées.

Ce travail a été réalisé dans l'équipe du Dr. Roland Marquet (UPR 9002, IBMC, Strasbourg). Après purification, l'analyse par CLHP sur résine échangeuse d'anion et par gel de polyacrylamide indique que le produit est homogène. Par contre, seules les **ODN7** et **11** ont pu être détectés en spectroscopie de masse. Le rapport m/z du signal obtenu est en accord avec la masse attendue. Cependant toutes les séquences synthétisées ont été analysées en spectroscopie de fluorescence et un spectre d'émission conforme à ce qui est attendu pour un oligonucléotide marqué à la 8vdA a été obtenu dans chacun des cas. C'est pourquoi, nous avons décidé de poursuivre nos études avec ces oligomères. Les études par spectroscopie de fluorescence sont en cours dans l'équipe du Pr. Y. Mély (UMR 7034 du CNRS, Faculté de pharmacie, Strasbourg).

IV. Synthèse de la 8-thiényl-désoxyadénosine (8thdA)

La 8vdA présente cependant quelques inconvénients qui pourraient être un frein à son développement. En effet la synthèse de la 8vdA s'est avérée être assez difficile à mettre en œuvre. Même si des solutions ont été trouvées pour palier à ses problèmes, les rendements de synthèse, notamment pour le synthon phosphoramidite, sont encore à améliorer. Il a également été nécessaire d'avoir recours à des conditions opératoires beaucoup plus douces lors de la synthèse en phase solide, qui soient compatibles avec une telle modification. Il est également à noter que dans nos premières synthèses, la séquence flanquée de 2 G de part et d'autre de la 8vdA n'a pu être préparée en raison de sa grande sensibilité.

Dans le but d'améliorer les propriétés spectrales et chimiques de la dA, un certain nombre de modifications fonctionnelles peuvent être introduites sur la base à la place du groupement vinyle. Parmi elles, un furane, un thiophène ou encore un thiazole peuvent être

envisagés. Nous avons choisi d'introduire dans un premier temps un groupement thiénylé en position 8 de la base afin d'augmenter la conjugaison avec le noyau purique. Un thiophène présente d'ailleurs l'avantage d'être plus stable chimiquement qu'un furane. Notre choix a été orienté sur le thiophène suite à différentes observations récoltées dans la littérature.

Le choix de ce groupement fonctionnel a été conditionné par la possibilité que devait conserver la base à établir des liaisons hydrogène de type Watson-Crick avec le brin complémentaire. En effet la fonctionnalisation de la position 8 est généralement accompagnée par une modification de la répartition des conformations *syn/anti* en faveur de la conformation *syn*. Il était donc important de s'assurer que la présence d'une telle modification serait compatible avec une conformation *anti* de la base.

En se tournant vers la littérature, il s'est avéré que le groupement thiénylé a déjà été introduit en position 8 de la A et de la dA. La 8-thiényl-dA s'est révélée être un inhibiteur de la glycéraldehyde-3-phosphate-déshydrogénase (GAPDH) du parasite responsable de la maladie du sommeil [224, 225]. Cette enzyme est d'ailleurs cruciale au métabolisme du parasite. La 8-thiényl-adénine quant à elle, a été testée en temps qu'agoniste partiel du récepteur adénosine A1 de fibroblastes humains [226] et comme inhibiteur potentiel de cytomégalovirus [227].

Il a été montré par ailleurs grâce à des expériences NOESY sur un autre composé, la 8-(2-thiényl)-2'-benzamido-2'-désoxyadenosine, que des interactions NOE existent d'une part entre les hydrogènes du thiénylé (H3'' et H5'') et l'hydrogène H5'. Ces observations montrent clairement que le groupement thiénylé est situé au dessus du plan moyen du sucre, adoptant ainsi une conformation *anti* par rapport à la liaison glycosidique [228].

D'autre part une interaction NOE est observée entre le proton H1' et les protons H2'''/H6''' du groupement benzamide indiquant une proximité spatiale entre H1' et les protons du phényle. D'autres interactions NOE ont été mises en évidence entre H2'''/H6''' et les deux H5', de même qu'entre H3'''/H5''' et les deux H5'. L'ensemble de ces données penche pour une orientation *trans* du groupement benzamido par rapport au plan du sucre, dans une molécule où le groupement phényle se trouve sous le plan du ribose (figure 16).

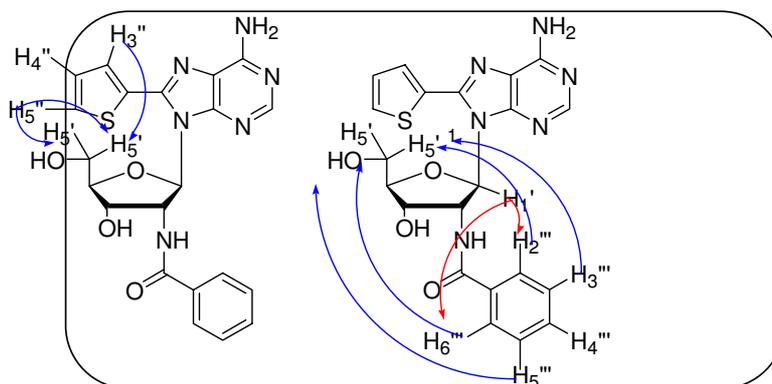


Figure 16: Interactions NOE dans la 8-(2-thiényle)-2'-benzamido-2'dA.

Alors que nous avons entrepris ce travail, des dérivés de la dU fonctionnalisés par un hétérocycle aromatique à 5 chaînons ont été synthétisés et étudiés pour leurs propriétés spectroscopiques par l'équipe de Tor et *al.* [229]. Le dérivé 5-thiényle-uridine fait partie de ces composés. Il présente des propriétés spectrales intéressantes, notamment un déplacement des maxima d'absorption et d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées, ce qui est favorable à une détection plus aisée de la sonde. Il est à noter toutefois que contrairement au dérivé furanyle, aucune donnée relative à son incorporation dans des séquences d'oligonucléotides n'est mentionnée alors que la synthèse du phosphoramidite est décrite.

Ces observations vont dans le sens d'une plus grande sensibilité spectrale des analogues substitués par un groupement thiényle, sans que la base ne soit figée dans la conformation *syn* incompatible à l'établissement d'une paire Watson Crick. Ces observations nous ont incité à poursuivre nos efforts quant à la modification de la dA par un groupement thiényle en position 8 de la base.

Avant de réaliser la synthèse d'oligonucléotides marqués avec cet analogue nucléosidique et d'étudier différentes propriétés physiques, il était indispensable dans le cadre des études qui nous intéressent de caractériser les propriétés chimiques et spectrales de la 8-thiényle-désoxyadénosine (8thdA) seule. En effet, il fallait d'abord vérifier qu'elle possédait les qualités requises pour être incorporée dans des acides nucléiques. Pour cela nous avons étudié la stabilité chimique de la 8thdA en fonction de différentes conditions utilisées en synthèse en phase solide. Nous avons également déterminé ses caractéristiques UV (λ_{max} d'absorption, coefficient d'absorption molaire) et de fluorescence (rendement quantique, λ_{max} d'émission) et étudié l'influence de différents paramètres sur ces propriétés (variation du pH, solvant...). Enfin, nous avons entrepris la synthèse de différentes séquences incorporant la

8thdA dans le but d'évaluer l'influence d'une telle modification sur la stabilité d'un duplex (mesure des T_m).

Dans cette partie du chapitre, je décrirai:

- ✓ L'évaluation des propriétés spectrales et de fluorescence de la 8thdA. Une étude comparative avec la 2-AP sera également menée en fonction de différents paramètres.
- ✓ La synthèse du synthon phosphoramidite de la 8thdA.

4.1. Synthèse et évaluation des propriétés de fluorescence de la 8thdA

4.1.1. Synthèse de la 8thdA nue (9)

La synthèse de la 8thdA, décrite dans le schéma 7, débute par une protection des hydroxyles libres en 5' et 3' du composé (*I*) par des groupements acétate en suivant des conditions d'acétylation classiques à savoir de l'anhydride acétique dans la pyridine en présence d'une quantité catalytique de DMAP. Le produit (*6*) est obtenu avec un rendement quantitatif sans protection indésirable de l'amine exocyclique en N6. Après protection des alcools libres, nous avons eu recours à un couplage de type Stille pour introduire le groupement thiénylyle.

Il était cependant nécessaire de synthétiser au préalable le dérivé 2-tributylstannane-thiophène, précurseur du groupement thiénylyle. Le dérivé 2-tributylstanne-thiophène a été synthétisé selon différents protocoles. Lorsque le composé de départ est le 2-bromothiophène, un échange halogène-métal a été effectué en présence de BuLi à 0°C dans l'éther puis le chlorure de tributyl-étain a été ajouté à -78°C [230]. Les auteurs ne préconisent pas d'étape supplémentaire de purification ; dans notre cas elle a été nécessaire. Lorsque le substrat est le thiophène, les conditions opératoires ont été légèrement modifiées, utilisant cette fois-ci la LDA comme agent de lithiation, dans le THF à -78°C. A l'issue de ces deux protocoles, le produit est obtenu après purification sur alumine basique, avec un rendement comparable de 85%.

En se basant sur la méthodologie employée pour la synthèse de la 8vdA, nous avons introduit le groupement thiénylyle à l'aide d'un couplage de Stille, en présence du catalyseur au palladium Pd(PPh₃)₄, et de 2-tributylstannane-thiophène, dans la NMP à 110°C [221]. Le produit (*8*) est ainsi obtenu avec un rendement de 96%.

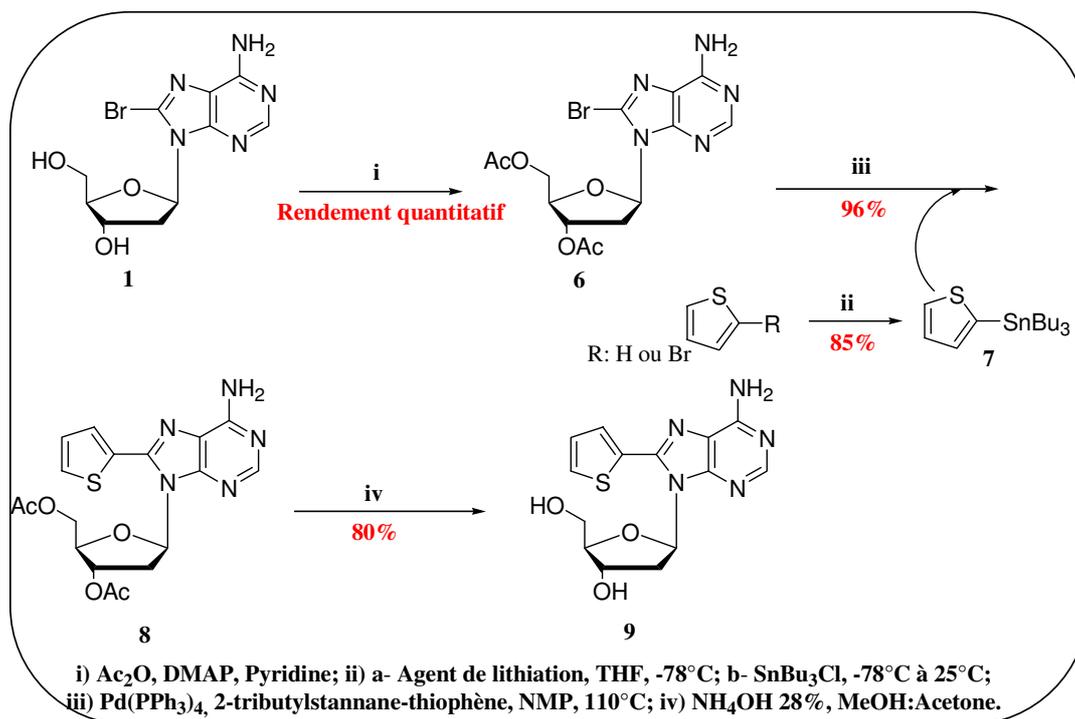


Schéma 7: Schéma de synthèse de la 8thdA.

A ce stade, il convient de mentionner que le composé di-protégé par les groupements acétate, présente d'ores et déjà d'intéressantes propriétés de fluorescence. La 8thdA (**9**) a finalement été obtenue avec un rendement de 80%, après élimination des groupements acétate à l'aide d'une solution d'ammoniaque à 28% dans un mélange MeOH : Acétone.

4.1.2. Tests de stabilité de la 8thdA

Ayant toujours comme objectif d'incorporer la 8thdA dans des séquences d'oligonucléotides, il était important de s'assurer de la stabilité de la 8thdA lorsque celle-ci est soumise aux conditions de synthèse en phase solide. Pour cela, nous devons vérifier que la 8thdA n'était pas affectée par des conditions acides ou basiques. La 8thdA a tout d'abord été mise en solution dans le mélange DCA 3%/ CH_2Cl_2 pendant 15min sans qu'il n'y ait perte du groupement thiényle ou dépurination de la base. Nous avons également vérifié la stabilité de la 8thdA dans des conditions basiques en la laissant pendant 12h en présence d'ammoniaque aqueux à 28%. A nouveau, aucune dégradation de la 8thdA n'a été observée que ce soit sur plaque de chromatographie ou par mesure UV.

4.1.2. Conformation de la 8thdA

Nous avons ensuite étudié l'influence du groupement thiényle de la 8thdA sur la conformation du sucre par une analyse des interactions proton/ proton par RMN NOESY. L'analyse du spectre 2D nous a permis de visualiser une interaction entre H1' et H3'', ainsi qu'une interaction NOE entre H3'' et H2'α (schéma 8).

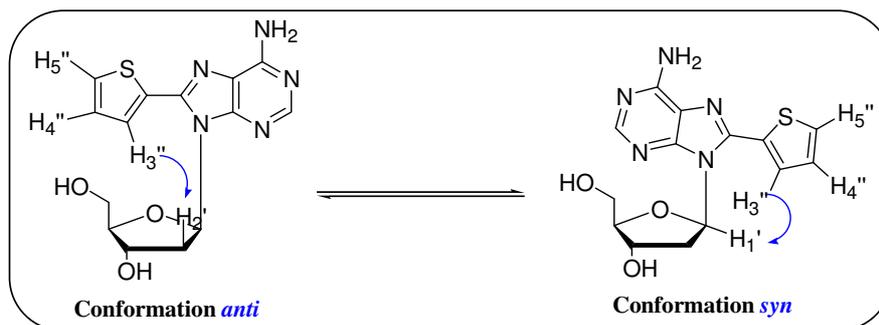


Schéma 8: Orientation du groupement thiényle par rapport au plan du sucre.

Ces résultats indiquent que la base est en équilibre entre les deux conformations et que la base n'est pas bloquée dans la conformation *syn*.

4.1.3. Les propriétés spectrales de la 8thdA

Avant d'étudier les propriétés de fluorescence de la 8thdA, il était indispensable de déterminer ses caractéristiques UV. Nous avons ainsi déterminé les λ_{\max} d'absorption de la 8thdA seule, dans l'eau (298nm), ainsi que son coefficient d'extinction molaire, ϵ , qui s'élève à $17700\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Les caractéristiques de fluorescence de la 8thdA pouvaient à présent être évaluées. Pour cela, il fallait non seulement déterminer son rendement quantique (Φ), mais également les λ_{\max} d'émission (figure 18). La sonde de référence retenue pour déterminer le rendement quantique a été la 2-aminopyridine (2-AMP) qui présente un maximum d'absorption à 299 nm (dans une solution 0,1N d' H_2SO_4) et un rendement quantique de 0,6 [231]. La 2-AMP représente donc un bon standard car les domaines d'absorption et d'émission sont voisins de ceux de la 8thdA.

L'intensité d'émission de la 2-AMP et de la 8thdA a été mesurée sur un intervalle de 315 à 600 nm avec des échantillons dont l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation (298nm) était identique à 20°C dans de l'eau. En effectuant le rapport des intensités de

fluorescence de la 8thdA et de la 2-AMP, un rendement quantique de 0,63 a été calculé pour la 8thdA.

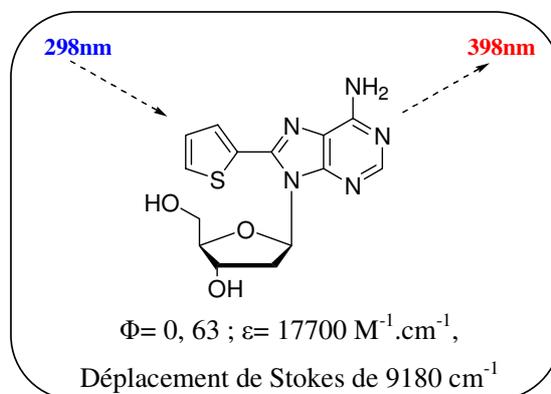


Figure 17: Caractéristiques spectrales de la 8thdA.

Les premiers résultats relatifs à la 8thdA montrent qu'elle peut être considérée comme une sonde sensible, avec un rendement quantique et un coefficient d'absorption molaire élevés. Par ailleurs la substitution d'un groupement vinyle par un groupement thiényl sur la base s'accompagne d'un déplacement vers le rouge du maximum d'absorption. Cette nouvelle sonde pourra donc être excitée dans un domaine distinct des résidus tyrosine ou tryptophane des protéines et des bases naturelles des acides nucléiques.

4.1.4. Effet de la nature du solvant sur les propriétés spectrales de la 8thdA

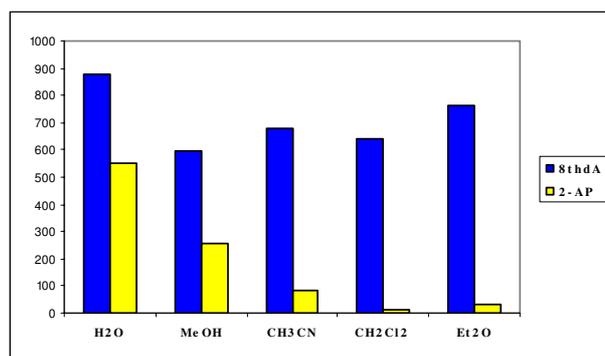
Dans un deuxième temps nous avons étudié l'influence de différents solvants sur les propriétés spectroscopiques de la 8thdA. L'ensemble de ces caractéristiques est répertorié dans le tableau 1:

Solvant	λ_{\max} d'absorption (nm)	λ_{\max} d'émission (nm)	Intensité relative
H_2O	298	398	1
$MeOH$	302	392	0,67
CH_3CN	300	392	0,74
CH_2Cl_2	302	392	0,72
Et_2O	307	389	0,83

Tableau 1 : Maxima d'absorption et d'émission de la 8thdA, et intensité relative dans différents solvants ($Intensité\ relative = I(H_2O)/I(solvant)$).

Cette étude montre que les maxima d'absorption et d'émission de la 8thdA varient peu en fonction du solvant. Elle indique aussi une diminution de l'intensité du signal de fluorescence en passant de l'eau à un solvant organique, mais cette variation reste faible.

Une étude a été réalisée avec la 2-AP en fonction de la polarité du solvant. Les résultats de cette étude comparative sont résumés dans le diagramme suivant (figure 20).



Indice de polarité des solvants : MeOH (6,6) ; CH₃CN (6,2) ; CH₂Cl₂ (3,4) ; Et₂O (1,7) [232].

Figure 18: Evolution de l'intensité de fluorescence de la 2-AP et de la 8thdA dans l'eau et dans différents solvants organiques.

A l'inverse de la 8thdA, l'intensité de fluorescence de la 2-AP diminue de façon drastique lorsque l'on passe de l'eau à des solvants organiques pour être quasi nulle dans les solvants les moins polaires (Et₂O ou CH₂Cl₂).

Nous avons poursuivi notre étude comparative avec la sonde de référence, la 2-AP, en faisant varier d'autres paramètres.

4.1.5. Influence du pH et nature du tampon

Nous avons dans un premier temps mesuré les maxima d'émission de la 8thdA et de la 2-AP dans une gamme de pH allant de 1 à 12 (figure 19).

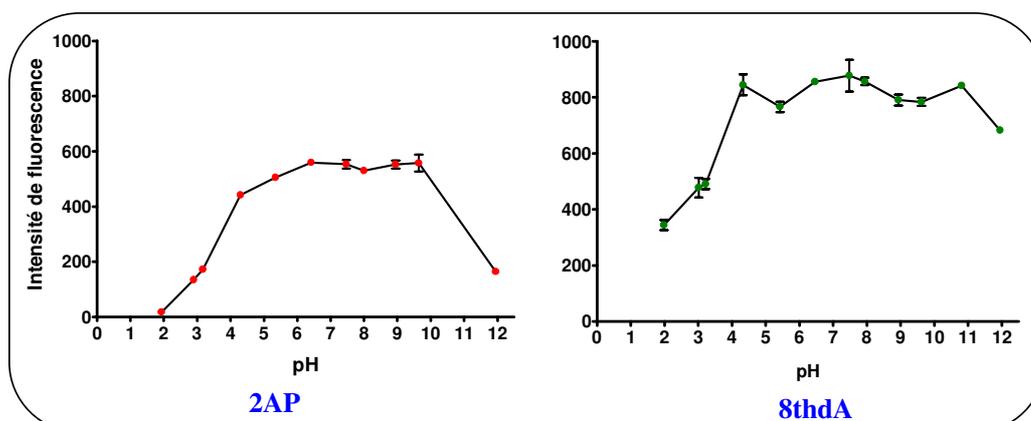


Figure 19 : Variation de l'intensité de fluorescence de la 2-AP et de la 8thdA en fonction du pH.

L'intensité de fluorescence est stable et maximale pour les deux sondes dans un domaine de pH comparable compris entre 4 et 11, alors qu'elle diminue au delà de pH 12 et pour des pH inférieurs à 4 (figure 19).

A concentration et à pH identiques, il est à noter que les valeurs d'intensité obtenues sont toujours supérieures pour la 8thdA, ce qui s'explique notamment par un rendement quantique voisin et un coefficient d'extinction molaire supérieur ($17700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour la 8thdA contre $7200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour la 2-AP).

Il convient de noter que même aux valeurs de pH limites (à pH 1 comme à pH 12), l'intensité de fluorescence de la 8thdA reste supérieure à la 2-AP.

Nous avons également étudié l'influence de différents tampons (tampon TRIS, TEIA, HEPES, MES, phosphate) à pH 7 sur l'intensité de fluorescence des deux sondes. Nous avons aussi chercher à savoir si la composition en ions (Na^+ ou K^+) était susceptible de modifier l'intensité de fluorescence. Les résultats de cette étude sont donnés dans le diagramme figurant ci après (figure 20).

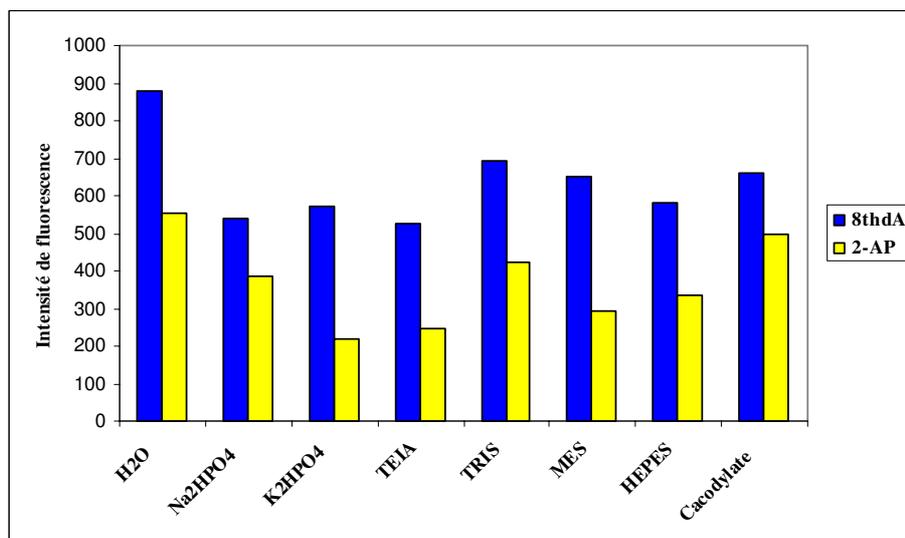


Figure 20: Variation de l'intensité de fluorescence de la 2-AP et de la 8thdA en fonction de différents tampons à pH= 7.

Quelle que soit la nature du tampon utilisée, l'intensité de fluorescence diminue fortement par rapport au niveau observé dans l'eau (pH=7). Cette observation est commune à la 2-AP et la 8thdA, même si l'intensité du signal de la 2-AP est toujours plus faible. Il apparaît également que la nature du contre ion, qu'il soit Na^+ ou K^+ , ne modifie pas le comportement de la 8thdA, alors qu'une légère diminution est observée dans le cas de la 2-AP. D'autre part la composition des tampons biologiques utilisés semble modifier de façon importante l'intensité de fluorescence de la 2-AP puisqu'une diminution d'un facteur 2 à 3 est à noter pour les tampons MES, TEIA et phosphate. Cette variation est également observée pour la 8thdA, mais à un degré moindre. Dans le cas le plus défavorable, une diminution d'un facteur 2 de l'intensité de fluorescence est observée par rapport à l'intensité mesurée dans l'eau.

4.1.6. Récapitulatif

Les données principales relatives aux propriétés spectrales de la 2-AP, de la 8vdA et de la 8thdA sont répertoriées dans le tableau 2 qui suit.

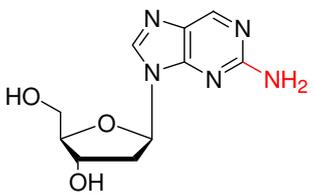
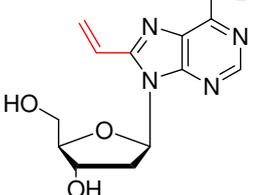
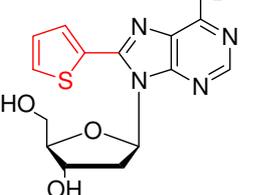
		
2-Aminopurine (2-AP)	8-vinyl-déoxyadénosine (8vdA)	8-thiényl-déoxyadénosine (8thdA)
λ_{\max} absorption: 303nm ϵ : 7700M ⁻¹ .cm ⁻¹ λ_{\max} émission: 370nm Déplacement de Stokes: 5970cm ⁻¹ Φ : 0,68	λ_{\max} absorption: 294nm ϵ : 12600M ⁻¹ .cm ⁻¹ λ_{\max} émission: 384nm Déplacement de Stokes: 8300cm ⁻¹ Φ : 0,65	λ_{\max} absorption: 301nm ϵ : 17700M ⁻¹ .cm ⁻¹ λ_{\max} émission: 398nm Déplacement de Stokes: 9180cm ⁻¹ Φ : 0,63

Tableau 2 : Récapitulatif des différentes propriétés spectrales de la 2-AP, 8vdA et de la 8thdA dans l'eau.

Avec un rendement quantique élevé et un maximum d'absorption comparable à la 2-AP mais avec un coefficient d'extinction molaire supérieur, la 8thdA possède des caractéristiques intéressantes comme sonde de fluorescence. Par ailleurs, elle est également stable sur une large gamme de pH mais reste cependant moins sensible que la 2-AP au changement de solvant ou à la variation d'autres paramètres (nature des ions en solution, etc...). Enfin les études de stabilité laissent à penser que cette nouvelle base devrait être d'un emploi plus aisé que la 8vdA en synthèse en phase solide.

4.2. Synthèse des oligonucléotides modifiés par la 8thdA

Compte tenu des propriétés spectrales de la 8thdA, nous pouvons à présent envisager d'incorporer cette nouvelle sonde dans des séquences d'oligonucléotides et d'évaluer l'influence d'une telle modification sur la stabilité d'un duplex d'ADN. Les séquences choisies sont celles que nous avons retenu antérieurement avec la 8vdA, à savoir des séquences palindromiques, non auto-complémentaires, de 15 nucléotides où le nucléoside modifié est incorporé en position centrale.

Les 4 séquences à synthétiser sont les suivantes :

ODN12: 5'-CGT TTT A8thdAA TTT TGC-3'

ODN13: 5'-CGT TTT T8thdAT TTT TGC-3'

ODN14: 5'-CGT TTT C8thdAC TTT TGC-3'

ODN15: 5'-CGT TTT G8thdAG TTT TGC-3'

Au regard de sa stabilité chimique supérieure à la 8vdA nous avons également envisagé de préparer la séquence dans laquelle la G a été placée à proximité de la 8thdA (ODN 15).

Bien évidemment il était nécessaire de synthétiser au préalable le phosphoramidite de la 8thdA, synthon permettant l'introduction de la sonde au sein de l'oligonucléotide durant le processus de synthèse sur support solide.

4.2.1. Synthèse du synthon phosphoramidite de la 8thdA

La synthèse du synthon phosphoramidite de la 8thdA a été menée en présence des groupements protecteurs usuels déjà utilisés dans le cas de la synthèse du synthon phosphoramidite de la 8vdA (schéma 9).

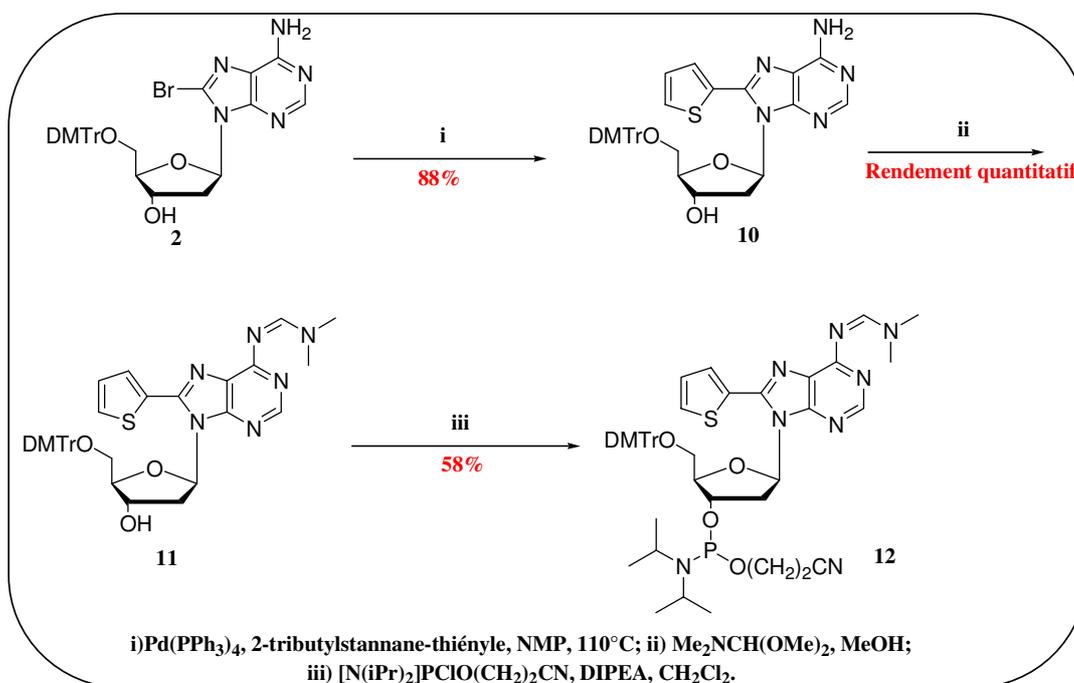


Schéma 9: Schéma de synthèse du synthon phosphoramidite de la 8thdA.

Grâce au couplage de Stille sur la 8-bromo-5'-O-DMTr-2'dA (**2**), le groupement thiényle a été introduit en position 8 de la base en utilisant le 2-tributylstannane-thiophène préparé au laboratoire, selon la méthodologie décrite précédemment. La 8-thiényl-5'-O-DMTr-2'dA (**10**) a ainsi été obtenue avec un rendement de 88%. L'étape suivante avant d'introduire le phosphoramidite en 3' du ribose, est la protection de la fonction amine exocyclique de la base. Dans ce but le réactif $\text{Me}_2\text{NCH}(\text{OMe})_2$ a été utilisé et le composé (**11**)

a été obtenu avec un rendement quantitatif. Il est utilisé directement sans étape de purification supplémentaire pour la suite de la synthèse. Le groupement thiénylyle ne présentant pas une aussi grande sensibilité chimique que la 8vdA, nous avons utilisé comme agent de phosphitylation le chlorure de *N,N'*-diisopropyl-cyanoéthylphosphoramidite en présence de DIPEA dans CH₂Cl₂. Le synthon phosphoramidite (**12**) de la 8thdA a ainsi été obtenu avec un rendement de 58% après purification.

La synthèse des oligonucléotides marqués par la 8thdA est en cours au laboratoire.

V. Conclusion générale

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à la synthèse de deux sondes nucléosidiques fluorescentes dérivées de la désoxyadénosine et modifiées en position 8 de la désoxyadénosine soit par un groupement vinyle, la 8vdA, soit par un groupement thiénylyle, la 8thdA. Ces deux nouvelles sondes ont été caractérisées quant à leurs propriétés spectrales d'absorption et de fluorescence et se sont révélées être plus sensibles que la sonde de référence, la 2-AP. Nous avons également étudié le comportement de la 8vdA lorsqu'elle est incorporée dans un duplex d'ADN. Dans des études préliminaires nous nous sommes appuyés sur la chimie des phosphoramidites et sur la synthèse en phase solide d'oligonucléotides pour préparer dans un premier temps les séquences modifiées par la 8vdA. Différentes études réalisées avec des oligomères marqués ou non marqués nous ont permis de montrer que la 8vdA ne déstabilise que très peu le duplex, et qu'elle présente en terme de détection par spectroscopie de fluorescence une sensibilité supérieure à la 2-AP. Cependant son incorporation dans des acides nucléiques est délicate ce qui limite son utilisation. Pour essayer de contourner ces difficultés, la 8thdA a été développée. L'évaluation de ses propriétés lorsqu'elle se trouve incorporer dans des séquences oligonucléotidiques est en cours.

En effet des efforts restent à mener pour essayer de développer de nouvelles sondes sensibles, plus stables chimiquement que la 8vdA et qui une fois incorporées dans un acide nucléique maintiennent sa structure et sa fonction. Leurs propriétés de fluorescence permettraient de suivre plus aisément les interactions de l'acide nucléique marqué avec sa cible. Cette possibilité reste ouverte à partir de la dA, même si la fenêtre d'investigation sur cette position est assez étroite. Des premiers efforts dans ce sens ont été réalisés avec la 8thdA.

Indications générales.

Les indications générales données ci-dessous sont également valables pour les parties expérimentales des chapitres III et IV

Les réactions sensibles à l'eau et/ou à l'oxygène de l'air ont été effectuées sous atmosphère d'argon. Le matériel utilisé (bicol, tricol, seringue...) est séché à l'étuve à 110°C pendant une nuit avant utilisation.

Les solvants utilisés lors des réactions ont été distillés comme suit :

- ✓ La pyridine a été distillée sur KOH et gardée à l'abri de la lumière sur KOH.
- ✓ Le CH_2Cl_2 a été distillé sur P_2O_5 et gardé à l'abri de la lumière sur tamis moléculaire 4Å.
- ✓ Le THF est distillé sur Na et benzophénone et gardé sur tamis moléculaire 4Å.
- ✓ L'éther est filtré sur alumine basique et dégazé à -78°C sous le vide de la pompe à palette.

Les **nucléosides** sont séchés par coévaporation azeotropique de l'eau avec la pyridine à 50°C et gardés sous le vide de la pompe à palette pendant une nuit.

Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de silice Merck 60F₂₅₄ (0,25mm), révélées par une lampe UV puis soit par une solution d'acide phosphomolybdique à 25% dans EtOH soit par une solution de vanilline (2,5g de vanilline dans un mélange EtOH/H₂SO₄ (98:2)). Les chromatographies semi-préparatives ont été effectuées sur des plaques de silice Merck 60F₂₅₄ (20*20). Avant tout dépôt, les plaques sont éluées avec du MeOH. Les chromatographies sur couche mince d'alumine ont été effectuées sur des plaques POLYGRAM® Alox N/UV₂₅₄ (0,2mm). Les chromatographies préparatives ont été effectuées soit sur gel de silice avec de la silice Merck (40-63µm) soit sur de l'alumine basique (pH : 9,5) Fluka type 5016 lorsque cela est mentionné. Les chromatographies sur phase inverse ont été effectuées sur plaque de verre Merck HPTLC 10*10cm RP-18WF_{254s}.

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN ¹H, ¹³C et ³¹P) ont été effectués sur un appareil Brücker Advance à 200, 300 ou 500MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane pour la RMN ¹H et ¹³C et par rapport à une solution à 85% H₃PO₄ pour la RMN ³¹P. Les constantes de couplage sont données en Hertz (Hz).

L'analyse par **Chromatographie Liquide Haute Performance** (CLHP) a été effectuée sur une tour Waters 2695 équipée d'un détecteur UV à barrettes de diodes et d'un détecteur

LSD universel. Les spectres ont été traités par le logiciel Millennium 32. Les solvants utilisés que ce soit en mode analytique ou semi-préparatif ont été filtrés à l'aide d'un système millipore sur des membranes de Nylon de 0,2 μ m d'épaisseur et de 47mm de diamètre de type Whatman. Les produits en solution ont été filtrés sur filtres Millex de type PVDF (0,45 μ m/4mm) avant injection. Le tampon TEAB est préparé à la concentration de 1M en faisant buller du CO₂ dans une solution de triéthylamine dans l'eau jusqu'à atteindre un pH compris entre 7,5 et 8. Le Tampon TEAA a également été préparé à la concentration de 1M en rajoutant goutte à goutte de l'acide acétique à un solution de NEt₃ dans H₂O, et cela jusqu'à atteindre un pH de 7,5.

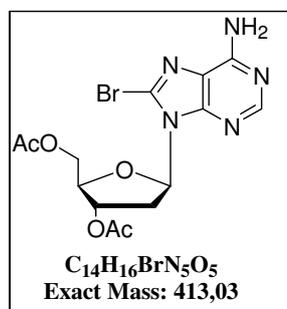
Les Spectres de Masse (SM) ont été effectués sur un appareil Esquire 3000 plus, en mode ESI positif ou négatif.

Les spectres Ultraviolet (UV) ont été effectués sur un spectrophotomètre UV Cary 300 équipé d'un passeur à échantillon à effet Peltier et traités par le logiciel CaryWin UV.

Les spectres de fluorescence ont été effectués sur un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS50B équipé d'un thermostat Haak G Fisons. Les spectres ont été traités par le logiciel FL WinLab.

Synthèse de la 8-thiényl-dA

8-Bromo-3',5'-diacétyl -2'-désoxyadénosine (6).



La 8-bromo-désoxyadénosine (1g; 3,03mmol) est mise en solution dans la pyridine anhydre (10mL), de la DMAP (185mg; 1,51mmol) est rajouté, suivie de l'anhydride acétique (430 μ L; 4,54mmol). L'évolution de la réaction est contrôlée par CCM dans un mélange CH_2Cl_2 / MeOH (95 :5). Au bout de 2 heures le mélange réactionnel est dilué avec du CH_2Cl_2 (10mL). La phase organique est lavée avec H_2O (20mL) et NaCl (20mL) puis séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié sur gel de silice conditionné avec $CHCl_3$ et élué avec un gradient de MeOH dans $CHCl_3$ (de 0 à 4%). Le produit (6) (1,25g, 3,01mmol) est obtenu avec un rendement quantitatif.

RMN 1H ($CDCl_3$, 200MHz): 8,26 (1H, s, H2); 6,38 (1H, dd, $J_1=J_2=7,8$, H1'); 6,13 (2H, s, NH_2); 5,63-5,58 (1H, m, H3'); 4,54-4,25 (3H, m, H4'et H5'); 3,88-3,79 (1H, m, H2'); 2,45-2,37 (1H, m, H2'); 2,12 (3H, s, CH_3); 2,02 (3H, s, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50,3MHz): 170,6 (CO); 170,2 (CO); 154,4 (C4); 152,8 (C2); 150,8 (C8); 127,2 (C6); 120,4 (C5); 86,2 (C1'); 82,6 (C3'); 74,7 (C4'); 63,6 (C5'); 34,1 (C2'); 20,9 (CH_3); 20,7 (CH_3).

ESI SM positif (m/z): 413,4 [M] et 415,4 [M'] en fonction de l'abondance isotopique du Brome.

2-tributylstanne-thiophène (7)

La synthèse du composé (7) a pu être effectuée en utilisant deux agents de lithiation, je ne décrirais dans cette partie expérimentale que la méthode la plus utilisée, à savoir en présence de LDA.

Chapitre II. Synthèse de nouvelles sondes de fluorescence
Partie expérimentale

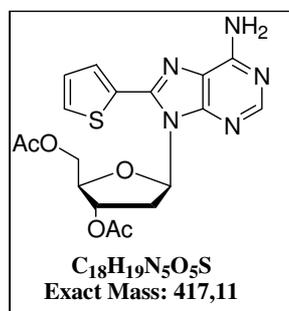
Le thiophène (1mL; 12,7mmol) est mis en solution avec du THF (29mL) et refroidit à -78°C par un bain de carboglace. L'ensemble est sous agitation pendant 10min avant d'ajouter la LDA à 1,8M (10,5mL; 19mmol) selon un goutte à goutte. La réaction est maintenue à -78°C , sous agitation constante et atmosphère d'argon pendant 45min. Le chlorure de tributylétain (5,1mL; 19mmol) est alors ajouté à -78°C et la réaction peu évoluer à température ambiante pendant la nuit. Une fois la réaction arrêtée la phase organique est lavée trois fois avec une solution saturée d' NH_4Cl , séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Le brut de réaction est purifié sur gel d'alumine conditionné et élué avec du cyclohexane. Le réactif (7) est obtenu avec un rendement de 85% (3,4mL; 10,6mmol).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200MHz): 7,63 (1H, d, $J=4,64\text{Hz}$, $\text{H5}''$); 7,18-7,1 (1H, dd, $J_1=J_2= 1,6-1,47$ (6H, m, CH_2); 1,4-1,22 (6H, m, CH_2); 1,2-1,04 (6H, m, CH_2); 1,04-0,8 (9H, t, CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 200MHz): 128,1 (C3); 127,6 (C4); 127,4 (C5); 127 (C2); 29,2 (CH_2); 27,6 (CH_2); 13,7 (CH_2); 12,1 (CH_3).

ESI SM positif (m/z): 374,2 [$\text{M}+\text{H}^+$].

8-Thiényl-3',5'-diacétyl-2'-désoxyadénosine (8).



Le composé (6, 500mg; 1,21mmol) est repris dans la NMP (4mL), le catalyseur $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (280mg; 0,242mmol) est alors rajouté sous atmosphère d'argon à température ambiante. Le mélange réactionnel est rapidement dégazé en appliquant trois fois successives un vide-argon. Le 2-tributylstannane thiophène (770 μL ; 2,42mmol) est alors rajouté sous argon et l'ensemble est chauffé à 110°C . Après 1h de réaction (CCM dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95 :5)), le mélange réactionnel est ramené à température ambiante pour être repris dans du CH_2Cl_2 (5mL). La phase organique est lavée plusieurs fois avec de l'eau (15mL), une solution saturée d' NaHCO_3 (15mL) et de la saumure (15mL) avant d'être séchée

Chapitre II. Synthèse de nouvelles sondes de fluorescence
Partie expérimentale

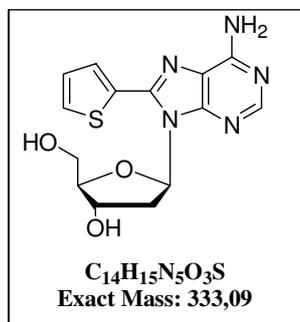
sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut de réaction est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et élué avec un gradient de MeOH pour fournir le produit (**8**) (487mg ; 1,16mmol) avec un rendement de 96%.

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,33 (1H, s, H2); 7,64 (1H, dd, J₁= 0,7Hz et J₂= 3,6Hz, H5''_{thiényle}); 7,58 (1H, dd, J₁= 0,7Hz et J₂= 5Hz, H3''_{thiényle}); 7,22 (1H, dd, J₁= 3,6Hz, J₂= 5Hz, H4''_{thiényle}); 6,42 (1H, dd, J₁=J₂= 6,96Hz, H1'); 5,71-5,66 (1H, m, H3'); 5,63 (2H, s, NH₂); 4,55-4,34 (3H, m, H5' et H4'); 4,19-4,05 (1H, m, H2'); 2,40-2,28 (1H, m, H2'); 2,11 (3H, s, CH₃); 2,04 (3H, s, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 170,6 (CO); 170,2 (CO); 155,26 (C4); 152,9 (C2); 151,1 (C8); 146,2 (C6); 130,36 (C5''_{Thiényle}); 129,8 (C3''_{Thiényle}); 128,5 (C4''_{Thiényle}); 128,01 (C5); 119,9 (C_{Thiényle}); 85,9 (C3'); 83,11 (C1'); 75,7 (C4'); 64,15 (C5'); 34,3 (C2'); 21,4 (CH₃); 21,2 (CH₃).

ESI SM positif (m/z): 418,1 [M+H⁺]; 440,1 [M+Na⁺]; 456,1 [M+K⁺].

8-Thiényl-2'-désoxyadénosine (**9**).



Le composé (**8**) (37,7mg; 0,09mmol) est dissous dans un mélange MeOH/Acétone (1:1, 1mL) avant de rajouter la solution de NH₄OH à 28% (3mL). La réaction est maintenue sous agitation pendant 12 heures (CCM dans un mélange CH₂Cl₂ : MeOH (90 :10)). Le mélange réactionnel est repris dans du CH₂Cl₂ (5mL) et la phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau (3*5mL), avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut de réaction est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et élué avec un gradient de MeOH (de 0 à 5%) dans du CHCl₃. Après évaporation et lyophilisation, 23,8mg (0,071mmol) du produit (**9**) sont récupérés soit un rendement de 80%.

RMN ¹H (MeOD, 200MHz): 8,17 (1H, s, H2); 7,76 (1H, dd, J₁= 0,7Hz et J₂= 5,1Hz, H5''_{Thiényle}); 7,62 (1H, dd, J₁= 0,7Hz et J₂= 3,7Hz, H3''_{Thiényle}); 7,29 (1H, dd, J₁= 3,7 Hz et J₂= 5,1 Hz, H4''_{Thiényle}); 6,59 (1H, dd, J₁= 6,1Hz et J₂= 8,7Hz, H1'); 4,7-4,66 (1H, m, H3'); 4,09-4,08 (1H, m, H4'); 3,94-3,72 (2H, ABX, J_{AX}= 2,6Hz, J_{BX}= 3,2Hz et J_{AB}= 12,4Hz, H5'); 3,33 (1H, m, H2'); 2,39- 2,29 (1H, m, H2').

RMN ¹³C (Pyridine d₅, 50,3MHz): 157,1 (C4); 152,6 (C2); 150,7 (C8); 145,2 (C6); 132,1 (C5''); 129,2 (C3''); 128,1 (C4''); 120,6 (C5); 90,02 (C4'); 86,8 (C1'); 73,5 (C3'); 63,5 (C5'); 38,8 (C2').

ESI SM positif (m/z): 334,1 [M+H⁺], 358 [M+Na⁺].

λ_{\max} (H₂O)= 298nm, ϵ : 17700M⁻¹.cm⁻¹.

Fluorescence et autres propriétés physiques.

1- Détermination du rendement quantique de la 8thdA

Le rendement quantique de la 8thdA a été déterminé par rapport à la 2-aminopyridine (2-AMP) dont le maximum d'absorption est à 299nm (dans une solution 0,1N d'H₂SO₄). Le rendement quantique de la 2-AMP est de 0,6. Après mesure de l'absorbance, les deux solutions de 2-AMP et de 8thdA ont été diluées de telle sorte que l'absorbance soit inférieure à 0,05 avant d'enregistrer le spectre d'émission. La mesure des intensités de fluorescence a été effectuée dans des cuves en quartz de 3mL et de 1cm de trajet optique. Nous avons choisi d'exciter les deux échantillons au point isobestique (à 298nm) et de mesurer les spectres d'émission sur un intervalle de 315 à 600 nm, à 20°C (avec une correction par rapport au blanc).

	λ_{\max} d'émission	L'aire sous la courbe
2-AMP	370nm	8971
8thdA	408nm	9390

Le rendement quantique est calculé à partir de la formule suivante:

$$I_{(2-AMP)} / I_{(8thdA)} = \Phi_{(2-AMP)} * A_{(2-AMP)} * \text{aire sous la courbe} / \Phi_{(8thdA)} * A_{(8thdA)} * \text{aire sous la courbe}$$

Au point isobestique, les absorbances sont identiques, la formule se simplifie alors pour donner:

$$\Phi_{(8\text{thdA})} = 0,63.$$

2-Influence du solvant.

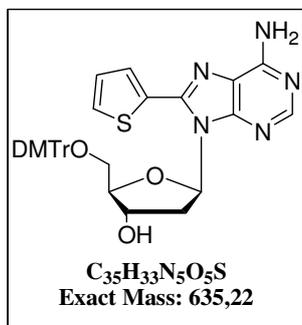
Les spectres d'absorption ont été enregistrés avec des solutions de 8thdA de concentration identique. Elles ont été fraîchement préparées en veillant que l'absorbance soit comprise entre 0,2 et 1. Le CH_2Cl_2 , le CH_3CN , le MeOH et l'Et₂O utilisés, sont de qualité spectroscopique. Les spectres d'émission ont été enregistrés dans des cuves en quartz de 3mL et de 1cm de trajet optique à partir de ces solutions préalablement diluées de telle sorte que l'absorbance au maximum d'absorption soit inférieure à 0,05. Les mesures d'intensité de fluorescence ont été effectuées avec des solutions de 8thdA ou de 2-AP à la concentration de $1,5 \cdot 10^{-4}\text{M}$. L'intensité de fluorescence est enregistrée au maximum d'émission du spectre d'émission en excitant au maximum d'absorption et en corrigeant par rapport au blanc.

3- Influence du pH.

Les tampons de pH 1 à 2 ont été préparés à l'aide d'un mélange KCl (0,02M)/HCl (0,02M)/H₂O. Les tampons de pH 3 à 7 ont été préparés en faisant varier les proportions de Na₂HPO₄ (0,05M) et de Citrate (0,01M). Les tampons de pH 8 à 10 ont été préparés à partir de différentes proportions de KCl (0,02M) dans H₃BO₃ (0,01M), de NaOH (0,01M) et d'eau. La solution à pH 11 résulte d'un mélange Na₂HPO₄ (0,05M) de NaOH (0,01M) et d'eau. Le tampon à pH 12 a été préparé à partir d'un mélange de KCl (0,02M), NaOH (0,02M) et d'eau. Les tampons biologiques TEIA, HEPES, Tris, MES et tampons phosphate, ont été préparés à la concentration de la 0,02M. Les mesures de l'intensité de fluorescence ont été effectuées dans des cuves en quartz de 3mL et de 1cm de trajet optique avec des solutions 8thdA ou de 2-AP à la concentration de $1,5 \cdot 10^{-4}\text{M}$. L'intensité de fluorescence est enregistrée au maximum d'émission du spectre d'émission en excitant au maximum d'absorption et en corrigeant par rapport au blanc.

Synthèse du synthon phosphoramidite de la 8thdA

8-Thiényle-5'-O-DMTr-2' désoxyadénosine (10).



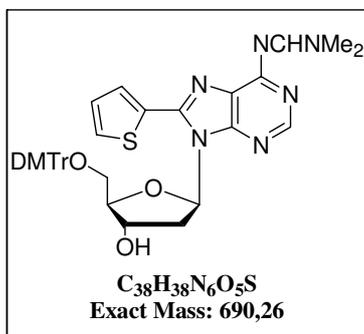
Dans un schlenk, le composé (2) (447,8mg; 0,708mmol) est dissous dans la NMP (2,5mL) à température ambiante et sous atmosphère d'Argon. Le catalyseur Pd(PPh₃)₄ (164mg; 0,14mmol) est alors rajouté avant de dégazer rapidement le milieu réactionnel par trois cycles successifs vide-argon. Le 2-thiényle-tributylstannane (450μL; 1,41mmol) est alors rajouté. L'ensemble est chauffé à 110°C pendant une heure. Une fois la réaction terminée (contrôle par CCM CH₂Cl₂/ MeOH (95 :5)) le mélange réactionnel est ramené à température ambiante pour être repris dans du CH₂Cl₂ (10mL). La phase organique est lavée avec H₂O (10mL), une solution saturée d'NaHCO₃ (10mL) et de la saumure (10mL). Elle est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous le vide de l'évaporateur rotatif. Le brut de réaction est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et 1% de NEt₃. Le produit sera élué avec un gradient de MeOH (0 à 5%) dans du CHCl₃. Le composé (10) (395,6mg; 0,62mmol) est obtenu après lyophilisation avec un rendement de 88%.

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,14 (1H, s, H2); 7,73 (1H, dd, J₁=J₂= 3,39Hz, H5''^{Thiényle}); 7,54-7,52 (1H, d, J₁=J₂= 5,02Hz, H3''^{Thiényle}); 7,36-7,17 (10H, m, DMTr et H4''^{Thiényle}); 6,76-6,72 (4H, m, DMTr); 6,39 (1H, dd, J₁= 5,65Hz et J₂= 7,07Hz, H1'); 5,64 (2H, s, NH₂); 5,10-5,05 (1H, m, H3'); 4,18-4,13 (1H, m, H4'); 3,76 (6H, s, CH₃O); 3,43-3,4 (1H, m, H5'); 2,51-2,40 (1H, m, H2'); 2,35-2,21 (1H, m, H2').

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 158,3 (C_{DMTr}); 155,0 (C4); 152,2 (C2); 150,8 (C8); 146,5 (C2''^{Thiényle}); 144,7 (C6); 135,9 (C_{DMTr}); 129,9- 126,6 (CH_{DMTr} et CH^{Thiényle}); 112,9 (CH_{DMTr}); 85,9 (C4'); 84,9 (C1'); 72,9 (C3'); 63,8 (C5'); 55,14 (CH₃O); 36,6 (C2').

ESI SM positif (m/z): 658,1 (M+Na⁺) et 303,1 (DMTr⁺).

8-Thiényl-5'-O-DMTr-N6-diméthylformamidine-2'-désoxyadénosine (**11**).



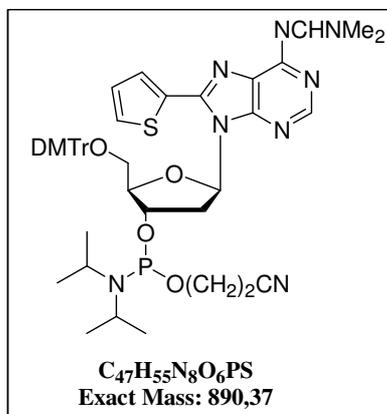
Le composé (**10**) (91,4mg; 0,144mmol) est dissous dans la DMF (500 μ L) avant de rajouter sous argon, le *N,N'*-diméthylformamide-diméthylacétale (95,5 μ L; 0,718mmol). L'ensemble est maintenu sous agitation pendant 4 heures (contrôl par CCM (CH₂Cl₂/ MeOH (95 :5)) au bout desquelles la réaction est arrêtée en rajoutant de l'AcOEt (5mL). La phase organique est alors lavée avec de l'H₂O (5mL) et de la saumure (5mL), séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous le vide d'un évaporateur rotatif. Le produit (**11**) ainsi obtenu (78,3mg; 0,113mmol) est suffisamment pur pour être engagé dans la suite de la synthèse. Le rendement de réaction est de 79%.

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,93 (1H, s, NCH); 8,34 (1H, s, H2); 7,74 (1H, d, J= 3,60Hz, H5''_{Thiényle}); 7,62 (1H, d, J=5Hz, H3''_{Thiényle}); 7,40-7,10 (10H, m, DMTr et H4''_{Thiényle}); 6,77-6,72 (4H, m, DMTr); 6,44 (1H, dd, J₁= 5,39Hz et J₂= 7,54Hz, H1'); 5,13-5,08 (1H, m, H3'); 4,16-4,08 (1H, m, H4'); 3,76 (6H, s, CH₃O); 3,46-3,43 (1H, m, H5'); 3,25 (3H, s, CH₃N); 3,19 (3H, s, CH₃N); 2,36-2,22 (1H, m, H2'); 2,04-1,94 (1H, m, H2').

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 158, 7 (NCH); 158,6 (C_{DMTr}); 153,1 (C4); 152,2 (C2); 148,1 (C8); 145,2 (C2''_{Thiényle}); 136,0 (C6); 131,8 (CH_{Thiényle}); 130,4- 127,06 (CH_{DMTr}); 126,4 (C5); 113,4 (CH_{DMTr}); 86,4 (C1'); 85,4 (C3'); 73,4 (C4'); 64,4 (C5'); 55,6 (CH₃O); 41,6 (CH₃N); 37 (C2'); 35,5 (CH₃N).

ESI SM positif (m/z): 691,4 [M+H⁺] et 713,4 [M+Na⁺].

8-Thiényl-N6-Diméthylformamidine-5'-O-DMTr-3'-phosphoramidite-2'-désoxyadénosine
(12).



Le composé (**11**) (500mg; 0,72mmol) est dissous dans du CH₂Cl₂ (2,2mL) avant de rajouter la DIPEA (925μL; 2,9mmol) sous atmosphère d'argon. Le chlorure de *N,N'*-diisopropyl-cyanoéthyl-phosphoramidite (242μL; 1,08mmol) est également mis en solution dans du CH₂Cl₂ (200μL) et la solution ainsi obtenue est rajoutée goutte à goutte à la solution précédente. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation continue pendant 4 heures, (suivie de la réaction par CCM CH₂Cl₂/MeOH/1%NEt₃ (95 :5)) avant de l'arrêter en rajoutant du MeOH (2mL) et de la NEt₃ (200μL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'NaHCO₃ (10mL), de l'H₂O (10mL) et de la saumure (10mL) avant d'être séchée sur Na₂SO₄ et filtrée. Le mélange est évaporé et purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et 1% de NEt₃. Le produit est élué avec un gradient de MeOH (de 0 à 1%). Une fois les solvants évaporés le produit est repris dans du toluène et rajouté à de l'hexane refroidit à -20°C sous agitation. 369mg (0,414mmol) du produit (**12**) sont récupérés soit un rendement de 58%.

RMN ¹H (CD₃CN, 200MHz): 8,86 (1H, s, NCH); 8,35 (1H, s, H2); 7,92 (1H, d, J= 3,05Hz, H5''_{Thiényle}); 7,69 (1H, d, J=4,74Hz, H3''_{Thiényle}); 7,37-7,09 (10H, m, DMTr, H4''_{Thiényle}); 6,67-6,60 (4H, m, DMTr); 6,46 (1H, dd, J₁= 3,92Hz et J₂= 7,75Hz, H1'); 5,46-5,29 (1H, m, H3'); 4,19-4,17 (1H, m, H4'); 3,96-3,79 (2H, m, CH₂O); 3,69-3,47 (9H, m, CH₃O, H5' et H2'); 3,17 (3H, s, CH₃N); 3,16 (3H, s, CH₃N); 2,67-2,61 (1H, t, CH); 2,54- 2,48 (2H, t, CH et H2'); 1,96-1,91 (2H,m, CH₂CN); 1,22-1,14 (12H, m, CH₃).

RMN ³¹P (CD₃CN, 80MHz): 149,17 et 148,9 (les deux déplacements observés sont dus à la présence d'un mélange de deux diastéréoisomères).

ESI SM positif (m/z): 891,3 [M+H⁺].

Synthèse des séquences cTAR marqués par la 8vdA
--

La synthèse des séquences cTAR modifiées par la 8vdA a été effectuée à l'échelle de la μmol , sur un synthétiseur automatique Applied Biosystem 392 en utilisant 10 équivalents de phosphoramidites. Les séquences ont été purifiées et analysées dans l'équipe du Dr. Roland Marquet selon la procédure décrite dans la partie expérimentale de la publication ci jointe au manuscrit [221]. Les différentes séquences ont été analysées par CLHP sur colonne Dionex DNAPac-100 (longueur : 250, diamètre : 4mm), gel de polyacrylamide (20%, 8M urée), par spectroscopie de fluorescence et spectrométrie de masse en mode linéaire négatif MALDI.

MALDI SM négatif [M-H]: ODN7: calc. 175332 trouvé 175333. ODN11: calc. 8279 trouvé 8280.

L'objectif premier de ce travail de thèse était d'évaluer les propriétés de fluorescence et antivirales de nouveaux analogues de la désoxyadénosine modifiés en position 8.

La première modification introduite en position 8 de la base a été le groupement vinyle qui comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent a permis d'augmenter de façon considérable les propriétés de fluorescence de la désoxyadénosine (dA). En effet la 8vdA s'est révélée être un bon candidat en tant que sonde de fluorescence, alternative à la 2-AP. Nous avons également voulu étudier les propriétés antivirale de la 8vdA lorsque celle-ci est dirigée contre notre enzyme cible : la Rétro Transcriptase (RT) du VIH-1. Ce deuxième chapitre va donc s'articuler autour de trois points importants:

➤ L'étude sur des séquences modèles "matrice" et "amorce", de l'influence d'une base modifiée sur les deux activités polymérase de la RT. En particulier nous souhaitons confirmer un mode d'inhibition postulé, différent des terminateurs d'élongation de chaîne actuellement utilisés en thérapie.

➤ La préparation d'une série d'analogues de la dA, modifiés en position 8 de la base, ainsi que les prodrogues correspondantes afin de tester leur activité antivirale sur des cultures cellulaires infectées par le VIH-1.

➤ Le développement d'une méthode de synthèse des analogues nucléosidiques sous leur forme triphosphate. Ces analogues pourront être testés sur la RT purifiée dans le but de mesurer leur efficacité d'incorporation par rapport au substrat naturel, mais aussi dans le but d'évaluer leur capacité à inhiber la synthèse d'ADN viral.

I- Hypothèses de travail et conception des analogues nucléosidiques

Les hypothèses de départ de notre travail découlent directement des données structurales de la RT. En effet une structure cristallographique de l'enzyme en présence d'un double brin d'ADN et d'un nucléotide entrant a été établie par Huang et *al.* [142]. Les informations apportées par cette structure ont permis d'affiner nos connaissances quant au mécanisme de synthèse de l'ADN proviral, catalysé par la RT.

Quelles informations importantes pouvons-nous déduire de cette structure ? La figure 1 montre qu'au niveau du site actif, la base du nucléotide entrant adopte une conformation *anti* qui lui permet de s'associer par interactions Watson-Crick avec la base complémentaire de la matrice, alors que le désoxyribose adopte une conformation C-3' *endo*.

Une zone de contact importante entre le duplex d'ADN et l'hélice α H, située au niveau du "pouce" de la sous-unité p66, est également observée. Au voisinage du site actif, l'ADN double brin est de forme A alors qu'en amont de la zone de contact avec l'hélice α H, l'ADN est de forme B. La transition de la forme A vers la forme B, s'effectue plus précisément de 4 à 6 nucléosides en amont du site actif.

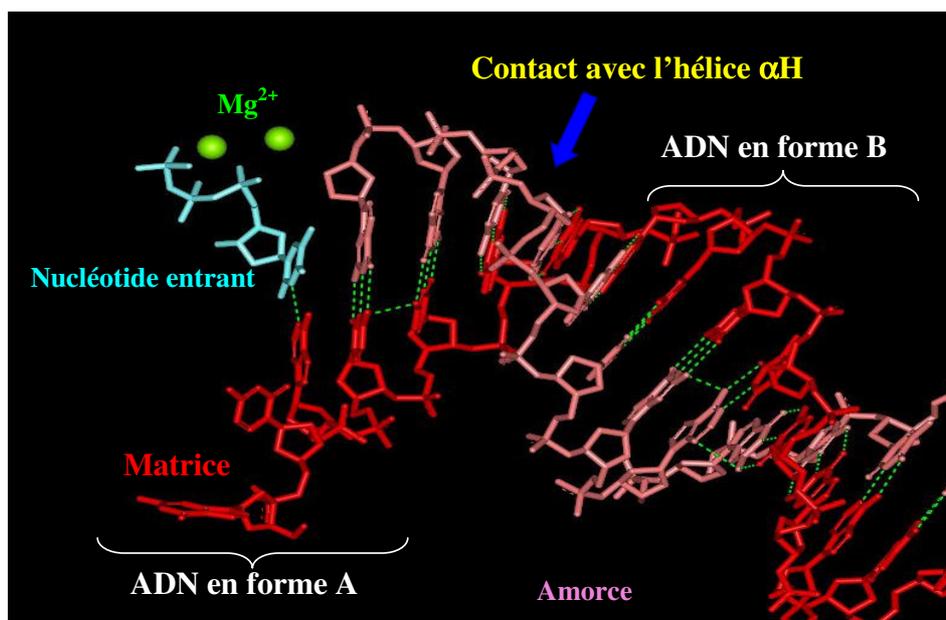


Figure 1: Représentation tridimensionnelle d'un double brin matrice/amorce d'ADN et d'un nucléotide entrant au voisinage du site de polymérisation de la RT.

Sont représentés les brins « matrice » (rouge) et « amorce » (rose) en présence du nucléotide entrant. Pour plus de clarté, la partie protéique a été soustraite.

Ce changement de conformation a des conséquences importantes sur la conformation du désoxyribose et sur l'orientation de la base. En effet, la transition de la forme A vers la forme B se traduit par une modification de l'angle χ qui passe de -160° à une valeur comprise entre -100 et -130° (figure 2), mais également d'une modification de la conformation du désoxyribose qui passe d'une conformation $C3'$ *endo* à $C2'$ *endo*.

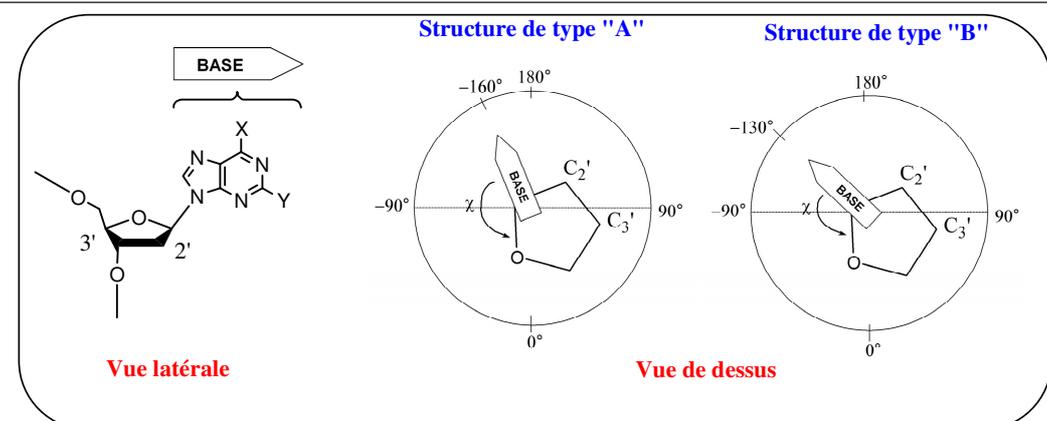


Figure 2 : Orientation moyenne de la base dans un ADN de forme A et de forme B et définition de l'angle χ .

La transition observée commence de 4 à 6 nucléotides en amont du nucléotide terminal (3'-OH) de l'amorce, notre objectif était donc de synthétiser des analogues nucléosidiques qui, comme le substrat naturel, seront intégrés dans le brin d'ADN en cours de synthèse sans en terminer immédiatement l'élongation. Ainsi ces molécules, à la différence du substrat naturel, devront bloquer l'élongation de la chaîne lorsqu'ils arriveront dans la zone de contact avec l'hélice α H de l'enzyme (schéma 1). D'autre part, la RT des rétrovirus ne possède pas d'activité 3'-exonucléase. Ainsi un composé qui ne bloque pas la polymérisation de l'ADN proviral directement après avoir été incorporé dans le brin (-), mais qui agit avec un retard de trois ou quatre unités nucléotidiques, ne pourra pas être excisé, que ce soit par réaction avec l'ATP ou par pyrophosphorolyse.

En cherchant à gêner cette transition par l'introduction en position 8 de la base de groupements R, de taille et de nature variables, nous espérons contourner les mécanismes de résistance impliquant une molécule d'ATP ou du pyrophosphate.

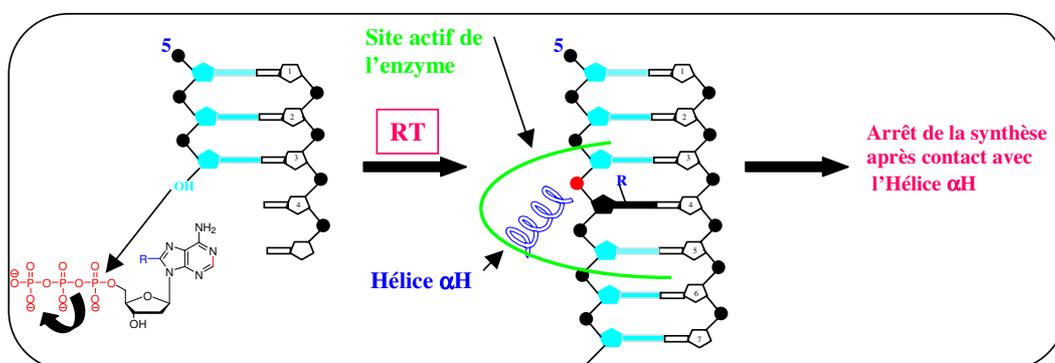


Schéma 1: Représentation schématique du mécanisme d'inhibition postulé des analogues nucléosidiques de la dA modifiés par un groupement R.

Les modifications à envisager doivent tenir compte d'un certain nombre de facteurs.

- ✓ Les analogues nucléosidiques modifiés devront être capable d'établir les interactions Watson-Crick avec le brin complémentaire.
- ✓ Les groupements fonctionnels intervenant dans ces liaisons ne devront pas perturber ces interactions.
- ✓ Les hydroxyles en 3' et 5' devront être conservés afin de pouvoir établir les liaisons phosphodiester.

En tenant compte de ces contraintes, des modifications peuvent être envisagées soit sur la base, soit sur le sucre (figure 3).

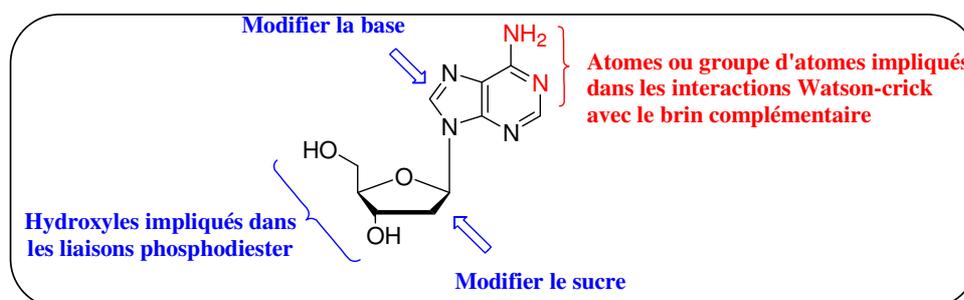


Figure 3: Représentation des différentes positions envisagées pour introduire des modifications sur la dA.

La première famille de molécules dont nous avons envisagé la synthèse repose sur des modifications chimiques introduites en position 8 de la dA. Nous avons cherché à gêner le changement d'orientation de la base lorsque cet analogue sera au contact de l'hélice α H en introduisant un substituant R en position 8 de la base (figure 4).

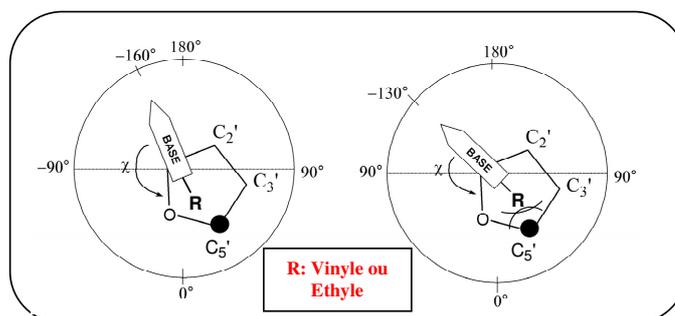


Figure 4 : Mécanisme postulé des inhibiteurs nucléosidiques envisagés.

L'encombrement stérique du substituant R gêne le changement d'orientation de la base lors de la transition de la forme « A » vers la forme « B » de l'ADN.

Les premières molécules avec lesquelles nous avons démarré ce projet sont des dérivés de la dA, modifiés par les groupements « vinyle » et « éthyle ».

Nous étudierons dans un premier temps l'influence de tels substituants sur l'activité polymérase de la RT en les incorporant dans des séquences modèles « matrice » et « amorce ». Pour accéder aux séquences d'oligonucléotides marqués, nous nous sommes appuyés sur la chimie développée au laboratoire (décrite dans le chapitre précédent) à savoir la préparation du synthon phosphoramidite correspondant et son incorporation dans des séquences d'ADN, grâce à la synthèse en phase solide.

Cette première partie va s'articuler autour de trois points:

- ✓ La synthèse des phosphoramidites correspondant aux analogues modifiés par un groupement vinyle et éthyle.
- ✓ La préparation des séquences d'oligonucléotides "amorce" et "matrice".
- ✓ La présentation des résultats, qui sera suivie d'une discussion.

II- Etude de l'effet de la 8vdA et de la 8edA sur les deux activités enzymatiques de la RT

Cette étude a été effectuée en collaboration avec l'équipe du Dr. R. Marquet (UPR 9002 du CNRS, IBMC Strasbourg).

2.1. Le choix des séquences synthétisées

2.1.1. La séquence "amorce"

Nous avons choisi de préparer des séquences d'oligonucléotides de 18 et 19-mers qui miment l'extrémité 3' de l'ARNt^{Lys3}. Cet ARN joue un rôle essentiel lors de la rétrotranscription puisqu'il agit comme amorce pour la synthèse du brin d'ADN (-) en se fixant au site PBS situé dans la région 5' de l'ARN viral. Dans ces séquences, l'analogue nucléosidique a été placé aux positions +1 et +2 (respectivement dans des séquences de 18 et 19-mers) en amont du site actif de la RT. Les mêmes séquences contenant la dA à la place de l'analogue nucléosidique ont été achetées et utilisées comme référence.

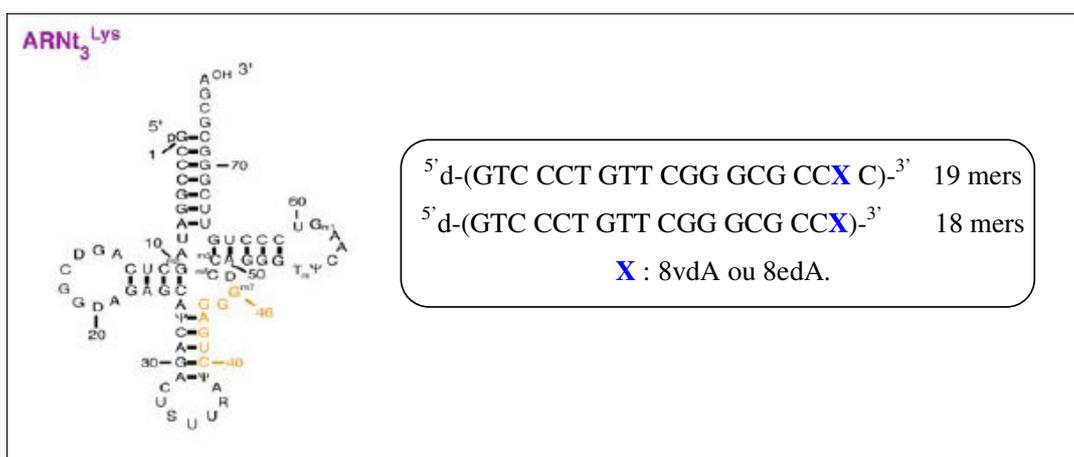


Figure 5 : A) Structure de l'ARNt^{Lys3}. B) Séquences de 18 et 19-mers modifiées par les analogues 8vdA et 8edA représentant l'extrémité 5' de l'ARNt^{Lys3}.

2.1.2. La séquence "matrice"

Pour évaluer dans un deuxième temps l'effet d'un groupement vinyle ou éthyle en position 8 de la base sur l'activité ADN polymérase ADN-dépendante, la 8vdA et la 8edA ont été incorporées dans un brin matrice de 31-mers en position +2 ou +1 par rapport au site de démarrage de la synthèse d'ADN. La production d'ADN sera évaluée en utilisant deux séquences complémentaires de 18 et 19-mers comme amorces, en prenant toujours comme référence la séquence matrice ne contenant pas la base modifiée (figure 6).

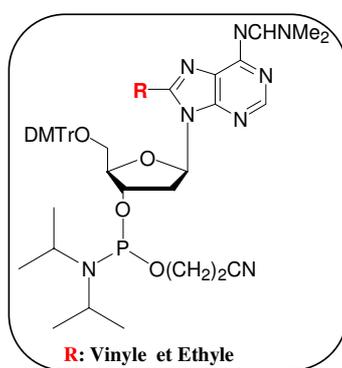


Figure 6 : Séquence d'ADN matrice synthétisée contenant soit la 8vdA soit la 8edA.

2.2. Synthèse des séquences marquées

La synthèse des oligonucléotides marqués repose sur la chimie des phosphoramidites et sur la synthèse en phase solide. Le principe de synthèse du synthon phosphoramidite de la 8vdA a été décrit dans le chapitre précédent, nous ne décrivons donc dans cette partie que la synthèse du synthon phosphoramidite de la 8edA ainsi que les modifications apportées à la synthèse en phase solide.

2.2.1. Synthèse des synthons phosphoramidites de la 8vdA et de la 8edA



Nous nous sommes appuyés sur la même stratégie de synthèse que celle décrite dans le chapitre II pour la préparation du synthon phosphoramidite de la 8vdA (schéma 1).

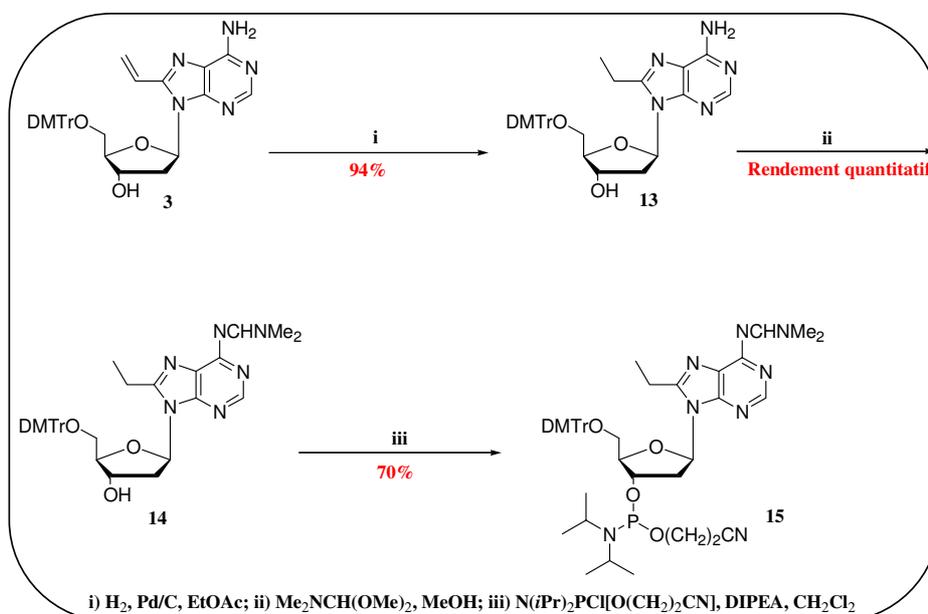


Schéma 2: Schéma de synthèse du synthon 8-éthyl-dA-CE-phosphoramidite (**15**).

La synthèse du synthon phosphoramidite de la 8edA commence par la réduction du groupement vinyle de la 8-vinyl-5'-*O*-DMTr-2'dA (**3**) décrit dans le chapitre précédent. La réduction est réalisée par hydrogénation catalytique en présence de palladium (0) sur charbon actif. Le rendement de cette étape est de 94%. Le produit (**13**) est obtenu suffisamment pur pour être engagé dans la suite de la synthèse, sans étape de purification supplémentaire. L'amine en N6 du composé (**13**) a été protégée quantitativement par le groupement formamidine. La dernière étape du schéma de synthèse du synthon 8edA est l'introduction du groupement phosphoramidite en position 3' de l'hydroxyle libre du composé (**14**). Cette étape a pu être effectuée dans les conditions habituelles de synthèse, à savoir en présence du chloro-*N,N'*-diisopropyl-cyanoéthyl-phosphoramidite, de DIPEA dans le CH₂Cl₂ et permet ainsi d'obtenir le composé (**15**) avec un rendement de 70% après purification.

2.2.2. Synthèse des séquences d'oligonucléotides marqués

Les conditions mises au point lors de la synthèse des oligonucléotides modifiés par la 8vdA ont été reprises et appliquées à la synthèse des séquences contenant la 8edA. Ainsi les étapes de détrytilation (TCA 3%), d'oxydation (butanone peroxyde) et de déprotection (NH₄OH 28%) sont identiques à la 8vdA, seul l'agent activateur a été modifié. Le tétrazole a en effet été remplacé par le 4,5-dicyanoimidazole assurant des temps de couplage trois fois plus rapide que le tétrazole [233].

Deux séquences « amorce » modifiées par la 8vdA ou la 8edA ont ainsi été préparées, purifiées par CLHP, et caractérisées par spectrométrie de masse ESI ou MALDI-Tof. Quant aux séquences « matrice » modifiées, elles ont également été synthétisées et purifiées mais seule la séquence modifiée par la 8edA a permis d'obtenir un spectre de masse en accord avec la masse attendue.

2.4. Résultats et discussion

L'activité inhibitrice de la 8vdA et de la 8edA incorporées dans les séquences « amorce » et « matrice » a pu être déterminée après analyse des produits de rétro-transcription sur gel de polyacrylamide dénaturant. L'amorce est marquée au ³²P à son extrémité 5' et après rétro-transcription et dénaturation thermique du complexe amorce/matrice, une électrophorèse dans un gel dénaturant de polyacrylamide permet de séparer les produits en fonction de leur taille. Les produits sont ensuite révélés par autoradiographie.

2.4.1. Effet des modifications dans le brin amorce

La production d'ADN (-) a été étudiée avec trois matrices de taille et de nature variables :

- ✓ Une matrice ARN de 311 nucléotides correspondant à l'extrémité 5' de l'ARN génomique.
- ✓ Une matrice d'ARN plus courte comportant la région PBS et 20 nucléotides supplémentaires.
- ✓ Une matrice d'ADN identique à la séquence précédente.

La production de l'ADN de pleine longueur avec des amorces contenant soit la 8vdA, la 8edA ou la dA a été évaluée avec un ARN ou ADN court comportant la région PBS et 20 nucléotides supplémentaires. Aucune différence n'est observée lors de la synthèse de l'ADN que les amorces contiennent les nucléotides modifiés ou non.

A l'inverse, avec la matrice ARN longue de 311 nucléotides, une pause marquée dans la synthèse d'ADN (-) est observée avec les amorces contenant la 8vdA ou la 8edA (figure 7). Cette pause a lieu après que deux nucléotides aient été incorporés dans le cas de l'amorce de 19-mers (8vdA) et après que trois nucléotides aient été rajoutés dans le cas de l'amorce de 18-mers (8edA). Cette pause est d'ailleurs également présente dans la séquence non modifiée (contenant la dA) mais elle est beaucoup moins prononcée qu'en présence des analogues modifiés.

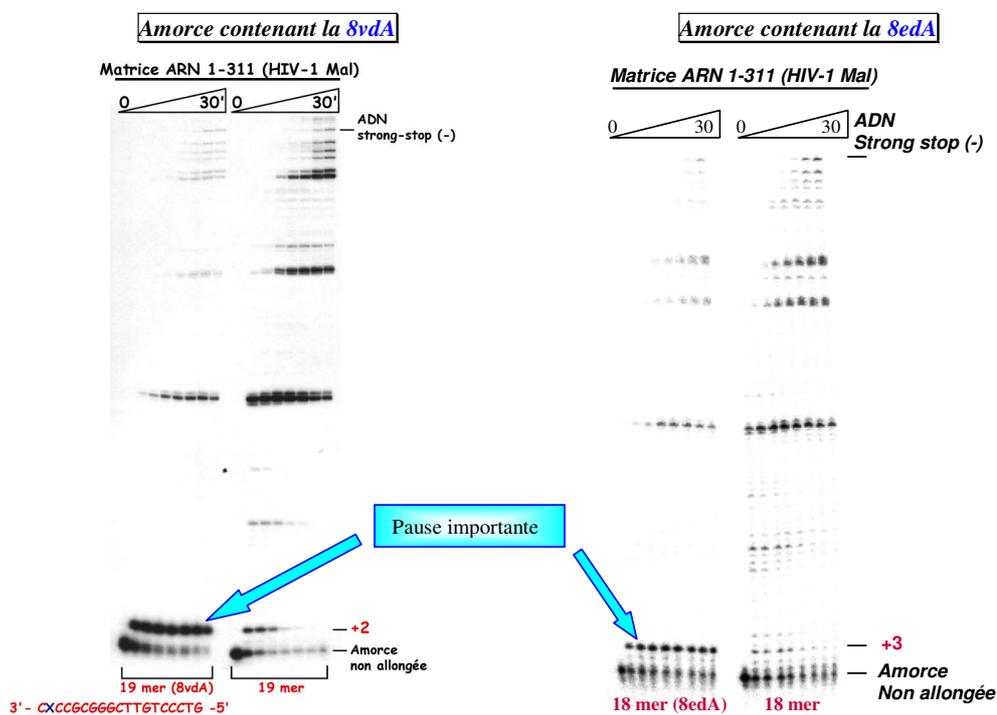


Figure 7: Cinétique de synthèse de l'ADN strong stop (-) analysée sur gel de polyacrylamide dénaturant à partir d'amorces contenant un nucléotide modifié ou non.

2.4.2. Effet des modifications dans le brin matrice

Les séquences « matrice » contenant la 8vdA ont été synthétisées mais elles n'ont pas pu être caractérisées par spectrométrie de masse. Seuls les résultats impliquant la 8edA seront décrits.

Lorsque la 8edA a été incorporée dans la séquence matrice d'ADN en position + 2 ou +1 par rapport au site de démarrage de la réplication et à l'amorce utilisée (respectivement de 18 nucléotides ou de 19 nucléotides) une pause importante est à nouveau observée (figure 8).



Figure 8: Cinétique de la synthèse de l'ADN proviral, à partir d'une amorce de 18 ou 19 nucléotides et d'une matrice marquée par la *8edA*.

2.4.3. Discussion

La synthèse des synthons phosphoramidite de la *8vdA* et de la *8edA* ainsi que des séquences modifiées correspondantes a été entreprise et réalisée avec succès. Pour la synthèse des oligonucléotides, la tâche s'est révélée être plus difficile à entreprendre dans le cas de la *8vdA* en raison d'une réactivité et d'une sensibilité beaucoup plus prononcée du groupe vinyle.

Les résultats obtenus par analyse des produits d'élongation de l'ADN (-) en présence de la RT, nous ont permis de visualiser une pause de l'activité enzymatique lorsque la *8vdA* ou la *8edA* sont incorporées dans les brins amorces. Cette pause a lieu après que 2 ou 3 nucléotides aient été rajoutés par la RT (respectivement pour les amorces de 19 et 18-mers). Les analogues modifiés de la dA se trouvent alors en position n-4, à 4 nucléotides du site actif de l'enzyme (figure 9).

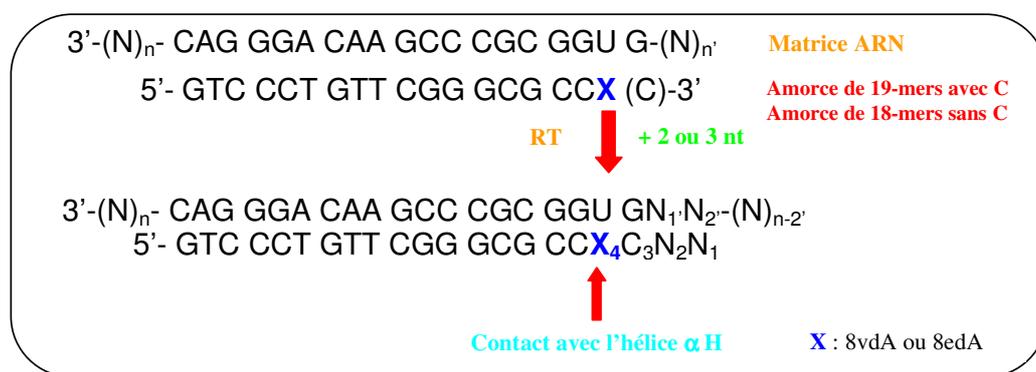


Figure 9: Représentation schématique des produits de synthèse de l'ADN (-) sous l'effet de la RT en présence d'amorce modifiées contenant soit la 8vdA, soit la 8edA.

Selon que l'amorce utilisée est longue de 19 ou 18 nucléotides, la RT additionne 2 ou 3 nucléotides. La présence des analogues modifiés provoque alors un arrêt de la synthèse lorsqu'ils se trouvent en position n-4 par rapport au site actif. C'est en effet à ce moment que le contact avec l'hélice αH a lieu.

En se basant sur les hypothèses de départ, c'est à ce moment précis que s'effectue la transition de la forme A vers la forme B, au contact avec l'hélice αH. Ces résultats indiquent que la présence des groupements « vinyle » et « éthyle » sur cette position de la base est suffisante pour gêner cette transition et induire une inhibition selon le mécanisme postulé. Le taux d'inhibition a d'ailleurs été quantifié : la 8vdA est un meilleur inhibiteur de la synthèse de l'ADN strong stop (-) que la 8edA, avec un taux d'inhibition atteignant les 90% contre 45% dans le cas de la 8edA. Il est également à noter que cette pause n'a pas été observée avec les matrices plus courtes d'ADN ou d'ARN, qui ne possèdent pas en aval du site PBS une région de 15 nucléotides qui serait en contact avec le domaine RNaseH de RT. Cette différence pourrait être à l'origine de ces observations; l'ARN de 311 nucléotides serait donc un meilleur mime de l'ARN génomique.

Dans cette étude, nous avons pu observé une pause importante dans la synthèse du second brin d'ADN lorsque la 8edA est incorporée au niveau d'un brin matrice. En effet lorsque l'amorce de 18 nucléotides est complémentaire du brin matrice porteur de la modification, un seul nucléotide est incorporé avant que la RT n'effectue une pause dans le processus d'élongation. Ce phénomène a également lieu avec l'amorce de 19 nucléotides, mais cette fois-ci la pause a lieu sans qu'un nucléotide supplémentaire ne soit ajouté (figure 10). Ces résultats indiquent que la synthèse d'ADN (+) est fortement inhibée lorsque la 8edA doit se positionner au niveau du site actif, pour se complexer au nucléotide entrant.

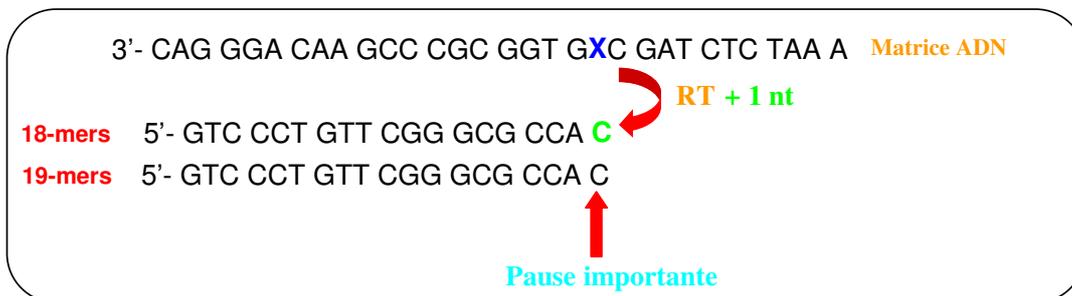


Figure 10: Représentation simplifiée de l'élongation de l'ADN (+) sous l'effet de la RT, en présence des bases modifiées.

Pour essayer d'expliquer ce résultat, il faut analyser la structure aux rayons X de la RT en présence d'un double brin d'ADN et d'un nucléotide entrant (figure 11).

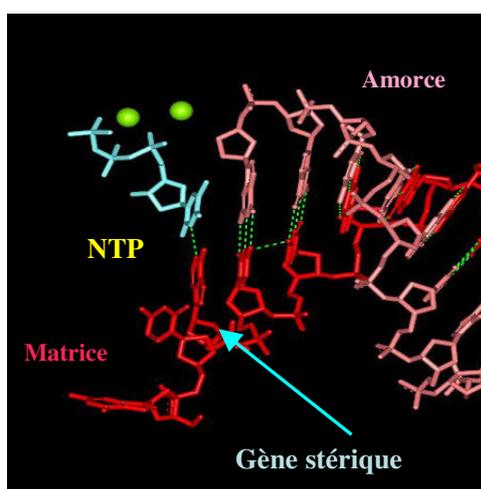


Figure 11 : Représentation simplifiée d'un brin matrice et amorce en présence d'un dNTP au niveau du site de polymérisation de la RT.

Pour que la liaison phosphodiester puisse s'établir entre deux nucléosides, la base du nucléotide de la matrice doit former des liaisons Watson-Crick avec le nucléotide entrant. Il est probable que le positionnement approprié de la base au niveau du site actif soit gêné par un encombrement stérique généré par le groupement éthyle. En effet, le remplacement de l'hydrogène en position 8 de la base par un groupe éthyle se traduirait par une interaction stérique importante de l'éthyle avec l'oxygène cyclique du désoxyribose du nucléotide en aval de la matrice (+1 par rapport au site de démarrage de la synthèse d'ADN) ainsi que l'indique la flèche bleue dans la figure 11. Le nucléoside modifié ne pourrait alors se positionner

correctement au niveau du site actif de l'enzyme gênant ainsi la formation d'un complexe enzyme/substrat productif.

Ce résultat n'était pas prévisible compte tenu des hypothèses de départ. Ces molécules peuvent donc exercer une activité inhibitrice en agissant cette fois-ci sur la synthèse du deuxième brin d'ADN.

Les modifications introduites en position 8 de la base permettraient ainsi non seulement d'inhiber la synthèse de l'ADN (-) selon un mécanisme différent des terminateurs d'élongation de chaîne mais peuvent également agir en inhibant cette fois-ci la synthèse de l'ADN (+), si la première étape n'est pas inhibée. Le mécanisme d'action mis en évidence avec des analogues de la dA est d'autant plus intéressant que l'on agit sur les deux activités polymérases de l'enzyme (ADN polymérase ARN et ADN dépendante).

2.5. Conclusion

En suivant une stratégie de synthèse assez douce, nous avons pu préparer les synthons phosphoramidites de la 8vdA et de la 8edA nécessaires à la synthèse des séquences modèles « amorce » et « matrice » avec de bons rendements. Les premières études menées avec des séquences marquées et la RT, nous ont permis de visualiser des pauses importantes dans la synthèses des ADN (+) et (-). Les résultats obtenus sur l'activité polymérase ARN dépendante vont dans le sens des hypothèses formulées. En ce qui concerne les observations faites sur la seconde activité polymérase, ces résultats n'étaient pas attendus, mais peuvent s'expliquer en analysant la structure de la RT cristallisée avec un duplex d'ADN et un nucléotide entrant.

Ces résultats indiquent que si l'analogue triphosphate est substrat de la RT, l'inhibition de la synthèse d'ADN proviral pourra avoir lieu sur les deux activités polymérases de l'enzyme. Un tel mode d'action sur les deux activités polymérases de l'enzyme renforcerait l'efficacité de ces analogues de la dA. Dans le but d'étudier l'influence de la taille et de la nature du substituant sur la capacité des analogues de la dA à inhiber la production d'ADN proviral, nous avons entrepris de réaliser la préparation d'autres analogues de la dA. Nous souhaitons ainsi mener des études de relation structure-activité sur une gamme plus large de molécules.

C'est dans cette optique que nous avons choisi de synthétiser dans un premier temps des analogues de la dA sous leur forme nue et sous la forme de prodrogue, avec pour objectif de les tester directement sur des cultures cellulaires infectées par le virus du VIH-1.

Après un rappel des différentes méthodes de synthèse disponibles dans la littérature nous exposerons l'approche que nous avons choisi d'adopter.

III. Les analogues nucléosidiques de la dA

3.1. Synthèse de dérivés modifiés en position 8 de la dA sous leur forme nue

La molécule de référence choisie est la désoxyadénosine sur laquelle un certain nombre de modifications chimiques ont été introduites en position 8 de la base (figure 12).

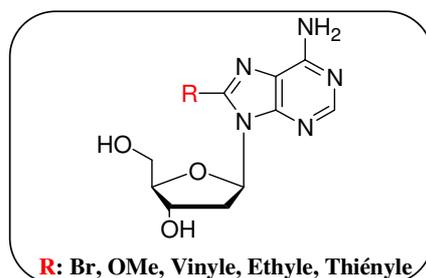


Figure 12 : Structure générale des différents analogues de la dA envisagés.

Les substituants à introduire sont de taille moyenne et ont été choisi en tenant compte d'informations de la littérature. Il est connu que l'introduction d'un substituant sur la position 8 de la dA modifie la répartition des conformations *syn* et *anti* en faveur de la conformation *syn* [234]. Nous avons tenu compte de ces informations dans le choix des substituants à introduire sur cette position, afin que l'orientation de la base ne soit pas bloquée dans la conformation *syn*.

De nombreux dérivés de l'adénosine et de la désoxyadénosine modifiés en position 8 ont été synthétisés et étudiés. On compte parmi eux des dérivés modifiés par un atome de brome, un groupement méthoxy [235], des groupements alkyles (méthyle [236], éthyle, vinyle [237], acétylène [238]) ou encore amine [239]. Ces dérivés sont connus pour modifier la répartition entre les deux conformations *syn* et *anti* sans en bloquer toutefois l'orientation de la base dans la conformation *syn*. Les propriétés antivirales de certains de ces analogues, principalement en série ribosyle, ont également été évaluées et certaines de ces modifications se sont révélées prometteuses pour induire une inhibition virale. Il nous est donc apparu important d'évaluer l'effet de telles modifications et d'autres, en série désoxyribosyle puisque le substrat de la RT est un désoxynucléotide.

La synthèse de ces analogues découle de la préparation du dérivé 8-bromé de la dA (**1**), décrit dans le chapitre précédent et repose sur le schéma 2 qui suit.

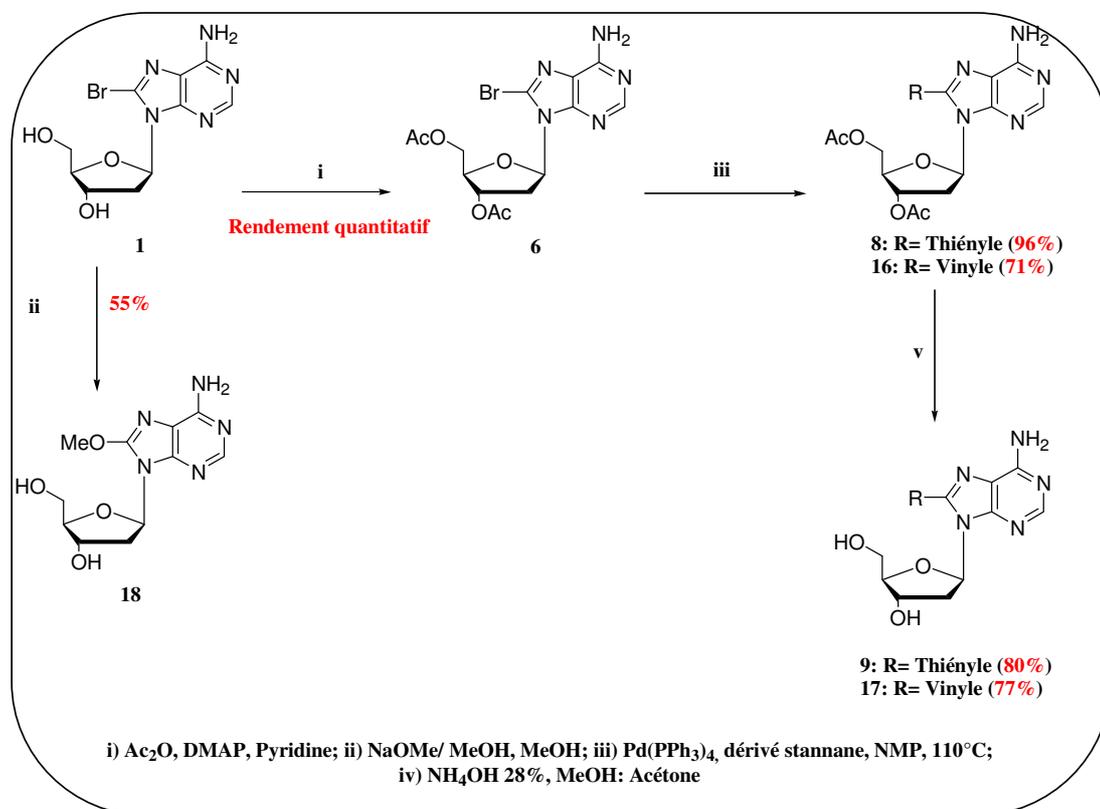


Schéma 3: Synthèse des différents analogues de la dA, modifiés en position 8.

La présence de l'atome de brome offre la possibilité d'introduire une grande variété de groupements par substitution nucléophile.

La synthèse de la 8thdA a été discutée dans le chapitre précédent. Le schéma de synthèse suivi a également été repris pour la synthèse de la 8vdA. Une fois les hydroxyles 3' et 5' du composé (**6**) protégés par les groupements acétate (rendement quantitatif), l'intermédiaire (**6**) peut alors être utilisé pour le couplage de Stille. Les conditions précédemment mises au point ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, dérivé stannane, NMP à 110°C) ont pu être utilisées pour préparer les composés (**8**) et (**16**) avec des rendements de réaction respectifs de 71% et 96%. Les groupements acétates de ces composés, ont été clivés en présence d'une solution d' NH_4OH à 28% dans un mélange $\text{MeOH}/\text{Acétone}$ (50:50) pendant une nuit.

Nous avons tenu compte des observations effectuées lors de la deprotection des oligonucléotides contenant la 8vdA, et les temps de déprotection ont ainsi été réduits dans le

cas du composé (**16**). Les produits (**9**) et (**17**) ont été finalement obtenus après purification avec un rendement de 80 et 77% respectivement.

Une autre modification a été introduite en position 8 de la base, toujours en se basant sur la 8-bromo-dA (**1**). Il s'agit du groupement méthoxy introduit en position 8 en suivant un protocole déjà décrit dans la littérature [235]. Le groupement méthoxy a été introduit à l'aide d'une solution de méthanolate de sodium à 25% dans du MeOH, permettant ainsi d'aboutir au composé 8-méthoxy-dA (**18**) avec un rendement comparable à celui de la littérature (55%).

La préparation du composé 8-éthyl-dA (**21**) a été effectuée à partir du composé (**13**) décrit précédemment selon le schéma 4 suivant.

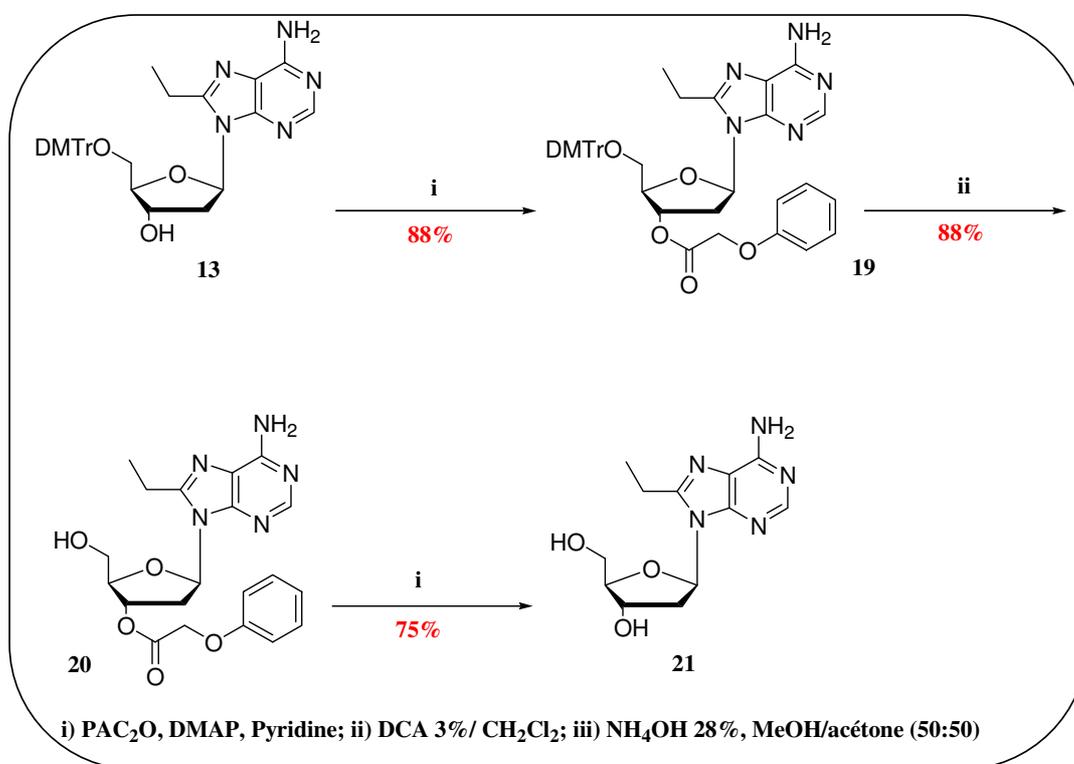


Schéma 4: Synthèse du nucléoside nu de la 8edA (**21**).

La synthèse de la 8edA débute par la protection de l'hydroxyle en 3' du composé (**13**) par le groupement phénoxyacétique dans des conditions standards. Le composé (**19**) est obtenu avec un rendement de 88% sans que l'amine en N6 ne soit affectée. Le groupement DMTr est ensuite éliminé en présence d'une solution de DCA à 3% dans du CH₂Cl₂ et le produit (**20**) est obtenu avec un rendement de 88%. La fonction alcool en 3' est alors libérée à l'aide d'une solution d'NH₄OH à 28%, dans un mélange MeOH : Acétone (50:50). Le

composé (**2I**) est obtenu après purification sur plaque semi-préparative avec un rendement de 75%.

Il convient de noter que l'ensemble des nucléosides nus, une fois purifié, présentent une très faible solubilité dans la plupart des solvants organiques, ce qui rend leur manipulation très délicate.

Ces dérivés ont été évalués pour leur activité Anti-VIH et les résultats relatifs à cette étude sont présentés à la fin de ce chapitre.

L'étape suivante à franchir était de tester cette série de nucléosides modifiés, sous leur forme monophosphorylée. En effet c'est sous cette forme qu'ils seront précurseurs de la forme active du substrat de l'enzyme, à savoir sa forme triphosphate, et peut être avoir une activité selon le mécanisme postulé au départ. L'approche adoptée a été de préparer ces analogues nucléosidiques sous la forme de prodrogue, ce qui non seulement permettra de contourner la barrière membranaire, mais également la première étape de phosphorylation.

IV. Préparation des analogues phosphoramidates

4.1. L'approche prodrogue, définition et enjeux

Les analogues de nucléosides (AZT, d4T, 3TC) actuellement utilisés en traitement clinique doivent subir 3 étapes successives de phosphorylation pour être actifs dans la cellule et devenir substrat de la RT. Il a été montré que certaines de ces étapes restent limitantes pour convertir l'analogue nucléosidique en dérivé triphosphorylé. Dans le cas du d4T, c'est la première étape de phosphorylation en dérivé monophosphate qui est l'étape cinétiquement limitante pour atteindre l'espèce active, à savoir le d4T-triphosphate. Dans le cas de l'AZT par contre, c'est le passage de l'espèce monophosphate vers l'analogue diphosphate qui est l'étape limitante [240-245].

Une façon de contourner ces problèmes consisterait à administrer l'analogue nucléosidique sous sa forme monophosphate permettant ainsi de s'affranchir de la première étape de phosphorylation. Cette stratégie se heurte cependant à deux inconvénients. D'une part le caractère polaire des molécules, qui les empêche de traverser les membranes cellulaires, d'autre part leur instabilité dans le flux sanguin est à l'origine d'une rapide déphosphorylation.

Afin de palier à ces inconvénients, une des méthodes de choix est la stratégie prodrogue [246].

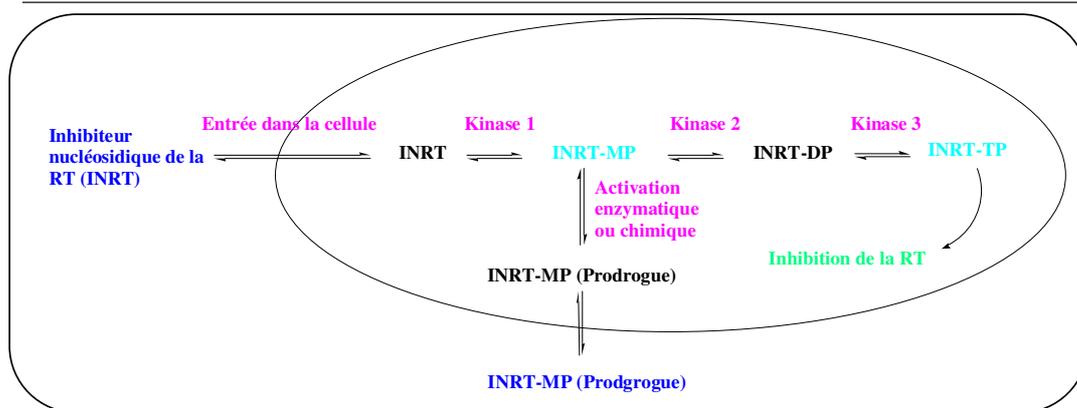


Figure 13 : Représentation schématique de la stratégie prodrogue permettant d'accéder à l'analogue monophosphate après activation enzymatique et/ou chimique dans la cellule.

De façon schématique (figure 13) une prodrogue peut être définie comme l'analogue inactif d'une molécule active. Le recours à cette stratégie a pour effet d'améliorer les propriétés pharmacologiques (biodisponibilité, biodistribution, activité thérapeutique, spécificité...) de la molécule parente en masquant une fonctionnalité réactive. Une fois dans la cellule, la prodrogue est convertie en espèce active sous l'effet d'enzymes et/ou par réaction chimique (variation du pH, des conditions salines...).

Les résultats les plus prometteurs quant à la synthèse des prodrogues font appel à deux stratégies principalement: la première méthodologie a été largement développée par Imbach et *al.* [247-249] et repose sur la conception d'analogues bis-SATE phosphotriester (figure 14).

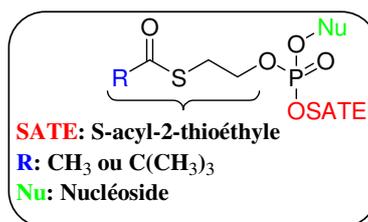


Figure 14: Structure générale d'un analogue bis-SATE phosphotriester de nucléoside.

La deuxième stratégie a été amplement étudiée par McGuigan et *al.* et repose sur des composés de type aryloxyphosphoramidates [250] (figure 15).

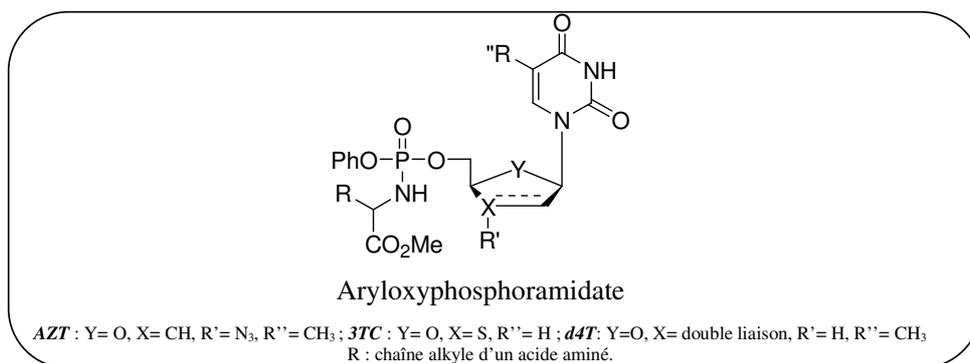


Figure 15: Exemples d'aryloxyphosphoramidates de didésoxynucléosides.

La stratégie développée par McGuigan et *al.* nous est apparue plus facile à mettre en œuvre pour nos analogues modifiés, c'est pour cela que nous discuterons plus particulièrement cette stratégie de synthèse.

4.2. Les aryloxyphosphoramidates de McGuigan

Cette stratégie prodrogue a été largement appliquée aux dérivés nucléosidiques à activité antivirale que ce soit pour l'AZT [251, 252], le d4T [250, 253-256] ou le 3TC [257] améliorant ainsi de façon considérable leurs propriétés antivirales sur des lignées cellulaires déficientes en thymidine kinase (cellules TK⁻). Il en est de même pour l'Abacavir pour lequel l'analogue phosphoramidate s'est révélé être plus actif sur des cellules CEM infectées par le VIH-1 ou le VIH-2 [258, 259].

Le mécanisme d'activation du phosphoramidate en dérivé monophosphate a fait l'objet de différentes études. Le mécanisme rendant compte des résultats de ces travaux est représenté dans le schéma 5.

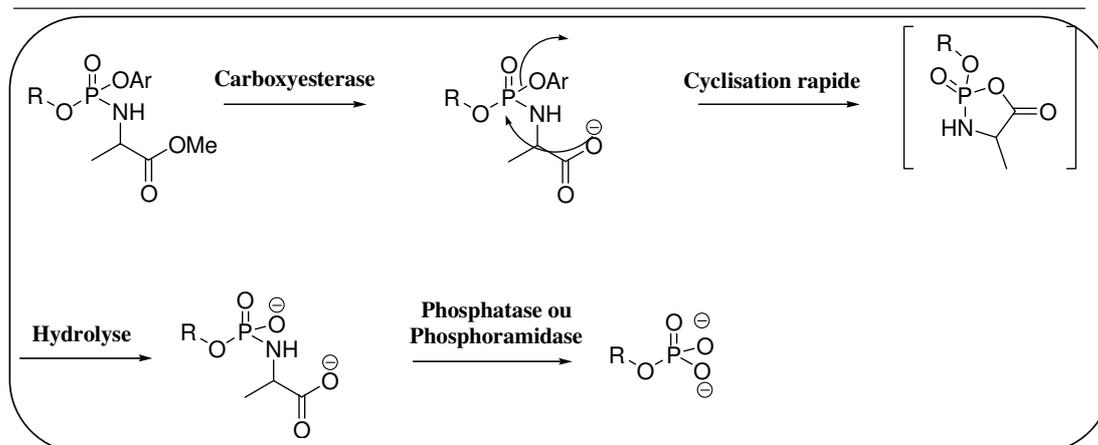


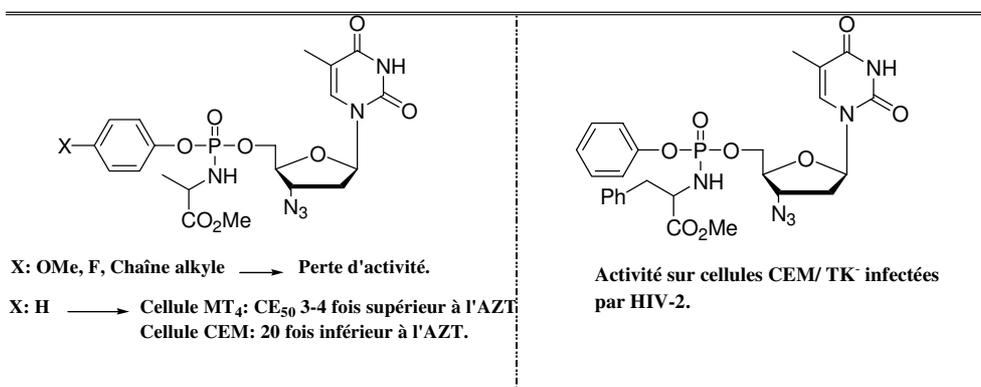
Schéma 5: Mécanisme proposé conduisant à la formation du dérivé monophosphate à partir d'un dérivé aryloxyphosphoramidate.

Il a été proposé que lors de la première étape, l'ester méthylique de l'acide aminé soit clivé par une estérase, libérant ainsi l'ion carboxylate. Ce résidu carboxylate pourra alors attaquer le phosphore (V) électrophile. Le groupement phénoxy est alors expulsé favorisant le passage par un intermédiaire cyclique instable, qui subit une hydrolyse rapide. La formation de cet intermédiaire cyclique est proposée mais aucune donnée ne permet jusqu'ici d'affirmer sa formation. Une hydrolyse de la liaison P-N sous l'effet d'une phosphoramidase ou d'une phosphatase, libère ensuite le dérivé monophosphate correspondant.

Un autre paramètre important à contrôler est la nature de l'acide aminé à incorporer, ainsi que la nature du noyau aromatique. En effet il a été observé que lorsque l'acide aminé était substitué par une amine quelconque, aucune activité antivirale n'est observée [260]. De même la stéréochimie de l'acide aminé est importante, puisque les dérivés de la série (D) sont très peu actifs [261]. D'un autre côté, la nature du noyau aromatique joue aussi un rôle important. Ainsi la présence en *para* d'un substituant alkyle, d'un groupement méthoxy ou d'un atome de fluor sur le noyau aromatique, modifie également les propriétés antivirales. Dans le cas de l'AZT, par exemple, ces modifications induisent une perte d'efficacité d'un facteur 20 à 50 par rapport à l'AZT [252].

Ces différents travaux nous ont amené à conclure que les aryloxyphosphoramidates les plus performants, quelle que soit la nature du nucléoside, sont ceux substitués par une (L)-alanine comme acide aminé et par un noyau phényle en ce qui concerne le noyau aromatique (figure 16).

Influence des résidus aryles et de la nature de l'acide aminé sur l'activité antivirale de l'AZT.



Influence des résidus aryles et de la nature de l'acide aminé sur l'activité antivirale du d4T [254, 255].

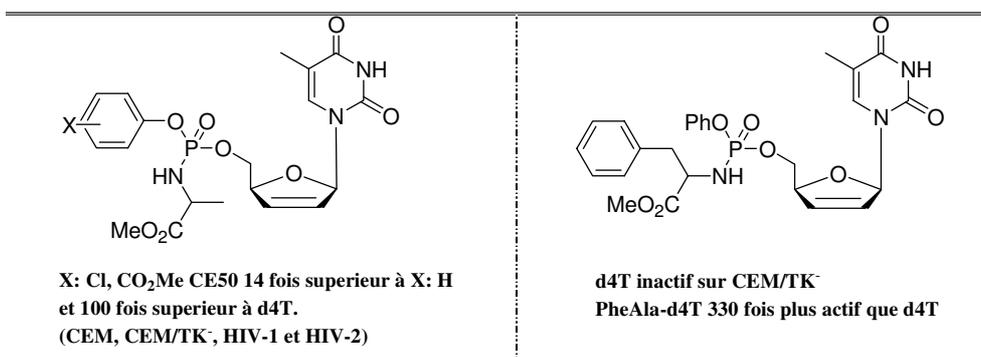


Figure 16: Exemples d'aryloxyphosphoramidates de l'AZT et du d4T substitués par la (L)-alanine ou la (L)-phénylalanine et leurs activités antivirales.

Nous avons donc cherché à exploiter cette stratégie, en synthétisant nos analogues modifiés en position 8 (Br, OMe, thiényle, éthyle, vinyle) sous la forme phosphoramidate, en gardant comme acide aminé la (L)-alanine et le phényle comme noyau aromatique.

Il a également été observé qu'un dérivé de l'AZT pour lequel la (L)-alanine a été remplacée par (L)-phénylalanine, présentait une activité antivirale sur des cellules CEM/TK⁻ infectées par le virus de VIH-2. Il était donc intéressant d'étudier aussi l'effet d'une telle modification sur nos dérivés. Pour cela deux séries de phosphoramidates ont été envisagées, une première, substituée par la (L)-alanine, la deuxième par la (L)-phénylalanine (figure 17).

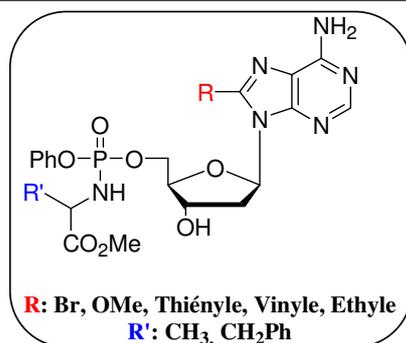


Figure 17 : Structure générale des phényloxyphosphoramidates envisagés.

4.2.1. La méthode de McGuigan

La littérature offre plusieurs méthodologies de synthèse permettant d'atteindre les dérivés phosphoramidates. Développée par McGuigan, la première voie de synthèse repose sur la préparation du dérivé phénylméthoxy-(L)-alaninyl phosphochloridate qui pourra alors réagir dans du THF avec l'alcool libre en 5' de l'analogue nucléosidique voulu (ex : AZT dans le schéma 6), en présence d'une base telle que la *N*-méthylimidazole (NMI), ou la *N*-méthylmorpholine.

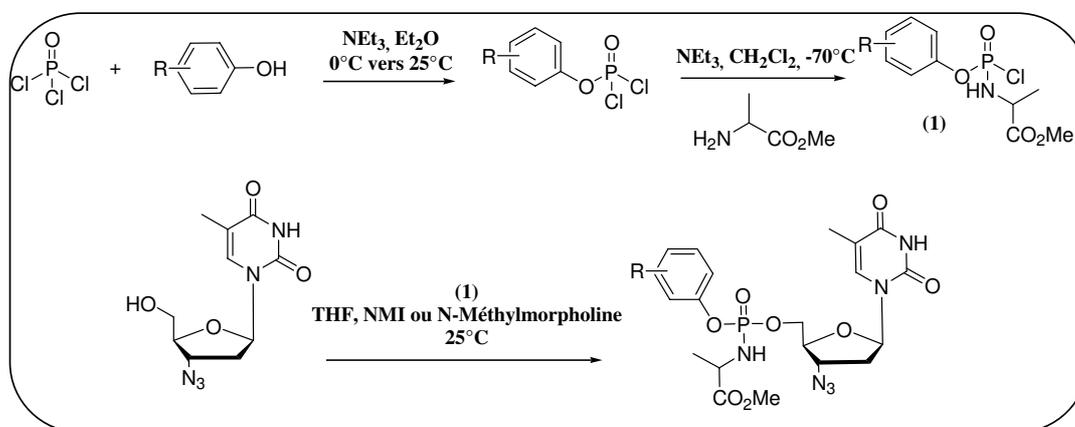


Schéma 6: Schéma de synthèse de l'analogue aryloxyphosphoramidate de l'AZT.

La méthode de McGuigan présente néanmoins un certain nombre de difficultés. Elle requiert tout d'abord la formation du dérivé phénylméthoxy-(L)-alaninyl phosphochloridate, avec l'ensemble des réactions secondaires que cela implique. Par exemple la condensation de l'amine sur le dérivé dichlorophosphate peut conduire au produit de double substitution d'autant plus que cette dernière est utilisée en excès. Les étapes de purification peuvent dès lors s'avérer longues et difficiles.

Il est également à noter que la dernière étape visant à obtenir le dérivé aryloxyphosphoramidate a lieu à température ambiante (25°C). Dans le cas d'analogues de la thymidine (AZT, d4T) ou de la cytosine (3TC) cela ne pose pas de problèmes majeurs, mais il a été observé pour l'acyclovir qu'une protection de la fonction amine exocyclique de la guanine est nécessaire [262]. Le groupement protecteur utilisé à cet effet, le *N,N'*-diméthylformamide a été par la suite déprotégé sous reflux de propanol (45% de rendement).

Cette voie de synthèse nous est apparue dès lors assez contraignante par le nombre d'étapes nécessaires (synthèse de l'analogue phosphorochloridate, protection de la base, phosphorylation, déprotection finale de la base). En outre, les conditions requises pour la deprotection du groupe protecteur de la base devront être compatibles avec la présence de l'ester méthylique. Nous avons donc cherché une voie d'accès mieux adaptée à nos molécules.

4.2.2. Synthèse optimisée, cas du NB1011

La méthode de McGuigan a été améliorée par Lehsten et *al.* dans le cadre de la synthèse à grande échelle de l'analogue phosphoramidate du NB1011 [263] (schéma 7). Le NB1011 ou (*E*)-5-(2-bromovinyl)-2'-désoxy-5'-phényl-(*L*-méthoxyalaninyl)-phosphate-uridine est actuellement développé comme anticancéreux en phase clinique I/II.

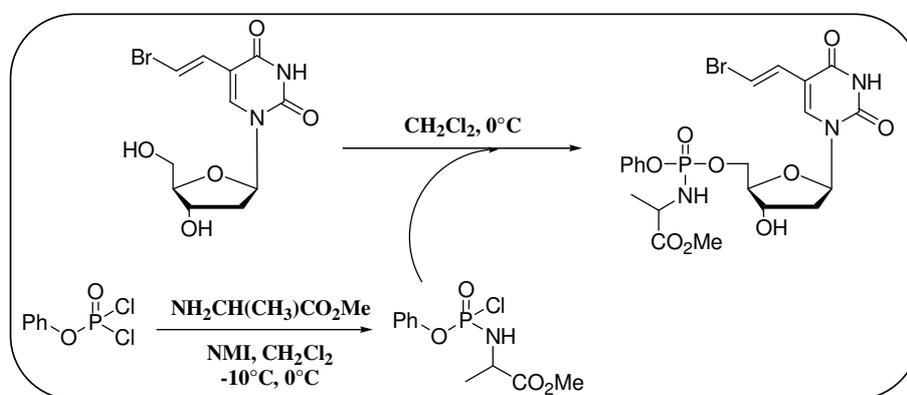


Schéma 7: Stratégie employée à la synthèse du phosphoramidate du NB1011.

Selon cette voie de synthèse, le phénylphosphochloridate commercial, est mis à réagir dans un premier temps avec l'ester méthylique de la (*L*)-alanine entre -10 et 0°C en présence de NMI dans le CH₂Cl₂ pendant une heure avant de rajouter le nucléoside. Les stœchiométries optimales de chaque réactif utilisé lors de la première étape ont été établies pour assurer la

formation exclusive du produit monosubstitué. Il est à noter que le choix de la NMI est important. Son rôle dans la réaction est double; elle intervient comme base pour neutraliser l'excès d'HCl libéré, mais également pour former un intermédiaire plus réactif sous la forme d'un imidazolium.

4.2.3. Méthode d'Uchiyama

La méthode d'Uchiyama [264] a été développée pour la synthèse du phosphoramidate de l'Abacavir, notamment en raison de sa faible solubilité dans les solvants organiques. Selon cette méthode, une phosphorylation sélective de l'hydroxyle en 5' a lieu sans avoir à protéger l'amine exocyclique de la base (schéma 8). L'utilisation d'une base forte telle que du *t*BuMgBr favorise préférentiellement la formation de l'espèce *O*-activée assurant une *O*-phosphorylation sélective.

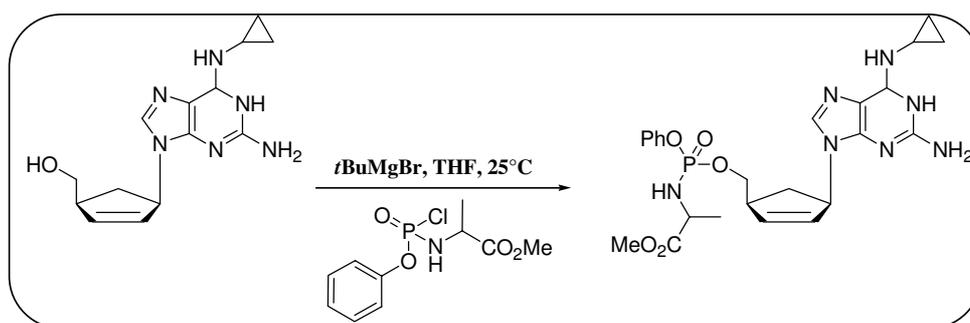


Schéma 8: Synthèse de l'analogue phosphoramidate de l'Abacavir en suivant la méthode d'Uchiyama.

Cependant cette voie de synthèse demande des temps de réaction très longs (> 70 heures) et n'a été appliquée que sur un exemple.

Après cette présentation des différentes voies décrites pour la préparation des dérivés aryloxyphosphoramidates de type McGuigan, il était important de noter que l'ensemble des exemples de la littérature dérive de la T ou de la C (exception faite de l'Abacavir). Qu'en est-il des dérivés de la A ou de la dA ? La même réactivité sera-t-elle observée ? Faudra-t-il protéger la base ? Faudra-t-il protéger l'hydroxyle en 3' du désoxyribose ? Autant de questions auxquelles nous avons voulu répondre en préparant les analogues modifiés de la dA en position 8.

4.3. Application aux dérivés de la dA modifiés en position 8

La méthode de synthèse décrite par Lehsten a été appliquée aux nucléosides modifiés en position 8. Nous avons également choisi d'introduire comme acide aminé la (L)-alanine et la (L)-phénylalanine afin d'étudier l'influence de la nature de l'acide aminé sur l'activité antivirale de nos composés.

4.3.1 Etude de la séquence réactionnelle par RMN du Phosphore ^{31}P

Une étude préliminaire par RMN du Phosphore ^{31}P a été entreprise sur la dA pour mettre au point les conditions de synthèse mais également pour suivre les différentes espèces qui se forment (schéma 9). Ainsi la première étape de synthèse au cours de laquelle l'acide aminé réagit avec le phényl-dichlorophosphate, a été suivie par RMN du phosphore (^{31}P , CD_2Cl_2). La disparition totale du pic caractéristique du réactif phényl-dichlorophosphate (4,3 ppm) a pu être visualisée au bout d'une heure, au profit de plusieurs signaux (9,3 ; -7,5 ; et -16 ppm). Le signal à 9,3ppm apparaît sous la forme d'un singulet en ^{31}P découplé du proton, et sous la forme d'un triplet en ^{31}P couplé (figure 18A). D'autres espèces sont également observées dans le milieu réactionnel, mais une extraction en fin de synthèse suffira à les éliminer. L'espèce activée ainsi formée est alors ajoutée à la dA à 0°C et la réaction peut alors évoluer pendant 4h. Après extraction, le brut de réaction est analysé par RMN du phosphore (^{31}P , CD_2Cl_2). Deux singulets, caractéristiques de la présence des deux diastéréoisomères, sont observés vers 4,3 ppm en ^{31}P découplé du proton (figure 18B) et deux triplets sont observés en ^{31}P couplé du proton. Après purification, le dérivé de la dA a été caractérisé par RMN du proton. L'analyse des spectres RMN du ^{31}P et ^1H après purification, indique que l'amine exocyclique n'a pas été modifiée.

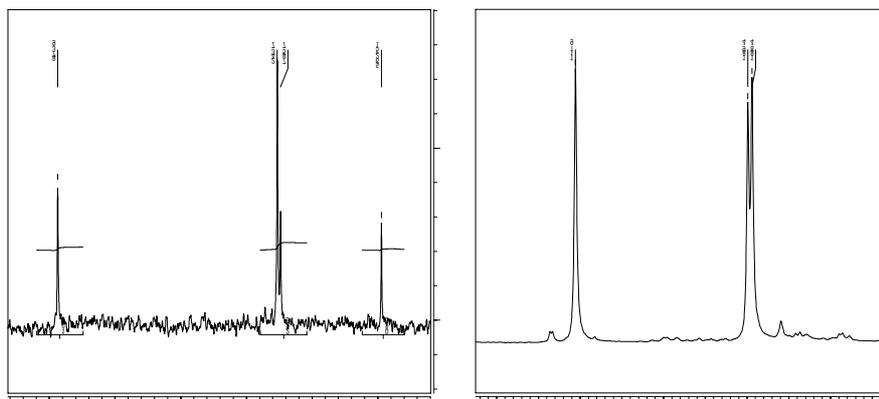


Figure 18 : A) Spectre RMN ^{31}P découplé du proton après réaction du réactif de McGuigan avec la (L)-Ala-CO₂Me dans CD₂Cl₂ ;B) Spectre RMN ^{31}P découplé du proton après réaction avec la dA puis extraction.

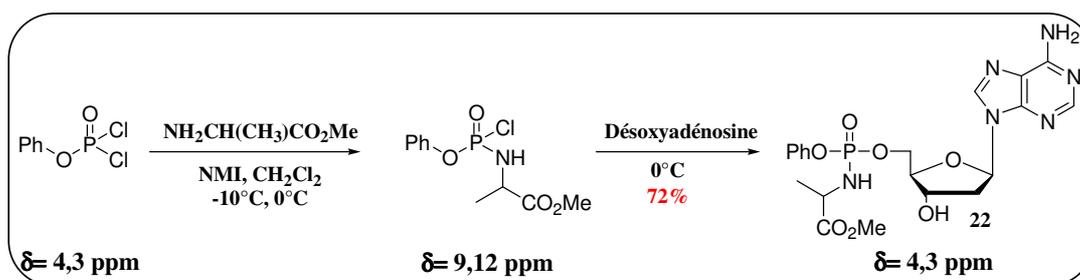


Schéma 9: Déplacement chimiques en RMN ^{31}P des différentes espèces formées au cours de réaction.

4.3.2. Synthèse des analogues phosphoramidate de la dA

La méthode ayant été validée sur la dA, nous avons cherché à transposer ces conditions de synthèse à la préparation des analogues modifiés de la dA. Les résultats obtenus sont donnés dans le schéma 10.

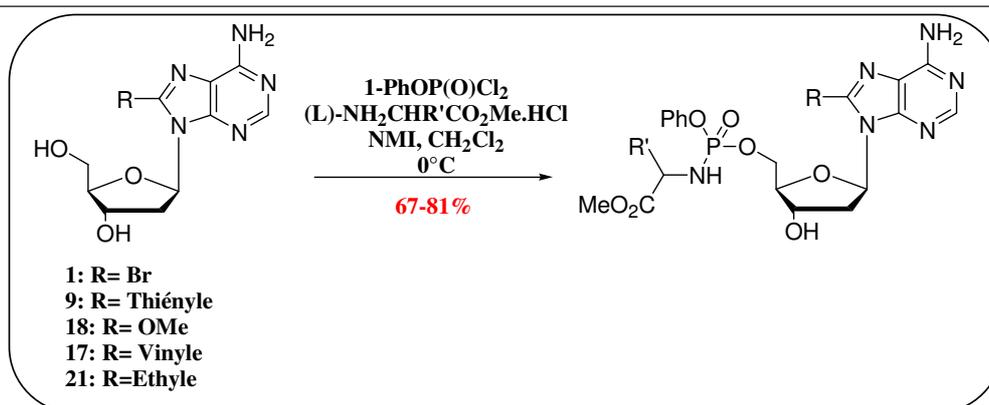


Schéma 10: Schéma de synthèse pour la préparation des analogues phosphoramidates des dérivés de la dA.

<i>Composé</i>	<i>R</i>	<i>R'</i>	<i>Rendement</i>
23	Br	CH ₃	81
27	Br	CH ₂ Ph	79
24	OMe	CH ₃	69
28	OMe	CH ₂ Ph	67
25	Thiényle	CH ₃	71
29	Thiényle	CH ₂ Ph	75
26	Ethyle	CH ₃	70

Tableau 1: Récapitulatif des rendements de synthèse obtenus.

Nous avons donc entrepris de préparer dans un premier temps les dérivés phosphoramidates modifiés en position 8 de la base par un groupement Br, OMe, éthyle et thiényle, sans aucune protection des fonctions amine en N6 ou de l'alcool en 3'. La réaction s'est déroulée dans de bonnes conditions, pour les modifications Br, OMe, thiényle et éthyle avec des rendements de réaction satisfaisants après purification. Quel que soit le dérivé phényloxyphosphoramidate synthétisé, aucune protection de l'amine exocyclique n'a été nécessaire puisque l'analyse par RMN ¹H a permis de visualiser la présence des protons caractéristiques de l'amine en N6.

L'ensemble des analogues de cette série (Br, OMe, thiényle, éthyle) a été synthétisé soit avec la (L)-alanine soit la (L)-Phénylalanine (Br, OMe, thiényle). Les composés ainsi obtenus ont été caractérisés par RMN ¹H et un pic caractéristique en RMN ³¹P a été observé aux environs de 4ppm. Les composés ont également été caractérisés par RMN ¹³C et SM (ESI⁺).

En cherchant à adapter cette méthode de synthèse à la préparation de l'analogue phosphoramidate de la 8vdA, nous avons été très vite confronté à la très faible solubilité du

nucléoside nu. Nous avons donc cherché à contourner ce problème en protégeant l'hydroxyle en 3' du désoxyribose par un groupement acétate. Son élimination pourra d'ailleurs avoir lieu en fin de réaction par une étape de transtérfication dans des conditions douces (un mélange $K_2CO_3/MeOH$) qui ne devraient pas affecter le groupement ester du phosphoramidate. Malheureusement, en appliquant ces conditions, nous observons la formation d'une multitude de produits et nous n'avons pas pu isoler le produit attendu.

V. Evaluation de l'activité antivirale des nucléosides nus et de leurs homologues phosphoramidates

5.1. Principe du test biologique

Les propriétés antivirales de l'ensemble des composés décrits au cours de ce chapitre ont été évaluées sur des lignées cellulaires infectées par le virus du VIH-1 en collaboration avec l'équipe du Dr A. M. Aubertin (Institut de virologie de la faculté de médecine, unité INSERM 544, Strasbourg).

Une substance antivirale doit, par définition, inhiber la réplication du virus et posséder la plus faible toxicité possible. Trois paramètres sont utilisés pour évaluer l'activité antivirale et la toxicité d'une drogue :

- 1)- $L'IC_{50}$ (concentration inhibitrice) : c'est la concentration pour laquelle la quantité de virus produite est diminuée de moitié. Cette valeur doit être la plus faible possible.
- 2)- $La CC_{50}$ (concentration cytotoxique) : c'est la concentration qui réduit de 50% la viabilité des cellules non infectées. Sa valeur doit demeurer la plus élevée possible.
- 3)- $Le SI$ (index de sélectivité) : c'est le rapport CC_{50}/IC_{50} . Cette valeur, sans unité, représente l'indice thérapeutique qui doit être le plus élevé possible et qui rend compte *in vitro*, de l'efficacité d'une drogue. Cet index souvent utilisé pour comparer l'activité des drogues entre elles, doit cependant être manipulé avec précaution, car il dépend des conditions expérimentales dans lesquelles il est mesuré (type de cellules, souche de virus...).

Deux lignées cellulaires ont été évaluées. La première lignée, CEM-SS, permet de déterminer l'activité de la RT en présence de l'inhibiteur. En effet la multiplication du VIH-1 (Souche LAI) dans les cellules CEM-SS est évaluée après 5 jours de culture, par dosage de l'activité de la RT qui traduit la présence de particules virales dans le surnageant de culture. Les composés à tester seront rajoutés après addition du virus dans le milieu de culture.

La viabilité des cellules est mesurée par une réaction colorimétrique, basée sur la capacité des cellules vivantes à réduire le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-

diphényl-tétrazolium en formazan sous l'effet des déshydrogénases mitochondriales (schéma 11).

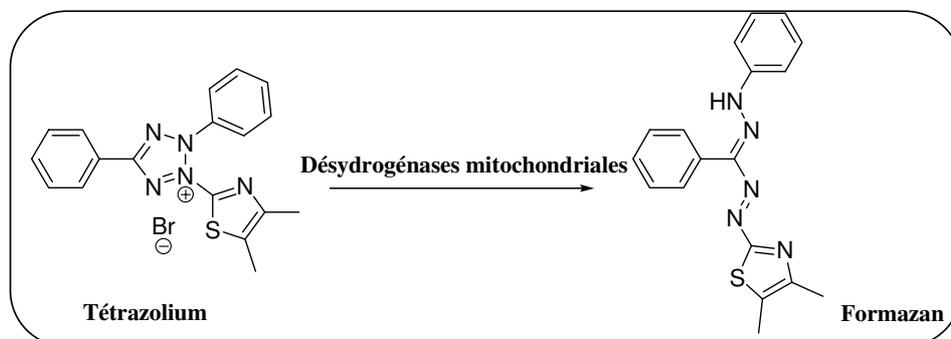


Schéma 11: Formation du Formazan sous l'effet des déshydrogénases mitochondriales.

La quantité de formazan produite sera directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. L'effet toxique des composés est également évalué selon le même principe sur des cellules CEM-SS non infectées et mesuré après 5 jours d'incubation.

Les nucléosides modifiés sont mis en solution dans le DMSO, avec une concentration en solvant toujours inférieure ou égale à 1% dans le milieu de culture. La production de virus dans les cultures de cellules incubées en présence des différentes concentrations de composé est évaluée, par rapport à des cultures cellulaires additionnées de DMSO seul.

Le surnageant du milieu de culture qui contient les particules virales est récupéré, et la quantité de RT est dosée après perméabilisation des virions par un détergent. Une matrice et une amorce (poly A/oligo-dT) et du dTTP tritié sont ajoutés au milieu et utilisés par la RT pour l'élongation de l'oligo-dT. Au bout d'un certain temps, la synthèse d'ADN est stoppée et l'ADN néosynthétisé radioactif, est précipité en présence de TCA. La quantité d'ADN produite sera directement proportionnelle à la quantité de RT.

La deuxième lignée cellulaire sur laquelle les nucléosides modifiés ont été testés est la lignée MT4. L'effet cytopathogène induit par le virus permet de suivre la multiplication du VIH-1 (souche HTLV-IIIIB) dans les cellules MT4. Les cellules sont infectées avec une dose de VIH-1 produisant après 5 jours de culture, une diminution de 90% du nombre de cellules vivantes. Les nucléosides modifiés sont ajoutés à différentes concentrations après adsorption du virus dans le milieu de culture. La viabilité des cellules est mesurée par réaction colorimétrique.

5.2. Résultats obtenus

Les analogues de nucléosides **1**, **9**, **17**, **18** et **21** et leur analogues phosphoramidates **23**, **24**, **25**, **27**, **28**, **29** ont été testés pour leur capacité à inhiber la réplication virale du VIH-1 LAI dans des cellules CEM-SS et du VIH-1 IIIB dans des cellules MT4. Leur cytotoxicité a également été évaluée.

Les résultats obtenus sur cellules CEM-SS sont répertoriés dans le tableau 2 qui suit.

	<i>IC₅₀ (M)</i>	<i>CC₅₀ (M)</i>	<i>SI</i>
<i>8-bromo-dA (1)</i>	> 1.10 ⁻⁴	> 1.10 ⁻⁴	
<i>8-thiényl-dA (9)</i>	> 1.10 ⁻⁴	> 1.10 ⁻⁴	
<i>8-vinyl-dA (17)</i>	> 1.10 ⁻⁴	> 1.10 ⁻⁴	
<i>8-méthoxy-dA (18)</i>	> 1.10 ⁻⁴	> 1.10 ⁻⁴	
<i>8-éthyl-dA (21)</i>	> 1.10 ⁻⁴	> 1.10 ⁻⁴	
<i>8-Br-Ala-dA (23)</i>	2,7.10 ⁻⁵	7,3.10 ⁻⁵	2,7
<i>8-Br-Phe-dA (27)</i>	> 1,8.10 ⁻⁵	9,5.10 ⁻⁵	5,3
<i>8-OMe-Ala-dA (24)</i>	3,3.10 ⁻⁵	> 1.10 ⁻⁴	3
<i>8-OMe-Phe-dA (28)</i>	> 1.10 ⁻⁵	> 1.10 ⁻⁵	-
<i>8-Thiényl-Ala-dA (25)</i>	2,5.10 ⁻⁵	3,7.10 ⁻⁵	1,5
<i>8-Thiényl-Phe-dA (29)</i>	> 1.10 ⁻⁵	> 1.10 ⁻⁵	-
<i>AZT</i>	2,8. 10 ⁻⁹		

Tableau 2: Valeurs d'IC₅₀, de CC₅₀ et de SI obtenus pour les nucléosides nus et les analogues phosphoramidates sur cellules CEM-SS.

Les résultats obtenus sur cellules MT4 sont répertoriés dans le tableau 3 qui suit.

	<i>IC₅₀ (M)</i>	<i>CC₅₀ (M)</i>
<i>8-bromo-dA (1)</i>	> CC 50	4,7.10 ⁻⁵
<i>8-thiényl-dA (9)</i>	> CC 50	> 1.10 ⁻⁴
<i>8-vinyl-dA (17)</i>	> CC 50	7,1.10 ⁻⁵
<i>8-méthoxy-dA (18)</i>	> CC 50	9.10 ⁻⁵
<i>8-éthyl-dA (21)</i>	> CC 50	> 1.10 ⁻⁴
<i>8-Br-Ala-dA (23)</i>	> CC 50	2,5.10 ⁻⁵
<i>8-Br-Phe-dA (27)</i>	> CC 50	3,7.10 ⁻⁵
<i>8-OMe-Ala-dA (24)</i>	> CC 50	4,8.10 ⁻⁵
<i>8-OMe-Phe-dA (28)</i>	> CC 50	7,8.10 ⁻⁶
<i>8-Thiényl-Ala-dA (25)</i>	> CC 50	2,4.10 ⁻⁵
<i>8-Thiényl-Phe-dA (29)</i>	> CC 50	8,3.10 ⁻⁶
<i>AZT</i>	1,1. 10 ⁻⁸	

Tableau 3: Valeurs d'IC₅₀ et de CC₅₀ obtenues pour les nucléosides nus et les analogues phosphoramidates sur cellules MT4.

Les valeurs des IC₅₀ et de CC₅₀ obtenus pour les nucléosides nus n'ont pu être obtenues avec précision et sont supérieures à 10⁻⁴M, alors que celles correspondantes aux phényloxyphosphoramidates varient aux alentours de 10⁻⁵M. Quant au SI, les valeurs n'ont pas pu être calculées pour l'ensemble des phosphoramidates, mais elles restent assez faibles. L'ensemble de ces données reste cependant nettement en retrait à celles obtenues pour la molécule de référence, l'AZT.

5.3. Discussion

Les résultats obtenus que ce soit pour les nucléosides nus ou les analogues phosphoramidates indiquent que ces composés sont peu ou pas actifs en culture cellulaire. En effet aucune modification de l'activité de la RT n'a été observée que ce soit en présence ou en absence des nucléosides modifiés, mais également pour de faibles concentrations de nucléosides. Ils ont également montré une toxicité importante (de l'ordre de 70%) vis-à-vis des cellules non infectées. Une légère amélioration, d'un facteur 10, est observée pour les dérivés phosphoramidates, mais elle s'accompagne d'une augmentation de la toxicité.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence d'inhibition de la réplication virale par ces analogues nucléosidiques. La première question qui nous vient à l'esprit est de savoir si la totalité du produit à tester a réellement atteint sa cible, ce qui suppose que toutes les étapes de phosphorylation aient bien eu lieu. Les analogues phosphoramidates nous permettent, par hypothèse, de s'affranchir de la première étape de phosphorylation, qui dans certains cas peut être l'étape limitante. Une légère amélioration a d'ailleurs été observée, mais encore insuffisante. D'autant plus qu'on n'évite pas les problèmes de toxicité. Encore une fois cela nous ramène à nous demander si toutes les étapes d'activation en monophosphate ont bien eu lieu et si l'étape permettant d'accéder au dérivé diphosphate n'était pas dans ce cas là, l'étape limitante. L'ensemble des nucléosides nus n'ayant montré aucune activité antivirale on peut se demander s'ils sont substrats de la RT et s'ils n'agiraient pas sur d'autres polymérase cellulaires en raison de leurs grandes homologies structurales.

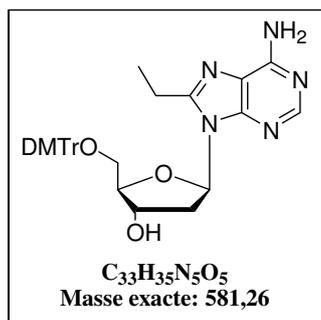
VI. Conclusion

Des études modèles menées avec des « amorces » et des « matrices » modifiées par les analogues 8vdA et 8edA, nous ont permis de mettre en évidence que ces analogues étaient capables d'inhiber la synthèse des deux brins d'ADN selon un mécanisme d'inhibition différent des terminateurs d'élongation de chaîne. Les résultats obtenus sur la synthèse du brin d'ADN (-) sont en accord avec les hypothèses formulées au départ. Les résultats obtenus sur la synthèse d'ADN dépendante lorsque les modifications sont présentes dans la matrice n'avaient pas été prévus mais peuvent être expliqués à partir des informations structurales de l'enzyme cristallisée. Suite à ces premiers résultats encourageants, nous avons été amenés à préparer la 8vdA et la 8edA sous la forme de nucléoside « nu », mais également sous la forme de prodrogue de type McGuigan. Nous avons aussi élargi notre démarche à la préparation d'autres analogues de la dA. Nous souhaitons ainsi mener des études de relation structure-activité sur une gamme plus large de molécules. Ces composés ont été testés *ex vivo* sur des cultures cellulaires infectées par le virus du VIH-1. Toutefois la 8vdA et la 8edA qui se sont montrés actifs *in vitro* dans les études modèles se sont montrés dépourvus d'activité lors des tests en culture cellulaire. Les mêmes observations s'appliquent aux autres analogues nucléosidiques nus. Pour les cas les plus favorables, une activité inhibitrice modeste de la réplication virale a pu être mesurée avec certaines prodrogues de type McGuigan ($IC_{50} \approx 1.10^{-5} M$) toutefois accompagnée d'une cytotoxicité du même ordre de grandeur. Il nous a dès lors paru important de synthétiser ces analogues modifiés sous leur forme triphosphorylée afin de pouvoir les tester sur la RT mais aussi sur d'autres polymérases cellulaires. Dans ces études, nous souhaitons vérifier si oui ou non ces analogues sont capables d'inhiber la synthèse d'ADN proviral selon le mécanisme mis en évidence dans les études modèles. Nous chercherons aussi à savoir si ces analogues sont capables d'inhiber la production d'ADN catalysée par les polymérases cellulaires. En effet, une meilleure connaissance de l'efficacité d'incorporation et du pouvoir d'inhibition de ces analogues devra nous guider dans la conception de molécules plus spécifiques de la RT.

Les indications générales pour la partie « matériels et méthodes » ont été données dans la partie expérimentale du chapitre II.

Synthèse du synthon phosphoramidite de la 8-éthyl-2'-désoxyadénosine

8-Ethyl-5'-O-DMTr-2'-désoxyadénosine (13)



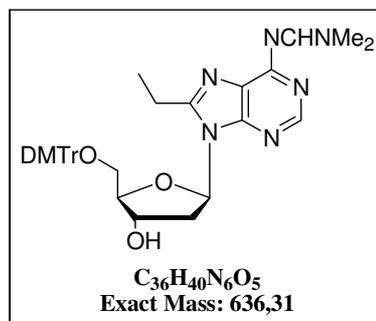
La 8-Vinyl-5'-O-DMTr-2'-désoxyadénosine (**3**; 150mg; 0,258mmol) est dissoute dans un mélange d'AcOEt et de CH_2Cl_2 dans un schlenk à température ambiante. Le catalyseur Pd/C est alors rajouté sous atmosphère d'Argon. Le mélange réactionnel est dégazé trois fois par un vide-hydrogène successif avant de laisser la réaction évoluée sous pression d'hydrogène pendant 4 heures. L'avancement de la réaction est contrôlé par chromatographie sur silice en phase inverse dans un mélange CH_3CN/H_2O (80:20). La réaction est arrêtée au bout de 4h, en dégazant à nouveau par un vide-argon trois fois successif. Le mélange réactionnel est dans de AcOEt et la phase organique est lavée à l'eau (10mL), une solution aqueuse saturée d' $NaHCO_3$ et de la saumure, avant d'être séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Le produit (**13**) est obtenu avec un rendement de réaction de 94% (141mg; 0,242mmol) sans étapes de purification supplémentaires.

RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz): 7,97 (1H, s, H2); 7,28-7,02 (9H, m, DMTr); 6,66-6,62 (4H, m, DMTr); 6,2 (1H, dd, $J_1=J_2= 6,82Hz$, H1'); 5,73 (2H, s, NH_2); 4,83-4,78 (1H, m, H3'); 4,05-3,9 (1H, m, H4'); 3,65 (6H, s, CH_3O); 3,49-3,40 (1H, m, H2'); 3,34-3,24 (2H, m, H5'); 2,86-2,79 (2H, q, $J=7,5Hz$, CH_2); 2,24-2,15 (1H, m, H2'); 1,30- 1,25 (3H, t, $J=7,5Hz$, CH_3 Ethyle).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75,4MHz): 158,3 (C_{IV} DMTr); 154,6 (C4); 154,3 (C2); 151,7 (C8); 150,7 (C6); 144,7 (C_{IV} DMTr); 135,9 (C_{IV} DMTr); 129- 126,7 (CH DMTr + C5); 112,9 (CH DMTr); 85,7 (C3'); 84 (C1'); 72,6 (C4'); 63,7 (C5'); 55,1 (CH_3O); 37,1 (C2'); 21,7 (CH_2); 11,8 (CH_3).

ESI SM positif (m/z): 581,7 [M].

8-Ethyl-5'-DMTr-N6-diméthylformamidine-2'-désoxyadénosine (14)



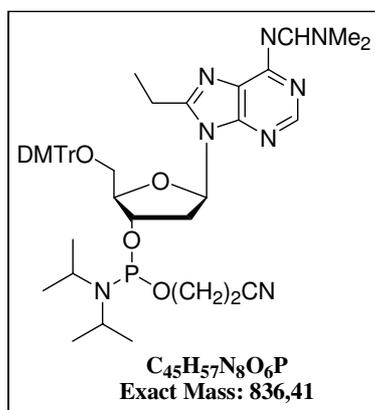
Le composé (**13** ; 100mg; 0,172mmol) est dissous dans la DMF (570 μ L) et la N,N'-diméthylformamide diméthylacétale (114,2 μ L; 0,86mmol) est ajouté sous atmosphère d'argon, agitation constante et température ambiante. L'avancement de la réaction est contrôlé par CCM dans un mélange CH₂Cl₂/ MeOH (95:5). La réaction est arrêtée au bout de 4 heures en rajoutant de l'AcOEt. La phase organique est alors lavée avec de l'H₂O et de la saumure, avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le produit (**14**) est obtenu avec un rendement quantitatif (110mg; 0,172mmol), sans étape de purification supplémentaire.

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz): 8,84 (1H, s, NCH); 8,27 (1H, s, H2); 7,40- 7,19 (10H, m, DMTr); 6,78-6,74 (4H, m, DMTr); 6,3 (1H, dd, J₁=J₂= 6,87Hz, H1'); 4,92-4,90 (1H, m, H3'); 4,07-4,03 (1H, m, H4'); 3,7 (6H, s, CH₃O); 3,58-3,48 (1H, m, H2'); 3,43-3,41 (2H, m, H5'); 3,24 (3H, s, CH₃N); 3,17 (3H, s, CH₃N); 2,98 (2H, q, J=7,5Hz, CH₂); 2,34-2,26 (1H, m, H2'); 1,63 (3H, t, J=7,5Hz, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,4MHz): 158,4 (NCH); 157,7 (C4); 151,3 (C2); 144,7 (C8); 135,9 (C6); 130-126,7 (CH DMTr + C5); 113 (CH DMTr); 85,5 (C1'); 83,8 (C3'); 73,1 (C4'); 63,8 (C5'); 55,2 (OCH₃); 41,2 (NCH₃); 37,2 (C2'); 35,1 (NCH₃); 21,8 (CH₂); 12,1 (CH₃).

ESI SM positif (m/z): 636,9 [M] et 658,9 [M+Na⁺].

8-Ethyl-5'-O-DMTr-N6-diméthylformamidine-3'-phosphoramidite-2'-dA (15)



Le composé (**14**) (312,9mg ; 0,491mmol) est mis en solution dans du CH₂Cl₂ (1,6mL) auquel est rajouté la DIPEA (342,1μL; 1,964mmol). Le chloro-cyanoethyl-N,N'-diisopropyl-phosphoramidite (164,2μL; 0,736mmol) est rajouté au milieu réactionnel, sous atmosphère d'argon et sous agitation constante. L'avancement de la réaction est suivi sur CCM dans un mélange cyclohexane/acétone /NEt₃ (50: 50: 1%). Au bout de 2h30, l'alcool de départ totalement consommé, la réaction est arrêtée en rajoutant du MeOH. Le mélange réactionnel est repris dans du CH₂Cl₂ et la phase organique est lavée avec H₂O (20 mL), une solution aqueuse d'NaHCO₃ (2 * 20mL), et de la saumure (20 mL), avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Une huile jaune est obtenue après évaporation; elle sera purifiée sur gel de silice conditionné avec un mélange cyclohexane/ acétone/ NEt₃ (50:50:1%). Le phosphoramidite obtenu est solubilisé dans du toluène à température ambiante et rajouté goutte à goutte à une solution d'Hexane (20 volumes) refroidit à -20°C. Le produit (**15**) est obtenu sous la forme d'un solide amorphe avec un rendement de 70%.

RMN ¹H (CD₂Cl₂, 200MHz): 8,91 (1H, s, NCH); 8,27 (1H, s, H2); 7,44-7,23 (11H, m, DMTr); 6,82-6,76 (4H, m, DMTr); 6,37 (1H, dd, J₁=4,3Hz et J₂= 6,7Hz, H1'); 5,06-4,99 (1H, m, H3'); 4,28-4,26 (1H, m, H4'); 3,80 (6H, s, CH₃O); 3,77-3,59 (5H, m, CH₂/O, H2' et H5'); 3,44-3,36 (2H, m, CH₂/CN) 3,25 (3H, s, CH₃N); 3,21 (3H, s, CH₃N); 3,05 (2H, q, J=7,3Hz, CH₂); 2,70-2,65 (1H, t, CH); 2,58-2,52 (1H, t, CH); 2,49-2,37 (1H, m, H2'); 1,47 (3H, t, J=7,5Hz, CH₃); 1,32-1,16 (12H, t, CH₃).

RMN ³¹P (CD₂Cl₂, 200MHz): 149,1 et 148,9 (présence de deux diastéréoisomères).

ESI SM positif (m/z): 836,9 [M]; 859,8 [M+Na⁺]; 1672,8 [2M].

Synthèse des oligonucléotides marqués pas la 8edA

Les oligonucléotides modifiés par la 8vdA et la 8edA ont été synthétisés en collaboration avec l'équipe du Dr. R. Marquet (UPR 9002 du CNRS) selon le protocole décrit dans la publication jointe au chapitre II [221].

La synthèse des 18, 19 et 31-mers a été effectuée sur un synthétiseur Applied Biosystem 392 en utilisant la chimie des phosphoramidites à l'échelle de la μmol . Chaque séquence est synthétisée 2 fois, soit 6 séquences au total. La séquence 18-mers est effectuée sur un support universel [265] alors que la séquence de 19-mers est effectuée sur un support CPG-dC. Les synthons phosphoramidites des nucléosides naturels ont été achetés auprès d'Eurogentec Glen Research. 20 équivalents de chaque phosphoramidite ont été utilisés. Une solution à 0,1M de phosphoramidite dans CH_3CN (DNA quality (Fluka)) est préparée dans les fioles compatibles avec le synthétiseur et gardée sous atmosphère inerte. Les conditions opératoires suivies lors de la synthèse automatisée sur support solide sont répertoriées dans le tableau 1.

Etape 1. Déprotection du groupement DMTr : DCA 3% / CH_2Cl_2
Etape 2. Activation : 4,5-dicyanoimidazole
Etape 3. Coiffage : Anhydride phénoxyacétique
Etape 4. Oxydation : Solution 1M de butanone peroxyde dans CH_2Cl_2 .

Tableau 1 : Conditions réactionnelles utilisées lors de la synthèse en phase solide.

L'oligonucléotide est clivé du support solide à l'aide d'une solution 2M d'ammoniac dans du MeOH anhydre pendant 30 min. La solution est filtrée avec un volume identique d' H_2O et évaporée au speed vacuum. A nouveau un volume d'ammoniac est ajouté et la réaction peut évoluer jusqu'à deprotection totale. La synthèse du 31-mers a suivie le même protocole que le 19-mers.

Avant analyse par SM, les échantillons ont été conditionnés comme décrit précédemment [221].

Les séquences synthétisées ont été caractérisées par ESI en mode négatif ou MALDI-Tof en mode négatif linéaire.

ESI SM négatif : 19-mers (8vdA) calculée : 5783 [M]; trouvé 5783 [M-H].

MALDI-Tof SM négatif: 18-mers (8edA) calculée: 5494 [M]; trouvée: 5492 [M-H]. 19-mers (8edA) calculée: 5785 [M]; trouvée: 5778 [M-H]; 31-mers (8edA) calculée: 9565 [M]; 9636 [M-H] et 4821 [(M-2H)/2].

**Elongation des oligonucléotides modifiés par la 8edA en présence des 4 dNTP naturels
(synthèse de l'ODN strong stop)**

Les gels d'élongation à effet retard ont été effectués sur gel d'acrylamide à 12%, en présence de 8M d'urée et de TBE (1X) et révélés par autoradiographie et ImagingPlate sur un BioImager.

6 réactions ont été effectuées :

- 1) 18-mers (8edA) en présence de l'ARN Mal (1-311).
- 2) 18-mers en présence de l'ARN Mal (1-311).
- 3) 19-mers (8edA) en présence de l'ARN Mal (1-311).
- 4) 19-mers en présence de l'ARN Mal (1-311).
- 5) 18-mers en présence du 31-mers (8edA).
- 6) 19-mers en présence du 31-mers (8edA).

Protocole général appliqué à l'ensemble des réactions

A) Formation du complexe Amorce/Matrice (30nM, 50μL)

L'amorce sera marquée de façon radioactive à son extrémité 5' à l'aide de γ -AT³²P. Pour cela l'oligomère est mis en solution dans un tampon kinase en présence de la kinase T4, de γ -AT³²P (dans de l'eau MilliQ) à 30°C pendant une heure. Dans le cas de l'amorce 18-mers (8edA) 1,03μl sont prélevés (solution à 0,39pmol.μL⁻¹) et mis en présence de l'ARN Mal (1-311nt) (solution de 1μg.μL⁻¹ ; 0,46μL), d'une solution d'NaCl 1M (0,5μL) et d'H₂O (1,91μL). L'ensemble est chauffé pendant 2min à 90°C, remis 2min dans la glace, chauffé 20min à 50°C et à nouveau refroidit pendant 30min dans la glace. A la fin de ce traitement, 5μl de tampon HIV 10X ont été ajoutés, ainsi que 40μL d'H₂O.

B) Les désoxynucléotides (dNTP) naturels (150μM, 150μL)

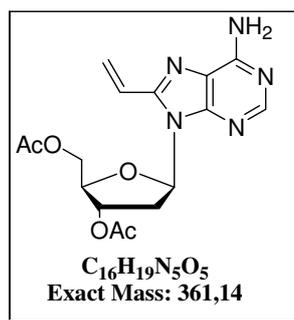
Une solution des 4 dNTP naturels est préparée en prélevant 2,25μL de dATP (10mM), 2,25μL de dCTP (10mM), 2,25μL de dTTP (10mM) et 2,25μL de dGTP (10mM). Du tampon HIV 10X (15μL) et de l'H₂O (126μL) sont également ajoutés.

C) Cinétique

Une solution du complexe amorce/matrice (33,3 μ L) et de la RT (3X) est préparée et incubée à 37°C. De cette solution sont prélevés 6,6 μ L que l'on verse dans 13,4 μ L dans du bleu de formamide (BF)/ EDTA pour arrêter la polymérisation. Ce premier mélange constituera notre référence. Après 4min, la solution de dNTP (3X ; 33,3 μ L) est ajoutée au mélange précédent à 37°C. C'est le début de la rétrotranscription. Des prélèvements de 10 μ L du mélange réactionnel sont effectués à 15', 30', 1min, 3min, 6min, 10min, 20min et 30min et la réaction de polymérisation est stoppée en rajoutant le mélange BF/EDTA (10 μ L). Ces mélanges seront par la suite déposés sur un gel dénaturant de polyacrylamide (polyacrylamide 12%, bis-acrylamide 0,6%, urée 8M). Après migration, le gel est séché à 80°C sous vide et révélé par autoradiographie.

Synthèse des nucléosides modifiés en position 8

8-vinyl-3',5'-diacétyl-2' désoxyadénosine (16)



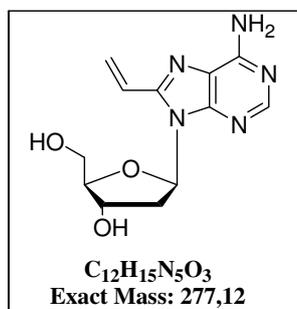
Le composé (6) (1g; 2,42mmol) déposé dans un schlenk est dissout dans la NMP (8mL) à température ambiante. Le catalyseur Pd(PPh₃)₄ (280mg; 0,242mmol) est alors rajouté sous atmosphère d'Argon. Le mélange réactionnel est dégazé trois fois en effectuant un vide argon successif, avant de rajouter le tétravinylétain (881 μ L; 4,84mmol) sous argon. Le mélange réactionnel est à nouveau dégazé une dernière fois avant de le garder sous pression d'argon. Il sera alors chauffé à 110°C pendant une heure. L'évolution de la réaction est contrôlée par CCM dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH (95:5) avant de l'arrêter en rajoutant de l'AcOEt (10mL). La phase organique est lavée avec H₂O (15mL) et de la saumure (15mL) avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut de réaction est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et un gradient en MeOH (de 0 à 5%) dans du CHCl₃ permet d'obtenir le produit avec un rendement de 71% (620mg; 1,72mmol).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz): 8,29 (1H, s, H₂); 6,94 (1H, dd, $J_1= 11,1\text{Hz}$ et $J_2= 17,2$, H_{vinyle}); 6,44 (2H, dd, $J_1= 1,2\text{Hz}$ et $J_2= 17,2\text{Hz}$, H_{Trans} ; dd, $J_1= 6,3\text{Hz}$ et $J_2= 8,1\text{Hz}$, H_{1'}); 5,89 (2H, s, NH₂); 5,71-5,67 (1H, dd, $J_1= 1,2\text{Hz}$ et $J_2= 11,1\text{Hz}$, H_{Cis}); 5,53-5,49 (1H, m, H_{3'}); 4,40 (2H, ABX, $J_{AX}= 4,3\text{Hz}$, $J_{BX}= 5,1\text{Hz}$, $J_{AB}= 11,8\text{Hz}$, H_{5'}); 4,28-4,24 (1H, m, H_{4'}); 3,58-3,49 (1H, m, H_{2'}); 2,43-2,35 (1H, m, H_{2'}); 2,12 (3H, s, CH₃); 2,06 (3H, s, CH₃).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz): 170,5 (CO); 170,3 (CO); 155,1 (C₄); 152,5 (C₂); 150,7 (C₈); 148,7 (C₆); 124,1 (CH vinyle); 123,7 (CH₂ vinyle); 119,4 (C₅); 83,8 (C_{3'}); 82,2 (C_{1'}); 74,5 (C_{4'}); 63,6 (C_{5'}); 35,6 (C_{2'}); 20,9 (CH₃); 20,7 (CH₃).

ESI SM positif (m/z): 362,3 [$\text{M}+\text{H}^+$] et 384,3 [$\text{M}+\text{Na}^+$].

8-vinyl-2'-désoxyadénosine (17)



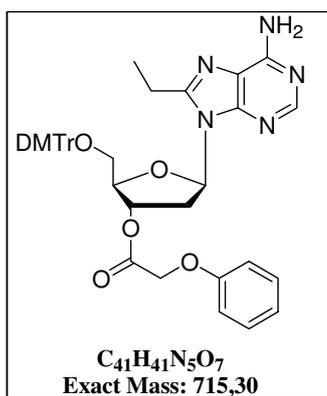
Le composé (**16**) (100mg; 0,36mmol) est dissous dans un mélange MeOH/Acétone (1,2mL) sous agitation et atmosphère d'argon, avant de rajouter une solution aqueuse d' NH_4OH à 28% (12mL). L'évolution de la réaction est contrôlée par CCM dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90:10). Au bout de 4 heures, le brut réactionnel est évaporé sous le vide de l'évaporateur rotatif. Le produit a été purifié sur plaque semi-préparative et élué avec un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90:10). La silice a été lavée avec de la pyridine et le filtrat évaporé pour fournir un rendement de 77% (77mg; 0,27mmol).

RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 200MHz): 8,25 (1H, s, H₂); 7,15 (1H, dd, $J_1= 11,1\text{Hz}$ et $J_2= 17,05\text{Hz}$, H_{vinyle}); 6,46 (1H, dd, $J_1= 6,18\text{Hz}$ et $J_2= 7,9\text{Hz}$, H_{1'}); 6,33 (1H, dd, $J_1= 1,9\text{Hz}$ et $J_2= 17,05\text{Hz}$, H_{Trans}); 5,68 (1H, dd, $J_1= 1,9\text{Hz}$ et $J_2= 11,12\text{Hz}$, H_{Cis}); 5,42-5,40 (1H, m, H_{3'}); 5,36 (2H, s, NH₂); 4,48 (1H, m, H_{4'}); 3,9-3,8 (2H, m, H_{5'}); 3,1-2,91 (1H, m, H_{2'}); 2,22-2,12 (1H, m, H_{2'}).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,3MHz): 157,8 (C4); 155,7 (C8); 152,0 (C2); 147,4 (C6); 124,3 (CH vinyle); 122,7 (CH₂ vinyle); 118,7 (C5); 87,8 (C1'); 83,6 (C3'); 70,8 (C4'); 61,8 (C5'); 22,4 (C2').

ESI SM (m/z): Le produit n'étant soluble que dans le DMSO, il ne nous a pas été possible de le caractériser par spectrométrie de masse.

8-éthyl-5'-DMTr-3'-phénoxyacétyl-2'-désoxyadénosine (19)



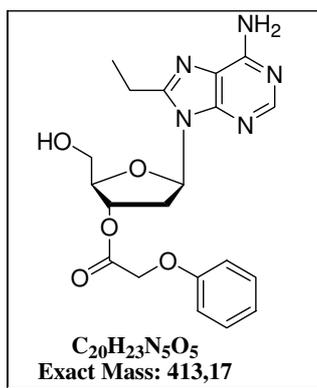
Le composé (**13**; 350mg; 0,61mmol) est dissous dans la pyridine (2mL) avant de rajouter la DMAP (37mg; 0,3mmol) et l'anhydride phénoxyacétique (258mg; 0,90mmol). L'ensemble est sous agitation et atmosphère d'argon jusqu'à disparition du réactif de départ (CCM dans un mélange Cyclohexane/acétone (50:50)). Au bout de 2 heures, le mélange réactionnel est transvasé dans une ampoule à décanter contenant une solution aqueuse saturée d'NaHCO₃ (15mL). La phase organique est alors lavée avec de l'H₂O (15mL) et de la saumure (15mL) avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut de réaction est purifié sur gel de silice conditionné avec du cyclohexane et élué avec un gradient d'acétone (de 0 à 80%) dans du cyclohexane. Le composé (**19**) est obtenu avec un rendement de 88% (384mg; 0,53mmol).

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz): 7,98 (1H, s, H2); 7,37-7,15 (9H, m, DMTr); 7,26-7,23 (2H, d, J= 8,30Hz, H aromatique); 6,99-6,94 (1H, t, H aromatique); 6,9-6,87 (2H, d, J=7,95Hz, H aromatique); 6,74-6,7 (4H, m, DMTr); 6,1 (1H, dd, J₁= 6,48Hz et J₂= 8Hz, H1'); 5,74-5,72 (3H, m, NH₂ et H3'); 4,6 (2H, s, CH₂); 4,21-4,19 (1H, m, H4'); 3,72 (6H, s, CH₃O); 3,74-3,32 (3H, m, H5' et H2'); 2,84 (2H, q, J= 7,45Hz, CH₂); 2,28-2,21 (1H, m, H2'); 1,31 (3H, t, J= 7,46Hz, CH₃).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,4MHz): 168,2 (CO); 158,4 (C_{IV} DMTr); 157,6 (C4); 154,5 (C8); 151,7 (C2); 150,9 (C6); 144,6 (C_{IV} DMTr); 135,8 (C_{IV} DMTr); 129,9- 26,6 (CH DMTr + CH PAC + C5); 121,8 (CH DMTr); 114,5 (CH aromatique); 112,9 (CH DMTr); 86,2 (C3'); 83,9 (C1'); 83,5 (C4'); 65,3 (CH_2); 63,3 (C5'); 55,1 (CH_3O); 34,4 (C2'); 21,7 (CH_2); 11,8 (CH_3).

ESI SM positif (m/z): 715,8 [M]; 737,8 [M+Na⁺]; 753,8 [M+K⁺].

8-éthyl-3'-phénoxyacétyl-2'-désoxyadénosine (20)



Le composé (**19**) (130mg; 0,182mmol) est dissous dans une solution de DCA à 3% dans du CH_2Cl_2 (4,5mL). La réaction instantanée est contrôlée par CCM dans un mélange cyclohexane/ acétone (50:50). Elle sera arrêtée en rajoutant une solution saturée d' NaHCO_3 jusqu'à neutralité. Le mélange réactionnel est repris dans CH_2Cl_2 (5mL) et la phase organique est lavée avec de l' H_2O (5mL) et de la saumure (5mL). Elle sera séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Le brut de réaction est purifié sur gel de silice conditionné avec du cyclohexane et le produit sera élué avec un gradient d'acétone (de 0 à 80%) dans du cyclohexane. Le composé (**20**) est obtenu avec un rendement de 88% (66,3mg; 0,160mmol).

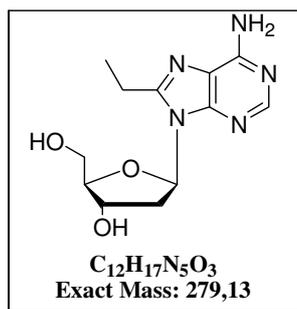
RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz): 8,23 (1H, s, H2); 7,34 (2H, d, J= 7,86Hz, H aromatique); 7,05-7,0 (1H, t, H aromatique); 6,93 (2H, d, J= 7,88Hz, H aromatique); 6,02 (1H, dd, J₁= 5,28Hz et J₂= 10Hz, H1'); 5,83 (2H, s, NH₂); 5,70-5,68 (1H, m, H3'); 4,73 (2H, s, CH₂); 4,24 (1H, m, H4'); 3,96- 3,85 (2H, m, H5'); 3,29-3,19 (1H, m, H2'); 2,87-2,77 (2H, m, CH₂); 2,29-2,23 (1H, m, H2'); 1,37 (3H, t, J= 7,5Hz, CH₃).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,4MHz): 168,5 (CO); 157,6 (C_{PAC}); 155,1 (C4); 153,3 (C8); 151,7 (C2); 149,7 (C6); 129,6 (CH aromatique); 121,9 (CH aromatique); 119,5 (C5); 114,4 (CH

aromatique); 86,9 (C3'); 85,7 (C1'); 77,6 (C4'); 65,2 (CH₂); 63,1 (C5'); 36,9 (C2'); 21,5 (CH₂); 11,9 (CH₃).

ESI SM positif (m/z): 413,7 [M].

8-éthyl-2'-désoxyadénosine (8edA, 2I)



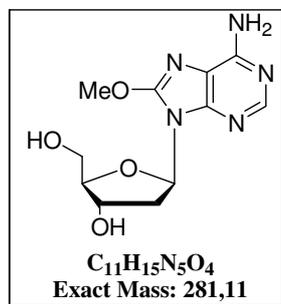
Le composé (**20**; 50,6mg; 0,122mmol) est dissous dans un mélange MeOH/Acétone (1mL) (50:50) sous atmosphère d'Argon et une solution d'NH₄OH à 28% (4mL) est rajoutée. La réaction est maintenue sous agitation pendant une nuit. Le mélange réactionnel est alors évaporé à sec et repris dans du CH₂Cl₂ et purifié sur plaque semi-préparative dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH (90:10). La silice est lavée avec de la pyridine et le filtrat évaporé. La 8edA est obtenu avec un rendement de 75% (25,5mg; 0,1mmol).

RMN ¹H (MeOD, 200MHz): 8,15 (1H, s, H2); 6,42 (1H, dd, J₁= 5,7Hz et J₂= 9,3Hz, H1'); 4,68-4,65 (1H, m, H3'); 4,14-4,13 (1H, m, H4'); 3,96-3,73 (2H, ABX, J_{AX}= 2,4Hz, J_{BX}= 2,6Hz, J_{AB}= 12,6Hz, H5'); 3,14-3,0 (1H, m, H2'); 2,91 (2H, q, J=7,4Hz, CH₂); 2,19-2,08 (1H, m, H2'); 1,32- 1,25 (3H, t, J= 7,5Hz, CH₃).

RMN ¹³C (MeOD, 200MHz): 158,7 (C4) ; 154,6 (C8); 151,5 (C2); 144,7 (C6); 110,7 (C5); 86,8 (C4'); 86,1 (C1') ; 76,2 (C3') ; 63,0 (C5') ; 36,4 (C2') ; 21,08 (CH₂) ; 10,8 (CH₃).

ESI SM positif (m/z): 280 [M+H⁺]; 302 [M+Na⁺] (M'); 325,1 [M'+ Na⁺]; 361 [M'+K⁺].

8-méthoxy-2'-désoxyadénosine (**18**) [235]



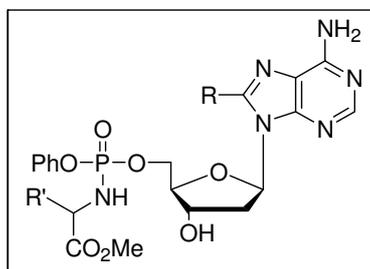
Le composé 8-bromo-2'-désoxyadénosine (100mg; 0,3mmol) est dissous dans du MeOH anhydre (1mL) sous pression d'Argon et température ambiante. Le méthanolate de sodium (360 μ L; 1,6mmol) est ajouté goutte à goutte à la solution précédente avant de chauffer l'ensemble à 60°C pendant une heure. L'évolution de la réaction est contrôlé sur CCM dans un mélange CH₂Cl₂/ MeOH (95:5). La réaction est arrêtée au bout d'une heure et le pH est ramené à neutralité en rajoutant quelques gouttes d'une solution d'HCl à 1M. Le produit (**18**) est obtenu avec un rendement de 55% (46,4mg; 0,16mmol) après évaporation sous le vide de l'évaporateur rotatif.

RMN ¹H (D₂O, 200MHz): 7,90 (1H, s, H2); 6,21 (1H, dd, J₁=J₂= 7,3Hz, H1'); 4,52- 4,47 (1H, m, H3'); 4,03 (3H, s, CH₃O); 4,01-3,97 (1H, m, H4'); 3,68 (2H, ABX, J_{AX}= 3,2Hz, J_{BX}= 4,4Hz, J_{AB}= 12,6Hz, H5'); 2,86-2,72 (1H, m, H2'); 2,28-2,17 (1H, m, H2').

RMN ¹³C (D₂O, 50,3MHz): 158,7 (C4); 155,2 (C8); 150,6 (C2); 148,1 (C6); 114,7 (C5); 87,52 (C1'); 83,5 (C3'); 71,9 (C4'); 62,4 (C5'); 58,1 (CH₃); 37,6 (C2').

ESI SM positif (m/z): 282,1 [M+H⁺]; 304,0 [M+Na⁺].

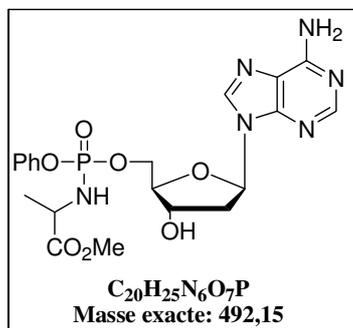
Synthèse des phényloxyphosphoramidate-2'-dA.



Protocole général de synthèse.

L'acide aminé (L)-Alanine ou (L)-Phénylalanine est mis en solution dans du CH_2Cl_2 avant de rajouter le dichlorophénylphosphite. L'ensemble est refroidit à 0°C par un bain de glace pendant 10min; la N-méthylimidazole en solution dans CH_2Cl_2 est alors rajouté sous atmosphère d'argon et agitation constante, à 0°C . Au bout d'une heure, le nucléoside modifié est mis en solution dans CH_2Cl_2 , sous agitation constante, pression d'argon dans un bain de glace à 0°C . Le chlorophényl-(L)-acide aminé-phosphite est rajouté goutte à goutte à 0°C . Une fois l'addition terminée, le mélange réactionnel peut évoluer à température ambiante jusqu'à disparition du nucléoside. L'évolution de la réaction est contrôlée par CCM dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5). La réaction est à nouveau refroidit à 0°C et du MeOH anhydre est rajouté. La réaction est maintenue sous agitation pendant 15min diluée avec du CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec une solution d'HCl 1M, une solution saturée d' NaHCO_3 et de l' H_2O . Elle sera séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Le brut de réaction est purifié sur gel de silice conditionné avec CHCl_3 et le produit sera élué avec un gradient de MeOH (de 0 à 3%). Les rendements de réaction sont consignés dans le tableau qui suit.

5'-phényloxy-Ala-phosphoramidate-dA (22)



(L)-NH ₂ CH(CH ₃)CO ₂ Me.HCl	90,4mg; 0,65mmol
CH ₂ Cl ₂	1,6mL
PhOP(O)Cl ₂	70μL; 0,46mmol
NMI	147,5μL; 1,85mmol
CH ₂ Cl ₂	250μL
Désoxyadénosine	50mg; 0,185mmol
CH ₂ Cl ₂	620μL
Rendement: 72% (65,5mg; 0,13mmol)	

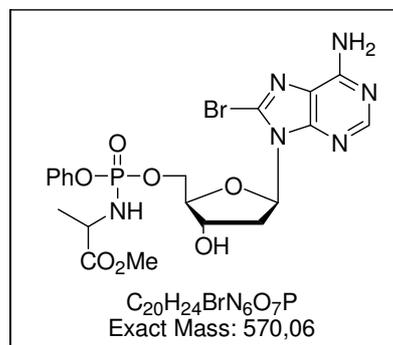
RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,7 (1H, s, H8); 8,12 (1H, s, H2); 7,3-7,1 (5H, m, H aromatique); 6,6 (1H, dd, J₁=J₂= 6,2Hz; H1'); 5,5-5,48 (1H, m, H3'); 5,3 (2H, s, NH₂); 4,5-3,95 (4H, m, H4', H5' et CH); 3,63 et 3,64 (3H, s, CH₃); 3,47-3,42 (1H, m, H2'); 2,44-2,40 (1H, m, H2'); 1,35-1,34 et 1,29-1,25 (3H, dd, J=7,01Hz, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 172 (CO); 157,3 (C_{IV} aromatique); 154,9 (C4); 152 (C2); 147,9 (C8); 144,8 (C6); 130-115,7 (CH aromatique + C5); 86,2 (C1'); 85,4 (C4'); 72,4 (C3'); 65,5 (C5'); 50,3 (CH₃); 42,6 (CH); 36,7 (C2'); 18,4 (CH₃).

RMN ³¹P (CDCl₃, 80,9MHz): 4,86 et 4,66.

ESI SM positif (m/z): 493,2 [M+H⁺].

8-Bromo-5'-phényloxy-phosphoramidate-2'dA (23).



(L)-NH ₂ CH(CH ₃)CO ₂ Me.HCl	74mg; 0,53mmol
CH ₂ Cl ₂	1,3mL
PhOP(O)Cl ₂	55,3μL; 0,37mmol
NMI	120,4μL; 1,51mmol
CH ₂ Cl ₂	200μL
8-Bromo-dA	50mg; 0,151mmol
CH ₂ Cl ₂	430μL
Rendement de Réaction : 81% (244,7mg; 0,43mmol)	

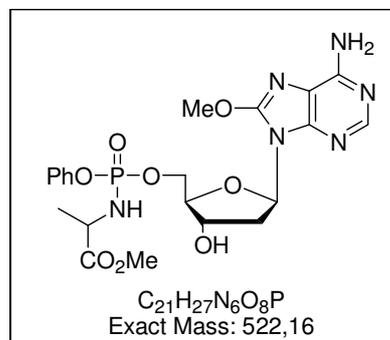
RMN ¹H (CDCl₃, 500MHz): 8,26 et 8,20 (1H, s, H2); 7,31-7,28 (2H, m, phényle); 7,18-7,13 (3H, m, phényle); 6,3 (1H, dd, J₁= 6Hz et J₂= 13Hz, H1'); 5,64 (1H, s, NH₂); 5,03-4,99 (1H, m, H3'); 4,48-3,96 (4H, m, H4', H5' et CH); 3,69 et 3,67 (3H, s, CH₃); 3,49-3,42 (1H, m, H2'); 2,45-2,40 (1H, m, H2'); 1,36-1,35 et 1,31-1,30 (3H, d, J= 7,03Hz, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,7MHz): 173,99 (CO); 154,14 (C4); 152,7 (C2); 150,7 (C8); 150,5 (C6); 129,7 (CH aromatique); 127,6 (CH aromatique); 120,4 (C5); 85,9 (C1'); 85,2 (C4'); 72,2 (C3'); 66,3 (C5'); 52,6 (CH₃); 50,2 (CH); 36,9 (C2'); 20,8 (CH₃).

RMN ³¹P (CDCl₃, 80,9MHz): 4,08 et 3,94.

ESI SM négatif (m/z): 569 [M-H]; 571 [M'-H] et 606,9 [M+Cl⁻]; 608,9 [M'+Cl⁻] en fonction de l'abondance isotopique du Brome.

8-Méthoxy-5'-phosphoramidate-2'-dA (24).



(L)-NH ₂ CH(CH ₃)CO ₂ Me.HCl	86,4mg; 0,62mmol
CH ₂ Cl ₂	1,5mL
PhOP(O)Cl ₂	66,1μL; 0,44mmol
NMI	141,1μL; 1,77mmol
CH ₂ Cl ₂	240μL
8-méthoxy-dA	50mg; 0,177mmol
CH ₂ Cl ₂	600μL
Rendement de réaction: 69% (223mg; 0,43mmol)	

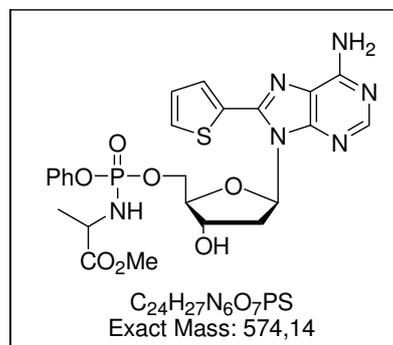
RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,18 (1H, s, H₂); 7,32-7,15 (5H, m, H aromatique); 6,32 (1H, dd, J₁=J₂= 6,9Hz, H1'); 5,50-5,47 (1H, m, H3'); 5,34 (2H, s, NH₂); 4,47-4,24 (3H, m, H4' et H5'); 4,14 (3H, s, CH₃); 4,05-4,03 (1H, m, CH); 3,73 et 3,68 (3H, s, CH₃); 2,59-2,39 (2H, m, H2'); 1,39-1,36 et 1,24-1,22 (3H, d, J=5,8Hz, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3 MHz): 174,1 (CO); 158,3 (C_{IV} aromatique); 154,9 (C₄); 153,0 (C₂); 147,9 (C₈); 144,8 (C₆); 129,7-120,2 (CH aromatique + C₅); 83,2 (C1'); 82,3 (C4'); 65,3 (C3'); 57,2 (C5'); 52,4 (CH₃O); 52,3 (CH₃O); 50,2 (CH); 29,6 (C2'); 20,8 (CH₃).

RMN ³¹P (CDCl₃, 80,9MHz): 4,30 et 4,06.

ESI SM positif (m/z): 523,2 [M+H⁺] et 545,2[M+Na⁺].

8-Thiényl-5'-phényloxyphosphoramidate-2'dA (25).



(L)-NH ₂ CH(CH ₃)CO ₂ Me.HCl	73,3mg; 0,525mmol
CH ₂ Cl ₂	1,3mL
PhOP(O)Cl ₂	56μL; 0,375mmol
NMI	120μL; 1,5mmol
CH ₂ Cl ₂	200μL
8-thiényl-dA	50mg; 0,150mmol
CH ₂ Cl ₂	500μL
Rendement de réaction : 71% (61,1mg; 0,1mmol)	

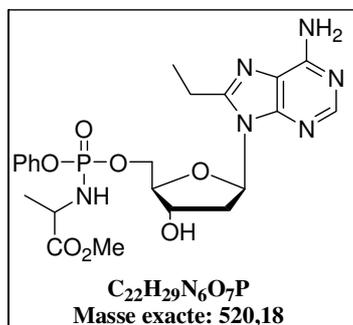
RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,30-8,24 (1H, s, H2); 7,63 (1H, dd, J= 3,29Hz, H5''); 7,55 (1H, d, J= 4,87Hz, H3''); 7,35-7,09 (6H, Phényle et H4''); 6,41 (1H, dd, J₁= 5,46Hz et J₂= 7,33Hz, H1'); 5,69 (2H, s, NH₂); 5,12-5,02 (1H, m, H3'); 4,49-3,93 (2H, m, H4'; H5' et CH); 3,69-3,66 (1H, s, CH₃); 2,38-2,28 (2H, m, H2'); 1,27-1,24 (3H, dd, J=6Hz, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 174 (CO); 154,8 (C4); 151,9 (C2); 150,4 (C8); 146,1 (C6); 142,6 (C_{IV} thiényle) ; 129,9- 128 (CH aromatique+ CH thiényle); 124,7 (C5); 119,8 (CH aromatique); 85,04 (C1'); 70,9 (C4'); 65,9 (C3'); 52,01 (C5'); 49,7 (CH₃); 36,08 (CH); 29,4 (C2'); 20,0 (CH₃).

RMN ³¹P (CDCl₃, 80,9MHz): 4,02 et 3,87.

ESI SM positif (m/z): 574,8 [M+H⁺] et 596,7 [M+Na⁺].

8-éthyl-phényloxyphosphoramidate-2'dA (26)



(L)-NH ₂ CH(CH ₃)CO ₂ Me.HCl	34,7mg; 0,25mmol
CH ₂ Cl ₂	100μL
PhOP(O)Cl ₂	26,5μL; 0,17mmol
NMI	56,6μL; 0,71mmol
CH ₂ Cl ₂	100μL
8-éthyl-dA	20mg; 0,071mmol
CH ₂ Cl ₂	240μL
Rendement: 70% (25,8 mg; 0,05mmol)	

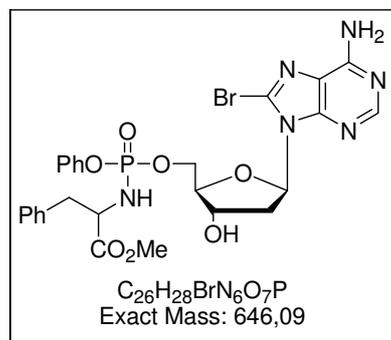
RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,24 et 8,20 (1H, s, H₂); 7,32-7,28 (2H, m, phényle); 7,18-7,13 (3H, m, phényle); 6,3 (1H, dd, J₁= 6Hz et J₂= 13Hz, H1'); 5,64 (1H, s, NH₂); 5,02-4,99 (1H, m, H3'); 4,46-3,96 (4H, m, H4', H5' et CH); 3,69 et 3,67 (3H, s, CH₃); 3,49-3,42 (1H, m, H2'); 2,61-2,57 (2H, m, CH₂); 2,45-2,40 (1H, m, H2'); 1,36-1,35 et 1,31-1,30 (3H, d, J= 7,03Hz, CH₃); 1,24 (3H, t, J= 7,5Hz, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 172,0 (CO); 157,3 (C_{IV} aromatique); 154,9 (C₄); 152,0 (C₂); 148,2 (C₈); 145,1 (C₆); 128,5-115,7 (C_{IV} aromatique + C₅); 86,2 (C1'); 83,9 (C4'); 83,5 (C3'); 65,5 (C5'); 50,3 (CH₃); 42,6 (CH); 35,7 (C2'); 21,1 (CH₂); 18,4 (CH₃); 11,2 (CH₃).

RMN ³¹P (CDCl₃, 80,9MHz): 4,01 et 3,87.

ESI SM positif (m/z): 521,2 [M+H⁺].

8-Bromo-phényloxyphosphoramidate-2'dA (27)



(L)-NH ₂ CH(CH ₂ Ph)CO ₂ Me.HCl	86,4mg; 0,62mmol
CH ₂ Cl ₂	1,5mL
PhOP(O)Cl ₂	66,1μL; 0,44mmol
NMI	141,1μL; 1,77mmol
CH ₂ Cl ₂	240μL
8-méthoxy-dA	50mg; 0,177mmol
CH ₂ Cl ₂	600μL
Rendement de réaction: 69% (223mg; 0,43mmol)	

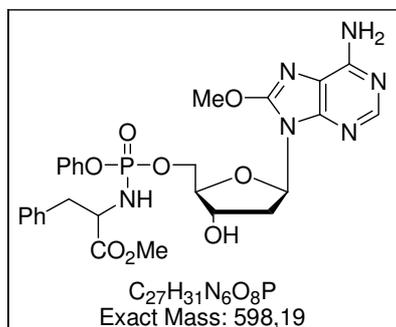
RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,22-8,18 (1H, s, H2); 7,36-6,88 (10H, m, H aromatique); 6,38 (1H, dd, J₁=J₂= 6,76Hz, H1'); 5,75 (2H, s, NH₂); 4,94-4,88 (1H, m, H3'); 4,30-4,05 (4H, m, H4'; H5' et CH); 3,69-3,62 (3H, s, CH₃); 3,48-3,35 (1H, m, H2'); 2,96-2,93 (2H, m, CH₂); 2,45-2,32 (1H, m, H2').

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,7MHz): 173,1 (CO); 154,5 (C4); 153,2 (C2); 151,15 (C8); 144,8 (C6); 135,8 (C_{IV} aromatique); 130,1- 128,9 (CH aromatique); 127,5 (C5); 125,4 (CH aromatique); 120,5 (CH aromatique); 86,2 (C1'); 85,5 (C4'); 72,3 (C3'); 66,6 (C5'); 56,0 (CH₃); 52,7 (CH); 40,7 (CH₂); 37,2 (C2').

RMN ³¹P (CDCl₃, 80,9MHz): 4,04 et 3,98

ESI SM positif (m/z): 647,09 [M+H⁺] et 649,1 [M+H⁺] et 668,6 [M+Na⁺] et 670,6 [M+Na⁺] en fonction de l'abondance isotopique du Brome.

8-Méthoxy-phényloxyphosphoramidate-2'-dA (28).



(L)-NH ₂ CH(CH ₂ Ph)CO ₂ Me.HCl	134,37mg; 0,623mmol
CH ₂ Cl ₂	1,5mL
PhOP(O)Cl ₂	66,5μL; 0,445mmol
NMI	142μL; 1,78mmol
CH ₂ Cl ₂	240μL
8-Méthoxy-dA	50mg, 0,178mmol
CH ₂ Cl ₂	600μL
Rendement: 67% (71,3mg; 0,12mmol)	

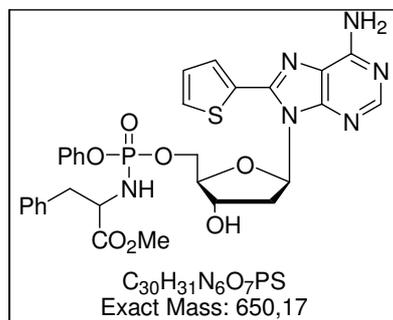
RMN ¹H (CDCl₃, 500MHz): 8,18 (1H, s, H₂); 7,36-7,0 (20H, m, H aromatique); 6,24 (1H; dd; J₁= 7,35Hz et J₂= 15,6Hz; H1'); 5,33 (2H, s, NH₂); 5,27-5,21 (1H, m, H3'); 4,32-3,64 (4H, m, H4' et H5'); 4,12 (3H, s, CH₃O); 3,89-3,83 (1H, m, CH); 3,65-3,64 et 3,59-3,58 (3H, d, J=5,5Hz, CH₃); 3,38-3,31 (1H, m, CH); 3,29-2,95 et 2,90-2,87 (2H, t, CH₂); 2,37-2,31 (1H, m, H2'); 2,29-2,24 (1H, m, H2').

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,7MHz): 173,1 (CO); 155,4 (C_{IV} aromatique); 153,4 (C₄); 151,6 (C₂); 151,1 (C₈); 150,2 (C₆); 136,2 (C_{IV} aromatique); 130,13- 120,4 (CH aromatique + C₅); 116,27 (CH aromatique); 85,5 (C1'); 82,7 (C4'); 77,9 (C3'); 65,7 (C5'); 57,6 (CH₃O); 56,4 et 52,6 (CH₃O); 40,7 (CH₂); 30,1 (C2').

RMN ³¹P (CDCl₃, 80,9MHz): 4,30 et 2,81.

ESI SM (m/z): 589,2 [M+H⁺].

8-thiényle-5'-phényloxyphosphoramidate-2'dA (29).



(L)-NH ₂ CH(CH ₂ Ph)CO ₂ Me.HCl	113,2mg; 0,525mmol
CH ₂ Cl ₂	1,3mL
PhOP(O)Cl ₂	56μL; 0,375mmol
NMI	119,6μL; 1,5mmol
CH ₂ Cl ₂	200μL
8-Thiényle-dA	50mg; 0,150mmol
CH ₂ Cl ₂	500μL
Rendement: (73,1mg; 0,112mmol)	

RMN ¹H (CDCl₃, 500MHz) : 8,23 (1H, s, H₂); 7,64 (1H, d, J=3,5Hz, H_{5''}); 7,57 (1H, d, J=5,05Hz, H_{3''}); 7,3-7,01 (10H, m, H aromatique); 6,42 (1H, dd, J₁= 6,4Hz et J₂= 13,2Hz, H_{1'}); 5,74 (2H, s, NH₂); 5,06-5,0 (1H, m, H_{3'}); 4,29-4,15 (4H, m, H_{4'}; H_{5'} et CH); 3,73-3,69 (1H, m, H_{2'}); 3,67 et 3,66 (3H, s, CH₃); 3,02 et 2,97 (2H, d, J=6Hz, CH₂); 2,35-2,30 (1H, m, H_{2'}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,7MHz) : 173,1 (CO); 155,45 (C_{IV} aromatique); 155,4 (C₄); 152,9 (C₂); 151, 2 (C₆); 151,0 (C₈); 146,8 (C_{IV} thiényle); 135,8 (C_{IV} aromatique); 131,1-125,4 (CH aromatique+ CH thiényle); 120,5 (CH aromatique); 85,5 (C_{1'}); 72,9 (C_{4'}); 72,8 (C_{3'}); 66,8 (C_{5'}); 56,0 (CH₃); 52,8 (CH); 40,7 (CH₂); 36,9 (C_{2'}).

RMN ³¹P (CDCl₃, 80,9MHz) : 3,96 et 3,90.

ESI SM négatif (m/z) : 685 [M+ Cl⁻].

Analyse par CLHP des phényloxyphosphoramidates modifiés de la dA.

L'analyse par CLHP a été effectuée sur une colonne ThermoHypersil Hypurity C₁₈ 5μm (250*4mm). Les résultats sont résumés dans le tableau 2 qui suit.

Chapitre III. Synthèse et évaluation des propriétés antivirales d'analogues nucléosidiques de la dA. Partie expérimentale.

<i>Composé</i>	<i>Conditions utilisées</i>	<i>Temps de rétention</i>	<i>Quantité relative</i>
22	MeOH/H ₂ O (1/1000 TFA) Gradient 50:50 vers 0:100 sur 20 min Débit: 1 mL.min ⁻¹	3,46 et 3,79	RI*
26	MeOH/H ₂ O (1/1000 TFA) Gradient 60:40 vers 0:100 sur 20 min. Débit: 1 mL.min ⁻¹ .	12,51 et 13,01	71,35% et 28,65%
27	MeOH/H ₂ O (1/1000 TFA) Gradient 50:50 vers 0:100 sur 20min Débit: 1mL.min ⁻¹ .	7,20 et 7,72	74,68% et 25,32%

Tableau 2 : Conditions opératoires à la séparation des diastéréoisomères des composés 18, 21 et 23.

* Résolution insuffisante

Dans le cas du VIH, l'ensemble des inhibiteurs nucléosidiques à l'exception du Tenofovir, possède un hydroxyle libre en 5'. Ils acquièrent leur activité vis-à-vis des cellules infectées à la suite de trois étapes successives de phosphorylation, catalysées par les kinases cellulaires. Ainsi dans le but d'évaluer *in vitro* l'activité inhibitrice d'une nouvelle molécule, il est primordial de la synthétiser sous sa forme triphosphorylée. C'est en effet sous cette forme qu'elle sera reconnue, comme substrat de l'enzyme et peut être avoir une activité inhibitrice.

Par ailleurs les nucléosides triphosphates représentent une classe de molécules importantes dans les systèmes biologiques, un exemple représentatif est l'adénosine triphosphate (ATP) molécule de base au stockage et à la production d'énergie.

Les exemples de synthèse impliquant la préparation de dérivés triphosphate modifiés sont peu nombreux dans la littérature. En effet l'ensemble des méthodes a été mise au point et appliqué principalement sur la dT et la dA en série désoxyribose et U et A en série ribose, mais également à l'AZT en raison de ses propriétés antivirales reconnues. Ces méthodes ont d'ailleurs pour objectif soit d'améliorer les rendements de synthèse ou les conditions de purification du triphosphate final, soit d'aboutir à la synthèse d'analogues triphosphorylés modifiés, sur la partie phosphate tels que les boranotriphosphates ou les méthylentriphosphates.

Ainsi nous ne savons toujours pas si parmi ces différentes méthodes, l'une d'entre elle est compatible à la préparation d'une large famille de dérivés en prenant en compte la grande sensibilité de ces composés ou si au contraire le développement d'une nouvelle méthode est à envisager.

Une attention plus importante a été donnée à cette partie en raison des efforts fournis pour accéder aux analogues nucléotidiques. Ce chapitre s'articulera donc autour de trois parties : la première partie sera consacrée à une revue des principales méthodes de synthèse des triphosphates de nucléosides. Dans une deuxième partie les différentes voies d'accès tentées, seront présentées, avant d'aborder la nouvelle méthodologie de synthèse que nous avons mise au point au laboratoire pour préparer les analogues modifiés sous leur forme monophosphorylés.

A. Les différentes méthodes de synthèse de dérivés triphosphorylés.

Les analogues de triphosphates sont difficiles à synthétiser, à isoler et à caractériser. La synthèse chimique de ces composés nécessite en particulier des conditions anhydres strictes, qui ne sont pas toujours aisées à satisfaire en raison notamment de l'utilisation de réactifs hygroscopiques (le pyrophosphate multichargé par exemple), généralement utilisés en large excès. De plus, la formation pendant la réaction d'un certain nombre de produits secondaires rend encore plus difficile les étapes de purification. Ainsi l'isolement du dérivé triphosphate nécessite souvent deux étapes de purifications sur de matrices orthogonales (résine échangeuse d'anions et phase inverse par exemple).

Un deuxième problème vient se greffer à ces contraintes puisque le composé triphosphate hydrosoluble est difficile à manipuler de par la nature même de l'enchaînement fragile des liaisons P-O-P. Ces molécules se révèlent être des plus sensibles à pH acide, mais également à des températures élevées. Elles présentent néanmoins une certaine stabilité qui dépend énormément de la nature du contre ion. Ainsi en présence d'ions trialkylammoniums, de sodium ou de lithium par exemple, les triphosphates s'avèrent être assez stables.

Plusieurs méthodes de synthèse des triphosphates plus ou moins originales et généralisables ont ainsi été développées [266]. Ces différentes méthodologies employées peuvent être classées principalement en deux catégories:

- * Les méthodes permettant un accès direct aux dérivés de nucléosides triphosphorylés.
- * Les méthodes nécessitant le passage par un dérivé monophosphate.

I. Les méthodes directes



1.1. La méthode de Poulter.

Une des approches les plus connues de synthèse directe est la méthode de synthèse mise au point par Poulter et *al*, initialement développée pour la préparation de diphosphates d'isoprénoïdes [267, 268]. Elle a par la suite été appliquée à la synthèse de diphosphates et autres dérivés de ribonucléosides naturels et étendue à la préparation d'ATP [268, 269].

Selon cette méthode (schéma 1), l'alcool primaire activé par un groupement tosylate, est déplacé, selon un mécanisme S_N2 , par du triphosphate organique. Ce dernier, issu de l'acide triphosphorique, est rendu soluble dans les solvants organiques, grâce aux contre-ions lipophiles (ammonium tertiaires ou quaternaires). Comme toutes les réactions S_N2 , cette transformation reste néanmoins très sensible à l'encombrement stérique.

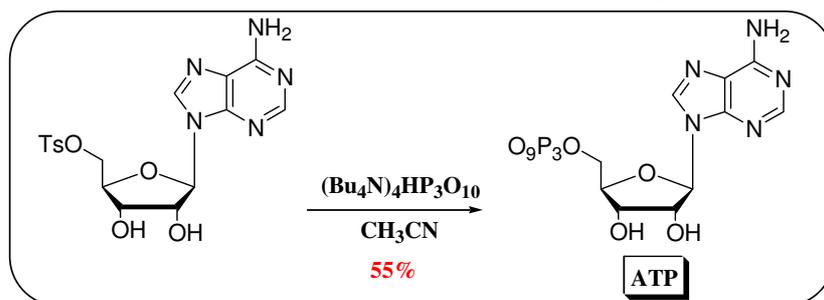


Schéma 1 : Méthode de Poulter appliquée à la synthèse d'ATP.

1.2. Méthode d'Eckstein-Ludwig

D'autres méthodes de triphosphorylation ont été mises au point ; c'est le cas de la méthode développée par Ludwig et Eckstein [270] selon laquelle l'hydroxyle en 5' réagit avec le 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one (schéma 2). Le phosphite formé *in situ* réagit avec le pyrophosphate pour former une espèce intermédiaire cyclique qui, après oxydation et hydrolyse, permet d'aboutir au dérivé triphosphate.

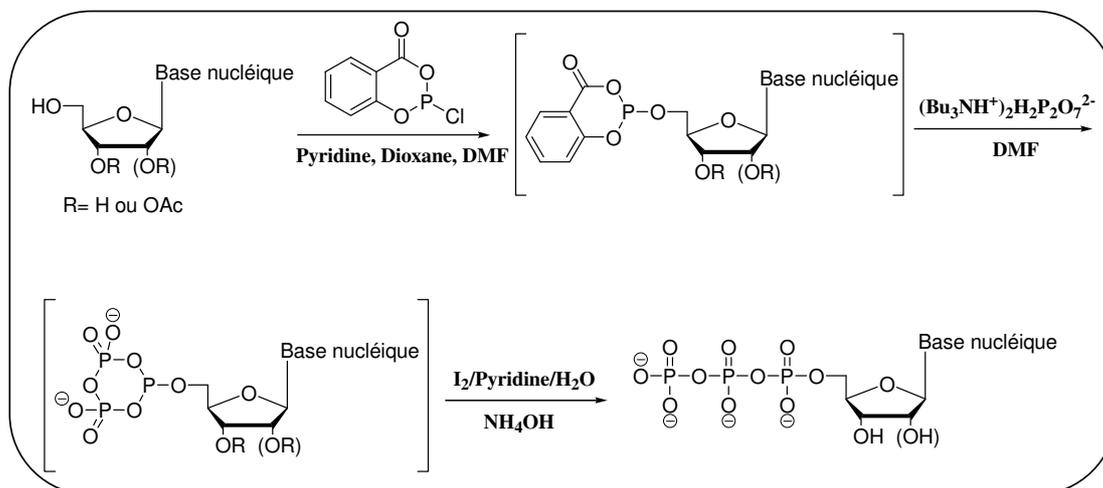


Schéma 2 : Méthode d'Eckstein-Ludwig.

L'utilisation de cette voie de synthèse a par ailleurs été étendue à la préparation de dérivés triphosphates modifiés tels que les boranotriphosphates [270] ou les thiotriphosphates

[270, 271]. Dans ce cas l'étape d'oxydation en présence d'I₂ a été remplacée respectivement soit par une réaction avec un complexe d'hydrure de bore, soit avec du S₈.

1.3. Méthode d'Yoshikawa-Ludwig

Cette méthode de synthèse directe emploie des dérivés dichlorophosphates. Ces réactifs présentent néanmoins un manque de régiosélectivité vis-à-vis des désoxyribonucléosides jusqu'à ce que Yoshikawa et *al.* [272] améliore considérablement la réaction en faveur d'une *O*-phosphorylation en 5' en ajoutant au milieu du triméthyle ou triéthylphosphate. En effet le trialkyle ou triméthyle phosphate utilisé en tant que solvant, présente l'avantage d'assurer une solution homogène avec le nucléoside, mais également de former un complexe activé plus encombré avec POCl₃ ce qui permet à ce dernier d'être plus sélectif vis-à-vis de l'alcool en 5' [273]. Yoshikawa et *al.* avaient décrit initialement cette voie de synthèse dans le but d'obtenir des dérivés monophosphates, mais elle s'est avérée par la suite être également une voie d'accès aux dérivés triphosphates. En effet, il a été montré par Ludwig [274] que l'intermédiaire issu de la réaction entre l'alcool libre en 5' et POCl₃ peut réagir directement avec du bis-(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphate pour générer le nucléoside triphosphate après hydrolyse (schéma 3). Il a été proposé qu'un intermédiaire de type trimétaphosphate se forme avant que le traitement aqueux n'ait lieu, d'où la nécessité d'être dans des conditions totalement anhydres.

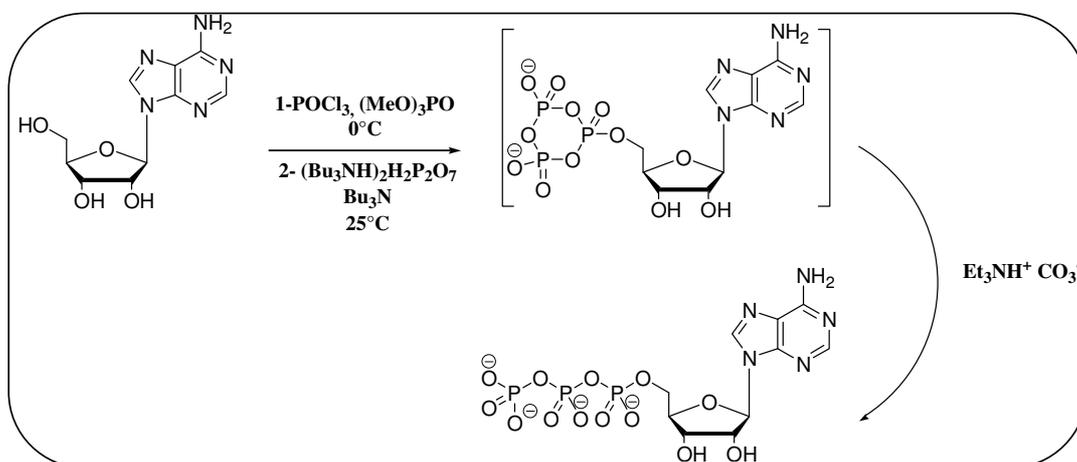


Schéma 3: Méthode de Yoshikawa- Ludwig.

Cette voie de synthèse a été largement utilisée et reste la méthode de choix pour des nucléosides peu sensibles aux conditions acides. Elle a également été adaptée pour la synthèse de dérivés thionucléotides [271, 275, 276] ou encore pour des nucléosides fonctionnalisés par

des groupements alcènes [277]. Il a cependant été nécessaire d'utiliser dans ces conditions, des bases telles que la lutidine, ou encore le *proton sponge*® pour pallier aux conditions réactionnelles trop acides.

Malgré le succès de cette méthode, elle n'est pas toujours applicable à des nucléosides modifiés. En effet, les temps de réaction semblent être très aléatoires et fortement dépendant de la nature du nucléoside lui-même [278]. Des réactions secondaires ont également été observées, probablement dues à un manque de sélectivité lors de l'étape de phosphorylation entre les alcools primaires et secondaires ce qui rend les conditions de purification beaucoup plus fastidieuses.

1.4. Les méthodes enzymatiques

Les nucléosides et désoxynucléosides triphosphates sont des substances naturelles synthétisés grâce au concours de différentes kinases cellulaires. L'idée d'utiliser les catalyseurs naturels pour la préparation des dérivés triphosphates a donc été exploitée comme une alternative à la synthèse chimique.

Ainsi l'adénosine a été triphosphorylée par voie biosynthétique grâce à trois enzymes : l'adénosine kinase, l'adénylate kinase et l'acétate kinase (schéma 4). L'ATP est d'ailleurs utilisé en quantité catalytique comme cofacteur de l'adénylate kinase [279].

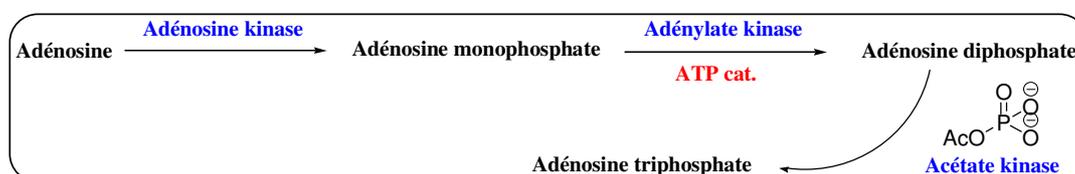


Schéma 4 : Voie de synthèse enzymatique de l'ATP.

Il est également possible de synthétiser par voie enzymatique des dérivés triphosphates en utilisant des systèmes cellulaires entiers. Cette méthodologie de synthèse a été appliquée à la synthèse d'analogues fluoro-désoxynucléosides (schéma 5); ils sont tout d'abord transformés en dérivé monophosphate à l'aide de cellules bactériennes issues d'*Erwinia herbicola* en présence de *p*-nitro-phenyl-phosphate. Le monophosphate est alors phosphorylé grâce au système enzymatique complet de *Saccharomyces cerevisiae* [280].

Un inconvénient important de cette méthode provient de la méthodologie elle-même. En effet, l'utilisation d'un système cellulaire complet, entraîne l'apparition d'un certain nombre de réactions enzymatiques secondaires.

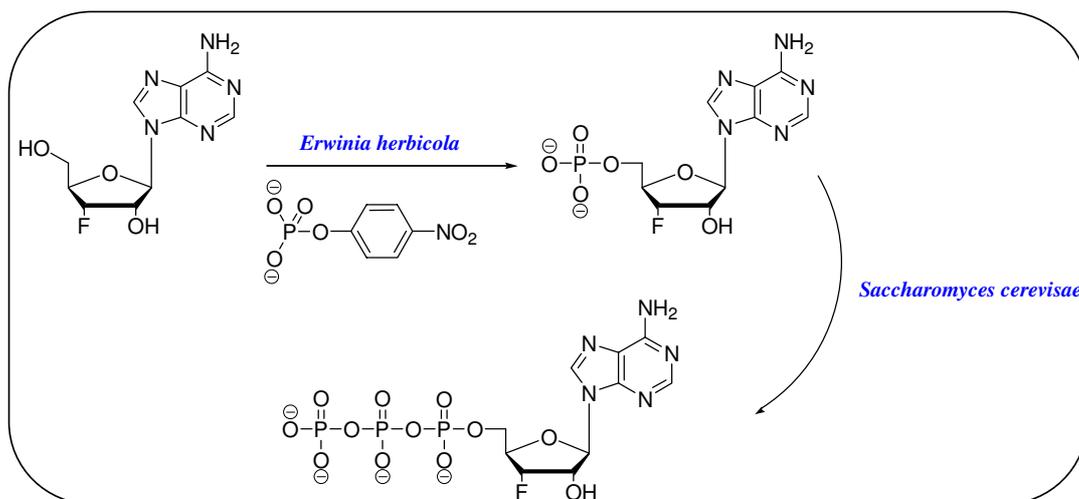


Schéma 5: Synthèse de triphosphates selon un système cellulaire complet.

Il est également possible de synthétiser les nucléotides naturels *via* une dégradation de l'ARN (schéma 6). Cette méthode de synthèse enzymatique met en jeu une première étape de dégradation de l'ARN en oligomères de plus petite taille, sous l'action de la nucléase P1. Les oligomères obtenus, sont convertis à leur tour en nucléosides diphosphates grâce à la phosphorylase et finalement en nucléosides triphosphates *via* l'action catalytique de la pyruvate kinase [281].

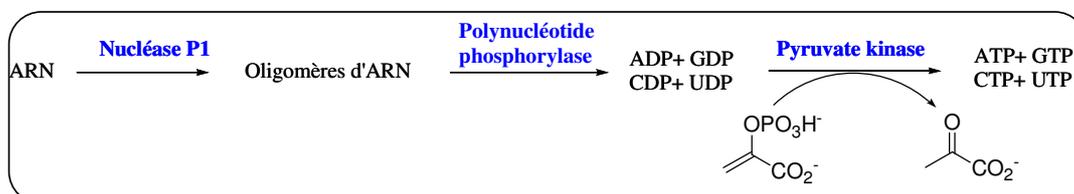
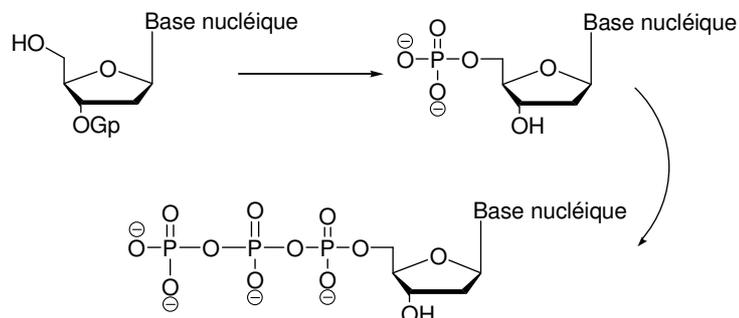


Schéma 6: Synthèse des triphosphates *via* une dégradation enzymatique de l'ARN.

Les méthodes de synthèse enzymatique restent très peu utilisées du fait de la très faible quantité de matériel obtenue et restent limitées à la synthèse de nucléosides triphosphates naturels. En effet dans le cas des nucléosides modifiés, une étape de mise au point supplémentaire des protocoles de synthèse est requise et cela dans le but de déterminer si ces composés sont des substrats des différentes enzymes. Cette voie de synthèse reste donc très limitée de par son coût et des incertitudes qui concernent son emploi sur des analogues de nucléosides.

II. Méthodes nécessitant le passage par un monophosphate



La deuxième stratégie de synthèse des dérivés triphosphorylés est de préparer le dérivé monophosphate intermédiairement. La plupart de ces méthodes mettent en jeu le caractère nucléophile de l'hydroxyle en 5'. En effet ce dernier pourra réagir avec des réactifs de phosphorylation électrophile de degré d'oxydation (V) ou de phosphitylation électrophile de degré d'oxydation (III). Une fois le dérivé monophosphate obtenu, une étape supplémentaire d'activation est nécessaire avant de le coupler au pyrophosphate voulu. Cette voie de synthèse présente l'avantage d'aboutir aux analogues triphosphorylés correspondant en utilisant des conditions réactionnelles assez douces.

2.1. Les réactifs de phosphitylation de degré (III)

L'alternative à la méthode d'Yoshikawa, a été l'introduction de réactifs de phosphitylation de degré (III) beaucoup plus stables et faciles à manipuler mais très réactifs sous certaines conditions. C'est le cas par exemple des phosphoramidites, des phosphorochloridites ou des phosphorothioites [282, 283] selon que l'on souhaite obtenir des analogues monophosphates ou phosphorothioates (figure 1).

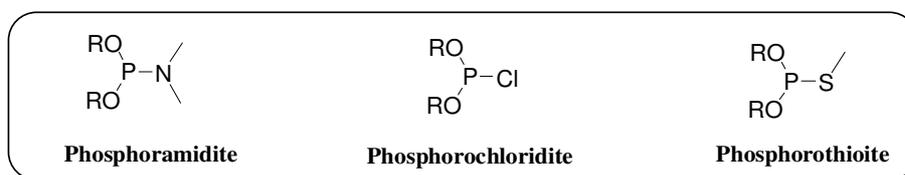


Figure 1: Réactifs de phosphitylation de degré (III).

Compte tenu de leur réactivité élevée, les réactifs de phosphitylation de degré (III) nécessitent la protection des fonctions réactives adjacentes à l'hydroxyle en 5' à savoir l'alcool en 3' et l'amine de la base (ex : NH₂ en N6 de la dA). Les conditions de réactions

demeurent néanmoins assez douces, même si elles requièrent une étape d'oxydation supplémentaire du phosphite intermédiaire (schéma 7).

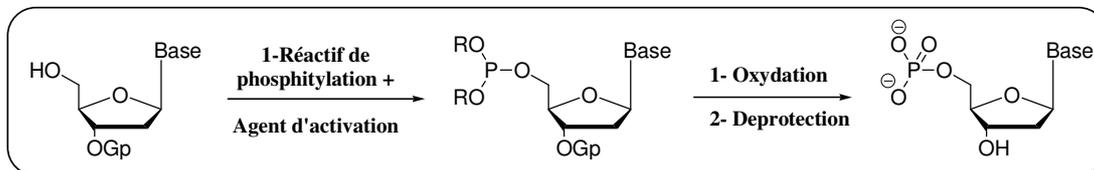


Schéma 7: Méthode de synthèse générale par phosphitylation.

2.2. Les réactifs de degré d'oxydation P(V)

Les principaux agents phosphorés pentavalents utilisés pour la phosphorylation des alcool en 5' de nucléosides, sont les chlorophosphates. La méthode la plus classique consiste à utiliser l'oxychlorure de phosphore (POCl_3), précédemment décrit. Une fois l'intermédiaire dichlorophosphate formé, une simple hydrolyse suffit à aboutir au dérivé monophosphate. Une alternative consiste à utiliser les esters de phosphorochloridates $(\text{RO}_2)\text{POCl}$. L'emploi de ces derniers nécessitera une étape supplémentaire d'élimination des groupes protecteurs du phosphate. Un inconvénient important de cette méthode est la libération de quantité importante d' HCl qu'il faudra piéger efficacement. Pour cela une amine tertiaire est généralement utilisée

2.3. Les méthodes moins conventionnelles

D'autres méthodes permettent d'atteindre les dérivés monophosphates, mais leurs applications sont restées assez limitées. C'est le cas par exemple du réactif développé par Nair et *al*, le 2-*O*-(4,4'-diméthoxytrityl)éthylsulfonyléthan-2'-yl-phosphate (A) qui a notamment été appliqué à la synthèse de nucléosides monophosphorylés en 5' ou 3' [284], précurseurs de dinucléotides inhibant l'Intégrase de VIH-1 [285]. La réaction nécessite également l'utilisation d'un agent de couplage tel que le triisopropylbenzènesulfonyl-tétrazolide (TPS-TAZ) (schéma 8).

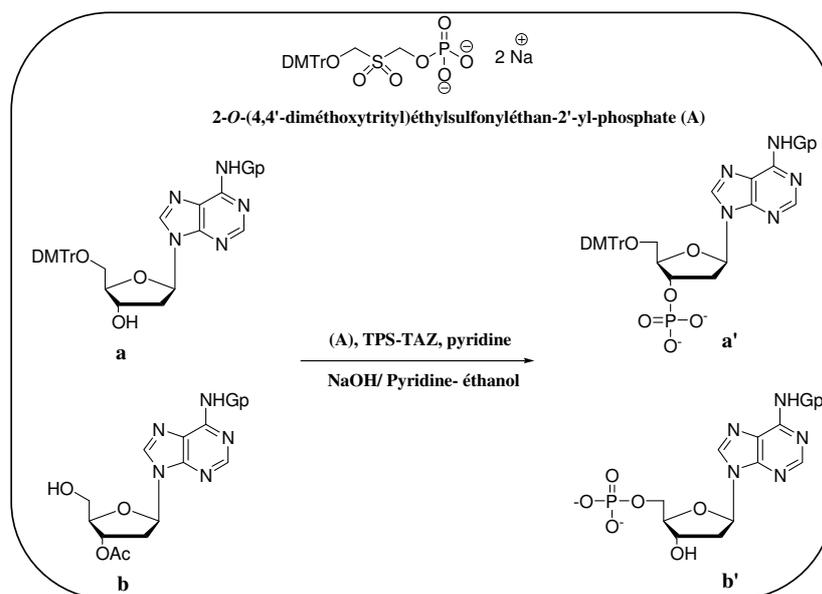


Schéma 8 : Méthode de phosphorylation utilisant le réactif de Nair et *al.*

Une autre méthode de synthèse a été largement utilisée par l'équipe de Mioskowski et *al.* et repose sur l'utilisation de la réaction de Mitsunobu sur des dérivés de l'adénosine [286]. Elle a également été étendue par la suite à la synthèse du monophosphate de l'AZT [287] (schéma 9).

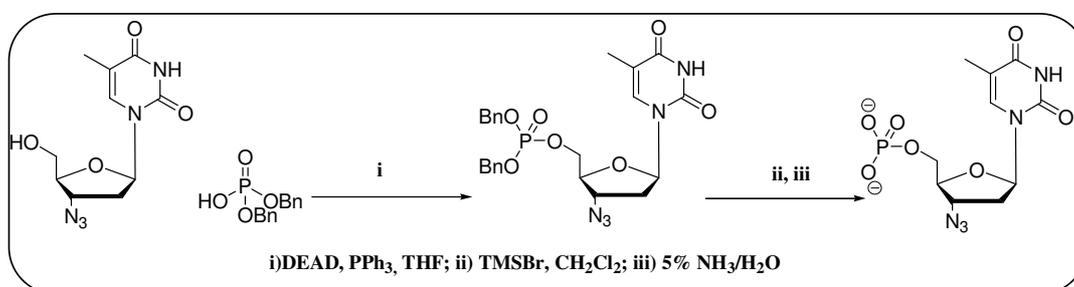


Schéma 9 : Exemple de synthèse du monophosphate de l'AZT utilisant la réaction de Mitsunobu.

Quelle que soit les réactifs choisis, P(III) ou P(V), il est nécessaire d'effectuer une étape supplémentaire d'activation du nucléoside monophosphate pour accéder aux dérivés triphosphates.

2.4. Les méthodes d'activation

Deux approches peuvent être appliquées ; la première voie (voie A) consiste à faire réagir le monophosphate nucléophile sur un pyrophosphate activé [266, 288]. Cette méthode reste très peu utilisée en comparaison à la deuxième voie (voie B) qui utilise cette fois-ci le caractère nucléophile du pyrophosphate lors d'une réaction avec un dérivé monophosphate activé (schéma 10). Nous décrivons ici que les principaux modes d'activation du monophosphate rendant compte de cette dernière stratégie de synthèse.

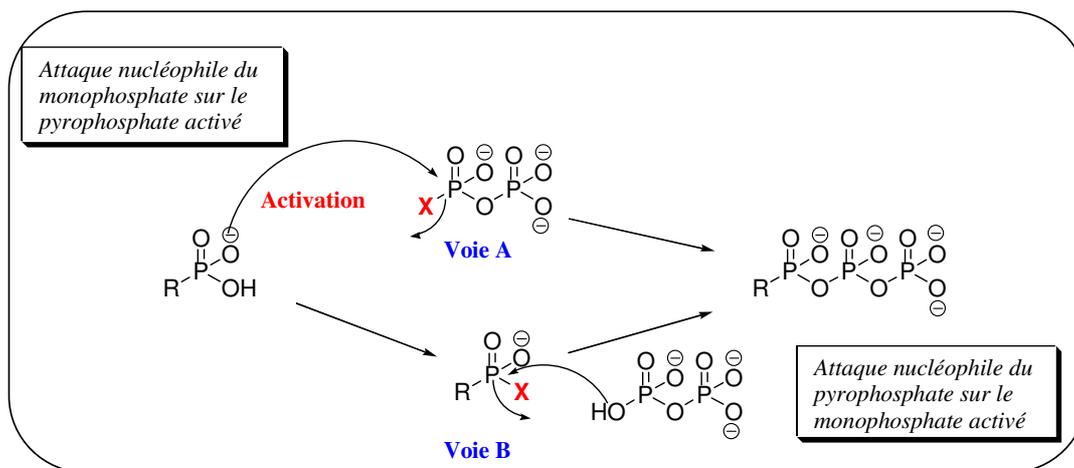


Schéma 10 : Les deux voies d'activation préconisées pour aboutir au triphosphate.

2.4.1. Activation au dicyclohexylcarbodiimide (DCC)

Des efforts considérables ont été menés pour mettre au point des méthodes d'activation efficaces. L'utilisation du DCC comme activateur a permis de répondre à cette attente. Lorsqu'il est utilisé seul, le DCC conduit à la formation du nucléotide voulu, mais sans grande sélectivité puisque les composés mono, diphosphorylés en plus de polyphosphates inorganiques, sont obtenus. Ces réactions secondaires ont pu être fortement limitées, en rajoutant au milieu réactionnel des amines, telles que la morpholine, permettant ainsi le passage par un intermédiaire phosphoramidate (schéma 11). Il semblerait également que le choix du solvant soit primordial puisque l'utilisation du DMSO a permis d'éviter les réactions de dégradation du triphosphate une fois celui-ci formé [289].

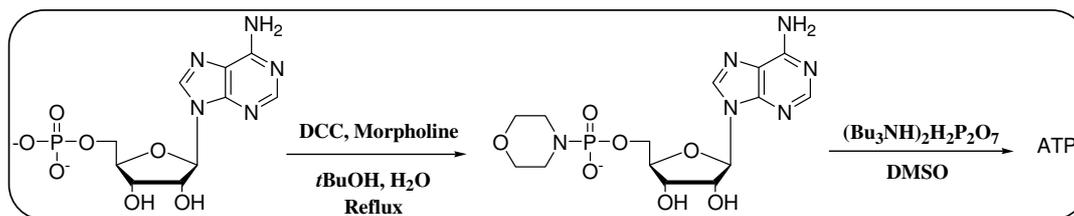


Schéma 11: Méthode d'activation au DCC.

2.4.2. Activation au carbonyldiimidazole (CDI)

D'autres agents d'activation ont par la suite été employés tels que le CDI [290-293] qui, par activation *in situ* du dérivé monophosphate, permet d'obtenir un phosphoroimidazolite intermédiaire hautement réactif (schéma 12). Cet intermédiaire pourra réagir avec le pyrophosphate et conduire au triphosphate de nucléoside correspondant. Son utilisation a été appliquée à l'ensemble des ribonucléosides et étendue par la suite aux désoxynucléosides.

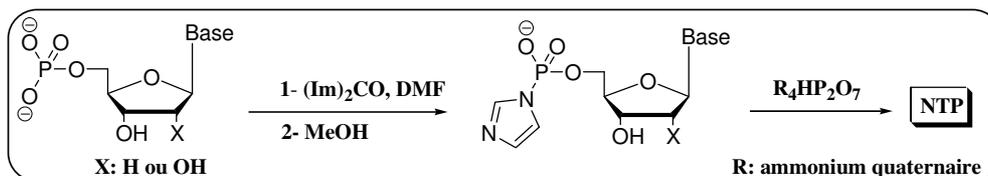


Schéma 12: Méthode d'activation au CDI.

Ces deux méthodes (DCC et CDI), même si elles sont assez fréquemment utilisées pour activer les analogues monophosphates *in situ* sans avoir recours à la protection de l'alcool en 3' en série désoxyribosyle, présentent un inconvénient de taille puisqu'elles nécessitent des temps de couplage très longs (>24h).

2.4.2. Méthode de Bogachev

La méthode de Bogachev [294] a été décrite dans le milieu des années 90 mais sans connaître un réel essor. Elle a néanmoins été reprise tout récemment et appliquée à la synthèse d'analogues modifiés de type méthylène triphosphate des nucléosides A et U [295]. Les auteurs ne préconisent pas l'utilisation de conditions anhydres, ni même la nécessité d'effectuer les échanges des ions alcalins du monophosphate de nucléoside par des ammoniums. Cet échange généralement nécessaire pour rendre le monophosphate soluble dans les solvants organiques, est inutile en suivant cette méthode de synthèse. Ainsi les

monophosphates sous leur forme protonnée ou sodique, sont tout à fait compatibles avec cette réaction.

Il a été proposé (schéma 13) que la réaction débute par la protection de l'ensemble des fonctionnalités réactives (fonction amine de la base, alcools en 2' et 3' du ribose) et l'activation du monophosphate par un groupement temporaire issu de l'anhydride trifluoroacétique. Cette étape très rapide sera suivie par une activation de l'intermédiaire trifluoroacétique obtenu, par de la *N*-méthyl-imidazole. L'espèce obtenue pourra alors être mise à réagir avec du pyrophosphate pour conduire aux nucléotides recherchés avec des temps de réaction beaucoup plus courts que ceux observés lors d'une activation par la DCC ou la CDI.

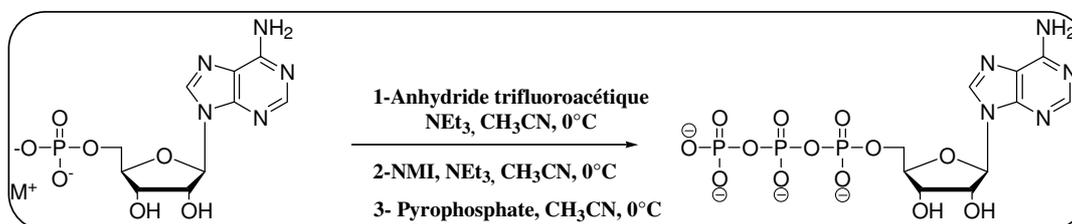


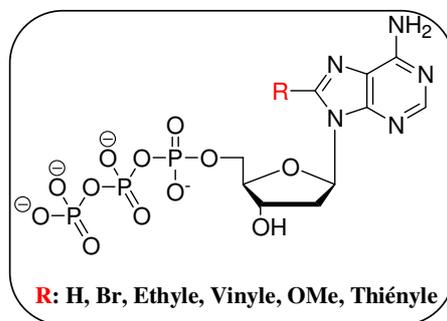
Schéma 13: Voie de synthèse des triphosphates selon la méthode de Bogachev.

L'ensemble de ces méthodes (DCC, CDI ou la méthode de Bogachev) nécessite cependant l'utilisation du pyrophosphate en large excès pour éviter la formation de dinucléoside tétraphosphate. Cela pose notamment des problèmes lors de la purification du produit final.

III. Conclusion

Après cette présentation, on peut penser que la synthèse d'analogues triphosphorylés modifiés serait assez facile à mettre en œuvre. Or aucune d'entre elles n'a fait l'objet d'études pour ce type de composés. Nous avons donc été amenés à évaluer certaines de ces méthodes en tenant compte de la nature de nos composés, mais également à rechercher une méthode de synthèse qui serait généralisable à l'ensemble des analogues modifiés en position 8 de la dA que nous avons présentés au chapitre précédent.

B. Synthèse des nucléotides modifiés de la dA



Nous avons essayé dans un premier temps d'appliquer les stratégies de synthèse déjà décrites sur la désoxyadénosine non modifiée pour s'assurer de la faisabilité de la méthode, avant d'essayer de l'étendre aux analogues modifiés en position 8.

I. Essai de synthèse des triphosphates selon des méthodes directes

Certaines des méthodes directes référencées sont d'ores et déjà incompatibles avec certaines des modifications introduites sur la dA. C'est le cas par exemple de la méthode au POCl_3 , incompatible avec le groupement vinyle ou d'autres analogues de nucléosides [296]. En effet lors de la phosphorylation des composés 5-vinyl et 5-éthynyl-2'-désoxyuridine, un effet hypsochrome a été observé par spectrométrie UV-Visible. Ce déplacement vers des longueurs d'onde plus faibles résulterait de l'addition sur la double liaison d'une molécule d'HCl [297]. Des observations similaires ont d'ailleurs été faites au laboratoire lors des essais de synthèse du dérivé diphosphate de la 8-vinyl-adénosine [298]. La méthode de Poulter avait aussi été expérimentée mais sans succès, probablement à cause de l'encombrement stérique trop important, généré par l'introduction d'un substituant sur la base. Quant à la méthode d'Eckstein-Ludwig, elle s'est avérée être très dépendante de la nature même du nucléoside. Dans le cadre d'autres travaux effectués au laboratoire sur des analogues triphosphorylés de l'AZT, cette méthode s'est avérée fructueuse. Malheureusement nous n'avons pas pu l'appliquer à la dA ou à un de ses dérivés. Par ailleurs les conditions opératoires à satisfaire sont extrêmement contraignantes en raison de la très grande sensibilité de la réaction à la présence de traces d'eau surtout que le réactif de phosphorylation est lui-même très hygroscopique et instable.

Nous avons donc cherché à mettre au point une méthode de synthèse qui soit suffisamment douce et compatible avec une large variété de modifications chimiques.

Afin d'essayer de répondre à cette attente, nous avons choisit d'explorer la chimie des phosphoramidites. Cette première approche a été testée sur la dA et est représentée dans le schéma rétrosynthétique suivant (schéma 14).

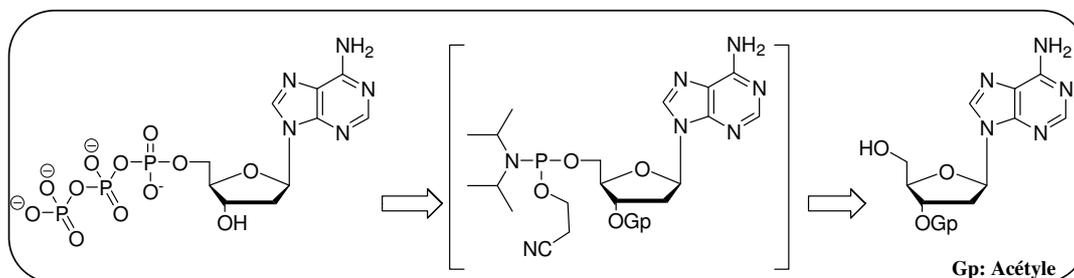


Schéma 14: Schéma rétrosynthétique du triphosphate de la dA en suivant la chimie des phosphoramidites.

La préparation de l'analogue triphosphate de la dA (et par la suite des analogues modifiés) est basée sur la préparation *in situ* de l'intermédiaire phosphoramidite en 5' du désoxyribose. Par la suite le phosphoramidite sera mis à réagira avec le pyrophosphate. L'intermédiaire formé devra être oxydé et l'élimination des groupements cyanoéthyle et acétate sera réalisée en fin de synthèse par traitement basique. Pour explorer cette voie il a fallu au préalable préparer le composé 3'-OAc-dA.

1.1. Préparation du composé 3'-OAc-dA (33)

Afin d'obtenir l'alcool libre en 5' de la dA (schéma 15), nous avons eu recours à la protection transitoire de l'hydroxyle en 5' par le groupement DMTr selon les conditions usuelles. Le produit (30) a été obtenu avec un rendement plus faible (59%) par rapport aux autres analogues nucléosidiques modifiés malgré plusieurs essais. Il était nécessaire à présent de protéger l'hydroxyle en 3' par un groupement protecteur qui puisse être clivé dans des conditions basiques tout en étant stable sous les conditions acides de déprotection du DMTr. Nous avons opté pour le groupement acétate dont l'introduction en position 3' a été réalisée avec de l'anhydride acétique en présence de DMAP, dans la pyridine. Le produit (31) a ainsi été obtenu avec un rendement quantitatif. L'amine exocyclique en N6 a également été protégée par le groupement diméthylformamide diméthylacétal avec un rendement de 94%. L'hydroxyle en 5' du composé (32) est alors libéré après traitement avec une solution de DCA à 3% dans du CH₂Cl₂. Le produit (33) est obtenu avec un rendement de 88%.

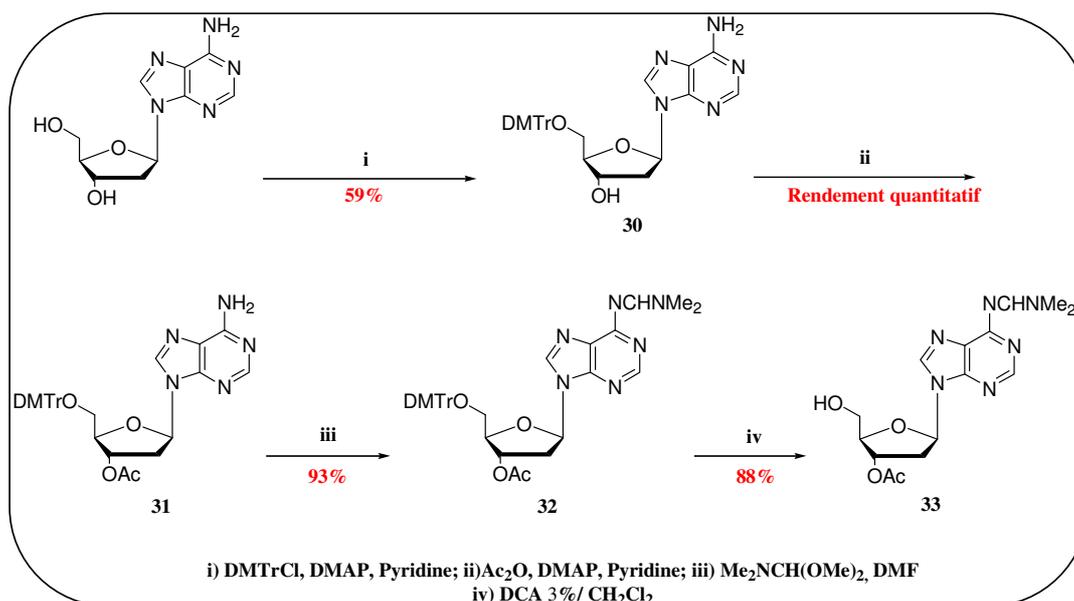


Schéma 15: Synthèse de l'alcool libre en 5' de la dA.

L'étape de déprotection du groupement DMTr a cependant posé quelques problèmes. En effet les premiers tests ont été effectués dans un mélange de TCA à 3% dans du CH₂Cl₂, les mêmes conditions que nous avons utilisé lors de la synthèse en phase solide, mais les rendements de réaction n'excédaient jamais les 50%. Nous avons donc essayé de modifier ces conditions soit en abaissant la température soit en modifiant la nature de la base (NaHCO₃ ou NEt₃) lors de l'extraction. Les résultats ont été tout autant décevants puisque les rendements étaient de 12 et 20% respectivement. En se tournant vers la littérature, la réaction de detritylation avait été décrite avec du TCA 3% dans un mélange CH₃NO₂ : MeOH (95 :5) dans la pyridine, à 0°C [299]. Nous avons essayé ces conditions mais le rendement obtenu après chromatographie était tout aussi faible, de l'ordre de 20%. Certains auteurs [300] préconisent d'effectuer la réaction directement sur la silice en présence de TFA à 3%, le produit étant par la suite élué avec un mélange CHCl₃ /MeOH. En suivant cette méthode de synthèse les rendements n'ont pu être améliorés.

Finalement c'est grâce à l'utilisation du DCA, un acide plus doux, que des rendements satisfaisants (76%) ont pu être obtenus.

1.2. Synthèse du triphosphate de la dA

Une fois la dA protégé en 3' et l'hydroxyle en 5' libéré, il est indispensable d'être sous des conditions totalement anhydres avant d'effectuer l'étape suivante (schéma 16).

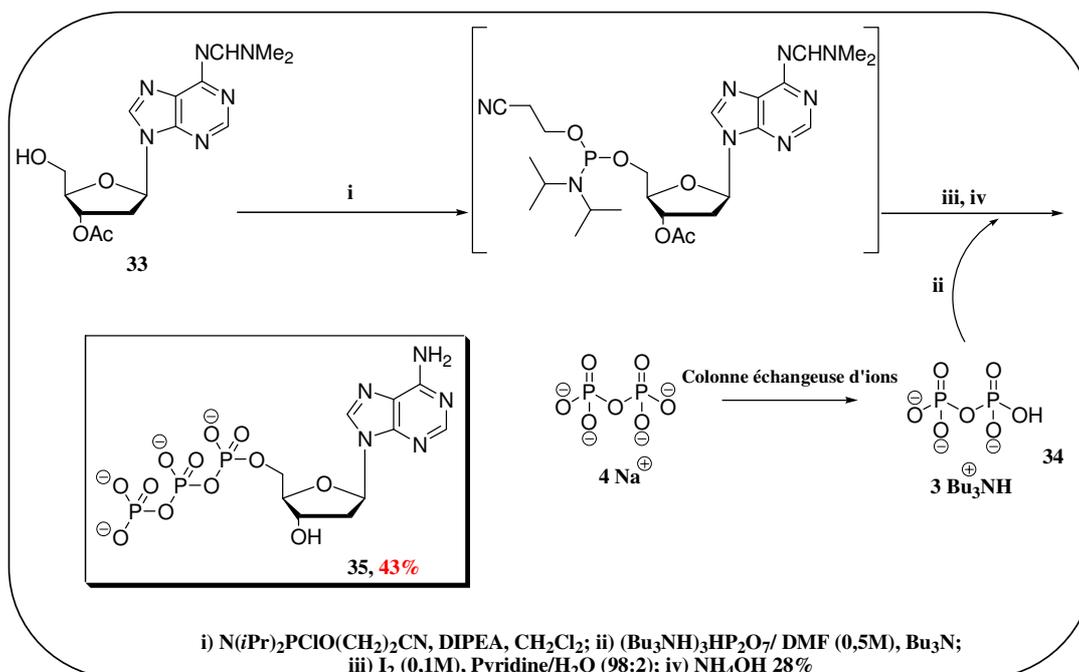


Schéma 16: Synthèse du 5'-triphosphate-dA en suivant une méthode d'activation directe basée sur la chimie des phosphoramidites.

L'alcool (**33**) préalablement séché, peut alors réagir avec le réactif de phosphorylation, à savoir le chloro-N,N'-diisopropyl-cyanoéthyl phosphoramidite en présence de DIPEA dans du CH_2Cl_2 . Au produit intermédiaire ainsi obtenu, est rajouté le pyrophosphate $(Bu_3NH)_3HP_2O_7$ (**34**) en solution dans la DMF et de la tributylamine. Après condensation et oxydation *in situ* avec une solution de I_2 à 0,1 M dans un mélange pyridine/ H_2O (98:2), l'ensemble des groupements protecteurs a été éliminé par traitement avec une solution d' NH_4OH à 28%. La dATP ainsi obtenue a été purifiée par CLHP, sur une colonne semi-préparative Zorbax RP-18 après élution par un gradient TEAB-MeOH. Le produit est obtenu sous la forme de sels triéthylammonium avec un rendement de 43% déterminé par UV.

Avant d'arriver à ce résultat, différentes conditions ont été essayées mais seules les conditions décrites précédemment nous ont permis d'accéder au triphosphate de la dA. la

formation de ce composé a été confirmée par RMN 31P puisque des déplacements caractéristiques ont été observés à -9,5; -10 et -20ppm.

Les différents paramètres que nous avons fait varier sont :

- * la nature du réactif de phosphitylation ($N(iPr)_2PClO(CH_2)_2CN$ ou $[N(iPr)_2]_2PO(CH_2)_2CN$)
- * la nature de l'agent d'activation basique (DIPEA) ou acide (sel de tétrazolium ou tétrazole)
- * la nature du pyrophosphate ($(Bu_3NH)_3HP_2O_7$ (**34**) ou $(Bu_4N)_3HP_2O_7$ (**36**))

La nature du pyrophosphate inorganique utilisé lors de cette dernière étape est très importante et notamment la nature du contre-ion. Notre choix s'est tourné dans un premier temps vers le pyrophosphate $(Bu_3NH)_3HP_2O_7$ puisqu'il semble être performant en terme de solubilité dans les solvants organiques mais également en terme d'efficacité de réaction. Il est important qu'à ce stade aucune trace d'eau ne soit présente. La quantité d'eau résiduelle présente dans la solution de pyrophosphate a d'ailleurs été évaluée par RMN et 3 molécules d'eau persistent après séchage [267].

Il apparaît à la suite de cette étude que la première étape est l'étape limitante de la séquence réactionnelle. En fonction du réactif de phosphitylation employé, les réactions sont plus ou moins faciles à suivre sur CCM de silice, mettant en avant une plus faible stabilité des phosphoramidites en 5' par rapport à leurs homologues en 3'. Nous avons aussi essayé de trouver les conditions réactionnelles compatibles avec l'utilisation du réactif phosphorodiamidite et cela en raison de sa compatibilité avec une plus large variété de modifications sur la dA. Cependant aucune de nos tentatives avec ce réactif n'a permis d'aboutir au triphosphate correspondant.

Les conditions ayant permis de synthétiser le triphosphate de la dA ont également été appliquée à la synthèse du triphosphate de la dT et des résultats comparables ont été obtenus.

Nous avons ensuite essayé d'appliquer ces conditions de synthèse à l'analogue de la dA le plus inerte d'un point de vue chimique, à savoir la 8edA, malheureusement sans succès. Aucune trace de l'analogue triphosphate n'a pu être décelée par CLHP.

Devant cet échec nous avons exploré la possibilité d'accéder aux analogues triphosphorylés en passant par un intermédiaire monophosphate selon le schéma rétrosynthétique suivant (schéma 17).

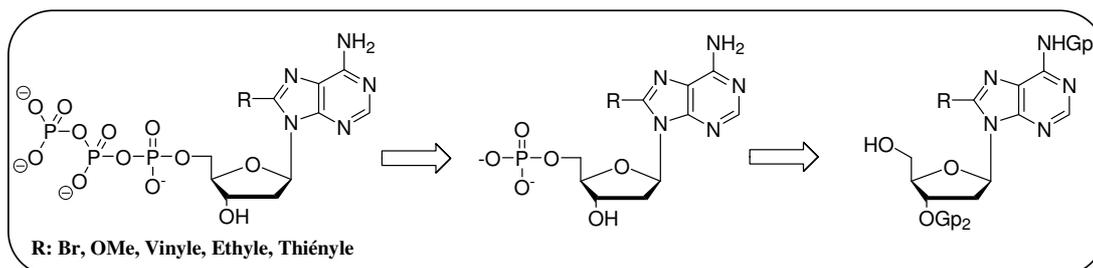


Schéma 17: Approche rétrosynthétique pour accéder aux triphosphates d'analogues modifiés via le passage par un intermédiaire monophosphate.

II. Essai de Synthèse des analogues de triphosphates à partir des analogues monophosphates

Pour explorer cette nouvelle voie, nous avons travaillé dans un premier temps avec deux dérivés de la dA, la 8vdA et la 8edA. Nous avons choisi ces deux composés comme étant les deux représentants, qui se situeraient aux deux extrémités de l'échelle de sensibilité de notre série d'analogues nucléosidiques.

Pour accéder aux monophosphates, différentes voies ont été préalablement explorées en solution avant de se tourner vers la synthèse en phase solide.

Nous exposerons donc dans un premier temps les efforts menés pour accéder aux monophosphates dérivés de la dA. Dans une deuxième partie, nous présenterons les voies d'activation du monophosphate qui ont été tentées pour accéder aux triphosphates correspondants.

2.1. Synthèse des monophosphates de la 8vdA et de la 8edA (8vdA-MP et 8edA-MP)

La chimie des phosphoramidites reste une méthode de choix pour travailler avec des bases modifiées, ainsi que nous l'avons déjà montré lors de la synthèse des phosphoramidites en 3' de la 8vdA, de la 8edA et de la 8thdA. C'est pour cela que nous avons pensé introduire le monophosphate en position 5', en mettant à profit l'ensemble des avantages offerts par la chimie du phosphore (III) en suivant le schéma rétrosynthétique suivant (schéma 18).

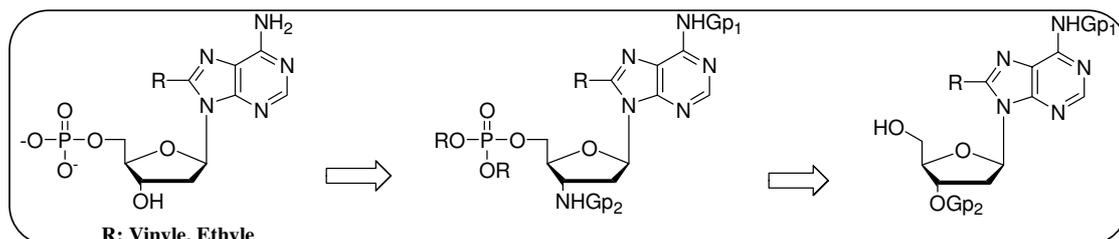


Schéma 18: Schéma rétrosynthétique envisagé pour accéder au monophosphate des dérivés vinyle et éthyle.

La synthèse de l'analogue monophosphate s'appuie sur la préparation du phosphotriester intermédiaire protégé et modifié en position 8 de la base par le groupement vinyle ou éthyle. La deprotection des groupements protecteurs adjacents permettra alors d'obtenir le monophosphate correspondant. Une étape supplémentaire d'hydrogénation de la double liaison sera nécessaire pour aboutir à l'analogue 8-éthyle. Pour explorer cette voie il était au préalable nécessaire de préparer les nucléosides protégés de façon adéquate sur les fonctions réactives autres que l'alcool en 5'.

2.1.1. Synthèse du monophosphate de la 8vdA (8vdA-MP)

2.1.1.1 Synthèse de l'intermédiaire avec l'alcool libre en 5' (39)

La grande réactivité et la sensibilité du groupe vinyle, nous ont incité à introduire cette fonctionnalité le plus tard possible dans le schéma de synthèse.

Pour pouvoir faire réagir le phosphoramidite avec l'alcool en 5' du désoxyribose, il est nécessaire au préalable de protéger les fonctions réactives, que ce soit l'amine en N6 ou l'hydroxyle en 3' (schéma 19). Pour cela nous avons retenu de protéger l'amine exocyclique du 5'-O-DMTr-8-bromo-2'dA (2), dont la synthèse est décrite dans le chapitre II, par traitement avec le *N,N'*-diméthylformamide diméthylacétal. L'intérêt de ce réactif a déjà été discuté dans le chapitre II. Quant à l'alcool en 3', le choix du groupement protecteur dépendait de plusieurs facteurs. D'une part le groupement protecteur doit être introduit assez facilement et de façon sélective au cours de la synthèse, et doit pouvoir être déprotégé dans des conditions basiques (l'hydroxyle en 5' protégé par le groupement DMTr, sera clivé dans des conditions acides). Les esters répondent à ces critères. Pour des raisons de solubilité, notre choix s'est porté sur l'anhydride isobutyrique qui a permis de protéger l'hydroxyle en 3' du composé (37) avec un rendement de 90%. La libération de la fonction réactive en 5' du

composé (38) s'est déroulée sans difficulté permettant d'obtenir le composé (39) avec un rendement de 83%.

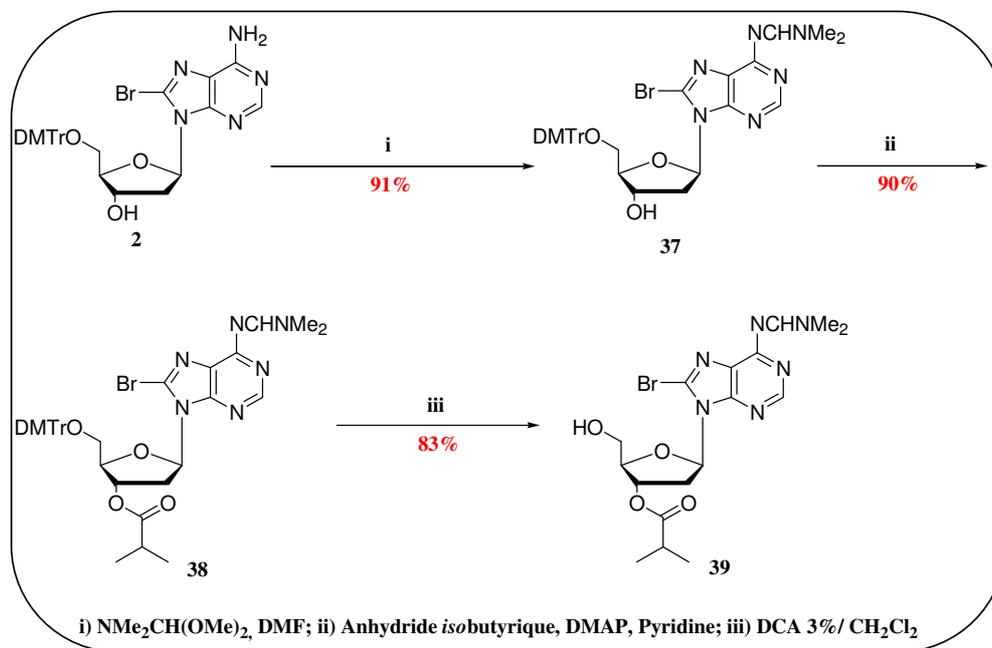


Schéma 19: Schéma de synthèse de l'alcool libre.

2.1.1.2. Synthèse du phosphotriester (40)

Une fois l'alcool en 5' libre et les fonctions réactives en N6 et 3' protégées, nous avons envisagé dans un premier temps d'accéder au phosphotriester en utilisant du *N,N'*diisopropylcyanoéthylphosphorodiamidite selon la voie A (schéma 20). Après phosphitylation, le phosphoramidite obtenu *in situ*, sera mis à réagir avec de l'hydroxypropionitrile et du tétrazole avant d'être finalement oxydé par le peroxyde de *tert*-butanol.

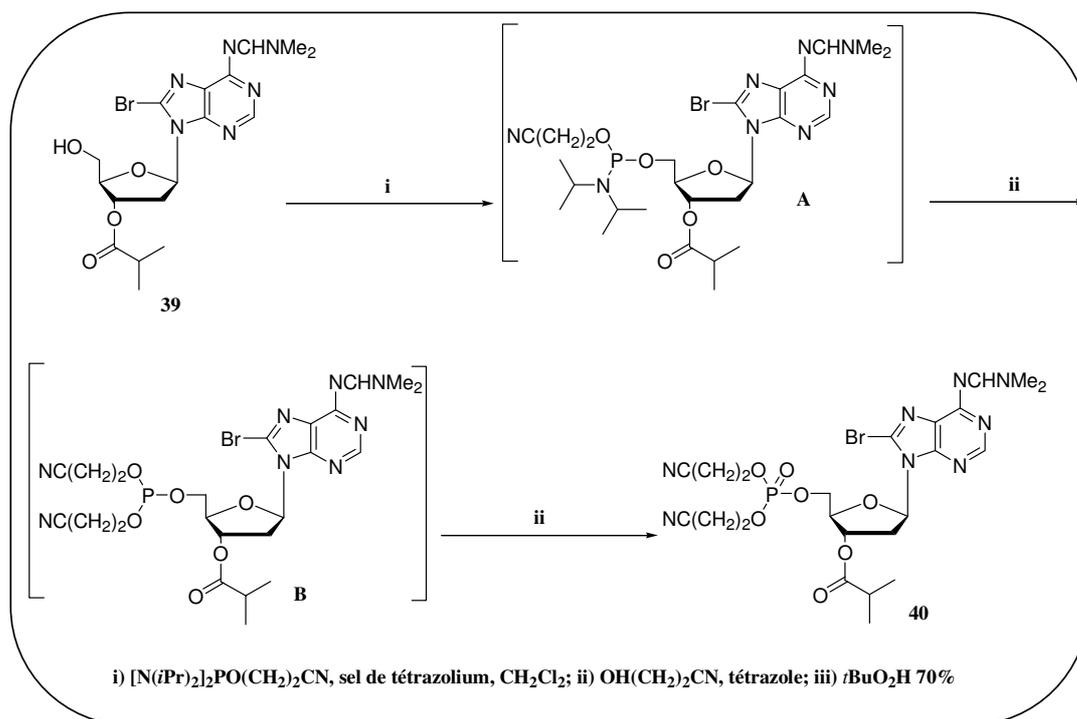


Schéma 20: Synthèse du phosphotriester selon la voie A.

Malheureusement, en suivant cette première voie de synthèse, nous n'avons pas pu obtenir le phosphotriester (40). Nous avons donc cherché à réduire la séquence réactionnelle en essayant d'obtenir directement l'intermédiaire (B) à partir de (39) (schéma 21). Le nouveau réactif de phosphorylation nécessaire à cette transformation a été préparé selon une procédure décrite dans la littérature. La méthode consiste à substituer l'atome de chlore du 2-cyanoethyl-*N,N'*-diisopropylchlorophosphoramidite par le groupement hydroxypropionitrile. Cette étape s'effectue sans difficultés en présence de DIPEA dans du CH_2Cl_2 . Le réactif (41) ainsi obtenu sera utilisé immédiatement dans la suite de la synthèse. Il peut également être gardé sous argon, à $-20^\circ C$ pendant quelques jours.

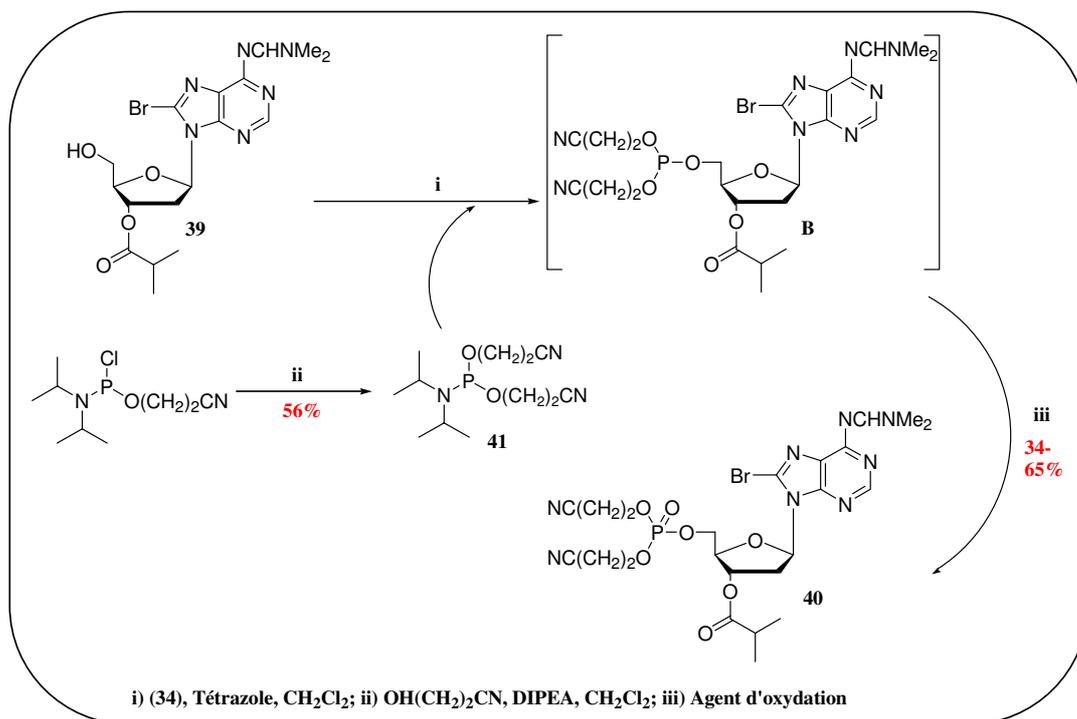


Schéma 21: Préparation du phosphotriester (**40**) en suivant la voie B.

Après phosphitylation, le phosphite intermédiaire a été oxydé avec une solution d' I_2 , de lutidine et d' H_2O dans le THF. Le phosphate triester (**40**) est isolé après purification avec un rendement de 65%. D'autres agents d'oxydation ont été essayés mais de moins bons résultats ont été obtenus. Les différentes conditions et résultats obtenus pour les voies A et B sont résumés ci-dessous (tableau 1).

<i>Conditions opératoires</i>	<i>Agent oxydant</i>	<i>Rendement</i>
1- $[\text{N}(\text{iPr})_2]\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{CN}$ sel de tétrazolium, CH_2Cl_2 2- $\text{OH}(\text{CH}_2)_2\text{CN}$, tétrazole	$t\text{BuO}_2\text{H}$	Produit non isolé
$\text{N}(\text{iPr})_2\text{P}[\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CN}]_2$	$t\text{BuO}_2\text{H}$	54%
	$m\text{CPBA}$	34%
	I_2 , lutidine, H_2O , THF	65%

Tableau 1: Récapitulatif des conditions expérimentales et des résultats obtenus en suivant les deux voies de synthèse.

2.1.1.3. Monophosphate de la 8-vinyl-dA (43)

Le phosphotriester bromé obtenu, il est nécessaire à présent d'introduire le groupement vinyle. Pour cela nous avons choisit de suivre les conditions déjà mise au point auparavant pour introduire le groupement vinyle grâce au couplage de Stille. Le produit (42) a été obtenu avec un rendement de 36% après purification (schéma 22).

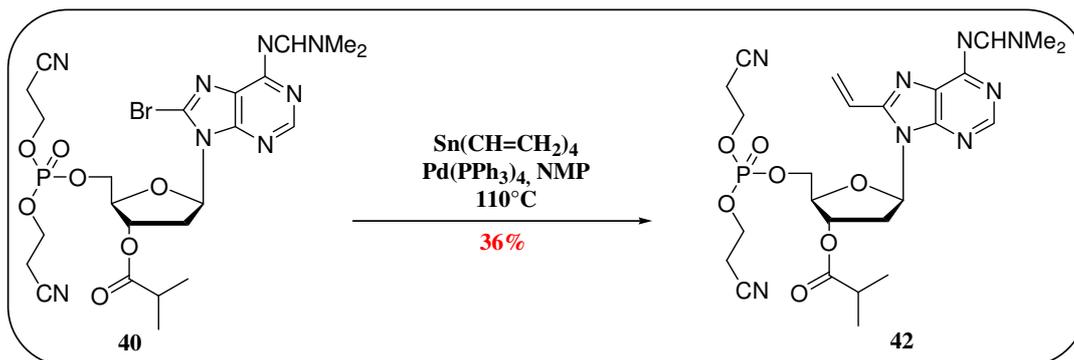


Schéma 22: Schéma de synthèse du phosphotriester de la 8vdA.

L'étape de déprotection finale permettant d'aboutir au monophosphate de la 8vdA, doit non seulement cliver les groupements cyanoéthyles mais également l'ensemble des groupements protecteurs de la base et du désoxyribose (schéma 23). Dans ce but une solution d' NH_4OH à 28% a été utilisée, mais outre la déprotection des groupements adjacents, elle n'aura permis de cliver qu'un seul groupement cyanoéthyle.

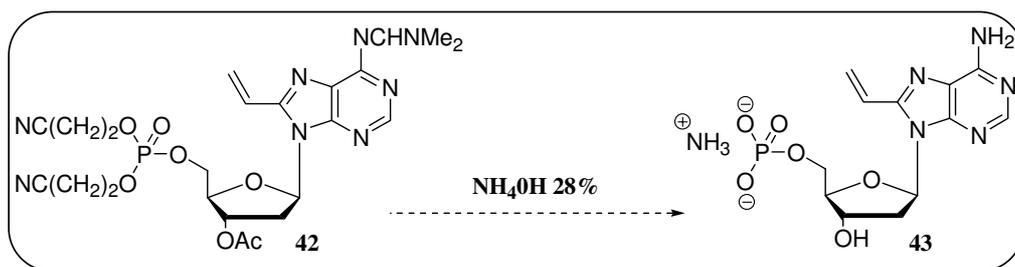


Schéma 23: Déprotection de l'ensemble des groupements protecteurs.

Ceci peut s'expliquer par une élimination rapide du premier groupement cyanoéthyle, (probablement *via* une élimination de type $\text{E}_{1\text{C}}\text{B}$), alors que l'élimination du deuxième groupement cyanoéthyle est plus difficile du fait que le phosphate diester est chargé négativement. En effet, le phosphore étant moins électrodéficient dans cet intermédiaire que

celui du phosphotriester, l'arrachement du proton moins acide est donc plus difficile. Par ailleurs, des répulsions de charge entre le phosphate diester chargé négativement et la base ne sont pas à exclure. Nous n'avons pas essayé de forcer les conditions car nous savions que le groupement vinyle ne le supporterait pas. La synthèse du dérivé monophosphate de la 8vdA (**42**) s'est donc arrêtée à ce stade.

2.1.2 Monophosphate de la 8-éthyle-dA (8edAMP, **47**)

Face à l'échec rencontré lors de la synthèse du monophosphate de la 8vdA et vue l'instabilité de ce composé, nous avons concentré nos efforts sur la 8edA. Pour accéder à la 8edA-MP nous avons choisi un réactif de phosphitylation substitué par des groupements benzyles. Une fois le phosphate triester obtenu, les benzyles pourront être éliminés par hydrogénolyse. Nous n'avons pas retenu ce réactif pour la 8vdA, car cette étape finale n'est pas compatible avec la présence d'une double liaison.

2.1.2.1 Préparation du dérivé de la 8edA avec l'alcool libre en 5' (**45**)

Nous avons suivie la même stratégie de synthèse adoptée à la préparation des alcools libre en 5' de la dA ou de la 8vdA, à savoir une protection transitoire de l'hydroxyle en 5', suivie de la protection de l'hydroxyle en 3' cette fois-ci par un groupement acétylé (schéma 24). Le composé (**44**) est obtenu avec un rendement de 82%. Le groupement DMTr peut alors être éliminé dans les conditions usuelles (DCA à 3% dans du CH₂Cl₂) et le composé (**45**) est obtenu avec un rendement de 98%.

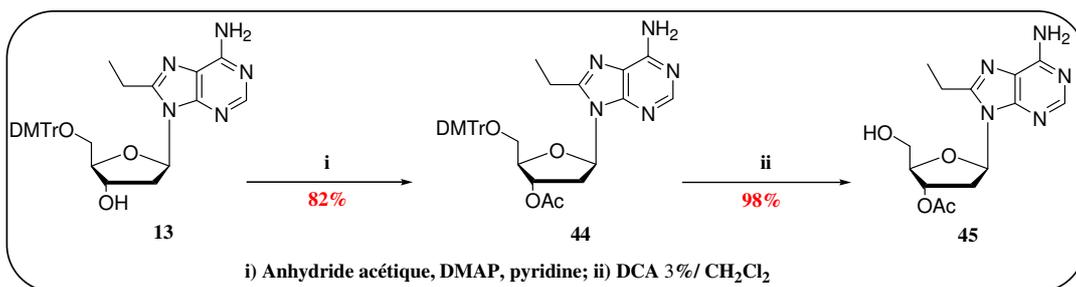


Schéma 24: Synthèse du dérivé de la 8edA avec l'alcool libre.

2.1.2.2. Phosphotriester de la 8edA (46)

Face aux résultats obtenus lors de la préparation du monophosphate de la 8vdA, nous avons choisi de modifier la nature du réactif de phosphitylation en remplaçant le réactif *N,N'*-diisopropyl-dicyanoéthylphosphoramidite (**41**) par le dibenzyl-*N,N'*-diisopropylphosphoramidite, commercial. La réaction nécessite également d'être effectuée dans des conditions totalement anhydres et inertes, mais également à basse température, pour éviter toute réaction entre l'amine exocyclique en N6 de la dA et le réactif de phosphitylation. Le phosphite ainsi obtenu *in situ* est alors oxydé en présence de *t*BuO₂H à 70%, à basse température, permettant ainsi d'obtenir le composé (**46**) avec un rendement de 70% (schéma 25).

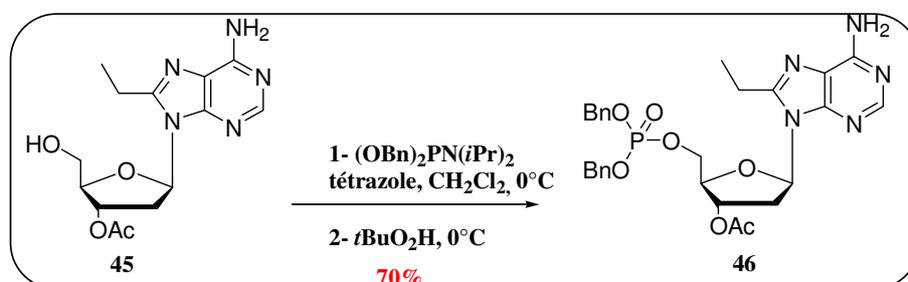


Schéma 25: Synthèse du phosphotriester de la 8edA.

2.1.2.3. Synthèse du monophosphate de la 8edA (47)

La déprotection des groupements benzyles est la dernière étape pour obtenir le monophosphate de la 8edA. Cette étape s'effectue en présence de Pd/C dans l'EtOH, et de 2 équivalents d'NaHCO₃, sous pression d'hydrogène. Dans ces conditions le monophosphate de la 8edA (**47**) est obtenu avec un rendement de 86% (schéma 26).

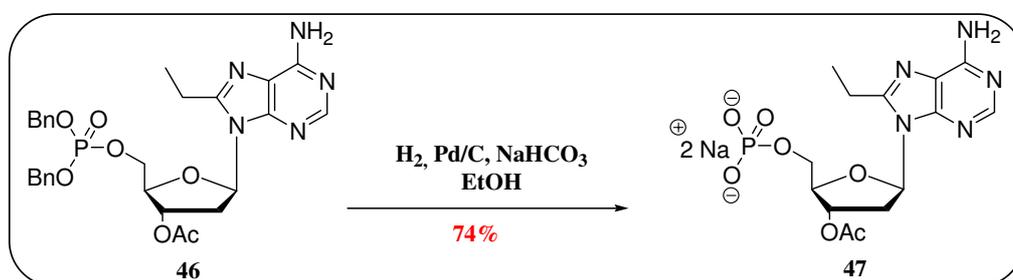


Schéma 26 : Synthèse du dérivé 8edAMP.

La chimie des phosphoramidites a été employée avec succès dans la synthèse du phosphate monoester de la 8edA (47). Elle s'est révélée compatible avec la préparation du phosphotriester de la 8vdA. Malheureusement, en suivant cette stratégie de synthèse nous n'avons pas pu accéder au monophosphate de la 8vdA. Toutefois, ces deux exemples montrent qu'il nous a fallu adapter la synthèse à chaque analogue nucléosidique, ce qui devient très vite contraignant lorsqu'on souhaite préparer des monophosphates sur une famille plus large de molécules.

Nous avons donc cherché à développer une méthode de synthèse qui soit d'application plus généralisable afin de pouvoir accéder aux monophosphates de nos composés. Pour atteindre ce but, nous avons exploité la chimie des *H*-phosphonates.

2.2. La chimie des phosphonates, une alternative à la chimie des phosphoramidites ?

2.2.1. Caractéristiques et avantages des *H*-phosphonates [301]

La chimie des *H*-phosphonates représente une méthode alternative à la chimie des phosphoramidites pour accéder aux oligonucléotides [302, 303]. Les applications sont restées cependant plus limitées que celle de la chimie des phosphoramidites. Les *H*-phosphonates ont connu un très large essor d'une part grâce aux travaux menés par Stawinski et Kraszewski [304-307] dans le développement de méthodes de synthèse visant à préparer des analogues de nucléotides, d'autre part à ceux de Reese et *al.* [308-313] qui se sont surtout intéressés à développer la chimie des phosphonates pour la synthèse d'oligonucléotides. Un des avantages de cette chimie est qu'elle ne nécessite pas l'utilisation de groupements protecteurs au niveau de l'amine exocyclique des bases puriques [314].

Les *H*-phosphonates peuvent être classés comme des molécules hybrides entre les phosphates et les phosphites. Leurs structure tétraédrique et la présence d'une liaison P=O leurs confèrent une analogie avec les phosphates où le phosphore est au degré d'oxydation (V). Même s'ils ne possèdent pas de paire d'électron libre sous cette forme, leur degré d'oxydation est bel et bien (III), une caractéristique des phosphites. Les *H*-phosphonates se distinguent de ces deux familles de composés, par la présence de la liaison P-H, à l'origine de leur appellation.

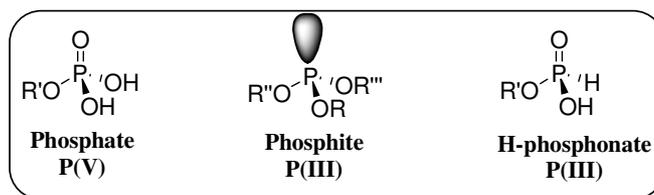


Figure 2: Structure d'un phosphate, d'un phosphite et d'un *H*-Phosphonate

La chimie des *H*-phosphonates présente un certain nombre d'avantages qui la rend très intéressante par rapport à la chimie des phosphates et des phosphoramidites. En effet, les dérivés du phosphore (III) sont extrêmement réactifs, sensibles à l'hydrolyse et peuvent s'oxyder de façon spontanée en présence de l'oxygène de l'air. Les dérivés du phosphore (V) quant à eux, sont très stables, faciles à manipuler, mais leur très faible réactivité, même en présence d'agent de condensation, limite leur utilisation.

Les *H*-phosphonates apparaissent comme une molécule hybride entre les dérivés du P(III) et P(V). Sous certaines conditions, ils peuvent être facilement oxydés, alors que sous d'autres, l'absence de la paire d'électrons libre, leur confère une plus grande résistance à des réactions d'oxydation spontanées ainsi qu'une plus grande stabilité aux conditions acides.

Il est également à noter qu'en solution, les *H*-phosphonates sont en équilibre tautomérique avec un phosphite tricoordiné [315].

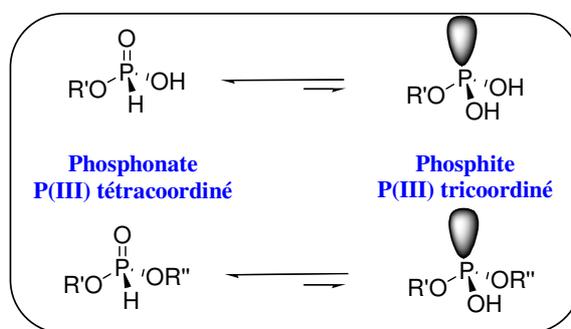


Schéma 27: Représentation de l'équilibre qui s'établit entre les deux formes tautomères *H*-phosphonates et phosphite.

L'équilibre est cependant très fortement déplacé vers la gauche [316], au profit de la forme *H*-phosphonate qui déterminera la réactivité de l'espèce. En fonction de l'espèce tautomère considéré, le centre phosphoré aura un caractère électrophile ou nucléophile. Cette dernière caractéristique peut d'ailleurs être favorisée notamment grâce à des agents de silylation.

Nous avons ainsi choisi d'explorer la chimie des *H*-phosphonates pour accéder aux analogues monophosphates des dérivés de la dA modifiés en position 8 en suivant le schéma rétrosynthétique décrit ci-dessous (schéma 28).

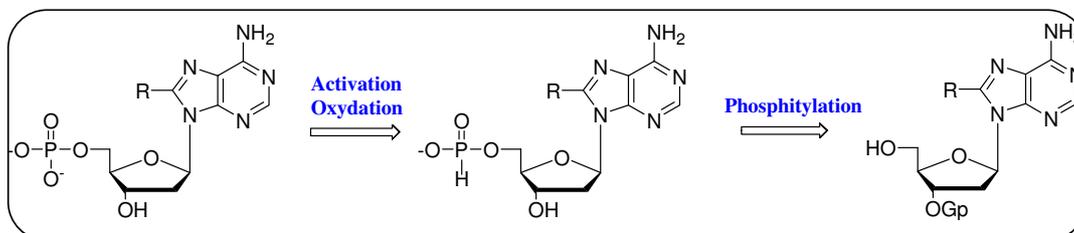


Schéma 28 : Schéma rétrosynthétique permettant l'accès aux analogues monophosphates à partir des *H*-phosphonates.

2.2.2 Synthèse des dérivés *H*-phosphonates en 5'; application à la dA

Différentes méthodes ont été développées pour accéder aux *H*-phosphonates, essentiellement en position 3' du ribose ou du désoxyribose. Elles reposent sur l'utilisation de réactifs tels que PCl_3 /azole (triazole, imidazole...) [317], de salicylchlorophosphite [318, 319], de *H*-pyrophosphonates [320] ou de diphénylphosphite [304].

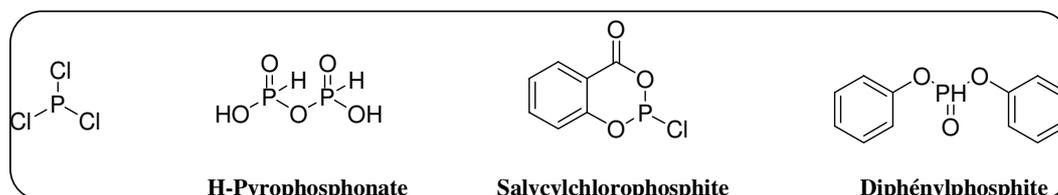


Figure 3 : Les différents agents de phosphonylation.

Le diphényl-*H*-phosphonate a particulièrement retenu notre attention puisqu'en plus d'avoir déjà montré son efficacité lors de la synthèse de dinucléoside *H*-phosphonates [304] et de nucléosides 3'-*H*-phosphonate [321], il est totalement inerte vis-à-vis des amines exocycliques. Ce réactif est également commercial, et peu coûteux. Nous avons dans un premier temps repris la méthode déjà décrite pour la synthèse du nucléoside 3'-*H*-phosphonate à la dA (**48**) selon le schéma 29.

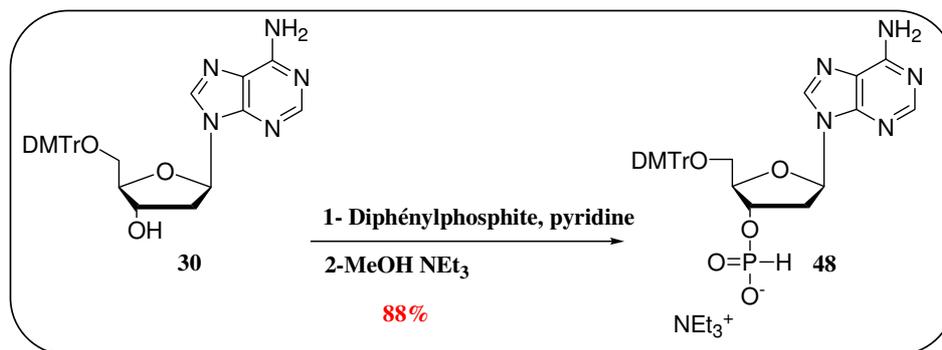


Schéma 29: Synthèse du phosphonate en 3' de la dA.

Le dérivé de la dA avec l'alcool libre en 3' (**30**) est mis à réagir avec un excès de diphénylphosphite dans la pyridine. Après hydrolyse, le produit (**48**) est facilement isolé par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 88%.

Nous pouvons à présent envisager de transposer cette méthode à la synthèse du dérivé *H*-phosphonate de la dA, en position 5' cette fois-ci, selon le schéma 30.

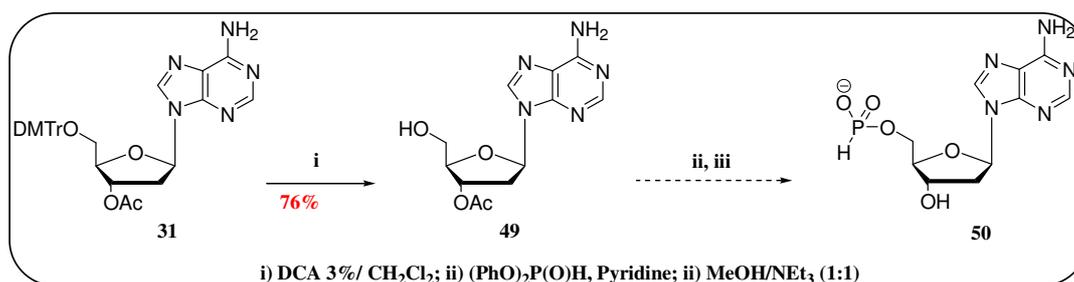


Schéma 30 : Synthèse du phosphonate de la dA.

La réaction telle qu'elle est décrite, préconise l'utilisation d'un très large excès de réactif de phosphorylation pour éviter la formation de composés dinucléoside *H*-phosphonate. Malgré cela, l'alcool de départ (**49**) n'a pas pu être consommé dans sa totalité. Nous avons donc cherché dans un premier temps à augmenter les vitesses de réaction en ajoutant au milieu réactionnel de l'imidazole. Ce choix a été fructueux puisque la totalité du réactif de départ a été consommé et une augmentation de la vitesse de réaction a été observée. La présence de NMI a d'ailleurs permis d'aboutir aux mêmes observations.

Cependant un deuxième problème s'est très vite posé à nous lors de l'isolement du composé (**50**). En effet le dérivé 5'-*H*-phosphonate soluble uniquement que dans l'eau, nous n'avons pas pu le purifier par chromatographie sur gel de silice.

La conversion étant totale, nous avons essayé de l'isoler en procédant à des extractions du produit d'hydrolyse du réactif de phosphorylation utilisé en excès avec différents solvants organiques (CH_2Cl_2 , CHCl_3 , Et_2O , Cyclohexane), mais sans succès.

Il nous est apparu dès lors que les conditions qui avaient été adaptées à la position 3' sont difficiles à transposer à la position 5' du nucléoside. En effet dans notre cas on perd le bénéfice du groupement DMTr qui apporte un caractère lipophile supplémentaire, facilitant ainsi la purification du produit.

Il était donc nécessaire de trouver une autre approche pour accéder à ces composés sans que l'utilisation de réactifs en excès ne soit un problème. La synthèse en phase solide devrait nous permettre de contourner cette difficulté. En effet l'utilisation du réactif de phosphorylation utilisé en excès pourra être facilement éliminé par lavage puisque le *H*-phosphonate de nucléoside sera fixé sur le support solide.

Nous avons donc cherché à mettre au point une nouvelle méthode de synthèse sur phase solide qui permette d'obtenir les analogues de la dA modifiés en position 8, sous la forme monophosphate, à partir des analogues *H*-phosphonates (schéma 31). Un objectif ultérieur serait aussi de pouvoir accéder aux analogues triphosphorylés toujours en bénéficiant de ces avantages.

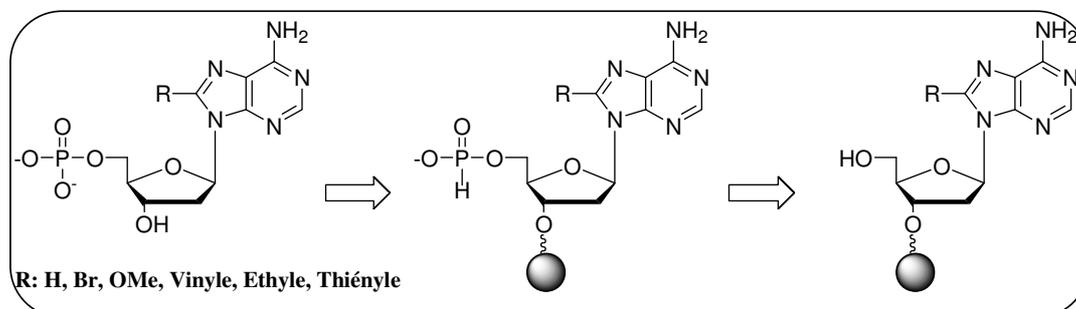


Schéma 31 : Schéma rétrosynthétique envisagé pour accéder aux dérivés triphosphates de la dA grâce à la synthèse en phase solide et à la chimie des *H*-phosphonates.

2.2.3. Synthèse des analogues de nucléotides de la dA en phase solide

Dans le but de préparer l'analogue phosphonate en 5' de la dA, nous nous sommes tournés vers la synthèse en phase solide et cela en raison des nombreux avantages qu'elle présente :

- ✓ Les réactifs peuvent être utilisés en très large excès car ils peuvent être éliminés de la résine par simple lavage.
- ✓ Les produits peuvent être obtenus après clivage de la résine avec une pureté satisfaisante ne nécessitant pas le recours à des étapes de purification supplémentaires.
- ✓ La résine peut être fractionnée, ce qui offre la possibilité d'effectuer plusieurs tests de façon parallèle assurant un gain en temps important.

Cette partie du manuscrit sera consacrée à la présentation de la méthode de synthèse mise au point sur support solide et permettant d'accéder aux analogues monophosphates des dérivés de la dA selon le schéma 32 envisagé ci-dessous. Nous présenterons tout d'abord les résines utilisées, ainsi que les monomères synthétisés avant d'aborder plus longuement la mise au point des conditions opératoires nécessaires à l'obtention de ces composés.

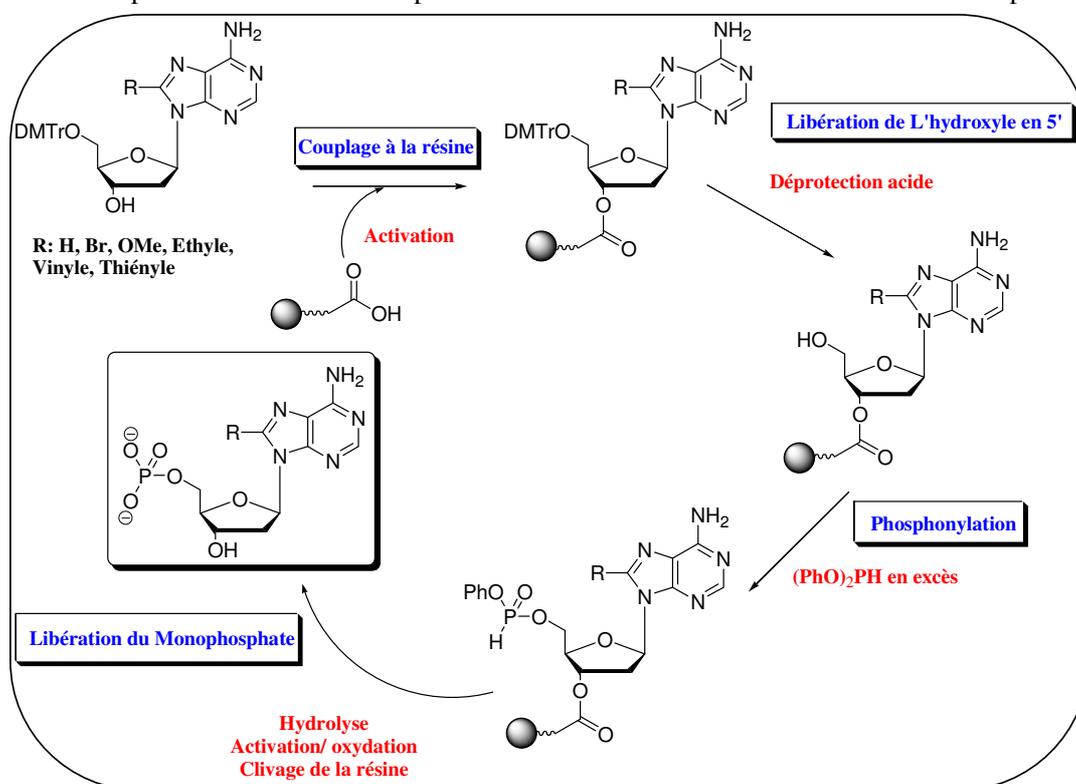


Schéma 32: Schéma de synthèse général pour accéder aux analogues monophosphates de la dA.

2.2.3.1. Le choix de la résine

Lorsque nous avons abordé la synthèse de nucléotide en phase solide, très peu d'exemples dans la littérature étaient décrits. Parmi les différentes résines disponibles, nous

avons choisi deux résines: d'une part la Tentagel®, largement développée par Rapp et Bayer [322] dont l'utilisation a été appliquée à la synthèse de 5'-phosphodiester et de 5'-phosphoramidate [323], mais également à des oligonucléotides [324]. D'autre part la LCAA-CPG déjà bien étudiée pour la synthèse d'oligonucléotides.

La résine Tentagel® (figure 4) est formée d'une matrice polystyrène (PS) sur laquelle est greffé *via* un bras alkyle, un bras espaceur (POE) de type polyéthylène glycol (PEG). Cette organisation lui confère des caractéristiques à la fois hydrophobes et hydrophiles. Le bras PEG représentant 50 à 70% du poids de la résine, la Tentagel® possède des propriétés très proches d'une résine de type purement polyéthylène glycol.

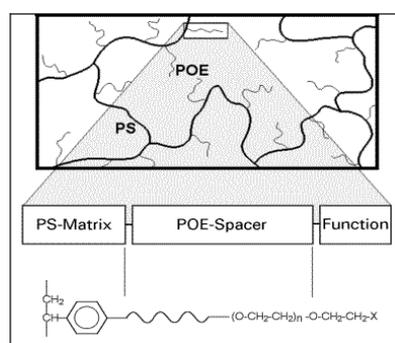


Figure 4: Représentation schématique de la résine Tentagel®.

La LCAA-CPG quant à elle (déjà présentée dans le chapitre II), est une résine à base de silice dont la taille des pores ainsi que celle du bras espaceur sont bien définies.

2.2.3.2. Fonctionnalisation de la LCAA-CPG-NH₂

La résine Tentagel® que nous avons utilisée est commercialisée avec un bras PEG fonctionnalisé par un groupement acide carboxylique, alors que la LCAA-CPG est vendue quant à elle avec une extrémité NH₂ terminale, il a donc fallu fonctionnaliser cette dernière.

Deux stratégies de synthèse permettent de coupler un nucléoside à une résine possédant une extrémité NH₂. La première voie (voie A) consiste à faire réagir de l'anhydride succinique avec l'extrémité NH₂ de la résine. Cette étape assez facile permet d'obtenir la résine modifiée par un bras à extrémité CO₂H. Elle pourra alors réagir, avec l'hydroxyle en 3' du nucléoside. Cette étape nécessite une activation au préalable. La deuxième stratégie quant à elle consiste à rajouter le lien succinique directement sur le nucléoside en 3' [325]. Le nucléoside modifié ainsi obtenu, pourra alors réagir avec l'extrémité NH₂ de la résine en suivant la voie B (schéma 33). La première étape de cette voie présente cependant quelques

inconvenients tels qu'une vitesse de réaction assez lente (temps de réaction >24h), le produit n'est pas toujours facile à isoler (purification assez fastidieuse) pour des rendements généralement faibles. De plus cette voie suppose de modifier le nucléoside, ce qui est plus contraignant. Par contre la réactivité des amines étant plus élevée que celle des alcools, le couplage du nucléoside modifié sur la résine est plus facile à réaliser.

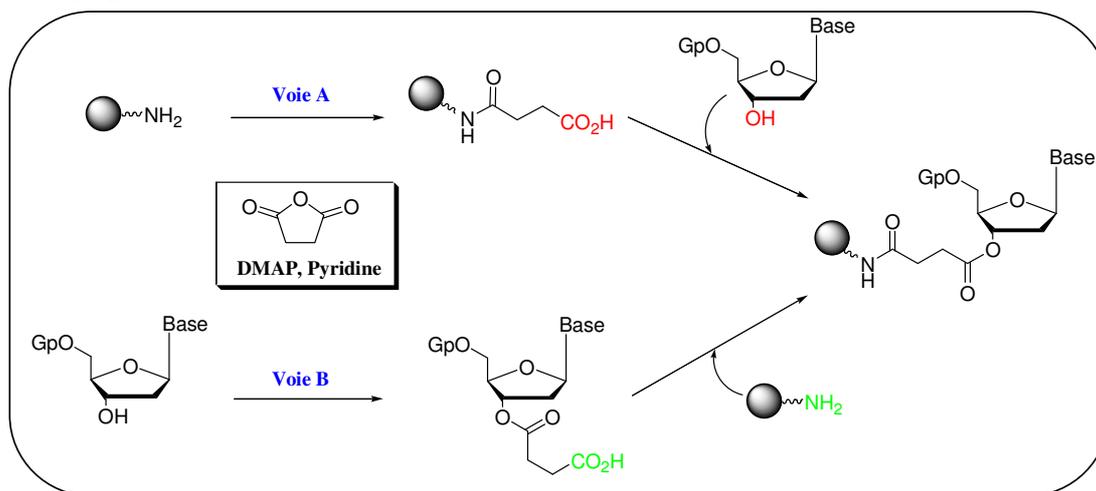


Schéma 33 : Les deux stratégies permettant de coupler un premier nucléoside sur une résine possédant une extrémité NH_2 .

Une méthode récemment décrite dans la littérature a particulièrement retenue notre attention. La CPG- NH_2 peut être fonctionnalisée grâce à une activation sous micro-ondes, en présence d'anhydride succinique, de DMAP dans la DMF (schéma 34) [326]. Cette nouvelle méthode d'activation a été appliquée à la LCAA-CPG- NH_2 et les résultats ont été satisfaisants puisque aucune dégradation de la résine n'a été observée. Nous avons également vérifié que l'ensemble des fonctions amine était fonctionnalisé grâce au test de Kaiser [327].

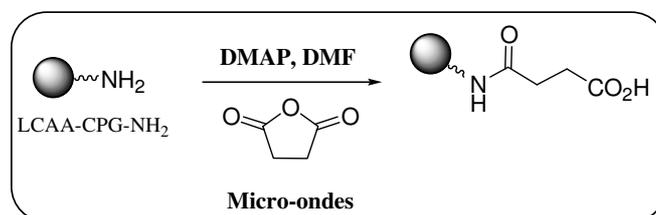


Schéma 34 : Fonctionnalisation de la LCAA-CPG- NH_2 sous micro-ondes.

2.2.3.3. Synthèse des monomères

Les groupements phosphorylés (phosphonates ou monophosphates) doivent être introduit en position 5', aussi le nucléoside modifié sera-t-il fixé sur la résine Tentagel@S-CO₂H ou LCAA-CPG-CO₂H par son extrémité 3'. Pour qu'il n'y ait pas de compétition entre les hydroxyles 3' et 5', une protection sélective de l'hydroxyle en 5' par le groupement DMTr a été nécessaire. Cette protection est assez facile à mettre en œuvre que ce soit pour les nucléosides modèles ou modifiés et nous permettra de déterminer par la suite l'efficacité de couplage sur la résine grâce à un test colorimétrique. La préparation des nucléosides (2), (3) et (10) protégés par le groupement DMTr a déjà été décrite dans le chapitre II alors que le composé (13) a été décrit dans le chapitre III. Le monomère DMTr de la dT (51) a été préparé selon les conditions classiques à savoir en présence de DMTrCl, DMAP dans la pyridine.

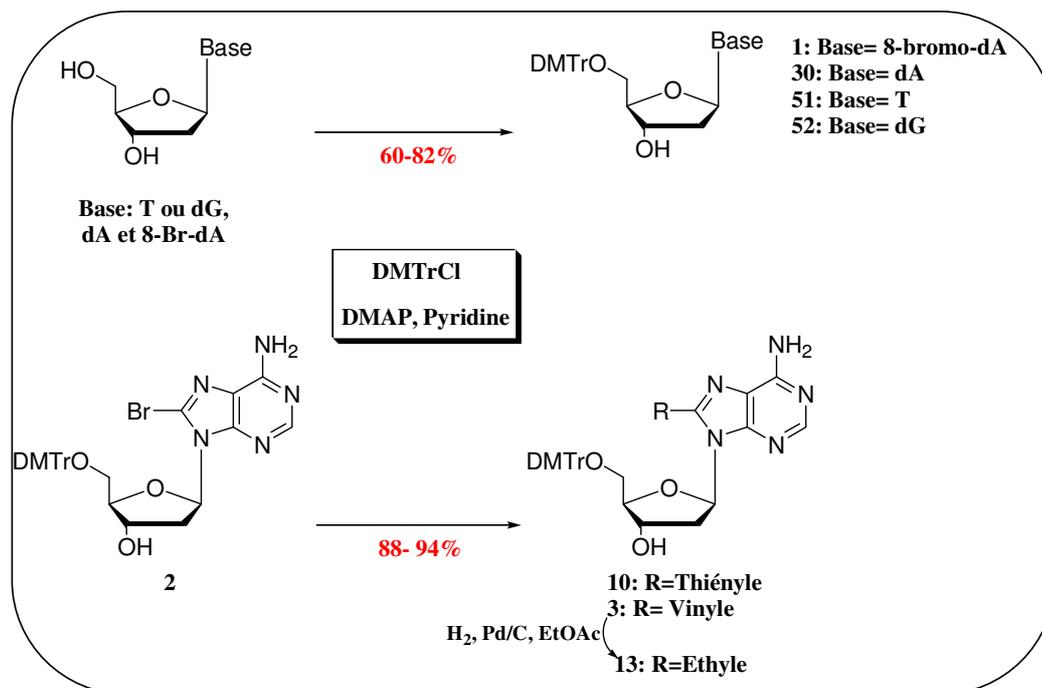


Schéma 35 : Schéma de synthèse des monomères destinés à la phase solide.

En appliquant ces conditions réactionnelles à la synthèse de la désoxyguanosine (dG, 52), une double protection de l'hydroxyle en 5' et de l'amine exocyclique a été observée. Cela ne devrait pas poser de problème dans la suite des réactions sur la phase solide.

Quant au dérivé 8-methoxy-5'-O-DMTr-2'-dA (53), les conditions décrites dans la littérature [235] ne n'ont pas permis de l'obtenir. En effet sous ces conditions, seul le produit

doublement protégé en 3' et 5' a été obtenu. Une des raisons est que la DMAP est connue pour augmenter fortement les cinétiques de protection. Nous avons donc repris cette réaction mais sans ajouter la DMAP au milieu réactionnel afin de ralentir les vitesses de protection [235]. Le résultat a été cependant identique. La faible différence de réactivité entre les hydroxyles primaires et secondaires (5' et 3' respectivement) pourrait être due à la formation d'une liaison hydrogène entre l'alcool primaire et l'oxygène du groupement méthoxy de la base. Pour contourner cette difficulté de synthèse nous avons choisi de modifier la séquence réactionnelle en substituant l'atome de brome de la 8-bromo-5'-O-DMTr-dA (**2**) par le groupement méthoxy (schéma 36). Dans ces conditions le composé (**53**) est obtenu sans difficulté avec un rendement de 85%.

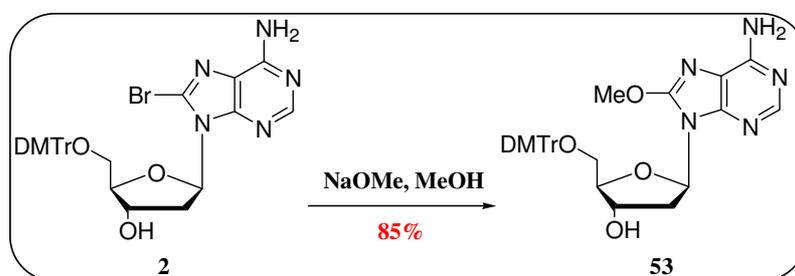


Schéma 36 : Synthèse du 8-OMe-5'-O-DMTr-2'dA (**53**).

Les monomères ainsi préparés, il ne restait plus qu'à les coupler à la résine par leur hydroxyle libre en 3'.

2.2.3.4. Couplage des monomères à la résine

Toutes les étapes de mise au point de la synthèse en phase solide ont été réalisées sur la Tentagel®CO₂H et appliquées par la suite à la LCAA-CPG. C'est pour cela que je ne présenterais que les résultats obtenus avec la Tentagel®CO₂H.

Un certain nombre d'agents de couplage commerciaux sont disponibles. Outre les agents de couplage usuels, tels que l'EDC et le DCC dont l'utilisation est aujourd'hui moins fréquente en raison de leur toxicité et des produits secondaires formés, d'autres agents de couplage dérivés d'uronium ou de phosphonium, tels que le HBTU, le HATU, le BrOP ou PyBrOP sont de plus en plus utilisés. Ces agents de couplage stables sont non hygroscopiques et surtout faciles à manipuler. Ils ont connu un réel essor grâce à leur utilisation massive en

synthèse peptidique [328, 329] ou de PNA [330-332]. Ils nécessitent cependant l'utilisation d'additifs tels que la DMAP ou HOBt [333].

Le couple HBTU/ DMAP dans CH₃CN a déjà été utilisé à cet usage [333]. Il a donc été retenu pour les premiers essais de mise au point sur la résine Tentagel® (taux de greffage de 0,2-0,3mmol/g) avec de la dT selon le schéma 37.

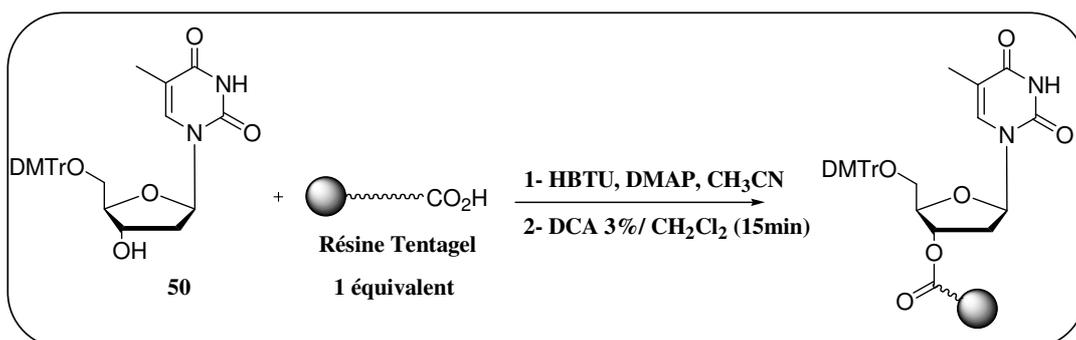


Schéma 37: Mise au point des conditions de couplage de la dT sur la résine Tentagel®.

Une fois le monomère fixé sur la résine, l'alcool en 5' est alors libéré. Cette étape est primordiale puisqu'elle permet lors de l'élimination du groupement DMTr, de déterminer le rendement de couplage de chaque monomère. Dans ce but un mélange de DCA à 3% dans du CH₂Cl₂ (v: v) a été utilisé. Le cation trityle ainsi libéré (λ_{max} : 504 nm, ϵ : 71700 M⁻¹.cm⁻¹), de couleur orange caractéristique, permet de déterminer le rendement de couplage par mesure d'absorbance. Les différentes conditions expérimentées avec de la 5'-O-DMTr-dT (**51**) sont données dans le tableau 2 qui suit.

<i>Pour 250mg de résine (capacité: 0,05mmol)</i>	<i>Nucléoside (51)</i>	<i>HBTU/ DMAP</i>	<i>Temps de couplage</i>	<i>Rendement de couplage</i>
Essai N° 1	4eq	4eq/ 4eq	1h	18,7%
Essai N°2	4eq	8eq/8eq	2h	48%
Essai N°3	4eq	16eq/16eq	2h	90%

Tableau 2: Récapitulatif des différentes conditions de couplage tentées avec le composé (**51**).

Les meilleurs rendements de couplage ont été obtenus dans l'essai 3. Nous avons donc appliqué ces conditions à l'ensemble de nos composés et obtenus des rendements comparables. Les résultats sont résumés dans le schéma 38.

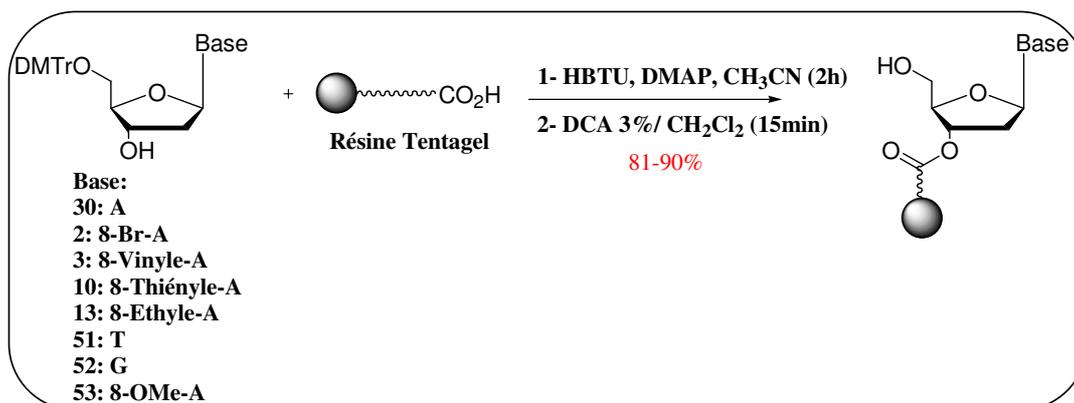


Schéma 38: Couplage des différents monomères sur la résine Tentagel®.

2.2.3.5. Synthèse des dérivés *H*-phosphonates

Les conditions de phosphorylation tentées en phase liquide ont été appliquées à la synthèse en phase solide des dérivés *H*-phosphonates. A nouveau la réaction a été préalablement essayée sur la dT et la dA et étendue par la suite à la synthèse des analogues modifiés. Ainsi un mélange de diphenylphosphite (40eq) et d'imidazole (10eq) dans la pyridine a été préparé et ajouté à la résine. Les analogues phosphonates ont été obtenus après clivage de la résine par traitement avec une solution d' NH_4OH à 28% (schéma 39).

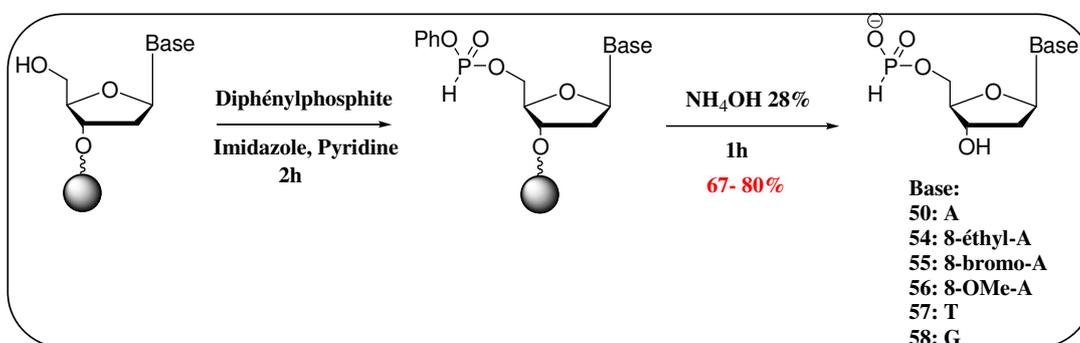


Schéma 39: Synthèse des dérivés 5'-*H*-phosphonates de nucléoside.

Une étude cinétique a été menée dans le but de déterminer la vitesse de déprotection de l'analogue phosphonate de la résine (figure 5). Pour cela des aliquotes de résine ont été traités sur différents intervalles de temps avec une solution d' NH_4OH à 28%. L'absorbance du phosphonate de la dA en solution est mesurée à 260nm.

Après un temps de latence de 10min, le phosphonate de nucléoside commence à s'accumuler en solution. Au bout de 30min, l'absorbance commence à varier plus faiblement

et atteint un plateau après 45min. Nous avons donc retenu un temps de déprotection d'une heure pour cliver les analogues *H*-phosphonates de la résine.

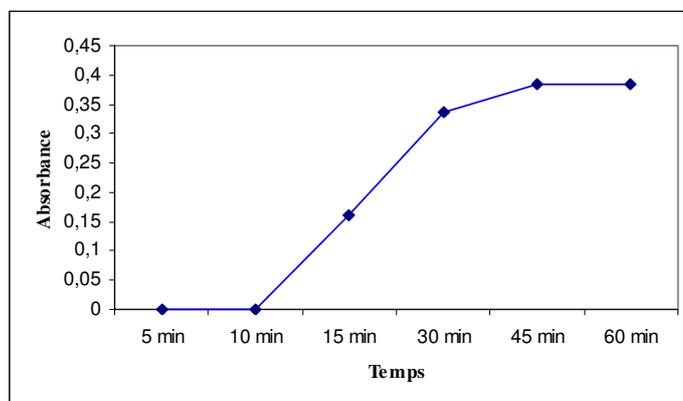


Figure 5: Cinétique de clivage du phosphonate de la dA par traitement de la résine avec une solution ammoniacale à 28%.

A l'exception de la 8vdA et de la 8thdA, les phosphonates ont été obtenus avec un bon rendement satisfaisant de 67 à 80% et une pureté supérieure à 94% (déterminée par CLHP) la formation des 5'-*H*-phosphonates a pu être confirmée par RMN ^1H , ^{31}P , puisqu'un déplacement caractéristique aux environs de 6ppm sous la forme d'un doublet est observé. Les 5'-*H*-phosphonates ont également été caractérisés par UV, MS, et CLHP.

Le tableau 3 récapitule les rendements de couplage, de réaction ainsi que les données issues de l'analyse par CLHP des produits obtenus directement après clivage de la résine.

<i>Composé</i>	<i>Rendement de couplage</i>	<i>Rendement de synthèse</i>	<i>Pureté relative</i>
<i>50 (R:H)</i>	87%	67%	100%
<i>54 (R: Ethyle)</i>	85%	80%	99,5%
<i>55 (R: Br)</i>	81%	67%	96%
<i>56(R: OMe)</i>	83%	70%	90%
<i>57 (dT)</i>	90%	73%	94,5%
<i>58 (dG)</i>	86%	70%	100%

Tableau 3: Récapitulatif de la pureté et des rendements de couplage et de synthèse des dérivés *H*-phosphonate de nucléosides.

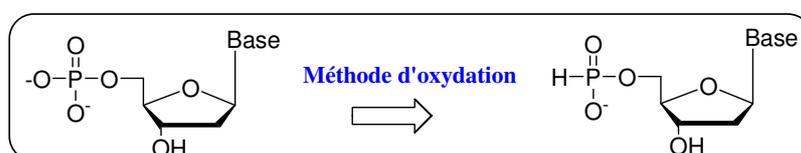
La phase solide s'est avérée être une méthode efficace pour préparer des dérivés 5'-*H*-phosphonates de nucléosides naturels mais aussi pour certains de nos dérivés modifiés en

position 8 de la dA. Nous avons dès lors poursuivis dans cette voie afin de préparer les analogues correspondants sous leur forme monophosphate.

2.3. Synthèse des nucléosides monophosphates sur support solide

Comme nous l'avons déjà mentionné auparavant, les *H*-phosphonates peuvent être facilement oxydés en choisissant des conditions appropriées. Avant d'exposer la méthode employée à la préparation des monophosphates correspondants à partir des phosphonates, je ferai un rappel bibliographique des différentes techniques d'oxydation des *H*-phosphonates.

2.3.1 Les méthodes d'oxydation des *H*-phosphonates



Il est à noter que les *H*-phosphonates sont difficile à oxyder dans les conditions standard d'oxydation des phosphites, comme par exemple en présence d'I₂, un réactif très fréquemment utilisé lors de la synthèse d'oligonucléotides. En effet le mélange aqueux de I₂, de pyridine et d'H₂O a été utilisé dans le but d'oxyder des *H*-phosphonates diesters en synthèse solide. L'oxydation n'est cependant pas totale et une hydrolyse partielle de la liaison phosphodiester est observée, diminuant ainsi les rendements de synthèse [334]. Une autre méthode d'oxydation a été employée lors de la synthèse d'oligonucléotides chimériques [335]. Elle repose sur l'utilisation de NEt₃ dans un mélange CCl₄, Pyridine et H₂O. Cette combinaison semble être compatible avec la présence de liaison P-O, P-S ou P-N, même si une protection supplémentaire de la base a été nécessaire pour éviter des réactions secondaires de transamination.

Une méthode alternative consiste à déplacer l'équilibre établi entre la forme phosphonate et la forme phosphite vers cette dernière et de favoriser ainsi l'étape d'oxydation. L'une des méthodes pour atteindre cet objectif, est la pré-activation du dérivé phosphonate par des agents de silylation [336]. L'agent de silylation qui a été le plus étudié dans ce contexte, est la BSA utilisée en combinaison avec différents oxydants. Dans ce but le premier agent d'oxydation à avoir été testé, est le *t*BuO₂H sur des dérivés de sucres *H*-phosphonates [337]. La combinaison BSA/ *t*BuO₂H a par la suite été employée dans l'oxydation des *H*-phosphonates diesters [321] et des *H*-phosphonates monoesters [338], mais sans grand succès. En effet en présence de BSA, le *t*BuO₂H est converti en une espèce beaucoup moins réactive,

le $t\text{BuO}_2\text{TMS}$ et l'oxydation peut alors durer jusqu'à 24h, malgré l'ajout d'un large excès de $t\text{BuO}_2\text{H}$.

Une autre famille d'agents oxydants, les oxaziridines, a été utilisée et a montré de bons résultats pour oxyder des silylphosphites. Les oxaziridines ont été largement développées par Davis *et al.* et initialement employées dans l'oxydation asymétrique d'énolates prochiraux en composés α -hydroxycarbonylés [339-341]. Les exemples les plus étudiés sont le 2-(phénylsulfonyl)-3-(3-nitrophényl)-oxaziridine (PNO) [342] et le (+)-(2*R*,8*aS*)-(camphorylsulfonyl)-oxaziridine (CSO) [343] (figure 6). Ces composés présentent aussi l'avantage d'être neutres, non hygroscopiques et peuvent être facilement obtenus anhydres.

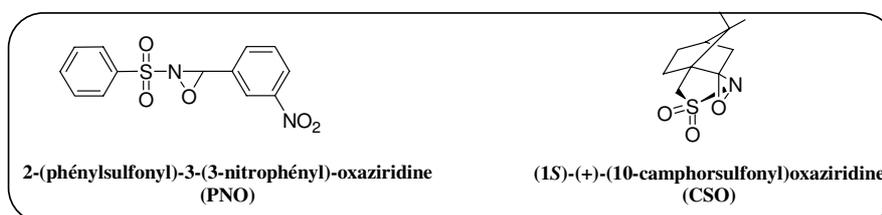
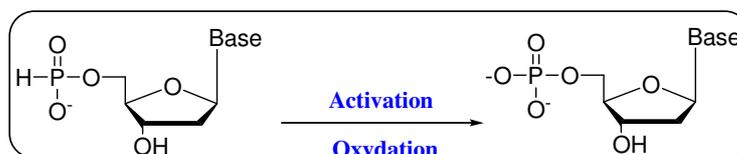


Figure 6: Structure de deux oxaziridines, le PNO et le CSO.

Les oxaziridines ont été par la suite employées pour l'oxydation de *H*-phosphonates diesters [321] en 3' après activation à la BSA. L'oxydation en présence de PNO notamment, ne nécessite d'ailleurs que 5min pour fournir le triméthylsilyl phosphate de façon quantitative après activation.

Nous avons donc choisit d'utiliser ce type de réactif à la synthèse en phase solide pour oxyder le nucléoside *H*-phosphonate en dérivé monophosphate.

2.3.2. Application du PNO à la synthèse des analogues monophosphates.



2.3.2.1. Synthèse du PNO.

Pour pouvoir oxyder les *H*-phosphonates il était nécessaire au préalable de synthétiser le PNO. Sa synthèse a été décrite par Davis *et al.* et repose sur le schéma synthétique suivant (schéma 40).

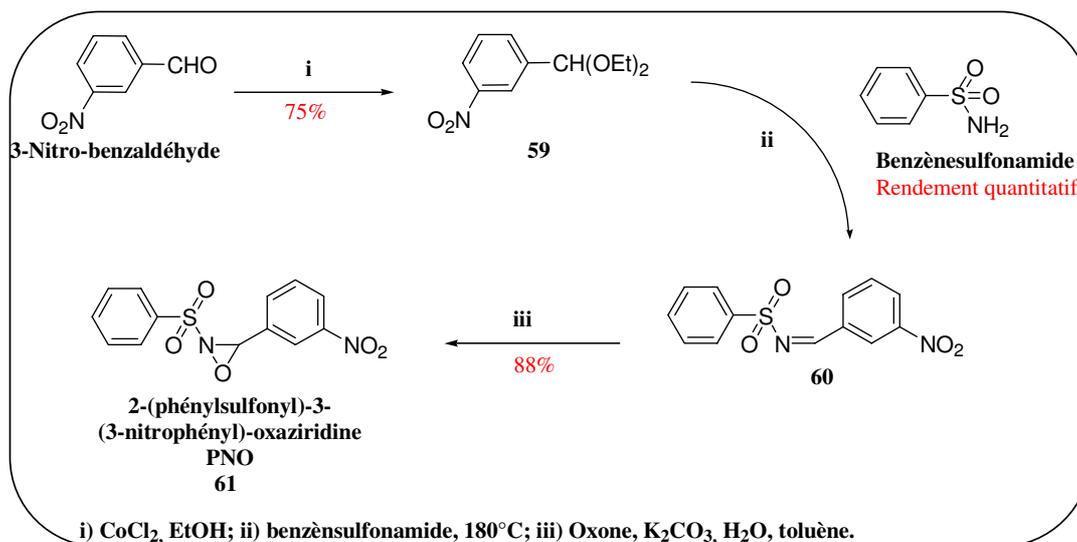


Schéma 40: Schéma de synthèse du PNO.

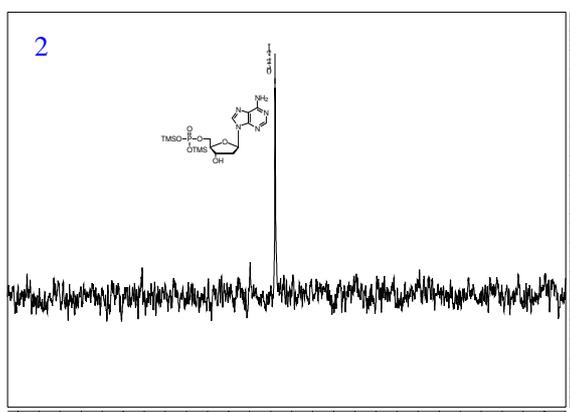
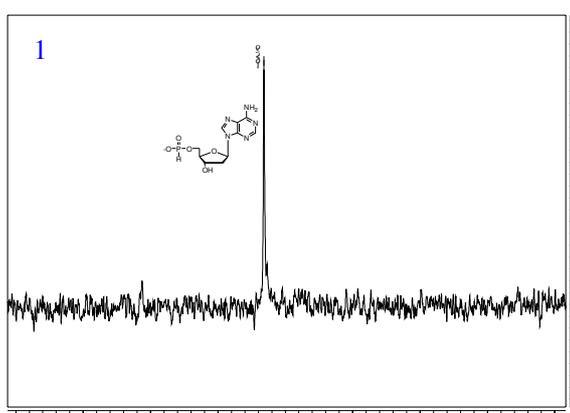
Les méthodes d'acétalisation sont communément utilisées comme protection temporaire des fonctions carbonyles réactives. Elles nécessitent généralement l'utilisation d'un alcool, ou de son équivalent orthoformate, en présence d'une catalyse acide. Les méthodes d'acétalisation ont souvent été décrites pour la formation de diméthyle acétale, et plus rarement pour la formation de diéthyle-acétale [344-348]. Le grand inconvénient de ces méthodes est qu'elles ne présentent aucune sélectivité puisqu'elles sont capables d'acétaler à la fois les cétones et les aldéhydes. Une méthode a cependant retenu notre attention, mettant en jeu l'utilisation d'un acide de Lewis doux, CoCl_2 [349]. Cette méthode d'acétalisation s'est révélée être assez douce, facile à mettre en œuvre, permettant d'obtenir le diéthylacétale nitrobenzène (59) avec un bon rendement.

Le diéthylacétale ainsi formé, peut réagir à $150-180^\circ\text{C}$ avec la benzène-sulfonamine commerciale, pour former l'imine correspondante (60), après élimination de deux molécules d'éthanol [342]. La sulfonimine (60) ainsi obtenue, est oxydée en présence d'Oxone® dans un mélange biphasique toluène/ K_2CO_3 : H_2O . Le produit (61) a ainsi pu être obtenu sans purification, puisqu'une simple étape de précipitation dans du pentane à suffit à l'obtenir avec un bon rendement.

2.3.2.2. Validation de la stratégie de synthèse : étude par RMN ^{31}P .

L'ensemble des études décrites dans la littérature visant à oxyder les dérivés *H*-phosphonates a été réalisé soit sur des *H*-phosphonates diesters, soit sur des *H*-phosphonates

monoester en position 3' du désoxyribose. Avant d'appliquer ces agents d'oxydation à nos *H*-phosphonates synthétisés sur support solide, nous avons étudié par RMN ^{31}P cette étape d'oxydation sur trois nucléosides modèles, le 5'-*O*-phosphonate-dT (**57**), le 5'-*O*-phosphonate-dA (**50**) et le 5'-*O*-phosphonate-8-éthyl-dA (**54**). Pour cela le nucléoside a été mis en solution dans la pyridine- d_5 , en présence de BSA et de PNO. A travers cette étude, nous souhaitons non seulement étudier la formation du produit d'oxydation, mais aussi l'effet de la base employée (NEt_3 ou DBU en présence de MeOH.) sur la deuxième étape de solvolysse en suivant le schéma suivant (figure 7).



Au temps $t=0$, le phosphonate possède un déplacement chimique en RMN ^{31}P caractéristique, à $\sim 6,7- 6,6$ ppm (Figure 7, spectre 1). Après ajout du mélange BSA/PNO la formation de l'intermédiaire triméthylsilylphosphite n'a pas été observée. Cela suggère que le triméthylsilylphosphite une fois formé, réagit immédiatement avec l'oxydant en solution pour donner le triméthylsilylphosphate correspondant. Sa formation est d'ailleurs instantanée dans les conditions choisies (moins de 5min), avec un déplacement caractéristique en RMN ^{31}P à 14,5ppm (une légère variation en fonction du nucléoside est observée) (figure 7, spectre 2), mais les valeurs reste très proches que ce soit pour la dA modifiée ou non modifiée.

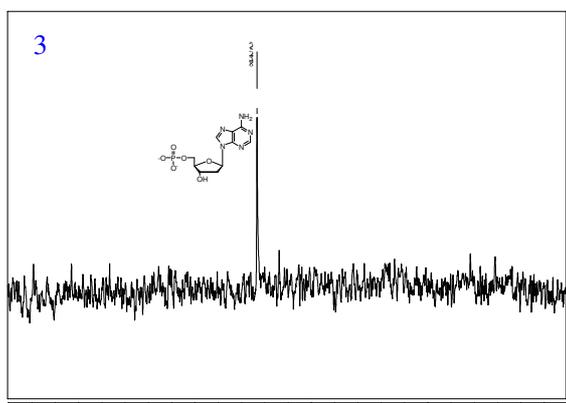


Figure 7: Cinétique de formation du monophosphate de la dA par RMN ^{31}P (pyridine d_5 à 200MHz).

1) Spectre RMN ^{31}P du 5'-phosphonate-dA ; 2) Spectre RMN ^{31}P du 5'-triméthylsilylphosphate-dA ; 3) Spectre RMN ^{31}P du 5'-monophosphate-dA.

ou non modifiée.

La solvolysse du triméthylsilylphosphate est alors réalisée en ajoutant soit le mélange MeOH-NEt₃ (1:1), soit le mélange MeOH : DBU (1:1). Encore une fois la réaction est instantanée avec un déplacement en RMN ^{31}P cette fois-ci à -5,31ppm lorsqu'une solution de MeOH/ base a été utilisée (figure 7, spectre 3). Il est à noter que lorsque le mélange réactionnel est repris dans un mélange MeOD/D₂O un signal avec un déplacement chimique de 1,7-0ppm est observé en accord avec les valeurs connues pour un monophosphate.

L'ensemble de ces observations est en accord avec la séquence réactionnelle proposée (schéma 41) pour l'oxydation des 5'-H-phosphonates en 5'-monophosphates.

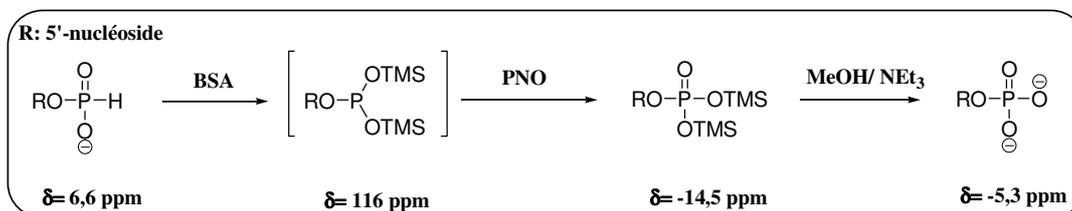


Schéma 41: Représentation des différentes espèces de P(III) et P(V) en solution et déplacement chimique en RMN ^{31}P .

Nota bene: le déplacement caractéristique du silylphosphite à 116ppm est observé lorsque seule de la BSA est ajouté au H-phosphonate.

2.3.3. Application à la synthèse en phase solide

Ayant vérifié les conditions d'oxydation en solution, ces dernières ont été appliquées à nos dérivés lors de la synthèse en phase solide (schéma 42).

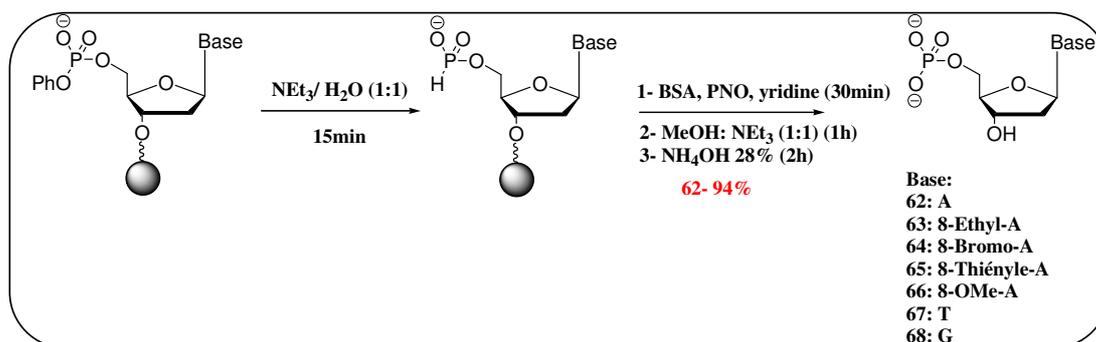


Schéma 42: Synthèse des différents analogues monophosphates synthétisés en phase solide.

Avant d'accéder aux dérivés monophosphates des nucléosides modifiés, il est nécessaire d'éliminer le groupement phényle présent sur le dérivé *H*-phosphonate. Pour cela des conditions basiques douces doivent être employées afin d'éviter de cliver cet intermédiaire de la résine. Nous avons choisi d'utiliser un mélange $\text{NEt}_3/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) pour réaliser cette transformation.

Cette étape de solvolysse basique a d'ailleurs fait l'objet d'une étude cinétique par spectroscopie UV-visible pour quantifier la libération de l'ion phénate (λ_{max} d'absorption 290nm) et surtout déterminer le temps au delà duquel le nucléoside (λ_{max} d'absorption 260nm) est clivé de la résine. Cette étude nous a permis de montrer que le phénate est rapidement éliminé et que le nucléoside commence à être clivé au bout de 15 min. Le groupement phényle a donc été éliminé par traitement de la résine avec le mélange $\text{NEt}_3/\text{H}_2\text{O}$ en ne dépassant pas les 15min.

Avant d'effectuer l'oxydation du *H*-phosphonate sur la résine il est important à ce stade de bien la sécher. En effet même si la BSA est un agent de séchage et sera utilisée en large excès, nous n'avons jamais obtenu de résultats comparables à ceux obtenus en solution. Par ailleurs les différents protocoles décrits dans la littérature préconisent l'utilisation dans un premier temps de la BSA suivie de l'agent oxydant. En suivant cette procédure, l'oxydation n'a pas eu lieu et seul le phosphonate est isolé. Deux explications peuvent être avancées pour rendre compte de ce résultat; soit l'intermédiaire triméthylsilylphosphite ne se forme pas, soit sa formation a réellement lieu mais étant beaucoup trop instable, il est immédiatement hydrolysé (ou transformé en un autre produit). Si cette dernière hypothèse est exacte il nous a semblé opportun de rajouter en même temps que la BSA, l'agent d'oxydation, afin de piéger l'intermédiaire triméthylsilylphosphite dès sa formation. En traitant le phosphonate avec le

mélange BSA/PNO (40eq/ 25eq) nous avons réussi à obtenir une conversion totale du phosphonate de nucléoside en monophosphate correspondant, à l'exception de la 8vdA.

Les groupements triméthylsilyles sont alors libérés avec un mélange de MeOH/ NEt_3 (1:1) et le monophosphate de nucléoside est clivé de la résine dans les conditions usuelles (NH_4OH 28%).

Nous avons remarqué que lorsque l'étape d'oxydation durait plus d'une demi-heure, un produit supplémentaire se formait avec un déplacement caractéristique en RMN du ^{31}P à 13 ppm. La formation d'un produit secondaire de ce type avait déjà été observée par Sekine *et al.* [338] en présence du PNO et résulterait de l'attaque de l'anion phosphate sur la sulfonimine formée. La formation de ce sous produit a d'ailleurs été confirmée par spectrométrie de masse (ESI en mode négatif) sur le dérivé monophosphate de la dT puisqu'un signal avec un rapport m/z compatible avec la masse attendue (à 594,3 [M-H]) a été observé (figure 8).

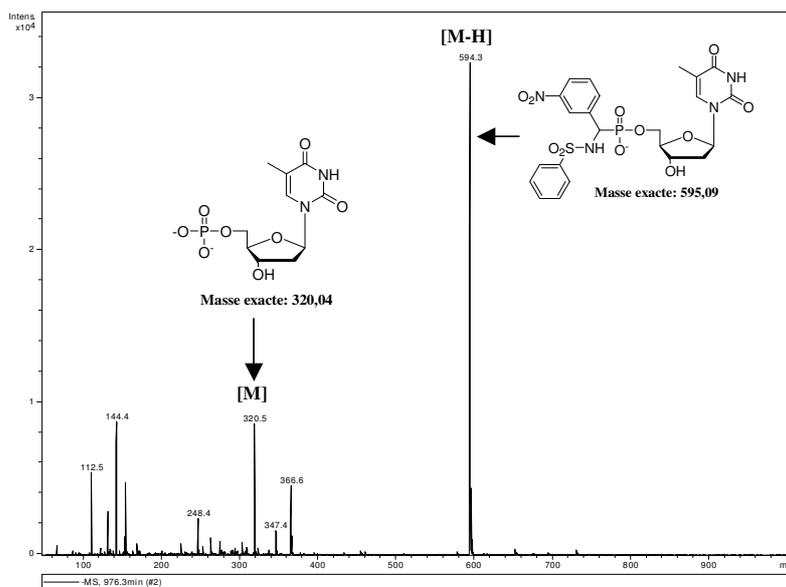


Figure 8 : Spectre de masse (ESI négatif) du composé issu de l'addition du dérivé PNO sur le monophosphate de la dT.

Cette stratégie de synthèse a donc été appliquée avec succès à l'ensemble de nos analogues à l'exception de la 8vdA. Les analogues monophosphates ont été obtenus avec de bons rendements (tableau 4) sans nécessiter d'étapes de purification supplémentaires. La formation du monophosphate a été confirmée par RMN ^1H et ^{31}P puisqu'un déplacement caractéristique à 1-0ppm a été observé (en fonction de la nature du nucléoside). L'ensemble des analogues modifiés de la dA a été caractérisé par RMN ^1H , ^{31}P , ESI, HPLC, UV.

<i>Composé</i>	<i>Rendement</i>	<i>Pureté relative</i>
60 (R : H)	90%	100%
61 (R : Ethyle)	83%	100%
62 (R : Br)	71%	94,5%
63 (R : Thiényle)	74%	82%
64 (R : OMe)	81%	71%
65 (dT)	94%	100%
66 (dG)	88%	94,5%

Tableau 4: Récapitulatif des rendements de synthèse et de la pureté relative des monophosphates de nucléosides.

La stratégie employée pour aboutir aux analogues monophosphorylés modifiés en position 8, est résumée dans le schéma qui suit (schéma 43).

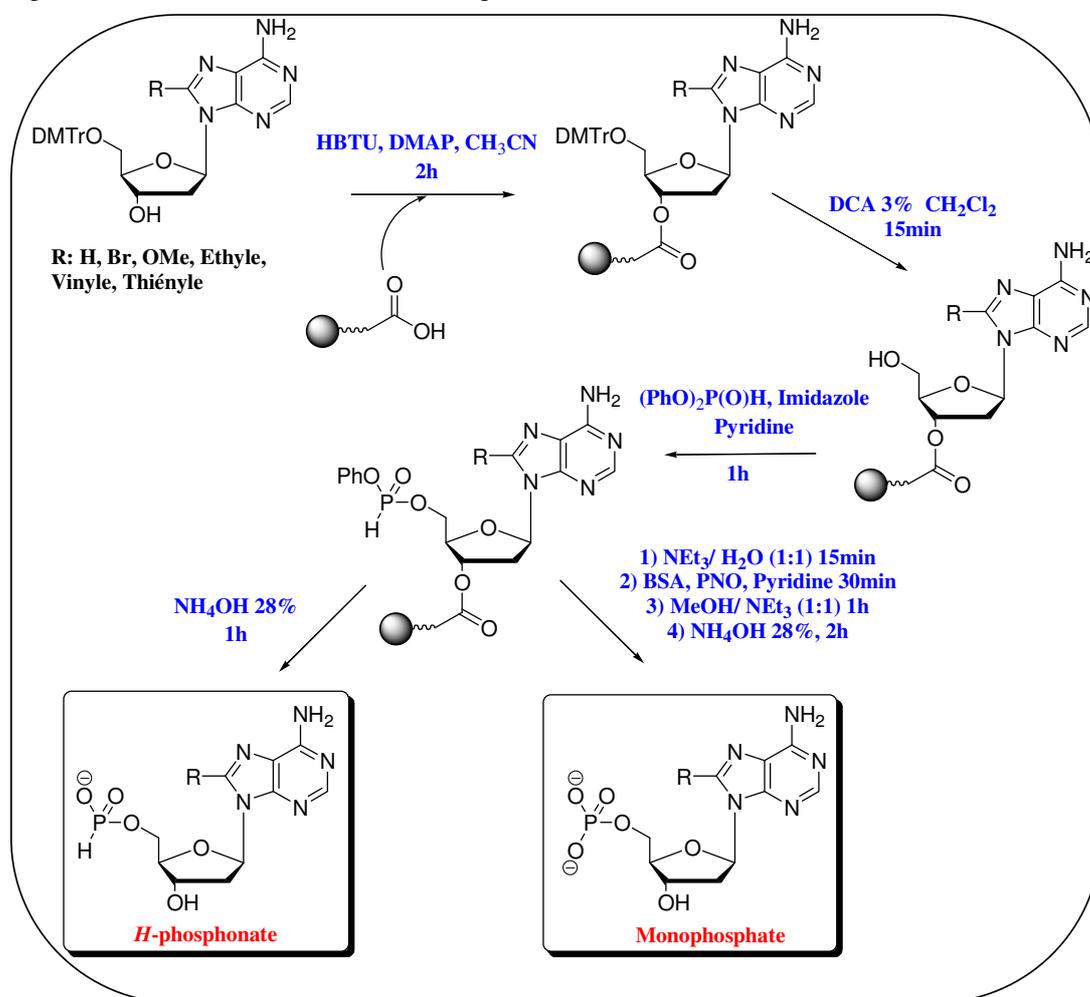


Schéma 43: Schéma de synthèse récapitulant les différentes étapes mises au point sur support solide pour accéder aux analogues *H*-phosphonates et monophosphates des dérivés de la dA.

La stratégie de synthèse mise au point sur support solide nous a permis de préparer les dérivés *H*-phosphonates et monophosphates des bases naturelles dA, dT et dG et surtout nous avons pu l'étendre et l'appliquer à la préparation des analogues modifiés de la dA en position 8. Une seule exception à ce schéma de synthèse est la 8vdA pour laquelle les dérivés *H*-phosphonates et monophosphates n'ont pu être obtenus sur la résine Tentagel®CO₂H. Un essai a été effectué sur la LCAA-CPG pour essayer d'aboutir directement au monophosphate de la 8vdA, mais les résultats n'étaient pas plus concluants avec cette résine.

Ainsi 16 nouveaux produits ont pu être préparés selon cette nouvelle voie de synthèse, faisant appel à des conditions de synthèse douces et compatibles avec des modifications structurales assez diversifiées.

A l'exception de la 8vdA, la synthèse en phase solide s'est avérée une alternative encourageante à la synthèse des analogues phosphorylés en étant compatible avec les modifications envisagées en position 8 de la dA. Nous avons donc voulu étendre les possibilités de cette chimie à la synthèse des triphosphates de nucléosides, mais également à d'autres dérivés tels que les boranophosphates isostères des dérivés monophosphates.

2.4. Synthèse des analogues boranophosphates

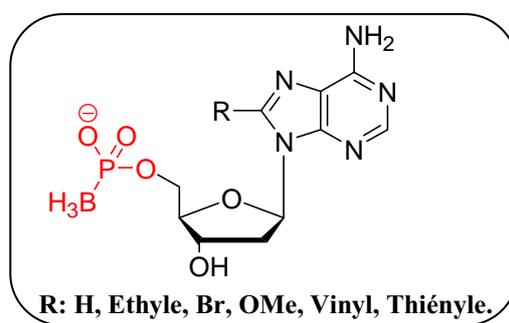


Figure 9: Structure générale des analogues boranophosphates de nucléoside.

En voulant mettre à profit le potentiel qu'offre les *H*-phosphonates, nous avons voulu étendre la chimie développée sur support solide à la préparation d'autres analogues phosphorylés. Notre choix s'est porté sur les boranophosphates dont les propriétés ont été largement mises à profit par l'équipe de Ramsay-Shaw *et al.* comme analogue nucléosidique α -boranotriphosphates [350, 351] ou α -boranodiphosphate [352]. Ces méthodes s'appuient soit sur la méthode d'Eckstein-Ludwig décrite précédemment [270], soit sur la chimie des phosphoramidites [353]. Parmi les composés modifiés par une liaison P-BH₃ décrits dans la littérature, on compte également des nucléosides boranodiesters [354-356], testés pour leurs propriétés inhibitrices en temps qu'antisens, des oligothymidine-boranophosphates [357], ou

encore des glycoboranophosphate diesters [358]. La synthèse de cette dernière classe de composés repose d'ailleurs sur la chimie des *H*-phosphonate.

2.4.1 Propriétés des Boranophosphates

Les différentes propriétés des analogues boranophosphates permettent d'expliquer leur utilisation croissante. En effet le groupement BH_3 est isoélectronique de l'oxygène même si la distribution de la densité de charge entre les deux groupes d'atome varie [359]. Les distances ainsi que les angles des liaisons O-P-O et O-P-B sont modifiés passant de 1,54Å à 1,91Å et 100° à 115° respectivement [360]. Même si les boranophosphates sont chargés, ils ne forment pas de liaisons hydrogène [361, 362] et ne coordinent pas de métaux, comme c'est le cas pour l'oxygène. Leur polarité est également modifiée puisqu'ils présentent une préférence vis-à-vis des milieux hydrophobes ce qui leur confère une meilleure perméabilité membranaire [363].

Par ailleurs les boranophosphates sont résistants aux nucléases, une caractéristique qui a été largement mise à profit pour développer des inhibiteurs à activité antivirale lorsqu'ils sont dirigés contre la RT de VIH-1 (α - BH_3 -ddNTP [364], α - BH_3 -AZTTP, α - BH_3 -d4TTP [365], α - BH_3 -3TCTP [366]). En effet ces analogues nucléotidiques permettent de réduire de façon considérable la réaction de pyrophosphorolyse sur des mutants AZT-résistant assurant même un niveau d'inhibition comparable à celui observé sur l'enzyme sauvage [365, 366].

Les boranonucléotides apparaissent comme d'intéressants analogues à développer d'autant plus qu'aucune méthode de synthèse n'est décrite pour accéder à ces dérivés sous leur forme boranomonomophosphate. Nous avons donc voulu mettre à profit l'ensemble de la chimie développée sur phase solide pour préparer les analogues modifiés de la dA sous la forme boranophosphate.

2.4.2. Etude de la réaction en solution et de suivie par RMN ^{31}P

Avant de mettre au point la synthèse des boranophosphates sur support solide, nous avons étudié la réaction en solution à partir des dérivés *H*-phosphonates de la dA et de la 8edA. Pour cela il est nécessaire d'utiliser un agent de silylation pour favoriser le déplacement de l'équilibre tautomérique vers la forme phosphite. La BSA a donc été tout naturellement envisagée, tout comme la BSTFA, un agent de silylation beaucoup plus stable.

Il était également nécessaire de faire un choix judicieux quant au réactif de bore. Pour cela, différents réactifs sont disponibles comme le complexe de bore diméthylsulfide (BH_3 :

Me₂S) ou les complexes de bore en combinaison avec des amines, tels que la DIPEA (BH₃ : DIPEA), la pyridine (BH₃ : Py), la 2-chloropyridine et l'aniline (BH₃ : An). En raison de leur coût assez élevé, nous n'avons essayé que les complexes BH₃ : Me₂S et BH₃ : DIPEA.

Une fois le choix des réactifs effectué, la réaction a été suivie par RMN ³¹P (figure 10).

L'analogue *H*-phosphonate est tout d'abord dissout dans du THF-d₆ en présence de la BSA. La réaction est instantanée et un déplacement caractéristique (116 ppm) en RMN ³¹P montre la formation de l'espèce triméthylsilylphosphite. La réaction est poursuivie après avoir ajouté le complexe de bore (BH₃ :DIPEA). A nouveau la réaction est instantanée et un nouveau produit donnant un déplacement caractéristique d'un boranophosphate à 93-90 ppm est observé après hydrolyse.

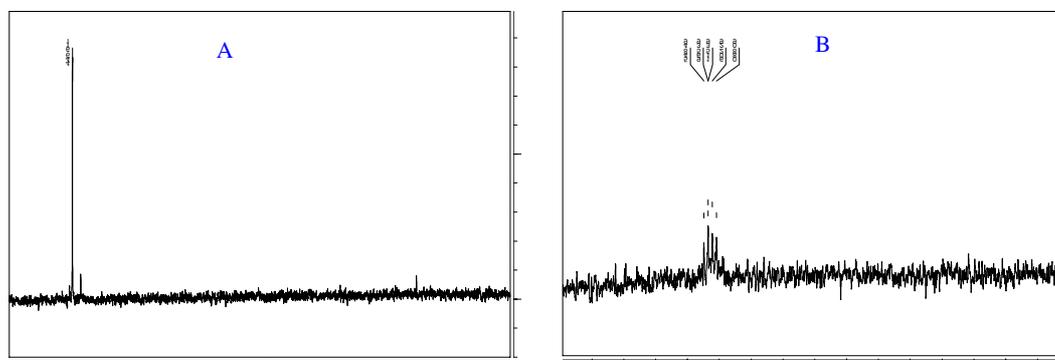


Figure 10: A)- Spectre ³¹P du phosphonate en présence de BSA dans THF-d₆ ; B)- Spectre ³¹P découplé du proton après addition du complexe BH₃ :DIPEA et hydrolyse.

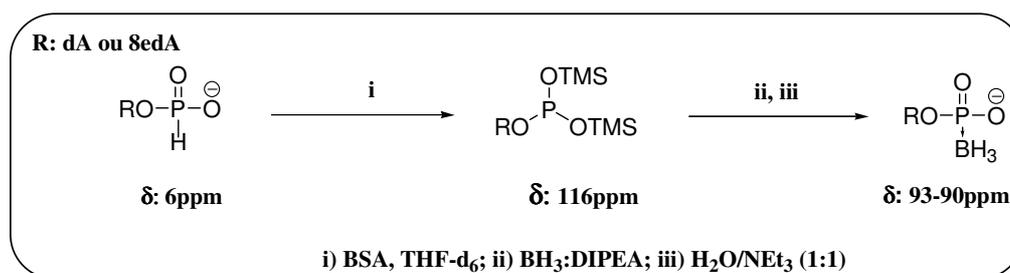


Schéma 44: Suivi de la formation des boranophosphates par RMN ³¹P.

Les déplacements chimiques observés en RMN ³¹P sont en accord avec les données de la littérature (schéma 44) [355]. Cette étude indique que la réaction est rapide en solution, nous avons donc cherché à appliquer ces conditions à la synthèse en phase solide.

2.4.3. Synthèse des Boranophosphates sur support solide.

Les premiers essais préliminaires avec la dA ont été effectués sur la Tentagel® que ce soit avec le complexe $\text{BH}_3 : \text{Me}_2\text{S}$ ou $\text{BH}_3 : \text{DIPEA}$, mais sans succès. En effet après clivage du nucléotide de la résine aucune trace en RMN ^{31}P d'un signal caractéristique à 90ppm pour un boranophosphate n'a été observé et seul le phosphonate de la dA a été récupéré.

Certaines données de la littérature font état du pouvoir réducteur du complexe $\text{BH}_3 : \text{Me}_2\text{S}$ dont les effets est d'induire certaines modifications au niveau de la base [357, 367]. Dans la suite de la synthèse, seul le complexe $\text{BH}_3 : \text{DIPEA}$ a été utilisé.

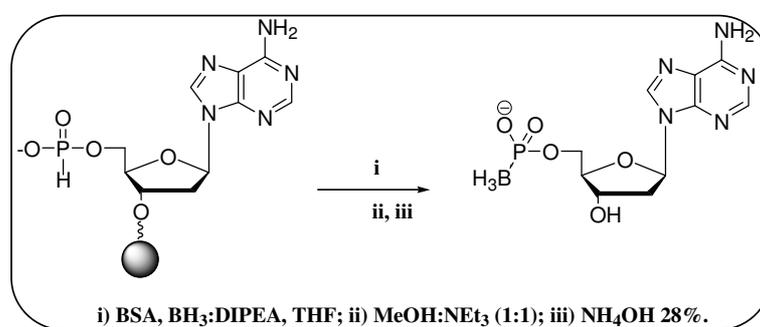


Schéma 45: Essai de synthèse de 5'-boranophosphate-désoxyadénosine sur support solide.

La littérature rapporte une étude menée par Shaw et *al.* visant à préparer des oligodésoxyribonucléosides boranophosphates pour laquelle différents paramètres de synthèse ont été modifiés (nature des agents de silylation, nature des agents de boronation et enfin la nature de la résine) [367]. Cette étude montre que les conditions optimales pour ce type de transformation utilisent la BSA ou la BSTFA en présence d'un complexe bore-amine sur une résine CPG.

La synthèse a donc été tentée à nouveau sur support solide mais cette fois-ci sur la LCAA-CPG. Des résultats encourageants ont été obtenus puisque le boranophosphate de la dA a été obtenu que ce soit en présence de BSA ou de BSTFA. Une mise au point supplémentaire des conditions de synthèse est cependant encore nécessaire.

La synthèse des boranophosphates était d'autant plus intéressante qu'aucun exemple dans la littérature ne traite de la synthèse d'analogues boranophosphates de nucléosides modifiés. Par ailleurs la synthèse des α -borano-triphosphates serait une extension logique à ce travail.

2.5. Synthèse des analogues triphosphates de la dA

Une des méthodes d'activation de nucléosides monophosphates très couramment utilisée, est l'utilisation de carbonyldiimidazole dans la DMF [291]. Cette méthode de synthèse même si elle requiert des conditions opératoires douces, nécessite l'utilisation d'un large excès de réactif et surtout nécessite des temps de condensation avec le pyrophosphate assez longs (>72h). Les conditions de séchage préconisées sont assez draconiennes, ce qui a dirigé notre choix vers une autre méthode d'activation beaucoup moins contraignante.

2.5.1. Application de la méthode de Bogachev

Nous avons donc essayé d'appliquer en solution, la méthode décrite par Bogachev et *al.* [294] tout d'abord sur l'adénosine et par la suite sur la dAMP, sous leur forme Na^+ .

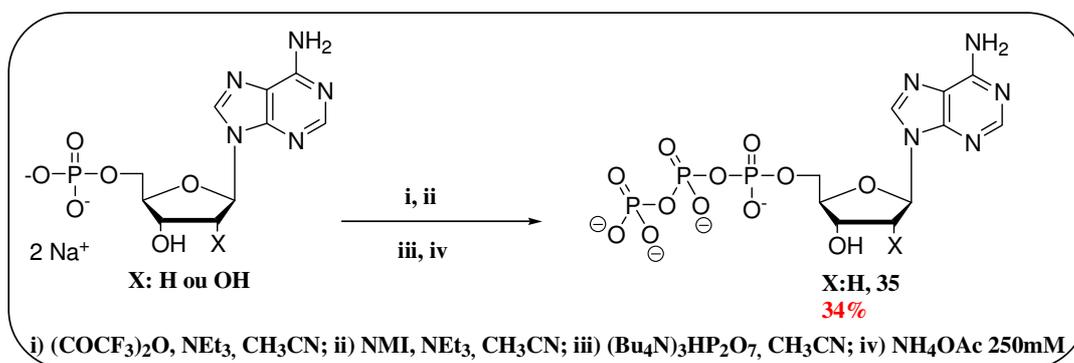


Schéma 46: Activation des dérivés AMP ou dAMP selon la méthode décrite par Bogachev et *al.*

Nous avons tout d'abord voulu nous assurer de la faisabilité de la méthode en l'appliquant sur l'Adénosine. La réaction s'est déroulée dans les mêmes conditions que celles décrites. Confiant de ce résultat, nous avons poursuivie nos essais, sur la dA cette fois-ci.

Ainsi la dAMP commerciale sous la forme Na^+ réagit tout d'abord avec l'anhydride trifluoroacétique en présence de triéthylamine dans le CH_3CN . L'ensemble des fonctionnalités réactives du désoxyribose (amine en N6 et hydroxyle en 3') est alors protégé et le groupement monophosphate conduit à une espèce activée (ester mixte). Un mélange NMI, NEt_3 dans CH_3CN est alors rajouté favorisant l'évolution vers une espèce activée du type *N*-méthylimidazolium dont la formation a pu être visualisée par RMN ^{31}P avec un déplacement caractéristique à (-14ppm). L'espèce activée ainsi formée peut réagir avec le pyrophosphate $(\text{Bu}_4\text{N})_3\text{HP}_2\text{O}_7$ (**36**) en solution dans CH_3CN . Le suivi de la réaction a pu être effectué par

RMN ^{31}P , ce qui a permis de visualiser la disparition des pics correspondant au monophosphate et à l'espèce activée. Il est cependant à noter que dans notre cas de figure, les temps de réaction pour l'analogue dAMP ont été plus longs que ceux préconisés pour l'Adénosine (jusqu'à 4 heures au lieu d'1h). Finalement un traitement avec une solution 250mM d' NH_4OAc permet d'éliminer les groupements trifluoroacétates pour aboutir au dérivé triphosphate de la dA.

La dATP a été purifiée par CLHP sur une colonne semi-préparative ThermoHypersil® de type phase inverse, avec un rendement de 34% et une pureté de 98% après purification (déterminée après purification par CLHP sur colonne analytique ThermoHypersil® dans les mêmes conditions). Le rendement de réaction est cependant assez modeste et n'a pu être optimisé en raison de la perte d'une partie du produit au cours de l'étape de purification. Les nucléosides triphosphates s'avèrent être très sensibles puisque même en dépit d'un stockage à -20°C , une partie du produit s'est hydrolysée, notamment en dérivé monophosphate.

Le produit ainsi obtenu a été caractérisé par RMN ^{31}P , ESI et CLHP.

La formation du dATP a pu être confirmée par RMN ^{31}P puisque des déplacements chimiques caractéristiques à -9,5, -10 et -20ppm ont été observés.

Le monophosphate de la 8edA obtenu par synthèse supportée a donc été testé comme substrat dans la réaction de Bogachev dans ces mêmes conditions. Les temps de réaction pour chaque étape ont cependant dû être augmentés notamment celle faisant appel au pyrophosphate qui a nécessité toute une nuit (réaction suivie par CCM). L'analyse par CLHP a permis de visualiser la formation du triphosphate de la 8edA, mais en faible quantité. Ce premier test nous a permis de confirmer la faisabilité de la méthode même si elle nécessite encore une étape supplémentaire de mise au point. La présence d'un groupement R tel que l'éthyle en position 8 de la désoxyadénosine, semble modifier totalement la réactivité de cette dernière. Cette réaction devra être reprise et étendue aux autres analogues nucléosidiques de la série.

2.5.2. Synthèse des triphosphates sur support solide

2.5.2.1. Etudes préliminaires sur la résine

L'ensemble de la mise au point quant à la synthèse des analogues *H*-phosphonates ou des monophosphate a été effectué sur la résine Tentagel. C'est tout naturellement que les premiers essais de synthèse des analogues triphosphates ont été essayés sur cette résine.

Plusieurs méthodes ont été entreprises en phase solide (méthode d'Eckstein,

l'activation des *H*-phosphonates suivie d'une étape de pyrophosphorylation, ou encore l'activation du monophosphate au CDI) mais aucune n'a permis d'obtenir le dérivé triphosphate attendu. De plus, après clivage de la résine on récupérait à chaque fois le pyrophosphate en excès. Ces observations nous ont amené à nous demander si la Tentagel® était bien adaptée à l'utilisation du pyrophosphate comme réactif en solution. En effet, de part sa nature polyéthylène glycol, la résine pourrait agir comme chélatant des contre-ions du pyrophosphate, les empêchant d'agir de façon adéquate. La résine Tentagel® semble être inadéquate et incompatible à la synthèse de triphosphates de nucléosides.

Nous nous sommes donc tournés vers la LCAA-CPG en adaptant la méthode de Bogachev qui nous a permis d'avoir les résultats les plus prometteurs (schéma 47).

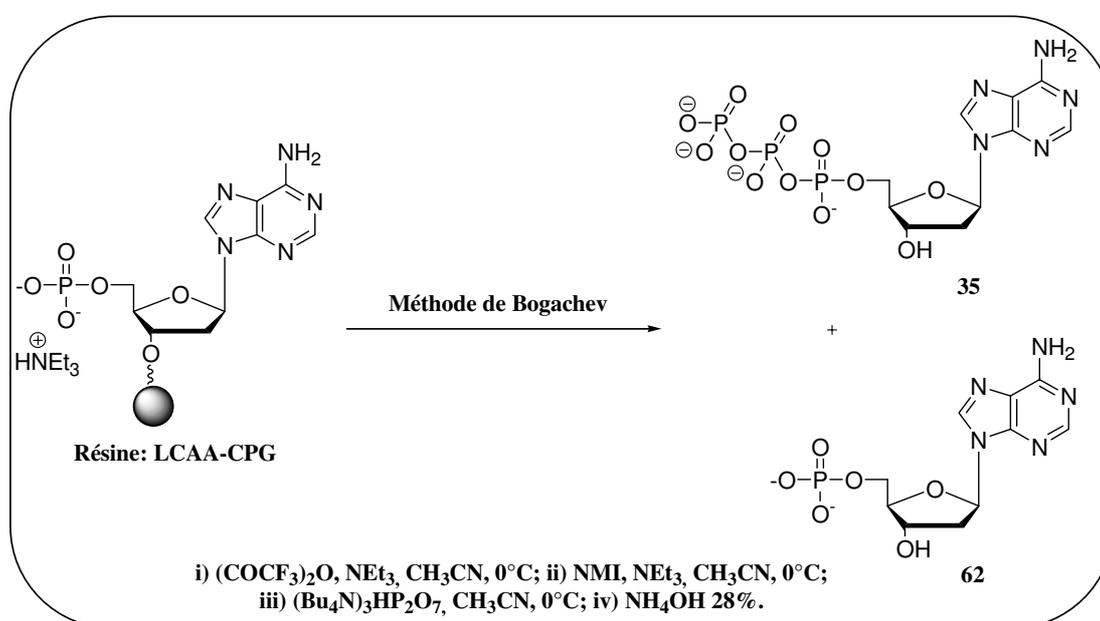


Schéma 47 : Synthèse du dATP en suivant la méthode de Bogachev sur support solide de type LCAA-CPG.

L'ensemble des conditions mis au point sur la Tentagel® a été repris et appliqué à la LCAA-CPG-CO₂H pour accéder au monophosphate de la dA. La résine, sur laquelle est immobilisé le monophosphate de la dA est préalablement séchée sous pression réduite avant d'être engagée dans la réaction de Bogachev. En raison des conditions opératoires et notamment en raison de la température préconisée pour cette réaction, il était indispensable d'effectuer la réaction dans un bicol et sous agitation. Les temps de réaction, notamment pour les étapes d'activation ont été augmentés jusqu'à 1h. Une fois le pyrophosphate ajouté (à

0°C), la résine est maintenue sous une légère agitation pendant trois jours. Après clivage de la résine, le mélange réactionnel a été analysé par RMN ^{31}P et par CLHP. En RMN du ^{31}P nous avons observés les déplacements caractéristiques du monophosphate et du triphosphate de la dA.

Par ailleurs les analyses par CLHP du brut de réaction seul et du mélange obtenu en présence d'un échantillon de référence, confirment la formation du triphosphate de la dA. L'analyse du chromatogramme montre que la conversion reste partielle puisque le produit majoritaire reste le monophosphate de la dA (figure 11).

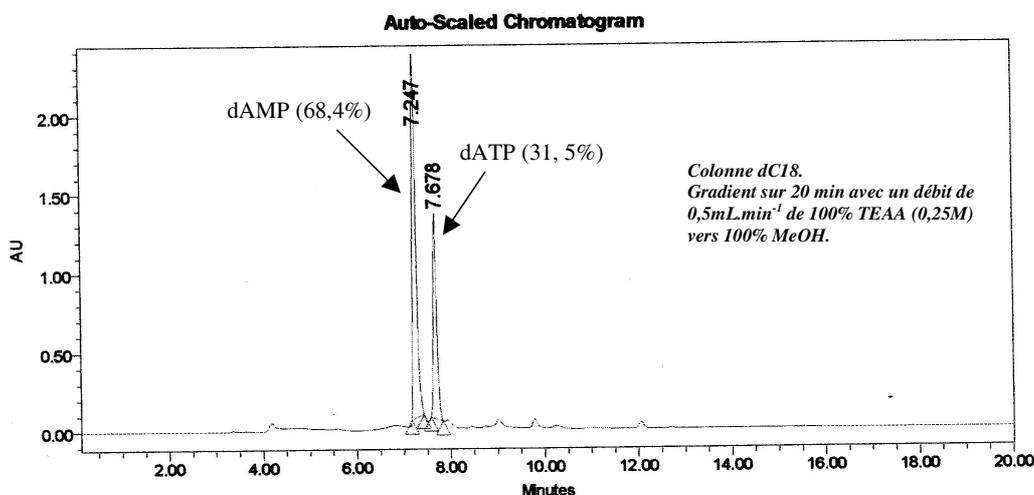


Figure 11: Chromatogramme CLHP du brut de réaction isolé après clivage de la résine LCAA-CPG.

En réduisant les temps de couplage lors de l'étape de condensation du pyrophosphate sur la dAMP activée, aucune trace du triphosphate n'a été décelée.

La LCAA-CPG semble être mieux adaptée à de tels composés, ainsi que la méthode de synthèse choisie. La méthode de synthèse de Bogachev a pu être transposée à la désoxyadénosine que ce soit en milieu homogène, mais également sur support solide. Une mise au point est cependant nécessaire afin d'améliorer les rendements de conversion et éventuellement transposer cette méthode à la préparation des analogues triphosphates de la dA.

C. Conclusion

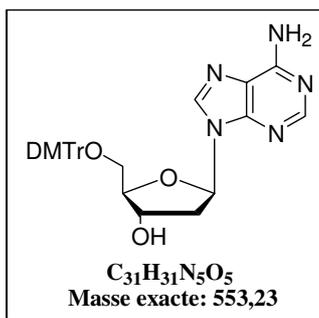
Au cours ce chapitre nous avons exploré plusieurs approches pour essayer de préparer les analogues nucléosidiques modifiés en position 8 de la dA sous leur forme triphosphate. Cet

objectif n'a pas pu être atteint et cela en dépit des efforts importants menés essentiellement en synthèse homogène. Nous avons néanmoins réussi à mettre au point une méthode de synthèse assez douce et compatible avec un certain nombre de modifications qui nous a permis d'accéder aux analogues phosphonates et monophosphates de nos dérivés. Nous avons également pu l'étendre à la synthèse d'analogues boranophosphates et triphosphates, mais une mise au point supplémentaire reste à effectuer. Il semblerait que la réactivité plus faible de ces bases modifiées en partie due à l'encombrement stérique généré par certaines modifications, soit à l'origine des difficultés rencontrées.

Les indications générales pour la partie « matériels et méthodes » ont été données dans la partie expérimentale du chapitre II.

Synthèse du triphosphate de la dA selon la chimie des phosphoramidites

5'-O-DMTr-2'dA (30)



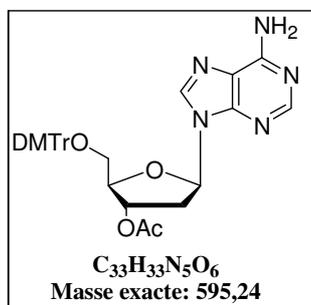
La désoxyadénosine (1g; 4mmol) est solubilisée dans la pyridine anhydre (12mL) sous agitation et atmosphère d'argon. A cette solution est ajouté successivement de la DMAP (244mg; 2mmol) puis le DMTrCl (2g; 6mmol). L'évolution de la réaction est contrôlée par CCM dans un mélange CH₂Cl₂/ MeOH (90:10). Au bout de 4 heures, la réaction est arrêtée en rajoutant du MeOH (5mL) et en ramenant le pH de la solution à neutralité à l'aide de NEt₃. Le mélange réactionnel est évaporé de moitié et repris dans du CH₂Cl₂ (20mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée d'NaHCO₃ (20mL), de l'H₂O (20mL) et de la saumure (20mL) avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut de réaction est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et 1% de NEt₃. Le produit est élué avec un gradient de MeOH (de 0% à 4%) dans un mélange CHCl₃/ NEt₃ 1% permettant ainsi d'obtenir après évaporation des solvants et lyophilisation le composé (30) avec un rendement de 60% (1,3g; 2,36mmol).

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,28 (1H, s, H8); 7,95 (1H, s, H2); 7,40-7,19 (9H, m, DMTr); 6,81-6,77 (4H, m, DMTr); 6,43 (1H, dd, J₁=J₂= 6,4Hz, H1'); 5,70 (2H, s, NH₂); 4,71-4,64 (1H, m, H3'); 4,17-4,11 (1H, m, H4'); 3,77 (6H, s, CH₃O); 3,41-3,39 (2H, m, H5'); 2,88-2,75 (1H, m, H2'); 2,58-2,46 (1H, m, H2');

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3Hz): 158,4 (C_{IV} DMTr); 155,45 (C4); 152,8 (C2); 149,3 (C8); 144,45 (C6); 138,8 (C_{IV} DMTr); 135,6 (C_{IV} DMTr); 129,9-119,8 (CH DMTr + C5); 113,1 (CH DMTr); 86,4 (C4'); 86,1 (C1'); 72 (C3'); 63,7 (C5'); 55,1 (CH₃O); 40,4 (C2');

ESI SM négatif (m/z): 552,2 [M-H]; 588 [M+ Cl⁻].

3'-Acétyl-5'-O-DMTr-2'-dA (31)



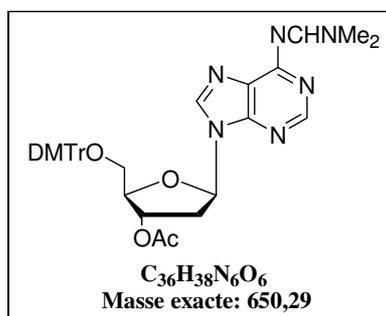
Le composé (**30**) (271mg; 0,49mmol) est dissous dans la pyridine anhydre (1,7mL) avant de rajouter successivement la DMAP (30mg; 0,245mmol) et l'anhydride acétique (70μL; 0,73mmol). L'ensemble est sous agitation et atmosphère d'argon. La disparition de l'alcool de départ est suivie par CCM dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH (95:5). Au bout de 2 heures, la réaction est arrêtée en rajoutant du MeOH et le mélange réactionnel est repris dans du CH₂Cl₂ (10mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée d'NaHCO₃ (10mL), de l'H₂O (10mL) et de la saumure (10mL). Elle est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut de réaction est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et 1% de NEt₃. Un gradient en MeOH (de 0 à 3%) dans le mélange CHCl₃/ NEt₃ 1% permet d'obtenir le composé (**31**) avec un rendement de réaction quantitatif (292mg; 0,49mmol).

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,28 (1H, s, H8); 7,98 (1H, s, H2); 7,41-7,21 (9H, m, DMTr); 6,8-6,7 (4H, m, DMTr); 6,46 (1H, dd, J₁= 5,8Hz, J₂= 8,4Hz, H1'); 6,26 (2H, s, NH₂); 5,5-5,47 (1H, m, H3'); 4,27-4,26 (1H, m, H4'); 3,75 (6H, s, CH₃O); 3,42 (2H, m, H5'); 3,06-2,8 (1H, m, H2'); 2,6-2,5 (1H, m, H2'); 2,08 (3H, s, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 170,2 (CO); 158,5 (C_{IV} DMTr); 155,6 (C4); 152,9 (C2); 149,6 (C8); 144,3 (C6); 138,4 (C_{IV} DMTr); 135,49 (CH DMTr); 129,9-126,8 (CH DMTr); 119,7 (C5); 113,23 (CH DMTr); 86,6 (C3'); 84,15 (C1'); 75,18 (C4'); 63,6 (C5'); 55,12 (CH₃O); 38,08 (C2'); 21 (CH₃).

ESI SM positif (m/z): 595,6 [M+H⁺]; 302,8 [DMTr].

3'-acétyl-5'-O-DMTr-N6-diméthylformamidine-2'-dA (32)



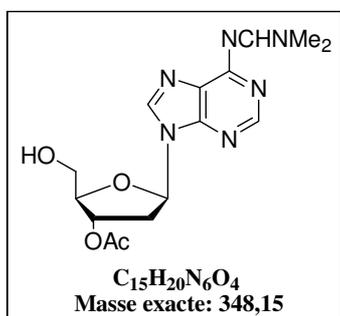
Le composé (31) (500mg; 0,84mmol) est solubilisé dans la DMF anhydre (2,8mL). Le *N,N'*-diméthylformamidine-diméthylacétale (565 μ L; 4,2mmol) est ajouté sous atmosphère inerte à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie sur CCM dans un mélange CH₂Cl₂/ MeOH (95:5). Elle est arrêtée au bout de 4 heures en rajoutant de l'AcOEt (5mL). La phase organique est alors lavée avec H₂O (2*10mL) et de la saumure (10mL) avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le produit obtenu est suffisamment pur pour ne pas nécessiter d'étape de purification supplémentaire. Le composé (32) a été obtenu avec un rendement de 93% (511mg; 0,78mmol).

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,9 (1H, s, NCH); 8,5 (1H, s, H8); 8,1 (1H, s, H2); 7,36-7,22 (9H, m, DMTr); 6,8-6,77 (4H, m, DMTr); 6,5 (1H, dd, J₁= 5,7Hz, J₂= 8,9Hz, H1'); 5,52-5,48 (1H, m, H3'); 4,28-4,24 (1H, m, H4'); 3,7 (6H, s, CH₃O); 3,43-3,41 (2H, m, H5'); 3,26 (3H, s, NCH₃); 3,2 (3H, s, NCH₃); 2,95-2,85 (1H, m, H2'); 2,66-2,58 (1H, m, H2'); 2,1 (3H, s, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 171 (CO); 159,5 (C_{IV} DMTr); 158,54 (NCH); 154,9 (C4); 153,15 (C2); 147,9 (C8); 144,8 (C6); 143 (C_{IV} DMTr); 130-128 (CH DMTr); 113,6 (CH DMTr); 89,1 (C_{IV} DMTr); 84,6 (C3'); 84,3 (C1'); 75,8 (C4'); 64,1 (C5'); 55,6 (OCH₃); 41,7 (CH₃N); 38,6 (C2'); 35,6 (CH₃N); 21,4 (CH₃).

ESI SM positif (m/z): 650,7 [M+H⁺]; 672,6 [M+Na⁺].

3'-acétyl-N6-diméthylformamide-2'dA (33)



Le composé (**32**; 300mg; 0,46mmol) est mis en solution dans un mélange DCA 3%/CH₂Cl₂ (15,4mL) fraîchement préparé. La réaction est arrêtée au bout de 5min après contrôle par CCM dans un mélange CH₂Cl₂/ MeOH (95:5). Le pH du mélange réactionnel est ramené à neutralité en rajoutant goutte à goutte une solution saturée d'NaHCO₃. La phase organique est diluée dans du CH₂Cl₂ (10mL) et lavée avec une solution saturée d'NaHCO₃ (15mL), de l'H₂O (15mL) et de la saumure (15mL) avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et le produit est élué avec un gradient de MeOH (de 0 à 4%). Le composé (**33**) est obtenu avec un rendement de 88% (141mg; 0,40mmol).

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,9 (1H, s, NCH); 8,4 (1H, s, H8); 7,9 (1H, s, H2); 6,25 (1H, dd, J₁= 5,4Hz, J₂= 10Hz, H1'); 5,52-5,5 (1H, m, H3'); 4,27 (1H, m, H4'); 3,97-3,8 (2H, m, H5'); 3,21 (3H, s, NCH₃); 3,17 (3H, s, NCH₃); 3,14-3,07 (1H, m, H2'); 2,42-2,32 (1H, m, H2'); 2,07 (3H, s, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 170,2 (CO); 158,5 (NCH); 158,1 (C4); 151,9 (C2); 147,9 (C8); 141,1 (C6); 120,1 (C5); 88,1 (C3'); 87,8 (C1'); 76,9 (C4'); 63,7 (C5'); 41,8 (CH₃N); 38,01 (C2'); 35,7 (CH₃N); 21,5 (CH₃).

ESI SM positif (m/z): 348,8 [M+H⁺].

Tris(tributylammonium)-hydrogénopyrophosphate ($(\text{Bu}_3\text{NH})_3\text{HP}_2\text{O}_7$) (34)

Une colonne échangeuse de cations de type DOWEX 50X*8 sous la forme H^+ est préalablement préparée. Pour cela la résine sous sa forme commerciale Na^+ est lavée plusieurs fois à l'eau MilliQ avant d'être déposée dans une colonne de 35cm de longueur et 2,5cm de diamètre. 200mL d'une solution de NaOH à 1M est fraîchement préparée et rajoutée à la résine. Le débit requis est de 1 goutte/min. Une fois que le pH a atteint un pH basique (pH:14), plusieurs lavage à l'eau sont nécessaires pour revenir à neutralité. Une solution d'HCl à 1M (200mL) est alors ajoutée à la résine et éluée au même débit (1goutte/min). Après s'être assuré que le pH est bien acide (pH: 1), le pH est à nouveau ramené à neutralité par plusieurs lavages successifs à l'eau. Le tétrasodiumhydrogénopyrophosphate (3g; 6,72mmol) est dissout dans de l' H_2O (5mL) et gardé sous agitation jusqu'à dissolution complète. La solution ainsi obtenue est rajoutée à la résine sous sa forme H^+ et le produit est élué avec le même débit (1 goutte/min). Le produit commence à être élué lorsque le pH de la solution devient acide (pH:1). La fraction acide est récoltée dans un billon contenant de l'EtOH (50mL) et de la tributylamine refroidit par un bain de glace jusqu'à atteindre un pH de 5-6. La solution est évaporée jusqu'à obtenir une huile. Elle est coévaporée avec du CH_3CN (3*50mL) et de l'acétone (3*50mL) jusqu'à obtenir à nouveau une huile. Cette huile est reprise dans du benzène et lyophilisée pendant la nuit. On obtient alors un solide amorphe avec un rendement de 95% (4,7g; 6,38mmol) que l'on remet en solution dans du CH_3CN anhydre pour obtenir une solution à 0,5M.

Tris(tétrabutylammonium)hydrogéo pyrophosphate. ($(\text{Bu}_4\text{N})_3\text{HP}_2\text{O}_7$) (36)

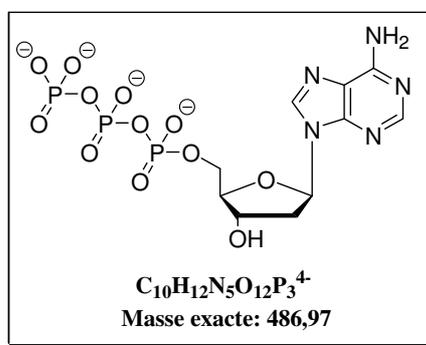
La résine est préparée dans les mêmes conditions que précédemment. Le tétrasodiumhydrogénopyrophosphate est mis en solution dans une solution à 10% d' NH_4OH et déposé sur la résine. Le produit est élué avec le même débit (1goutte/min) et récupéré dans un ballon refroidit à 0°C par un bain de glace. Une fois la totalité de produit récupéré (pH 5-6), le pH est ramené à neutralité en rajoutant de l'hydroxide de tétrabutylammonium. La solution est alors évaporée et les cycles de coévaporation et de lyophilisation décrits précédemment sont réalisés. Le solide obtenu après lyophilisation est repris dans du CH_3CN anhydre pour obtenir une solution à 0,5M.

Le titre des deux solutions préparées de $(\text{Bu}_3\text{NH})_3\text{HP}_2\text{O}_7$ et de $(\text{Bu}_4\text{N})_3\text{HP}_2\text{O}_7$ a été vérifié par RMN ^{31}P . Pour cela une quantité connue de dibenzyl-phosphite est solubilisée dans du CD_3CN et la même quantité théorique de pyrophosphate en solution est également prélevée et

rajoutée à la solution précédente. Le dibenzyl-phosphite sert ainsi de référence interne. La quantité d'eau résiduel présente dans les deux solutions de $(\text{Bu}_3\text{NH})_3\text{HP}_2\text{O}_7$ et de $(\text{Bu}_4\text{N})_3\text{HP}_2\text{O}_7$ a été vérifiée par RMN ^1H en utilisant les solutions précédentes. Le dibenzyl-phosphite sert à nouveau de référence interne. Cette étude par RMN a permis de montrer la présence de 3 molécules d' H_2O .

5'-triphosphate-2'-dA (35)

Remarque : Le composé 5'triphosphate-désoxyadénosine étant connu, je ne décrirais dans cette partie que les modes opératoires suivis pour y accéder. Les caractéristiques spectrales (RMN ^1H , ^{31}P) seront données par la suite.



Le composé (**33**; 50mg; 0,14mmol) est repris dans CH_2Cl_2 anhydre (400 μL) et la DIPEA (100 μL ; 0,58mmol) est rajoutée sous pression d'argon; Le chloro-*N,N'*-diisopropylamine-cyanoéthyl-phosphoramidite (48 μL ; 0,22mmol) est également solubilisé dans du CH_2Cl_2 anhydre (100 μL) et rajouté goutte à goutte au mélange préparé précédemment sous pression d'argon et agitation constante. L'évolution de la réaction est contrôlée sur CCM dans un mélange cyclohexane/acétone (50:50). Les réactifs de phosphorylation $(\text{Bu}_3\text{NH})_3\text{HP}_2\text{O}_7$ en solution dans la DMF (C= 0,5M; 1,2mL) ainsi que la tributylamine (150 μL ; 0,62mmol) sont rajoutés successivement. La réaction est maintenue pendant 12 heures sous agitation (CCM : *is*PrOH/ NH_4OH 28%/ H_2O (7:2:1)) avant qu'une solution fraîchement préparée d' I_2 (0,1M; 2,2mL) dans un mélange Pyridine/ H_2O (98:2) soit rajoutée. La réaction se poursuit pendant une heure avant d'ajouter une solution aqueuse d' NH_4OH 28%. Le mélange réactionnel est évaporé sous le vide de l'évaporateur rotatif et purifié par CLHP sur colonne C_{18} ThermoHypersil Hypurity 5 μ (250*10mm). Pour cela un gradient de 100% TEAA (0,25M) vers 100% de MeOH sur 30 min est appliqué avec un débit de 3mL.min $^{-1}$. Le triphosphate de la dA (**36**) est obtenu avec un rendement de 43%, déterminé par mesure de l'absorbance en spectroscopie UV-visible à 260nm.

Synthèse du 5'-triphosphate-2'-dA en suivant la méthode de Bogachev.

Dans un bicol contenant la dAMP sous sa forme Na⁺ (95,4mg ; 0,27mmol) est rajouté du CH₃CN anhydre (1mL) et de la NEt₃ anhydre (480μL; 3,44mmol). L'ensemble est refroidit par un bain de glace à 0°C. Une solution d'anhydride trifluoroacétique (480μL; 3,4mmol) dans du CH₃CN (300μL) est également préparée à froid et rajoutée goutte à goutte à la solution précédente. Le mélange réactionnel est maintenu à 0°C pendant 15min à la suite desquels l'excès de trifluoroacétique est évaporé sous le vide de la pompe à palette. Pour cela le bicol est relié au vide de la pompe via un piège refroidit à -78°C. On obtient alors une huile jaune que l'on refroidit à nouveau à 0°C. Une solution de NMI (72μL; 0,9mmol), de NEt₃ (315μL ; 2,26mmol) dans du CH₃CN (300μL) est préparée à froid et rajoutée au mélange réactionnel. La réaction peut évoluer à cette température pendant une heure. (Bu₄N)₃HP₂O₇ en solution dans du CH₃CN (C=0,5M; 1,1mL; 0,55mmol) est déposé dans un schlenk sous argon. La solution est refroidit à 0°C et la solution de monophosphate activé, préparée précédemment est rajoutée goutte à goutte. La réaction peut alors évoluer à température ambiante et son évolution est suivie sur CCM dans un mélange EtOH/ NH₄OH 28%/ H₂O (8:1:1) et par RMN ³¹P dans du CD₃CN. Au bout de 4h, une solution d'NH₄OAc (250mM; 3mL) est rajoutée et l'ensemble est maintenu sous agitation pendant 15min. Le mélange réactionnel est repris dans du CHCl₃, et la phase organique est extraite trois fois avec de l'H₂O. La phase aqueuse ainsi récupérée est évaporée sous le vide de la pompe à eau. Le brut réactionnel est analysé par CLHP sur une colonne C₁₈ ThermoHypersil Hypurity (5μ; 250*4mm) avec un gradient de MeOH de 0 à 100% dans du TEAB et un débit de 1mL.min⁻¹. Le produit a également été purifié sur une colonne semi-préparative C₁₈ ThermoHypersil Hypurity (5μ; 250*10mm) dans les mêmes conditions d'éluion et un débit de 4mL.min⁻¹. Le produit est analysé par CLHP (pureté de 97%) et est obtenu, avec un rendement de purification de 34% déterminé par mesure de l'absorbance en spectroscopie UV-visible à 260nm.

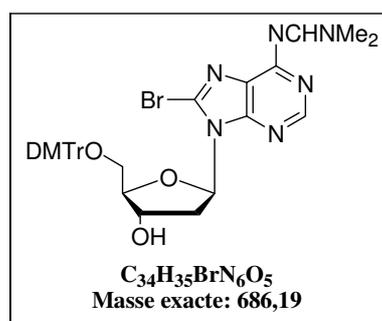
RMN ¹H (MeOD, 200MHz): 8,4 (1H, s, H8); 8,1 (1H, s, H2); 6,37 (1H, dd, J₁=J₂= 6,8Hz, H1'); 4,65-4,61 (1H, m, H3'); 4,6-4,46 (1H, m, H4'); 4,1-4,05 (2H, m, H5'); 3,13-3,03 (6H, q, CH₂); 2,74-2,6 (1H, m, H2'); 2,38-2,3 (1H, m, H2'); (9H, t, J= 7Hz CH₃).

RMN ³¹P (MeOD, 80,9MHz): -9,5 (1P, d, J_{p-p}=18,3Hz, P); -10,2 (1P, d, J_{p-p}=18,9Hz, P); -20,8 (1P, m, P).

ESI SM négatif (m/z): 329,9 [dAMP-H] ; 409,9 [dADP-H] ; 489,9 [dATP-H]

Synthèse du monophosphate de la 8vdA (8vdA-MP)

8-Bromo-5'-O-DMTr-N6-diméthylformamidine-2'dA (37)



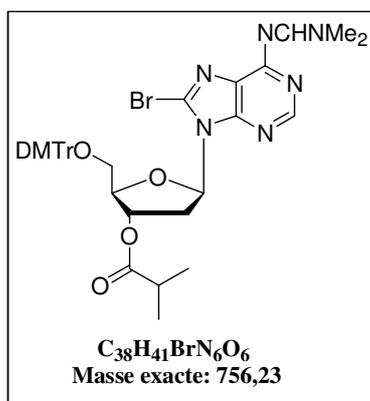
Le composé 8-Bromo-5'-O-DMTr-2'-désoxyadénosine (500mg; 0,8mmol) est solubilisé dans la DMF (2,65mL) anhydre avant de rajouter sous pression d'argon et agitation constante, le *N,N'*-diméthylformamide-diméthylacétale (535 μ L; 4mmol). L'avancement de la réaction est suivie par CCM dans un mélange CH₂Cl₂/ MeOH (95:5). De l'AcOEt (5mL) est rajouté au bout de 4 heures et la phase organique est lavée successivement avec de l'H₂O (2*10mL) et de la saumure (10mL), séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le composé (37) est obtenu avec un rendement de 91% (502mg; 0,73mmol) sans purification supplémentaire.

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz): 8,82 (1H, s, NCH); 8,25 (1H, s, H2); 7,39-7,17 (9H, m, DMTr); 6,77-6,73 (4H, m, DMTr); 6,42 (1H, dd, J₁=J₂= 6,7Hz, H1'); 4,96-4,94 (1H, m, H3'); 4,12-4,10 (1H, m, H4'); 3,75 (6H, s, CH₃O); 3,56-3,50 (1H, m, H2'); 3,41 (2H, dd, J_{AX}= 1,85Hz, J_{BX}= 2,5Hz, J_{AB}= 5,6Hz, H5'); 3,2 (3H, s, NCH₃); 3,17 (3H, s, NCH₃); 2,38-2,30 (1H, m, H2').

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,4MHz): 158,37 (C_{IV} DMTr); 157,9 (NCH); 152,3 (C4); 152,1 (C2); 144,7 (C8); 135,9 (C6); 130-127,7 (CH DMTr); 126,7 (C5); 113 (CH DMTr); 86,2 (C1'); 85,8 (C3'); 72,9 (C4'); 63,8 (C5'); 55,2 (CH₃O); 41,2 (NCH₃); 36,8 (C2'); 35,2 (NCH₃).

ES SM positif (m/z): 686,7 [M]; 688,5 [M'] en fonction de l'abondance isotopique du brome.

8-bromo-5'-ODMTr-N6-Diméthylformamidine-3'-isobutyryl-2'-dA (38)



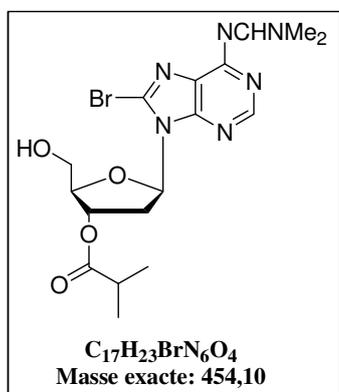
Le composé (37) (500mg; 0,727mmol) est dissous dans la pyridine (2,5mL) avant de rajouter la DMAP (8,8mg; 0,073mmol) suivie de l'anhydride isobutyrique (242μL; 1,45mmol). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation et atmosphère d'argon pendant 4 heures (CCM dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH (95:5)). Le mélange réactionnel est repris dans du CH₂Cl₂ avant d'être lavée avec une solution aqueuse saturée d'NaHCO₃, de l'H₂O (2*15mL) et de la saumure (15mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et élué avec un gradient de MeOH (de 0 à 3%). Le composé (38) est obtenu avec un rendement de réaction de 90% (490mg; 0,65mmo).

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz): 8,82 (1H, s, NCH); 8,20 (1H, s, H2); 7,41-7,16 (9H, m, DMTr); 6,76-6,70 (4H, m, DMTr); 6,42 (1H, dd, J₁=J₂= 7,1Hz, H1'); 5,65-5,62 (1H, m, H3'); 4,29-4,26 (1H, m, H4'); 3,9-3,83 (1H, m, H2'); 3,76 (6H, s, CH₃O); 3,44-3,40 (2H, m, H5'); 3,24 (3H, s, NCH₃); 3,19 (3H, s, NCH₃); 2,62-2,56 (1H, m, CH); 2,34-2,26 (1H, m, H2'); 1,21 (3H, s, CH₃); 1,94 (3H, s, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,4MHz): 176,3 (CO); 158,3 (C_{IV} DMTr); 157,8 (NCH); 152,4 (C4); 152,1 (C2); 144,7 (C8); 136,0 (C6); 130,1-126,7 (CH DMTr); 126,6 (C5); 112,9 (CH DMTr); 86,1 (C1'); 84,2 (C3'); 75,1 (C4'); 63,8 (C5'); 55,1 (CH₃O); 41,3 (CH); 35,2 (CH₃N); 34,4 (C2'); 33,9 (CH₃N); 18,9 (CH₃).

ESI SM positif (m/z): 757,5 [M+H⁺]; 758,5 [M'+H⁺].

8-Bromo-N6-diméthylformamidine-3'-isobutyryl-2'dA (39)



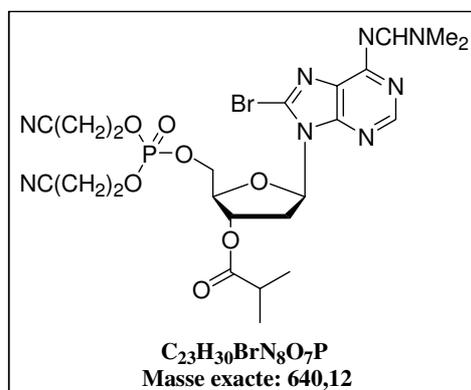
Le produit (**38**; 50mg; 0,066mmol) est dissous dans une solution de DCA à 3% dans du CH₂Cl₂ (2mL) fraîchement préparée, sous agitation et pression d'argon. L'avancement de la réaction est contrôlée par CCM dans un mélange CH₂Cl₂ /MeOH (95:5) avant d'être stoppée au bout de 15min en ramenant le pH à neutralité avec une solution aqueuse saturée d'NaHCO₃. La phase organique est lavée plusieurs fois avec de l'H₂O (2*15mL) et de la saumure (15mL), séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel obtenu sous la forme d'une huile, est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃. Un gradient de MeOH (de 0 à 5%) permet d'obtenir le composé (**39**) avec un rendement de 83% (25mg; 0,054mmol)

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz): 8,87 (1H, s, NCH); 8,41 (1H, s, H2); 6,28 (1H, dd, J₁= 5,4Hz, J₂= 10Hz, H1'); 5,55-5,53 (1H, m, H3'); 4,20-4,18 (1H, m, H4'); 3,98-3,88 (3H, m, H5'); 3,24 (3H, s, NCH₃); 3,20 (3H, s, NCH₃); 3,22-3,12 (1H, m, H2'); 2,65-2,56 (1H, m, CH); 2,37-2,31 (1H,m, H2'); 1,21 (3H, s, CH₃); 1,18 (3H, s, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,4MHz): 176,5 (CO); 159,0 (NCH); 158,1 (C4); 152,4 (C8); 151,7 (C2); 151,3 (C6); 128,2 (C5); 88,2 (C1'); 87,6 (C3'); 76,0 (C4'); 63,2 (C5'); 41,4 (NCH₃); 36,8 (C2'); 35,4 (NCH₃); 33,8 (CH); 18,8 (CH₃).

ESI SM positif (m/z): 454,9 [M+H⁺]; 455,9 [M+H⁺]; 456,9 [M']; 458 [M'+H⁺]; 476,9 [M+Na⁺]; 478,9 [M'+Na⁺].

8-bromo-N6-diméthylformamidine-3'-isobutyryl-5'-dicyanoéthyl-phosphotriester-2'dA (40).

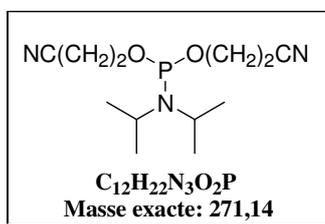


L'alcool libre (**39**) (74mg; 0,183mmol) est dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ (300μL) avant de rajouter le tétrazole (30mg; 0,42mmol). Le réactif de phosphitylation (**41**) (60μL; 0,22mmol) est également dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ (300μL) avant d'être rajouté au mélange réactionnel. L'ensemble est sous agitation et sous pression d'argon. Au bout de 4 heures (contrôle sur CCM dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH (95:5)) le phosphotriester est oxydé par une solution de I₂ (2,7mL, à 0,1M) dans un mélange lutidine THF/ H₂O (45:45:10). L'excès d'I₂ est neutralisé au bout de 30 min de réaction par une solution aqueuse d'NaHSO₃ à 40%. La phase organique est lavée avec de l'H₂O (2* 15mL) et de la saumure (15mL). Elle est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le mélange réactionnel est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et le produit est élué avec un gradient de MeOH (de 0 à 3%) dans du CHCl₃. Le composé (**40**) est obtenu avec un rendement de 65% (70mg; 0,12mmol).

RMN ¹H (CD₂Cl₂, 200 MHz): 8,91 (1H, s, NCH); 8,45 (1H, s, H2); 6,44 (1H, dd, J₁=J₂=6,8Hz, H1'); 5,69-5,62 (1H, m, H3'); 4,46-4,23 (4H, m, CH₂O); 4,21-4,10 (3H, m, H5' et H4'); 3,89-3,75 (1H, m, H2'); 3,21 (3H, s, NCH₃); 3,20 (3H, s, NCH₃); 2,74-2,6 (5H, m, CH₂CN et CH); 2,55-2,41 (1H, m, H2'); 1,22 (3H, s, CH₃); 1,18 (3H, s, CH₃).

RMN ³¹P (CD₂Cl₂, 80MHz): -2,2 (1P, s).

N,N'-diisopropyl-dicyanoéthyl-phosphoramidite (**41**)

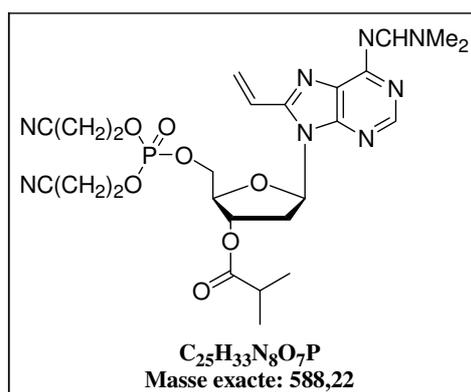


L'hydroxypropionitrile (80 μ L; 1,16mmol) et la DIPEA (202 μ L; 1,16mmol) sont mis en solution dans du CH_2Cl_2 et refroidit par un bain d'eau glacée à 0-4°C. Le mélange est sous agitation pendant 10min avant de rajouter le chloro- *N,N'*-diisopropylcyanoéthylphosphoramidite (250 μ L; 1mmol). Le suivi de la réaction se fait sur plaque d'alumine (100% éther) et le produit est révélé à l'iode. La réaction est stoppée au bout d'une heure par rajout d'AcOEt (10mL) distillé. La phase organique est lavée trois fois avec un tampon phosphate à pH 7 (3*10mL) avant d'être séchée sur Na_2SO_4 , filtrée, et évaporée. Le brut réactionnel est purifié sur une colonne d'alumine de 5 cm de hauteur conditionnée et élué avec de l'éther. Le réactif (**41**) est obtenu avec un rendement de 75% (234mg; 0,86mmol)

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 200 MHz): 3,91-3,77 (4H, m, CH_2O); 3,68-3,56 (2H, m, CH); 2,68-2,61 (4H, m, CH_2CN); 1,21 (6H, s, CH_3); 1,17 (6H, s, CH_3).

RMN ^{31}P (CD_2Cl_2 , 80 MHz): 150 (1P, s).

*8-vinyl-N6-diméthylformamide-3'-isobutyryl-5'-dicyanoéthyl-phosphotriester-2'dA (**42**)*



Dans un schlenk le composé (**40**) (65mg; 0,11mmol) est dissous dans la NMP (400 μ L) à température ambiante. Le catalyseur $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (11,5mg; 0,01mmol) est alors ajouté et le milieu réactionnel dégazé par trois cycles vide-argon successifs. Le tétravinylétain (41 μ L;

Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale

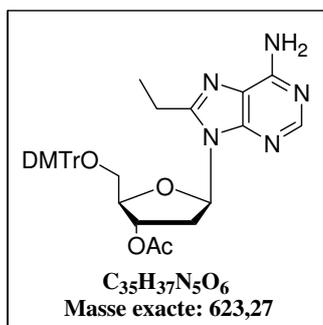
0,22mmol) est alors ajouté. Le milieu réactionnel est à nouveau dégazé avant de chauffer l'ensemble sous argon, à 110°C. Au bout de 30 min de réaction (contrôle par CCM dans un mélange CHCl₃/ MeOH (95:5)) de l'EtOAc (5 mL) et de l'eau (5mL) sont ajoutés. Le catalyseur est filtré sur célite et le filtrat est récupéré pour être lavé à l'eau (2*15mL) et par de la saumure (1* 15mL). La phase organique sera séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et élué par un gradient de MeOH (de 0 à 3%) dans du CHCl₃. On obtient alors le produit (**42**) avec un rendement de 36% (21mg; 0,036mmol).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 8,92 (1H, s, NCH); 8,5 (1H, s, H₂); 6,91 (1H, dd, J₁= 11,1Hz et J₂= 17,1Hz; H_{vinyle}); 6,67 (1H, dd, J₁ = 1,50Hz et J₂ = 17,1Hz; H_{Trans}); 6,46 (1H, dd, J₁=J₂= 6,9 Hz; H_{1'}); 5,77 (1H, dd, J₁ = 1,50Hz et J₂ =11,1Hz; H_{Cis}); 5,62-5,58 (1H, m, H_{3'}); 4,47-4,40 (1H, m, H_{4'}); 4,26-4,16 (6H, m, CH₂O et H_{5'}); 3,72-3,67 (1H, m, H_{2'}); 3,26 (3H, s, NCH₃); 3,20 (3H, s, NCH₃); 2,72-2,56 (5H, m, CH₂CN et CH); 1,20 (3H, s, CH₃); 1,24 (3H, s, CH₃).

RMN ³¹P (CDCl₃, 80Hz): -1,95 (1P, s).

Synthèse du monophosphate de la 8-éthyl-désoxyadénosine (8edA-MP)

8-éthyl-5'-O-DMTr-3'-acétyl-2'dA (44)



Le composé (**13**; 254mg; 0,44mmol) est mise en solution dans la pyridine anhydre (1,5mL) avant de rajouter la DMAP (27mg; 0,22mmol) et l'anhydride acétique (62μL; 0,66mmol) successivement. Le milieu réactionnel est maintenu sous pression d'argon et agitation constante. L'avancement de la réaction est suivie sur CCM dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH (95:5). La réaction est arrêtée au bout de 2 heures en rajoutant du CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec de l'H₂O (10mL) et de la saumure (10mL) avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le mélange réactionnel est purifié sur gel de silice

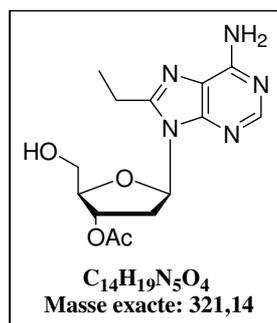
conditionné avec du CHCl_3 et un gradient de MeOH (de 0 à 3%) dans du CHCl_3 permet d'obtenir le produit (**44**) avec un rendement de 82% (225mg; 0,36mmol).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200MHz): 8,05 (1H, s, H2); 7,42-7,18 (9H, m, DMTr); 6,8-6,7 (4H, m, DMTr); 6,28 (1H, dd, $J_1=6,3\text{Hz}$ et $J_2=8,2\text{Hz}$, H1'); 5,63-5,6 (1H, m, H3'); 5,4 (2H, s, NH_2); 4,27-4,20 (1H, m, H4'); 3,77 (6H, s, CH_3O); 3,75-3,7 (1H, m, H2'); 3,44-3,40 (2H, ABX, $J_{\text{AX}}=2,6\text{Hz}$, $J_{\text{BX}}=3\text{Hz}$, $J_{\text{AB}}=7,6\text{Hz}$, H5'); 2,98-2,94 (2H, q, $J=7,1\text{Hz}$, CH_2); 2,36-2,25 (1H, m, H2'); 2,12 (3H, s, CH_3); 1,40-1,33 (3H, t, $J=7,5\text{Hz}$, CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50,3MHz): 170,6 (CO); 158,8 (C_{IV} DMTr); 158,7 (C4); 155 (C8); 151,9 (C2); 151,44 (C6); 145,12 (C_{IV} DMTr); 136,3 (C_{IV} DMTr); 130,4-127,1 (CH DMTr+ C5); 113,5 (CH DMTr); 86,6 (C_{IV} DMTr); 84,5 (C1'); 84,3 (C3'); 75,7 (C4'); 63,9 (C5'); 55,6 (CH_3O); 35,3 (C2'); 22,3 (CH_2); 21,5 (CH_3); 12,2 (CH_3).

ESI SM positif (m/z): 303,1 [DMTr^+]; 624,0 [$\text{M}+\text{H}^+$]; 645,9 [$\text{M}+\text{Na}^+$]; 662,2 [$\text{M}+\text{K}^+$].

8-éthyl-3'-acétyl-2'dA (**45**)



Une solution de DCA 3% dans du CH_2Cl_2 (7mL) fraîchement préparée est rajoutée sous pression d'argon au composé (**44**, 132mg; 0,207mmol). L'avancement de la réaction est contrôlée par CCM dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5). Au bout de 15min le pH de la solution est ramené à neutralité grâce à une solution saturée d' NaHCO_3 . Le mélange réactionnel est repris dans du CH_2Cl_2 et la phase organique est lavée avec de l' H_2O (10mL), une solution aqueuse saturée d' NaHCO_3 (10mL) et de la saumure (10mL). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Le brut de réaction est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl_3 et un gradient de MeOH (de 0 à 5%) dans du CHCl_3 permet d'obtenir le composé (**45**) avec un rendement de 98% (65mg; 0,20mmol).

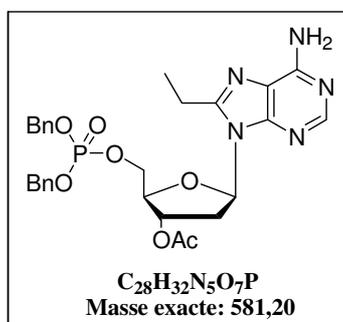
Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale

RMN ¹H (MeOD, 200MHz): 8,11 (1H, s, H2); 6,34 (1H, dd, J₁= 5,72Hz, J₂= 9,3Hz, H1'); 5,50- 5,47 (1H, m, H3'); 4,22 (1H, m, H4'); 3,93-3,77 (2H, ABX, J_{AB}= 2,04Hz, J_{BX}= 2,6Hz, J_{AB}= 12,3Hz, H5'); 3,34-3,09 (1H, m, H2'); 2,99 (2H, q, J=7,4Hz, CH₂); 2,50-2,41 (1H, m, H2'); 2,12 (3H, s, CH₃); 1,45-1,37 (3H, t, J=7,5Hz, CH₃).

RMN ¹³C (MeOD, 50,3MHz): 172,3 (CO); 156,8 (C4); 155,6 (C8); 152,6 (C2); 150,9 (C6); 119,6 (C5); 87,9 (C3'); 87,1 (C1'); 77,3 (C4'); 64,0 (C5'); 37,5 (C2'); 22,1 (CH₂); 21 (CH₃); 11,8 (CH₃).

ESI SM positif (m/z): 322,3 [M+H⁺]; 344,2 [M+Na⁺].

8-éthyl-3'-acétyl-5'-dibenzylphosphate-2'dA (46)



Le composé (45) (30mg; 0,093mmol) est dissous dans du CH₂Cl₂ (500μL) et le tétrazole (26mg; 0,372mmol) est rajouté. L'ensemble est refroidi à 0°C par un bain de glace et maintenu sous agitation et atmosphère d'argon pendant 10min avant d'ajouter le dibenzyl-N,N'-diisopropylphosphoramidite (34μL; 0,102mmol). Le bain de glace est alors retiré et l'évolution de la réaction est suivie sur CCM dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH (95:5). Après deux heures le phosphodiester intermédiaire est oxydé en présence d'une solution aqueuse de *t*BuO₂H à 70% (137μL; 0,65mmol). La réaction est maintenue sous agitation pendant 1 heure. L'excès d'oxydant est neutralisé en rajoutant de la triphénylphosphine (170mg; 0,651mmol). Le mélange réactionnel est alors repris dans du CH₂Cl₂ (2mL) et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'NaHCO₃ (5mL), de l'H₂O (5mL) et de la saumure (5mL). Elle est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut de réaction est alors purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et un gradient de MeOH (de 0 à 5%) permet d'obtenir le produit (46) avec un rendement de 70% (38mg; 0,065mmol).

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,14 (1H, s, H2); 7,26-7,22 (10H, m, aromatique); 6,21(1H, dd, J₁= 7Hz, J₂= 7,9Hz, H1'); 5,82 (2H, s, NH₂); 5,48-5,46 (1H, m, H3'); 4,79 (2H, s, CH₂); 4,93

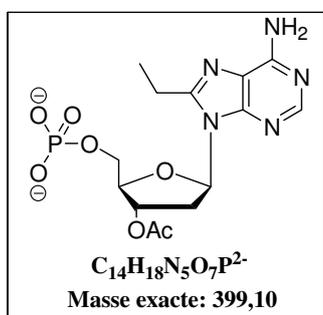
Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale

(2H, s, CH₂); 4,40-4,22 (3H, m, H₄' et H₅') ; 3,65-3,51 (1H, m, H₂') ; 2,87 (2H, q, J=7,4Hz, CH₂) ; 2,33-2,23 (1H, m, H₂') ; 2,07 (3H, s, CH₃) ; 1,33 (3H, t, J= 7,5Hz, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 169,9 (CO); 154,4 (C₄); 154,1 (C₈); 151,8 (C₂); 150,7 (C₆); 135,5 (C_{IV} aromatique); 128,3 (CH aromatique); 127,7 (CH aromatique); 84,05 (C₃') ; 82,6 (C₁') ; 74,4 (C₄') ; 69,23 (CH₂) ; 69,18 (CH₂) ; 66,3 (C₅') ; 34,4 (C₂') ; 21,6 (CH₂) ; 20,8 (CH₃) ; 11,7 (CH₃).

RMN ³¹P (CDCl₃, 80MHz): 0,14 (1P, q, P-O).

8-éthyl-3'-acétyl-5'-monophosphate-2'-dA (47)



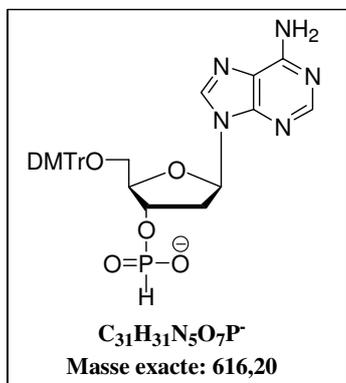
Le composé (46) (24,3mg; 0,042mmol) est repris dans un schlenk et dissous dans de l'EtOH (150μL), avant de rajouter du NaHCO₃ (7mg; 0,084mmol) et du Pd/C (5mg; 0,0042mmol). Le mélange réactionnel est dégazé par trois cycles successifs vide-hydrogène, avant de laisser la réaction évoluée à température ambiante et sous pression d'hydrogène. La réaction est suivie sur CCM dans un mélange *i*PrOH/ NH₄OH 28%/ H₂O (7:2:1). Au bout de 4 jours, de l'EtOH (2mL) est rajouté, le catalyseur est filtré sur célite et le filtrat évaporé à sec. Le produit (47) est obtenu sans purification supplémentaire avec un rendement de 86% (14,5mg; 0,036mmol).

RMN ¹H (D₂O, 200MHz): 8,0 (1H, s, H₂); 6,2 (1H, dd, J₁=J₂= 6,6Hz, H₁') ; 5,36 (1H, m, H₃') ; 4,26-4,24 (1H, m, H₄') ; 4,05-3,98 (2H, m, H₅') ; 3,16-3,09 (1H, m, H₂') ; 2,90-2,87 (2H, m, CH₂) ; 2,39-2,32 (1H, m, H₂') ; 2,05 (3H, s, CH₃) ; 1,22 (3H, t, J=7,5Hz, CH₃).

RMN ³¹P (D₂O, 80MHz): 2,38 (1P, s, P-O)

ESI SM négatif (m/z): 399,5 [M-H].

5'-O-DMTr-3'-phosphonate-2'dA (48)



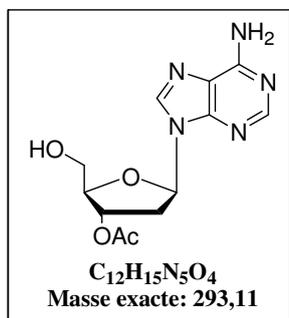
Le composé (**30**; 300mg; 0,54mmol) est dissous dans la pyridine (2mL) l'imidazole (147mg; 2,16mmol) est rajouté suivi du diphénylphosphite (730 μ L; 3,8mmol). L'ensemble est sous agitation et atmosphère d'argon. L'évolution de la réaction est suivie sur CCM dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH (95:5). Au bout de 4h un mélange MeOH/NEt₃ (2mL; 1:1) est rajouté et la réaction peut évoluer pendant 15min sous atmosphère d'argon. Le mélange réactionnel est repris dans du CH₂Cl₂ (10mL) et la phase organique est lavée avec de l'H₂O (10mL), une solution aqueuse d'NaHCO₃ (10mL) et de la saumure (10mL). Elle est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et 1% de NEt₃. Un gradient de MeOH (de 0 à 5%) dans du CHCl₃ et 1% de NEt₃ permet d'obtenir le composé (**48**) avec un rendement de 80% (266mg; 0,43mmol).

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,46 (0,5H, s, P-H); 8,27 (1H, s, H8); 7,98 (1H, s, H2); 7,42-7,20 (9H, m, DMTr); 6,79-6,75 (4H, m, DMTr); 6,51 (1H, dd, J₁=J₂= 6,4Hz, H1'); 5,65 (2H, s, NH₂); 5,29 (0,5H, s, P-H); 5,04-5,0 (1H, m, H3'); 4,4-4,38 (1H, m, H4'); 3,77 (6H, s, CH₃O); 3,39-3,37 (2H, m, H5'); 3,15-2,98 (6H, q, CH₂); 2,87-2,73 (2H, m, H2'); 1,36-1,29 (9H, t, CH₃).

RMN ³¹P (CDCl₃, 80,9MHz): 4,6 (1P, d, J=634Hz, P-H).

ESI SM négatif (m/z): 616,0 [M-H].

3'-Acétyl-2'-dA (49)



Le composé (**31**, 250mg; 0,42mmol) est dissous dans un mélange de DCA à 3% dans du CH_2Cl_2 (14mL) sous agitation et atmosphère d'argon. Au bout de 15min (CCM dans un mélange $CH_2Cl_2/MeOH$ (95:5) le pH de la solution est ramené à neutralité en rajoutant une solution aqueuse saturée d' $NaHCO_3$. Le mélange réactionnel est repris dans du CH_2Cl_2 et la phase organique est lavée avec de l'eau (15mL) et de la saumure (15mL). Elle est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée sous le vide de l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur gel de silice conditionné avec du $CHCl_3$ et le produit est élué avec un gradient de MeOH (de 0 à 4%) dans du $CHCl_3$. Le produit (**49**) est obtenu avec un rendement de 76% (92,4mg; 0,32mmol).

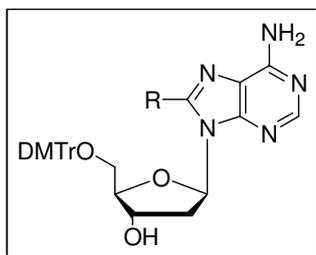
RMN 1H (MeOD, 200MHz): 8,27 (1H, s, H8); 8,14 (1H, s, H2); 6,4 (1H, dd, $J_1=5,7Hz$ et $J_2=8,9Hz$, H1'); 5,44-5,41 (1H, m, H3'); 4,19-4,18 (1H, m, H4'); 3,81-3,79 (2H, m, H5'); 2,99-2,85 (1H, m, H2'); 2,56-2,46 (1H, m, H2'); 2,05 (3H, s, CH_3).

RMN ^{13}C (MeOD, 50,3MHz): 155,6 (C4); 152,4 (C2); 142,4 (C8); 138,3 (C6); 126,2 (C5); 89,4 (C1'); 88,3 (C3'); 78,8 (C4'); 65,4 (C5'); 40,3 (C2'); 23,1 (CH_3).

ESI SM positif (m/z): 293,7 [$M+H^+$].

Synthèse des monomères pour la synthèse en phase solide

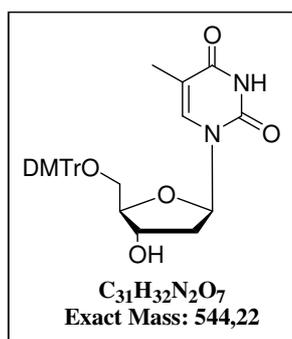
Procédure générale pour la préparation des nucléosides-5'-O-DMTr



Le nucléoside est dissous dans la pyridine (C=0,3M), la DMAP (0,5eq) est rajoutée suivie du DMTrCl (1,5eq). Le mélange réactionnel est sous agitation et pression d'argon et l'évolution de la réaction est suivie sur CCM dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH (90:10). La réaction est arrêtée en rajoutant du MeOH et le pH est ramené à neutralité avec de la NEt₃. L'ensemble est alors évaporé de moitié et repris dans du CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée d'NaHCO₃, de l'H₂O et de la saumure avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et 1% de NEt₃ et élué avec un gradient de MeOH (de 0 à 4%) dans du CHCl₃ et 1% de NEt₃.

Ce protocole de synthèse a été appliquée au monomère (2), (30), (51) et (52).

5'-O-DMTr-2'dT (51)



Thymidine	1g; 4,1 mmol
Pyridine	14mL
DMAP	251mg; 2,1 mmol
DMTrCl	2,1g; 6,2 mmol
Rendement	80% (1,8g; 3,3 mmol)

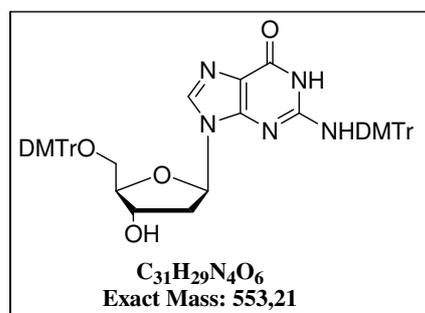
Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 7,5 (1H, s, H6); 7,26-7,14 (9H, m, DMTr); 6,73-6,7 (4H, m, DMTr); 6,38-6,28 (2H, m, H1' et H6); 4,5-4,46 (1H, m, H3'); 3,97-3,96 (1H, m, H4'); 3,66 (3H, s, CH₃O); 3,38-3,20 (2H, ABX, J_{AX}= 3Hz, J_{BX}= 2,8Hz, J_{AB}= 10,4Hz, H5'); 2,89 (3H, s, CH₃); 2,31-2,15 (2H, m, H2').

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 163,9 (C2); 158,67 (C_{IV} DMTr); 150,4 (C4); 144,3 (CH DMTr); 135,7 (CH DMTr); 135,4 (C6); 130,05-127,07 (CH DMTr); 113,2 (CH DMTr); 111,1 (C5); 86,2 (C3'); 84,7 (C1'); 63,6 (C5'); 55,2 (CH₃O); 40,9 (C2'), 11,7 (CH₃).

ESI SM négatif (m/z): 543,2 [M-H] et 579,2 [M+Cl].

5'-O-DMTr-2'dG (52)



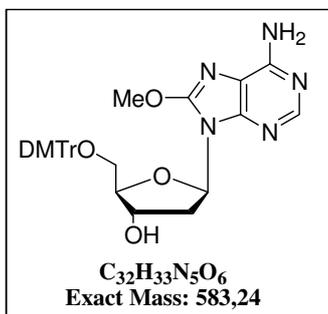
Désoxyguanosine	1,2g; 4,3mmol
Pyridine	14mL
DMAP	260mg; 2,1mmol
DMTrCl	2,2g; 6,4mmol
Rendement de réaction de 65% (2,4g; 2,8mmol)	

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,11-8,07 (1H, s, H8); 7,41-7,02 (18H, m, DMTr); 6,78-6,64 (8H, m, DMTr); 5,68 (1H, dd, J₁=J₂= 5,6Hz, H1'); 4,27-4,20 (1H, m, H3'); 3,97-3,9 (1H, m, H4'); 3,77-3,75 (1H, m, H2'); 3,69 (6H, s, CH₃); 3,63 (6H, s, CH₃); 3,33-3,17 (2H, m, H5'); 2,16-1,91 (1H, m, H2').

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 158,4 (CO); 151,1 (C4); 149,7 (C2); 148,8 (C8); 144,6 (C_{IV} DMTr); 136,8 (C5); 135,7 (C_{IV} DMTr); 129,9-126,5 (CH DMTr); 117,6 (CH DMTr); 113,1 (CH DMTr); 86,3 (C_{IV} DMTr); 85,2 (C1'); 83,7 (C3'); 71,5 (C4'); 70,1 (C_{IV} DMTr); 64,0 (C5'); 55,1 (CH₃O); 40,4 (C2').

ESI SM négatif (m/z): 870,3 [M-H] et 906,2 [M+Cl].

8-méthoxy-5'-O-DMTr-2'dA (53)



Le composé (2) (700mg; 1,10mmol) est dissous dans du MeOH (3,7mL) à température ambiante et sous pression d'argon, avant de rajouter une solution de méthanolate de sodium à 25-30% dans MeOH (1mL; 4,4mmol). Le mélange réactionnel est alors chauffé à 60°C et l'évolution de la réaction est contrôlée au bout d'une heure sur CCM dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH (95:5). Le mélange réactionnel est ramené à température ambiante et le pH de la solution est ramené à neutralité en rajoutant une solution d'HCl à 1M. Le brut réactionnel est repris dans du CH₂Cl₂ (10mL), la phase organique est lavée avec de l'H₂O (15mL), une solution aqueuse saturée d'NaHCO₃ (15mL) et de la saumure (15mL) avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le produit est purifié sur gel de silice conditionné avec du CHCl₃ et 1% de NEt₃. Un gradient de MeOH (de 0 à 4%) permet d'obtenir le composé (52) avec un rendement de 87% (560mg; 0,96mmol).

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,12 (1H, s, H2); 7,45-7,22 (9H, m, DMTr); 6,8-6,79 (4H, m, DMTr); 6,38 (1H, dd, J₁=J₂= 6,76Hz, H1'); 5,37 (2H, s, NH₂); 4,88-4,81 (1H, m, H3'); 4,13-4,04 (3H, s, CH₃O et 1H, m, H4'); 3,79 (6H, s, CH₃O); 3,45-3,23 (3H, m, H5' et H2'); 2,36-2,2 (1H, m, H2').

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 158,7 (C_{IV} DMTr); 155,6 (C4); 153,3 (C8); 151,3 (C2); 150,2 (C6); 144,8 (C_{IV} DMTr); 136,1 (C_{IV} DMTr) 130,4-127,8 (CH DMTr); 126,9 (C6); 113,2 (CH DMTr); 86,4 (C_{IV} DMTr); 85,5 (C1'); 82,5 (C3'); 73,1 (C4'); 64,2 (C5'); 57,1 (CH₃O); 55,3 (CH₃O); 36,8 (C2').

ESI SM positif (m/z): 606 [M+Na⁺].

Synthèse en phase solide des analogues H-phosphonates de nucléosides

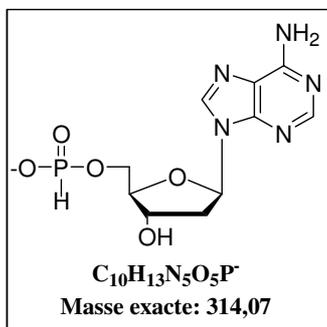
Protocol général de synthèse en phase solide sur résine Tentagel®-CO₂H.

La résine est mise à gonfler dans une fiole de 10mL en présence de CH₂Cl₂ pendant 15 min. Le nucléoside est mis en solution dans du CH₃CN avant d'ajouter le HBTU et la DMAP. Une pompe à membrane sera connectée à la fiole *via* un ballon de récupération destiné à accueillir les solvants de lavage. La résine est lavée et séchée avant de rajouter la solution de nucléoside sous argon. L'ensemble est sous agitation pendant 2h. La résine est alors lavée plusieurs fois en suivant la combinaison de solvants décrite dans le tableau qui suit. Un mélange de DCA à 3% dans du CH₂Cl₂ fraîchement préparé, est rajouté à la résine avant de la laisser sous agitation pendant 15min. Après plusieurs cycles de lavage, une solution de diphénylphosphite et d'imidazole dans la pyridine est ajoutée sous argon. La fiole est maintenue sous agitation pendant encore 2h, au bout desquelles la résine est lavée avant de cliver le nucléoside phosphitylé de la résine à l'aide d'une solution d'NH₄OH à 28% pendant 1h. Le nucléoside est récupéré après 3 lavages successifs de la résine avec un mélange MeOH/H₂O (1:1).

Les quantités utilisées sont données pour 300mg de résine (taux de greffage: 0,06mmol).

Conditions de réaction	Temps de réaction	Solvants de lavage
<p><u>Couplage à la résine</u></p> <p>HBTU (0,96mmol; 364,1 mg) DMAP (0,96mmol; 117,3mg) CH₃CN (2,5mL)</p>	2h	<p>MeOH 3*5mL CH₃CN 3*5mL CH₂Cl₂ 3*5mL</p>
<p><u>Déprotection</u></p> <p>DCA 3% / CH₂Cl₂ (8mL)</p>	15 min	<p>CH₃CN 3*5mL CH₂Cl₂ 3*5mL</p>
<p><u>Introduction du phosphonate</u></p> <p>Diphényl phosphite (2,4mmol; 500μL) Imidazole (0,6mmol; 40,1mg) Pyridine (2,5mL)</p>	2h	<p>Pyridine 3*5mL CH₃CN 3*5mL CH₂Cl₂ 3*5mL</p>
<p><u>Clivage de la résine</u></p> <p>NH₄OH 28% (5mL)</p>	1h	<p>MeOH/ H₂O (50:50) 3*5mL</p>

5'-phosphonate-2'-dA (50)

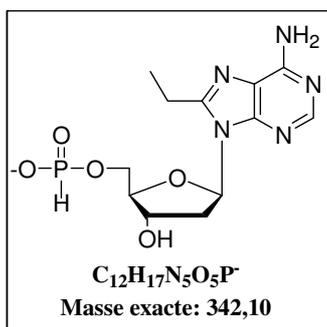


RMN ¹H (D₂O, 200MHz): 8,16 (1H, s, H8); 8,1 (0,5H, s, P-H); 7,9 (1H, s, H2); 6,23 (1H, dd, J₁=J₂= 6,6Hz, H1'); 4,9 (0,5H, s, P-H); 4,56-4,53 (1H, m, H3'); 4,1-4,09 (1H, m, H4'); 3,91-3,86 (2H, m, H5'); 2,71-2,58 (1H, m, H2'); 2,50-2,38 (1H, m, H2').

RMN ³¹P (D₂O, 80,9MHz): 7,76 (1P, d, J_{P-H}= 639Hz, P-H).

ESI SM négatif (m/z): 313,5 [M-H].

8-Ethyl-5'-phosphonate-2'-dA (54)

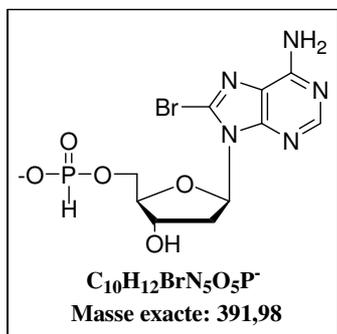


RMN ¹H (MeOD/D₂O, 200MHz): 8,01 (0,5H, s, P-H); 8,0 (1H, s, H2); 6,21 (1H, dd, J₁=J₂= 7Hz, H1'); 4,95 (0,5H, s, P-H); 4,56-4,55 (1H, m, H3'); 3,89-3,85 (3H, m, H4' et H5'); 3,13-3,10 (1H, m, H2'); 2,87-2,82 (2H, m, CH₂); 2,18-2,08 (1H, m, H2'); 1,23 (3H, t, J= 7,5Hz, CH₃).

RMN ³¹P (MeOD/ D₂O, 80,9MHz): 5,97 (1P, d, J_{P-H}= 622Hz, P-H).

ESI SM négatif (m/z): 341,5 [M-H].

8-Bromo-5'-phosphonate-2'-dA (55)

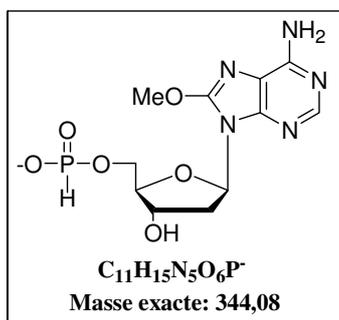


RMN ¹H (MeOD, 500MHz): 8,04 (1H, s, H2); 7,07 (0,5H, s, P-H); 6,36 (1H, dd, J₁=J₂= 7Hz, H1'); 4,53-4,52 (1H, m, H3'); 4,07-4,05 (1H, m, H4'); 3,99-3,95 (2H, m, H5'); 2,41-2,37 (1H, m, H2'); 2,27-2,23 (1H, m, H2').

RMN ³¹P (MeOD, 202,4 MHz): 8,7 (1P, d, J_{P-H}= 633Hz, P-H).

ESI SM négatif (m/z): 393,1 [M-H]; 314,3 [M-Br].

8-Méthoxy-5'-phosphonate-dA (56)

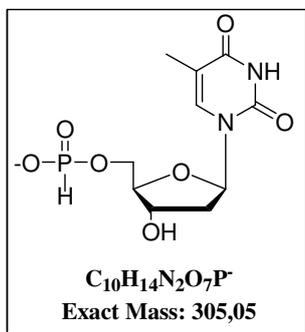


RMN ¹H (MeOD/ D₂O, 200MHz): 8,18 (0,5H, s, P-H); 8,11 (1H, s, H2); 6,4 (1H, dd, J₁=J₂= 7Hz, H1'); 5,0 (0,5H, s, P-H); 4,68-4,61 (1H, m, H3'); 4,16 (3H, s, CH₃); 4,07-3,97 (3H, m, H4' et H5'); 3,51-3,39 (1H, m, H2'); 3,21-2,95 (6H, q, CH₂ NEt₃); 2,40-2,29 (1H, m, H2'); 1,27-1,20 (9H, t, CH₃ NEt₃).

RMN ³¹P (MeOD/ D₂O, 80,9MHz): 7,42 (1H, d, J_{P-H}= 636Hz, P-H)

ESI SM négatif (m/z): 343,8 [M-H].

5'-Phosphonate-2'thymidine (57).

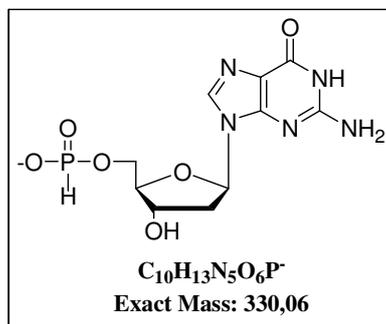


RMN ¹H (D₂O, 200MHz): 8,22 (0,5H, s, P-H); 7,57 (1H, s, H6); 6,19 (1H, dd, J₁=J₂= 6,8Hz, H1'); 5,04 (0,5H, s, P-H); 4,46-4,03 (1H, m, H3'); 4,02-3,92 (3H, m, H4' et H5'); 2,26-2,20 (2H, m, H2'); 1,77 (3H, s, CH₃).

RMN ³¹P (D₂O, 80,9MHz): 7,58 (1H, d, J_{P-H}= 637Hz, P-H).

ESI SM négatif (m/z): 305,3 [M-H].

5'-Phosphonate-désoxyguanosine (58)



RMN ¹H (D₂O, 200MHz): 8,14 (0,5H, s, P-H); 7,91 (1H, s, H8); 6,17 (1H, dd, J₁=J₂= 6,6Hz, H1'); 4,95 (0,5H, s, P-H); 4,61-4,56 (1H, m, H3'); 4,1-4,09 (1H, m, H4'); 3,94-3,91 (1H, m, H5'); 3,14-3,02 (6H, q, CH₂ NEt₃); 2,79-2,63 (1H, m, H2'); 2,45-2,33 (1H, m, H2'); 1,19-1,12 (9H, t, CH₃ NEt₃).

RMN ³¹P (D₂O, 89,9MHz): 7,81 (1H, d, J_{P-H}= 632Hz, P-H).

ESI SM négatif (m/z): 329,8 [M-H].

Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale

Les phosphonates modifiés de la dA ainsi que le phosphonate de la dT et de dG ont été analysés par CLHP sur une colonne ThermoHypersil Hypurity C₁₈ 5μ (250*4mm) grâce à un gradient de 100% TEAA (0,25M) vers 100% de MeOH sur 30min avec un débit de 1mL/min.

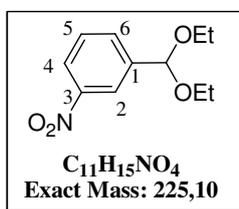
Les rendements de réactions ainsi que les puretés relatives déterminées par CLHP sont répertoriés dans le tableau 1 qui suit.

Composé	Rendement de couplage	Rendement de synthèse	Temps de rétention en min	Pureté relative
50 (R:H)	87%	67%	11,5	100%
54 (R: Ethyle)	85%	80%	17,8	99,5%
55 (R: Br)	81%	67%	10,2	96%
56 (R: OMe)	83%	70%	8,7	90%
57 (dT)	90%	73%	11,16	94,5%
58 (dG)	86%	70%	6,42	100%

Tableau 1: Récapitulatif des puretés relatives et des rendements de couplage et de réactions des H-phosphonates de nucléosides.

Synthèse du N-sulfonyloxaziridine PNO

1-diéthylacétal-3-nitrobenzène (59)



Le catalyseur CoCl₂ (258mg; 2mmol) est préalablement séché sous le vide de la pompe à palette pendant une nuit à 110°C avant d'être engagé dans la réaction. Le 3-nitrobenzaldéhyde (3g; 20mmol) est mis en solution dans l'EtOH (80mL) à température ambiante, sous pression d'argon, avant de rajouter le catalyseur CoCl₂. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux d'EtOH pendant 4h (CCM sur alumine dans un mélange cyclohexane/AcOEt (95:5)). Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est repris dans l'EtOH et évaporé à sec sous le vide de l'évaporateur rotatif. Le brut de réaction est purifié sur gel d'alumine conditionné avec du cyclohexane. Le produit est élué assez rapidement avec un gradient d'AcOEt (de 0 à 3%) pour fournir le composé (59) avec un rendement de 75% (3,32g; 15mmol).

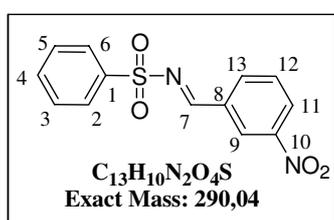
Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,20 (1H, s, H₂); 8,02 (1H, d, J= 8Hz, H₄); 7,7 (1H, d, J= 7,6Hz, H₆); 7,42 (1H, t, J=8Hz, H₅); 5,46 5 (1H, s, CH); 3,52-3,44 (4H, m, CH₂); 1,13 (6H, t, J= 7,2Hz, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 148,5 (C₃); 141,8 (C₁); 133,1 (C₂); 129,4 (C₅); 123,3 (C₆); 121,9 (C₄); 100,2 (CH); 61,5 (CH₂); 15,3 (CH₃).

ESI SM positif (m/z): 248,2 [M+Na⁺].

N-(3-Nitrobenzylidène)-benzènesulfonamide (60).

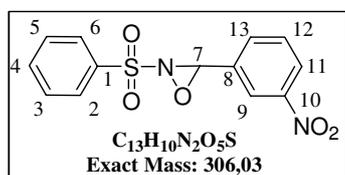


Le composé (**59**; 10g; 44mmol) est mélangé à de la benzènesulfonamine (7g; 44mmol) dans un bicol sur lequel est adapté un montage de distillation. L'ensemble est chauffé à 180°C sous agitation et atmosphère d'argon. La réaction est arrêtée une fois que la totalité de l'éthanol a été distillé. Le mélange réactionnel est évaporé à sec sous le vide de l'évaporateur rotatif pour donner un solide jaunâtre qui est redissous dans du CH₂Cl₂. Le produit en solution est alors précipité dans du pentane sous agitation rapide. Une fois que la totalité de la solution est rajoutée, l'agitation est arrêtée. Le pentane est prélevé et le solide formé est évaporé sous le vide de l'évaporateur rotatif. Le produit est obtenu avec un rendement quantitatif (12,8g; 44mmol).

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 9,14 (1H, s, NCH); 8,78-8,77 (1H, s, H₉); 8,45 (1H, d, J= 8,22Hz, H₁₁); 8,25 (1H, d, J= 7,7Hz, H₁₃); 8,03 (1H, d, J=6,85Hz, H₁₂); 7,76-7,51 (5H, m, H aromatique).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,5MHz): 158,7 (NCH); 139,3 (C₁₀); 137,07 (C₁); 136,6 (C₄); 134,8 (C₁₃); 133,6 (C₈); 133,4 (C₁₂); 130,8 (C₆); 130,3 (C₂); 127,6 (C₁₁); 125,5 (C₉).

N-sulfonyloxaziridine (61) produit connu.



Le composé (**60**) (10g; 34,5mmol) est déposé dans un bicol et du toluène (340mL) est rajouté sous argon et agitation constante. Une solution de K₂CO₃ (40g; 289mmol) dans l'H₂O (206mL) est préparée et rajoutée au mélange précédent en maintenant une agitation rapide. L'oxone® (25,3g; 41,2mmol) est également dissous dans de l'H₂O (210mL) et la solution est versée dans une ampoule à brome préalablement fixée au bicol. Cette solution est rajoutée goutte à goutte pendant 15min au mélange réactionnel sous agitation rapide. Des aliquotes de 100µL de la réaction sont prélevés, évaporés à sec puis repris dans du CDCl₃ pour être analysés par RMN. La disparition du pic caractéristique du proton NCH au bout de 2h indique que la réaction est finie. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'NaHSO₃, d'H₂O et de la saumure, avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le solide jaune amorphe obtenu, est dissous dans du CH₂Cl₂ et précipité dans du pentane sous agitation rapide. Une poudre jaune pâle est obtenue avec un rendement de 76,5% (8,1g; 26,3mmol) après évaporation et séchage sous le vide de la pompe à palette.

RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz): 8,34-7,26 (H aromatique); 5,6 (1H, s, CH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50,3MHz): 149,06 (C10); 143,3 (C8); 139,3 (C1); 135,8 (C13); 134,6 (C4); 130,4 (C12); 129,9 (C5 et C3); 129,8 (C6 et C2); 126,6 (C9); 123,7 (C11); 75,1 (C7).

ESI SM négatif (m/z) : 304,9 [M-H].

Synthèse en phase solide des analogues monophosphates de nucléosides.

Protocole général de synthèse des analogues monophosphates de nucléosides sur résine Tentagel®-CO₂H (300mg; 0,06mmol)

Les mêmes conditions réactionnelles et de lavage sont appliquées à la résine jusqu'à la formation du dérivé phénylphosphonate. Le groupement phényle est clivé en ajoutant à la résine un mélange NEt₃/H₂O (1:1) et cela pendant 15min. Le phosphonate encore fixé à la résine est alors oxydé en rajoutant le mélange BSA, PNO dans la pyridine. Cette étape dure 30min au-delà desquelles la résine est à nouveau lavée et les triméthylsilyles déprotégés par le

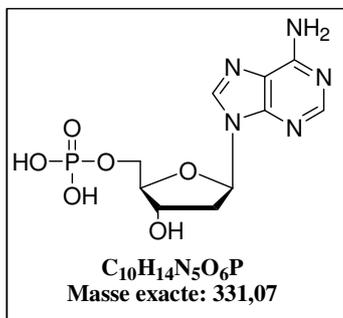
Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale

mélange MeOH/NEt₃ (1:1). Le Monophosphate de nucléoside est clivé de la résine par une solution aqueuse d'NH₄OH à 28% pendant 1h et récupéré après lavage de la résine par un mélange MeOH/H₂O (1:1).

<i>Conditions de réaction</i>	<i>Temps de réaction</i>	<i>Solvants de lavage</i>
<u><i>Couplage à la résine</i></u> HBTU (0,96mmol; 364,1 mg) DMAP (0,96mmol; 117,3mg) CH ₃ CN (2,5mL)	2h	MeOH 3*5mL CH ₃ CN 3*5mL CH ₂ Cl ₂ 3*5mL
<u><i>Déprotection</i></u> DCA 3%/ CH ₂ Cl ₂ (5mL)	15 min	CH ₃ CN 3*5mL CH ₂ Cl ₂ 3*5mL
<u><i>Introduction du phosphonate</i></u> Diphényl phosphite (2,4mmol; 500μL) Imidazole (0,6mmol; 40,1mg) Pyridine (2,5mL)	2h	Pyridine 3*5mL CH ₃ CN 3*5mL CH ₂ Cl ₂ 3*5mL
<u><i>Silylation/ oxydation</i></u> BSA (2,4mmol; 600μL) PNO (1,5mmol; 365mg) Pyridine (5mL)	30 min	Pyridine 3*5mL CH ₃ CN 3*5mL CH ₂ Cl ₂ 3*5mL
<u><i>Deprotection</i></u> MeOH/NEt ₃ (1:1) (5mL)	1h	MeOH 3*5mL CH ₃ CN 3*5mL CH ₂ Cl ₂ 3*5mL
<u><i>Clivage de la résine</i></u> NH ₄ OH 28% (5mL)	1h	MeOH/ H ₂ O (50:50) 3*5mL

Synthèse des analogues monophosphate de la dA.

5'-monophosphate-2'dA (62).



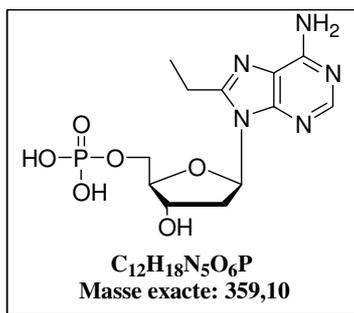
Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale

RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$, 200MHz): 8,32 (1H, s, H8); 8,02 (1H, s, H2); 6,3 (1H, dd, $J_1=J_2$ 6,6Hz, H1'); 4,54-4,52 (1H, m, H3'); 4,07-4,06 (1H, m, H4'); 3,83-3,79 (1H, m, H5'); 2,66-2,56 (1H, m, H2'); 2,44-2,34 (1H, m, H2').

RMN ^{31}P (D_2O , 200MHz): 1,64 (1P, s, P-O).

ESI SM négatif (m/z): 330 [M-H].

8-éthyl-5'-monophosphate-2'dA (63)

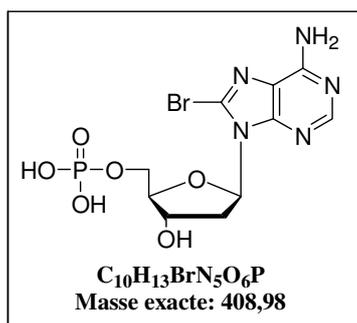


RMN ^1H (D_2O , 200MHz): 8,07 (1H, s, H2); 6,32 (1H, dd, $J_{\text{app}}=7,2\text{Hz}$, H1'); 4,63-4,61 (1H, m, H3'); 4,05-3,94 (1H, m, H4'); 3,92-3,79 (2H, m, H5'); 3,16-3,05 (1H, m, H2'); 2,9 (2H, q, $J=7,2\text{Hz}$, CH_2); 2,34-2,10 (1H, m, H2'); 1,25 (1H, t, $J=7,4\text{Hz}$, CH_3).

RMN ^{31}P (D_2O , 80,9MHz): 1,6 (1P, s, P-O).

ESI SM négatif (m/z): 358 [M-H].

8-bromo-5'-monophosphate-2'dA (64).

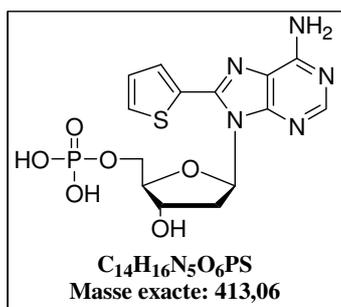


RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$, 200MHz): 8,03 (1H, s, H2); 6,36 (1H, dd, $J_1=J_2=7,2\text{Hz}$, H1'); 4,55-4,52 (1H, m, H3'); 3,99-3,79 (3H, m, H4' et H5'); 3,29-3,18 (1H, m, H2'); 2,30-2,19 (1H, m, H2').

RMN ^{31}P ($\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$, 80,9MHz): 2,0 (1P, s, P-O).

ESI SM négatif (m/z): 407,9 [M-H]; 409,5 [M'-H] en fonction des deux isotopiques du Brome.

8-thiényl-5'-monophosphate (65).

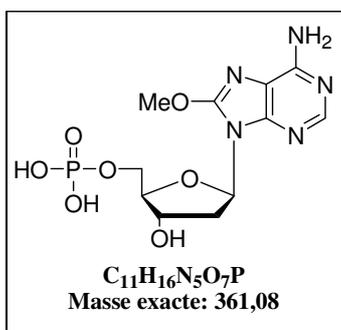


RMN ^1H (D_2O , 500MHz): 8,20 (1H, s, H1'); 7,72 (1H, d, $J = 5,15\text{Hz}$, H5''_{Thiényle}); 7,63 (1H, d, $J = 3,7\text{Hz}$, H3''_{Thiényle}); 7,25 (1H, dd, $J_1=J_2 = 3,5\text{Hz}$, H4''_{Thiényle}); 6,45 (1H, dd, $J_1=J_2 = 7\text{Hz}$, H1'); 4,11-3,92 (4H, m, H3', H4' et H5'); 3,44-3,38 (1H, m, H2'); 2,26-2,21 (1H, m, H2').

RMN ^{31}P (D_2O , 80,9MHz): 3,83 (1P, s, P-O).

ESI SM négatif (m/z): 412,0[M-H].

8-méthoxy-5'-monophosphate (66)

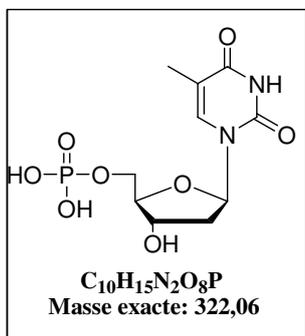


RMN ^1H ($\text{MeOD}-\text{D}_2\text{O}$, 200MHz): 8,12 (1H, s, H2); 6,4 (1H, dd, $J_1=J_2 = 7\text{Hz}$, H1'); 4,68-4,61 (1H, m, H3'); 4,16 (3H, s, CH₃); 4,07-3,97 (3H, m, H4' et H5'); 3,51-3,39 (1H, m, H2'); 2,40-2,29 (1H, m, H2').

RMN ^{31}P ($\text{MeOD}-\text{D}_2\text{O}$, 80,9MHz): 1,6 (1P, s, P-O).

ESI SM négatif (m/z): 360,8 [M-H]

5'-monophosphate-dT (67).

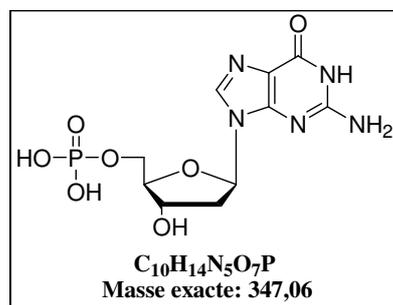


RMN ¹H (D₂O/MeOD, 200MHz): 7,90 (1H, s, H6); 6,35 (1H, dd, J₁= 6Hz, J₂= 8,5Hz, H1'); 4,53-4,51 (1H, m, H3'); 4,06-4,05 (3H, m, H4' et H5'); 2,81-2,76 (1H, m, H2'); 2,63-2,58 (1H m, H2'); 2,20 (3H, s, CH₃).

RMN ³¹P (D₂O/MeOD, 80,9MHz): 2,06 (1P, s, P-O).

ESI SM négatif (m/z): 321,0 [M-H]

5'-monophosphate-dG (68)



RMN ¹H (MeOD/D₂O, 200MHz): 7,91 (1H, s, H8); 6,17 (1H, dd, J₁=J₂= 6,6Hz, H1'); 4,61-4,56 (1H, m, H3'); 4,1-4,09 (1H, m, H4'); 3,94-3,91 (1H, m, H5'); 2,79-2,63 (1H, m, H2'); 2,45-2,33 (1H, m, H2').

RMN ³¹P (MeOD/D₂O, 80,9MHz): 1,6 (1P, s, P-O).

ESI SM négatif (m/z): 346,1 [M]

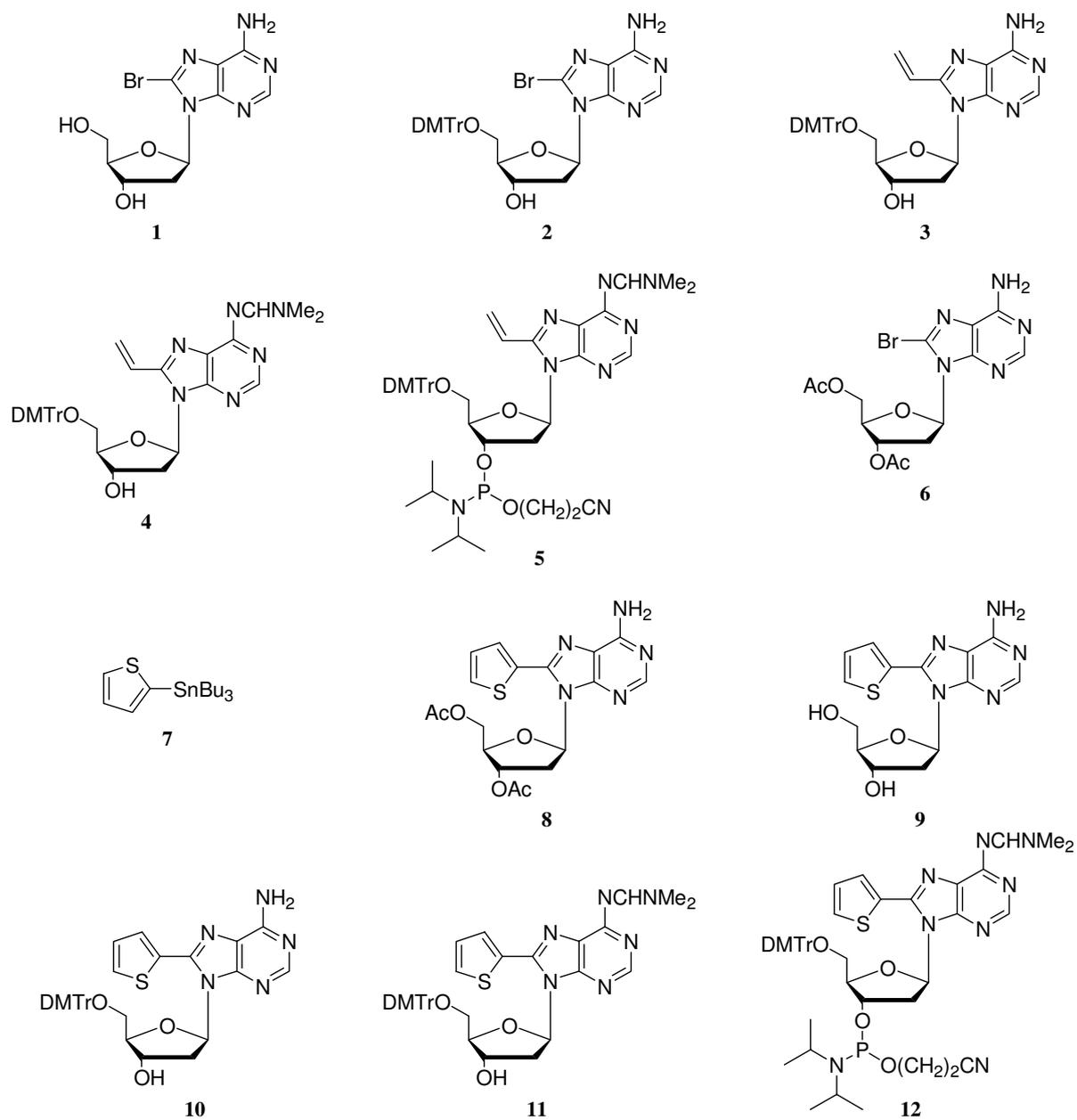
Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale

Les rendements de réactions ainsi que les puretés relatives déterminées par CLHP sont répertoriés dans la tableau qui suit.

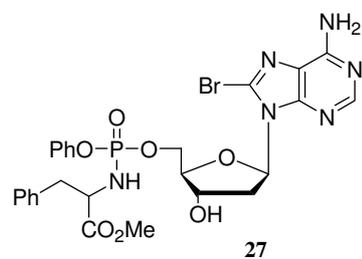
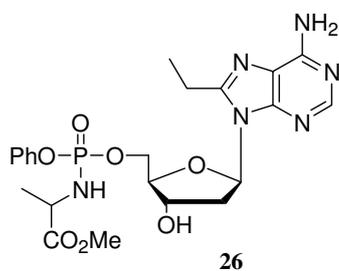
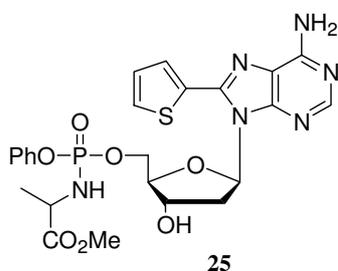
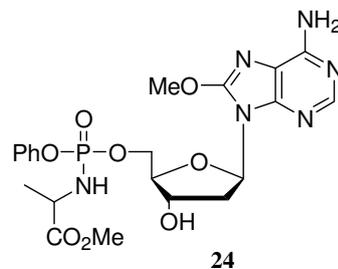
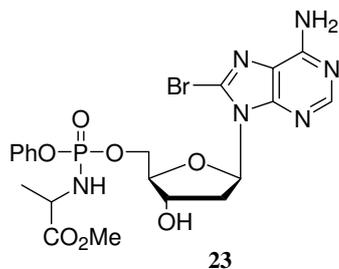
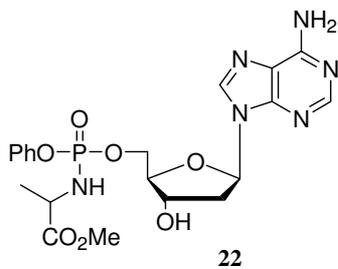
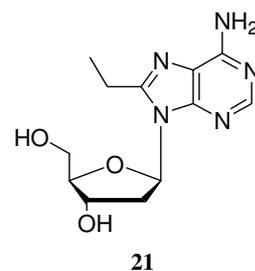
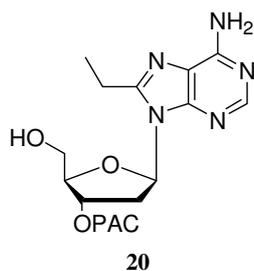
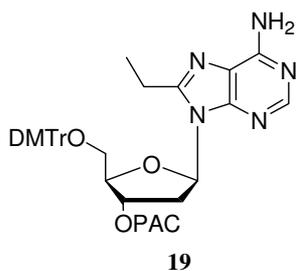
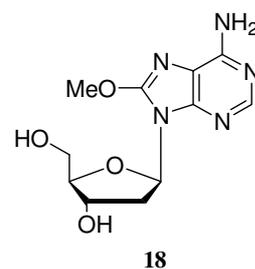
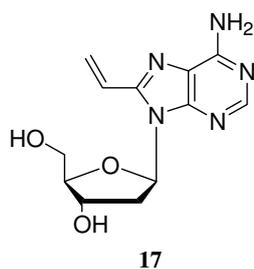
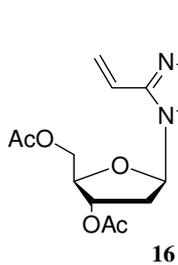
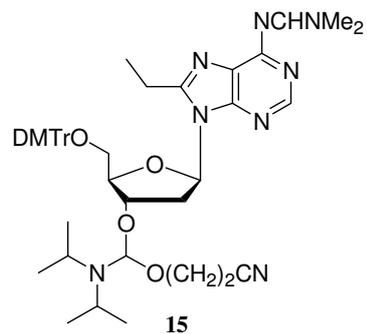
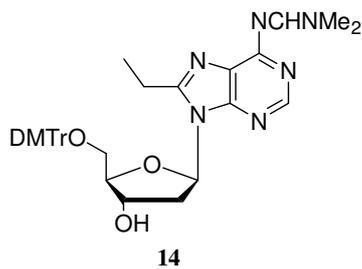
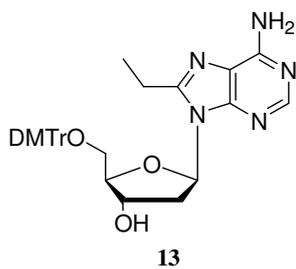
<i>Composé</i>	<i>Rendement</i>	<i>Temps de rétention</i>	<i>Pureté relative</i>
62 (R : H)	90%	6,31	100%
63 (R : Ethyle)	83,5%	6,68	100%
64 (R : Br)	71%	4,56	94,5%
65 (R : Thiényle)	74,2%	7,7	82%
66 (R : OMe)	81%	5,7	71%
67 (dT)	94,3%	5,2	98%
68 (dG)	87,6%	14,97	88%

Tableau 4: Récapitulatif des rendements de synthèse et de la pureté relative des monophosphate de nucléoside déterminée par CLHP.

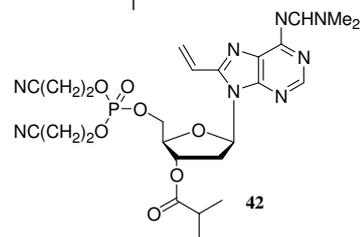
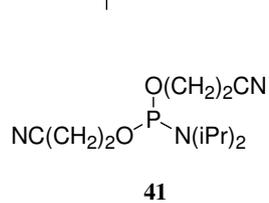
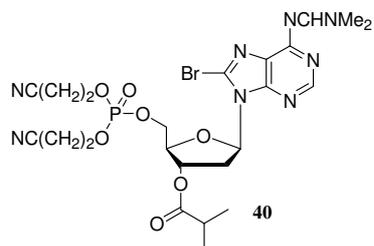
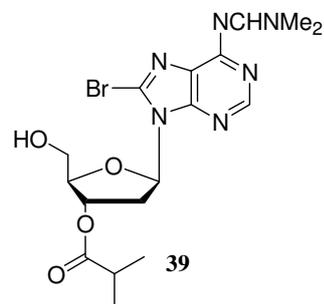
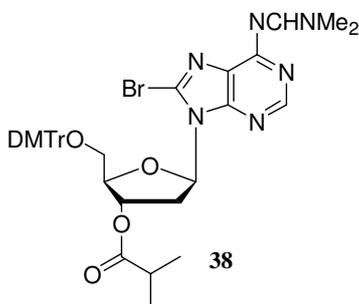
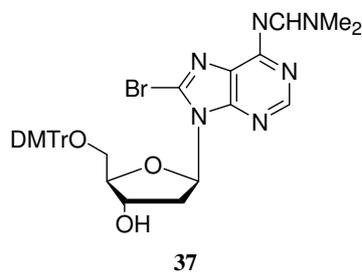
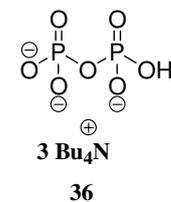
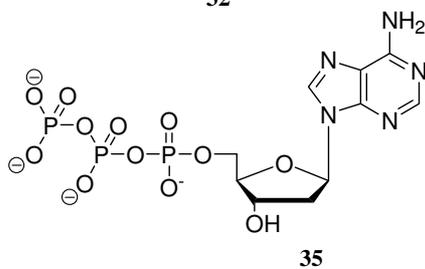
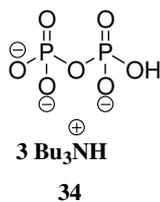
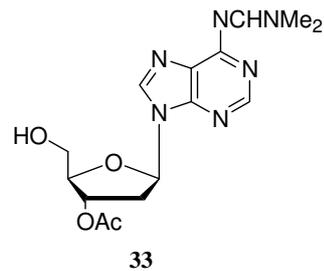
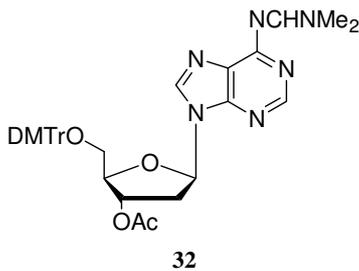
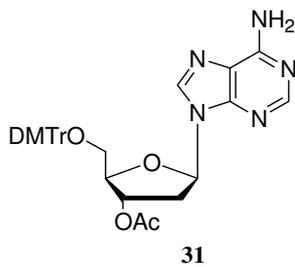
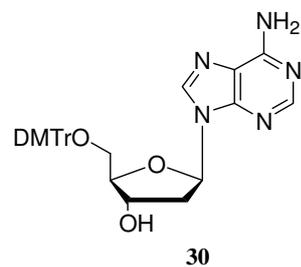
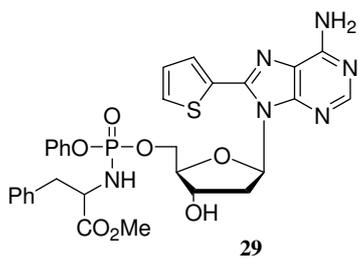
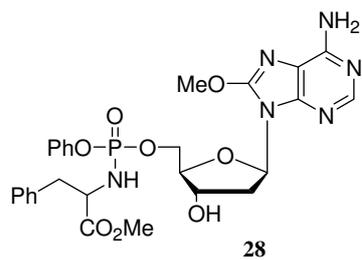
Planche de molécules



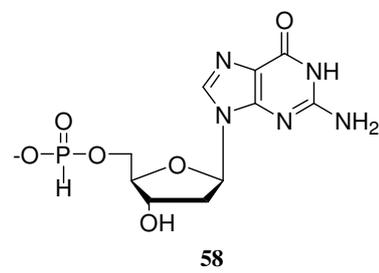
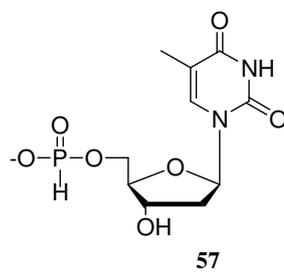
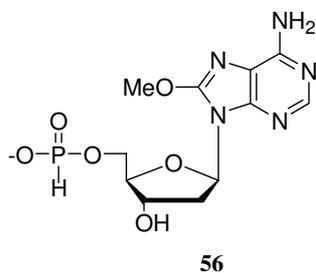
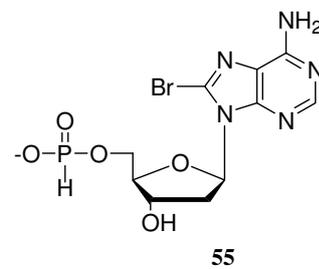
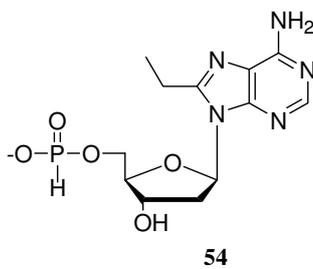
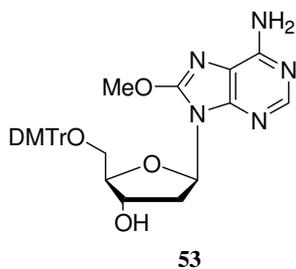
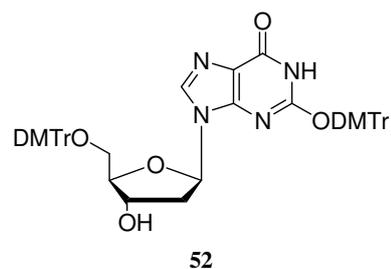
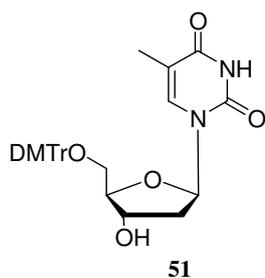
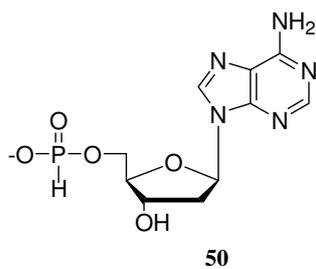
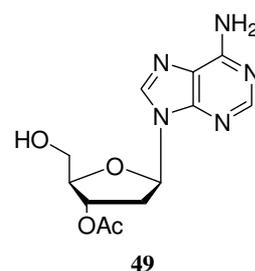
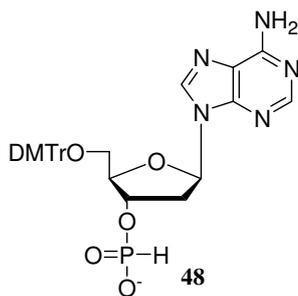
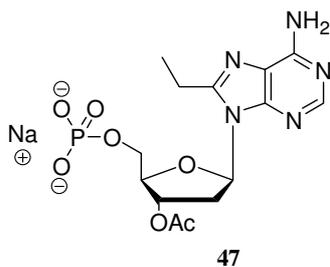
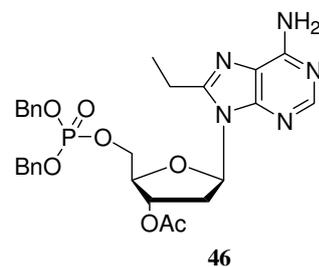
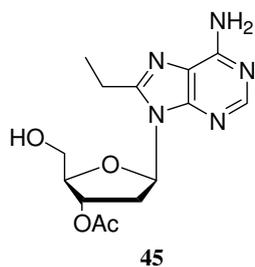
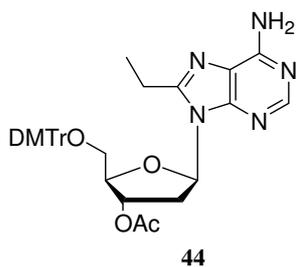
Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale



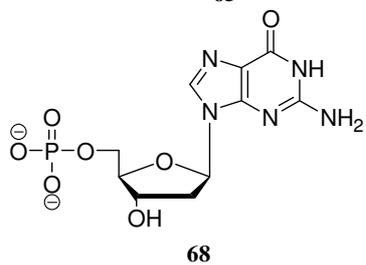
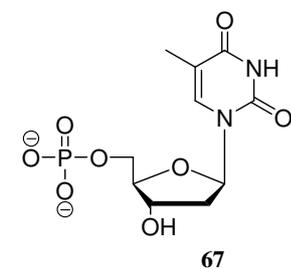
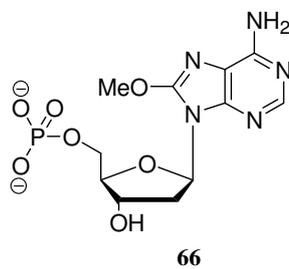
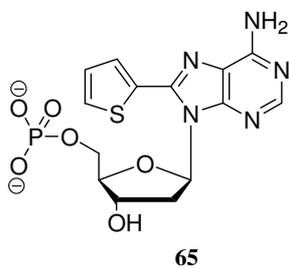
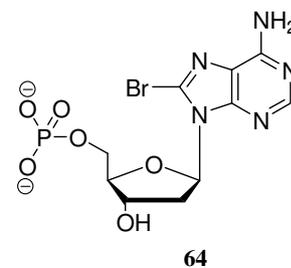
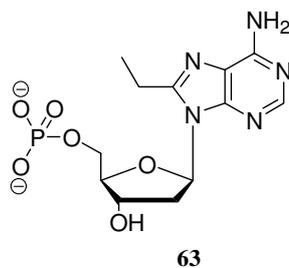
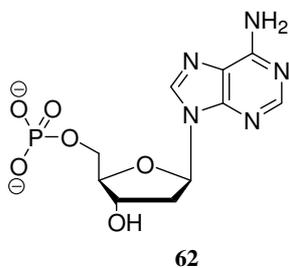
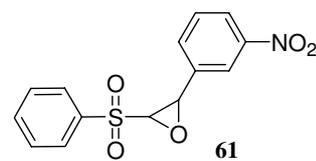
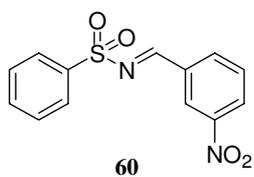
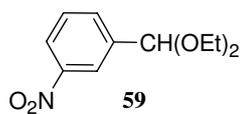
Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale



Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale



Chapitre IV. Vers la synthèse des analogues triphosphates de nucléosides.
Partie expérimentale



Pour essayer d'endiguer la progression du virus d'immunodéficience humaine (VIH), il est indispensable de développer de nouvelles molécules qui agissent sur le virus par un mécanisme original mais aussi d'étudier les différentes étapes qui régissent la réplication virale afin de mieux les comprendre. Les objectifs de ce travail étaient doubles. Ils ont consisté :

- d'une part à rechercher des analogues fonctionnels de nucléosides pouvant servir d'outils pour l'étude des mécanismes de la rétrotranscription, grâce à leurs propriétés de fluorescence,
- d'autre part à développer des analogues nucléosidiques qui agiraient selon un mécanisme différent des terminateurs d'élongation de la chaîne d'ADN.

Notre premier objectif a donc consisté à rechercher de nouveaux analogues nucléosidiques fluorescents, qui grâce à leurs propriétés spectrales pourraient être utilisés pour étudier les interactions qui s'établissent entre les protéines virales et les acides nucléiques. Pour atteindre cet objectif, la spectroscopie de fluorescence requiert l'utilisation de sondes suffisamment sensibles qui permettent de mesurer et de visualiser des changements conformationnels et structuraux rapides avec une grande précision.

Pour essayer de répondre à cette attente, la synthèse de deux sondes nucléosidiques fluorescentes a été réalisée. Elles dérivent de la désoxyadénosine et sont modifiées en position 8 de la base soit par un groupement vinyle, la 8vdA, soit par un groupement thiénylyle, la 8thdA. Ces deux nouvelles sondes ont été caractérisées quant à leurs propriétés spectrales d'absorption et de fluorescence et se sont révélées être plus sensibles que la sonde de référence, la 2-AP. Nous avons également étudié le comportement de la 8vdA lorsqu'elle est incorporée dans un duplex d'ADN. Nous nous sommes appuyés sur la chimie des phosphoramidites et sur la synthèse en phase solide d'oligonucléotides pour accéder aux séquences modifiées par la 8vdA nécessaires aux études. Différentes études réalisées avec des oligomères marqués ou non marqués nous ont permis de montrer que la 8vdA ne déstabilise que très peu le duplex, et qu'elle présente en terme de détection par spectroscopie de fluorescence une sensibilité supérieure à la 2-AP. Cependant son incorporation dans des acides nucléiques est délicate ce qui limite son utilisation. Pour essayer de contourner ces difficultés, la 8thdA a été développée. L'évaluation de ses propriétés lorsqu'elle se trouve incorporer dans des séquences oligonucléotidiques est en cours.

En effet des efforts restent à mener pour essayer de développer de nouvelles sondes sensibles, plus stables chimiquement que la 8vdA et qui une fois incorporées dans un acide

nucléique maintiennent sa structure et sa fonction. Leurs propriétés de fluorescence, permettraient de suivre plus aisément les interactions de l'acide nucléique marqué, avec sa cible. La position 8 de la base offre la possibilité d'introduire d'autres groupements à la place du groupement vinyle dont l'effet serait de conduire à des produits chimiquement plus stables mais aussi d'augmenter la conjugaison et ainsi induire un déplacement plus important vers le rouge favorisant une détection plus aisée de la sonde. Cette possibilité reste ouverte à partir de la dA, même si la fenêtre d'investigation sur cette position est assez étroite. Des premiers efforts dans ce sens ont été réalisés avec la 8thdA.

Le deuxième volet abordé au cours de ce manuscrit, a porté sur la synthèse d'une nouvelle classe d'analogues nucléosidiques modifiés en position 8 de la dA par des groupements de taille et de nature variables. Grâce aux données structurales issues de la RT cristallisée en présence d'un double brin d'ADN et d'un nucléotide entrant, nous avons pu concevoir une nouvelle classe d'analogues de la dA qui agissent selon un mécanisme différent des terminateurs d'élongation de la chaîne d'ADN. Pour cela nous avons entrepris sur une étude modèle, d'évaluer les propriétés inhibitrices de la 8vdA et de son analogue réduit, la 8edA, lorsqu'elles sont incorporées dans un brin « amorce » et « matrice ». Les résultats obtenus avec ces composés sur l'activité ARN dépendante de la RT sont en accord avec les hypothèses de départ. Dans ces études modèles nous avons pu montrer qu'il est possible d'inhiber la synthèse d'ADN selon un mécanisme différent de celui des inhibiteurs nucléosidiques dits « terminateurs d'élongation de chaîne ». Un deuxième résultat tout aussi important a été obtenu sur la deuxième activité de la RT ADN dépendante. Ce résultat était d'autant plus intéressant qu'inattendu, car même si le nucléoside modifié était contré lors de la première étape de la rétrotranscription, il restait néanmoins actif sur la deuxième activité polymérase de la RT.

Ces résultats indiquent que si l'analogue triphosphate est substrat de la RT, l'inhibition de la synthèse d'ADN proviral pourra avoir lieu sur les deux activités polymérase de l'enzyme. Un tel mode d'action renforcerait l'efficacité de ces analogues de la dA. Dans le but d'étudier l'influence de la taille et de la nature du substituant sur la capacité des analogues de la dA à inhiber la production d'ADN proviral, nous avons réalisé la préparation d'autres analogues de la dA afin de mener des études de relation structure-activité sur une gamme plus large de molécules.

C'est dans cette optique que nous avons synthétisé dans un premier temps des analogues de la dA sous leur forme nue et sous la forme de prodrogue de type McGuigan, avec pour objectif de les tester directement sur des cultures cellulaires infectées par le virus du

VIH-1. Toutefois la 8vdA et la 8edA qui se sont montrés actives *in vitro* dans les études modèles se sont montrées dépourvues d'activité lors des tests en culture cellulaire. Les mêmes observations s'appliquent aux autres analogues nucléosidiques nus. Pour les cas les plus favorables, une activité inhibitrice modeste de la réplication virale a pu être mesurée avec certaines prodrogues de type McGuigan ($IC_{50} \approx 1.10^{-5}M$) toutefois accompagnée d'une cytotoxicité du même ordre de grandeur. Il nous a dès lors paru important de synthétiser ces analogues modifiés sous leur forme triphosphorylée afin de pouvoir les tester sur la RT mais aussi sur d'autres polymérase cellulaires. Dans les études à réaliser, nous souhaitons vérifier si oui ou non ces analogues sont capables d'inhiber la synthèse d'ADN proviral selon le mécanisme mis en évidence dans les études modèles. Nous chercherons aussi à savoir si ces analogues sont capables d'inhiber la production d'ADN catalysée par les polymérase cellulaires.

Dans ce dernier chapitre nous avons exploré plusieurs approches pour essayer de préparer les analogues nucléosidiques modifiés en position 8 de la dA sous leur forme triphosphate. Cet objectif n'a pas pu être atteint et cela en dépit des efforts importants menés essentiellement en synthèse homogène. Pour essayer d'accéder à ces composés nous avons été amenés à adopter une stratégie de synthèse qui repose sur la préparation des intermédiaires monophosphates. Nous avons d'abord envisagé de les préparer en phase homogène mais devant les difficultés et inconvénients de cette approche nous avons finalement opté pour une approche basée sur la chimie en phase solide. Pour cela nous nous sommes basés sur la chimie des phosphonates pour mettre au point une stratégie de synthèse des monophosphates de nucléoside sur support solide. En s'appuyant sur des conditions de synthèse douces cette méthode nous aura permis de préparer les analogues phosphonates et monophosphates des bases nucléiques naturelles. Elle s'est également avérée être compatible avec la plus part des nucléosides modifiés envisagés. La seule exception reste la 8vdA qui est apparue très sensible, difficile à préparer et à isoler et cela en dépit de plusieurs tentatives effectuées. Nous avons également essayé d'étendre cette chimie à la synthèse de boranophosphates de nucléosides. Les premiers résultats obtenus sont encourageants mais une mise au point supplémentaire reste à réaliser

Par ailleurs différentes méthodes de synthèses des dérivés triphosphates en phase solide à partir du monophosphate ont été tentées sur la dA qui a servi de modèle. Dans une de nos tentatives, nous avons obtenus des résultats encourageants, cependant cette approche si elle doit être poursuivie devra nécessiter une mise au point supplémentaire. La synthèse des

triphosphates de nucléosides en phase solide est un sujet d'actualité, puisque tout récemment, une nouvelle stratégie de synthèse sur support solide de triphosphates de nucléosides naturels et d'inhibiteurs nucléosidiques de la RT a été rapportée dans la littérature [368, 369]. Encore une fois il reste à démontrer qu'elle est applicable à la synthèse d'analogues triphosphorylés modifiés.

1. *Résumé d'orientation de rapport sur l'épidémie mondiale de l'infection: à VIH/SIDA/2006/ONUSIDA.*
2. Brun-Vezinet, F., Damond, F., and Simon, F. *Variabilité des virus d'immunodéficience humaine de type 1.* in *Journée SPE.* 1999. Institut Pasteur à Paris.
3. Centerfordeseasecontrol, *Pneumocystis pneumonia among homosexual men: New York city and California.* Morb. Mortal. Wkly. Rep, 1981. **30**: p. 303- 308.
4. control, C.F.d., *Pneumocystis Pneumonia: Los angeles.* Morb. Mortal. Wkly. Rep, 1981. **30**: p. 250- 252.
5. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Guaguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).* Science, 1983. **220**(4599): p. 868- 871.
6. Lin, T.S. and Prusoff, W.H., *Synthesis and biological activity of several amino analogs of thymidine.* J. Med. Chem, 1978. **21**(1): p. 109- 112.
7. Mitsuya, H., Weinhold, K.J., Furman, P.A., Clair, M.H.S., Lehrman, S.N., Gallo, R.C., Bolognesi, D., Barry, D.W., and Broder, S., *3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An Antiviral Agent That Inhibits the Infectivity and Cytopathic Effect of Human T-Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-Associated Virus in vitro.* PNAS, 1985. **82**(20): p. 7096-7100.
8. Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H.S., Özel, M., Pauli, G., and Koch, M.A., *Fine structure of Human Immunodeficiency Virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins.* Micron and Microscopica Acta, 1987. **18**(4): p. 335- 336.
9. Goto, T., Nakai, M., and Ikuta, K., *The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1.* Micron, 1998. **29**(2-3): p. 123-138.
10. Benjamin, J., Ganser-Pornillos, B.K., Tivol, W.F., Sundquist, W.I., and Jensen, G.J., *Three dimensional structure of HIV-1 virus like particles by electron cryotomography.* J. Mol. Biol., 2005. **346**: p. 577-588.
11. Briggs, J.A.G., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H.-G., and Fuller, S.D., *Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores.* EMBO J., 2003. **22**(7): p. 1707-1715.
12. Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr., Lifson, J.D., Arthur, L.O., Liu, J., Taylor, K.A., and Roux, K.H., *Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions.* PNAS, 2003. **100**(26): p. 15812-15817.
13. Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., and Markowitz, M., *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.* Nature, 1995. **373**(6510): p. 123-126.
14. Zambruno, G., Giannetti, A., Bertazzoni, U., and Girolomoni, G., *Langerhans cells and HIV infection.* Immunology Today, 1995. **16**(11): p. 520-524.
15. Rinaldo, J., Charles R. and Piazza, P., *Virus infection of dendritic cells: portal for host invasion and host defense.* Trends in Microbiology, 2004. **12**(7): p. 337-345.
16. Fantini, J., Yahi, N., and Chermann, J., *Human Immunodeficiency Virus can Infect the Apical and Basolateral Surfaces of Human Colonic Epithelial Cells.* PNAS, 1991. **88**(20): p. 9297-9301.
17. Starcich, B.R., Hahn, B.H., Shaw, G.M., McNeely, P.D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E.S., Parks, W.P., Josephs, S.F., Gallo, R.C., and Wong-Staal, F., *Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS.* Cell, 1986. **45**(5): p. 637-648.
18. Leonard, C., Spellman, M., Riddle, L., Harris, R., Thomas, J., and Gregory, T., *Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope*

- glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells*. J. Biol. Chem., 1990. **265**(18): p. 10373-10382.
19. Cordonnier, A., Montagnier, L., and Emerman, M., *Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding*. Nature, 1989. **340**(6234): p. 571-574.
 20. Olshevsky, U., Helseth, E., Furman, C., Li, J., Haseltine, W.A., and Sodroski, J., *Identification of individual HIV-1 gp120 amino-acids important for CD4 receptor binding*. J. Virol., 1990. **64**.
 21. Lu, M., Blacklow, S.C., and Kim, P.S., *A trimeric structural domain of HIV-1 transmembrane glycoprotein*. Nat. Struct. Biol., 1995. **2**: p. 1075- 1082.
 22. Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Goh, W.C., Terwilliger, E.F., Dayton, A.I., Rosen, C., Haseltine, W.A., and Sodroski, J., *Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1*. Science, 1987. **237**: p. 1351- 1355.
 23. McDougal, J., Kennedy, M., Sligh, J.M., Cort, S., Mawle, A., and Nicholson, J., *Binding of HTLV-III/LAV to T₄⁺ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T₄ molecule*. Science, 1986. **231**(4736): p. 382- 385.
 24. Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., and Hendrickson, W.A., *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 648-659.
 25. Horuk, R., *Molecular properties of the chemokine receptor family*. Trends in Pharmacological Sciences, 1994. **15**(5): p. 159-165.
 26. Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O., Mukaida, N., and Matsushima, K., *Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family*. Annu. Rev. Immunol, 1991. **9**: p. 617- 648.
 27. O'Brien, S.J. and Moore, J.P., *The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS*. Immunol. Rev, 2000. **177**: p. 99- 111.
 28. Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T.A., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 829-833.
 29. Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.-M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., Loetscher, M., Baggiolini, M., and Moser, B., *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 833-835.
 30. Gallaher, W.R., *Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus*. Cell, 1987. **50**(3): p. 327-328.
 31. Rubin, D., *Fusion inhibitor: A progress report*, in Numedx. 2003. p. 66- 68.
 32. Yang, X., Mahony, E., Holm, G.H., Kassa, A., and Sodroski, J., *Role of the gp120 inner domain [beta]-sandwich in the interaction between the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein subunits*. Virology, 2003. **313**(1): p. 117-125.
 33. Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., and Kim, P.S., *Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein*. Cell, 1997. **89**(2): p. 263-273.
 34. Tan, K., Liu, J.-h., Wang, J.-h., Shen, S., and Lu, M., *Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41*. PNAS, 1997. **94**(23): p. 12303-12308.
 35. Zack, J.A., Arrigo, S.J., Weitsman, S.R., Go, A.S., Haislip, A., and Chen, I.S.Y., *HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: Molecular analysis reveals a labile, latent viral structure*. Cell, 1990. **61**(2): p. 213-222.

36. Fisher, A.G., Feinberg, M.B., Josephs, S.F., Harper, M.E., Marselle, L.M., Reyes, G., Gonda, M.A., Aldovini, A., Debouk, C., Gallo, R.C., and Wong-Staal, F., *The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication*. Nature, 1986. **320**(6060): p. 367-371.
37. Dayton, A.I., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Goh, W.C., and Haseltine, W.A., *The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication*. Cell, 1986. **44**(6): p. 941-947.
38. Feng, S. and Holland, E.C., *HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar*. Nature, 1988. **334**(6178): p. 165-167.
39. Roy, S., Delling, U., Chen, C., Rosen, C., and Sonenberg, N., *A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation*. Genes Dev., 1990. **4**(8): p. 1365-1373.
40. Kao, S.-Y., Calman, A.F., Luciw, P.A., and Peterlin, B.M., *Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product*. Nature, 1987. **330**(6147): p. 489-493.
41. Feinberg, M., Baltimore, D., and Frankel, A., *The Role of Tat in the Human Immunodeficiency Virus Life Cycle Indicates a Primary Effect on Transcriptional Elongation*. PNAS, 1991. **88**(9): p. 4045-4049.
42. Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.-M., Fischer, W.H., and Jones, K.A., *A Novel CDK9-Associated C-Type Cyclin Interacts Directly with HIV-1 Tat and Mediates Its High-Affinity, Loop-Specific Binding to TAR RNA*. Cell, 1998. **92**(4): p. 451-462.
43. Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debating, K.-M., and Krammer, P.H., *Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120*. Nature, 1995. **375**(6531): p. 497-500.
44. Li, C.J., Friedman, D.J., Wang, C., Metelev, V., and Pardee, A., *Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein*. Science, 1995. **268**(5209): p. 429-431.
45. Brother, M.B., Chang, H.-K., Lisziewicz, J., Su, D., Murty, L.C., and Ensoli, B., *Block of Tat-Mediated Transactivation of Tumor Necrosis Factor [beta] Gene Expression by Polymeric-TAR Decoys*. Virology, 1996. **222**(1): p. 252-256.
46. Sastry, K.J., Marin, M.C., Nehete, P.N., McConnell, K., El-Naggar, A.K., and McDonnell, T.J., *Expression of Human Immunodeficiency Virus type I tat results in down-regulation of bcl-2 and induction of apoptosis in hematopoietic cells*. Oncogene, 1996. **13**(3): p. 487-493.
47. Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.-Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R., *The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 254-257.
48. Ahmad, N. and Venkatesan, S., *Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR*. Science, 1988. **241**(4872): p. 1481-1485.
49. Niederman, T.M.J., Thielan, B.J., and Ratner, L., *Human Immunodeficiency Virus Type 1 Negative Factor is a Transcriptional Silencer*. PNAS, 1989. **86**(4): p. 1128-1132.
50. Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E., and Trono, D., *Nef induces CD4 endocytosis: Requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain*. Cell, 1994. **76**(5): p. 853-864.
51. Miller, M., Warmerdam, M., Gaston, I., Greene, W., and Feinberg, M., *The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages*. J. Exp. Med., 1994. **179**(1): p. 101-113.

52. Heinzinger, N., Bukrinsky, M., Haggerty, S., Ragland, A., Kewalramani, V., Lee, M., Gendelman, H., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M., *The Vpr Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Influences Nuclear Localization of Viral Nucleic Acids in Nondividing Host Cells*. PNAS, 1994. **91**(15): p. 7311-7315.
53. Strebel, K., Klimkait, T., and Martin, M.A., *A novel gene of HIV-1 Vpu, and its 16-kilodalton product*. Science, 1988. **241**: p. 1221- 1223.
54. Willey, R., Maldarelli, F., Martin, M., and Strebel, K., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes*. J. Virol., 1992. **66**(1): p. 226-234.
55. Willey, R., Maldarelli, F., Martin, M., and Strebel, K., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4*. J. Virol., 1992. **66**(12): p. 7193-7200.
56. Terwilliger, E.F., Cohen, E.A., Lu, Y., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A., *Functional Role of Human Immunodeficiency Virus Type 1 vpu*. PNAS, 1989. **86**(13): p. 5163-5167.
57. Strebel, K., Daugherty, D., Clouse, K., Cohen, D., Folks, T., and Martin, M.A., *The HIV "A" (sor) gene product is essential for virus infectivity*. Nature, 1987. **328**: p. 728-730.
58. Mariani, R., Chen, D., Schrofelbauer, B., Navarro, F., Konig, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H., and Landau, N.R., *Species-Specific Exclusion of APOBEC3G from HIV-1 Virions by Vif*. Cell, 2003. **114**(1): p. 21-31.
59. Silva, F.A.d., Santa-Marta, M., Freitas-Vieira, A., Mascarenhas, P., Barahona, I., Moniz-Pereira, J., Gabuzda, D., and Goncalves, J., *Camelized Rabbit-derived VH Single-domain Intrabodies Against Vif Strongly Neutralize HIV-1 Infectivity*. J. Mol. Biol., 2004. **340**(3): p. 525-542.
60. Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., and Malim, M.H., *Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein*. Nature, 2002. **418**(6898): p. 646-650.
61. Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., and Malim, M.H., *The antiviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif*. Nat. Med., 2003. **9**: p. 1404-1407.
62. Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A., and Steitz, T.A., *Crystal structure at 3,5 Å resolution of HIV-1 Reverse Transcriptase complexed with an inhibitor*. Science, 1992. **256**: p. 1783- 1790.
63. Le Grice, S., Naas, T., Wohlgensinger, B., and Schatz, O., *Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase*. EMBO J., 1991. **10**(12): p. 3905-3911.
64. Rodgers, D., Gamblin, S., Harris, B., Ray, S., Culp, J., Hellmig, B., Woolf, D., Debouck, C., and Harrison, S., *The Structure of Unliganded Reverse Transcriptase from the Human Immunodeficiency Virus Type 1*. PNAS, 1995. **92**(4): p. 1222-1226.
65. Esnouf, R., Ren, J., Ross, R., Jones, Y., Stammers, D.K., and Stuart, D., *Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors*. Nat. Struct. Biol., 1995. **2**: p. 303- 308.
66. Hsiou, Y., Ding, J., Das, K., Clark Jr, A.D., Hughes, S.H., and Arnold, E., *Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms*. Structure, 1996. **4**(7): p. 853-860.
67. Ren, J., Esnouf, R., Garman, E., D, S., Ross, C., Kirby, I., Keeling, J., G, D., Y, J., D, S., and Stammers, D.K., *High resolution structures of HIV-1 RT from four inhibitor*. Nat. Struct. Biol., 1995. **2**: p. 293- 302.

68. Smerdon, S., Jager, J., Wang, J., Kohlstaedt, L., Chirino, A., Friedman, J., Rice, P., and Steitz, T., *Structure of the Binding Site for Nonnucleoside Inhibitors of the Reverse Transcriptase of Human Immunodeficiency Virus Type 1*. PNAS, 1994. **91**(9): p. 3911-3915.
69. Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R., Clark, A., Jr, Lu, X., Tantillo, C., Williams, R., Kamer, G., Ferris, A., Clark, P., Hizi, A., Hughes, S., and Arnold, E., *Crystal Structure of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Complexed with Double-Stranded DNA at 3.0 Å Resolution Shows Bent DNA*. PNAS, 1993. **90**(13): p. 6320-6324.
70. Arnold, E., Jacobo-Molina, A., Nanni, R.G., Williams, R.L., Lu, X., Ding, J., Clark Jr, A.D., Zhang, A., Ferris, A.L., Clark, P., Hizi, A., and Hughes, S.H., *Structure of HIV-1 reverse transcriptase/DNA complex at 7 Å resolution showing active site locations*. Nature, 1992. **357**(6373): p. 85-89.
71. http://www.cabm.rutgers.edu/~kalyan/RT_imgs/RT_comp.html.
72. Johnson, P.E., Turner, R.B., Wu, Z.R., Hairston, L., Guo, J., Levin, J.G., and Summers, M.F., *A mechanism for plus-strand transfer enhancement by the HIV-1 nucleocapsid protein during Reverse Transcriptase*. Biochemistry, 2000. **39**: p. 9084-9091.
73. Peliska, J.A., Balasubramanian, S., Giedroc, D.P., and Benkovic, S.J., *Recombinant anti HIV nucleocapsid protein accelerates HIV-1 RT catalysed DNA strand transfer reaction and modulates RNaseH activity*. Biochemistry, 1994. **33**(46): p. 13817-13823.
74. You, J. and McHenry, C., *Human immunodeficiency virus nucleocapsid protein accelerates strand transfer of the terminally redundant sequences involved in reverse transcription*. J. Biol. Chem., 1994. **269**(50): p. 31491-31495.
75. Guo, J., Henderson, L., Bess, J., Kane, B., and Levin, J., *Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein promotes efficient strand transfer and specific viral DNA synthesis by inhibiting TAR-dependent self-priming from minus-strand strong-stop DNA*. J. Virol., 1997. **71**(7): p. 5178-5188.
76. Kim, J.K., Palaniappan, C., Wu, W., Fay, P.J., and Bambara, R.A., *Evidence for a Unique Mechanism of Strand Transfer from the Transactivation Response Region of HIV-1*. J. Biol. Chem., 1997. **272**(27): p. 16769-16777.
77. Rodriguez-Rodriguez, L., Tsuchihashi, Z., Fuentes, G.M., Bambara, R.A., and Fay, P.J., *Influence of Human Immunodeficiency Virus Nucleocapsid Protein on Synthesis and Strand Transfer by the Reverse Transcriptase in Vitro*. J. Biol. Chem., 1995. **270**(25): p. 15005-15011.
78. Dib-Hajj, F., Khan, R., and Giedroc, D.P., *Retroviral nucleocapsid proteins possess potent nucleic acid strand renaturation activity*. Protein Sci, 1993. **2**(2): p. 231-243.
79. Feng, Y.-X., Campbell, S., Harvin, D., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Rein, A., *The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Polyprotein Has Nucleic Acid Chaperone Activity: Possible Role in Dimerization of Genomic RNA and Placement of tRNA on the Primer Binding Site*. J. Virol., 1999. **73**(5): p. 4251-4256.
80. Wu, W., Henderson, L., Copeland, T., Gorelick, R., Bosche, W., Rein, A., and Levin, J., *Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein reduces reverse transcriptase pausing at a secondary structure near the murine leukemia virus polypurine tract*. J. Virol., 1996. **70**(10): p. 7132-7142.
81. Ji, X., Klarmann, G.J., and Preston, B., D, *Effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nucleocapsid protein on HIV-1 reverse transcriptase activity in vitro*. Biochemistry, 1996. **35**: p. 132- 143.

82. Ding, J., Das, K., Hsiou, Y., Sarafianos, S.G., Clark, J., Arthur D., Jacobo-Molina, A., Tantillo, C., Hughes, S.H., and Arnold, E., *Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody fab fragment at 2.8 Å resolution*. Journal of Molecular Biology, 1998. **284**(4): p. 1095-1111.
83. Li, Y., Korolev, S., and Waksman, G., *Crystal structure of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of Thermus aquaticus DNA polymerase: structural bases for nucleotide incorporation*. EMBO J., 1998. **17**: p. 7514- 7525.
84. Boyer, P.L., Sarafianos, S.G., Arnold, E., and Hughes, S.H., *Selective Excision of AZTMP by Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase*. J. Virol., 2001. **75**(10): p. 4832-4842.
85. Hsieh, J., Zinnen, S., and Modrich, P., *Kinetic mechanism of the DNA-dependent DNA polymerase activity of human immunodeficiency virus reverse transcriptase*. J. Biol. Chem., 1993. **268**(33): p. 24607-24613.
86. Kati, W., Johnson, K., Jerva, L., and Anderson, K., *Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase*. J. Biol. Chem., 1992. **267**(36): p. 25988-25997.
87. Sarafianos, S.G., Hughes, S.H., and Arnold, E., *Designing anti-AIDS drugs targeting the major mechanism of HIV-1 RT resistance to nucleoside analog drugs*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004. **36**(9): p. 1706-1715.
88. Dyda, F., Hickman, A.B., Jenkins, M.T., Engelman, A., Craigie, R., and Davies, D.R., *Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 Integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases*. Science, 1994. **266**: p. 1981- 1986.
89. Maignan, S., Guilloteau, J.-P., Zhou-Liu, Q., Clement-Mella, C., and Mikol, V., *Crystal structures of the catalytic domain of HIV-1 integrase free and complexed with its metal cofactor: high level of similarity of the active site with other viral integrases*. Journal of Molecular Biology, 1998. **282**(2): p. 359-368.
90. Cai, M., Zheng, R., Caffrey, M., Craigie, R., Clore, G.M., and Gronenborn, A.M., *Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 Integrase*. Nat. Struct. Biol., 1997. **4**: p. 567- 577.
91. Lutzke, R.A., Boelens, R., Plasterk, R.H., Kaptein, R., and Hard, K., *The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold*. Nat. Struct. Biol., 1995. **2**: p. 807- 810.
92. Lodi, P.J., Ernst, J.A., Kuszewski, J., Hickman, A.B., Engelman, A., Craigie, R., Clore, G.M., and Gronenborn, A.M., *Solution structure of the DNA binding domain of HIV-1 Integrase*. Biochemistry, 1995. **34**: p. 9826- 9833.
93. Thomas, M. and Brady, L., *Hiv integrase: a target for aids therapeutics*. Trends in Biotechnology, 1997. **15**(5): p. 167-172.
94. Kulkosky, J., Jones, K.S., Katz, R., Mack, J., and Skalka, A., *Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases*. Mol. Cell. Biol, 1992. **12**: p. 2331- 2338.
95. Bujacz, G., Jaskolski, M., Alexandratos, J., Wlodawer, A., Merkel, G., Katz, R.A., and Skalka, A.M., *The catalytic domain of avian sarcoma virus integrase: conformation of the active-site residues in the presence of divalent cations*. Structure, 1996. **4**(1): p. 89-96.
96. Mazumder, A., Gazit, A., Levitzki, A., Nicklaus, M., Yung, J., Kohlhagen, G., and Pommier, Y., *Effects of Tyrphostin protein kinase inhibitors on human immunodeficiency virus type 1 Integrase*. Biochemistry, 1995. **34**(46): p. 15111-15122.

97. Yoder, K.E. and Bushman, F.D., *Repair of Gaps in Retroviral DNA Integration Intermediates*. J. Virol., 2000. **74**(23): p. 11191-11200.
98. Brin, E., Yi, J., Skalka, A.M., and Leis, J., *Modeling the late steps in the HIV-1 retroviral Integrase catalyzed DNA integration*. The Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(50): p. 39287- 39295.
99. Navia, M.A., Fitzgerald, P.M.D., McKeever, B.M., Leu, C.-T., Heimbach, J.C., Herber, W.K., Sigal, I.S., Darke, P.L., and Springer, J.P., *Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1*. Nature, 1989. **337**(6208): p. 615-620.
100. Wlodawer, A., Miller, M., Jaskolski, M., Sathyanarayana, B.K., Baldwin, E., Weber, I.T., Selk, L.M., Clawson, L., Schneider, J., and Kent, B.H.S., *Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease*. Science, 1989. **245**: p. 616- 621.
101. Abdel-Rahman, H.M., Al-Karamany, G.S., El-Koussi, N.A., Youssef, A.F., and Kiso, Y., *HIV protease inhibitors: peptidomimetic drugs and future perspectives*. Current Medicinal Chemistry, 2002. **9**: p. 1905- 1922.
102. Wild, C., Greenwell, T., and Matthews, T., *A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus mediated cell-cell fusion*. AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1993. **9**: p. 1051- 1053.
103. Vermeire, K., Bell, T.W., Choi, H.-J., Jin, Q., Samala, M.F., Sodoma, A., De Clercq, E., and Schols, D., *The Anti-HIV Potency of Cyclotriazadisulfonamide Analogs Is Directly Correlated with Their Ability to Down-Modulate the CD4 Receptor*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(1): p. 203-210.
104. Vermeire, K., Zhang, Y., Princen, K., Hatse, S., Samala, M.F., Dey, K., Choi, H.-J., Ahn, Y., Sodoma, A., and Snoeck, R., *CADA Inhibits Human Immunodeficiency Virus and Human Herpesvirus 7 Replication by Down-modulation of the Cellular CD4 Receptor*. Virology, 2002. **302**(2): p. 342-353.
105. Vermeire, K., Princen, K., Hatse, S., De Clercq, E., Dey, K., Bell, T.W., and Schols, D., *CADA, a novel CD4-targeted HIV inhibitor, is synergistic with various anti-HIV drugs in vitro*. AIDS, 2004. **18**: p. 2115- 2125.
106. Balzarini, J., Hatse, S., Vermeire, K., Princen, K., Aquaro, S., Perno, C.-F., De Clercq, E., Egberink, H., Vanden Mooter, G., Peumans, W., Van Damme, E., and Schols, D., *Mannose-Specific Plant Lectins from the Amaryllidaceae Family Qualify as Efficient Microbicides for Prevention of Human Immunodeficiency Virus Infection*. Antimicrob. Agents Chemother., 2004. **48**(10): p. 3858-3870.
107. Boyd, M., Gustafson, K., McMahon, J., Shoemaker, R., O'Keefe, B., Mori, T., Gulakowski, R., Wu, L., Rivera, M., Laurencot, C., Currens, M., Cardellina, J., 2nd, Buckheit, R., Jr, Nara, P., Pannell, L., Sowder, R., 2nd, and Henderson, L., *Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus- inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development*. Antimicrob. Agents Chemother., 1997. **41**(7): p. 1521-1530.
108. Wang, T., Shang, Z., Wallace, O.B., Deshpande, M., Fang, H., Yang, Z., Zadjura, L.M., Tweedie, D.L., Huang, S., Zhao, F., Ranadive, S., Robinson, B.S., Gong, Y.-F., Riccardi, K., Spicer, T.P., Deminie, C., Rose, R., Wang, H.-G.H., Blair, W.S., Shi, P.-Y., Lin, P.-F., Colonna, R.J., and Meanwell, N.A., *Discovery of 4-benzoyl-1-[(4-methoxy-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)oxoacetyl]-2-(R)-methylpiperazine (BMS-378806): a novel HIV-1 attachment inhibitor that interferes with CD4-gp120 interactions*. J. Med. Chem, 2003. **46**: p. 4236- 4239.

109. Hatse, S., Princen, K., Bridger, G., De Clercq, E., and Schols, D., *Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4*. FEBS Letters, 2002. **527**(1-3): p. 255-262.
110. Hatse, S., Princen, K., Clercq, E.D., Rosenkilde, M.M., Schwartz, T.W., Hernandez-Abad, P.E., Skerlj, R.T., Bridger, G.J., and Schols, D., *AMD3465, a monomacrocyclic CXCR4 antagonist and potent HIV entry inhibitor*. Biochemical Pharmacology, 2005. **70**(5): p. 752-761.
111. Tsamis, F., Gavrillov, S., Kajumo, F., Seibert, C., Kuhmann, S., Ketas, T., Trkola, A., Palani, A., Clader, J.W., Tagat, J.R., McCombie, S., Baroudy, B., Moore, J.P., Sakmar, T.P., and Dragic, T., *Analysis of the Mechanism by Which the Small-Molecule CCR5 Antagonists SCH-351125 and SCH-350581 Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry*. J. Virol., 2003. **77**(9): p. 5201-5208.
112. Hazuda, D.J., Felock, P., Witmer, M., Wolfe, A., Stillmock, K., Grobler, J.A., Espeseth, A., Gabryelski, L., Schleif, W., Blau, C., and Miller, M.D., *Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells*. Science, 2000. **287**: p. 646- 650.
113. Hazuda, D.J., Young, S., Guare, J.P., Anthony, N.J., Gomez, R.P., Wai, J.S., Vacca, J., Handt, L., Motzel, S.L., Klein, H.J., Dornadula, G., Danovich, R.M., Witmer, M.V., Wilson, K.A.A., Tussey, L., Schleif, W.A., Gabryelski, L.S., Jin, L., Miller, M.D., Casimiro, D.R., Emini, E.A., and Shiver, J.W., *Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques*. Science, 2004. **305**(5683): p. 528- 532.
114. Grobler, J.A., Stillmock, K., Hu, B., Witmer, M., Felock, P., Espeseth, A.S., Wolfe, A., Egbertson, M., Bourgeois, M., Melamed, J., Wai, J.S., Young, S., Vacca, J., and Hazuda, D.J., *Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: Implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes*. PNAS, 2002. **99**(10): p. 6661-6666.
115. Pannecouque, C., Pluymers, W., Van Maele, B., Tetz, V., Cherepanov, P., De Clercq, E., Witvrouw, M., and Debyser, Z., *New class of HIV integrase inhibitors that block viral replication in cell culture*. Curr. Biol, 2002. **12**: p. 1169- 1177.
116. Dorsey, B.D., Levin, R.B., McDaniel, S.L., Vacca, J.P., Guare, J.P., Darke, P.L., Zugay, J.A., Emini, E.A., Schleif, W.A., Quintero, J.C., Lin, J.H., Chen, I.-W., Holloway, M.K., Fitzgerald, P.M.D., Axel, M.G., Ostovic, D., Anderson, P.S., and Huff, J.R., *L-735,524: The Design of a Potent and Orally Bioavailable HIV Protease Inhibitor*. J.Med.Chem, 1994. **37**(21): p. 3443- 3451.
117. Kempf, D., Marsh, K., Denissen, J., McDonald, E., Vasavanonda, S., Flentge, C., Green, B., Fino, L., Park, C., Kong, X., Wideburg, N., Saldivar, A., Ruiz, L., Kati, W., Sham, H., Robins, T., Stewart, K., Hsu, A., Plattner, J., Leonard, J., and Norbeck, D., *ABT-538 is a Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Protease and has High Oral Bioavailability in Humans*. PNAS, 1995. **92**(7): p. 2484-2488.
118. Kaldor, S.W., Kalish, V.J., Davies, J.F., Shetty, B.V., Fritz, J.E., Appelt, K., Burgess, J.A., Campanale, K.M., Chirgadze, N.Y., Clawson, D.K., Dressman, B.A., Hatch, S.D., Khalil, D.A., Kosa, M.B., Lubbehusen, P.P., Muesing, M.A., Patrick, A.K., Reich, S.H., Su, K.S., and Tatlock, J.H., *Viracept (Nelfinavir mesylate, AG1343): a potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease*. J. Med. Chem, 1997. **40**: p. 3979- 3985.
119. Sham, H.L., Kempf, D.J., Molla, A., Marsh, K.C., Kumar, G.N., Chen, C.-M., Kati, W., Stewart, K., Lal, R., Hsu, A., Betebenner, D., Korneyeva, M., Vasavanonda, S., McDonald, E., Saldivar, A., Wideburg, N., Chen, X., Niu, P., Park, C., Jayanti, V., Grabowski, B., Granneman, G.R., Sun, E., Japour, A.J., Leonard, J.M., Plattner, J.J.,

- and Norbeck, D.W., *ABT-378, a Highly Potent Inhibitor of the Human Immunodeficiency Virus Protease*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998. **42**(12): p. 3218-3224.
120. Robinson, B.S., Riccardi, K.A., Gong, Y.-f., Guo, Q., Stock, D.A., Blair, W.S., Terry, B.J., Deminie, C.A., Djang, F., Colonno, R.J., and Lin, P.-f., *BMS-232632, a Highly Potent Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitor That Can Be Used in Combination with Other Available Antiretroviral Agents*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000. **44**(8): p. 2093-2099.
121. De Meyer, S., Azijn, H., Surleraux, D., Jochmans, D., Tahri, A., Pauwels, R., Wigerinck, P., and de Bethune, M.-P., *TMC114, a Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitor Active against Protease Inhibitor-Resistant Viruses, Including a Broad Range of Clinical Isolates*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005. **49**(6): p. 2314-2321.
122. Surleraux, D.L.N.G., Tahri, A., Verschueren, W.G., Pille, G.M.E., De Kock, H.A., Jonckers, T.H.M., Peeters, A., De Meyer, S., Azijn, H., Pauwels, R., De Bethune, M.-P., King, N.M., Prabu-Jeyabalan, M., Schiffer, C.A., and P, W.B.T., *Discovery and Selection of TMC114, a Next Generation HIV-1 Protease Inhibitor*. *J. Med. Chem.*, 2005. **48**: p. 1813- 1822.
123. Turner, S.R., Strohbach, J.W., Tommasi, R.A., Aristoff, P.A., Johnson, P.D., Skulnick, H.I., Dolak, L.A., Seest, E.P., Tomich, P.K., Bohanon, M.J., Horng, M.-M., Lynn, J.C., Chong, K.-T., Hinshaw, R.R., Watenpaugh, K.D., Janakiraman, M.N., and Thaisrivongs, S., *Tipranavir (PNU-140690): A Potent, Orally Bioavailable Nonpeptidic HIV Protease Inhibitor of the 5,6-Dihydro-4-hydroxy-2-pyrone Sulfonamide Class*. *J. Med. Chem.*, 1998. **41**: p. 3467- 3476.
124. Poppe, S., Slade, D., Chong, K., Hinshaw, R., Pagano, P., Markowitz, M., Ho, D., Mo, H., Gorman, R., 3rd, Dueweke, T., Thaisrivongs, S., and Tarpley, W., *Antiviral activity of the dihydropyrone PNU-140690, a new nonpeptidic human immunodeficiency virus protease inhibitor*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997. **41**(5): p. 1058-1063.
125. Pauwels, R., Andries, K., Desmyter, J., Schols, D., Kukla, M.J., Breslin, H.J., Raeymaeckers, A., Gelder, J.V., Woestenborghs, R., Heykants, J., Schellekens, K., Janssen, M.A.C., Clercq, E.D., and Janssen, P.A.J., *Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives*. *Nature*, 1990. **343**(6257): p. 470-474.
126. Merluzzi, V.J., Hargrave, K.D., Labadia, M., Grozinger, K., Skoog, M., Wu, J.C., Shih, C.K., Eckner, K., Hattox, S., and Adams, J., *Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor*. *Science*, 1990. **250**: p. 1411- 1413.
127. Romero, D.L., Morge, R.A., Genin, M.J., Biles, C., Busso, M., Resnick, L., Althaus, I.W., Reusser, F., Thomas, R.C., and Tarpley, W.G., *Bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) reverse transcriptase inhibitors: structure-activity relationships of novel substituted indole analogs and the identification of 1-[(5-methanesulfonamido-1H-indol-2-yl)carbonyl]-4-[3-[(1-methylethyl)amino]pyridinyl]piperazinemonomethanesulfonate (U-90152S), a second-generation clinical candidate*. *J. Med. Chem.*, 1993. **36**: p. 1505- 1508.
128. Young, S., Britcher, S., Tran, L., Payne, L., Lumma, W., Lyle, T., Huff, J., Anderson, P., Olsen, D., and Carroll, S., *L-743, 726 (DMP-266): a novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995. **39**(12): p. 2602-2605.
129. Tantillo, C., Ding, J., Jacobo-Molina, A., Nanni, R.G., Boyer, P.L., Hughes, S.H., Pauwels, R., Andries, K., Janssen, P.A.J., and Arnold, E., *Locations of Anti-AIDS*

- Drug Binding Sites and Resistance Mutations in the Three-dimensional Structure of HIV-1 Reverse Transcriptase : Implications for Mechanisms of Drug Inhibition and Resistance.* Journal of Molecular Biology, 1994. **243**(3): p. 369-387.
130. Parreira, R.L.T., Abrahao, J., Odonirio, and Galembeck, S.E., *Conformational preferences of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors.* Tetrahedron, 2001. **57**(16): p. 3243-3253.
 131. Ludovici, D.W., De Corte, B.L., Kukla, M.J., Ye, H., Ho, C.Y., Lichtenstein, M.A., Kavash, R.W., Andries, K., de Bethune, M.-P., and Azijn, H., *Evolution of anti-HIV drug candidates. Part 3: diarylpyrimidine (DAPY) analogues.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2001. **11**(17): p. 2235-2239.
 132. Das, K., Clark, A.D.J., Lewi, P.J., Heeres, J., de Jonge, M.R., Koymans, L.M.H., Vinkers, H.M., Daeyaert, F., Ludovici, D.W., Kukla, M.J., De Corte, B., Kavash, R.W., Ho, C.Y., Ye, H., Lichtenstein, M.A., Andries, K., Pauwels, R., De Bethune, M.-P., Boyer, P.L., Clark, P., Hughes, S.H., Janssen, P.A.J., and Arnold, E., *Roles of Conformational and Positional Adaptability in Structure-Based Design of TMC125-R165335 (Etravirine) and Related Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors That Are Highly Potent and Effective against Wild-Type and Drug-Resistant HIV-1 Variants.* J. Med. Chem, 2004. **41**(10): p. 2550- 2560.
 133. Furman, P.A., Fyfe, J.A., Clair, M.H.S., Weinhold, K., Rideout, J.L., Freeman, G.A., Lehrman, S.N., 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 Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase.* PNAS, 1986. **83**(21): p. 8333-8337.
 134. De Clercq, E., *Strategies in the design for antiviral drugs.* Nat. Rev. Drug Discovery, 2002. **1**: p. 13- 25.
 135. Mansour, T.S., Jin, H., Wang, W., Hooker, E.U., Ashman, C., Cammack, N., Salomon, H., Belmonte, A.R., and Wainberg, M.A., *Anti-Human Immunodeficiency Virus and Anti-Hepatitis-B Virus Activities and Toxicities of the Enantiomers of 2'-Deoxy-3'-oxa-4'-thiocytidine and Their 5-Fluoro Analogs in Vitro.* J. Med. Chem, 1996. **38**: p. 1- 4.
 136. Stoddart, C.A., Moreno, M.E., Linquist-Stepps, V.D., Bare, C., Bogan, M.R., Gobbi, A., Buckheit, R.W., Jr., Bedard, J., Rando, R.F., and McCune, J.M., *Antiviral Activity of 2'-Deoxy-3'-Oxa-4'-Thiocytidine (BCH-10652) against Lamivudine-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in SCID-hu Thy/Liv Mice.* Antimicrob. Agents Chemother., 2000. **44**(3): p. 783-786.
 137. Kim, H.O., Schinazi, R.F., Shanmuganathan, K., Jeong, L.S., Beach, J.W., Nampalli, S., Cannon, D.L., and Chu, C.K., *L-beta.-(2S,4S)- and L-alpha.-(2S,4R)-dioxolanyl nucleosides as potential anti-HIV agents: asymmetric synthesis and structure-activity relationships.* J. Med. Chem, 1993. **36**: p. 519- 528.
 138. Furman, P.A., Jeffrey, J., Kiefer, L.L., Feng, J.Y., Anderson, K.S., Borroto-Esoda, K., Hill, E., Copeland, W.C., Chu, C.K., Sommadossi, J.-P., Liberman, I., Schinazi, R.F., and Painter, G.R., *Mechanism of Action of 1-{beta}-D-2,6-Diaminopurine Dioxolane, a Prodrug of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibitor 1-{beta}-D-Dioxolane Guanosine.* Antimicrob. Agents Chemother., 2001. **45**(1): p. 158-165.
 139. De Clercq, E., *New approaches toward anti HIV chemotherapy.* J. Med. Chem, 2005. **48**(5): p. 1- 17.
 140. De Clercq, E., *Antiviral drugs in current clinical use.* Journal of Clinical Virology, 2004. **30**(2): p. 115-133.
 141. De Corte, B.L., *From 4,5,6,7-tetrahydro-5-methylimidazol[4,5,1-jk](1,4)benzodiazepine-2(1H)-one (TIBO) to Etravirine (TMC125): fifteen years of*

- research on non-nucleoside inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase*. J. Med. Chem, 2005. **48**(6): p. 1689- 1696.
142. Huang, H., Chopra, R., Verdine, G.L., and Harrison, S.C., *Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implication for drug resistance*. Science, 1998. **282**: p. 1669- 1675.
 143. Gao, H.-Q., Boyer, P.L., Sarafianos, S.G., Arnold, E., and Hughes, S.H., *The role of steric hindrance in 3TC resistance of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase*. J. Mol. Biol., 2000. **300**(2): p. 403-418.
 144. Meyer, P.R., Matsuura, S.E., So, A.G., and Scott, W.A., *Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism*. PNAS, 1998. **95**(23): p. 13471-13476.
 145. Valeur, B., *Invitation à la fluorescence moléculaire*. De Boeck Université ed. 2004, Bruxelles: De Boeck & Larcier.
 146. Darlix, J.-L., Cristofari, G., Rau, M., Pechoux, C., Berthoux, L., and Roques, B., *Nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus as a model protein with chaperoning functions and as a target for antiviral drugs* *Advances in Pharmacology*, in *HIV-1: Molecular Biology and Pathogenesis Viral Mechanisms*, Jeang, K.-T., Editor. 2000, Academic Press. p. 345-372.
 147. Bannwarth, S. and Gatignol, A., *HIV-1 TAR RNA: The target of molecular intercalations between the virus and its host*. Curr. HIV Res, 2005. **3**(1): p. 61- 71.
 148. Darlix, J.-L., Lapadat-Tapolsky, M., De Rocquigny, H., and Roques, B.P., *First Glimpses at Structure-function Relationships of the Nucleocapsid Protein of Retroviruses*. Journal of Molecular Biology, 1995. **254**(4): p. 523-537.
 149. Davies, M.J., Shah, A., and Bruce, I.J., *Synthesis of fluorescently labelled oligonucleotides and nucleic acid*. Chem. Soc. Rev, 2000. **29**: p. 97- 107.
 150. Smith, L.M., Fung, S., Hunkapiller, M.W., Hunkapiller, T.J., and Hood, 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*. Nucl. Acids Res., 1985. **13**(7): p. 2399-2412.
 151. Connolly, B.A. and Rider, P., *Chemical synthesis of oligonucleotides containing a free sulphhydryl group and subsequent attachment of thiol specific probes*. Nucl. Acids Res., 1985. **13**(12): p. 4485-4502.
 152. Li, P., Medon, P.P., Skingle, D.C., Lanser, J.A., and Symons, R.H., *Enzyme-linked synthetic oligonucleotide probes: non-radioactive detection of enterotoxigenic Escherichia coli in faecal specimens*. Nucl. Acids Res., 1987. **15**(13): p. 5275-5287.
 153. 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*. Nucl. Acids Res., 1987. **15**(15): p. 6181-6196.
 154. Broker, T.R., Angerer, L.M., Yen, P.H., Hershey, N.D., and Davidson, N., *Electron microscopic visualization of tRNA genes with ferritin-avidin: biotin labels*. Nucl. Acids Res., 1978. **5**(2): p. 363-384.
 155. Schreiber, J.P., Hsiung, N., and Cantor, C.R., *Fluorescence studies of the accessibility of the 3' ends of the ribosomal RNAs in Escherichia coli ribosomes and subunits*. Nucl. Acids Res., 1979. **6**(1): p. 181-193.
 156. Richardson, R.W. and Gumpport, R.I., *Biotin and fluorescent labeling of RNA using T4 RNA ligase*. Nucl. Acids Res., 1983. **11**(18): p. 6167-6184.
 157. Zuckermann, R., Corey, D., and Schultz, P., *Efficient methods for attachment of thiol specific probes to the 3'-ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides*. Nucl. Acids Res., 1987. **15**(13): p. 5305-5321.

158. Pon, R.T., *A long chain biotin phosphoramidite reagent for the automated synthesis of 5'-biotinylated oligonucleotides*. Tetrahedron Letters, 1991. **32**(14): p. 1715-1718.
159. Nelson, P.S., Sherman-Gold, R., and Leon, R., *A new and versatile reagent for incorporating multiple primary aliphatic amines into synthetic oligonucleotides*. Nucl. Acids Res., 1989. **17**(18): p. 7179-7186.
160. Misiura, K., Durrant, I., Evans, M.R., and Gait, M.J., *Biotinyl and phosphotyrosinyl phosphoramidite derivatives useful in the incorporation of multiple reporter groups on synthetic oligonucleotides*. Nucl. Acids Res., 1990. **18**(15): p. 4345-4354.
161. Agrawal, S. and Zamecnik, P.C., *Site specific functionalization of oligonucleotides for attaching two different reporter groups*. Nucl. Acids Res., 1990. **18**(18): p. 5419-5423.
162. Agrawal, Sudhir and Tang, J.Y., *Site-specific functionalization of oligodeoxynucleotides for non-radioactive labelling*. Tetrahedron Letters, 1990. **31**(11): p. 1543-1546.
163. Fidanza, J.A. and McLaughlin, L.W., *Use of thiol tether for the site specific attachment of reporters groups to DNA*. J. Org. Chem, 1992. **57**(8): p. 2340-2346.
164. Inoue, H., Imura, A., and Ohtsuka, E., *Synthesis and hybridization of dodecadeoxyribonucleotides containing a fluorescent pyridopyrimidine deoxynucleoside*. Nucl. Acids Res., 1985. **13**(19): p. 7119-7128.
165. Haralambidis, J., Chai, M., and Tregear, G.W., *Preparation of base-modified nucleosides suitable for non-radioactive label attachment and their incorporation into synthetic oligodeoxyribonucleotides*. Nucl. Acids Res., 1987. **15**(12): p. 4857-4876.
166. Gibson, K.J. and Benkovic, S.J., *Synthesis and application of derivatizable oligonucleotides*. Nucl. Acids Res., 1987. **15**(16): p. 6455-6467.
167. Sarfati, S.R., Pochet, S., Guerreiro, C., Namane, A., Huynh-Dinh, T., and Igolen, J., *Synthesis of fluorescent or biotinylated nucleoside compounds*. Tetrahedron, 1987. **43**(15): p. 3491-3497.
168. Yamana, Kazushige, Ohashi, Y., Nunota, K., Kitamura, M., Nakano, H., Sangen, O., and Shimidzu, T., *Synthesis of oligonucleotide derivatives with pyrene group at sugar fragment*. Tetrahedron Letters, 1991. **32**(44): p. 6347-6350.
169. Manoharan, Muthiah, Guinosso, C.J., and Dan Cook, P., *Novel functionalization of the sugar moiety of nucleic acids for multiple labeling in the minor groove*. Tetrahedron Letters, 1991. **32**(49): p. 7171-7174.
170. Sigmund, H. and Pfliederer, W., *Nucleotides. Part LXXI. A new type of labelling of nucleosides and nucleotides*. Helvetica Chimica Acta, 2003. **86**(7): p. 2299-2334.
171. Jiao, G.-S. and Burgess, K., *Oligonucleotides with strongly fluorescent groups [pi]-Conjugated to a nucleobase: syntheses, melting temperatures, and conformation*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2003. **13**(16): p. 2785-2788.
172. Plavec, J. and Chattopadhyaya, J., *Comparative assessment of structure and reactivity of wyosine by chemistry, spectroscopy and ab initio calculations*. Tetrahedron, 1996. **52**(5): p. 1597-1608.
173. Rist, M.J. and Marino, J.P., *Fluorescent nucleotide base analogs as probes of nucleic acid structure, dynamics and interaction*. Curr. Org. Chem., 2002. **6**: p. 775-793.
174. Ward, D.C., Reich, E., and Stryer, L., *Fluorescence studies of nucleotides and polynucleotides*. The Journal of Biological Chemistry, 1969. **244**: p. 1228-1237.
175. Stivers, J., *2-Aminopurine fluorescence studies of base stacking interactions at abasic sites in DNA: metal-ion and base sequence effects*. Nucl. Acids Res., 1998. **26**(16): p. 3837-3844.
176. Raney, K., Sowers, L., Millar, D., and Benkovic, S., *A Fluorescence-Based Assay for Monitoring Helicase Activity*. PNAS, 1994. **91**(14): p. 6644-6648.

177. Rachofsky, E.L., Seibert, E., Stivers, J.T., Osman, R., and Ross, J.B.A., *Conformation and Dynamics of Abasic Sites in DNA Investigated by Time-Resolved Fluorescence of 2-Aminopurine*. *Biochemistry*, 2001. **40**(4): p. 957-967.
178. Beechem, J.M., Otto, M.R., Bloom, L.B., Eritja, R., Reha-Krantz, L.J., and Goodman, M.F., *Exonuclease-Polymerase Active Site Partitioning of Primer-Template DNA Strands and Equilibrium Mg²⁺ Binding Properties of Bacteriophage T4 DNA Polymerase*. *Biochemistry*, 1998. **37**(28): p. 10144-10155.
179. Stivers, J.T., Pankiewicz, K.W., and Watanabe, K.A., *Kinetic Mechanism of Damage Site Recognition and Uracil Flipping by Escherichia coli Uracil DNA Glycosylase*. *Biochemistry*, 1999. **38**(3): p. 952-963.
180. Allan, B.W. and Reich, N.O., *Targeted Base Stacking Disruption by the EcoRI DNA Methyltransferase*. *Biochemistry*, 1996. **35**(47): p. 14757-14762.
181. Holz, B., Klimasauskas, S., Serva, S., and Weinhold, E., *2-Aminopurine as a fluorescent probe for DNA base flipping by methyltransferases*. *Nucl. Acids Res.*, 1998. **26**(4): p. 1076-1083.
182. Hawkins, M.E., *Fluorescent pteridine nucleoside analogs*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2001. **34**(2): p. 257- 281.
183. Hawkins, M.E., Pfliederer, W., Balis, F.M., Porter, D., and Knutson, J.R., *Fluorescence Properties of Pteridine Nucleoside Analogs as Monomers and Incorporated into Oligonucleotides*. *Analytical Biochemistry*, 1997. **244**(1): p. 86-95.
184. Hawkins, M.E., Pfliederer, W., Jungmann, O., and Balis, F.M., *Synthesis and Fluorescence Characterization of Pteridine Adenosine Nucleoside Analogs for DNA Incorporation*. *Analytical Biochemistry*, 2001. **298**(2): p. 231-240.
185. Rao, P. and Benner, S.A., *Fluorescent Charge-Neutral Analogue of Xanthosine: Synthesis of a 2'-Deoxyribonucleoside Bearing a 5-Aza-7-deazaxanthine Base*. *J. Org. Chem.*, 2001. **66**(15): p. 5012-5015.
186. Singleton, S.F., Shan, F., Kanan, M.W., McIntosh, C.M., Stearman, C.J., Helm, J.S., and Webb, K.J., *Facile synthesis of a fluorescent deoxycytidine analogue suitable for probing the RecA nucleoprotein filament*. *Organic Letters*, 2001. **3**(24): p. 3919- 3922.
187. Lin, K.-Y., Jones, R., J, and Matteucci, M., *Tricyclic 2'-Deoxycytidine Analogs: Syntheses and Incorporation into Oligodeoxynucleotides Which Have Enhanced Binding to Complementary RNA*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995. **117**(13): p. 3873- 3874.
188. Eldrup, A.B., Nielsen, B.B., Haaima, G., Rasmussen, H., Kastrup, J.S., Christensen, C., and Nielsen, P.E., *1,8-Naphthyridin-2(1H)-ones - Novel Bicyclic and Tricyclic Analogues of Thymine in Peptide Nucleic Acids (PNAs)*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2001. **2001**(9): p. 1781-1790.
189. Sandin, P., Wilhelmsson, L.M., Lincoln, P., Powers, V.E.C., Brown, T., and Albinsson, B., *Fluorescent properties of DNA base analogue tC upon incorporation into DNA - negligible influence of neighbouring bases on fluorescence quantum yield*. *Nucl. Acids Res.*, 2005. **33**(16): p. 5019-5025.
190. Wilhelmsson, L.M., Holmen, A., Lincoln, P., Nielsen, P.E., and Norden, B., *A Highly Fluorescent DNA Base Analogue that Forms Watson-Crick Base Pairs with Guanine*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001. **123**(10): p. 2434-2435.
191. Liu, C. and Martin, C.T., *Fluorescence characterization of the transcription bubble in elongation complexes of T7 RNA polymerase*. *Journal of Molecular Biology*, 2001. **308**(3): p. 465-475.
192. Godde, F., Toulme, J.-J., and Moreau, S., *Benzoquinazoline Derivatives as Substitutes for Thymine in Nucleic Acid Complexes. Use of Fluorescence Emission of Benzo[g]quinazoline-2,4-(1H,3H)-dione in Probing Duplex and Triplex Formation*. *Biochemistry*, 1998. **37**(39): p. 13765-13775.

193. Godde, F., Toulme, J.-J., and Moreau, S., *4-amino-1H-benzog[*g*]quinazoline-2-one: a fluorescent analog of cytosine to probe protonation sites in triplex forming oligonucleotides*. Nucl. Acids Res., 2000. **28**(15): p. 2977-2985.
194. Ren, R.X.-F., Chaudhuri, N.C., Paris, P.L., Rumney, S., and Kool, E.T., *Naphthalene, Phenanthrene, and Pyrene as DNA Base Analogues: Synthesis, Structure, and Fluorescence in DNA*. J. Am. Chem. Soc., 1996. **118**(33): p. 7671-7678.
195. Hwang, G.T., Seo, Y.J., and Kim, B.H., *Pyrene -labeled deoxyuridine and deoxyadenosine: fluorescent discriminating phenomena in their oligonucleotides*. Tetrahedron Lett., 2005. **46**: p. 1475- 1477.
196. Firth, A.G., Fairlamb, I.J.S., Darley, K., and Baumann, C.G., *Sonogashira alkynylation of unprotected 8-brominated adenosines and guanosines: fluorescence properties of compact conjugated acetylenes containing a purine ring*. Tetrahedron Letters, 2006. **47**(21): p. 3529-3533.
197. Driscoll, M.D. and Hughes, S.H., *Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein Can Prevent Self-Priming of Minus-Strand Strong Stop DNA by Promoting the Annealing of Short Oligonucleotides to Hairpin Sequences*. J. Virol., 2000. **74**(19): p. 8785-8792.
198. Driscoll, M.D., Golinelli, M.-P., and Hughes, S.H., *In Vitro Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Minus-Strand Strong-Stop DNA Synthesis and Genomic RNA Processing*. J. Virol., 2001. **75**(2): p. 672-686.
199. Bernacchi, S., Stoylov, S., Piemont, E., Ficheux, D., Roques, B.P., Darlix, J.L., and Mely, Y., *HIV-1 nucleocapsid protein activates transient melting of least stable parts of the secondary structure of TAR and its complementary sequence*. Journal of Molecular Biology, 2002. **317**(3): p. 385-399.
200. Azoulay, J., Clamme, J.-P., Darlix, J.-L., Roques, B.P., and Mely, Y., *Destabilization of the HIV-1 Complementary Sequence of TAR by the Nucleocapsid Protein Through Activation of Conformational Fluctuations*. Journal of Molecular Biology, 2003. **326**(3): p. 691-700.
201. Beltz, H., Azoulay, J., Bernacchi, S., Clamme, J.-P., Ficheux, D., Roques, B., Darlix, J.-L., and Mely, Y., *Impact of the Terminal Bulges of HIV-1 cTAR DNA on its Stability and the Destabilizing Activity of the Nucleocapsid Protein NCp7*. Journal of Molecular Biology, 2003. **328**(1): p. 95-108.
202. Beltz, H., Piemont, E., Schaub, E., Ficheux, D., Roques, B., Darlix, J.-L., and Mely, Y., *Role of the Structure of the Top Half of HIV-1 cTAR DNA on the Nucleic Acid Destabilizing Activity of the Nucleocapsid Protein NCp7*. Journal of Molecular Biology, 2004. **338**(4): p. 711-723.
203. Beltz, H., Clauss, C., Piemont, E., Ficheux, D., Gorelick, R.J., Roques, B., Gabus, C., Darlix, J.-L., de Rocquigny, H., and Mely, Y., *Structural Determinants of HIV-1 Nucleocapsid Protein for cTAR DNA Binding and Destabilization, and Correlation with Inhibition of Self-primed DNA Synthesis*. Journal of Molecular Biology, 2005. **348**(5): p. 1113-1126.
204. Cosa, G., Harbron, E.J., Zeng, Y., Liu, H.-W., O'Connor, D.B., Eta-Hosokawa, C., Musier-Forsyth, K., and Barbara, P.F., *Secondary Structure and Secondary Structure Dynamics of DNA Hairpins Complexed with HIV-1 NC Protein*. Biophys. J., 2004. **87**(4): p. 2759-2767.
205. Kanevsky, I., Chaminade, F., Ficheux, D., Moumen, A., Gorelick, R., Negroni, M., Darlix, J.-L., and Fossé, P., *Specific interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and the TAR element*. J. Mol. Biol., 2005. **348**: p. 1059- 1077.

206. Berkhout, B., Vastenhouw, N.L., Klasens, B.I., and Huthoff, H., *Structural features in the HIV-1 repeat region facilitate strand transfer during reverse transcription*. RNA, 2001. **7**(8): p. 1097-1114.
207. Godet, J., de Rocquigny, H., Raja, C., Glasser, N., Ficheux, D., Darlix, J.-L., and Mely, Y., *During the Early Phase of HIV-1 DNA Synthesis, Nucleocapsid Protein Directs Hybridization of the TAR Complementary Sequences via the Ends of their Double-stranded Stem*. J. Mol. Biol., 2006. **356**(5): p. 1180-1192.
208. Millar, D.P., *Fluorescence studies of DNA and RNA structure and dynamics*. Curr. Opin. Struct. Biol., 1996. **6**: p. 322- 326.
209. Patel, S.S. and Bandwar, R.P., *Fluorescence methods for studying the kinetics and thermodynamics of transcription Initiation*. Methods in Enzymol., 2003. **370**: p. 668-686.
210. Roy, S., *Fluorescence quenching methods to study protein-nucleic acid interactions*. Methods in Enzymol., 2004. **379**: p. 175- 187.
211. Nordlund, T.M., Andersson, S., Nilsson, L., and Rigler, R., *Structure and dynamics of a fluorescent DNA oligomer containing the EcoRI recognition sequence: fluorescence, molecular dynamics, and NMR studies*. Biochemistry, 1989. **28**: p. 9095- 9103.
212. Guest, C.R., Hochstrasser, R.A., Sowers, L.C., and Millar, D.P., *Dynamics of mismatched base pairs in DNA*. Biochemistry, 1991. **30**(13): p. 3271- 3279.
213. Merrifield, R.B., *Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide*. J. Am. Chem.Soc., 1963. **85**(14): p. 2149- 2154.
214. Letsinger, R.L., Finnan, J.L., Heavner, G.A., and Lunsford, W.B., *Nucleotide chemistry. XX. Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links*. J. Am. Chem.Soc., 1975. **97**: p. 3278- 3279.
215. Adams, S.P., Kavka, K.S., Wykes, E.J., Holder, S.B., and Gallupi, G.R., *Hindered dialkylamino nucleoside phosphite reagents in the synthesis of two DNA 51-mers*. J. Am. Chem.Soc., 1983. **105**: p. 661- 663.
216. Usman, N., Ogilvie, K.K., Jiang, M.Y., and Cedergren, R.J., *Automated chemical synthesis of long oligoribonucleotides using 2'-O-silylated ribonucleosides 3'-O-phosphoramidites on a controlled pore glass support: Synthesis of a 43-nucleotide sequence similar to the 3'-half molecule of an Escherichia coli formylmethionine tRNA*. J. Am. Chem.Soc., 1987. **109**: p. 7845- 7854.
217. Song, Q.L. and Sanghvi, Y.S., *Unexpected results and recourse in process optimization of nucleoside 3'-O-succinates*. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2001. **20**(4-7): p. 1267- 1270.
218. Mullah, B. and Andrus, A., *Automated synthesis of double dye-labeled oligonucleotides using tetramethylrhodamine (TAMRA) solid supports*. Tetrahedron Letters, 1997. **38**(33): p. 5751-5754.
219. Pon, R. and Yu, S., *Hydroquinone-O,O'-diacetic acid ('Q-linker') as a replacement for succinyl and oxalyl linker arms in solid phase oligonucleotide synthesis*. Nucl. Acids Res., 1997. **25**(18): p. 3629-3635.
220. Wincott, F., DiRenzo, A., Shaffer, C., Grimm, S., Tracz, D., Workman, C., Sweedler, D., Gonzalez, C., Scaringe, S., and Usman, N., *Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribosomes*. Nucl. Acids Res., 1995. **23**(14): p. 2677-2684.
221. Ben Gaied, N., Glasser, N., Ramalanjaona, N., Beltz, H., Wolff, P., Marquet, R., Burger, A., and Mély, Y., *8-vinyl-deoxyadenosine, an alternative fluorescent nucleoside analog to 2'-deoxyribosyl-2-aminopurine with improved properties*. Nucl. Acids Res., 2005. **33**(3): p. 1031-1039.

222. Milstein, D. and Stille, J.K., *A general, selective, and facile method for ketone synthesis from acid chloride and organotin compounds catalyzed by palladium*. J. Am. Chem. Soc., 1978. **100**(11): p. 3636- 3638.
223. Kataoka, M., Hattori, A., Okino, S., Hyodo, M., Asano, M., Kawai, R., and Hayakawa, Y., *Ethyl(methyl)dioxirane as an Efficient Reagent for the Oxidation of Nucleoside Phosphites into Phosphates under Nonbasic Anhydrous Conditions*. Organic Letters, 2001. **3**(6): p. 815-818.
224. Verlinde, C., Callens, M., Van Calenberg, S., Van Aerschot, A., Herdewijn, P.A., Hannaert, V., Michels, P.A.M., Opperdoes, F.R., and Hol, W.G.J., *Selective inhibition of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based design: toward new drugs for the treatment of sleeping sickness*. J. Med. Chem, 1994. **37**: p. 3605- 3613.
225. Aronov, A.M. and Gelb, M.H., *Synthesis and structure-activity relationships of adenosine analogs as inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Modifications at positions 5' and 8*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1998. **8**(24): p. 3505-3510.
226. Van der Werten, E.M., Hartog-Witte, H.R., Roelen, H.C.P.F., von Frijtag Drabbe Kunzel, J.K., Pirovano, I.M., Mathot, R.A.A., Danhof, M., Van Aerschot, A., Lidaks, M.J., Ijzerman, A.P., and Soudijn, W., *8-substituted adenosine and theophylline-7-riboside analogues as potential partial agonists for the adenosine A1 receptor*. European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology, 1995. **290**(3): p. 189-199.
227. Persson, T., Gronowitz, S., Hornfeldt, A.-B., and Johansson, N.G., *Synthesis and antiviral effects of 2-heteroaryl substituted adenosine and 8-heteroaryl substituted guanosine derivatives*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1995. **3**(10): p. 1377-1382.
228. Van Calenberg, S., Verlinde, C., Soenens, J., De Bruyn, A., Callens, M., Blaton, N.M., Peeters, O., Herdewijn, P., Rozenski, J., and Hol, W.G.J., *Synthesis and Structure-Activity Relationships of Analogs of 2'-Deoxy-2'-(3-methoxybenzamido)adenosine, a Selective Inhibitor of Trypanosomal Glycosomal Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*. J. Med. Chem, 1995. **38**(19): p. 3838- 3849.
229. Greco, N.J. and Tor, Y., *Simple fluorescent pyrimidine analogues detect the presence of DNA abasic sites*. J. Am. Chem.Soc., 2005.
230. Raposo, M.M.M., Fonseca, A.M.C., and Kirsch, G., *Synthesis of donor-acceptor substituted oligothiophenes by Stille coupling*. Tetrahedron, 2004. **60**: p. 4071- 4078.
231. Rusakowicz, R. and Testa, A.C., *2-aminopyridine as a standard for low wavelength spectrofluorimetry*. The Journal of Physical Chemistry, 1968. **72**(7): p. 2680- 2681.
232. Reichardt, C., *Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators*. Chem. Rev., 1994. **94**(8): p. 2319- 2358.
233. Vargeese, C., Carter, J., Yegge, J., Krivjansky, S., Settle, A., Kropp, E., Peterson, K., and Pieken, W., *Efficient activation of nucleoside phosphoramidites with 4,5-dicyanoimidazole during oligonucleotide synthesis*. Nucl. Acids Res., 1998. **26**(4): p. 1046-1050.
234. Saenger, W., *Principles of nucleic acid structure*. Springer-Verlag, ed. Cantor, C.R. 1984, New-York. 556.
235. Eason, R.G., Burkhardt, D.M., Phillips, S.J., Smith, D.P., and David, S.S., *Synthesis and characterization of 8-methoxy-2'-deoxyadenosine- containing oligonucleotides to probe the syn glycosidic conformation of 2'-deoxyadenosine with DNA*. Nucl. Acids Res., 1996. **24**(5): p. 890-897.

236. Virgilio, A., Esposito, V., Randazzo, A., Mayol, L., and Galeone, A., *Effect of 8-methyl-2'-deoxyadenosine incorporation into quadruplex forming oligonucleotides*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005. **13**: p. 1037- 1044.
237. Manfredini, S., Baraldi, P.G., Bazzanini, R., Marangoni, M., Simoni, D., Balzarini, J., and De Clercq, E., *Synthesis and cytotoxic activity of 6-Vinyl and 6-Ethynyluridine and 8-Vinyl and 8-Ethynyladenosine*. J.Med.Chem., 1995. **38**: p. 199-203.
238. Hirota, K., Kitade, Y., Kanbe, Y., and Maki, Y., *Convenient method for the synthesis of C-alkylated purine nucleosides: palladium-catalyzed cross-coupling reaction of halogenopurine nucleosides with trialkylaluminums*. J. Org. Chem., 1992. **57**(19): p. 5268-5270.
239. Kiyohiko, K. and Saito, I., *Stabilization of Hoogsteen Base Pairing by Introduction of NH₂ Group at the C8 Position of Adenine*. Tetrahedron Letters, 1998. **39**: p. 5221-5224.
240. Balzarini, J., Baba, M., Pauwels, R., Herdewijn, P., and De Clercq, E., *Anti-retrovirus activity of 3'-fluoro- and 3'-azido-substituted pyrimidine 2',3'-dideoxynucleoside analogues*. Biochemical Pharmacology, 1988. **37**(14): p. 2847-2856.
241. Ahluwalia, G., Cooney, D.A., Mitsuya, H., Fridland, A., Flora, K.P., Hao, Z., Dalal, M., Broder, S., and Johns, D.G., *Initial studies on the cellular pharmacology of 2',3'-dideoxyinosine, an inhibitor of HIV infectivity*. Biochem. Pharmacol., 1987. **36**(22): p. 3797-3800.
242. Balzarini, J., Kang, G., Dalal, M., Herdewijn, P., De Clercq, E., Broder, S., and Johns, D., *The anti-HTLV-III (anti-HIV) and cytotoxic activity of 2',3'-didehydro- 2',3'-dideoxyribonucleosides: a comparison with their parental 2',3'-dideoxyribonucleosides*. Mol. Pharmacol., 1987. **32**(1): p. 162-167.
243. Johnson, M. and Fridland, A., *Phosphorylation of 2',3'-dideoxyinosine by cytosolic 5'-nucleotidase of human lymphoid cells*. Mol. Pharmacol., 1989. **36**(2): p. 291-295.
244. Hao, Z., Cooney, D., Farquhar, D., Perno, C., Zhang, K., Masood, R., Wilson, Y., Hartman, N., Balzarini, J., and Johns, D., *Potent DNA chain termination activity and selective inhibition of human immunodeficiency virus reverse transcriptase by 2',3'-dideoxyuridine-5'- triphosphate*. Mol. Pharmacol., 1990. **37**(2): p. 157-163.
245. Balzarini, J., Herdewijn, P., and De Clercq, E., *Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro- 2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds*. J. Biol. Chem., 1989. **264**(11): p. 6127-6133.
246. Krise, J.P. and Stella, V.J., *Prodrugs of phosphates, phosphonates, and phosphinates*. Advanced Drug Delivery Reviews, Low Molecular Weight Pro Drugs, 1996. **19**(2): p. 287-310.
247. Perigaud, C., Aubertin, A.-M., Benzaria, S., Pelicano, H., Girardet, J.-L., Maury, G., Gosselin, G., Kirn, A., and Imbach, J.-L., *Equal inhibition of the replication of human immunodeficiency virus in human T-cell culture by ddA BIS(SATE)phosphotriester and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine*. Biochemical Pharmacology, 1994. **48**(1): p. 11-14.
248. Girardet, J.-L., Perigaud, C., Aubertin, A.-M., Gosselin, G., Kirn, A., and Imbach, J.-L., *Increase of the anti-HIV activity of D4T in human T-cell culture by the use of the sate pronucleotide approach*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1995. **5**(24): p. 2981-2984.
249. Lefebvre, I., Périgaud, C., Pompon, A., Aubertin, A.-M., Girardet, J.-L., Kirn, A., Gosselin, G., and Imbach, J.-L., *Mononucleoside Phosphotriester Derivatives with S-Acyl-2-thioethyl Bioreversible Phosphate-Protecting Groups: Intracellular Delivery of*

- 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine 5'-Monophosphate. *J. Med. Chem.*, 1995. **38**(20): p. 3941- 3950.
250. McGuigan, C., Wedgwood, O.M., De Clercq, E., and Balzarini, J., *Phosphoramidate derivatives of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyadenosine [d4A] have markedly improved anti-HIV potency and selectivity.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1996. **6**(19): p. 2359-2362.
251. McGuigan, C., Pathirana, R.N., Mahmood, N., Devine, K.G., and Hay, A.J., *Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV1 in cell lines which are resistant to the action of AZT.* *Antiviral Research*, 1992. **17**(4): p. 311-321.
252. McGuigan, C., Pathirana, R.N., Balzarini, J., and De Clercq, E., *Intracellular delivery of big-active AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT.* *J. Med. Chem.*, 1993. **36**(8): p. 1048- 1052.
253. McGuigan, C., Cahard, D., Sheeka, H.M., DeClercq, E., and Balzarini, J., *Aryl phosphoramidate derivatives of d4T have improved anti HIV efficacy in tissue culture and may act by the generation of a novel intracellulare metabolite.* *J. Med. Chem.*, 1996. **39**(8): p. 1748- 1753.
254. McGuigan, C., Tsang, H.-W., Cahard, D., Turner, K., Velazquez, S., Salgado, A., Bidois, L., Naesens, L., De Clercq, E., and Balzarini, J., *Phosphoramidate derivatives of d4T as inhibitors of HIV: The effect of amino acid variation.* *Antiviral Research*, 1997. **35**(3): p. 195-204.
255. Siddiqui, A.Q., Ballatore, C., McGuigan, C., De Clercq, E., and Balzarini, J., *The Presence of Substituents on the Aryl Moiety of the Aryl Phosphoramidate Derivative of d4T Enhances Anti-HIV Efficacy in Cell Culture: A Structure-Activity Relationship.* *J. Med. Chem.*, 1999. **42**(3): p. 393-399.
256. McGuigan, C., Cahard, D., Sheeka, H.M., De Clercq, E., and Balzarini, J., *Phosphoramidate derivatives of d4T with improved anti-HIV efficacy retain full activity in thymidine kinase-deficient cells.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1996. **6**(10): p. 1183-1186.
257. Balzarini, J., Wedgwood, O., Kruijing, J., Pelemans, H., Heijntink, R., Clercq, E.D., and McGuigan, C., *Anti-HIV and Anti-HBV Activity and Resistance Profile of 2',3'-Dideoxy-3'-Thiacytidine (3TC) and Its Arylphosphoramidate Derivative CF 1109.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996. **225**(2): p. 363-369.
258. Balzarini, J., Aquaro, S., Hassan-Abdallah, A., Daluge, S.M., Perno, C.-F., and McGuigan, C., *Improved antiviral activity of the aryloxymethoxyalaninyl phosphoramidate (APA) prodrug of abacavir (ABC) is due to the formation of markedly increased carbovir 5'-triphosphate metabolite levels.* *FEBS Letters*, 2004. **573**(1-3): p. 38-44.
259. McGuigan, C., Harris, S.A., Daluge, S.M., Gudmundsson, K.S., McLean, E.W., Burnette, T.C., Marr, H., Hazen, R., Condreay, L.D., Johnson, L., DeClercq, E., and Balzarini, J., *Application of Phosphoramidate Pronucleotide Technology to Abacavir Leads to a Significant Enhancement of Antiviral Potency.* *J. Med. Chem.*, 2005. **48**(10): p. 3504-3515.
260. McGuigan, C., Cahard, D., Salgado, A., De Clercq, E., and Balzarini, J., *Phosphoramidates as potent pro-drugs of anti-HIV nucleotides: studies in the amino region.* *Antiviral Chem. Chemother*, 1996. **7**: p. 31- 36.
261. McGuigan, C., Salgado, A., Yarnold, C., Harries, T.Y., De Clercq, E., and Balzarini, J., *Novel nucleosides phosphoramidates as inhibitors of HIV: studies on the stereochemical requirements of the phosphoramidate amino acid.* *Antiviral Chem. Chemother*, 1996. **7**: p. 184- 188.

262. McGuigan, C., Slater, M.J., Parry, N.R., Perry, A., and Harris, S., *Synthesis and antiviral activity of acyclovir-5'-(phenyl methoxy alaninyl) phosphate as a possible membrane-soluble nucleotide prodrug*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000. **10**(7): p. 645-647.
263. Lehsten, D.M., Baehr, D.N., Lobl, T.J., and Vaino, A.R., *An Improved Procedure for the Synthesis of Nucleoside Phosphoramidates*. Org. Process Res. Dev., 2002. **6**(6): p. 819-822.
264. Uchiyama, M., Aso, Y., Noyori, R., and Hayakawa, Y., *O-selective phosphorylation of nucleosides without N-protection*. J. Org. Chem, 1993. **58**: p. 373- 379.
265. Azhayev, A.V. and Antopolsky, M.L., *Amide group assisted 3'-dephosphorylation of oligonucleotides synthesized on universal A-supports*. Tetrahedron, 2001. **57**(23): p. 4977-4986.
266. Burgess, K. and Cook, D., *Syntheses of nucleoside triphosphates*. Chem. Rev, 2000. **100**: p. 2047- 2059.
267. Davisson, V.J., Woodside, A.B., Neal, T., R, Stremmler, K.E., Muehlbacher, M., and Poulter, C.D., *Phosphorylation of isoprenoid alcohols*. J. Org. Chem, 1986. **51**: p. 4768- 4779.
268. Davisson, V.J., Davis, D.R., Dixit, V.M., and Poulter, C.D., *Synthesis of nucleotide 5'-diphosphates from 5'-O-Tosyl nucleosides*. J. Org. Chem, 1987. **52**: p. 1794- 1801.
269. Dixit, V.M. and Poulter, C.D., *Convenient syntheses of adenosine 5'-diphosphate, adenosine 5'-methylenediphosphonate, and adenosine 5'-triphosphate*. Tetrahedron Letters, 1984. **25**(37): p. 4055-4058.
270. Ludwig, J. and Eckstein, F., *Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one*. J. Org. Chem, 1989. **54**(3): p. 631-635.
271. Eckstein, F., *Nucleoside thiotriphosphates*. Annu. Rev. Biochem., 1985. **54**: p. 367-402.
272. Yoshikawa, M., Kato, T., and Takenishi, T., *A novel method for phosphorylation of nucleoside to 5'-nucleotides*. Tetrahedron Lett., 1967. **8**(50): p. 5065- 5068.
273. Cramer, F. and Winter, M., *Imidoester, VI. Katalytische Wirkung von Dimethylformamid bei Reaktionen von Phosphorsäureester-chloriden*. Chemische Berichte, 1961. **94**(4): p. 989-996.
274. Ludwig, J., *A new route to nucleoside 5'-triphosphates*. Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 1981. **16**(3-4): p. 131-133.
275. Goody, R.S. and Isakov, M., *Simple synthesis and separation of the diastereomers of alpha-thio analogs of ribo and deoxyribo- di- and triphosphate*. Tetrahedron Letters, 1986. **27**(31): p. 3599- 3602.
276. Arabshahi A. and Frey P. A., *A Simplified Procedure for Synthesizing Nucleoside 1-Thiotriphosphates: dATP[alpha]S, dGTP[alpha]S, UTP[alpha]S, and dTTP[alpha]S*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994. **204**(1): p. 150-155.
277. Kovacs, T. and Otvos, L., *Simple synthesis of 5-vinyl- and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine-5'-triphosphates*. Tetrahedron Letters, 1988. **29**(36): p. 4525-4528.
278. Ruth, J.L. and Cheng, Y.C., *Nucleoside analogues with clinical potential in antiviral chemotherapy. The effect of several thymidine and 2'-deoxycytidine analogue 5'-triphosphates on purified human (alpha, beta) and herpes simplex virus (types 1, 2) DNA polymerases*. Mol Pharmacol, 1981. **20**: p. 415.
279. Baughn, R.L., Adalsteinsson, Ö., and Whitesides, G.M., *Large scale enzyme-catalyzed synthesis of ATP from adenosine and acetyl phosphate. Regeneration of ATP from AMP*. J. Am. Chem. Soc., 1978. **100**(1): p. 304- 306.

280. Zinchenko, A.I., Barai, V.N., Zaiashko, L.M., Poopeiko, N.E., Pricota, T.I., Sivets, G.G., and Mikhailopulo, I.A., *Enzymatic synthesis of nucleoside 5'-mono and -triphosphates*. FEBS Letters, 1990. **260**(2): p. 257-260.
281. Wong, C.-H., Haynie, S.L., and Whitesides, G.M., *Preparation of a mixture of nucleoside triphosphates from yeast RNA: use in enzymatic synthesis requiring nucleoside triphosphates regeneration and conversion to nucleoside diphosphate sugars*. J. Am. Chem. Soc., 1983. **105**(1): p. 115- 117.
282. Slotin, L.A., *Current methods of phosphorylation of biological molecules*. Synthesis, 1977: p. 737- 752.
283. Bannwarth, W. and Trzeciak, A., *A Simple and Effective Chemical Phosphorylation Procedure for Biomolecules*. Helvetica Chimica Acta, 1987. **70**(1): p. 175-186.
284. Taktakishvili, M. and Nair, V., *A new method for the phosphorylation of nucleosides*. Tetrahedron Letters, 2000. **41**(37): p. 7173-7176.
285. Nair, V. and Taktakishvili, M., *A new procedure for the phosphorylation of nucleosides: Application to the discovery of inhibitors of HIV Integrase*. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2001. **20**(4-7): p. 739- 742.
286. Saady, M., Lebeau, L., and Mioskowski, C., *Synthesis of adenosine-5'-phosphates and 5'-alkylphosphonates via the Mitsunobu reaction*. Tetrahedron Letters, 1995. **36**(13): p. 2239-2242.
287. Goujon, L., Brossette, T., Dereudre-Bosquet, N., Creminon, C., Clayette, P., Dormont, D., Mioskowski, C., Lebeau, L., and Grassi, J., *Monitoring of intracellular levels of 5'-monophosphate-AZT using an enzyme immunoassay*. Journal of Immunological Methods, 1998. **218**(1-2): p. 19-30.
288. Ahmadibeni, Y. and Parang, K., *Selective Diphosphorylation, Dithiodiphosphorylation, Triphosphorylation, and Trithiotriphosphorylation of Unprotected Carbohydrates and Nucleosides*. Org. Lett., 2005. **7**(25): p. 5589-5592.
289. Moffatt, J.G., *A general synthesis of nucleoside 5'-triphosphates*. Canadian Journal of Chemistry, 1964. **42**: p. 599- 604.
290. Goldman, L., Marico, J.W., and Anderson, G.W., *The preparation of Adenosine-5'-imidazol-1-ylphosphonate and its reactions with nucleophiles. A novel synthesis of nucleotides coenzymes*. J. Am. Chem.Soc., 1960. **82**: p. 2969-2970.
291. Hoard, D.E. and Ott, D.G., *Conversion of mono- and oligodeoxyribonucleotides to 5'-triphosphates*. J. Am. Chem.Soc., 1965. **87**(8): p. 1785- 1788.
292. Maeda, M., Patel, A., and Hampton, A., *Formation of ribonucleotide 2',3'-cyclic carbonates during conversion of ribonucleoside 5'-phosphates to diphosphates and triphosphates by the phosphorimidazolidate procedure*. Nucl. Acids Res., 1977. **4**(8): p. 2843-2853.
293. Cramer, F. and Neunhoeffler, H., *Zur Chemie der energiereichen Phosphate, XV Reaktionen von Adenosin-5'-phosphorsäure-imidazolid - eine neue Synthese von Adenosindiphosphat und Flavin-adenin-dinucleotid*. Chemische Berichte, 1962. **95**(7): p. 1664-1669.
294. Bogachev, V.S., *Synthesis of deoxynucleoside 5'-triphosphates using trifluoroacetic anhydride as an activating reagent*. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 1996. **22**(9): p. 699- 705.
295. Mohamady, S. and Jakeman, D.L., *An Improved Method for the Synthesis of Nucleoside Triphosphate Analogues*. J. Org. Chem., 2005. **70**(25): p. 10588-10591.
296. Wu, W., Bergstrom, D., E, and Davisson, V.J., *A combination chemical and enzymatic approach for the preparation ofazole carboxamide nucleoside triphosphate*. J. Org. Chem, 2003. **68**(10): p. 3860- 3865.

297. Yoshikawa, M., Kato, T., and Takenishi, T., *Studies of phosphorylation. III. Selective phosphorylation of unprotected nucleoside*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1969. **42**: p. 3505- 3508.
298. Lang, P., *Synthèse d'analogues de nucléosides et de nucléotides en vue d'inhiber les polymérase et d'étudier le mécanisme de la ribonucléotide reductase de classe I*, in *Chimie*. 2000, Université Louis Pasteur: Strasbourg. p. 220.
299. Hiroshi Takaku, K.M., Takashi Sumiuchi, *Selective removal of terminal dimethoxytrityl groups*. Chemistry letters, 1983: p. 1661-1664.
300. Pathak, A.K., Pathak, V., Seitz, L.E., Tiwari, K.N., Akhtar, M.S., and Reynolds, R.C., *A facile method for deprotection of trityl ethers using column chromatography*. Tetrahedron Letters, 2001. **42**(44): p. 7755-7757.
301. Stawinski, J. and Kraszewski, A., *How to get the most out of two phosphorus chemistries. Studies on H-phosphonates*. Acc. Chem. Res, 2002. **35**: p. 952- 960.
302. Corby, N.S., Kenner, G.W., and Todd, A.R., *Nucleotides. Part XVI. Ribonucleoside-5'-phosphites. A new method for the preparation of mixed secondary phosphites*. J. Chem. Soc., 1952: p. 3669- 3675.
303. Hall, R.H., Todd, A.R., and Webb, R.F., *Nucleotides. Part XLI. Mixed anhydrides as intermediates in the synthesis of dinucleoside phosphates*. J. Chem. Soc., 1957: p. 3291- 3296.
304. Jankowska, J., Sobkowski, M., Stawinski, J., and Kraszewski, A., *Studies on aryl H-phosphonates. I. An efficient method for the preparation of deoxyribo- and ribonucleoside 3'-H-phosphonate monoesters by transesterification of diphenyl H-phosphonate*. Tetrahedron Letters, 1994. **35**(20): p. 3355-3358.
305. Kers, A., Kers, I., Stawinski, J., Sobkowski, M., and Kraszewski, A., *Studies on aryl H-phosphonates; part 2: A general method for the preparation of Alkyl H-phosphonate monoesters*. Synthesis, 1995: p. 427-430.
306. Bollmark, M., Johansson, T., Kullberg, M., Nilsson, J., Stawinski, J., Cieslak, J., Jankowska, J., Sobkowski, M., Szymczak, M., Wenska, M., and Kraszewski, A., *Developing synthetic method for bioactive phosphorus compounds usinh H-phosphonate chemistry: A progress report*. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2003. **22**(5- 8): p. 617- 621.
307. Szymczak, M., Szymanska, A., Stawinski, J., Boryski, J., and Kraszewski, A., *Aryl H-phosphonates. 14. Synthesis of new nucleotides analogues with phosphonate-phosphate internucleosidic linkage*. Organic Letters, 2003. **4**(20): p. 3571-3573.
308. Reese, C.B. and Quanlai Song, *A new approach to the synthesis of oligonucleotides and their phosphorothioate analogues in solution*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1997. **7**(21): p. 2787-2792.
309. Reese, C.B. and Song, Q., *A new approach to the synthesis of linear and cyclic oligoribonucleotides*. Nucleosides & Nucleotides, 1999. **18**(6 & 7): p. 1175-1180.
310. Reese, C. and Song, Q., *The H-phosphonate approach to the solution phase synthesis of linear and cyclic oligoribonucleotides*. Nucl. Acids Res., 1999. **27**(4): p. 963-971.
311. Reese, C. and Song, Q., *The H-phosphonate approach to the synthesis of oligonucleotides and their phosphorothioate analogues in solution*. J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 1999: p. 1477- 1486.
312. Reese, C. and Song, Q., *A new approach to the synthesis of branched and branched cyclic oligoribonucleotides*. Nucl. Acids Res., 1999. **27**(13): p. 2672-2681.
313. Reese, C.B., *Process for the preparation of oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate triesters via coupling reaction*, in *PCT Int. Appl.* 2001, (Avecia Ltd., UK). Wo. p. 23 pp.

314. Kung, P.-P. and Jones, R.A., *H-phosphonate DNA synthesis without amino protection*. Tetrahedron Letters, 1992. **33**(40): p. 5869-5872.
315. Doak, G.O. and Freedman, L.D., *The structure and properties of the dialkyl phosphonates*. Chem. Rev, 1961. **61**: p. 31- 44.
316. Guthrie, J.P., *Tautomerization equilibria for phosphorus acid and its ethyl esters, free energies of formation of phosphorus and phosphonic acids and their ethyl esters, and pKa values for ionization of the P-H bond in phosphonic acid esters*. Can. J. Chem, 1979. **57**: p. 236- 239.
317. Garegg, P.J., Regberg, T., Stawinski, J., and Stroemberg, R., *Nucleoside hydrogenphosphonate in oligonucleotides synthesis*. Chem. Scr., 1986. **26**: p. 59- 62.
318. Marugg, J.E., Tromp, M., Kuyl-Yeheskiely, E., van der Marel, G.A., and van Boom, J.H., *A convenient and general approach to the synthesis of properly protected d-nucleoside-3'-hydrogenphosphonates via phosphite intermediates*. Tetrahedron Letters, 1986. **27**(23): p. 2661-2664.
319. Marugg, J.E., Burik, A., Tromp, M., Van der Marel, G.A., and Van Boom, J.H., *A new and versatile approach to the preparation of valuable deoxynucleoside 3'-phosphite intermediates*. Tetrahedron Letters., 1986. **27**: p. 2271- 2274.
320. Stawinski, J. and Thelin, M., *Nucleoside H-phosphonate. XI. A convenient method for the preparation of nucleoside H-phosphonate*. Nucleosides & Nucleotides, 1990. **9**: p. 129- 135.
321. Wada, T., Sato, Y., Honda, F., Kawahara, S.-i., and Sekine, M., *Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides using N-unprotected H-phosphonate monomers and carbonium and phosphonium condensing reagent: O-selective phosphorylation and condensation*. J. Am. Chem.Soc., 1997. **119**: p. 12710-12721.
322. http://www.rapp-polymere.com/preise/tent_s_d.htm.
323. De Napoli, L., Di Fabio, G., D'Onofrio, J., and Montesarchio, D., *An efficient solid phase synthesis of 5'-phosphodiester and phosphoramidate monoester nucleoside analogues*. Chem. Commun., 2005: p. 2586- 2588.
324. Wright, P., Lloyd, D., Rapp, W., and Andrus, Alex, *Large scale synthesis of oligonucleotides via phosphoramidite nucleosides and a high-loaded polystyrene support*. Tetrahedron Lett., 1993. **34**(21): p. 3373-3376.
325. Pon, R.T., Usman, N., and Ogilvie, K.K., *Derivatization of controlled pore glass beads for solid phase oligonucleotide synthesis*. Biotechniques, 1988. **6**(8): p. 768- 775.
326. Padmanabhan, S., Coughlin, J.E., and Iyer, R.P., *Microwave-assisted functionalization of solid supports: application in the rapid loading of nucleosides on controlled-pore-glass (CPG)*. Tetrahedron Lett., 2005. **46**: p. 343- 347.
327. Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., and Cook, P.I., *Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides*. Analytical Biochemistry, 1970. **34**(2): p. 595-598.
328. Albericio, F., Bofill, J.M., Elfaham, A., and Kates, S.A., *Use of onium salt-based coupling reagents in peptide synthesis*. J. Org. Chem, 1998. **63**: p. 9678- 9683.
329. Fields, C.G., Lloyd, D.H., Macdonald, R.L., Otteson, K.M., and Noble, R.L., *HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis*. Peptide Res., 1991. **4**: p. 95-101.
330. Finn, P.J., Gibson, N.J., Fallon, R., Hamilton, A., and Brown, T., *Synthesis and properties of DNA-PNA chimers oligomers*. Nucl. Acids Res., 1996. **24**: p. 3357- 3363.

331. Bergmann, F. and Bannwarth, W., *Solid phase synthesis of directly linked peptide-oligodeoxynucleotide hybrids using standard synthesis protocols*. Tetrahedron Lett., 1995. **36**: p. 1839- 1842.
332. Farese, A., Pairo, S., Patino, N., Ravily, V., Condom, R., Aumelas, A., and Guedj, R., *Liquid-phase synthesis of peptid nucleic acid (or polyamide nucleic acid) dimers*. Nucleosides & Nucleotides, 1997. **16**: p. 1893- 1906.
333. Pon, R.T., Yu, S., and Sanghvi, Y.S., *Rapid Esterification of Nucleosides to Solid-Phase Supports for Oligonucleotide Synthesis Using Uronium and Phosphonium Coupling Reagents*. Bioconjugate Chemistry, 1999. **10**(6): p. 1051-1057.
334. Froehler, B.C., Ng, P.G., and Matteucci, M.D., *Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates*. Nucl. Acids Res., 1986. **14**(13): p. 5399- 5407.
335. Maier, M.A., Guzaev, A.P., and Manoharan, M., *Synthesis of chimeric oligonucleotides containing phosphodiester, phosphorothioate, and phosphoramidate linkages*. Organic Letters, 2000. **2**(13): p. 1819- 1822.
336. Hata, T. and Sekine, M., *Silyl phosphites. I. The reaction of silyl phosphites with diphenyl disulfide. Synthesis of S-phenyl nucleoside phosphorothioates*. J. Am. Chem.Soc., 1974. **96**(23): p. 7363- 7364.
337. Dreef, C.E., Van der Marel, G.A., and Van Boom, J.H., *Phosphorylation of benzyl protected sugar derivatives via 1-H-phosphonate intermediates: synthesis of DL-Myo-Inositol 1,4,5-Tris-1-H-phosphonate*. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 1987. **106**(512- 513).
338. Wada, T., Mochizuki, A., Sato, Y., and Sekine, M., *A convenient method for phosphorylation involving a facile oxidation of H-phosphonate monoesters via bis(trimethylsilyl)phosphites*. Tetrahedron Letters, 1998. **39**(39): p. 7123-7126.
339. Davis, F.A. and Haque, M.S., *Stereochemistry of the asymmetric oxidation of ketone enolates using (camphorsulfonyl)oxaziridines*. J. Org. Chem, 1986. **51**: p. 4085- 4087.
340. Davis, F.A., Haque, M.S., Ulatowski, T.G., and Towson, J.C., *Assymetric oxidation of ester and amide enolates using new (Camphorsulfonyl)oxaziridines*. J. Org. Chem, 1986. **51**(12): p. 2402- 2404.
341. Boschelli, D., Smith III, A.B., Stringer, O.D., Jenkins Jr., R.H., and Davis, F.A., *An asymmetric synthesis of (+)-kjellmanianone*. Tetrahedron Letters, 1981. **22**(44): p. 4385-4388.
342. Davis, F.A., Lamendola Jr, J., Nadir, U., Kluger, E.W., Sedergran, T.C., Panunto, T.W., Billmers, R., Jenkins Jr, R., Turchi, I.J., Watson, W.H., Chen, J.S., and Kimura, M., *Chemistry of oxaziridines. I. Synthesis and structure of 2-Arenesulfonyl-3-aryloxaziridines. A new class of oxaziridines*. J. Am. Chem.Soc., 1980. **102**(6): p. 2000-2005.
343. Davis, F.A., Towson, J.C., Weismiller, M.C., Lal, S., and Carroll, P.J., *Chemistry of oxaziridines. II. (Camphorylsulfonyl)oxaziridine, synthesis and properties*. J. Am. Chem.Soc., 1988. **110**: p. 8477- 8482.
344. Fife, T.H. and Jao, L.K., *Substituent effects in acetal hydrolysis*. J. Org. Chem, 1964. **30**(5): p. 1492- 1495.
345. Bornstein, J., Bedell, S.F., Drummond, P.E., and Kosloski, C.L., *The synthesis of alpha-amino-o-tolualdehyde diethylacetal and its attempted conversion to pseudoisindole*. J. Am. Chem.Soc., 1956. **78**(1): p. 83- 86.
346. Karimi, B. and Ashtiani, A.M., *2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone (DDQ) as a highly efficient and mild catalyst for diethyl acetalization of carbonyl compound*. Chemistry Letters, 1999. **28**(11): p. 1199- 1200.
347. Patwardhan, S.A. and Dev, S.U.K.H., *Amberlyst-15, a superior catalyze for the preparation of enol ethers and acetals*. Synthesis, 1974: p. 348- 349.

348. Firouzabadi, H., Iranpoor, N., and Karimi, B., *Zirconium tetrachloride (ZrCl₄) catalysed highly chemoselective and efficient acetalization of carbonyl compounds*. Synlett, 1999: p. 321- 323.
349. Velusamy, S. and Punniyamurthy, T., *Cobalt(II)-catalyzed chemoselective synthesis of acetals from aldehydes*. Tetrahedron Letters, 2004. **45**(25): p. 4917-4920.
350. Krzyzanowska, B.K., He, K., Hasan, A., and Shaw, B.R., *A convenient synthesis of 2'-deoxyribonucleoside 5'-(α)-P-borano)triphosphates*. Tetrahedron, 1998. **54**(20): p. 5119-5128.
351. He, K., Hasan, A., Krzyzanowska, B.K., and Shaw, B.R., *Synthesis and separation of diastereomers of ribonucleoside 5'-(α -P-borano) triphosphates*. J. Org. Chem, 1998. **63**: p. 5769- 5773.
352. Li, P., Xu, Z., Liu, H., Wennefors, C.K., Dobrikov, M.I., Ludwig, J., and Shaw, B.R., *Synthesis of α -P-modified nucleoside diphosphates with ethylenediamine*. J. Am. Chem. Soc., 2005. **127**: p. 16782- 16783.
353. Nahum, V., Zündorf, G., Lévesque, S.A., Beaudoin, A.R., Reiser, G., and Fischer, B., *Adenosine 5'-O-(1-Boranotriphosphate) derivatives as novel P2Y1 receptor agonists*. J. Med. Chem, 2002. **45**: p. 5384- 5396.
354. Spielvogel, B.F., Sood, A., Shaw, B.R., and Hall, I.H., *From Boron analogues of aminoacids to boronated DNA: potential new pharmaceuticals and neutron capture agents*. Pure & Appl. Chem, 1991. **63**(3): p. 415- 418.
355. Sood, A., Shaw, B.R., and Spielvogel, B.F., *Boron-containing nucleic acids. 2. Synthesis of oligodeoxynucleoside boranophosphates*. J. Am. Chem. Soc., 1990. **112**: p. 9000- 9001.
356. He, K., Sergueev, D.S., Sergueeva, Z.A., and Shaw, B.R., *Synthesis of diuridine 3',5'-boranophosphate: H-phosphonate approach*. Tetrahedron Letters, 1999. **40**(25): p. 4601-4604.
357. Higson, A.P., Sierchala, A., Brummel, H., Zhao, Z., and Caruthers, M.H., *Synthesis of an oligothymidylate containing boranophosphate linkages*. Tetrahedron Letters, 1998. **39**(23): p. 3899-3902.
358. Prosperi, D., Panza, L., Poletti, L., and Lay, L., *Boranophosphate diesters as stable synthetic analogues of 1-O-glycosylphosphates*. Tetrahedron, 2000. **56**: p. 4811- 4815.
359. Summers, J.S., Roe, D., Boyle, P.D., Colvin, M., and Shaw, B.R., *Structural Studies of a Borane-Modified Phosphate Diester Linkage: Ab Initio Calculations on the Dimethylboranophosphate Anion and the Single-Crystal X-ray Structure of Its Diisopropylammonium Salt*. Inorg. Chem., 1998. **37**(17): p. 4158-4159.
360. Thatcher, G.R.J. and Campbell, A.S., *Phosphonates as mimics of phosphate biomolecules: Ab initio calculations on tetrahedral ground states and pentacoordinate intermediates for phosphoryl transfer*. J. Org. Chem., 1993. **58**(8): p. 2272- 2281.
361. Crabtree, R.H., Siegbahn, P.E.M., Eisenstein, O., Rheingold, A.L., and Koetzle, T.F., *A New Intermolecular Interaction: Unconventional Hydrogen Bonds with Element-Hydride Bonds as Proton Acceptor*. Acc. Chem. Res., 1996. **29**(7): p. 348-354.
362. Cramer, C.J. and Gladfelter, W.L., *Ab Initio Characterization of [H₃N.BH₃]₂, [H₃N.AlH₃]₂ and [H₃N.GaH₃]₂*. Inorg. Chem., 1997. **36**(23): p. 5358-5362.
363. Summers, J.S. and Shaw, B.R., *Boranophosphates as mimics of natural phosphodiester in DNA*. Current Medicinal Chemistry, 2001. **8**: p. 1147- 1155.
364. Selmi, B., Boretto, J., Sarfati, S.R., Guerreiro, C., and Canard, B., *Mechanism-based Suppression of Dideoxynucleotide Resistance by K65R Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase Using an α -Boranophosphate Nucleoside Analogue*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(51): p. 48466-48472.

365. Meyer, P., Schneider, B., Sarfati, S., Deville-Bonne, D., Guerreiro, C., Boretto, J., Janin, J., Véron, M., and Canard, B., *Structural basis for activation of α -boranophosphate nucleotide analogues targeting drug-resistant reverse transcriptase*. EMBO J., 2000. **19**(14): p. 3520-3529.
366. Deval, J., Alvarez, K., Selmi, B., Bermond, M., Boretto, J., Guerreiro, C., Mulard, L., and Canard, B., *Mechanistic Insights into the Suppression of Drug Resistance by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Using $\{\alpha\}$ -Boranophosphate Nucleoside Analogs*. J. Biol. Chem., 2005. **280**(5): p. 3838-3846.
367. Sergueev, D.S. and Shaw, B.R., *H-Phosphonate approach for solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside boranophosphates and their characterization*. J. Am. Chem. Soc., 1998. **120**(37): p. 9417-9427.
368. Ahmadibeni, Y. and Parang, K., *Application of a Solid-Phase β -Triphosphitylating Reagent in the Synthesis of Nucleoside β -Triphosphates*. J. Org. Chem., 2006. **71**(15): p. 5837-5839.
369. Ahmadibeni, Y. and Parang, K., *Solid-Phase Synthesis of Dinucleoside and Nucleoside-Carbohydrate Phosphodiester and Thiophosphodiester*. J. Org. Chem., 2006. **71**(17): p. 6693-6696.