

**UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

**THESE de DOCTORAT**

Présentée par

**Cédric GLAPSKI**

En vue d'obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

**Spécialité : Chimie Bioorganique**

Sujet :

**Inhibition de la S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase :  
Synthèses et études du mode d'action de nouveaux inhibiteurs  
irréversibles ; modélisation et synthèses de nouveaux acyclonucléosides  
dirigés contre le site actif de l'enzyme.**

Soutenue le 16 Mars 2004 devant le jury :

<b>M. François Huet</b>	Professeur à l'Université du Maine, Rapporteur.
<b>M. Olivier Ploux</b>	Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, Rapporteur.
<b>M. Charles Mioskowski</b>	Directeur de Recherche CNRS, (Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Strasbourg), Examineur.
<b>M. Alain Alix</b>	Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardenne, Examineur.
<b>M. Georges Guillerm</b>	Professeur à l'Université de Reims Champagne Ardenne, Directeur de Thèse.

*A la mémoire de ma grand-mère,*

*A mes parents et grand-parents,*

*A tous ceux qui me sont chers.*

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR 6519 dans le laboratoire de chimie bioorganique dirigé par le Professeur G. Guillermin. Je tiens à le remercier, tout d'abord, de m'avoir accueilli dans son laboratoire mais aussi de ses nombreux conseils avisés et de sa présence attentive à mes côtés.

Je tiens à remercier les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je voudrais remercier également le Dr Murielle Muzard et le Dr Jean-Bernard Behr pour l'aide très précieuse qu'ils m'ont apportée au quotidien dans la réalisation de cette thèse ainsi que pour les bons moments passés ensemble.

Je voudrais avoir aussi une pensée pour les Dr S. Pilard et Dr J.P. Touzel qui m'ont fait profiter de leur expertise dans les domaines de la spectrométrie de masse et de la microbiologie ainsi que Nicolas Floquet pour tout le travail réalisé en modélisation moléculaire.

Une autre de mes pensées va au Dr D. Guillermin pour nos discussions intéressantes et ses conseils concernant nos activités au sein de la Société Française de Chimie.

Un remerciement spécial à Jacqueline Keller, Sylvie Lanthony, Dominique Harrakat et Henri Baillia pour leur soutien technique plus qu'apprécié au laboratoire, en microanalyse, en spectrométrie de masse et en RMN.

Enfin un remerciement, et non des moindres, à ceux qui m'ont soutenu pendant ces trois années : Audrey, Benjamin, Alexandre, Ariane, Céline, Isabel, Annie, Martine, Sandrine.

# TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS ET NOTATIONS .....	5
---------------------------------	---

INTRODUCTION GENERALE .....	7
-----------------------------	---

## CHAPITRE 1

### LA S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEINE HYDROLASE : UNE CIBLE

PHARMACOLOGIQUE .....	10
-----------------------	----

1. ROLES BIOLOGIQUES DE L'ADOHCY ET DE L'ADOHCY HYDROLASE .....	12
---	----

1.1 Ciblage de l'AdoHcy hydrolase pour la recherche d'agents antiviraux .....	13
---	----

1.2. Ciblage de l'AdoHcy hydrolase pour la recherche d'agents hypohomocystéinémians .....	14
---	----

1.3. L'AdoHcy hydrolase, cible pour la recherche de nouveaux agents antipaludiques.....	15
---	----

1.4. L'AdoHcy hydrolase, cible pour la recherche de nouveaux agents immunosuppresseurs....	16
--	----

2. LES INHIBITEURS DE L'ADOHCY HYDROLASE : PROPRIETES ET MODE D'ACTION.....	18
---	----

2.1 Les inhibiteurs réversibles.....	18
--------------------------------------	----

2.2 Inhibiteurs irréversibles.....	19
------------------------------------	----

2.2.1 Inhibiteurs de type I .....	19
-----------------------------------	----

2.2.2 Les inhibiteurs irréversibles covalents de type II.....	21
---	----

3. L'ADOHCY HYDROLASE : MECANISME CATALYTIQUE ET STRUCTURES .....	28
---	----

3.1 Mécanisme catalytique .....	29
---------------------------------	----

3.2 Structures de l'AdoHcy hydrolase.....	30
---	----

### CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE NOUVEAUX INHIBITEURS

SPECIFIQUES DE L'AdoHcy HYDROLASE.....	29
--	----

## CHAPITRE 2

### RECHERCHE DE NOUVELLES SÉRIES D'INHIBITEURS COVALENTS DE L'AdoHcy HYDROLASE CIBLANT L'ACTIVITÉ HYDROLYTIQUE DE

L'ENZYME .....	37
----------------	----

1. ETUDE DE L'INTERACTION DES 6'-CYANO-5',6'-DEHYDRO-6'-DESOXY-6'-HALOHOMOADENOSINE AVEC L'ADOHcy HYDROLASE .....	38
2. UTILISATION DES ESTERS DERIVES DE L'HOMOADENOSINE COMME NOUVEAUX MODELES D'INHIBITEURS SUICIDES DE L'ADOHcy HYDROLASE.....	39
3. SYNTHESSES.....	42
3.1 Synthèses des 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-6'-halo-homoadénosine <b>4</b> .....	42
3.1.1 Synthèse des cyanohalométhylidènetriphénylphosphoranes .....	42
3.1.1.1 Synthèse du chlorocyanométhylidènetriphénylphosphorane <b>7b</b> .....	42
3.1.1.2 Synthèse du cyanofluorométhylidènetriphénylphosphorane <b>7c</b> .....	43
3.1.2 Synthèse des 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-homoadénosines ( <b>4a</b> ) et 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-6'-halo-homoadénosines ( <b>4b</b> et <b>4c</b> ) .....	45
3.1.2.1 Synthèse des 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-homoadénosines <b>4a</b> .....	45
3.1.2.2 Synthèse des 6'-chloro-6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-homoadénosines <b>4b</b> .....	46
3.1.2.3 Synthèse des 6'-cyano-6'-fluoro-5',6'-déhydro-6'-désoxy-adénosines <b>4c</b> .....	46
3.2 Synthèse des esters 2,2-dihalocyclopropaniques <b>5a-b</b> , 2-haloéthyliques <b>6a-b</b> de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique .....	47
3.2.1 Synthèse de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique protégé <b>25</b> .....	47
3.2.2 Synthèse des 2,2-dihalocyclopropan-1-ols.....	49
3.2.2.1 Synthèse du 2,2-dichlorocyclopropan-1-ol <b>28</b> .....	49
3.2.2.2 Synthèse du 2,2-difluorocyclopropan-1-ol <b>31</b> .....	49
3.2.3 Synthèse des esters de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique <b>5-6</b> .....	52
3.2.3.1 Synthèse des esters 2,2-dihalocyclopropaniques de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique <b>5</b> .....	52
3.2.3.2 Synthèse des esters haloéthyliques dérivés de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique <b>6</b> .....	53
4. INACTIVATION DE L'ADOHcy HYDROLASE – RESULTATS ET DISCUSSION .....	54
4.1 Préparation de l'AdoHcy hydrolase .....	54
4.2 Inactivation de l'AdoHcy hydrolase par les (Z) et (E)-5'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-homoadénosines ( <b>4a</b> ) et la (E)-6'-chloro-6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-homoadénosine ((E)- <b>4b</b> ).....	56
4.3 Inhibition de l'AdoHcy hydrolase par les esters nucléosidiques <b>5a-b</b> et <b>6a-b</b> : Cinétiques d'inhibition et détermination des paramètres cinétiques .....	58
4.4 Irréversibilité du processus d'inactivation et effet de protection par le substrat pour les composés <b>4a-b</b> , <b>5a-b</b> et <b>6a-b</b> .....	59
4.5 Etude du mécanisme d'inactivation.....	60
4.5.1 Interaction des inactivateurs <b>4a-b</b> , <b>5a-b</b> , <b>6a-b</b> avec le cofacteur NAD <sup>+</sup> associé à l'AdoHcy hydrolase.....	60
4.5.2 Détermination des masses moléculaires de l'AdoHcy hydrolase native et inactivée par (E)- <b>4a</b> ...	63
RESUME ET CONCLUSION.....	65

## CHAPITRE 3

### CONCEPTION ET EVALUATION DE NOUVEAUX INHIBITEURS

<b>COVALENTS DE L'AdoHcy HYDROLASE : CIBLAGE SPECIFIQUE DE LA CYSTEINE 195 DU SITE ACTIF.....</b>	<b>66</b>
1. ROLE DES CYSTEINES DANS L'ACTIVITE DE L'ADOHCY HYDROLASE.....	67
2. INHIBITION DE L'ADOHCY HYDROLASE PAR CIBLAGE DE LA CYSTEINE CYS-195 .....	71
3. SYNTHESSES.....	74
3.1 Synthèse de la 5'-désoxy-5'-thioadénosine 35.....	74
3.2 Synthèse du bis(5'-désoxy-5'-thioadénosyl) disulfure 37.....	75
3.3 Synthèse des 5'-S-alcanoylthio-5'-désoxyadénosines 38b-d.....	75
3.4 Synthèse des (5'S) et (5'R)-désoxy-5'-épithioadénosines 39a-b.....	76
4. INHIBITION DE L'ADOHCY HYDROLASE PAR LA SERIE DES THIONUCLEOSIDES 35-39.....	79
4.1 Cinétiques d'inhibition et détermination des paramètres cinétiques.....	79
5. ETUDE DU MECANISME D'INACTIVATION.....	82
5.1 Dosage du contenu en cofacteurs NAD <sup>+</sup> /NADH après interaction des inhibiteurs 35-39 avec l'AdoHcy hydrolase.....	82
5.2 Analyse du milieu réactionnel et recherche de métabolites après inactivation de l'AdoHcy hydrolase par 36 : mise en évidence de l'implication d'une réaction de transulfuration entre l'inhibiteur et une cystéine du site actif.....	83
5.3 Détermination des masses moléculaires de l'AdoHcy hydrolase native et inactivée par 35, 36, 37 et 39b.....	84
CONCLUSION.....	88

## CHAPITRE 4

### IDENTIFICATION ET SYNTHESE D'UNE NOUVELLE SERIE

<b>D'INHIBITEURS DE L'AdoHcy HYDROLASE « TAILLES SUR MESURE » POUR LE SITE ACTIF DE L'ENZYME.....</b>	<b>89</b>
1. INTRODUCTION.....	90
2. CONCEPTION DE NOUVEAUX INHIBITEURS : ETUDES DE MODELES DERIVES DE LA D-ERITADENINE.....	92
3. MODELISATION DES SECONUCLEOSIDES 63, 64 ET 65 DANS LE SITE CATALYTIQUE DE L'ADOHCY HYDROLASE.....	95

3.1 Protocole utilisé.....	95
3.2 Validation de la méthode de modélisation.....	97
3.3 Mode de binding des seconucléosides <b>63a-d</b> et <b>65a-d</b> dans la forme fermée de l'AdoHcy hydrolase .....	97
<b>4. SYNTHESSES.....</b>	<b>102</b>
4.1 Synthèse de l'acide 4-(adén-9-yl)-(3S)-amino-(2R)-hydroxybutyrique <b>63d</b> .....	102
4.1.1 Dérivatisation de la L-sérine.....	103
4.1.2 Préparation des aminoalcools .....	103
4.2 Synthèse du (1R,2S)-3-(adén-9-yl)-2-amino-1-(thiazol-2-yl)propan-1-ol <b>64d</b> .....	105
4.3 Synthèse de l'acide 4-(adén-9-yl)-(3S)-amino-(2S)-hydroxybutyrique <b>63c</b> .....	105
4.4 Synthèse du 1,2-di-(N <sup>o</sup> -adényl) éthane <b>68c</b> .....	107
<b>5. RESULTATS.....</b>	<b>108</b>
5.1 Interaction de <b>63d</b> et <b>64d</b> avec l'AdoHcy hydrolase.....	108
5.2 Cinétique d'inhibition du composé <b>68c</b> .....	108
<b>6. CONCLUSION.....</b>	<b>110</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>114</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>126</b>
INDICATIONS GENERALES .....	127
ENZYMOLOGIE.....	131
CHIMIE.....	145

## ABREVIATIONS ET NOTATIONS

AcOH	Acide Acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ado	Adénosine
AdoHcy	<i>S</i> -Adénosyl-L-Homocystéine
AdoMet	<i>S</i> -Adénosyl-L-Méthionine
ARN	Acide ribonucléique
ARN <sub>m</sub>	Acide ribonucléique messenger
BHMT	Bétaïne Homocystéine Méthyl Transférase
BSA	Bovine Serum Albumine
CCM	Chromatographie sur couche mince
Da	Dalton
DCC	1,3-dicyclohexycarbodiimide
DEA	D-éritadénine
DEAE	Diethylaminoethyl
DHCaA	(1'R,2'S,3'R)-9-(2',3'-dihydroxycyclopentan-1'-yl) adénine
DHCeA	(1'R,2'S,3'R)-9-(2',3'-dihydroxycyclopentan-4'-ényl) adénine
DMF	Diméthylformamide
DO	Densité optique
dpm	Désintégration par minute
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)
DTT	Dithiothréitol
EDCI	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide hydrochloride
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
ESI-MS	Electrospray Ionization – Mass Spectrometry
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FSBA	5'- <i>p</i> -fluorosulfonylbenzoyladénosine
Hcy	Homocystéine
HOBT	1-hydroxybenzotriazole hydrate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-galactopyranoside

$K_i$	Constante d'affinité
$k_{inact}$	Constante d'inactivation apparente
LDL	Low Density Lipoprotein
NepA	Neplanocine A
Rdt	Rendement
THF	Tetrahydrofuranne
ZDDFA	(Z)-4',5'-didéhydro-5'-désoxy-5'-fluoroadénosine

# **INTRODUCTION GENERALE**

En médecine, l'utilisation d'agents antiviraux à large spectre d'activité présente de nombreux avantages pour le traitement précoce des infections virales. Chez les patients qui présentent les symptômes d'une infection virale aiguë, une chimiothérapie antivirale doit être appliquée au plus vite. Cependant, il n'est pas toujours possible à l'aide du seul diagnostic clinique de pouvoir identifier le virus pathogène impliqué ni de prescrire, avant son identification au laboratoire, un traitement antiviral spécifique lorsqu'il existe. Pour ces raisons, la recherche d'agents antiviraux à large spectre reste un problème d'actualité dont l'importance est souvent soulignée dans le monde médical.

La connaissance du mécanisme de réplication virale est à la base de toutes les stratégies développées en chimiothérapie antivirale. Quelle que soit leur famille, les virus ne peuvent se répliquer sans l'aide de la cellule hôte et dépendent en partie des enzymes cellulaires pour exprimer les activités métaboliques nécessaires à leur développement.

Les cycles de réplication virale des virus à **ADN** et des rétrovirus (**ARN**) au sein d'une cellule sont différents mais ont en commun des étapes essentielles en particulier la traduction du génome viral en nouvelles protéines. Dans cette étape, la méthylation de l'extrémité 5' de l'**ARN<sub>m</sub>** viral est indispensable à sa bonne fixation sur le ribosome cellulaire pour sa traduction en protéines nécessaires à sa maturation.

Les transméthylases impliquées dans ce dernier processus comme toutes les réactions de transméthylations biologiques **AdoMet** dépendantes sont toutes sous la dépendance de la concentration cellulaire en *S*-adenosyl-L-homocystéine (**AdoHcy**). Il en résulte que l'inhibition de l'**AdoHcy** hydrolase, la seule enzyme qui métabolise ce nucléoside, et la recherche d'inhibiteurs spécifiques et performants de cette enzyme sont considérées depuis plus de 15 ans comme une stratégie thérapeutique de choix pour arrêter la maturation des virus à **ADN** et **ARN**.

L'intérêt de l'**AdoHcy** hydrolase ne s'arrête pas là. En raison de son rôle central dans la régulation des réactions de méthylations biologiques, l'**AdoHcy** hydrolase a également été sélectionnée plus récemment comme cible thérapeutique pour d'autres recherches médicales :

l'immunosuppression, l'anti-inflammation et l'hyperhomocystéinémie responsable d'accidents cardio-vasculaires.

Ces différentes considérations justifient le travail effectué dans cette thèse qui a été consacrée à :

- La conception et la synthèse de nouvelles séries d'inhibiteurs de l'**AdoHcy** hydrolase : inhibiteurs irréversibles et inhibiteurs compétitifs de grande affinité.
- L'évaluation de leur pouvoir inhibiteur sur l'activité de l'enzyme et l'étude de leur mode d'action.

L'évaluation de leurs propriétés antivirales a été confiée au laboratoire du professeur Erick De Clercq à Louvain et les résultats ne seront pas présentés dans cette thèse.

## Chapitre 1

# **LA S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEINE HYDROLASE : UNE CIBLE PHARMACOLOGIQUE**

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous avons rassemblé les données récentes de la littérature concernant :

- Les propriétés de la *S*-adénosyl-L-homocystéine hydrolase,
- Le rôle de la *S*-adénosyl-L-homocystéine hydrolase dans la régulation des réactions de méthylations biologiques **AdoMet** dépendantes,
- Les implications des inhibiteurs de la *S*-adénosyl-L-homocystéine hydrolase dans le processus de réplication virale, dans la modulation de la réponse immunitaire, dans le contrôle de l'hyperhomocystéinémie et dans la prolifération de *Plasmodium falciparum*, agent responsable de la malaria.

Ces données justifieront l'intérêt de l'**AdoHcy** hydrolase comme cible pharmacologique. La description du mécanisme d'action de l'enzyme ainsi que le rappel sur les avancées récentes concernant la structure de l'**AdoHcy** hydrolase serviront à la discussion des différentes stratégies développées pour provoquer l'inhibition de l'enzyme.

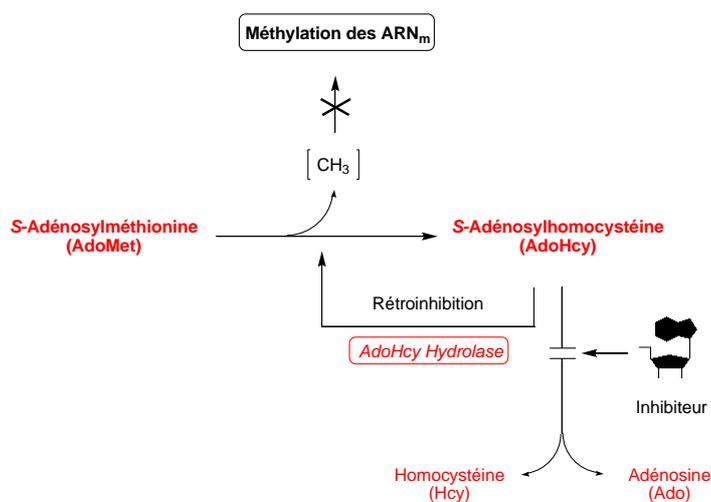
## 1. ROLES BIOLOGIQUES DE L'ADOHCY ET DE L'ADOHCY HYDROLASE

La *S*-Adénosyl-L-homocystéine hydrolase est une enzyme impliquée, chez les eucaryotes, dans le cycle de la méthionine, illustré ci contre (Figure 1). Toutes les réactions de méthylations biologiques *S*-Adénosyl-méthionine (**AdoMet**) dépendantes conduisent à la formation de la *S*-Adénosyl homocystéine (**AdoHcy**).

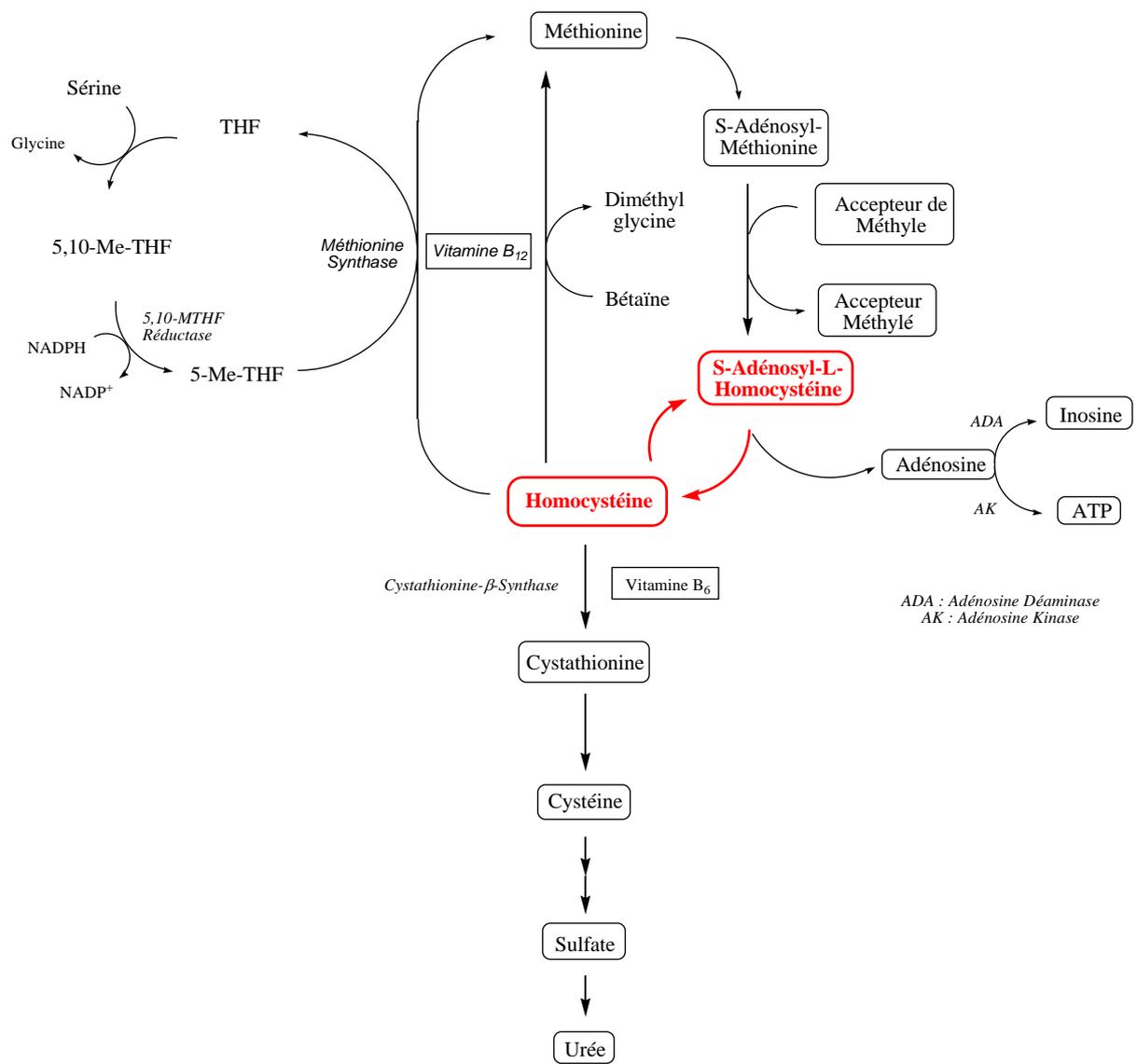
Dans la cellule, ces réactions de méthylations biologiques sont nombreuses et assurent un grand nombre de fonctions essentielles telles que la biosynthèse et le métabolisme des catécholamines, histamines et sérotonine<sup>[1-3]</sup> ainsi que la méthylation des acides nucléiques **ARN** et **ADN** et celles des phospholipides et protéines<sup>[4]</sup>.

Une propriété importante de l'**AdoHcy** est sa bonne affinité pour les transméthylases qui la génèrent<sup>[5]</sup>. Son rôle d'inhibiteur de ces enzymes et sa participation directe à la régulation des transméthylases sont maintenant bien établis. Pour maintenir le potentiel de méthylation *in vivo* l'**AdoHcy** doit être dégradée en continu. Cette dégradation en homocystéine et adénosine est assurée par l'**AdoHcy** hydrolase.

L'inhibition de cette enzyme, qui conduit à une accumulation intracellulaire de l'**AdoHcy**, s'est très vite révélée comme un bon moyen pour moduler ou stopper l'activité des transméthylases dont celles qui sont impliquées dans les processus biochimiques ou biologiques d'intérêts thérapeutiques comme l'illustre le schéma ci-dessous.



**Schéma 1 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'AdoHcy hydrolase sur l'activité des transméthylases AdoMet dépendantes.**



**Figure 1 : Cycle de la Méthionine**

## 1.1 Ciblage de l'AdoHcy hydrolase pour la recherche d'agents antiviraux

Les avancées récentes dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis l'élucidation du mécanisme de la réplication virale. L'identification des différentes étapes nécessaires à la maturation du virus est à la base des différentes stratégies antivirales développées aujourd'hui.

Tous les agents qui peuvent interférer avec les enzymes impliquées dans l'une ou l'autre de ces étapes principales, à savoir :

1. Absorption du virus
2. Pénétration du virus dans la membrane cellulaire
3. Réplication du génome viral
4. Méthylation de l'ARN<sub>m</sub> viral, « capping »
5. Traduction de l'ARN<sub>m</sub> viral en protéine
6. Assemblage du nouveau virus
7. Largage hors de la cellule

sont des candidats potentiels pour une chimiothérapie antivirale.

La méthylation de l'extrémité 5' de l'ARN<sub>m</sub> viral est indispensable à la fixation sur le ribosome cellulaire pour sa traduction en protéine. Cette méthylation concerne les positions N<sup>7</sup> de la guanine et l'hydroxyle en position C-2' de l'avant dernier nucléoside de l'ARN<sub>m</sub> (Schéma 2).

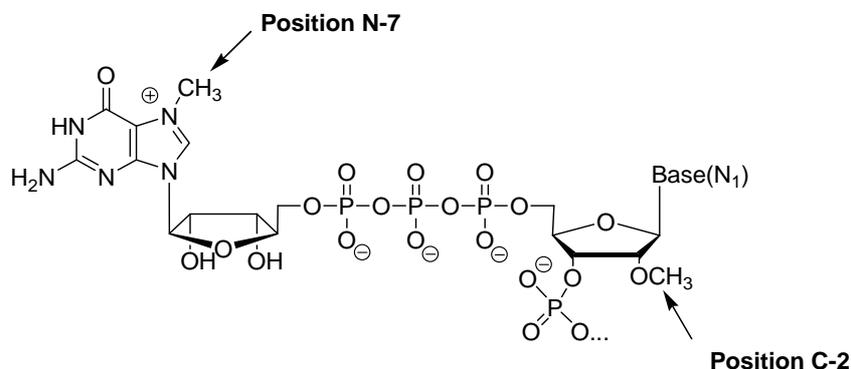


Schéma 2

Deux méthylases, les guanosine-N<sup>7</sup>-méthyl transférase et la nucléoside-2'-méthyl transférase (cellulaires ou virales selon la nature du virus) sont impliquées dans ce processus<sup>[6, 7]</sup>. La perturbation de leur activité via l'inhibition de l'**AdoHcy** hydrolase a été confirmée<sup>[8]</sup>. Cet évènement conduit à une diminution de la production d'**ARN<sub>m</sub>** viraux matures et ralentit le processus de réplication virale.

De fait, les inhibiteurs de l'**AdoHcy** hydrolase possèdent tous des propriétés antivirales. Leur performance en tant qu'agents antiviraux et leur cytotoxicité seront discutées à la fin de ce chapitre.

## 1.2. Ciblage de l'**AdoHcy** hydrolase pour la recherche d'agents hypohomocystéinémiant

L'élévation du taux d'homocystéine dans le plasma sanguin (hyperhomocystéinémie) est bien connue comme étant un facteur de risques pour les maladies cardiovasculaires<sup>[9]</sup>.

Des études cliniques récentes ont montré que chaque accroissement du taux d'homocystéine de 5  $\mu\text{M}$  dans le sang accroît le risque d'accidents coronariens de 60 % chez les hommes et 80 % chez les femmes<sup>[10]</sup>. Du seul point de vue facteur de risque, l'hyperhomocystéinémie est équivalent à celui provoqué par l'élévation du cholestérol **LDL** (athérogène). L'hyperhomocystéinémie est provoquée essentiellement par l'altération des gènes qui codent pour les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine, par contre le mécanisme intime par lequel l'élévation de l'homocystéinémie provoque des dommages irréversibles au niveau des cellules endothéliales n'est pas encore élucidé.

Chez les eucaryotes, la seule voie de biosynthèse de l'homocystéine (**Hcy**) est l'hydrolyse de l'**AdoHcy** par l'**AdoHcy** hydrolase. L'homocystéine résultant de cette bioconversion est ensuite soit recyclée en méthionine, via un processus de reméthylation catalysée par la bétaine transméthylase (**BHMT**) ou en cystéine via la  $\beta$ -cystathionase ou bien exportée dans le plasma (Schéma 3).

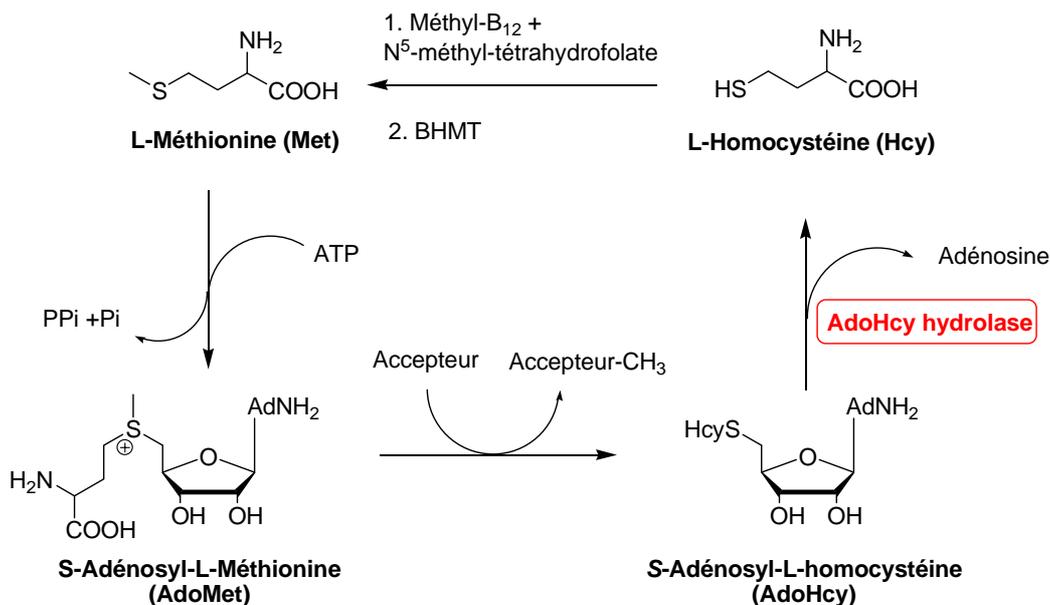


Schéma 3

Jusqu'à présent, les tentatives de palier au déficit de la **BHMT** ou  $\beta$ -cystathionase chez les patients atteints d'hyperhomocystéinémie aiguë ne se sont pas révélées très efficaces<sup>[10]</sup>.

Par contre, des études récentes ont montré que les inhibiteurs performants de l'**AdoHcy** hydrolase étaient capables de rétablir un taux normal d'homocystéine chez des souris chez lesquelles on a provoqué une hyperhomocystéinémie. Ces études se poursuivent actuellement pour démontrer que les inhibiteurs de l'**AdoHcy** hydrolase peuvent être utilisés dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires.

### 1.3. L'AdoHcy hydrolase, cible pour la recherche de nouveaux agents antipaludiques

Le gène codant pour l'**AdoHcy** hydrolase de *Plasmodium falciparum* dans sa phase érythrocytaire a été identifié récemment<sup>[11]</sup>. Ceci a permis la construction d'un plasmide codant pour cette enzyme qui a été surexprimé chez *E. coli*. L'**AdoHcy** hydrolase recombinante résultante a été caractérisée<sup>[11]</sup>. Le poids moléculaire (56 KDa) de chaque sous unité est différent de celui de l'enzyme des mammifères (45 kDa).

Bien que la séquence en aminoacides de cette nouvelle isoforme de l'enzyme présente des analogies avec celle des mammifères (domaine peptidique impliqué dans le binding du cofacteur), de nombreux autres domaines ne sont pas conservés.

Ces différences (composition en acides aminés, comportement cinétique vis-à-vis d'inhibiteurs identifiés) pourraient être exploitées dans un but thérapeutique pour lutter contre *P. falciparum*, l'agent responsable de la malaria.

Provoquer l'inhibition des réactions de méthylations indispensables à la prolifération du parasite via l'inhibition de l'**AdoHcy** hydrolase de *P. falciparum* a retenu l'attention de plusieurs laboratoires<sup>[12-14]</sup>.

Les premiers résultats concernant cette approche thérapeutique publiés par Mc Carthy et collaborateurs (Institut Merrel Dow – HSA), par l'équipe de Borchardt et des résultats récents de notre laboratoire ont déjà montré la capacité du 4',5'-éno-5'-fluoroadénosine<sup>[15]</sup>, de la néplanocine et ses dérivés<sup>[12]</sup> et des *S*-éthynyl, *S*-allénylthioadénosine<sup>[16]</sup> à inhiber efficacement *in vitro* la croissance de souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine. Cette approche mérite d'être approfondie en tenant compte des caractéristiques de l'**AdoHcy** hydrolase de *P. falciparum* pour élaborer des inhibiteurs spécifiques de cette isoforme de l'enzyme.

#### **1.4. L'AdoHcy hydrolase, cible pour la recherche de nouveaux agents immunosuppresseurs**

Des études *in vitro* ont montré que des inhibiteurs de l'**AdoHcy** hydrolase pouvaient inhiber sélectivement l'activation des lymphocytes **T** (ou cellules **T**), responsables de l'immunité cellulaire, sans affecter l'immunité humorale via les lymphocytes **B** (ou cellules **B**). Plusieurs inhibiteurs compétitifs puissants de l'**AdoHcy** hydrolase de la famille des carbonucléosides ont été brevetés comme agents immunosuppresseurs<sup>[17, 18]</sup>. Le mode d'action de ces inhibiteurs sur le système immunitaire cellulaire étant différent de celui de la cyclosporine, ils ont été utilisés avec succès en synergie avec ce dernier immunosuppresseur de référence.

Le développement d'un tel programme de recherche médicinale nécessite de pouvoir disposer d'inhibiteurs nouveaux de l'**AdoHcy** hydrolase performants et non toxiques. Un des moyens pour réduire la cytotoxicité des inhibiteurs de l'**AdoHcy** hydrolase sera discuté dans le troisième chapitre de ce manuscrit.

## 2. LES INHIBITEURS DE L'AdoHcy HYDROLASE : PROPRIETES ET MODE D'ACTION

L'évolution dans la conception et la recherche d'inhibiteurs de l'AdoHcy hydrolase a suivi pas à pas les avancées faites ces dix dernières années concernant la « biochimie » de l'enzyme : l'élucidation de son mécanisme d'action et l'identification des résidus d'acides aminés qui participent à cette catalyse.

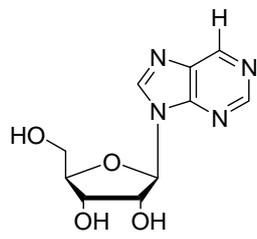
La première génération de ces inhibiteurs est constituée essentiellement d'analogues structuraux de l'adénosine ou de la S-adénosyl-L-homocystéine modifiés au niveau de la base purique ou du groupe ribosyle.

### 2.1 Les inhibiteurs réversibles

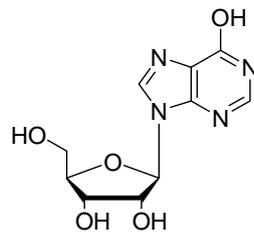
Une grande variété de nucléosides naturels ou synthétiques a été testée sur l'activité de l'AdoHcy hydrolase. A titre d'exemple, la structure d'une série de ces inhibiteurs nucléosidiques qui n'est pas exhaustive est illustrée sur la Figure 2.

Dans la série d'inhibiteurs réversibles identifiés à ce jour, des analogues acycliques et carbocycliques de l'adénosine tels que les 3-déaza-adénosine, l'aristéromycine et la D-éritadénine se sont révélés être des inhibiteurs compétitifs performants de l'enzyme (Figure 3) avec des  $K_i$  variant de 6 nM à 4  $\mu$ M. Ces inhibiteurs possèdent des affinités pour le site actif de l'enzyme bien plus grande que les substrats naturels eux-mêmes ( $K_M(\text{Ado}) \approx 10 \mu\text{M}$  ;  $K_M(\text{AdoHcy}) \approx 70 \mu\text{M}$ ).

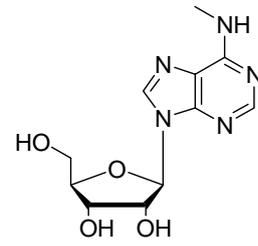
Une étude systématique de leurs propriétés antivirales a été effectuée par E. De Clercq qui a établi une corrélation directe entre le pouvoir inhibiteur de ces composés sur l'activité de l'AdoHcy hydrolase et leurs propriétés antivirales<sup>[8, 19]</sup>.



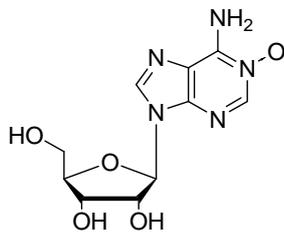
**néburaline**



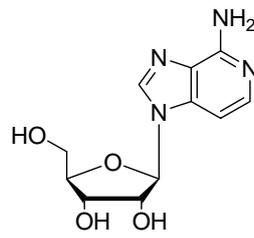
**inosine**



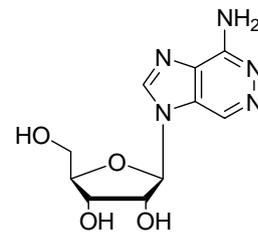
**N<sup>6</sup>-méthyladénosine**



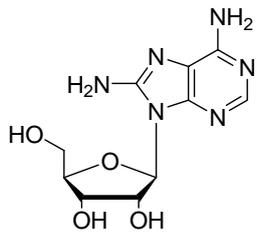
**adénosine N<sup>1</sup>-oxyle**



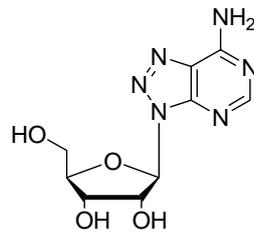
**3-déaza-adénosine**



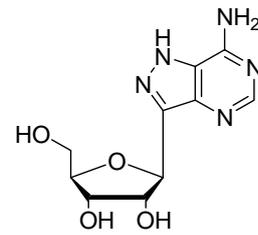
**2-aza-3-déaza-adénosine**



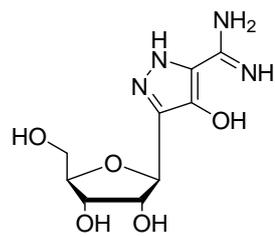
**8-aminoadénosine**



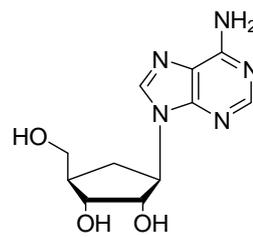
**8-aza-adénosine**



**formycine**



**pyrazomycine**



**aristéromycine**

**Figure 2**

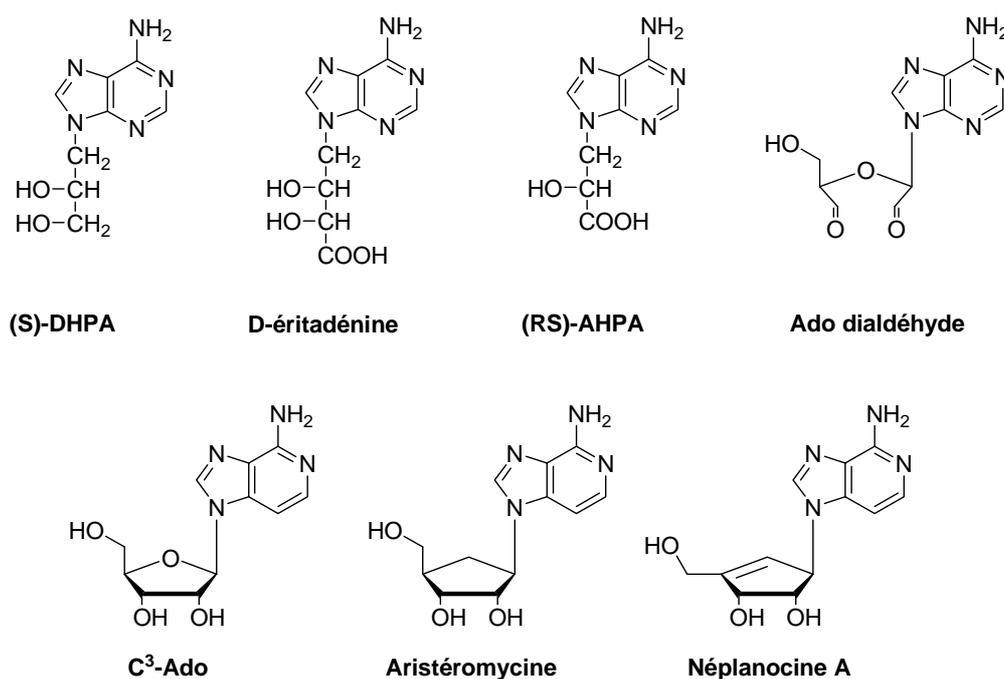


Figure 3

Le spectre d'activité de ces inhibiteurs est très large, il couvre des virus à **ADN** (cytomégalovirus, peste porcine, varicelle)<sup>[20, 21]</sup> et à **ARN** (virus de la grippe, oreillons, rougeole)<sup>[22-24]</sup>. Il faut souligner que certains d'entre eux sont les seuls à pouvoir inhiber la réplication des filovirus Ebola et Marburg<sup>[25]</sup> à l'origine de diarrhées hémorragiques chez les personnes infectées et qui sont responsables d'une mortalité importante en Afrique.

## 2.2 Inhibiteurs irréversibles

### 2.2.1 Inhibiteurs de type I

La néplanocine A (**Nep A**, Figure 3) a été le premier inactivateur de l'**AdoHcy** hydrolase à avoir été identifié et son mode d'action a fait l'objet d'une étude approfondie<sup>[26]</sup>. Borchardt et collaborateurs ont démontré que ce carbonucléoside, qui provoque une inhibition de l'**AdoHcy** hydrolase dépendante du temps et de la concentration en inhibiteur, était substrat de l'étape « oxydative » du cycle catalytique de l'enzyme. Son interaction avec l'**AdoHcy** hydrolase conduit au carbonucléoside correspondant oxydé en C-3' (3'-oxo-**Nep A**) et a pour conséquence la transformation du complexe **Enzyme-NAD<sup>+</sup>** sous sa forme **Enzyme-NADH**.

Cette forme réduite de l'enzyme est inactive puisqu'elle ne permet plus l'initiation du processus catalytique tel qu'il a été décrit par Palmer et Abeles<sup>[27]</sup>.

L'irréversibilité du processus résulte de la séquestration du produit de bioconversion dans le site actif de l'enzyme rendu possible par le changement conformationnel de la protéine induit par la réduction du cofacteur (Schéma 4).

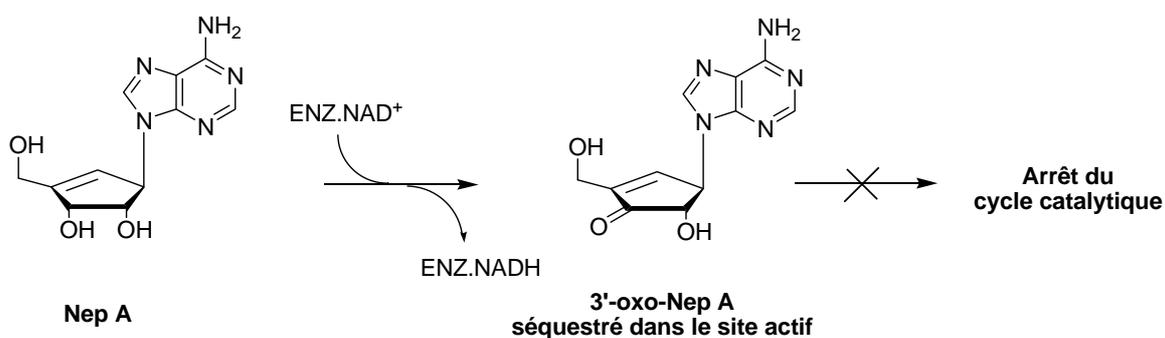


Schéma 4

Les inhibiteurs qui opèrent de cette façon en arrêtant à mi-chemin le cycle catalytique de l'**AdoHcy** hydrolase ont été désigné par Borchardt « inhibiteurs de **type I** ».

La **Nep A** possède des activités antivirales remarquables mais malheureusement une cytotoxicité prononcée associée principalement à son interaction avec des kinases cellulaires qui la transforment en nucléotide correspondant toxique. D'autres inhibiteurs analogues de la **Nep A** ont été synthétisés : les (1'R,2'S,3'R)-9-(2',3'-dihydroxycyclopentan-1-yl) adénine et (1'R,2'S,3'R)-9-(2',3'-dihydroxy cyclopenta-4-ényl) adénine ainsi que leur analogues 3-déaza correspondants (Schéma 5).

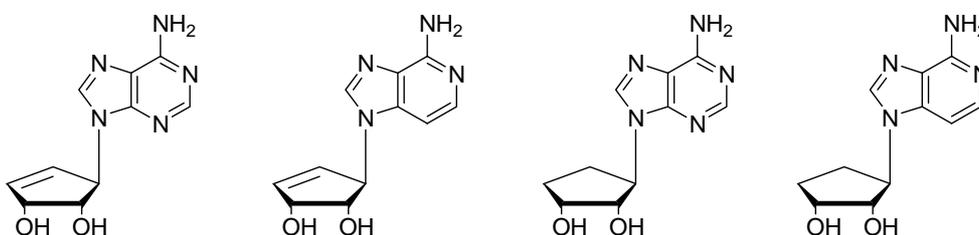


Schéma 5

Tous ces pseudonucléosides inactivent l'**AdoHcy** hydrolase par un mécanisme de **type I**. La suppression du groupe 5'-hydroxyméthyle dans la structure de la **Nep A** supprime la possibilité de métabolisme de ces composés par l'adénosine désaminase et les kinases responsables de la phosphorylation en 5' observée pour la **Nep A**<sup>[28]</sup>. Ils conservent leurs propriétés antivirales mais leur toxicité est considérablement diminuée. Ces derniers inhibiteurs ont été brevetés en tant qu'agents antiviraux<sup>[29]</sup>.

Au laboratoire, la 4'-fluoroadénosine a été synthétisée et son mécanisme d'action étudié<sup>[30]</sup>. Ce fluoronucléoside induit par un mécanisme semblable (**type I**) l'inactivation irréversible de l'**AdoHcy** hydrolase.

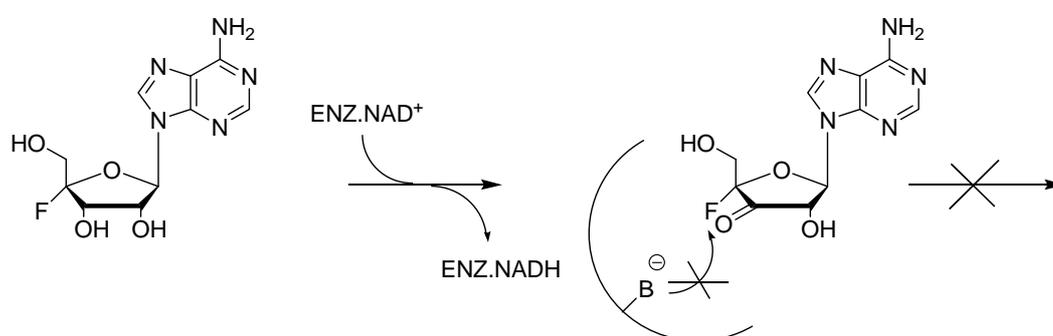


Schéma 6

### 2.2.2 Les inhibiteurs irréversibles covalents de type II

Les inhibiteurs irréversibles covalents qui utilisent dans leur mode d'action l'acte catalytique de l'enzyme pour provoquer son inactivation répondent au mécanisme des substrats suicides décrit par Bloch, découvreur de ce concept<sup>[31, 32]</sup>. Le processus catalytique de chaque enzyme étant unique, cette inactivation se caractérise par sa grande spécificité.

Il a longtemps été admis que le mécanisme catalytique de l'**AdoHcy** hydrolase décrit par Palmer et Abeles<sup>[27]</sup> opérait d'une façon séquentielle et que l'oxydation du groupe hydroxyle en C-3' (« activité oxydative ») était un préalable à l'addition d'une molécule d'eau (« activité hydrolytique ») sur la double liaison conjuguée de l'énone intermédiaire (Schéma 15, page 29). Récemment Borchardt et collaborateurs ont montré que ces deux activités catalytiques de l'enzyme peuvent être indépendantes l'une de l'autre. Le mode d'inactivation du (Z)-4',5'-

didéhydro-5'-désoxy-5'-fluoroadénosine ou **ZDDFA**<sup>[33]</sup> élucidé par ces auteurs<sup>[34]</sup> en est la preuve (Schéma 7).

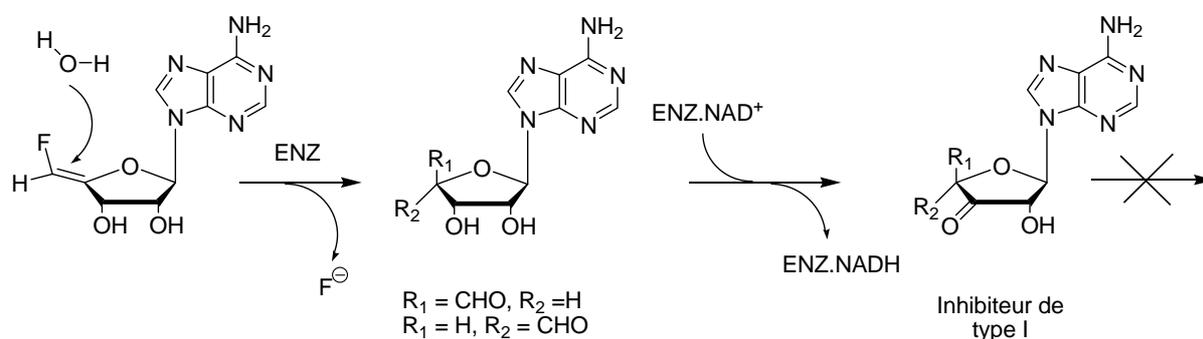


Schéma 7

L'enzyme catalyse l'attaque d'une molécule d'eau séquestrée dans le site catalytique et le **ZDDFA** est transformé en aldéhyde correspondant avec libération d'ions fluorures. La formation de cet intermédiaire ainsi que celle de son isomère (résultat d'une épimérisation *in situ*) ont été identifiés pendant le processus d'inactivation de l'enzyme. L'inactivation de l'enzyme par le **ZDDFA** résulte en fait de l'interaction de ces deux aldéhydes avec « l'étape oxydative » de l'enzyme et la transformation de celle-ci sous sa forme réduite **Enz-NADH**. Le **ZDDFA** se comporte comme un proinhibiteur de **type I** pour l'**AdoHcy** hydrolase.

*A partir de ces données, il est devenu possible d'envisager d'utiliser « l'activité oxydative » et/ou « l'activité hydrolytique » de l'enzyme pour tenter de générer sur des pseudosubstrats des sites électrophiles capables de les fixer de façon covalente dans le site actif ou de pouvoir libérer des espèces très réactives pouvant modifier des résidus nucléophiles du site actif indispensables à la catalyse.*

Les inactivateurs de ce type (vrais substrats suicides) ont été désignés par Borchardt comme inhibiteurs de **type II**. Une dizaine d'années d'efforts de recherche a été nécessaire avant de pouvoir synthétiser et identifier les premiers inhibiteurs de **type II**. Il n'existe que quelques exemples d'inhibiteurs de ce type publiés à ce jour et leur mode d'action est rapporté ci-après.

✓ *Inhibition de l'AdoHcy hydrolase par le 9-(5',6'-didésoxy-β-D-ribohex-5'-ynofuranosyl)-adénine*

Cet analogue acétylénique de l'adénosine, préparé et étudié par Parry<sup>[35, 36]</sup>, est le premier exemple d'inhibiteur de **type II** décrit qui exploite à la fois « l'activité oxydative » et l'étape concomitante de β-élimination pour activer l'inhibiteur sous forme d'un accepteur de Mickaël réactif (Schéma 8).

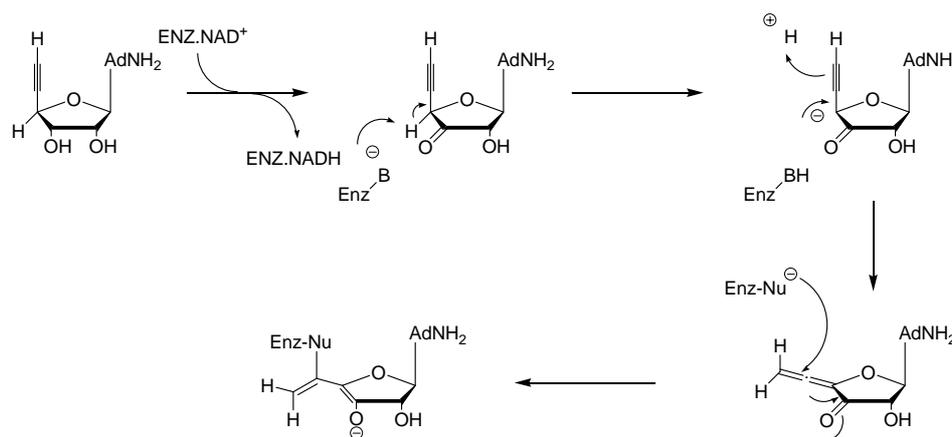


Schéma 8

Le nucléophile impliqué dans la formation de la liaison covalente n'a pas été identifié dans ces expériences.

L'analogue acétylénique porteur d'un atome d'iode en C-6' et décrit par Borchardt et collaborateurs fonctionne de la même façon<sup>[37]</sup> (Schéma 9).

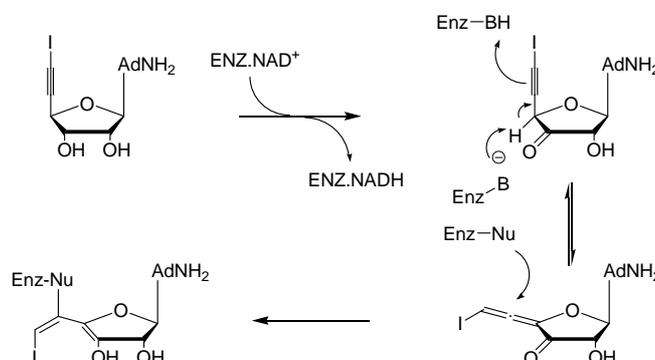


Schéma 9

✓ *Inhibition de l'AdoHcy hydrolase par les 6'-bromo-6'-fluorohomo adénosine<sup>[38]</sup> et 6'-chloro (ou bromo)-éthynyl adénosine<sup>[38, 39]</sup>.*

Ces deux exemples (Schéma 10 et Schéma 11) publiés par Borchardt sont remarquables dans la mesure où seule « l'activité hydrolytique » participe à l'activation de l'inhibiteur sous forme d'halogénures d'acides. Dans le premier exemple, l'arginine 196 a été identifiée comme étant le nucléophile responsable de la formation du complexe covalent.

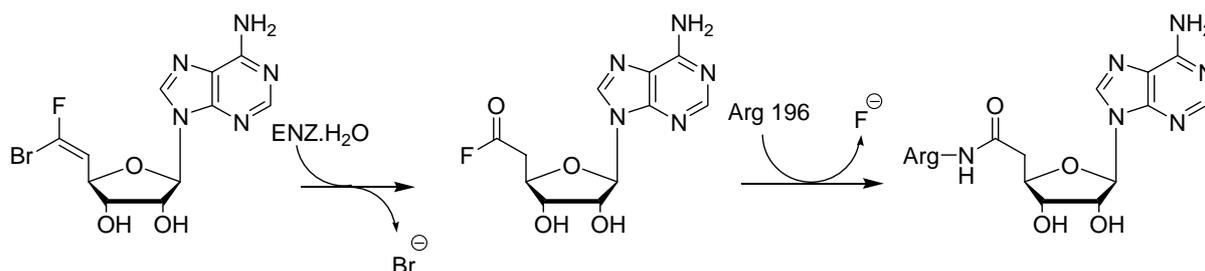


Schéma 10

Le mécanisme d'action des 6'-chloro (ou bromo)-éthynyl adénosine est similaire. Cette fois, la lysine 318 est impliquée dans le processus d'inactivation covalente.

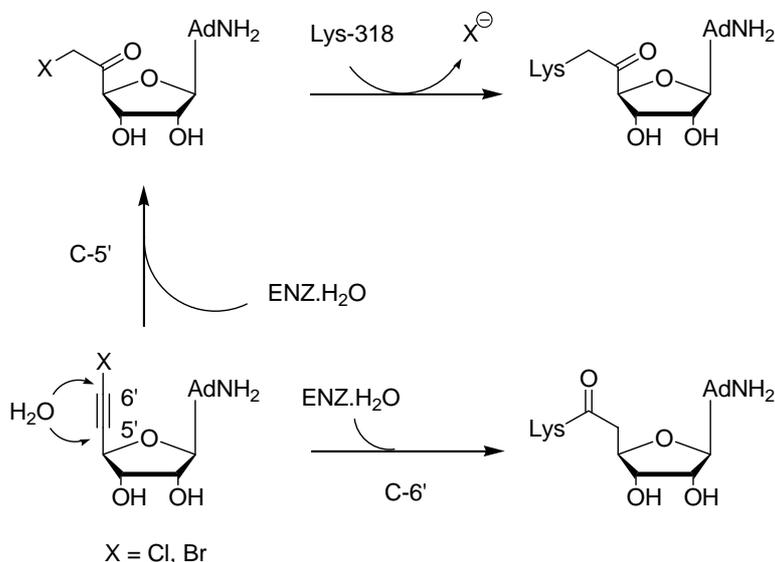


Schéma 11

Dans les deux cas, le contenu en cofacteurs  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  n'est pas modifié pendant le processus d'inactivation. Ce n'est pas le cas pour l'analogue iodé, pour lequel le mécanisme d'inactivation implique l'intervention des deux activités « oxydative » et « hydrolytique » de l'enzyme (Schéma 9).

La contribution de notre laboratoire à la découverte d'inhibiteurs de **type II** a également été importante.

✓ *Inhibition de l'AdoHcy hydrolase par la difluorométhylthioadénosine<sup>[40]</sup> et la 3'-désoxydifluorométhylthioadénosine<sup>[41]</sup>*

Guillerm et collaborateurs ont montré que l'interaction de la difluorométhyl (ou trifluorométhyl)thioadénosine avec la seule étape de  $\beta$ -élimination du processus catalytique de l'AdoHcy hydrolase conduit à la formation des ions difluorométhylthiolate ou trifluorométhylthiolate ( $\text{XF}_2\text{CS}^-$ ,  $\text{X} = \text{H}, \text{F}$ , Schéma 12). Ces deux espèces instables se décomposent spontanément dans le site actif sous forme de thioformyle ou de difluorures de thiocarbonyle. Ces deux espèces acylantes sont capables de neutraliser l'activité enzymatique à chaque turn over de l'enzyme par acylation de résidus nucléophiles impliqués dans la catalyse.

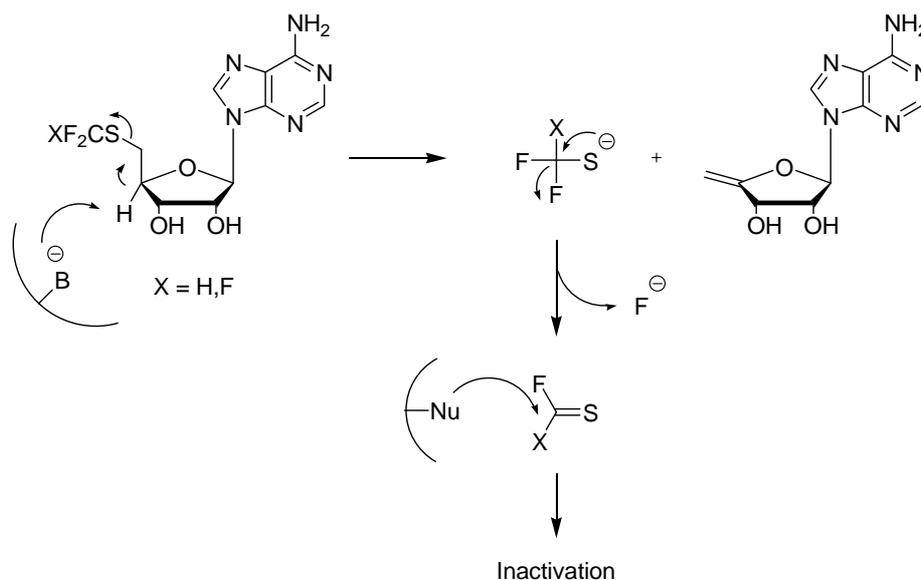


Schéma 12

La 3'-désoxy-difluorométhylthioadénosine quant à elle est activée par « l'activité hydrolytique » de l'enzyme et provoque l'inactivation de celle-ci via la formylthioadénosine intermédiairement formée<sup>[42]</sup>. Cet intermédiaire sert d'agent de formylation pour les résidus d'acides aminés participant à la catalyse et il n'est pas exclu dans le mécanisme proposé que le thiol résultant puisse aussi s'associer à une cystéine du site actif (Schéma 13).

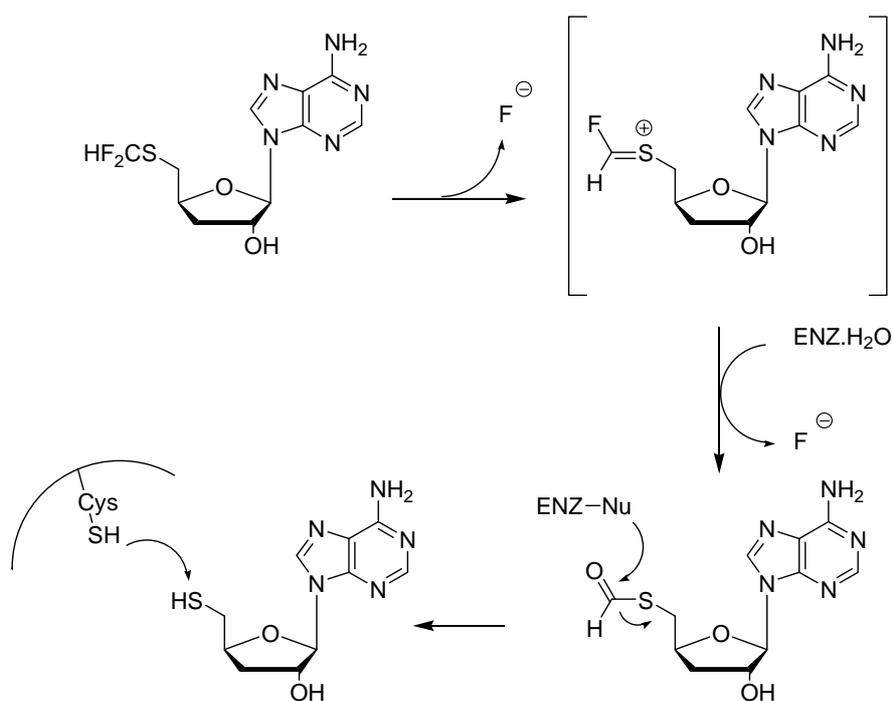


Schéma 13

✓ *Inhibition de l'AdoHcy hydrolase par la 5'-S-allényl-5'-thioadénosine<sup>[41]</sup>*

Guillerm et collaborateurs ont également démontré que ce thionucléoside était substrat de la seule « activité hydrolytique » de l'enzyme. Le thioester résultant de cette bioconversion sert d'agent acylant et modifie de façon covalente la tyrosine 430 de l'**AdoHcy** hydrolase recombinante de placenta humain (Schéma 14). La tyrosine 430 est un acide aminé essentiel pour le binding du cofacteur associé à chaque sous-unité de l'**AdoHcy** hydrolase.

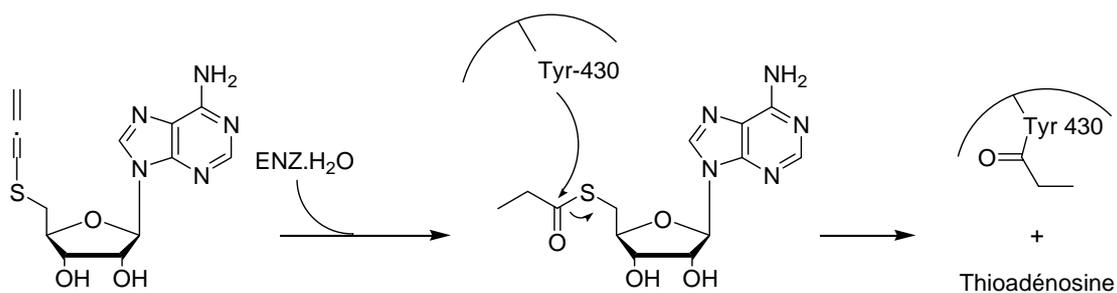


Schéma 14

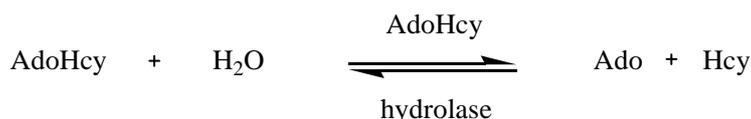
Ce résultat a démontré pour la première fois que la seule modification d'un aminoacide essentiel au binding du cofacteur  $\text{NAD}^+$  peut provoquer l'inactivation irréversible de l'enzyme.

Très récemment un mécanisme d'inactivation similaire a été mis en évidence au laboratoire avec d'autres thionucléosides analogues : les *S*-propynyl, *S*-éthynyl et *S*-cyano thioadénosines<sup>[43]</sup>.

### 3. L'AdoHcy HYDROLASE : MECANISME CATALYTIQUE ET STRUCTURES

L'activité de l'**AdoHcy** hydrolase a été mise en évidence pour la première fois par De La Haba et Cantoni<sup>[44]</sup>.

Dans la cellule, l'activité des transméthylases qui conduisent à la formation de l'**AdoHcy** est importante. Elle devrait conduire à la formation d'une quantité importante d'**AdoHcy**. Cependant la concentration intracellulaire de ce nucléoside reste faible. En catalysant sa bioconversion réversible en adénosine (**Ado**) et homocystéine (**Hcy**), l'**AdoHcy** hydrolase régule le taux intracellulaire de l'**AdoHcy** avec les conséquences déjà décrites sur les réactions de méthylation biologiques.



*In vitro*, la réaction est déplacée dans le sens de la synthèse qui est le processus énergétiquement favorisé ( $K_{\text{éq}} = 10^{-6}$  M). Par contre, *in vivo*, différents processus tels que la désamination de l'adénosine en inosine, la bioconversion de la L-homocystéine en cystathionine ou son recyclage en méthionine entraînent un équilibre dans le sens hydrolytique (Figure 1).

L'enzyme est spécifique des eucaryotes. Chez les mammifères, l'enzyme est ubiquitaire et est présente dans les tissus de nombreux organes. Son activité est particulièrement importante dans le foie<sup>[27, 45-47]</sup>, le rein et le placenta humain<sup>[48]</sup>. Elle a été identifiée chez l'eucaryote primitif le *Dictyostelium discoideum*<sup>[49]</sup> et très récemment chez deux protozoaires : *Leishmania donovani*<sup>[50, 51]</sup> et *Plasmodium falciparum*<sup>[52]</sup>.

### 3.1 Mécanisme catalytique

Bien avant que la structure de l'**AdoHcy** hydrolase ait été élucidée, Palmer et Abeles ont montré que l'enzyme des mammifères était essentiellement tétramérique. Chaque sous-unité de poids moléculaire estimé à 45 kDa est associée à un cofacteur  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  qui est essentiel à l'activité catalytique. L'association entre le cofacteur et l'apoenzyme est particulièrement forte puisque ce dernier ne peut pas être éliminé par simple dialyse. Sa dissociation de l'holoenzyme ne peut se faire que dans des conditions dénaturantes<sup>[34]</sup> (traitement par l'éthanol ou en milieu acide).

La réaction catalysée par la *S*-adénosyl-L-homocystéine hydrolase correspond formellement à l'hydrolyse d'une fonction thioether. La rupture de la liaison soufre-carbone étant difficilement envisageable de façon directe, pour provoquer cette réaction l'**AdoHcy** hydrolase utilise une stratégie complexe dont chaque étape a été précisée par Palmer et Abeles<sup>[27]</sup> (Schéma 15).

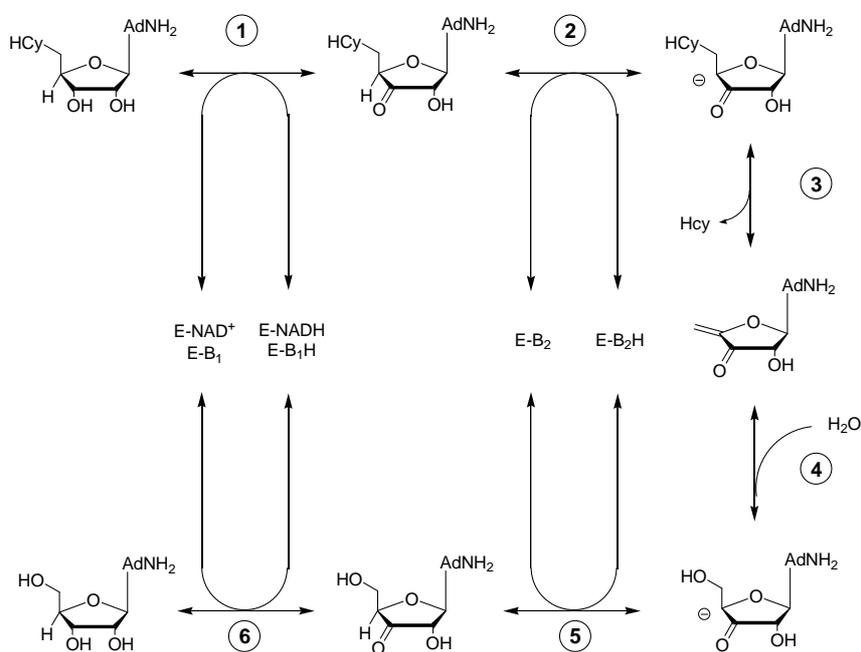


Schéma 15 : Mécanisme catalytique de l'**AdoHcy** hydrolase selon Palmer et Abeles<sup>[27]</sup>

Le processus est initié par le complexe **Enz-NAD<sup>+</sup>** qui catalyse l'oxydation de l'hydroxyle en C-3' (étape 1). L'enzyme se retrouve sous la forme réduite **Enz-NADH**. Une base du site

actif arrache le proton activé en position C-4' sur le dérivé 3'-oxo-**AdoHcy** formé (étape 2). Un processus d'élimination E<sub>1</sub> conduit à la formation de la 3'-oxo-4',5'-didéhydro-5'-désoxyadénosine (étape 3). L'addition 1-4 d'une molécule d'eau sur cet accepteur de Mickaël (étape 4) suivie d'une reprotonation de la position C-4' (étape 5) génère la 3'-oxoadénosine. Le complexe **Enz-NADH** assure en dernier lieu la réduction stéréosélective de cet intermédiaire en adénosine (étape 6). A la fin de ce cycle, l'enzyme qui est reconduite sous sa forme initiale **Enz-NAD<sup>+</sup>** peut initier un nouveau cycle catalytique.

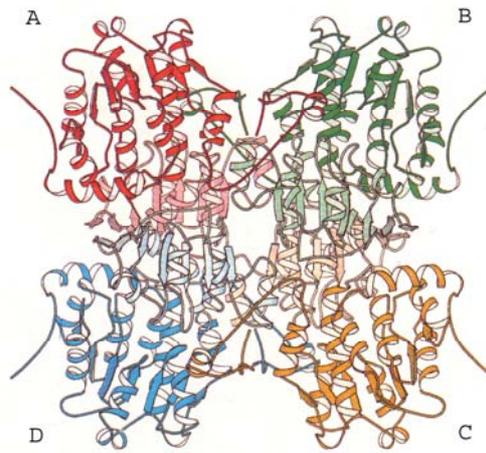
Comme le montre le Schéma 15, en plus de l'implication d'un processus de catalyse acide/base généralisée, l'**AdoHcy** hydrolase possède deux activités partielles principales : une « activité oxydative » (étape 1) et une « activité hydrolytique » (étape 4). La connaissance de ce mécanisme a été le facteur déterminant pour le démarrage d'une recherche rationnelle d'inhibiteurs spécifiques de l'**AdoHcy** hydrolase. En particulier, ces deux activités « oxydative » et « hydrolytique » ont été exploitées comme nous l'avons décrit précédemment pour provoquer l'activation des inhibiteurs irréversibles de l'enzyme.

La détermination de la structure cristallographique de l'enzyme résultant de travaux plus récents a non seulement permis de confirmer cette proposition mécanistique mais aussi d'identifier au niveau du site actif les résidus d'acides aminés qui participent à la catalyse.

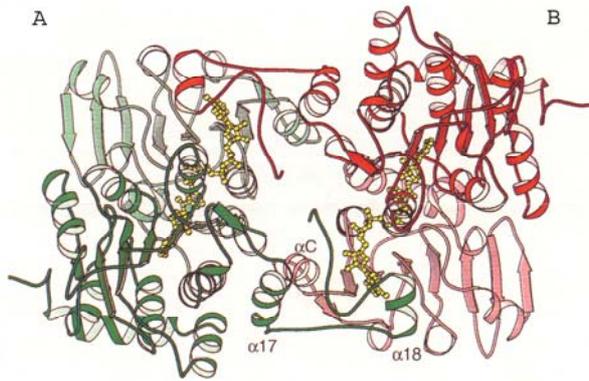
### 3.2 Structures de l'**AdoHcy** hydrolase

Les gènes codant pour l'**AdoHcy** hydrolase du foie de rat<sup>[53]</sup>, du placenta humain<sup>[54]</sup> et de *Dictyostelium discoideum*<sup>[55]</sup> ont été les premiers à être identifiés. La séquence en aminoacides de ces isoenzymes déduites de leur **ADN** présente des homologues remarquables (97 % d'homologie entre la structure primaire de l'**AdoHcy** du foie de rat et celle du placenta humain qui contient 432 aminoacides pour l'un et 431 pour l'autre).

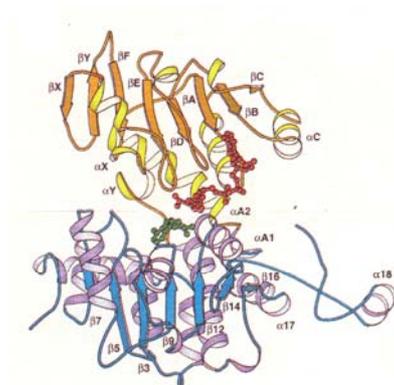
*Une différence notable existe cependant entre les séquences de l'enzyme des mammifères et celle du protozoaire Plasmodium falciparum qui a été identifiée récemment.*



**(A) Forme tétramérique.**



**(B) Forme dimérique illustrant l'implication du domaine C terminal dans la stabilisation du cofacteur NAD+.**



**(C) Forme monomérique (forme ouverte).**

**Figure 4 : Structure de l'AdoHcy hydrolase recombinante de placenta humain selon Turner et collaborateurs<sup>[56]</sup>.**

L'identification du gène de l'**AdoHcy** hydrolase a permis la mise en œuvre des premières expériences de mutagenèses dirigées<sup>[57-59]</sup> et la recherche et l'identification des aminoacides essentiels à l'activité de l'**AdoHcy** hydrolase.

Toutes les enzymes clonées possèdent un domaine de binding de **NAD<sup>+</sup>** conservé. Il occupe les positions 213-244 pour l'**AdoHcy** hydrolyse du placenta humain et possède le motif G<sup>219</sup>YGDVGR<sup>225</sup> qui est caractéristique de l'enchaînement feuillet  $\beta$  / hélice  $\alpha$ <sup>[58]</sup>.

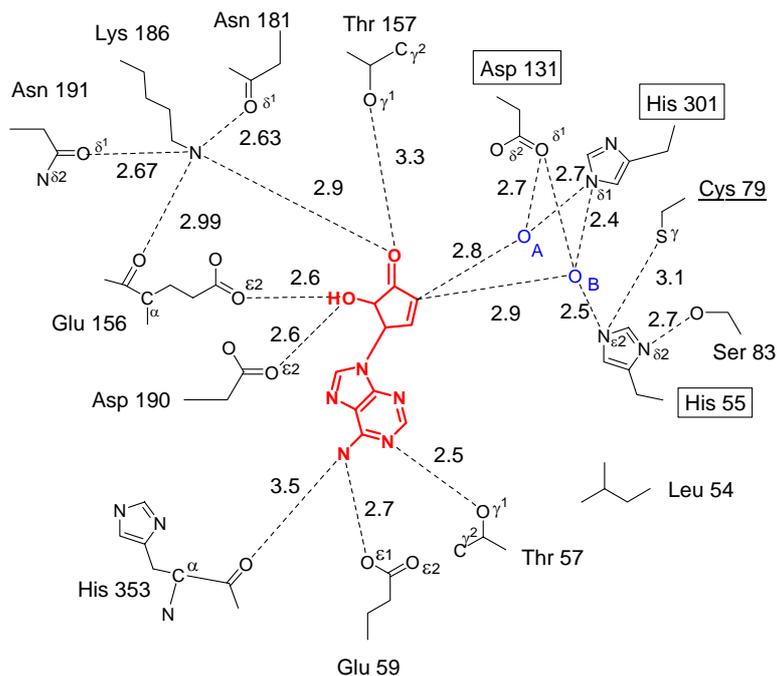
Le remplacement par mutagenèse dirigée de chacune des glycines Gly-219, Gly-221 et Gly-240 par une valine conduit à trois protéines inactives qui perdent leur capacité à fixer le cofacteur **NAD<sup>+</sup>** et à s'associer en tétramère<sup>[58]</sup>.

L'isolement des gènes structuraux codant pour l'**AdoHcy** hydrolase du foie de rat et du placenta humain a rendu possible la construction des plasmides **pUCSAH**<sup>[58]</sup> et **pPROKcd20**<sup>[60]</sup> et la surexpression des deux isoenzymes correspondantes chez *E. coli*. La production de quantité importante des enzymes recombinantes correspondantes a permis leur cristallisation.

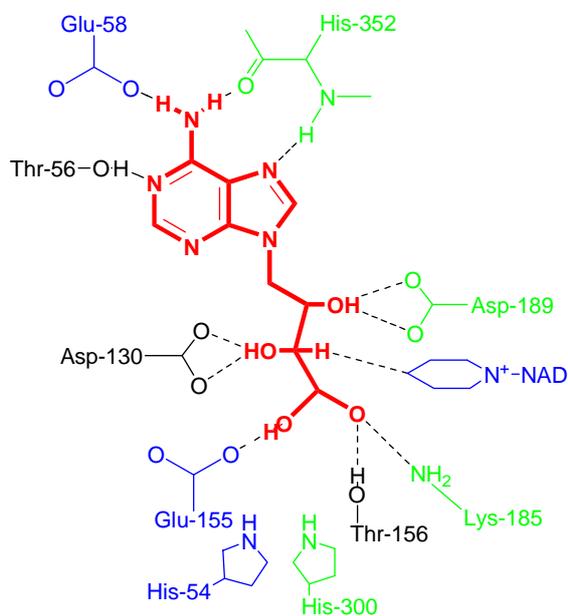
Deux études cristallographiques par diffraction de rayons X ont été publiées récemment. Elles concernent l'**AdoHcy** hydrolase du placenta humain sous sa forme réduite **Enz-NADH** cristallisée en présence d'un inhibiteur de **type I**, le **DHCaA** (1'R,2'S,3'R)-9-(2',3'-déhydrocyclopentan-1'-yl) adénine, séquestré dans le site actif sous sa forme oxydée, le **DHCeA** (3'-oxo-4',5'-didéhydro)-5'-désoxyadénosine<sup>[56]</sup> et l'enzyme native du foie de rat (**Enz-NAD<sup>+</sup>**) cristallisée en absence de substrat<sup>[61]</sup> ou en présence d'un inhibiteur compétitif de grande affinité : l'éritadénine<sup>[62]</sup> (Figure 5).

Il ressort de ces deux études les premières observations suivantes :

- L'enzyme existe bien sous la forme d'un homotétramère,
- Chaque sous unité comporte trois domaines principaux,



**Topologie du site actif de l'AdoHcy hydrolase (enzyme du placenta humain) selon Turner et collaborateurs :** *interactions du DHCeA avec les résidus d'acides aminés dans le complexe Enz-DHCeA cristallisé déduites des spectres de diffraction des rayons X.*



**Topologie du site actif de l'AdoHcy hydrolase (foie de rat) selon Takusagawa et collaborateurs<sup>[62]</sup> :** *interactions de la D-éritadénine (DEA) avec les résidus d'acides aminés dans le complexe ENZ-DEA cristallisé déduites des spectres de diffraction des rayons X.*

**Figure 5**

- Contrairement aux déshydrogénases **NAD**-dépendantes, l'**AdoHcy** hydrolase assure le « binding » du cofacteur **NAD**<sup>+</sup> grâce à la contribution de deux sous unités adjacentes (AB et CD).

L'extrémité C-terminale de la sous-unité B pénètre dans la sous-unité A adjacente et, à l'aide des lysines Lys-426 et tyrosine Tyr-430, stabilise le cofacteur associé à la sous unité A et ceci réciproquement (Figure 4 - B). Aucune interaction particulière n'associe les paires de sous-unités AB et CD si bien que l'on peut considérer la forme tétramérique de l'**AdoHcy** hydrolase comme un « dimère de dimères ».

L'implication ou intervention d'un « cycle d'oxydo-réduction » utilisant le cofacteur **NAD**<sup>+</sup>/**NADH** dans la stratégie catalytique de l'**AdoHcy** hydrolase (Schéma 15) rend sans doute nécessaire une stabilisation exceptionnelle du cofacteur dans son domaine de binding.

*Le fait saillant qui résulte de ces deux études est certainement la mise en évidence d'une « forme ouverte » et « fermée » de l'enzyme.*

L'enzyme native (foie de rat) sous sa forme oxydée **NAD**<sup>+</sup> en absence de substrat cristallise dans une conformation dite « ouverte » (Figure 6). Dans cette forme cristallographique, le site de « binding » du substrat est exposé vers l'extérieur et oscille à une fréquence de  $4.10^7 \text{ s}^{-1}$ <sup>[63]</sup>.

La fixation du substrat ou d'un analogue (inhibiteur) sur ce site non seulement freine la mobilité de ce domaine mais provoque, en rompant des liaisons hydrogène et en créant des associations nouvelles, un réarrangement spatial entre les différents domaines de la protéine (rotation de 14° autour de l'axe des sous unités AB et CD). Le domaine de binding du substrat vient au contact de celui du cofacteur pour former le site catalytique (Figure 6) et rend possible l'oxydation de l'hydroxyle en C-3' du substrat, première étape de la catalyse (Schéma 15).

L'isolement du site catalytique au sein de la protéine empêche la diffusion des intermédiaires réactionnels formés au cours des différentes étapes de la catalyse (Schéma 15 :

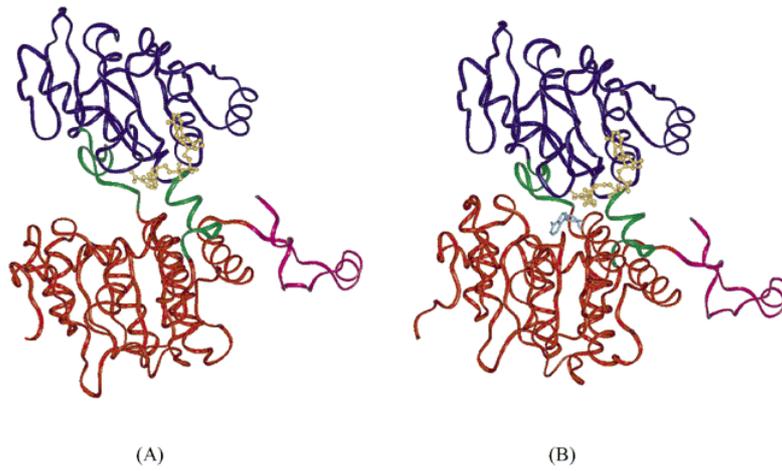
---

3'-oxo-**AdoHcy** et son dérivé 4',5'-didéhydro) et par la même ainsi réduit la possibilité d'avortement des processus d'arrachement du proton en C-4', de  $\beta$ -élimination ainsi que celui impliqué dans l'étape hydrolytique<sup>[27]</sup>.

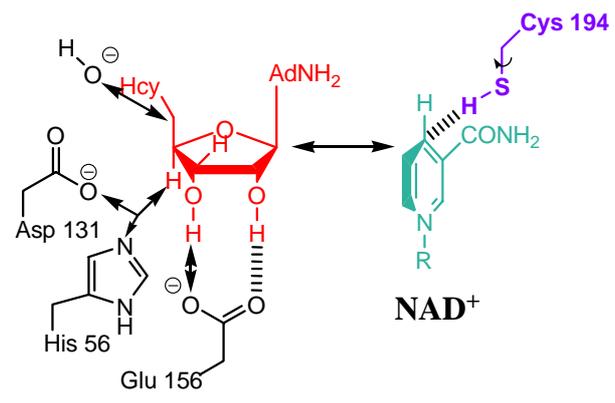
Ces études structurales concernant la forme fermée de l'enzyme (complexe **Enz-NADH** en présence de **DHCeA**<sup>[56]</sup>) ou complexe **Enz-NAD**<sup>+</sup> en présence d'éritadénine<sup>[62]</sup>) ont été déterminantes pour identifier les résidus d'acides aminés du site actif au contact (distance < 4Å) avec les différents déterminants structuraux (cycle ribosyle et groupe adénosyle) de ces différents analogues du substrat (Figure 5).

A partir de là, différentes hypothèses, l'une et l'autre complémentaires, ont été formulées pour justifier le rôle des acides aminés constitutifs du site actif dans les différentes étapes catalytiques de l'**AdoHcy** hydrolase<sup>[61, 64]</sup> (Figure 7).

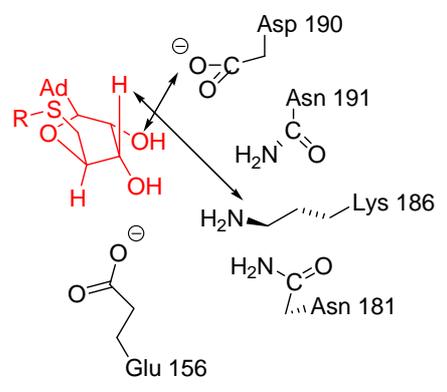
*Nous nous sommes appuyés sur ces données pour définir les différentes stratégies d'inactivation de l'AdoHcy hydrolase qui seront exposées dans les chapitres 2, 3 et 4 de cette thèse.*



**Figure 6 : L'AdoHcy hydrolase, forme ouverte (A) et forme fermée (B) selon Borchardt et collaborateurs<sup>[65]</sup>.** Le site de binding du cofacteur NAD<sup>+</sup> est figuré en bleu, le cofacteur NAD<sup>+</sup> en jaune, le site de binding du substrat en rouge, le domaine C terminal en magenta et les ponts entre les différents domaines en vert.



**(A) selon Takusagawa et collaborateurs<sup>[61]</sup>.**



**(B) selon Schowen et collaborateurs<sup>[64]</sup>.**

**Figure 7 : Les acides aminés impliqués dans la catalyse.**

**OBJECTIF DES RECHERCHES :**

**CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE NOUVEAUX**

**INHIBITEURS SPÉCIFIQUES DE L'AdoHcy**

**HYDROLASE**

Nous avons souligné dans le chapitre précédent, consacré aux inhibiteurs connus de la *S*-adényl-*L*-homocystéine hydrolase et à leur mode d'action, comment la connaissance du mécanisme d'action de cette enzyme avait permis de faire des progrès considérables dans le « design » rationnel d'inhibiteurs.

Après les inhibiteurs classiques de première génération, les premiers inhibiteurs irréversibles de l'**AdoHcy** hydrolase qui ont été identifiés sont, comme nous l'avons rapporté, des nucléosides analogues structuraux du substrat qui ont été conçus pour interrompre le cycle catalytique de l'enzyme au niveau de l'étape d'oxydation, en transformant le complexe **Enz-NAD<sup>+</sup>** en sa forme réduite **Enz-NADH**, forme fermée de l'enzyme qui permet la séquestration irréversible de l'inhibiteur (inhibiteurs de **type I**)<sup>[28]</sup>.

Les données structurales récentes concernant l'**AdoHcy** hydrolase résultant des études par diffraction des rayons X de l'enzyme cristallisée<sup>[56, 61]</sup> et en particulier la mise en évidence d'une molécule d'eau associée au site catalytique de l'enzyme et responsable de « l'activité hydrolytique » de l'**AdoHcy** hydrolase ont permis par la suite le développement d'inhibiteurs irréversibles et covalents.

L'exploitation de cette « activité hydrolytique » indépendante de « l'activité oxydante » s'est révélée efficace pour activer les inhibiteurs et les rendre aptes à s'associer de façon covalente avec l'enzyme (inhibiteurs de **type II**). Ce type d'inhibiteurs spécifiques de troisième génération découverts par l'équipe de Borchart<sup>[66, 67]</sup> et notre équipe<sup>[16]</sup> ont des propriétés antivirales intéressantes. Ils se différencient des autres inhibiteurs par la nature du groupe substituant en position 5' de l'adénosine qui joue le rôle de groupe latent activable par l'activité hydrolytique.

La structure des inhibiteurs de **type II** identifiés à ce jour est rappelée ci-dessous (Schéma 16).

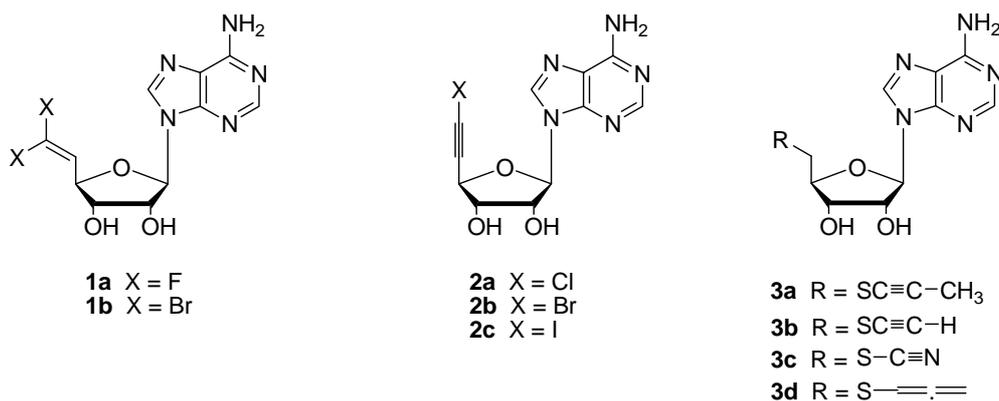


Schéma 16

Dans le cadre de cette thèse consacrée à la recherche de nouveaux inhibiteurs spécifiques de la *S*-adénosyl-*L*-homocystéine hydrolase nous avons entrepris :

- D'étudier l'interaction de nouvelles séries de nucléosides dérivés de l'adénosine avec « l'activité hydrolytique » de l'**AdoHcy** hydrolase et tenter d'identifier de nouveaux inhibiteurs de **type II**, ceci, dans la continuité du travail déjà accompli au laboratoire dans ce domaine.
- De modifier de façon covalente et spécifique la cystéine 195 du site actif de l'enzyme. Cette modification devrait provoquer l'inactivation de l'**AdoHcy** hydrolase étant donné le rôle crucial joué par la cystéine 195 dans la modulation de l'activité d'oxydoréduction de l'enzyme, rôle qui a été mis en évidence récemment.
- D'exploiter les données structurales concernant la topologie du site actif de l'enzyme et de « tailler sur mesure », à partir d'expériences de modélisation moléculaire, de nouveaux inhibiteurs susceptibles de développer des interactions de binding fortes avec des résidus d'acides aminés identifiés du site actif. Les seconucléosides dérivés de l'éritadénine<sup>[68]</sup> et du **DHAP**<sup>[22, 23, 69, 70]</sup> ont été choisis dans un premier temps pour cette étude.

## Chapitre 2

# **RECHERCHE DE NOUVELLES SERIES D'INHIBITEURS COVALENTS DE L'AdoHcy HYDROLASE CIBLANT L'ACTIVITE HYDROLYTIQUE DE L'ENZYME**

Deux nouvelles approches ont été mises en œuvre pour la recherche de nouvelles séries d'inhibiteurs covalents de l'AdoHcy hydrolase ciblant l'activité hydrolytique de l'enzyme.

## Discussions des stratégies :

### 1. ETUDE DE L'INTERACTION DES 6'-CYANO-5',6'-DEHYDRO-6'-DESOXY-6'-HALOHOMOADENOSINE AVEC L'AdoHcy HYDROLASE

Dans la série des thionucléosides étudiés au laboratoire<sup>[43]</sup> qui provoquent l'inhibition irréversible de l'enzyme via « l'activité hydrolytique », la 5'-thiocyano-5'-désoxyadénosine **3c** s'est révélée un des plus performants ( $t_{1/2}$  d'inactivation de 9 minutes pour une concentration de 3  $\mu\text{M}$ )<sup>[43]</sup>.

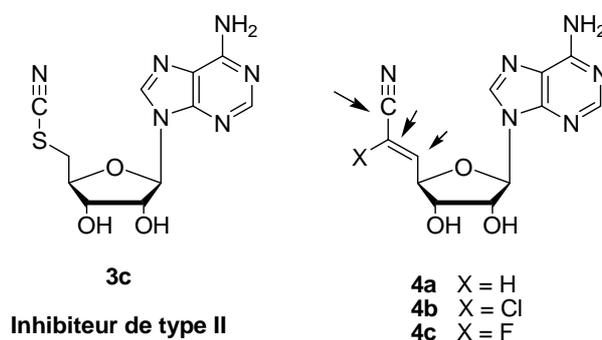


Schéma 17

Dans la structure moléculaire de cet inhibiteur, le remplacement de l'atome de soufre par un groupe bioisostère tel qu'une double liaison ne devrait pas modifier de façon sensible son affinité pour l'enzyme (composé **4a**, Schéma 17). Par contre l'introduction d'un halogène en position 6' (composés **4b-c**), en créant de nouveaux centres électrophiles, devrait augmenter les possibilités d'interactions de l'inhibiteur modifié avec l'activité hydrolytique de l'enzyme et/ou avec les résidus nucléophiles du site actif.

En particulier, on peut envisager que l'addition catalytique d'une molécule d'eau en C-6' suivie d'une élimination de l'halogène permettrait la génération dans le site actif d'un dérivé carbonyle hautement réactif pouvant réagir avec un résidu d'acide aminé impliqué dans la catalyse. La lysine 185 qui participe à l'arrachement du proton en C-4' pourrait être un de ces acides aminés (Schéma 18).

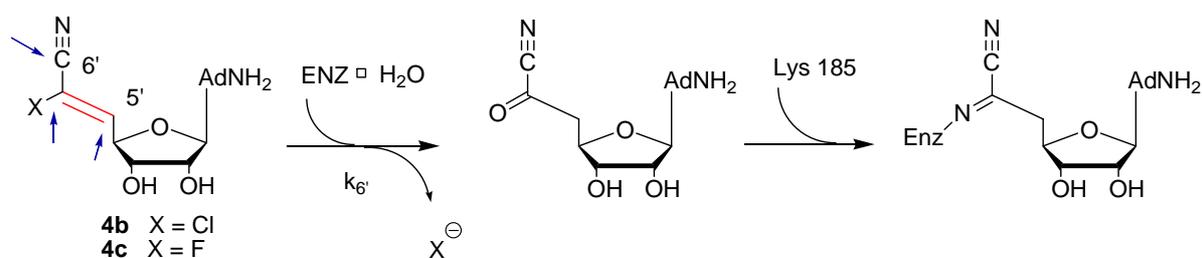
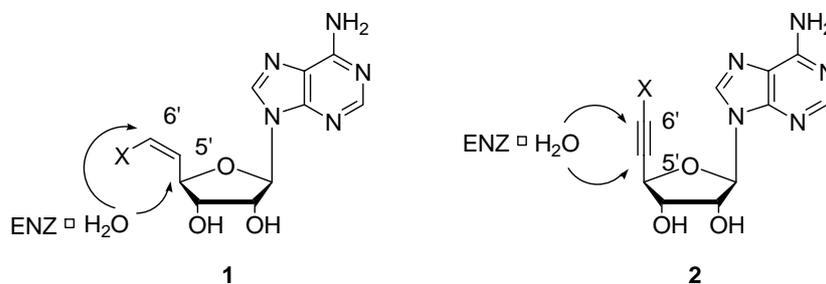


Schéma 18

## 2. UTILISATION DES ESTERS DERIVES DE L'HOMOADENOSINE COMME NOUVEAUX MODELES D'INHIBITEURS SUICIDES DE L'AdoHcy HYDROLASE

Dans le site actif de l'AdoHcy hydrolase, l'addition catalytique de la molécule d'eau séquestrée du site actif peut se faire indifféremment sur les centres électrophiles C-5' et C-6' de dérivés de l'adénosine<sup>[66, 67]</sup>. Les études concernant les mécanismes d'inactivation de l'AdoHcy hydrolase par des 6'-halomovinyl adénosine **1** et la 5',5',6',6'-tétradéhydro-6'-désoxy-6'halo-homo adénosine **2** ont bien mis en évidence cette particularité de l'activité hydrolytique de l'AdoHcy hydrolase (Schéma 19).

Schéma 19 : Activation des inhibiteurs de type II par l'activité hydrolytique de l'AdoHcy hydrolase<sup>[66, 67]</sup>

En se basant sur le même type de stratégie d'inhibition, une autre série de nucléosides **5** dérivés de l'homoadénosine et porteurs en position C-6' d'une fonction ester potentiellement activable par l'activité hydrolytique de l'enzyme peut être envisagée comme nouveaux modèles d'inhibiteurs de **type II** (Schéma 20).

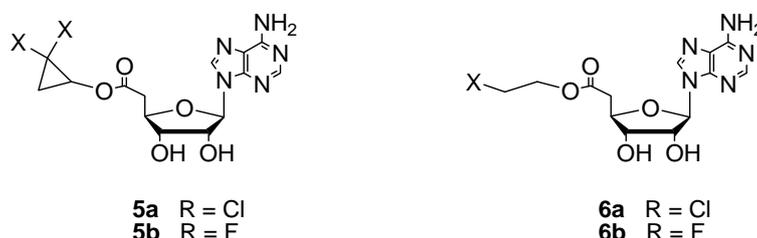


Schéma 20

Il est bien connu que les cyclopropanols et les cyclopropylamines possédant un groupe partant en position 2 sont instables en milieu basique et même dans certains cas dans des conditions neutres et se transforment en dérivés  $\alpha,\beta$  insaturés<sup>[71]</sup>. A partir de cette observation, on peut considérer que les esters correspondants peuvent servir d'espèces réactives masquées. En conséquence l'interaction des esters **5a-b**, dérivés des 2,2-dichloro et 2,2-difluorocyclopropanol, avec « l'activité hydrolytique » de l'**AdoHcy** hydrolase devrait être capable de générer au sein du site actif des entités électrophiles réactives susceptibles de modifier de façon covalente un ou plusieurs résidus du site actif participant à la catalyse (Schéma 21).

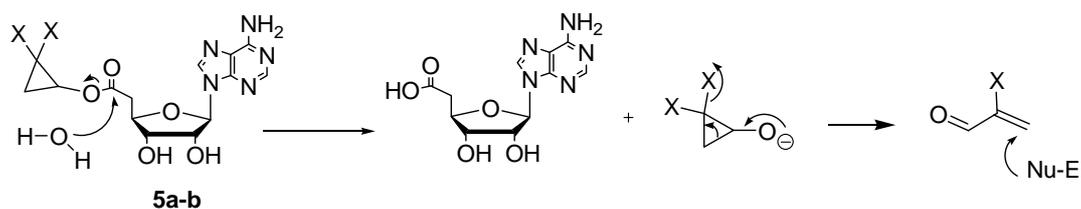


Schéma 21

Une approche similaire, illustrée sur le schéma ci-dessous, peut être envisagée avec d'autres esters dérivés de l'homoadénosine.

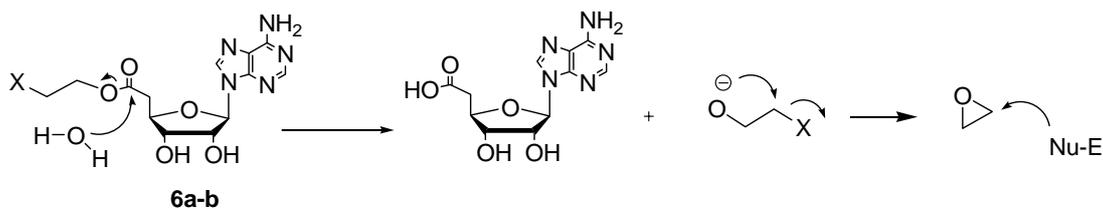


Schéma 22

*Pour justifier le choix de ces deux stratégies d'inhibition, il est important de rappeler que l'interaction du substrat ou d'un inhibiteur avec le site de binding de l'enzyme conduit à la forme fermée de l'AdoHcy hydrolase. Les processus d'inactivation envisagés (Schéma 21 et Schéma 22) devant se faire dans la forme fermée de l'enzyme, la diffusion des espèces réactives devrait être suffisamment ralentie pour favoriser la formation de liaison covalente.*

*La synthèse de ces différents nucléosides, inactivateurs potentiels de l'AdoHcy hydrolase, est décrite ci-après.*

### 3. SYNTHÈSES

#### 3.1 Synthèses des 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-6'-halo-homoadénosine **4**

La voie de synthèse que nous avons étudiée pour accéder aux 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-6'-halo-homoadénosines **4** utilise une réaction de Wittig entre un ylure de phosphore ( $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CNX}$ ) et la 5'-carboxaldéhyde adénosine convenablement protégée (Schéma 23).

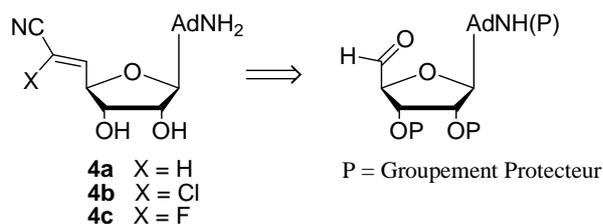
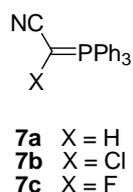


Schéma 23

Cet aldéhyde déjà décrit dans la littérature est accessible à partir de l'adénosine par oxydation du groupe hydroxyle en C-5' par la méthode de Moffatt<sup>[72, 73]</sup>.

##### 3.1.1 Synthèse des cyanohalométhylidènetriphénylphosphoranes

Les ylures de phosphore nécessaires à la mise ne œuvre de ces synthèses sont les suivants :



##### 3.1.1.1 Synthèse du chlorocyanométhylidènetriphénylphosphorane **7b**

Le chlorocyanométhylidènetriphénylphosphorane a été synthétisé en utilisant la méthode décrite par Tronchet<sup>[74]</sup>. La position en  $\alpha$  du phosphore du cyanométhylidène triphénylphosphorane **7a** est chlorée par l'hypochlorite de ter-butyle fraîchement préparé et

dosé avant utilisation (Schéma 24). Le chlorocyanométhylidènetriphénylphosphorane résultant est obtenu quantitativement sous forme de cristaux jaunes.

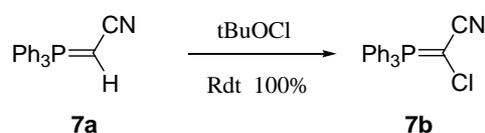


Schéma 24

### 3.1.1.2 Synthèse du cyanofluorométhylidènetriphénylphosphorane 7c

Les voies d'accès au cyanofluorométhylidènetriphénylphosphorane **7c** sont plus complexes et seules deux préparations décrites dans la littérature et illustrées ci-dessous peuvent être mises en œuvre à l'échelle du laboratoire.

↳ Le **2-(O,O-diéthyl-phosphono)-2-fluoro-acétonitrile**<sup>[75]</sup> a été obtenu à partir du 2-(O,O-diéthyl-phosphono)-acétonitrile<sup>[75, 76]</sup> (Schéma 25). L'action du butyllithium sur ce phosphonate conduit à l'ylure correspondant qui est mis en réaction dans un premier temps avec un agent de fluoration électrophile. Un nouveau traitement par le butyllithium sert à la génération de l'ylure qui peut ensuite être condensé sur une fonction carbonyle. Dans ce type de réaction, l'ylure fluoré n'est pas isolé. L'inconvénient de cette méthode réside dans la préparation de l'agent de fluoration, le N-fluorobis(trifluorométhanesulfonyl)imide<sup>[77]</sup>, qui nécessite l'utilisation du fluor gazeux.

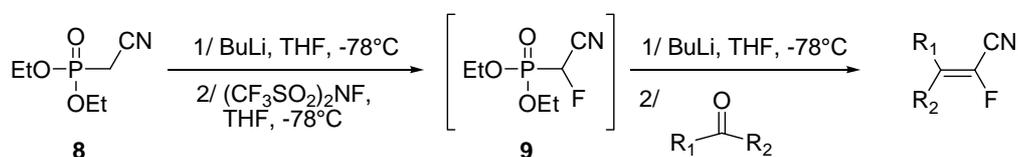


Schéma 25

↳ Le **phosphorane fluoré 7c** peut être généré à partir du (chlorocyanofluorométhyl)phénylmercure par traitement par la triphénylphosphine dans le xylène à reflux. Cette méthode a été utilisée avec succès par Tronchet pour accéder au 5,6-didésoxy-6-halogéno-

hept-5-éno-1,4-furanonitriles dérivés du glucose et très récemment pour fonctionnaliser des dérivés de la 2'-désoxy-thymidine<sup>[78, 79]</sup>.

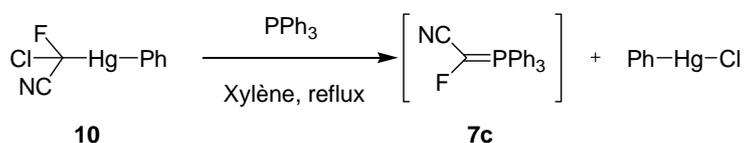
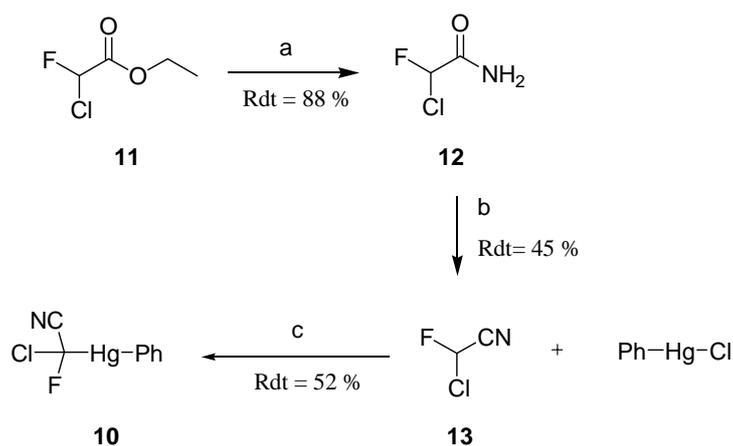


Schéma 26

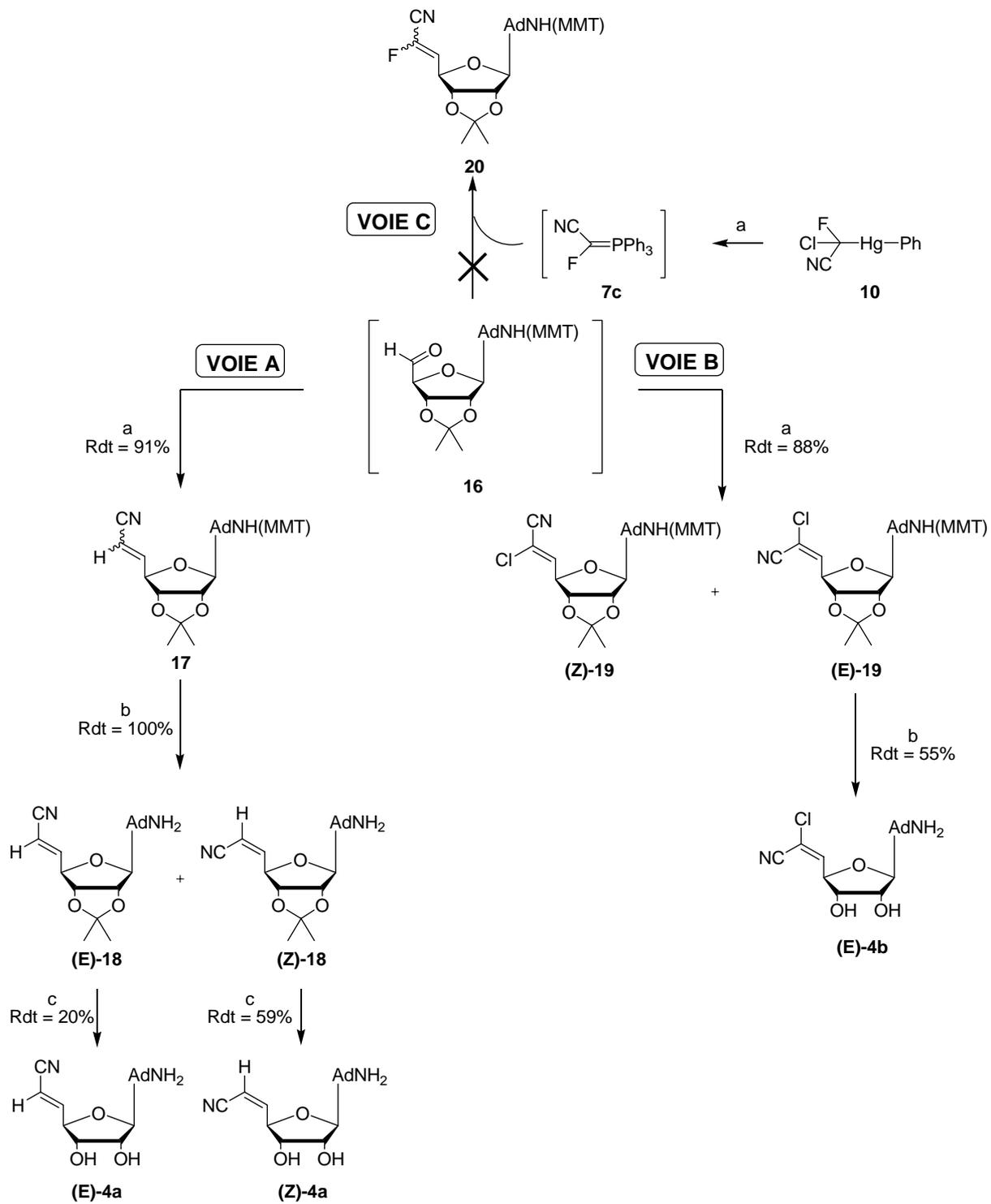
Nous avons choisi d'utiliser cette dernière méthode pour la synthèse de la 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-6'-fluoro-homoadénosine **4c**. Le (chlorocyanofluorométhyl)phénylmercure nécessaire à cette synthèse est préparé en 3 étapes à partir du chlorofluoroacétate d'éthyle commercial (Schéma 27).



a)  $\text{NH}_3$  / MeOH b)  $\text{P}_2\text{O}_5$  c) tBuOK/tBuOH, THF

Schéma 27

Le 2-chloro-2-fluoroacétamide est obtenu par ammonialyse du 2-chloro-2-fluoroacétate d'éthyle<sup>[80]</sup>. Le 2-chloro-2-fluoroacétamide **12** est ensuite déshydraté par chauffage en présence de  $\text{P}_2\text{O}_5$  pour donner le chlorofluoroacétonitrile **13**<sup>[80]</sup>. Le chlorofluoroacétonitrile est traité par le tertbutylate de potassium en présence de chlorure de phénylmercure. Cette réaction conduit à la formation de l'organomercurique **10** précurseur du cyanofluorométhylidènetriphényl phosphorane<sup>[74]</sup>. Ce composé est stable et sera utilisé pour générer l'ylure *in situ* dans les réactions de Wittig décrites ci-après.

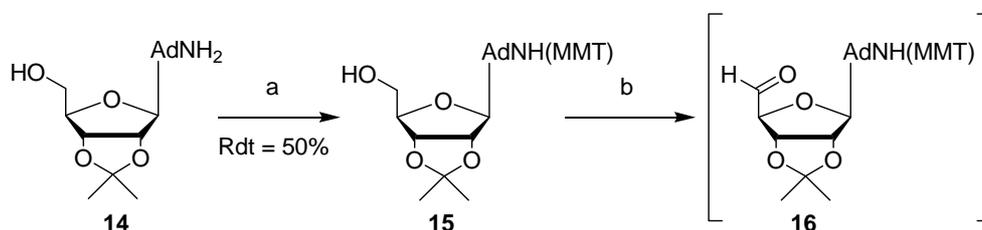


VOIE A : a)  $\text{HCN}=\text{PPh}_3$  b)  $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O} : 4/1$  c)  $\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O} : 1/1$   
 VOIE B : a)  $\text{ClCN}=\text{PPh}_3$  b)  $\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O} : 1/1$   
 VOIE C : a)  $\text{PPh}_3$ , Xylène, Reflux

Schéma 28

### 3.1.2 Synthèse des 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-homoadénosines (**4a**) et 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-6'-halo-homoadénosines (**4b** et **4c**) – (Schéma 28)

Pour ces différentes synthèses illustrées sur le schéma général ci-contre l'aldéhyde **16** a été utilisé comme intermédiaire pour la mise en œuvre des différentes réactions de Wittig (voies A, B et C). Cet aldéhyde a été préparé en quatre étapes à partir de la 2',3'-*O*-isopropylidène adénosine **14** après sa protection en position N<sup>6</sup> par un groupe monométhoxytrityle (composé **15**) et oxydation de Moffat<sup>[73]</sup>. L'aldéhyde **16** est obtenu quantitativement.



a) 1. TMSCl, Pyridine 2. MMTCl, pyridine 3. NH<sub>4</sub>OH, pyridine b) DCC, DMSO, CHCl<sub>2</sub>COOH

Schéma 29

Selon la nature des ylures utilisés dans les réactions de Wittig mises en œuvre pour la préparation de **4a** et **4b** (voie A et B), cet aldéhyde a été utilisé in situ ou isolé et purifié avant réaction (voie C). La 2',3'-*O*-isopropylidène-N<sup>6</sup>-monométhoxytrityl adénosine a été choisie pour cette synthèse car les deux groupes protecteurs peuvent être enlevés en milieu acide en fin de synthèse soit sélectivement (AcOH) soit ensemble (HCOOH).

#### 3.1.2.1 Synthèse des 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-homoadénosines **4a** – (Schéma 28 - Voie A)

La condensation du cyanométhylidènetriphénylphosphorane sur l'aldéhyde **16** permet l'obtention du 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-2',3'-*O*-isopropylidène-N<sup>6</sup>-monométhoxytrityl-adénosine **17** sous forme de deux isomères Z et E (35 : 65). A ce stade les deux isomères ne sont pas séparables. L'azote en N<sup>6</sup> est déprotégé en milieu acide puis les deux isomères sont séparés par chromatographie éclair sur silice. Les groupements isopropylidène en 2' et 3'

de chacun de ces isomères sont ensuite déprotégés pour conduire respectivement aux (Z) et (E)-6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-adenosines, composés **(E)-4a** et **(Z)-4a** (Schéma 28).

### 3.1.2.2 Synthèse des 6'-chloro-6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-homo-adenosines **4b** – (Schéma 28 - Voie B)

Le chlorocyanométhylidènetriphénylphosphorane est également condensé in situ sur l'aldéhyde **16** comme précédemment pour conduire à un mélange de diastéréoisomères, composés **(E)-19** et **(Z)-19** (E/Z : 4/1). Cette fois le composé E (le plus mobile sur CCM) peut être séparé de ce mélange. Le composé Z correspondant a toujours été obtenu en mélange avec l'isomère E. La déprotection finale est réalisée en une seule étape en milieu acide formique (Schéma 28), elle permet d'obtenir le nucléoside **(E)-4b** diastéréoisomériquement pur.

La stéréochimie au niveau de la double liaison pour ce composé a été déterminée en étudiant la constante de couplage entre les protons 4' et 5'<sup>[78]</sup> et en se basant sur des études précédentes concernant le même type de réactions de Wittig réalisées sur différents aldéhydes en C-5 dérivés du ribose. L'isomère (E) est dans ce cas toujours majoritaire<sup>[78]</sup>.

### 3.1.2.3 Synthèse des 6'-cyano-6'-fluoro-5',6'-déhydro-6'-désoxy-adenosines **4c** – (Schéma 28 - Voie C)

L'ylure **7c** généré in situ dans le xylène par la méthode décrite précédemment et l'aldéhyde **16** (utilisé en solution) sont chauffés à reflux du xylène. Dans ces conditions réactionnelles, aucun produit résultant de la condensation de Wittig n'a pu être mis en évidence bien que l'analyse du milieu réactionnel montre la formation de l'ylure souhaité (contrôle RMN <sup>19</sup>F). L'instabilité de l'aldéhyde **16** dans les conditions de température utilisées est vraisemblablement la cause de cet échec (Schéma 28).

### 3.2 Synthèse des esters 2,2-dihalocyclopropaniques 5a-b, 2-haloéthyliques 6a-b de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique

La voie d'accès la plus directe à ces différents nucléosides met en jeu dans la dernière étape de préparation une réaction d'estérification entre un acide dérivé de l'homoadénosine et les 2,2-dihalocyclopropanols ou alcools haloéthyliques correspondants (Schéma 30). La mise en œuvre de cette dernière réaction nécessite préalablement la synthèse de l'acide correspondant à partir de l'adénosine et des dihalocyclopropanols qui ne sont pas commerciaux.

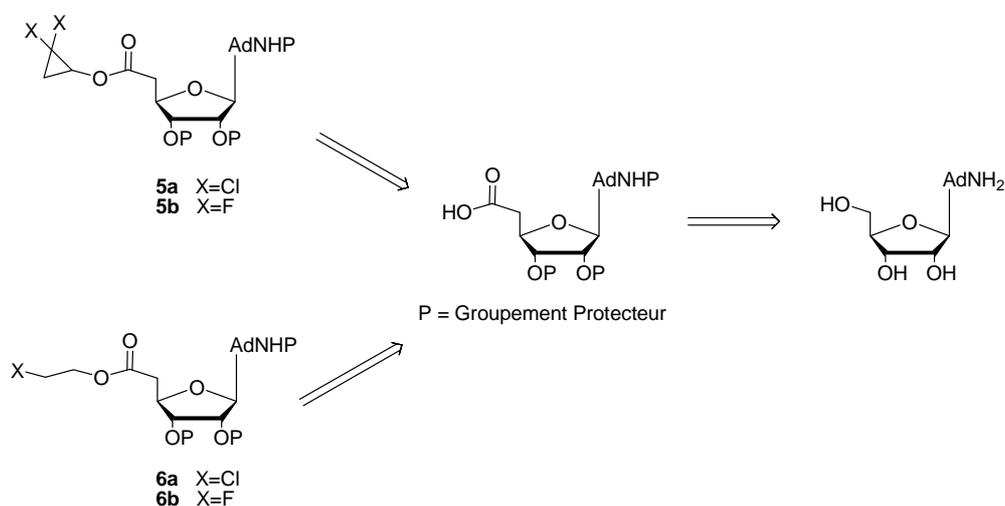


Schéma 30

Nous décrirons successivement les préparations des deux dihalocyclopropanols avant d'envisager la réaction d'estérification qui nous conduira après déprotection aux molécules cibles choisies.

#### 3.2.1 Synthèse de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique protégé 25

La méthode que nous avons développée pour obtenir l'acide homoadénosine-6'-carboxylique, intermédiaire clé de cette synthèse, utilise l'homologation des acides selon Arndt-Eistert.

Cette méthode consiste à générer à partir d'un acide initial une fonction diazocétone qui après réarrangement de Wolff peut conduire selon les conditions réactionnelles à la formation d'un ester, amide ou acide homologué d'un carbone selon les conditions réactionnelles.

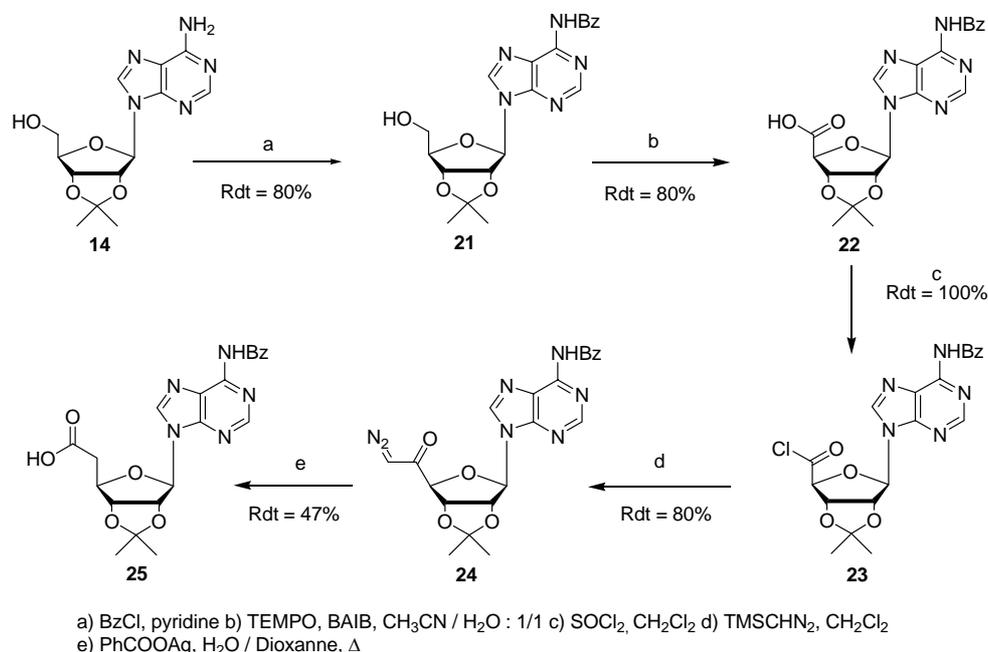


Schéma 31

Cette méthode a été testée avec succès pour réaliser l'homologation d'acides dérivés de sucres<sup>[81, 82]</sup> et d'acides aminés<sup>[83]</sup> mais jamais sur des nucléosides. Le mécanisme du réarrangement de Wolff reste encore discuté mais la stéréospécificité du processus est bien établie<sup>[81]</sup>.

Le chemin réactionnel conduisant à **25** est illustré ci-après (Schéma 31). La N<sup>6</sup>-benzoyl-2',3'-O-isopropylidène adénosine est tout d'abord oxydée pour conduire à l'acide correspondant<sup>[84]</sup> **22**. Cet acide carboxylique est transformé en chlorure d'acide correspondant par traitement par le chlorure de thionyle. Sans purification préalable, ce chlorure d'acide **23** est traité par le triméthylsilyle diazométhane pour conduire à la diazocétone<sup>[85]</sup> **24**. Cette diazocétone est stable et peut être isolée. Après purification, le composé **24** est traité à chaud dans une solution eau / dioxane par le benzoate d'argent. L'acide homologué résultant est obtenu avec un rendement de 47 %. Cette voie de synthèse de dérivés de l'acide

homoadénosine-6'-carboxylique est certainement la plus directe et la plus efficace des méthodes décrites jusqu'à présent.

### 3.2.2 Synthèse des 2,2-dihalocyclopropan-1-ols

Selon la nature de l'halogène, différentes voies d'accès aux 2,2-dihalocyclopropan-1-ols ont été étudiées. Le 2,2-dichlorocyclopropan-1-ol est décrit dans la littérature, ce n'est pas le cas du 2,2-difluorocyclopropan-1-ol pour lequel nous avons mis au point de nouvelles conditions expérimentales permettant sa génération de façon fiable.

#### 3.2.2.1 Synthèse du 2,2-dichlorocyclopropan-1-ol 28

Le 2,2-dichlorocyclopropan-1-ol est un dérivé instable. Dans les réactions où il est utilisé, il est généralement généré in situ à partir de son ester triméthylsilylé correspondant qui est lui-même préparé par addition du dichlorocarbène sur le (vinyloxy)triméthylsilane<sup>[86]</sup>. Nous avons repris cette méthode en changeant les conditions réactionnelles pour produire avec de meilleurs rendements le *O*-triméthylsilyl-2,2-dichlorocyclopropanol correspondant. En particulier, la génération du dichlorocarbène par traitement du trichloacétate d'éthyle par le méthylate de sodium et sa condensation sur le (vinyloxy)triméthylsilane dans le pentane s'est révélé un protocole plus efficace pour l'isolement par distillation de l'éther silylé **27**. Cet intermédiaire est hydrolysé en milieu faiblement acide (THF + quelques gouttes d'HCl 1M) pour produire le 2,2-dichlorocyclopropanol et le mettre en solution dans les réactions d'estérification étudiées (Schéma 32).

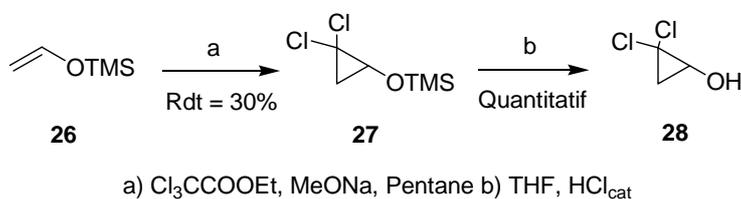


Schéma 32

#### 3.2.2.2 Synthèse du 2,2-difluorocyclopropan-1-ol 31

La synthèse du 2,2-difluorocyclopropan-1-ol s'est révélée plus délicate que celle de son homologue chloré. En effet les difluorocarbènes sont connus pour être moins réactifs et plus

difficiles à générer en raison de la stabilisation induite par les deux atomes de fluor<sup>[87]</sup>. Plusieurs méthodes ont été développées au cours de ces dernières années pour produire le difluorocarbène et réaliser la difluorocyclopropanation des alcènes, ces méthodes sont rappelées ci-dessous.

↳ **La thermolyse du chlorodifluoroacétate de sodium** a été la première méthode<sup>[88]</sup> utilisée pour produire le difluorocarbène et la cyclopropanation d'alcènes (Schéma 33). Les rendements sont en général modestes mais la réaction est facile à mettre en oeuvre<sup>[89]</sup>.



Schéma 33

↳ **Dolbier et collaborateurs**<sup>[90]</sup> proposent une autre méthode qui aurait l'avantage d'être conduite à température ambiante. Le traitement du dibromodifluorométhane par le zinc en présence d'alcènes conduit aux dérivés cyclopropaniques correspondants (Schéma 34).



Schéma 34

↳ **Une dernière méthode** développée plus récemment par Burton et Nae<sup>[91]</sup> utilise comme précurseur de difluorocarbène un sel de phosphonium dérivé du dibromodifluorométhane et de la triphénylphosphine. Ce sel traité par les ions fluorures (CsF ou KF) génère le difluorocarbène correspondant qui peut être utilisé dans les réactions de cyclopropanation (Schéma 35). Les gem-difluorocyclopropanes dérivant d'alcènes riches en électrons sont alors obtenus avec de bons rendements par cette méthode.

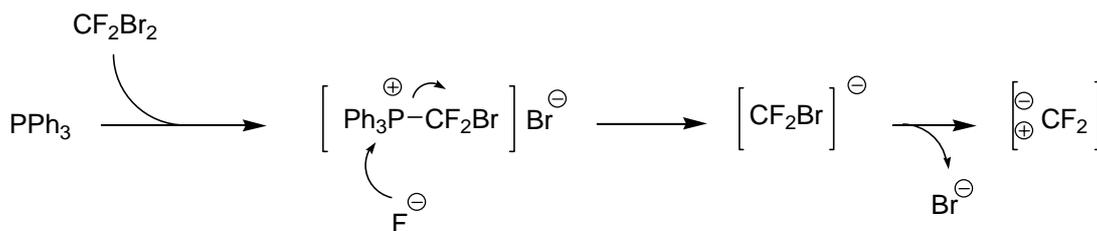


Schéma 35

Pour notre part nous avons préféré utiliser la thermolyse du chlorodifluoroacétate de sodium pour produire le difluorocarbène dans la réaction de cyclopropanation du vinyloxyméthyl-benzène<sup>[92]</sup>, intermédiaire mis en jeu dans la synthèse du difluorocyclopropanol que nous avons mis au point (Schéma 36).

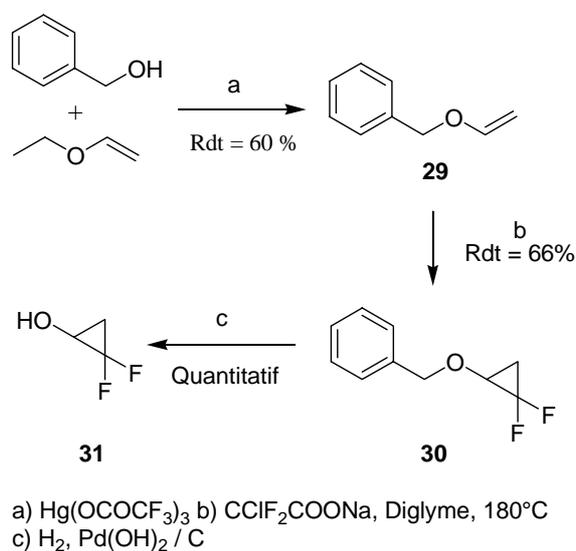


Schéma 36

La condensation du difluorocarbène généré par thermolyse du chlorodifluoroacétate de sodium dans le diglyme à  $180^\circ\text{C}$  conduit au *O*-benzyl-2,2-difluorocyclopropan-1-ol avec des rendements satisfaisants. Ce dérivé s'est révélé être un excellent précurseur à partir duquel le 2,2-difluorocyclopropanol **31** peut être généré dans des conditions neutres (hydrogénolyse en présence de palladium).

### 3.2.3 Synthèse des esters de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique 5-6

#### 3.2.3.1 Synthèse des esters 2,2-dihalogocyclopropaniques de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique 5

Ces synthèses ont été réalisées en 3 étapes, illustrées dans le Schéma 37, à partir de l'acide 2',3'-*O*-isopropylidène- $N^6$ -benzoylhomoadénosine-6'-carboxylique.

L'acide **25** est préalablement débenzoylé en position  $N^6$  avant d'être estérifié. L'acide nucléosidique **32** résultant, dissous dans le dichlorométhane, est activé par ajout d'EDCI et d'HOBT (l'utilisation d'EDCI est préférable à celle du DCC, l'urée résultante soluble en phase aqueuse facilite l'extraction). A cette solution on ajoute une solution de 2,2-dichloro **28** ou 2,2-difluorocyclopropanol **31** fraîchement préparée à partir des dérivés triméthylsilylé **27** ou benzylé **30** correspondants pour former respectivement les esters **5a** et **5b**.

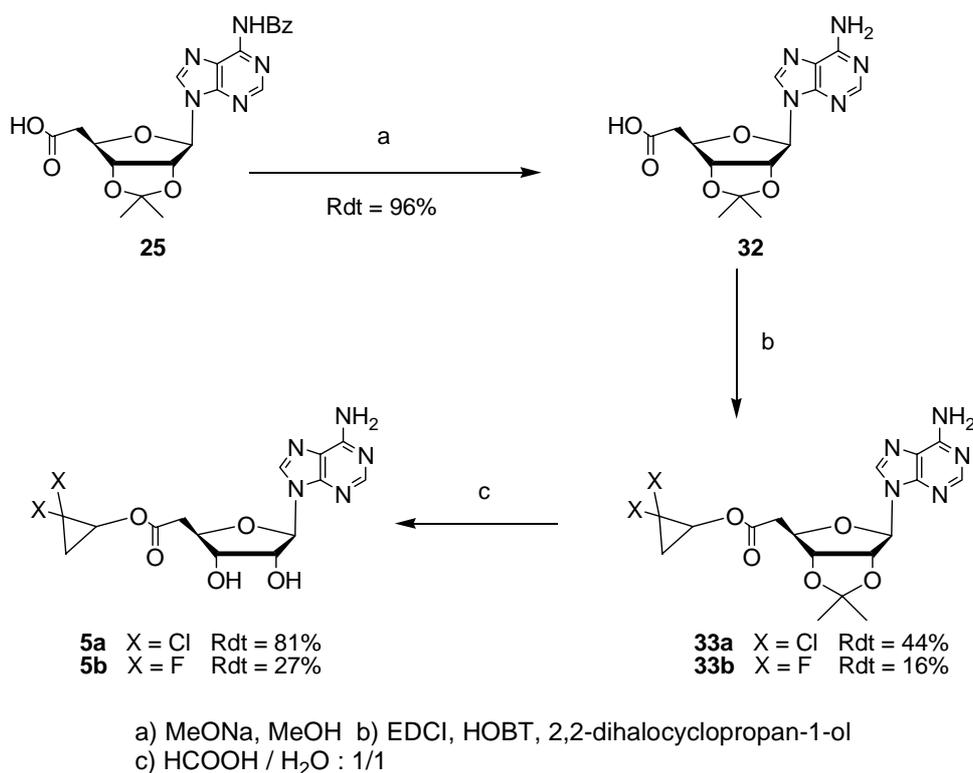


Schéma 37

Les esters cyclopropaniques résultants sont formés avec des rendements modestes, respectivement 44% et 16%. La déprotection des positions 2' et 3' est réalisée en milieu acide formique et les esters résultants purifiés sur des colonnes de résine hydrophobe **HP20SS** avant d'être lyophilisés. Il faut noter que la grande réactivité de l'ester **5b** conduit facilement à des réactions de transestérifications en présence de méthanol.

### 3.2.3.2 Synthèse des esters haloéthyliques dérivés de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique **6**

La synthèse des esters haloéthyliques de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique utilise les mêmes méthodes que précédemment (Schéma 38). Néanmoins, la stabilité des alcools utilisés permet d'obtenir de meilleurs rendements que ce soit au niveau de la formation des esters intermédiaires **34a-b** ou au niveau de la réaction de déprotection finale du groupement isopropylidène.

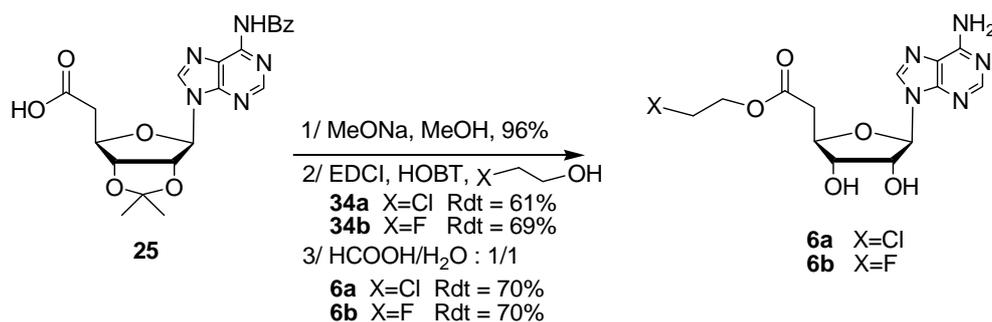


Schéma 38

## 4. INACTIVATION DE L'AdoHcy HYDROLASE – RESULTATS ET DISCUSSION

Le pouvoir inhibiteur des trois séries de nucléosides **4a-b**, **5a-b** et **6a-b** proposés comme modèles d'inhibiteur irréversibles covalents de **type II** a été testé sur l'activité de l'**AdoHcy** hydrolase recombinante de placenta humain purifiée jusqu'à homogénéité au laboratoire.

### 4.1 Préparation de l'AdoHcy hydrolase

L'équipe du professeur M.S. Hershfield a isolé le gène codant pour l'**AdoHcy** hydrolase du placenta humain<sup>[54]</sup>. Ce gène associé au vecteur procaryotique **pPROK-1** a servi à la construction du plasmide **pPROK cd 20**. Le plasmide introduit dans une souche de *E. coli* **JM109** est capable de surproduire l'**AdoHcy** hydrolase après induction par l'**IPTG** (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside). Cette bactérie transformée a été préparée et est disponible au laboratoire.

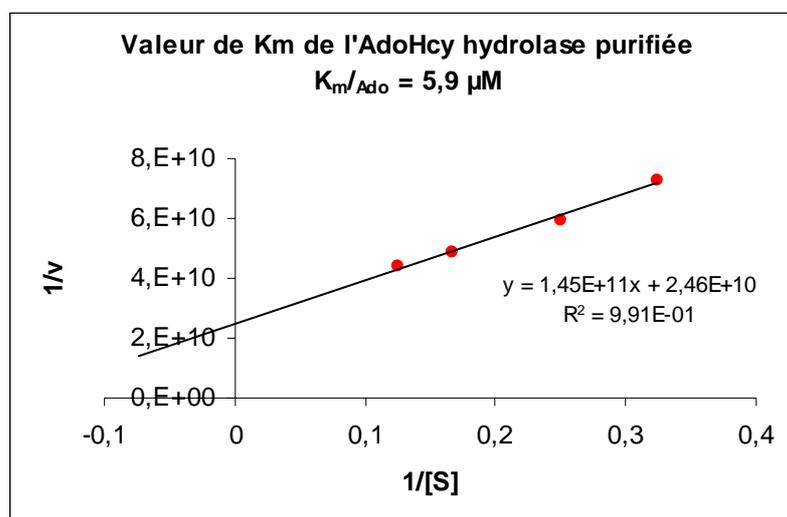
Dans chaque préparation de l'**AdoHcy** hydrolase effectuée pendant ce travail, l'enzyme a été purifiée à partir de 7 g de bactéries correspondant à la quantité obtenues pour 4 litres de culture.

Après les opérations de cassage par action de lysozyme et par choc thermique, le cytosol récupéré dans un tampon phosphate est soumis à un fractionnement incluant une chromatographie échangeuse d'ions (**DEAE** cellulose), une précipitation au sulfate d'ammonium, un gel d'exclusion (Sephacryl S200) et une seconde chromatographie d'échange d'ions (**DEAE** sepharose). A ce protocole décrit par T. Gomi et collaborateurs<sup>[58]</sup>, nous avons ajouté une étape de purification supplémentaire par **FPLC** sur colonne UnoQ. La protéine ainsi obtenue est homogène comme le montre le contrôle réalisé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et par **ESI/MS**. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 1.

Etapes	Protéines (mg)	Activité Globale (U)	Activité Spécifique (U/mg)	Facteur de purification de l'étape
Cassage	385	898	2,3	-
DEAE cellulose	220	768	3,5	1,5
Précipitation fractionnée	62	559	9,0	2,6
Sephacryl S200	26	332	12,8	1,4
DEAE Sepharose	12	155	12,9	1,0

Tableau 1

Le  $K_m$  par rapport à l'adénosine mesuré pour l'**AdoHcy** hydrolase purifiée de cette façon est de  $5,9 \mu\text{M}$ , résultat analogue à celui décrit dans la littérature ( $1,4 \mu\text{M}$ )<sup>[57]</sup>.



**Graphique 1 : Détermination des paramètres cinétiques de l'AdoHcy hydrolase par rapport au substrat (Ado) dans le sens synthétique - Méthode de Linewaver et Burk**

## Test enzymatique

Dans toutes les expériences décrites concernant la purification de l'**AdoHcy** hydrolase et les tests d'inhibition, l'activité de l'enzyme a été testée dans le sens synthétique. Le test d'activité est un test radioactif dont le protocole s'inspire de celui décrit initialement par F. Della Ragione et A.E. Pegg<sup>[93]</sup>.

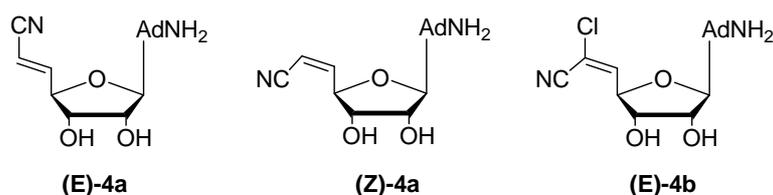
L'enzyme est incubée à 37°C en présence de [2,8-<sup>3</sup>H]-adénosine ou [8-<sup>14</sup>C]-adénosine et d'un excès de D,L-homocystéine dans des conditions de tampon décrites dans la partie expérimentale.



L'avancement de la réaction est suivi en mesurant la quantité de [2,8-<sup>3</sup>H]-**AdoHcy** ou [8-<sup>14</sup>C]-**AdoHcy** formée (comptage par scintillation liquide) après sa séparation de [2,8-<sup>3</sup>H]-adénosine ou [8-<sup>14</sup>C]-adénosine restante sur résine échangeuse de cation (microcolonne de cellulose phosphate).

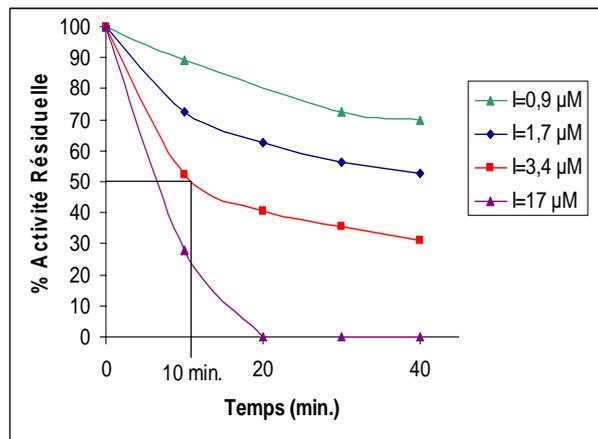
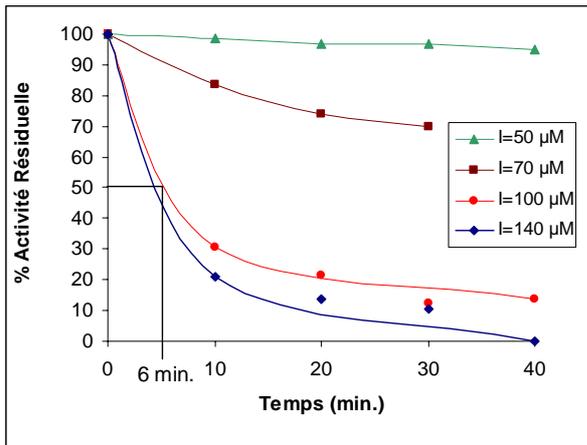
#### 4.2 Inactivation de l'AdoHcy hydrolase par les (Z) et (E)-5'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-homoadénosines (4a) et la (E)-6'-chloro-6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-homoadénosine ((E)-4b)

L'inactivation de l'AdoHcy hydrolase a été suivie à partir d'expériences de préincubation de l'enzyme en présence de concentrations variables de (E)-4a, (Z)-4a et (E)-4b (de 0,9 à 140 μM) en mesurant l'activité enzymatique résiduelle en fonction du temps.



La perte d'activité de l'enzyme observée dans ces trois expériences est dépendante du temps et de la concentration en inhibiteur.

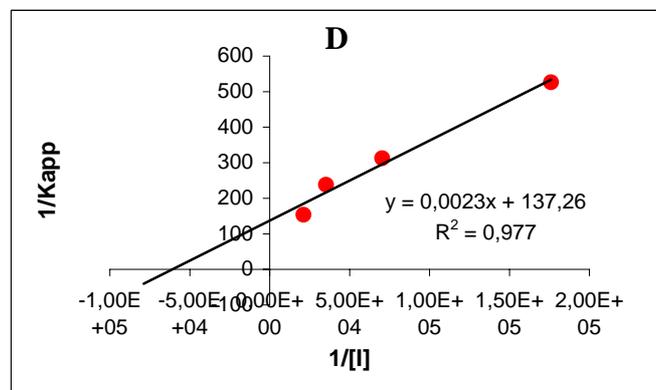
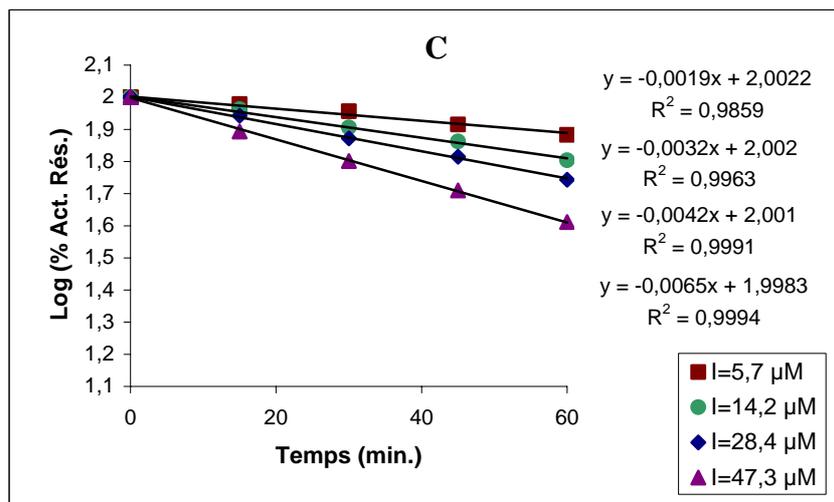
Les représentations graphiques de ces cinétiques, illustrées sur la Figure 8, montrent que la vitesse d'inactivation de l'enzyme provoquée par les deux nucléosides (E)-4a et (Z)-4a est biphasique (Graphiques A et B).



A

B

Inactivation de (Z)-4a (A) et (E)-4a (B), détermination des temps de demi-vie.



Inactivation de l'AdoHcy hydrolase par (E)-4b, détermination des paramètres cinétiques  $K_i$  et  $k_{inact}$ .

Figure 8

Dans ces deux cas la vitesse d'inactivation est du pseudo premier ordre dans la première période d'inactivation (inférieure à 10 minutes) pour des faibles concentrations en inhibiteurs puis est ralentie après 50% d'inactivation de l'enzyme.

Il faut noter que l'inactivation totale de l'**AdoHcy** hydrolase peut être obtenue dans chaque cas à des concentrations de 140  $\mu\text{M}$  pour **(Z)-4a** et 1,7  $\mu\text{M}$  pour **(E)-4a** (Figure 8, Graphiques A et B).

Les cinétiques d'inactivation de l'enzyme par le composé **(E)-4b** sont quant à elles du pseudo premier ordre et les représentations graphiques selon la méthode de Kitz et Wilson qui permettent la détermination des paramètres cinétiques sont illustrées sur la Figure 8 (Graphiques C et D).

La représentation du logarithme du pourcentage de l'activité rémanente en fonction du temps de préincubation permet l'évaluation de la constante d'inactivation apparente  $k_{\text{obs}}$  pour chaque concentration en inhibiteur. La représentation en double réciproque de ces constantes de vitesse  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration en inhibiteur permet la détermination des valeurs des paramètres d'inactivation  $k_{\text{inact}}$  (constante d'inactivation apparente) et  $K_i$  (constante d'affinité) d'après la formule suivante :

$$\frac{1}{k_{\text{app}}} = \frac{1}{k_{\text{inact}}} + \frac{K_i}{k_{\text{inact}}} \frac{1}{[I]}$$

La détermination des paramètres cinétiques ( $K_i$  et  $k_{\text{inact}}$ ) par la méthode de Kitz et Wilson n'étant pas possible pour chacun des deux inhibiteurs **(E)-4a** et **(Z)-4a**, nous nous sommes contentés de déterminer les temps de demi-vie de l'enzyme lorsqu'elle est incubée en présence de chacun de ces deux inhibiteurs à des concentrations de 3,4 et 100  $\mu\text{M}$  respectivement.

Ces résultats ainsi que les paramètres cinétiques d'inactivation correspondant à l'analogue chloré **4b** sont rassemblés dans le Tableau 2.

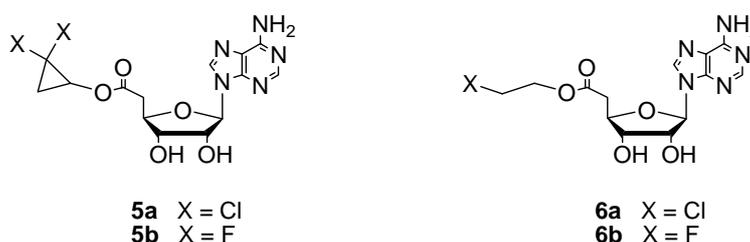
Composés	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{inact}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$k_{\text{inact}}/K_i$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )
((E)-4a)	-	-	$t_{1/2} = 10$ min. pour $[I] = 3,4 \mu\text{M}$	-
((Z)-4a)	-	-	$t_{1/2} = 6$ min. pour $[I] = 100 \mu\text{M}$	-
((E)-4b)	$17 \mu\text{M}$	$0,007 \text{ min}^{-1}$	$t_{1/2} = 164$ min pour $[I] = 5,4 \mu\text{M}$	411

Tableau 2

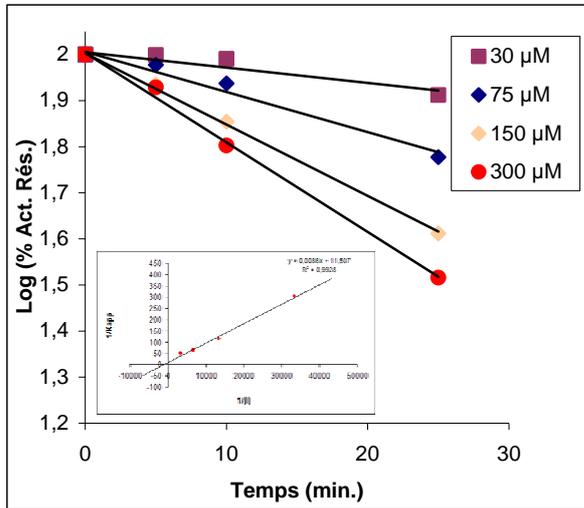
### 4.3 Inhibition de l'AdoHcy hydrolase par les esters nucléosidiques 5a-b et 6a-b : Cinétiques d'inhibition et détermination des paramètres cinétiques

Préalablement à l'évaluation du pouvoir inhibiteur de ces nucléosides sur l'activité de l'AdoHcy hydrolase, leur stabilité dans les milieux d'incubation a été contrôlée par HPLC. Ces différents esters sont stables et restent inchangés en solution dans un tampon phosphate 20 mM à pH = 7,5 pendant 24 heures.

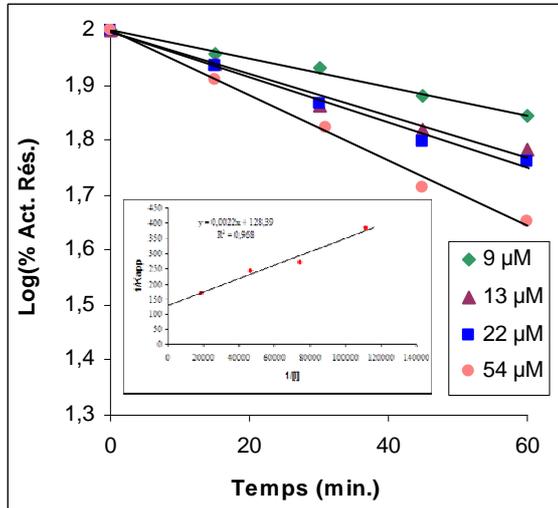
L'inactivation de l'AdoHcy hydrolase par les nucléosides 5a-b et 6a-b a été suivie comme précédemment à partir d'expériences de préincubation de l'enzyme en présence de concentrations variables en inhibiteurs. Dans tous les cas, la perte d'activité est également dépendante du temps et de la concentration en inhibiteur (vitesse d'inactivation du pseudo 1<sup>er</sup> ordre).



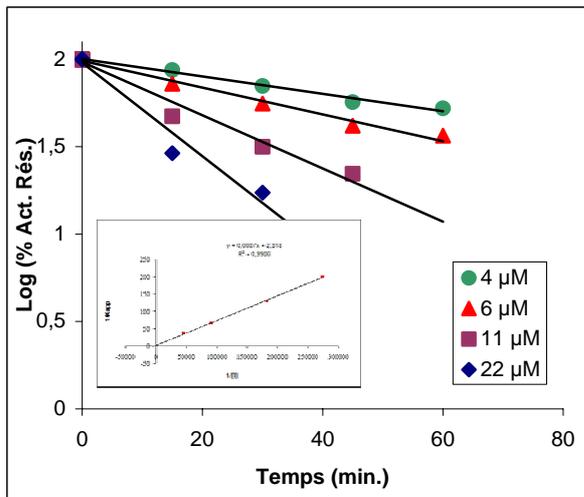
Les représentations graphiques de ces cinétiques d'inhibition sont illustrées sur la Figure 9 et la méthode de Kitz et Wilson a été une nouvelle fois appliquée pour la détermination des paramètres d'inactivation  $K_i$  et  $k_{\text{inact}}$  pour chacun des inhibiteurs étudiés. Ces résultats sont rassemblés dans le Tableau 3.



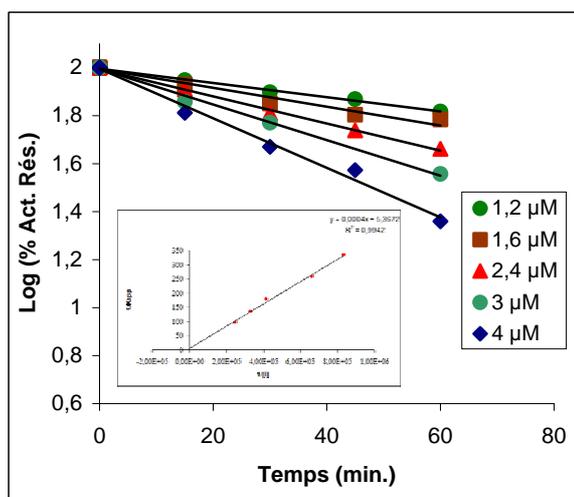
Composé 5a



Composé 5b



Composé 6a



Composé 6b

Figure 9 : Cinétique d'inactivation de l'AdoHcy hydrolase par les composés 5a-b et 6a-b, détermination des paramètres cinétiques  $K_i$  et  $k_{inact}$ .

Composés	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{inact}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{inact}}/K_i$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )
(5a)	750 $\mu\text{M}$	0,08 $\text{min}^{-1}$	107
(5b)	17 $\mu\text{M}$	0,008 $\text{min}^{-1}$	470
(6a)	302 $\mu\text{M}$	0,43 $\text{min}^{-1}$	1424
(6b)	75 $\mu\text{M}$	0,186 $\text{min}^{-1}$	2480

Tableau 3

Des cinq composés testés, le plus performant est le composé **6b**. Il ressort aussi de l'examen de ces résultats que les composés fluorés **5b** et **6b** sont plus efficaces que leurs analogues chlorés.

L'encombrement stérique des esters chlorés par rapport à leurs analogues fluorés justifie vraisemblablement la différence d'affinité observée.

#### 4.4 Irréversibilité du processus d'inactivation et effet de protection par le substrat pour les composés 4a-b, 5a-b et 6a-b

##### ➤ Irréversibilité :

L'activité de l'AdoHcy hydrolase totalement inactivée par les nucléosides **4a-b**, **5a-b** et **6a-b** n'est pas restaurée après une dialyse prolongée de 12 heures contre un tampon phosphate ce qui démontre sans ambiguïté l'irréversibilité du processus d'inactivation provoqué par chacun de ces inhibiteurs.

##### ➤ Effet de l'adénosine sur la vitesse d'inactivation de l'AdoHcy hydrolase (protection par le substrat) :

Dans deux essais menés en parallèle, l'AdoHcy hydrolase est préincubée avec chaque inhibiteur étudié en absence ou en présence d'adénosine à une concentration de 30  $\mu\text{M}$ . Après 20 minutes d'incubation, l'activité résiduelle de l'enzyme est mesurée. Les résultats de ces

expériences, résumées dans le Tableau 4, montrent clairement l'effet de protection par le substrat (adénosine) qui ralentit d'une façon très significative la vitesse d'inactivation de l'AdoHcy hydrolase par les inhibiteurs **5a-b** et **6a-b** utilisés en large excès (55-100  $\mu\text{M}$ ).

<b>Inhibiteur présent dans le milieu d'incubation</b> [concentration en $\mu\text{M}$ ]	<b>Adénosine (substrat)</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>Activité résiduelle de l'AdoHcy hydrolase en % mesuré après 20 min. d'incubation</b>
<b>(5a)</b> [66 $\mu\text{M}$ ]	0	79
	30	90
<b>(5b)</b> [100 $\mu\text{M}$ ]	0	89
	30	95
<b>(6a)</b> [55 $\mu\text{M}$ ]	0	15
	30	27
<b>(6b)</b> [66 $\mu\text{M}$ ]	0	7
	30	99

**Tableau 4 : Effet de protection par le substrat : l'AdoHcy hydrolase est incubée en présence des inhibiteurs 5a-b et 6a-b à des concentrations de 55 à 100  $\mu\text{M}$  et en absence ou en présence d'adénosine à une concentration de 30  $\mu\text{M}$ .**

*Ces différentes expériences permettent de préciser que le processus d'inactivation a bien lieu dans le site catalytique de l'enzyme.*

## 4.5 Etude du mécanisme d'inactivation

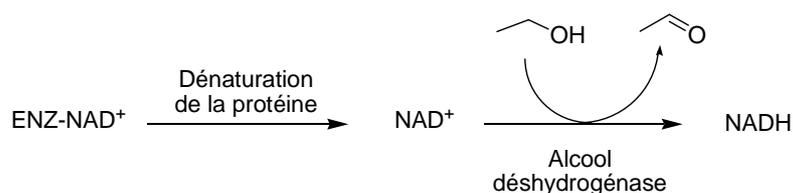
### 4.5.1 Interaction des inactivateurs 4a-b, 5a-b, 6a-b avec le cofacteur $\text{NAD}^+$ associé à l'AdoHcy hydrolase

Il était important à ce stade de notre étude de pouvoir préciser si le processus d'inactivation observé impliquait ou non l'oxydation de l'hydroxyle en C-3' des différents nucléosides testés ou, en d'autres termes, les inactivateurs étudiés sont-ils ou non substrat de « l'activité oxydative » de l'enzyme ?

Le dosage des cofacteurs **NAD<sup>+</sup>/NADH** présents dans l'enzyme native avant et après son inactivation est le moyen le plus direct pour mettre en évidence une implication de l'activité « oxydative » de l'enzyme dans le processus d'inactivation de l'**AdoHcy** hydrolase. Ce dosage a été effectué par une méthode de fluorescence décrite pour la première fois par Veron et collaborateurs<sup>[94]</sup>.

Dans ces expériences de dosage, les cofacteurs sont dissociés de l'enzyme native ou inhibée par dénaturation de la protéine par l'éthanol. Après séparation de la partie protéique qui précipite, le **NADH** libéré est directement dosé par fluorescence à 460 nm après excitation à 340 nm.

Le **NAD<sup>+</sup>** présent dans la protéine, et libéré comme le **NADH** pendant l'étape de dénaturation, ne peut quant à lui être dosé directement par cette méthode. Il doit être préalablement converti en sa forme réduite **NADH** par l'alcool déshydrogénase en présence d'éthanol selon le schéma suivant :



**Schéma 39**

L'utilisation de cette méthode n'est plus possible lorsque l'inactivateur étudié exhibe un spectre de fluorescence proche de celui du **NADH**. C'est le cas des dérivés **4a-b**.

Dans les expériences d'inactivation de l'enzyme avec ces deux derniers nucléosides, les variations du contenu en cofacteurs ont été déterminées par un dosage en **HPLC** du **NAD<sup>+</sup>** et du **NADH** libérés après dénaturation de l'enzyme (voir la partie expérimentale).

Ce dosage chromatographique étant moins sensible que celui réalisé par la méthode de fluorescence, nous avons choisi d'utiliser pour ces dernières expériences une hydrolase préalablement transformée en holoenzyme contenant 100% de **NAD<sup>+</sup>** pour déterminer les variations en **NAD<sup>+</sup>/NADH** au cours du processus d'inactivation par **4a-b**. La préparation du complexe **Enz-NAD<sup>+</sup>**, détaillée dans la partie expérimentale, nécessite : la dénaturation de l'enzyme native en milieu acide (pH = 3,0) pour l'extraction des deux formes du cofacteur, la

réactivation de l'apoenzyme et sa purification suivie de son incubation en présence de  $\text{NAD}^+$ . L'activité spécifique de l'**AdoHcy** hydrolase ainsi obtenue est optimum.

### **Résultats :**

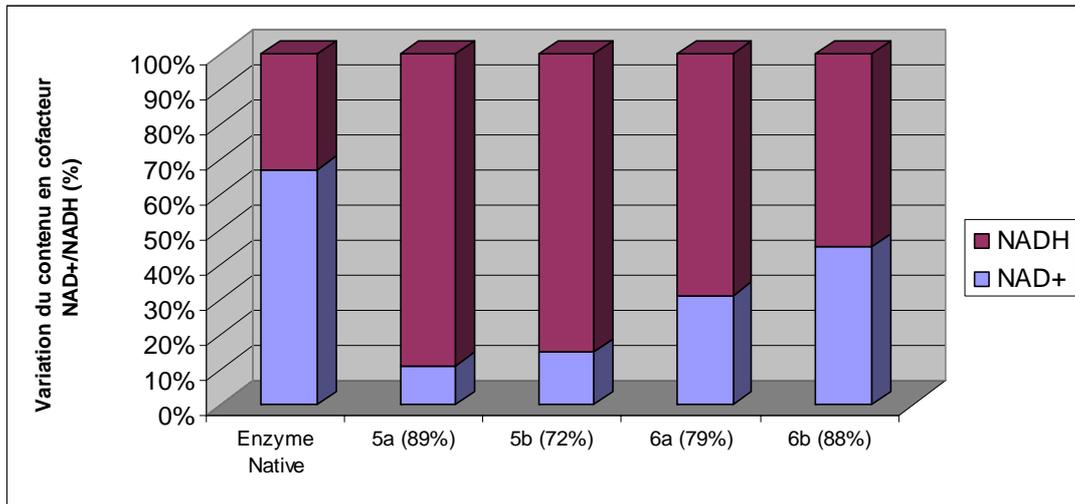
Le cofacteur dans l'enzyme native se trouve sous les deux formes  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  dans les proportions 70/30 (Référence Graphique 2A). Dans les expériences d'inactivation de l'enzyme native par les inhibiteurs **5a-b** et **6a-b**, en tenant compte du pourcentage d'inactivation de l'enzyme à l'instant du dosage, les résultats obtenus (Graphique 2A) démontrent sans ambiguïté que l'enzyme native est transformée à plus de 88% en sa forme réduite **Enz-NADH**. Ceci démontre clairement l'implication prépondérante du processus d'oxydation dans le mécanisme d'inactivation.

Avec les inhibiteurs **4a-b**, seule une transformation  $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$  partielle est observée (Graphique 2B). Dans ce dernier cas, on peut donc conclure que l'activité oxydative de l'enzyme dans le processus d'inactivation par **4a-b** n'est pas le seul processus responsable de l'inactivation observée.

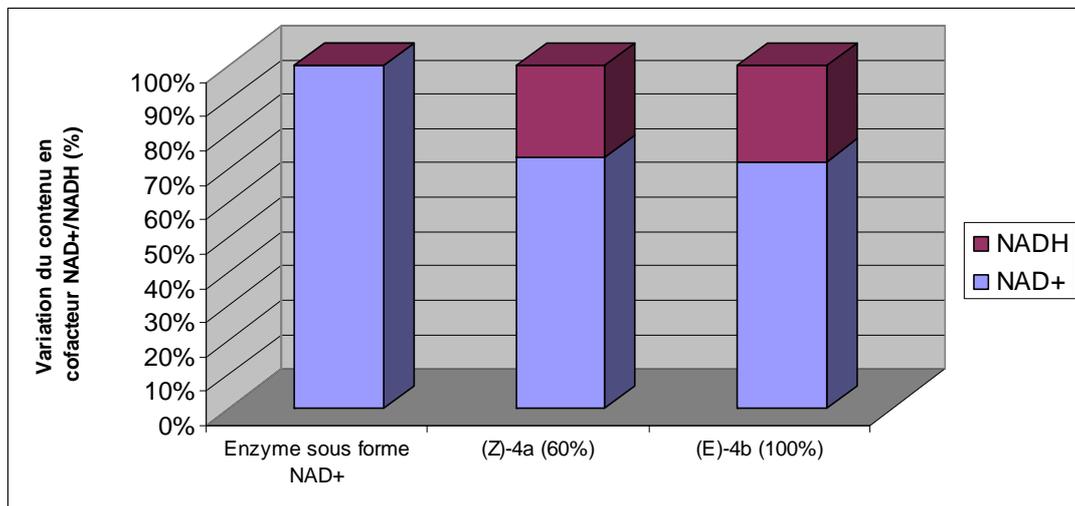
La bonne reconnaissance catalytique des inhibiteurs **5a-b** et **6a-b** vis-à-vis de « l'activité oxydative » de l'enzyme et les cinétiques d'inactivation du pseudo premier ordre observées avec ces inhibiteurs sont en faveur d'un comportement de **type I** (Schéma 40, voie A). Cependant l'implication de « l'activité oxydative » dans le processus d'inhibition n'exclue pas de fait la possibilité de l'activation de ces inhibiteurs par « l'activité hydrolytique » de l'enzyme pour conduire à une marquage covalent tel qu'il est aussi illustré sur le Schéma 40 voie B.

Par contre, les cinétiques biphasiques observées avec les cyanovinylnucléosides **(E)-4a** et **(Z)-4a** (Figure 8) ainsi que la mise en évidence d'une participation partielle du cofacteur  $\text{NAD}^+$  dans le processus d'inactivation provoqué par ces deux derniers inactivateurs suggèrent la participation de deux mécanismes concomitants, **type I** et **type II**.

**A**



**B**



**Graphique 2 : Variation du rapport NAD<sup>+</sup>/NADH associé à l'AdoHcy hydrolase native, sous forme NAD<sup>+</sup> ou après inactivation de l'enzyme par les inhibiteurs (E)-4a, (Z)-4a, (E)-4b, 5a-b et 6a-b. Le % d'inactivation de l'enzyme à l'instant du dosage est indiqué entre parenthèses.**

La spectrométrie de masse **ESI/MS** (électrospray) permet aujourd'hui de déterminer rapidement la pureté d'une protéine et de révéler par la mesure de sa masse moléculaire toute modification covalente pouvant être provoquée par un inhibiteur.

Une étude de l'**AdoHcy** hydrolase inactivée par les inhibiteurs irréversibles **(E)-4a**, **(Z)-4a** et **(E)-4b** pour lesquels différents processus d'inactivation sont possibles a donc été envisagée pour trancher entre les différentes propositions mécanistiques.

La mise en œuvre de ces expériences nécessite de disposer de quantités importantes d'enzyme purifiée (de 0,2 à 0,5 mg par expérience). Dans le développement de notre travail concernant cette série d'inhibiteurs, seule l'étude en spectrométrie de masse de l'**AdoHcy** hydrolase inactivée par **(E)-4a** a été réalisée jusqu'à présent.

Le travail a été réalisé par le docteur Serge Pilard (Laboratoire des Glucides, Université Picardie Jules Vernes à Amiens).

#### **4.5.2 Détermination des masses moléculaires de l'AdoHcy hydrolase native et inactivée par (E)-4a.**

La mesure précise de la masse moléculaire de l'**AdoHcy** hydrolase par **ESI/MS** est possible à partir des ions multichargés de l'enzyme solubilisée dans des conditions dénaturantes (un mélange H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN / HCOOH : 49,5/49,5/1).

Le spectre multichargé de l'enzyme native correspondant à une sous unité est illustré ci-contre (Figure 10).

Celui de l'enzyme inactivée par **4a** est plus complexe, il correspond au spectre de la protéine de départ superposé à celui d'une enzyme modifiée de manière covalente.

La déconvolution de ce dernier spectre montre clairement la présence du pic moléculaire de l'**AdoHcy** hydrolase non modifiée ( $M = 47585 \pm 4$  Da) accompagné de celui de la protéine ayant subi au cours du processus d'inactivation une modification de sa masse moléculaire ( $M = 47977 \pm 8$  Da).

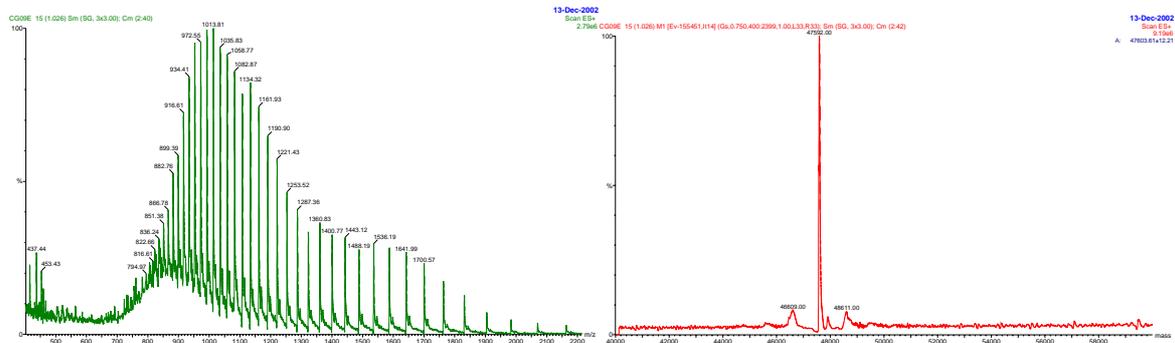


Figure 10 : Spectre ESI/MS de l'AdoHcy hydrolase native et sa déconvolution par le logiciel MAX-ENT

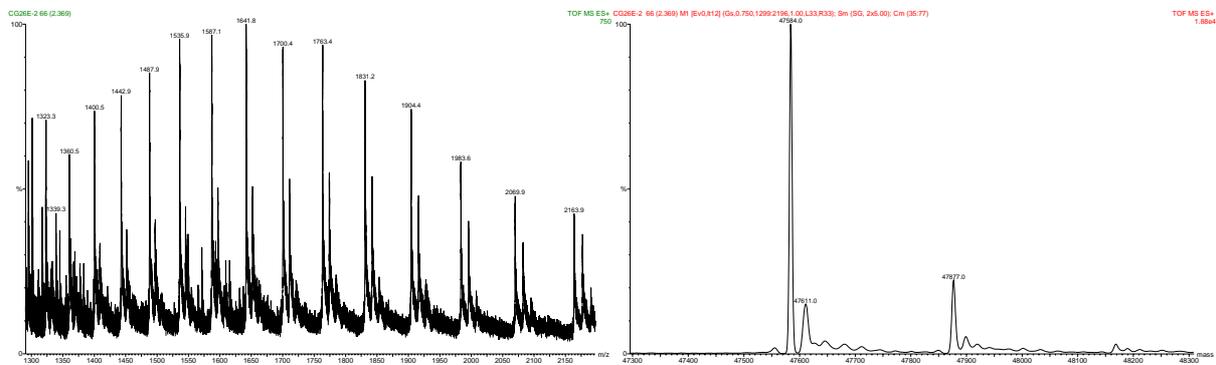


Figure 11 : Spectre ESI/MS de l'AdoHcy hydrolase inactivée par (E)-4a et sa déconvolution par le logiciel MAX-ENT

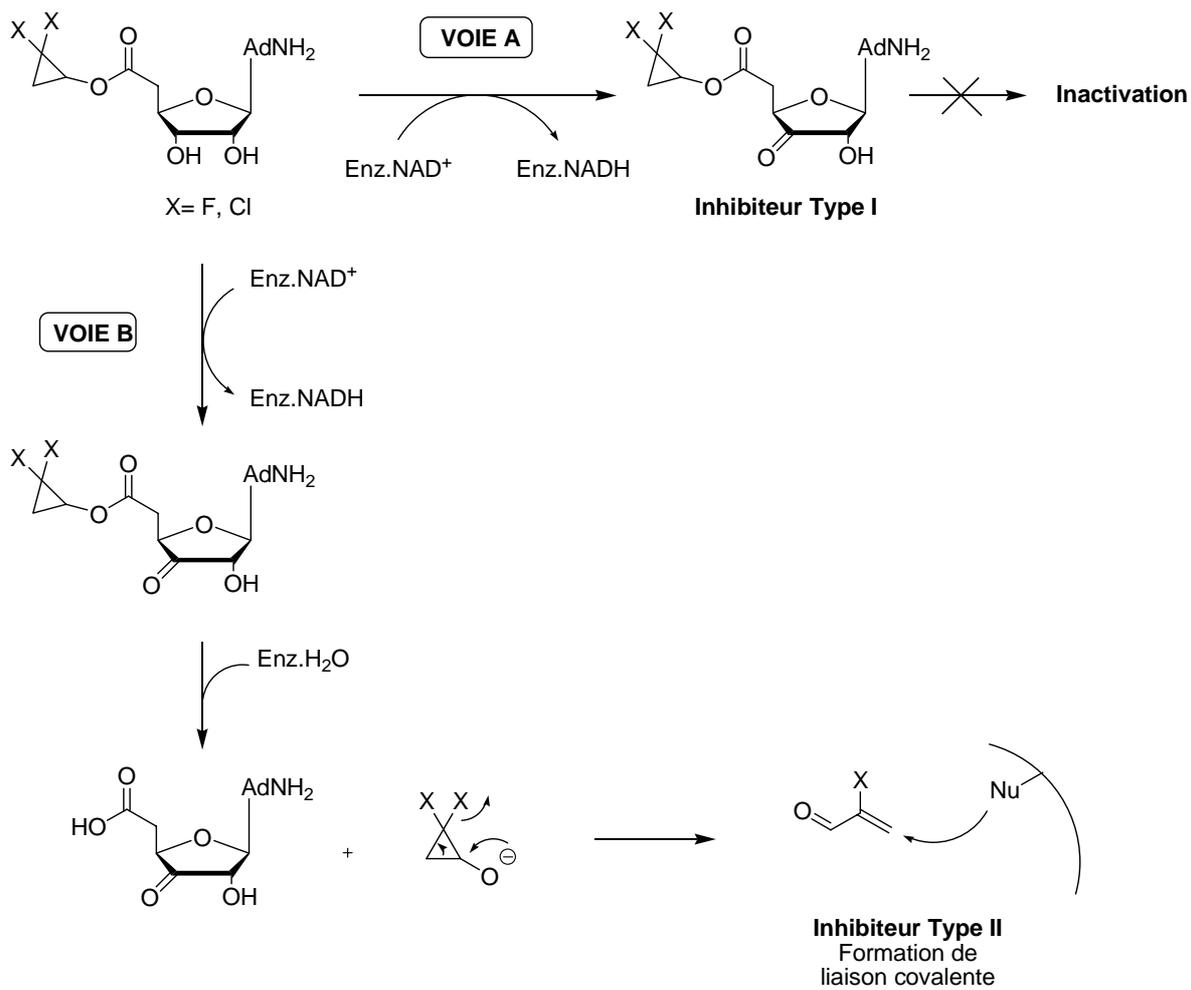


Schéma 40

L'incrément de masse  $\Delta M = 292 \pm 8$  Da correspond à la masse moléculaire de l'inhibiteur **(E)-4a** utilisé.

Ce résultat confirme la formation d'un adduit covalent entre l'inhibiteur et un résidu du site actif de l'enzyme par addition 1,2 ou 1,4 de celui-ci sur la fonction nitrile conjuguée.

Cette modification structurale n'étant que partielle, la participation des deux mécanismes d'inactivation illustrés sur le Schéma 41 peut être retenue pour expliquer le mode d'action de **(E)-4a**.

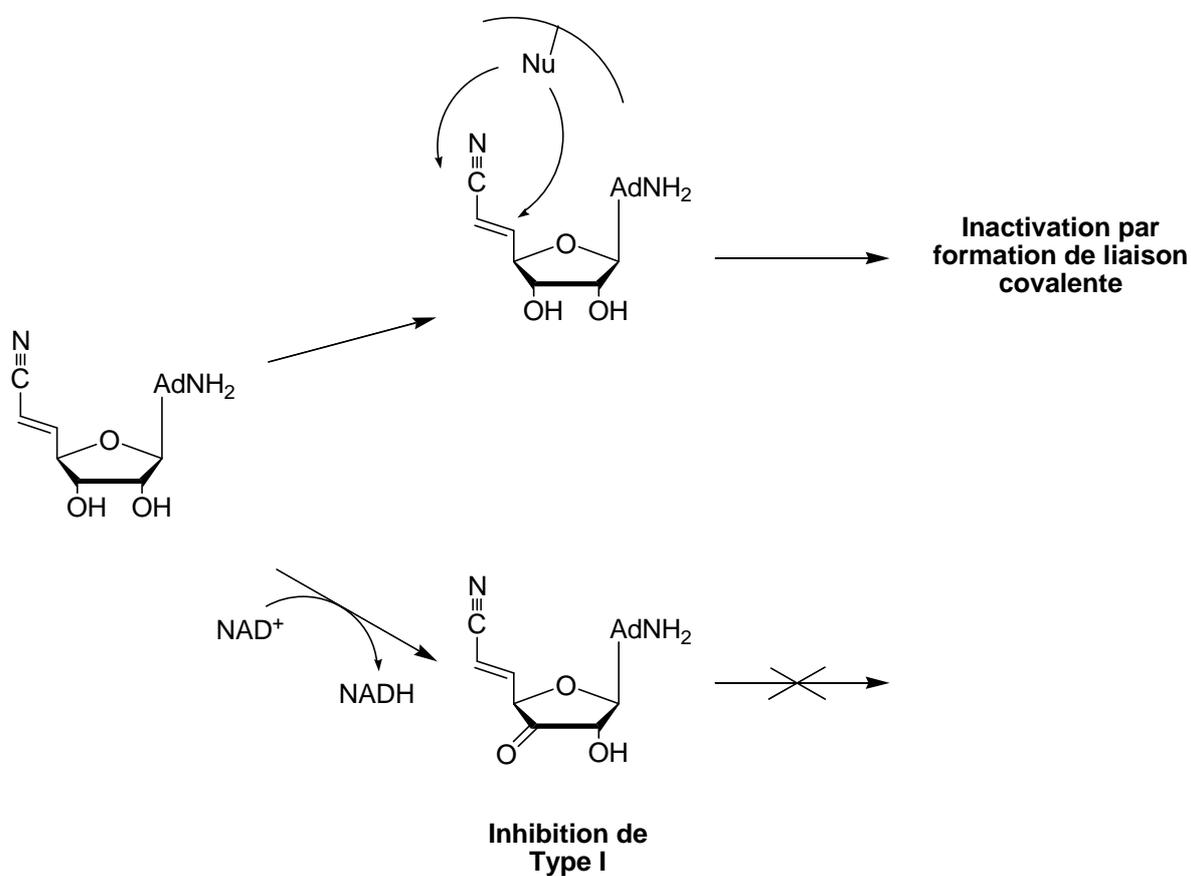


Schéma 41

## RESUME ET CONCLUSION

Dans cette première partie de notre travail, nous avons synthétisé et identifié trois nouvelles séries de nouveaux inactivateurs de l'**AdoHcy** hydrolase. Les études préliminaires concernant leur mode d'action démontrent que les cyanovinyladénosines **4a-b** et les esters dérivés de l'homoadénosine **5a-b** et **6a-b** sont tous substrats à des degrés divers de l'étape « oxydative » de l'enzyme.

Les premières expériences **ESI/MS** réalisées sur l'enzyme inactivée par **(E)-4a** montre que le processus d'inactivation de l'**AdoHcy** hydrolase est complexe. La réduction du complexe **Enz-NAD<sup>+</sup>** en sa forme réduite s'accompagne aussi de la formation partielle d'un adduit covalent. Les deux processus **type I** et **type II** semblent être impliqués dans l'inactivation totale de l'enzyme par ce dernier nucléoside.

L'étude en **ESI/MS** de l'enzyme inactivée par les deux autres analogues **(Z)-4a** et **(E)-4b** est en cours. Elle est particulièrement intéressante dans la mesure où elle permettra de vérifier si la configuration de la double liaison (Z ou E) ou l'introduction d'un atome de fluor peut modifier l'interaction de ces inhibiteurs avec les acides aminés nucléophiles du site actif de l'enzyme tel que nous l'avons suggéré (Schéma 19).

Les processus d'inactivation de l'**AdoHcy** hydrolase provoqués par les inhibiteurs **5a-b** et **6a-b** ont les caractéristiques d'une inhibition de **type I**. Toutefois, on ne peut exclure l'implication d'un processus de **type II** tel que nous l'avons formulé (Schéma 40). Seule une étude en spectrométrie de masse de la protéine inactivée par cette série de nucléosides permettra de préciser ce point.

L'évaluation des propriétés biologiques de ces nouveaux inhibiteurs de l'**AdoHcy** hydrolase est en cours.

## Chapitre 3

# **CONCEPTION ET EVALUATION DE NOUVEAUX INHIBITEURS COVALENTS DE L'AdoHcy HYDROLASE : CIBLAGE SPECIFIQUE DE LA CYSTEINE 195 DU SITE ACTIF**

## 1. ROLE DES CYSTEINES DANS L'ACTIVITE DE L'AdoHcy HYDROLASE

Après les travaux de Palmer et Abeles<sup>[27]</sup> concernant le mécanisme d'action de l'**AdoHcy** hydrolase et bien avant son clonage, sa cristallisation et l'obtention des premiers spectres de diffraction de rayons X de celle-ci, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'identification des acides aminés constitutifs de l'enzyme susceptibles de jouer un rôle dans l'une ou l'autre des trois étapes essentielles impliquées dans la catalyse.

En 1982, Fujioka et Coll. ont étudié l'inactivation de l'**AdoHcy** hydrolase du foie de rat par marquage des cystéines à l'[1-<sup>14</sup>C]-iodoacétamide<sup>[95]</sup>. Ils ont démontré que trois cystéines par sous unité pouvaient être modifiées par ce réactif. Pour expliquer l'inactivation résultante de l'enzyme, ces auteurs ont avancé l'hypothèse qu'une de ces cystéines pouvait participer, en tant que nucléophile, dans l'étape d'arrachement du proton en position 4'-C. Ces mêmes auteurs<sup>[96]</sup> ont également démontré que la 5'-*p*-fluorosulfonyl-benzoyladénosine (**FSBA**) pouvait jouer le rôle de marqueur d'affinité pour les cystéines situées dans le site actif de l'**AdoHcy** hydrolase ou proches de celui-ci.

En effet, l'incubation de l'enzyme avec le **FSBA** conduit à l'inactivation de l'enzyme mais cette fois il a été démontré que celle-ci ne résulte pas d'un marquage covalent par le réactif. Le **FSBA** favorise par contre la formation d'un pont disulfure entre des cystéines proches dans l'édifice tridimensionnel de la protéine.

Par la suite, les cystéines impliquées dans l'établissement de ponts disulfure ont été identifiées comme étant les cystéines Cys-52, Cys-78 et Cys-112 (**AdoHcy** hydrolase de foie de rat)<sup>[97]</sup>. Le marquage initial par le **FSBA** se faisant sur la cystéine Cys-112.

Des expériences de mutagenèse dirigée visant ces cystéines (substitution par une sérine S ou par une alanine A) ont démontré que seule la Cys-78 jouait un rôle important dans le maintien de l'activité de l'**AdoHcy** hydrolase. En effet, les mutants **C78S** et **C78A** montrent une activité largement réduite par rapport à l'activité de l'enzyme native. Les auteurs ont conclu que seule la structure de l'enzyme semblerait affectée par la modification de la Cys-78.

Plus récemment, une étude systématique du rôle des cystéines de l'**AdoHcy** hydrolase de placenta humain (soit 432 aminoacides contre 431 pour l'**AdoHcy** hydrolase de foie de rat) par modification chimique des cystéines accessibles au **DTNB** (acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)) et par mutagenèses dirigées a été effectuée. Cette dernière étude<sup>[57]</sup> a démontré que :

- trois cystéines sur les dix présentes dans chaque sous unité de l'enzyme sont marquées par le **DTNB**,
- ce marquage conduit à l'inactivation de l'enzyme,
- ces trois cystéines ont été identifiées comme étant les Cys-113, Cys-195 et Cys-421 (correspondant aux cystéines Cys-112, Cys-194 et Cys-420 de l'enzyme de foie de rat).
- l'adénosine, substrat de l'**AdoHcy** hydrolase, protège les Cys-113 et Cys-195 du marquage par le **DTNB**. Ces deux cystéines se situent donc dans ou près du site actif.

Les résultats ont été complétés par des expériences de mutagenèse dirigée visant les trois cystéines Cys-113, Cys-195 et Cys-421 (substitution par une sérine (S) ou par un aspartate (D)). Les résultats de cette étude démontrent que les Cys-113 et Cys-421 ne sont pas indispensables à l'activité enzymatique. Les mutants **C421S** et **C421D** possèdent respectivement une activité équivalente à celle de l'enzyme native.

La Cys-113, bien que se situant à proximité du site actif, ne semble pas impliquée dans l'acte catalytique : les mutants **C113S** et **C113D** gardent une activité similaire à celle de l'enzyme native.

Par contre la mutation de la Cys-195 par un aspartate (**C195D**) ou une sérine (**C195S**) affecte largement les paramètres cinétiques des réactions catalysées par l'enzyme. En particulier, chez les mutants correspondants (**C195D** et **C195S**), le potentiel de réduction du complexe **Enz-NADH•3'**-céto-adénosine (dernière étape du cycle catalytique) est considérablement réduit et par là même la régénération de l'enzyme sous sa forme **Enz-NAD<sup>+</sup>** ainsi que la libération du produit de réaction, l'adénosine.

Les auteurs suggèrent, à partir de ces résultats, que la Cys-195 pourrait jouer un rôle critique au niveau du cycle d'oxydoréduction interne du processus catalytique de l'**AdoHcy** hydrolase. L'hypothèse avancée est que la formation d'une liaison hydrogène entre la fonction

carbonyle en position 3' et la fonction thiol de la Cys-195 (3'-C=O...HSCys 195) devrait favoriser le transfert d'électron ou d'hydrure à partir du cofacteur **NADH**.

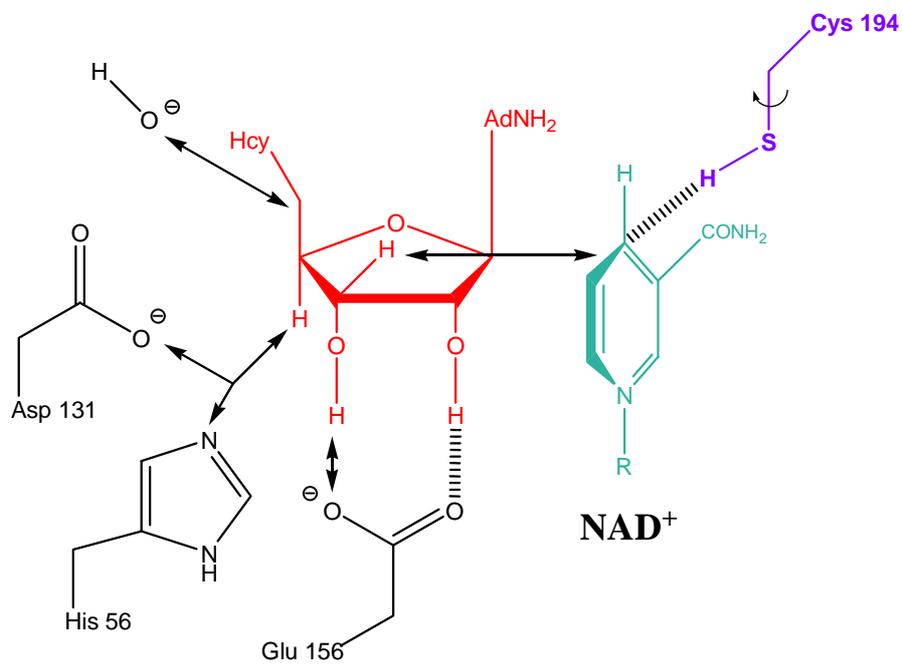
De même, dans le processus inverse d'oxydation, l'établissement d'une liaison hydrogène entre ce même thiol et le groupement hydroxyle en position 3'-C (3'-C-OH) pourrait aussi aider largement le transfert d'électrons ou d'hydrure de la position 3'-C sur le cycle pyridinium du **NAD<sup>+</sup>**.

Cette hypothèse n'est pas en contradiction avec les données cristallographiques obtenues récemment par Takusagawa et collaborateurs qui ont obtenu pour la première fois les spectres de diffraction des rayons X de la protéine cristallisée et décrit la structure de l'**AdoHcy** hydrolase de foie de rat<sup>[61]</sup> avec une précision inférieure à 3Å permettant la localisation précise des différentes cystéines et l'interprétation de leur fonction au niveau de l'activité enzymatique.

La Cys-194 (équivalente à la cystéine 195 de l'**AdoHcy** hydrolase recombinante de placenta humain) se situe bien dans le site actif de l'enzyme (Schéma 42). Son rôle, déduit cette fois des données structurales concernant l'**AdoHcy** hydrolase associées à des expériences de modélisation moléculaire (docking du substrat **AdoHcy** dans le site actif), s'exercerait au niveau du processus oxydatif de l'enzyme comme l'illustre le schéma ci-contre qui décrit les interactions supposées des aminoacides du site actif avec le substrat durant l'acte catalytique.

Avant l'étape d'oxydation, la Cys-194 stabilise la forme oxydée du cofacteur **NAD<sup>+</sup>** dans le site actif. Le processus d'oxydation est amorcé lorsque la Cys-194 s'éloigne du carbone 4-C du **NAD<sup>+</sup>** par rotation de la liaison carbone-soufre ce qui a pour conséquence d'augmenter le potentiel d'oxydation du **NAD<sup>+</sup>** et faciliter le transfert du proton en position 3'-C. L'acide glutamique (Glu-156), quant à lui, assurerait l'activation de groupe hydroxyle en position 3'-C. L'ensemble de ces données souligne l'importance de la cystéine localisée dans le site actif dans le processus catalytique (Cys 194 pour l'enzyme de foie de rat et Cys 195 pour l'enzyme de placenta humain).

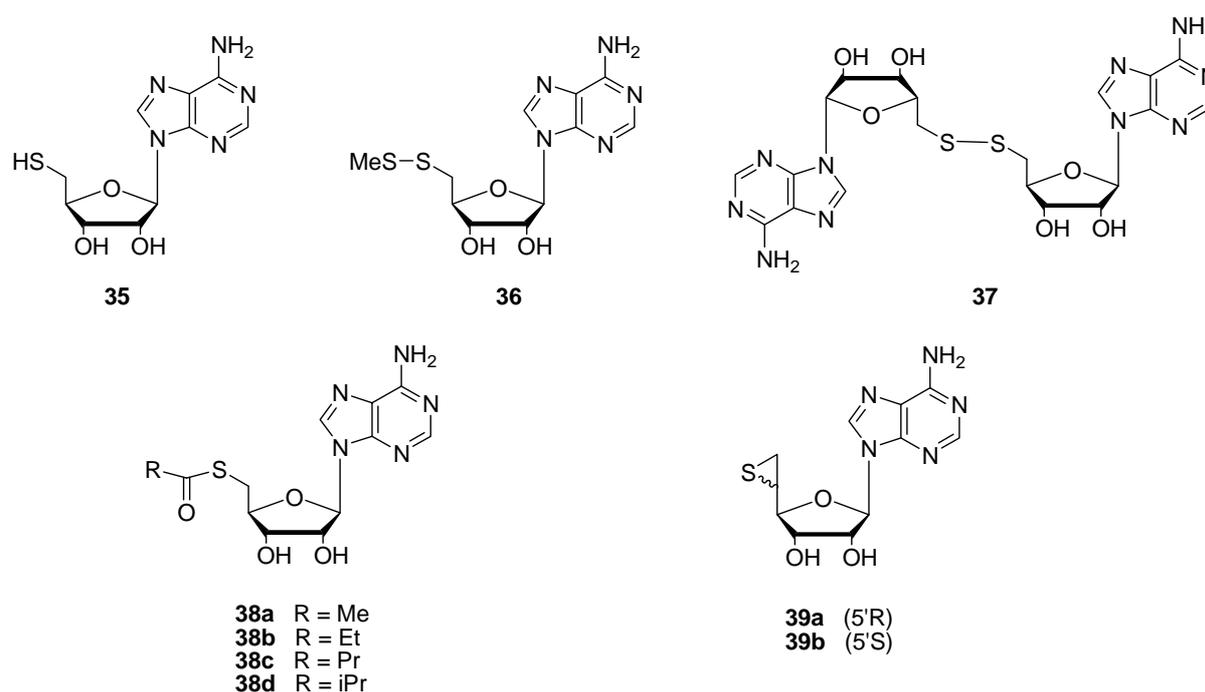
*Ces différentes considérations suggèrent que la modification spécifique de cette cystéine 195 à l'aide de nouveaux analogues du substrat (l'adénosine) pourrait déboucher sur une nouvelle stratégie pour altérer ou stopper le cycle catalytique de l'AdoHcy hydrolase de façon irréversible. L'étude de cette nouvelle stratégie d'inhibition sera développée dans ce troisième chapitre à partir d'une nouvelle série de thionucléosides.*



**Schéma 42 : Rôle de la Cys 194 dans l'étape oxydative de l'AdoHcy hydrolase du foie de rat selon Takusagawa and al. (Biochemistry, 1999, 38(26), 8323-8333).**

## 2. INHIBITION DE L'AdoHcy HYDROLASE PAR CIBLAGE DE LA CYSTEINE CYS-195

Les nucléosides choisis pour modifier la cystéine Cys-195 sont les 5'-désoxy-5'-thioadénosine **35**, adénosine 5'-désoxy-5'-méthylsulfure **36**, bis(5'-désoxy-5'-thioadényl)disulfure **37**, 5'-S-alcanoylthio-5'-désoxyadénosine **38** et les (5'R) et 5'-désoxy-(5'S)-épi-thioadénosines **39** dont les structures sont illustrées ci-dessous (Schéma 43).



**Schéma 43**

↳ Les analogies structurales de ces nucléosides avec le substrat laissent penser que ces différents dérivés de l'adénosine devraient se fixer facilement au site de binding de l'AdoHcy hydrolase (forme ouverte). Dans la forme fermée résultante de l'enzyme, le rapprochement de la Cys-195 (ou Cys 194 pour l'enzyme de foie de rat) devrait permettre la formation de liaison covalente avec ces thionucléosides (ponts disulfures) soit directement avec la fonction thiol portée par l'inhibiteur **35** (processus d'oxydation) soit par l'intermédiaire d'une réaction de transulfuration avec les disulfures **36** et **37** comme nous l'avons illustré dans le Schéma 44.

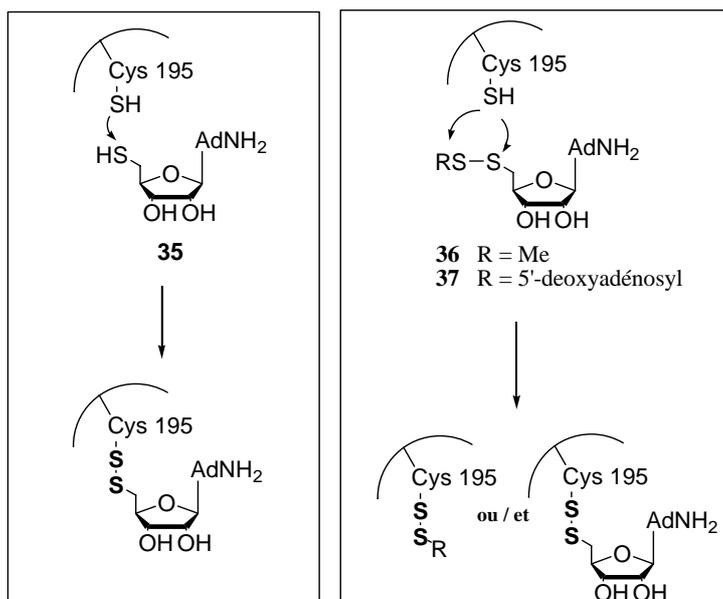


Schéma 44 : Interactions possibles des thionucléosides 35, 36 et 37 avec la cystéine du site actif.

↪ Le même type de modification de la cystéine du site actif pourrait être également provoqué à l'aide de proinhibiteurs, substrats préalables de l'activité hydrolytique de l'enzyme.

L'hydrolyse des 5'-S-alcanoylthio-5'-désoxyadénosine **38** (Schéma 45) devrait être capable de libérer dans le site actif de l'enzyme la 5'-désoxy-5'-thioadénosine **35** ou différents thiols avec lesquels l'interaction avec la Cys-195 est également envisageable comme nous l'avons décrit précédemment.

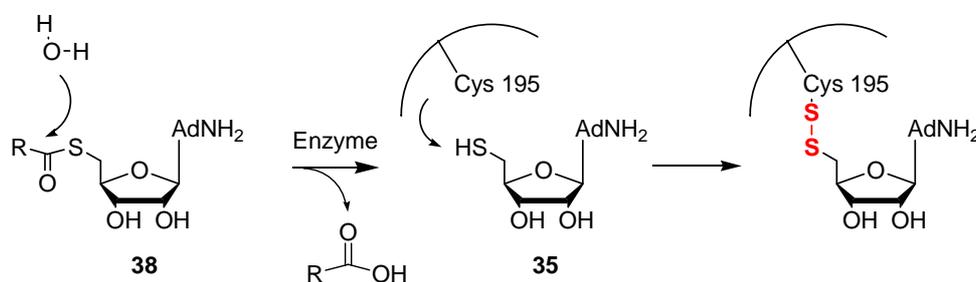


Schéma 45

Des résultats antérieurs du laboratoire sont en faveur d'une telle hypothèse. La 5'-désoxy-5'-thioacétyladénosine a déjà été identifiée comme un inhibiteur irréversible de l'**AdoHcy** hydrolase<sup>[98]</sup>.

Un deuxième type de proinhibiteurs ciblant l'activité de l'**AdoHcy** hydrolase peut être envisagé. L'ouverture des (5'R) et (5'S)-désoxy-5'-épithioadénosines **39** (Schéma 46) catalysée par l'enzyme (activité hydrolytique) devrait conduire à un résultat similaire.

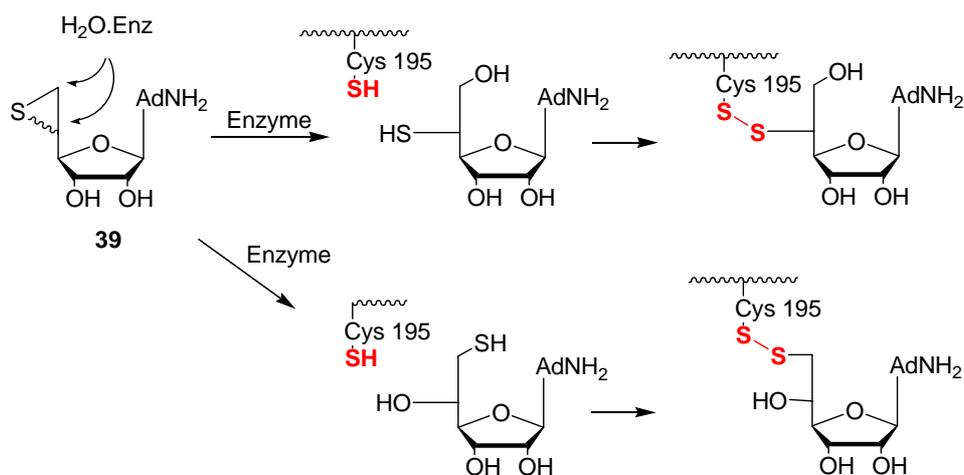


Schéma 46

*Nous avons souhaité étudier ces différentes hypothèses mécanistiques concernant l'inactivation de l'AdoHcy hydrolase par les thionucléosides 35-39 en synthétisant ces différents thionucléosides et en étudiant leur mode d'action sur l'enzyme.*

### 3. SYNTHÈSES

L'adénosine 5'-méthylsulfure **36** nous a été fournie par le laboratoire du Professeur Jean Luc Decout (Faculté de Pharmacie, Université J. Fournier, Grenoble I).

#### 3.1 Synthèse de la 5'-désoxy-5'-thioadénosine **35**

La 5'-désoxy-5'-thioadénosine **35** est préparée par hydrolyse basique de la 5'-acétylthio-5'-désoxyadénosine **38a**. Ce composé s'est révélé un intermédiaire de choix pour la formation du thiol ou du thiolate correspondant. Il existe plusieurs voies d'accès à ce thioester.

Une méthode souvent utilisée consiste à activer la position 5' par chloration<sup>[41]</sup> ou tosylation<sup>[99]</sup> de l'adénosine. Le déplacement nucléophile de l'un ou l'autre de ces groupements par le thioacétate de potassium conduit à la 5'-acétylthio-5'-désoxyadénosine **38a** (Schéma 47).

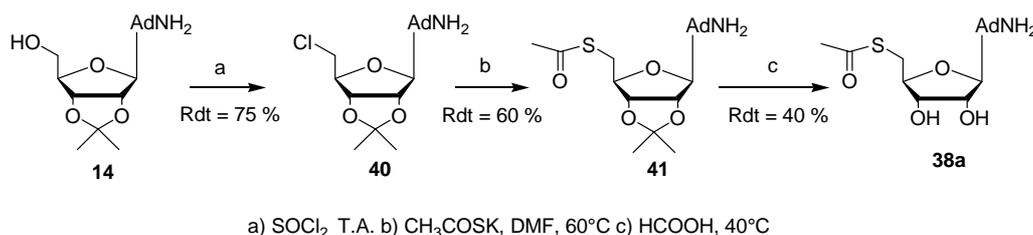


Schéma 47

Pour notre part nous avons choisi une méthode plus récente utilisant la réaction de Mitsunobu<sup>[100]</sup> mettant en jeu la 2',3'-O-isopropylidène adénosine et l'acide thioacétique suivie d'une étape de déprotection douce de la fonction isopropylidène (Schéma 48).

L'ammonialyse sous argon de la 5'-acétylthio-5'-désoxyadénosine **38a** conduit à la 5'-désoxy-5'-thioadénosine **35**.

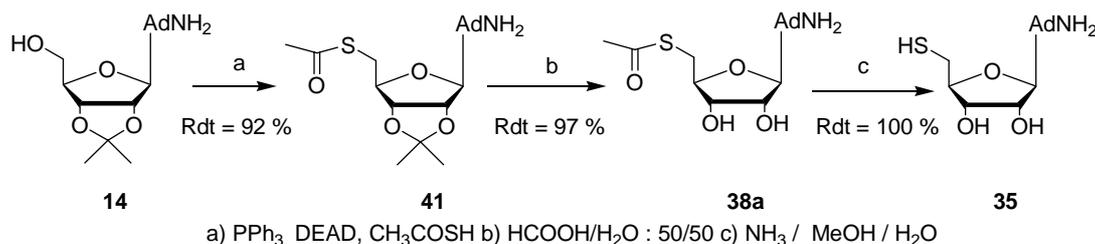
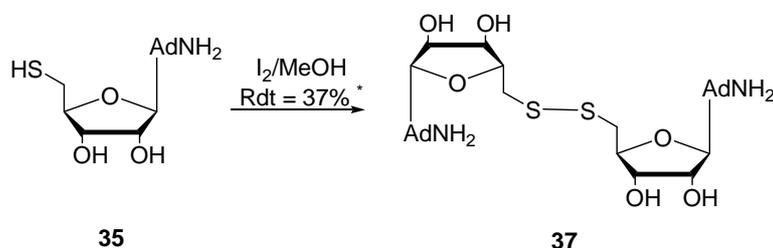


Schéma 48

### 3.2 Synthèse du bis(5'-désoxy-5'-thioadényl) disulfure 37

Le bis(5'-désoxy-5'-thioadényl) disulfure **37** est préparé par oxydation par l'iode de la 5'-désoxy-5'-thioadénosine<sup>[101]</sup> en solution dans le méthanol.

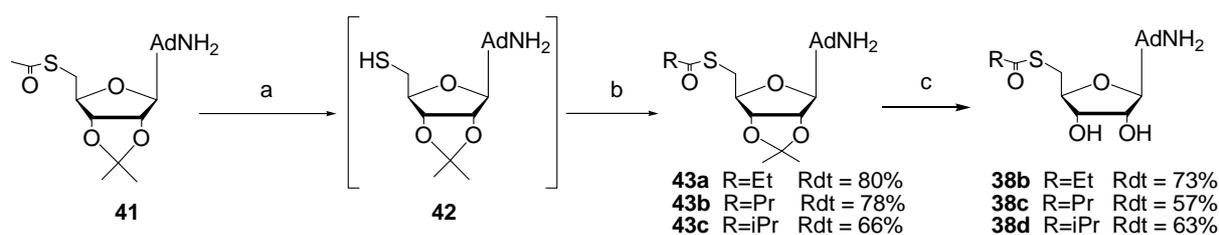


\* Rendement après recristallisation

Schéma 49

### 3.3 Synthèse des 5'-S-alcanoylthio-5'-désoxyadénosines 38b-d

Les anhydrides d'acides éthanoïque, propanoïque et isopropanoïque étant commerciaux la voie choisie pour la préparation des 5'-S-alcanoylthio-5'-désoxyadénosines **38b-d** met en jeu une réaction d'addition du thiolate correspondant à la 2',3'-O-isopropylidène-5'-désoxy-5'-thioadénosine **42** sur les différents anhydrides. La déprotection des thioesters **43a-c** est réalisée par l'acide formique aqueux.



a) NH<sub>3</sub> / MeOH b) (RCO)<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, DMF c) HCOOH / H<sub>2</sub>O : 50/50

Schéma 50

### 3.4 Synthèse des (5'S) et (5'R)-désoxy-5'-épithioadénosines 39a-b

Il existe de nombreuses méthodes de préparation des thiiranes mais parmi toutes ces méthodes de synthèses, les plus importantes restent celles qui mettent en jeu la conversion d'époxyde par la thiourée<sup>[102]</sup>, les thiocyanates<sup>[103, 104]</sup> et les thiophosphines<sup>[105]</sup> (Schéma 51).

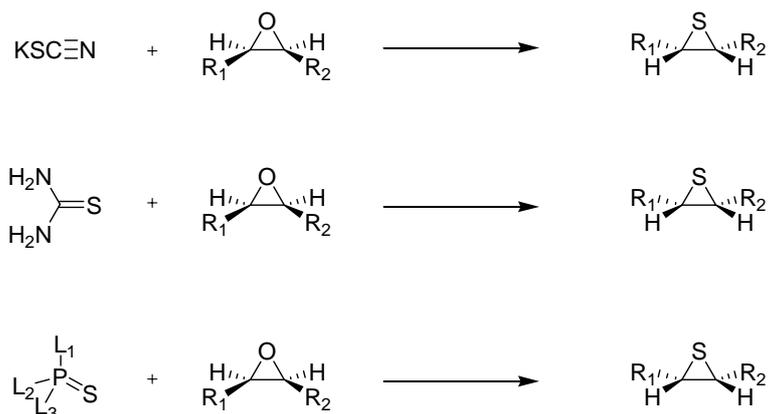


Schéma 51

La synthèse des (5'S) et (5'R)-désoxy-5'-épithioadénosines 39a-b a, dans un premier temps, été entreprise à partir de l'adénosine en suivant le chemin rétrosynthétique suivant :

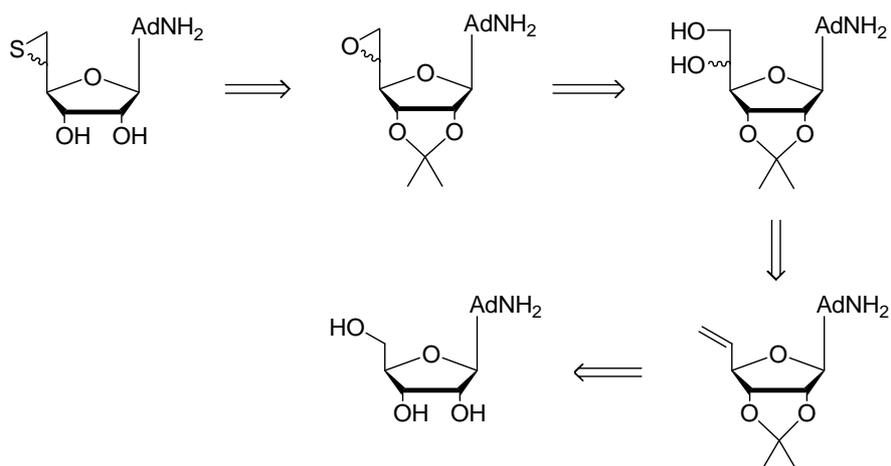


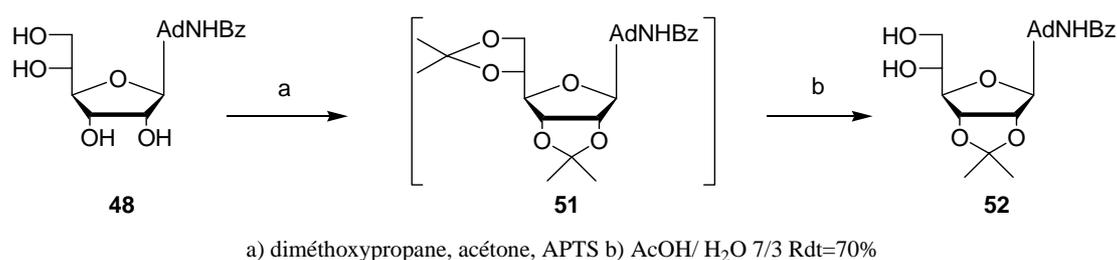
Schéma 52

Si l'accès à la 5'-vinyl-5'-désoxyadénosine en 5 étapes à partir de l'adénosine via une réaction de Wittig sur l'aldéhyde correspondant ne pose pas de problème, la dihydroxylation stéréosélective de ce nucléoside vinylique (méthode de Sharpless<sup>[106, 107]</sup>) par l'AD-mix  $\alpha$  ou de l'AD-mix  $\beta$  n'a pas permis de réaliser la synthèse des diols stéréoisomères correspondant dans de bonnes conditions.

La synthèse des (5'S) et (5'R)-désoxy-5'-épithioadénosines **39a-b** a donc été réalisée à partir d'un chemin réactionnel plus classique utilisant un sucre dérivés du glucose sur lequel on couple la base adénine (méthode de Vorbrüggen<sup>[108, 109]</sup>) pour conduire à la N<sup>6</sup>-benzoyl-9 $\beta$ -D-allofuranosyl adénine qui servira d'intermédiaire pour la synthèse des deux épisulfures **39a-b**.

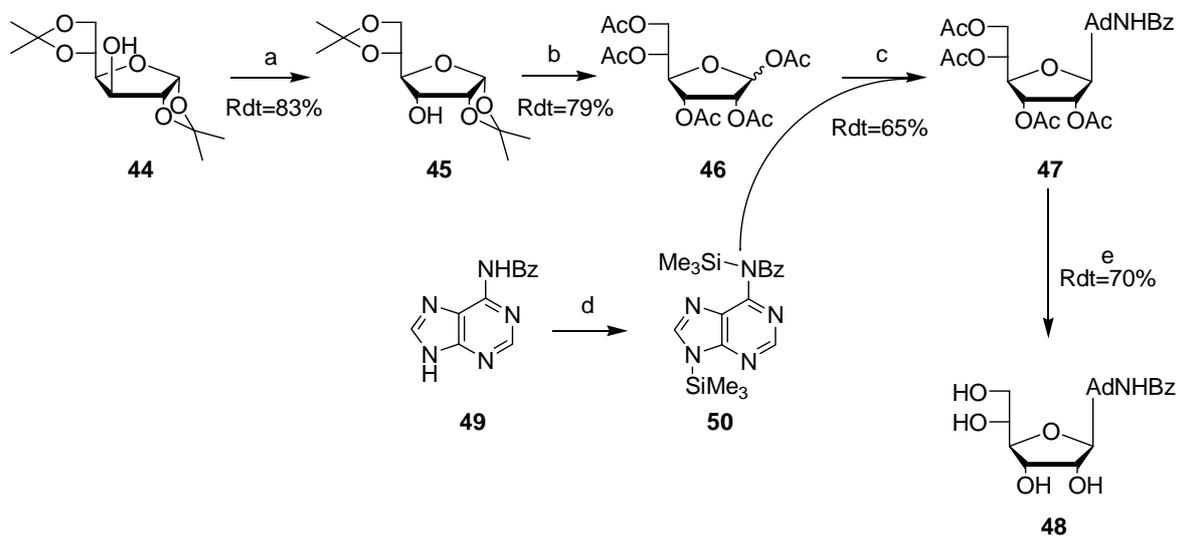
Les différentes étapes de cette synthèse à partir du diacétone-D-glucose sont illustrées ci-contre (Schéma 54).

La protection des hydroxyles en position 2' et 3' est essentielle pour effectuer les aménagements fonctionnels sur les hydroxyles en position 5' et 6.' Cette opération est effectuée en deux étapes. Après formation des acétonides en position 2',3' et 5',6', le groupement isopropylidène en 5',6' est déprotégé sélectivement en milieu acide acétique (Schéma 53).



**Schéma 53**

A partir de la N<sup>6</sup>-benzoyl-2',3'-O-isopropylidène-9 $\beta$ -D-allofuranosyl adénine **52**, deux chemins réactionnels illustrés ci-dessous (Schéma 55 et Schéma 56) ont permis respectivement d'effectuer la synthèse des épisulfures de configuration R et S.

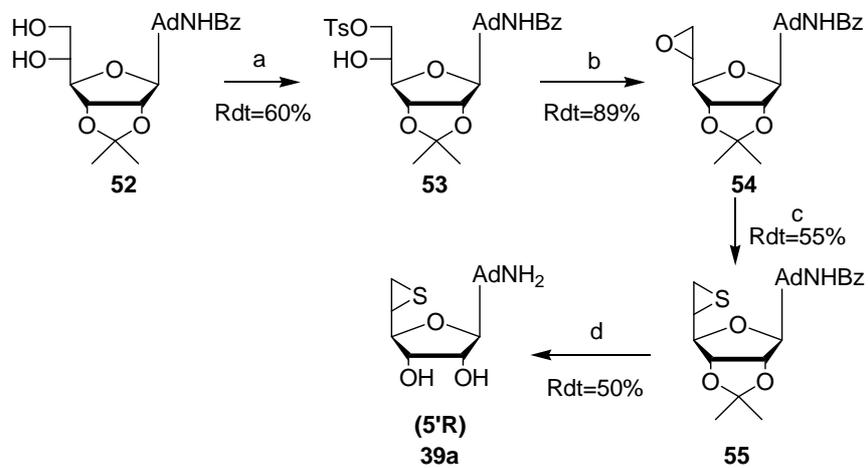


a) PDC puis  $\text{NaBH}_4$  b)  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , APTS c)  $\text{SnCl}_4$  d) HMDS, quantitatif e)  $\text{NaOH}$  2M, EtOH

Schéma 54

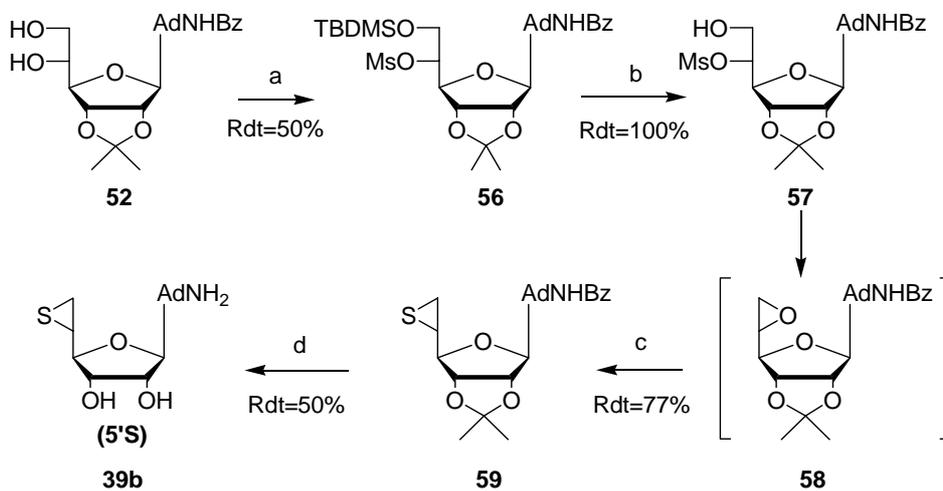
Pour accéder à l'épithioadénosine de configuration R en position 5', l'hydroxyle en position 6' est tosylé. Le tosylate **53** correspondant traité par l'hydrure de sodium conduit à un déplacement nucléophile intramoléculaire conduisant à la formation de la (5'S)-N<sup>6</sup>-benzoyl-5'-désoxy-5'-époxy-2',3'-O-isopropylidène adénosine **54**. La condensation de la thiourée conduit à l'épithioadénosine souhaitée par un processus stéréochimiquement contrôlé<sup>[102]</sup> procédant par inversion de la configuration du carbone C-5'. La déprotection de l'azote N<sup>6</sup> et des groupes hydroxyles en 2' et 3' est réalisée par des méthodes standard (Schéma 55).

Pour obtenir l'autre épimère en C<sub>5</sub>, la fonction hydroxyle en position 6' est protégée préalablement par un groupement tert-butyldiméthylsilyle. L'hydroxyle en position 5' peut alors être mésylé. La déprotection de la position 6' du tert-butyldiméthylsilyle par le TBAF conduit au déplacement nucléophile du groupement mésyle avec inversion de la configuration du carbone C<sub>5</sub>. Comme précédemment, le traitement de cet époxyde par la thiourée permet d'obtenir l'épithioadénosine de configuration (5'S) (Schéma 56).



a) TsCl, pyridine b) NaH, THF c) thiourée, MeOH d) 1. HCOOH/H<sub>2</sub>O : 4/1  
2. MeONa, MeOH

Schéma 55



a) 1. tBDMSCl, imidazole, pyridine 2. MsCl, pyridine b) TBAF, THF c) thiourée, MeOH  
d) 1. HCOOH/H<sub>2</sub>O : 4/1 2. MeONa, MeOH

Schéma 56

## 4. INHIBITION DE L'AdoHcy HYDROLASE PAR LA SERIE DES THIONUCLEOSIDES 35-39

Le pouvoir inhibiteur de chacun des thionucléosides **35-39** préparés précédemment a été testé dans le sens synthétique sur l'activité de l'AdoHcy hydrolase recombinante de placenta humain purifiée jusqu'à homogénéité.

### 4.1 Cinétiques d'inhibition et détermination des paramètres cinétiques

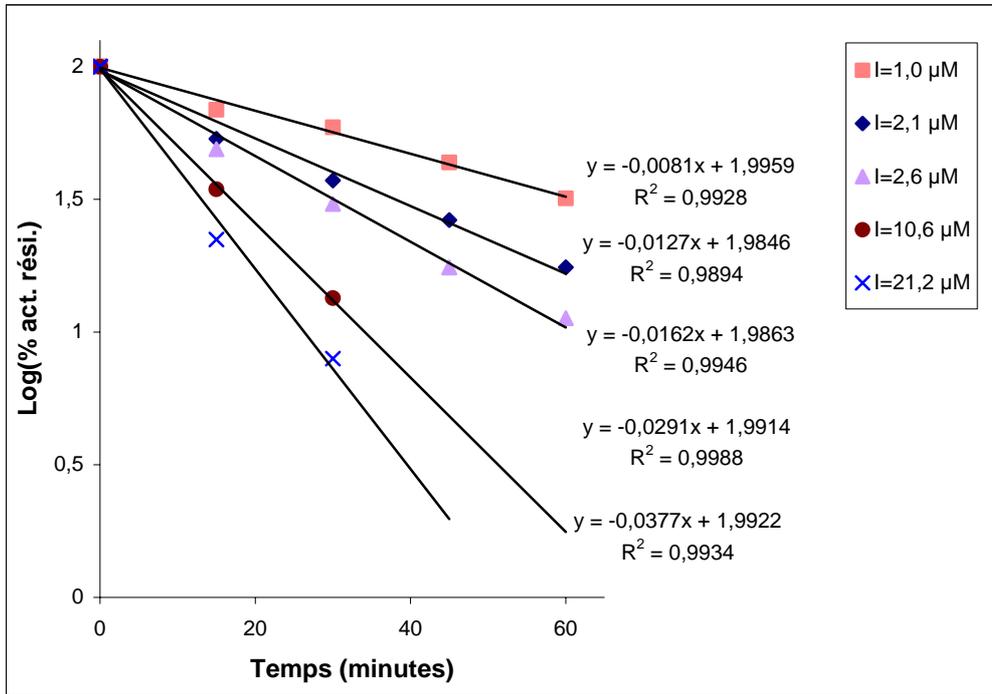
L'inactivation de l'AdoHcy hydrolase par les nucléosides **35-39** a été suivie, comme précédemment, à partir d'expériences de préincubation de l'enzyme en mesurant l'activité résiduelle de l'enzyme en fonction du temps en présence de concentrations variables en inhibiteurs.

Tous les inhibiteurs testés ont montré des cinétiques d'inhibition dépendantes du temps et de la concentration en inhibiteur. A titre d'exemple les représentations graphiques de ces cinétiques, obtenues dans les expériences d'inactivation de l'enzyme par le nucléoside **35** sont illustrées sur la Figure 12. La méthode de Kitz et Wilson<sup>[110]</sup> déjà décrite dans le chapitre précédent a permis la détermination des paramètres cinétiques  $K_i$  (constante d'affinité) et  $k_{inact}$  (constante d'inactivation apparente). L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le tableau ci-dessous.

Composé	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{inact}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{inact}/K_i$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )
(35)	4	0,04	10000
(36)	19	0,05	2631
(37)	96	0,05	520
(38c)	24	0,02	833
(38d)	15	0,01	667
(39a)	105	0,10	952
(39b)	50	0,03	600

Tableau 5 : Paramètres cinétiques des composés dérivés de la 5'-désoxy-5'-thioadénosine

### A : Détermination des $K_{app}$



### B : Détermination du $K_i$ et de $k_{inact}$

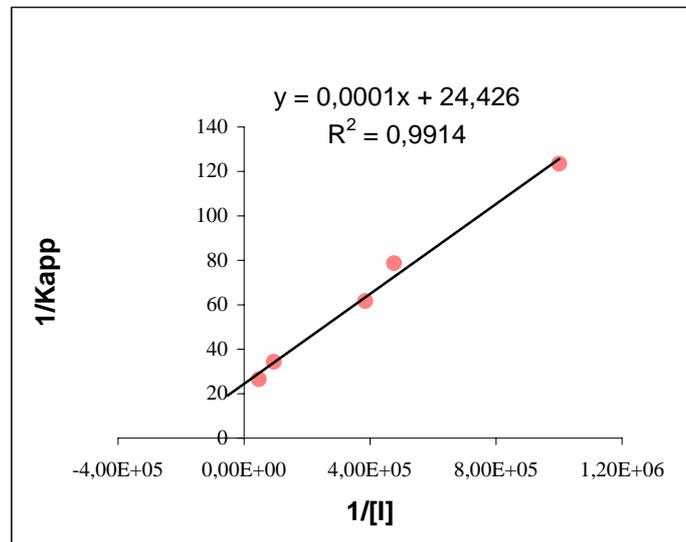
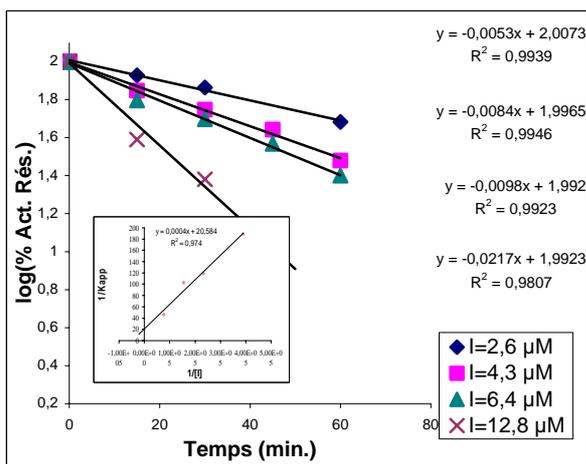
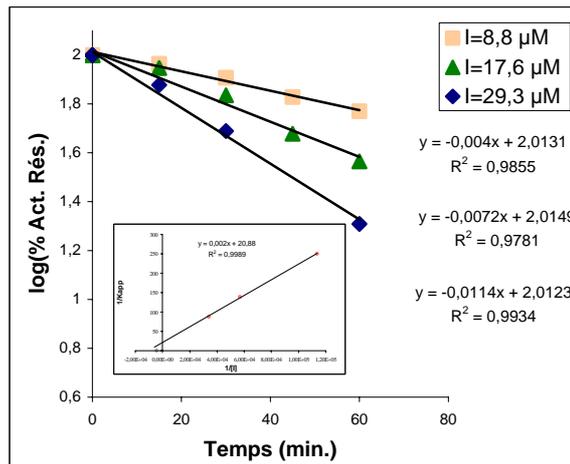


Figure 12 : Illustration de la méthode de Kitz et Wilson pour la détermination des paramètres cinétiques

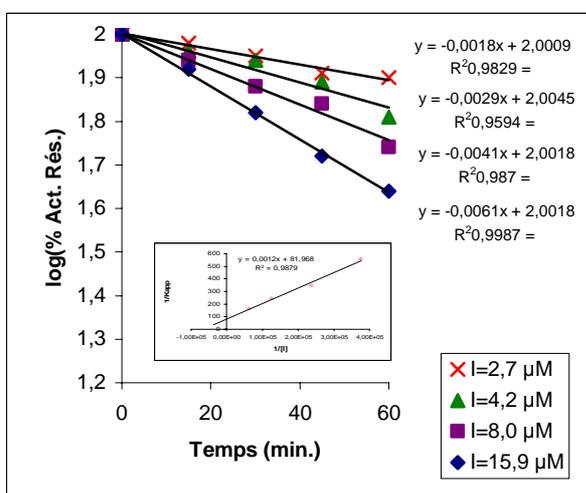
$K_i$  et  $k_{inact}$  : inactivation de l'AdoHcy hydrolase par 35.



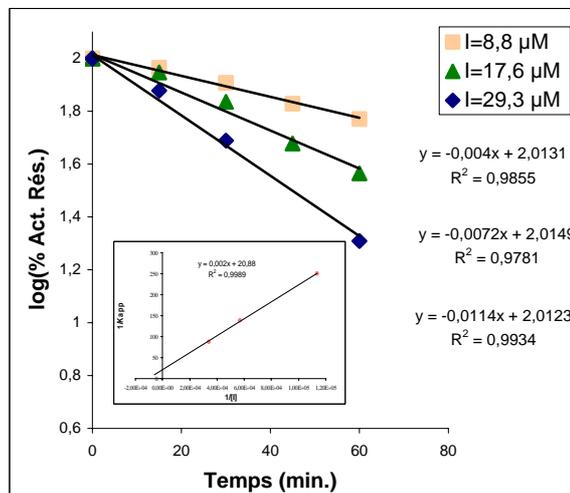
Composé 36



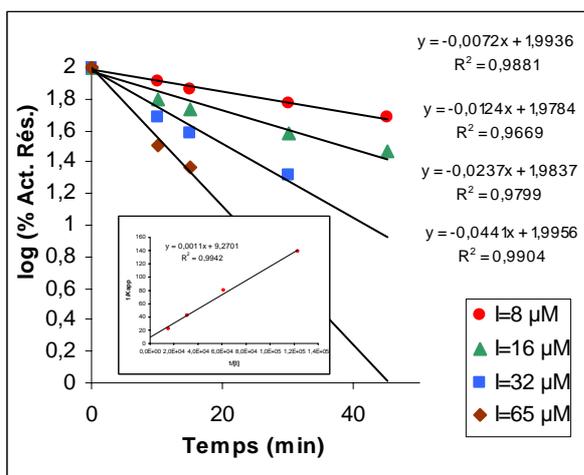
Composé 37



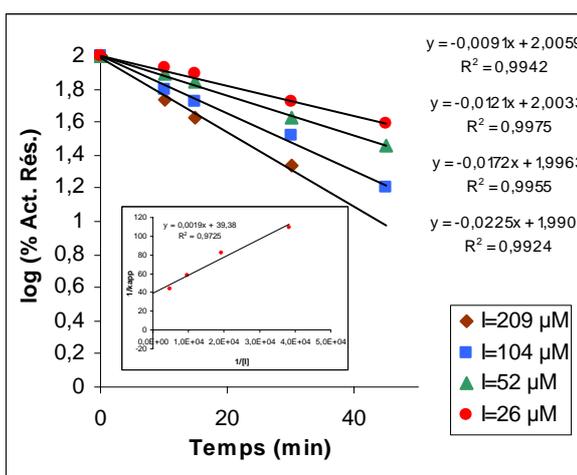
Composé 38c



Composé 38d



Composé 39a



Composé 39b

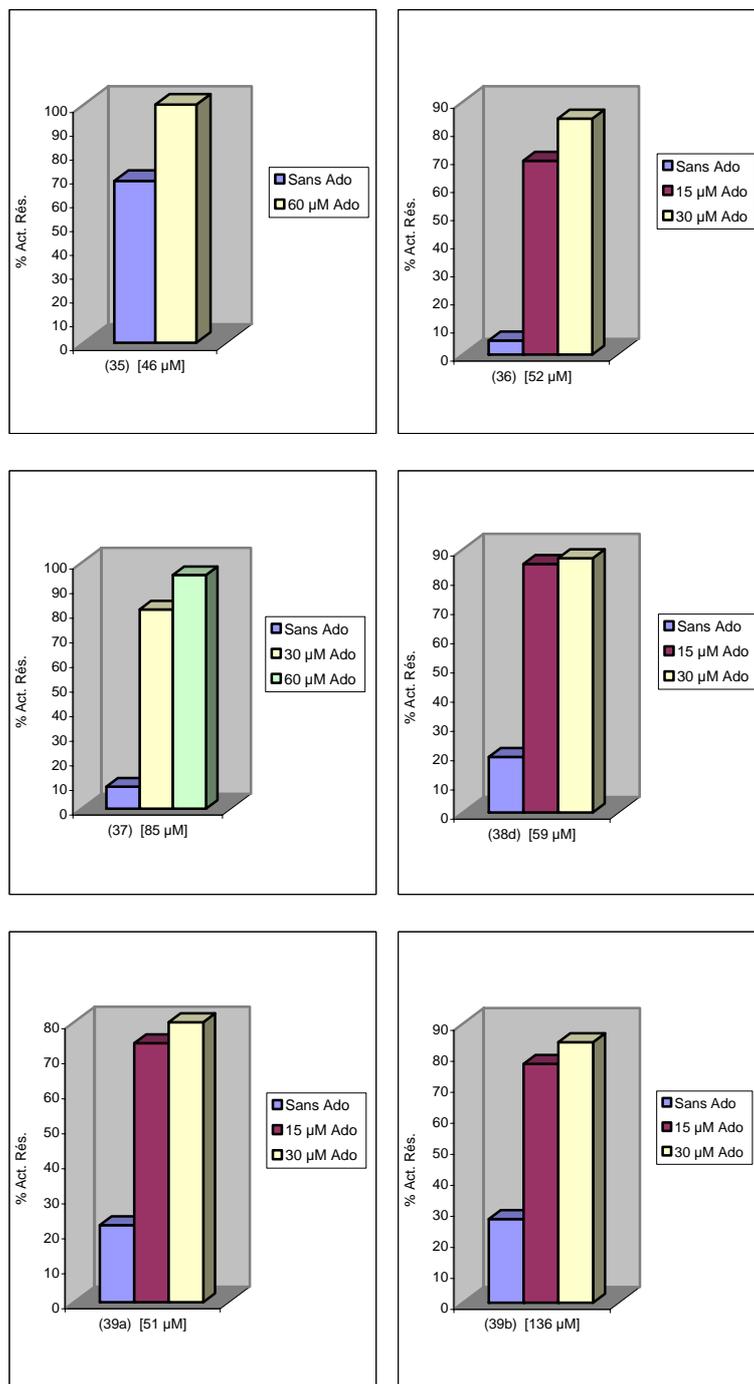
Cinétique d'inactivation de l'AdoHcy hydrolase incubée avec 36, 37, 38c, 38d, 39a et 39b pour des concentrations en inhibiteurs allant de 2,6 à 209 μM.

Les valeurs de  $K_i$  observées varient de 4 à 105  $\mu\text{M}$ , la 5'-désoxy-5'-thioadénosine **35** présente la meilleure affinité pour le site catalytique. Sa constante d'inhibition est identique au  $K_M$  de l'adénosine ce qui peut s'expliquer par la grande analogie structurale de ce composé avec l'adénosine, substrat naturel de l'enzyme. La fonction thiol ne modifie donc pas les interactions de binding, cependant ce thionucléoside n'est pas substrat de l'enzyme. Les rapports  $k_{\text{inact}}/K_i$  mesurés montrent que les différents inactivateurs étudiés ont des performances équivalentes (Tableau 5).

En complément à ces évaluations cinétiques nous avons établi que :

- L'inactivation de l'**AdoHcy** hydrolase observée dans tous les cas est irréversible puisque l'activité de l'enzyme ne peut être rétablie après une dialyse de 12 heures (essais effectués avec les composés **35-39**).
- L'adénosine, substrat de l'enzyme, joue un rôle de protection vis-à-vis de l'inactivation provoquée par chacun des inhibiteurs étudiés.

La Figure 3 rassemble les résultats obtenus pour les composés **35-39** démontrant ainsi que le processus d'inhibition provoqué par ces thionucléosides a bien lieu au sein du site catalytique.



**Figure 3 : % Act. Rés. après 20 min. d'incubation de l'AdoHcy hydrolase avec les différents inhibiteurs étudiés 35 (46 μM), 36 (52 μM), 37 (85 μM), 38d (59 μM), 39a (51 μM), 39b (136 μM) en absence et en présence de quantité croissante d'adénosine (15 à 60 μM)**

## 5. ETUDE DU MECANISME D'INACTIVATION

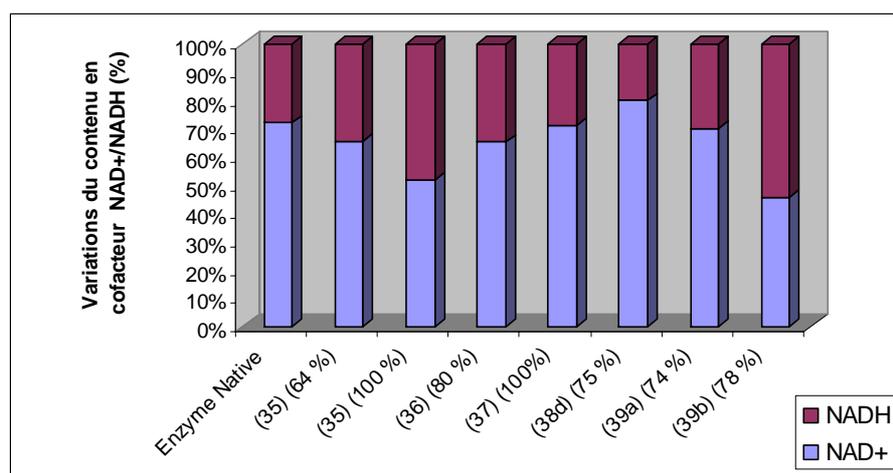
### 5.1 Dosage du contenu en cofacteurs $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ après interaction des inhibiteurs 35-39 avec l'AdoHcy hydrolase

Il était important pour la suite de notre étude de pouvoir élucider le mécanisme d'action de ces thionucléosides et de vérifier l'hypothèse mécanistique qui a guidé le choix de cette nouvelle famille de nucléosides pour provoquer l'inhibition irréversible de l'enzyme.

A ce stade de notre étude, deux mécanismes restent possibles pour expliquer l'inactivation de l'AdoHcy hydrolase après incubation avec les thionucléosides **35-39** :

- Leur interaction avec la cystéine 195 comme nous l'avons envisagé,
- ou une inactivation de l'enzyme via un processus de **type I**.

Le dosage des cofacteurs  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  associés à l'enzyme avant et après inactivation totale par les composés **35-39** est le moyen le plus direct pour s'assurer de l'implication de l'étape d'oxydation en 3'-C dans le processus d'inactivation et de pouvoir trancher entre ces deux mécanismes. Ce dosage a été réalisé par la méthode de fluorescence déjà citée et exposée dans la partie expérimentale. Les résultats sont rassemblés dans le Graphique 4.



**Graphique 4 : Variation du rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  associé à l'AdoHcy hydrolase après inactivation de l'enzyme par les inhibiteurs 35-39. Le % d'inactivation de l'enzyme à l'instant du dosage est indiqué entre parenthèses.**

Ce résultat de ces expériences montre qu'à l'exception de l'épisulfure **39b** le contenu en cofacteur n'est pas ou peu modifié durant le processus d'inactivation compte tenu de la précision des mesures.

*On peut en conclure que le processus d'oxydation n'est pas impliqué dans le mécanisme conduisant à l'inactivation de l'enzyme. Ces résultats rendent peu probables (sauf pour **39b**) l'intervention d'un processus d'inactivation de **type I** et restent en faveur d'un processus d'inactivation covalent mettant en jeu une cystéine compte tenu de la nature des inhibiteurs étudiés.*

Un moyen simple pourrait être mis en œuvre avec l'un des inactivateurs étudiés pour appuyer cette hypothèse. L'analyse des métabolites libérés dans le milieu d'incubation lors du processus d'inactivation de l'AdoHcy hydrolase par le disulfure **36** est une première approche qui a été envisagée.

## **5.2 Analyse du milieu réactionnel et recherche de métabolites après inactivation de l'AdoHcy hydrolase par **36** : mise en évidence de l'implication d'une réaction de transulfuration entre l'inhibiteur et une cystéine du site actif**

Selon les hypothèses mécanistiques avancées concernant l'inactivation de l'AdoHcy hydrolase par les nucléosides **36** et **37**, la modification covalente de la cystéine du site actif devrait se faire via une réaction de transulfuration entre cet aminoacide et l'inhibiteur (Schéma 44).

Dans le cas particulier du disulfure dissymétrique **36**, il devrait être possible de démontrer qualitativement l'implication d'une telle réaction de transulfuration dans le mécanisme d'inactivation en mettant en évidence, durant le processus d'inhibition, la formation de méthylthiol et/ou de 5'-désoxy-5'-thioadénosine (ou de leur disulfures correspondants\*) lors de l'incubation de l'enzyme avec ce dernier inhibiteur.

---

\* Préalablement à cette étude nous avons montré que la 5'-désoxy-5'-thioadénosine **35** pouvait se transformer en disulfure correspondant **37** dans un tampon phosphate en présence ou absence d'enzyme.

## Résultats :

L'**AdoHcy** hydrolase a été incubée en présence d'un excès de composé **36**. Après inactivation de l'enzyme, le milieu réactionnel est analysé en **HPLC** pour identifier les métabolites libérés dans les conditions décrites dans la partie expérimentale. Cette analyse permet de mettre en évidence la formation de (5'-désoxy-5'-thioadénosyl)disulfure **37** identifié par son temps de rétention et par coinjection avec un authentique. Dans le même milieu d'incubation en absence d'**AdoHcy** hydrolase, **36** reste inchangé.

Le résultat est en faveur de la proposition mécanistique avancée pour expliquer l'inactivation de l'**AdoHcy** hydrolase par l'inhibiteur **36** et précise que la réaction de transulfuration est régiospécifique (Schéma 57).

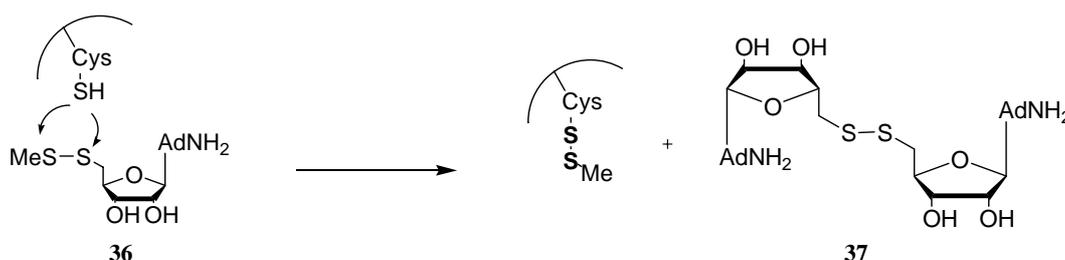
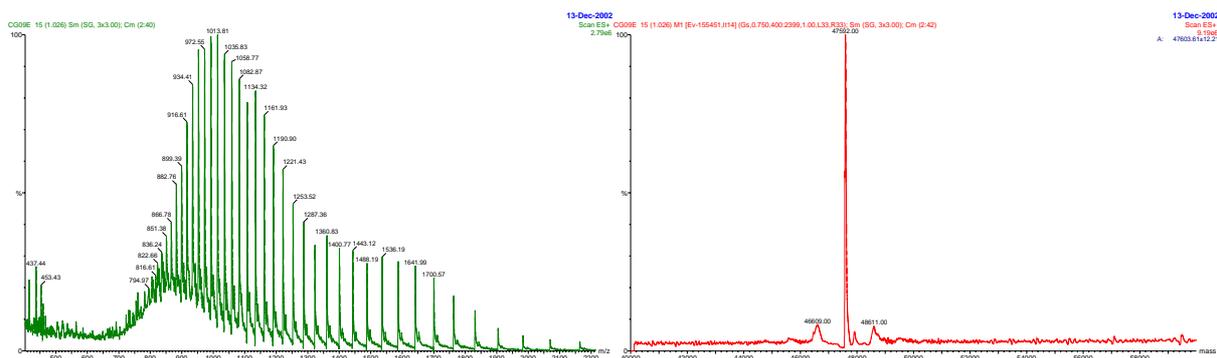


Schéma 57

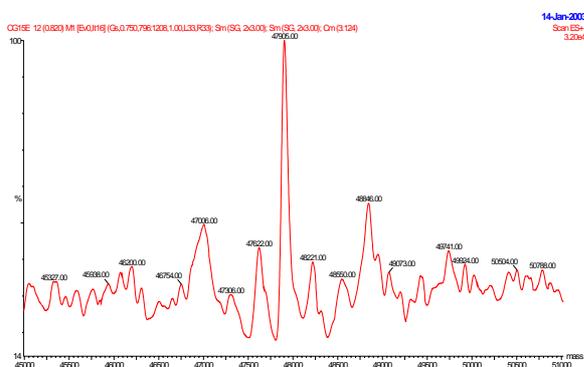
Pour compléter cette étude mécanistique et prouver l'implication d'un marquage covalent de l'enzyme, le moyen le plus sûr reste l'étude de l'**AdoHcy** hydrolase inactivée par les inhibiteurs **35**, **36** et **37** en spectrométrie de masse **ESI** (ionisation par électrospray).

### **5.3 Détermination des masses moléculaires de l'**AdoHcy** hydrolase native et inactivée par **35**, **36**, **37** et **39b****

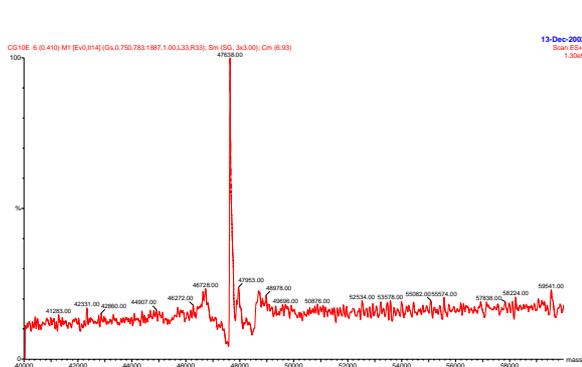
Dans les conditions dénaturantes, nécessaires à l'ionisation de la protéine et utilisées pour l'enregistrement des spectres (acétonitrile/eau/acide formique), le spectre de masse de l'**AdoHcy** hydrolase en **ESI/MS** obtenu dans les différentes expériences décrites ci-après (enveloppe d'ions multichargés) correspond à celui d'une sous unité de l'homoprotéine.



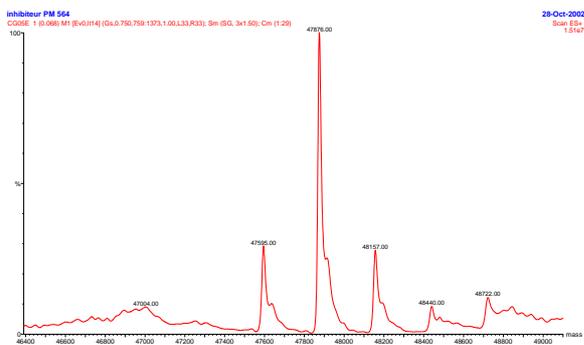
(a)



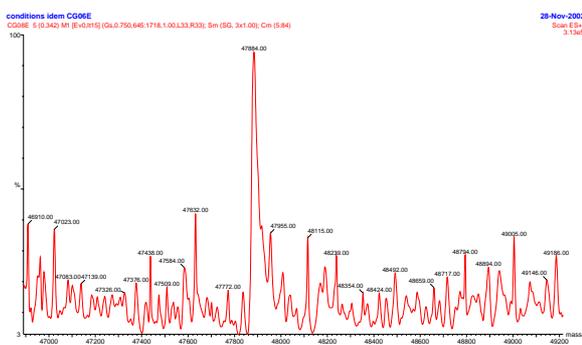
(b)



(c)



(d)



(e)

Figure 13 : Déconvolution par le logiciel MAX-ENT des enveloppes d'ions multichargés de l'AdoHcy hydrolase native (a) et inactivée par 35 (b), 36 (c), 37 (d) et 39b (e).

Lorsqu'on dispose d'une protéine de grande pureté le profil des ions multichargés est net comme le montre le spectre de masse de l'**AdoHcy** hydrolase native qui provient de cette étude (Figure 13). La déconvolution de ce spectre à l'aide du logiciel MAX-ENT permet la détermination de la masse moléculaire d'une sous-unité enzymatique. Pour l'enzyme native, le pic moléculaire majoritaire est détecté à  $47603,6 \text{ Da} \pm 12,2 \text{ Da}$ .

Après incubation de l'enzyme, dans les conditions décrites dans la partie expérimentale, avec les inhibiteurs **35**, **36**, **37** et **39b**, le pic moléculaire majoritaire de chaque sous unité de l'enzyme inactivée est détecté à une masse moléculaire correspondant respectivement à 47905 Da, 47638 Da, 47876 Da et 47884 Da avec une précision allant de  $\pm 2$  à  $\pm 12$  Da comme le montre les différents spectres, déconvolués, correspondants à ces différentes expériences (Figure 13).

Ces résultats démontrent sans ambiguïté que l'inhibition de l'**AdoHcy** hydrolase par les thionucléosides **35**, **36**, **37** et **39b** est accompagnée par un marquage covalent et spécifique. Les incréments de masse mesurés sont respectivement de 282 Da pour les inhibiteurs **35** et **36** et de 47 Da et 293 Da pour les thionucléosides **37** et **39b**. Ces résultats sont en accord avec le marquage d'une cystéine du site actif tel que nous l'avons proposé à savoir la formation de complexes covalents **Enz-SCH<sub>3</sub>**, **Enz-S-ThioAdo** et **Enz-S-EpithioAdo** illustré sur le Schéma 44. Seule l'interaction de l'épisulfure **39a** avec l'**AdoHcy** hydrolase ne provoque aucune modification de protéine.

L'analyse par spectrométrie de masse (**LC/ESI-MS**) de l'hydrolysate protéolytique de l'enzyme modifiée est l'outil de choix pour préciser la localisation du marquage et pour s'assurer que celui-ci concerne bien la cystéine 195 située dans le site actif de l'enzyme.

Cette étude a été effectuée jusqu'à présent avec deux des quatre inhibiteurs covalents identifiés.

### **Caractérisation du peptide marqué lors du processus d'inactivation de l'enzyme 37 :**

L'**AdoHcy** hydrolase inactivée par le (5'-désoxy-5'-thioadénosyl)disulfure **37** est soumise à une digestion protéolytique par l'**EndoLys C**, une enzyme qui hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques adjacentes à une lysine (K) située en position C-terminale. Les peptides résultants sont séparés et analysés par **LC/ESI-MS** et comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions à partir de l'enzyme native.

La cystéine 195 est la seule cystéine appartenant au peptide FDNLYGCRESLIDGIK qui devrait être libéré lors de la digestion de l'enzyme native par l'**EndoLys C** (voir Tableau 6). Ce peptide de masse moléculaire 1841,89 Da qui produit un ion dichargé détecté à  $m/z = 922,01$  Da a été caractérisé dans le mélange de peptides formés lors de la protéolyse de l'enzyme native par l'**EndoLys C** ( $t_R = 34,93$  min., Figure 14A).

Dans le chromatogramme obtenu dans les expériences **LC/ESI-MS** conduites avec l'enzyme inactivée (Figure 14B), on note l'absence de ce peptide et l'apparition d'un nouveau peptide au temps de rétention  $t_R = 33,42$  min. dont la masse moléculaire correspond à 2123,08 Da (ion dichargé détecté à  $m/z = 1062,55$  Da). Ce peptide a été caractérisé en prenant en compte la séquence en aminoacides de l'**AdoHcy** hydrolase recombinante du placenta humain<sup>[54]</sup> et le calcul systématique de la masse monoisotopique de chacun des peptides théoriques susceptibles de se former par digestion de cette protéine par l'**EndoLys C** (Tableau 6). Il s'agit du peptide [FDNLYGC<sup>195</sup>RESLIDGIK] contenant la seule cystéine 195 et possédant un incrément de masse de  $\Delta M = 281$  Da correspondant à la fixation covalente d'un groupe thioadénosyle.

### **Caractérisation du peptide marqué lors du processus d'inactivation de l'enzyme par 36**

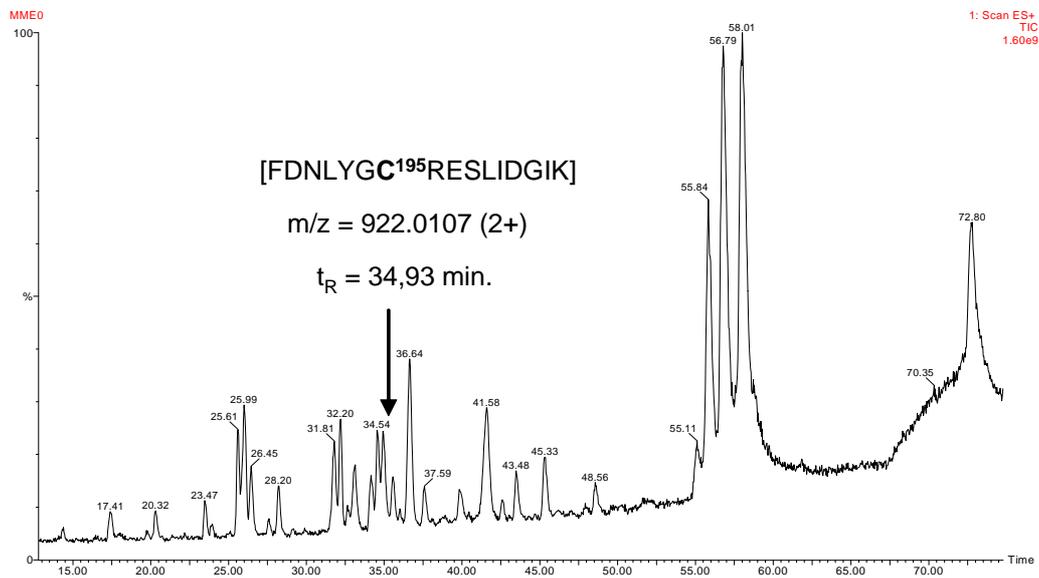
Dans les mêmes conditions, l'hydrolysate protéolytique de l'enzyme inactivée par l'adénosine 5'-méthylthio disulfure **36** et modifiée de façon covalente par un groupement méthylthio ( $\Delta M = 46$  Da) a été analysé par **LC/ESI-MS**.

La comparaison des chromatogrammes, non présentés ici, des deux digests (enzyme native et enzyme modifiée) a permis cette fois de mettre en évidence la formation de deux nouveaux peptides. Seul le peptide ayant un temps de rétention de  $t_R = 37,01$  min. de masse moléculaire 1855,16 (ion dichargé,  $m/z = 945,01$ ) a été identifié jusqu'à présent. Il s'agit comme précédemment du peptide [FDNLYGC<sup>195</sup>RESLIDGIK] contenant la Cys-195 incrémenté cette fois de  $\Delta M = 46$  Da.

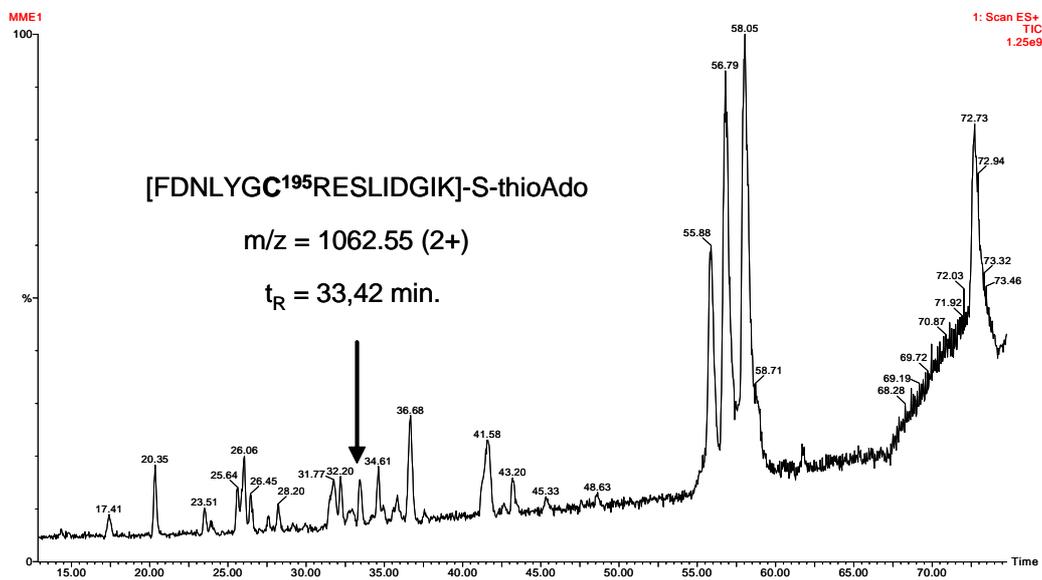
Ce résultat permet d'avancer que la modification covalente provoquée par le composé **36** implique aussi la Cys-195, seule cystéine présente dans le peptide marqué identifié.

			Analyse par LC/ESI-MS de l'AdoHcy hydrolase : peptides identifiés	
	Fragments peptidiques attendus par digestion par l'EndoLys C	Masse isotopique des peptides attendus	t <sub>R</sub> des peptides observés (min)	Ion (charge) des peptides observés
1	MSDK	479.2050		
2	LPYK	519.3057	20.32	520.4540 (1+)
3	VADIGLAAWGRK	1255.7036	25.61	1256.6075 (1+)
4	ALDIAENEMPGLMRMRERYS ASK	2666.2930	34.54	1334.7628 (2+)
5	PLK	356.2423		
6	GARIAGCLHMTVETAVLIETL VTLGAEVQWSSCNIFSTQDH AAAAIAK	4996.5239		
7	AGIPVYAWK	1003.5491		
8	GETDEEYLWCIEQTLTYFK	2266.0142	43.48	1134.3367 (2+)
9	DGPLNMILDDGGDLTNLIHT K	2251.1157	41.58	1126.9950 (2+)
10	YPQLLPGIRGISEETTTGVHNL YK	2685.4126		
11	MMANGILK	876.4561	28.20	877.5040 (1+)
12	VPAINVNDVTK	1255.6772	32.20	1256.6725 (1+)
13	SK	233.1375		
14	FDNLYG <b>C</b> RESLIDGIK	<b>1841.8984</b>	<b>34.93</b>	<b>922.0107 (2+)</b>
15	RATDVMIAGK	1060.5698	23.47	1061.5052 (1+)
16	VAVVAGYGDVVK	1133.6082	25.99	1134.5966 (1+)
17	GCAQALRGFGARVIITEIDPIN ALQAAMEGYEVTTMDEACQ EGNIFVTTTGCIDILGRHFEQ MK	7058.4204		
18	DDAIVCNIGHFDVEIDVK	2000.9514	37.59	1001.9916 (2+)
19	WLNENAVEK	1101.5454	26.45	1102.5015 (1+)
20	VNIK	472.3009	17.41	473.4723 (1+)
21	PQVDRYRLK	1173.6619		
22	NGRRIILAEGRLVNLGCAM GHPSFVMSNSFTNQVMAQIE LWTHPK	5250.6455		
23	YPVGVHFLPK	1155.6440	31.81	1156.6210 (1+)
24	K	146.1055		
25	LDEAVAEHLGK	1251.6460		
26	LNVK	472.3009	17.41	473.4723 (1+)
27	LTK	360.2373		
28	LTEK	489.2799	11.91	490.4326 (1+)
29	QAQYLGMSCDGPFK	1543.6799		
30	PDHYRY	849.3370		

**Tableau 6 : Fragmentation peptidique de l'AdoHcy hydrolase par l'EndoLys C : comparaison de la carte peptidique de l'enzyme native / peptide identifiés par LC/ESI-MS.**



(A) Chromatogramme obtenu après digestion de l'AdoHcy hydrolase par l'EndoLys C



(B) Chromatogramme obtenu après digestion par l'EndoLys C de l'AdoHcy hydrolase inactivée par 37

Figure 14

## CONCLUSION

Pour la première fois, nous avons montré qu'il était possible de provoquer l'inactivation irréversible de l'AdoHcy hydrolase du placenta humain par une nouvelle série de thionucléosides qui jouent le rôle de marqueurs covalents et spécifiques de la cystéine 195.

Ces résultats apportent la preuve irréfutable du rôle crucial joué par cette cystéine dans l'activité « oxydative » de l'enzyme et confirme l'hypothèse mécanistique avancée par Takusagawa et collaborateurs<sup>[61]</sup>.

L'évaluation biologique des thionucléosides étudiés est en cours.

## Chapitre 4

# **IDENTIFICATION ET SYNTHÈSE D'UNE NOUVELLE SÉRIE D'INHIBITEURS DE L'AdoHcy HYDROLASE « TAILLES SUR MESURE » POUR LE SITE ACTIF DE L'ENZYME**

## 1. INTRODUCTION

Jusqu'à présent les différentes stratégies utilisées au laboratoire pour provoquer l'inactivation irréversible de l'**AdoHcy** hydrolase étaient basées sur l'exploitation des données mécanistiques de l'enzyme décrivant le processus de rupture de la liaison soufre-carbone en C-5' catalysée par l'enzyme, à savoir : la participation dans le cycle catalytique d'une « activité oxydative » et « hydrolytique » et l'identification des aminoacides impliqués dans ces deux étapes essentielles de la catalyse.

Cette démarche a été fructueuse car elle a permis dans les travaux antérieurs du laboratoire<sup>[16, 40, 41, 43]</sup> et au cours de ce travail de thèse de découvrir de nouvelles séries d'inhibiteurs irréversibles de **type I** ainsi que des inhibiteurs covalents de **type II** de l'**AdoHcy** hydrolase.

Après les publications des premières structures cristallographiques de l'enzyme déduites des études de diffraction des rayons X, ces nouvelles données ont été exploitées principalement pour préciser et confirmer les mécanismes des inhibiteurs identifiés<sup>[41]</sup>.

A ce jour, aucun laboratoire n'a tenté d'exploiter les données structurales disponibles concernant la topologie du site de « binding » du substrat (forme ouverte) et du site catalytique de l'enzyme (forme fermée) pour modéliser de nouveaux inhibiteurs dont la structure serait ajustée au mieux pour établir des interactions fortes avec le site catalytique de l'enzyme (inhibiteur compétitif de forte affinité).

Cette méthode utilisée avec succès sur d'autres enzymes devrait aussi faciliter la recherche rationnelle d'inhibiteurs puissants et spécifiques de l'**AdoHcy** hydrolase.

Un préalable à sa mise en œuvre était d'intéresser à ce programme de recherche des experts en modélisation moléculaire. Nous avons établi dans ce sens une collaboration avec le « Laboratoire de Spectroscopies et Structures Biomoléculaires (LSSBM) » de Reims dirigé par le Professeur Alain Alix. Le travail de modélisation qui sera présenté dans ce chapitre a été effectué par Nicolas Floquet, doctorant dans ce laboratoire.

Une seconde préoccupation a guidé notre démarche et notre intérêt pour les inhibiteurs compétitifs de grande affinité. Comme nous l'avons souligné précédemment, les activités

antivirales ( $IC_{50}$ ), sur une large variété de virus, des inhibiteurs irréversibles de l'**AdoHcy** hydrolase sont intéressantes<sup>[111]</sup> mais leur cytotoxicité<sup>[112]</sup> reste encore un obstacle pour leur utilisation clinique.

Cette cytotoxicité peut être interprétée de la façon suivante : l'**AdoHcy** hydrolase est une enzyme ubiquitaire cellulaire qui participe à la régulation des réactions de transméthylations indispensables au bon fonctionnement de la cellule. Son turnover est lent (24 heures dans le foie de rat). L'inhibition complète de l'**AdoHcy** hydrolase par les inhibiteurs irréversibles de **type I** et **II** est certainement responsable des effets secondaires observés<sup>[113]</sup>.

Dans la perspective de leur utilisation comme agents antiviraux, des inhibiteurs réversibles de l'**AdoHcy** hydrolase qui possèderaient des  $K_{off}$  assez faibles pour provoquer les effets désirés (inhibition de la méthylation des **ARN<sub>m</sub>** viraux) *in vivo* mais assez grands pour permettre la restauration de l'activité enzymatique avant la prise d'une nouvelle dose devraient avoir plus de chances de déboucher sur des applications cliniques.

*La D-éritadénine est un inhibiteur compétitif de l'AdoHcy hydrolase qui possède un profil cinétique correspondant à ces exigences. Son mode d'ancrage dans le site actif de l'enzyme est connu. Ce seconucléoside a donc été choisi comme modèle pour le « design » de nouveaux inhibiteurs dont les interactions avec l'enzyme seront préalablement évaluées par modélisation moléculaire.*

*Les résultats préliminaires de cette étude sont exposés dans ce chapitre.*

## 2. CONCEPTION DE NOUVEAUX INHIBITEURS : ETUDES DE MODELES DERIVES DE LA D-ERITADENINE

La D-éritadénine (**DEA**) est un produit naturel qui a été isolé au Japon à partir d'une souche fongique (*Lentinus edodes*) en 1970<sup>[114]</sup>. Sa structure est celle d'un seconucléoside : l'acide (2R),(3R)-dihydroxy-4-(9-adényl) butyrique. Ses propriétés anticholestérolémiantes et sa capacité à réduire le taux de triglycérides et de phospholipides dans le plasma sanguin chez le rat et chez l'homme ont suscité un intérêt considérable dans la communauté des chimistes pharmacologues<sup>[114]</sup>. Un criblage approfondi de ses propriétés biologiques a permis de démontrer que la **DEA** pouvait également inhiber efficacement la croissance de virus tels que vaccine, celui de la grippe (parainfluenza type 3) et ceux du type simplex (stomatitis vésiculaire)<sup>[115]</sup>. Ces propriétés antivirales ont très vite été corrélées avec la capacité de la D-éritadénine à inhiber l'**AdoHcy** hydrolase du foie de rat<sup>[24]</sup>.

Plus d'un cinquantaine d'analogues aliphatiques de l'adénosine ont été par la suite synthétisés<sup>[114]</sup> et testés sur l'activité de l'**AdoHcy** hydrolase mais seules les D-éritadénine **60**, L-éritadénine **61**, L-thréo-éritadénine et le (S)-DHPA (9-(S)-(2,3-dihydroxypropyl)-adénine) **62** inhibent l'enzyme de façon efficace<sup>[111]</sup> (Schéma 58).

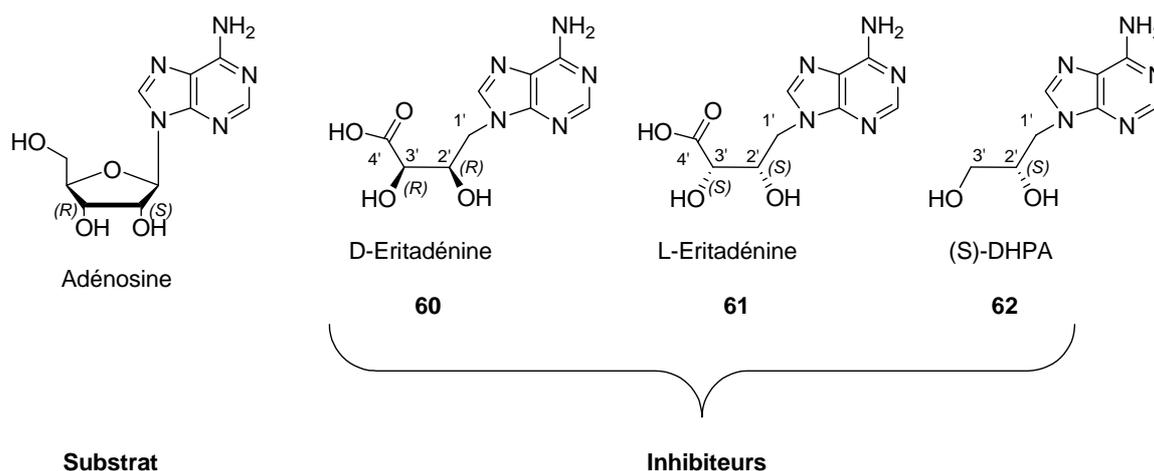


Schéma 58

Le mode d'action de la D-éritadénine a été étudié. La **DEA** inhibe l'**AdoHcy** hydrolase de façon réversible et compétitive avec un  $IC_{50}$  de 7 nM<sup>[116]</sup>.

Pour expliquer les performances remarquables de cet analogue acyclique de l'adénosine qui possède en C-2' une configuration inverse de la position C-2' du substrat (Ado), Takusagawa et collaborateurs ont cristallisé le complexe Enzyme-DEA et élucidé récemment sa structure par diffraction des rayons X<sup>[62]</sup>.

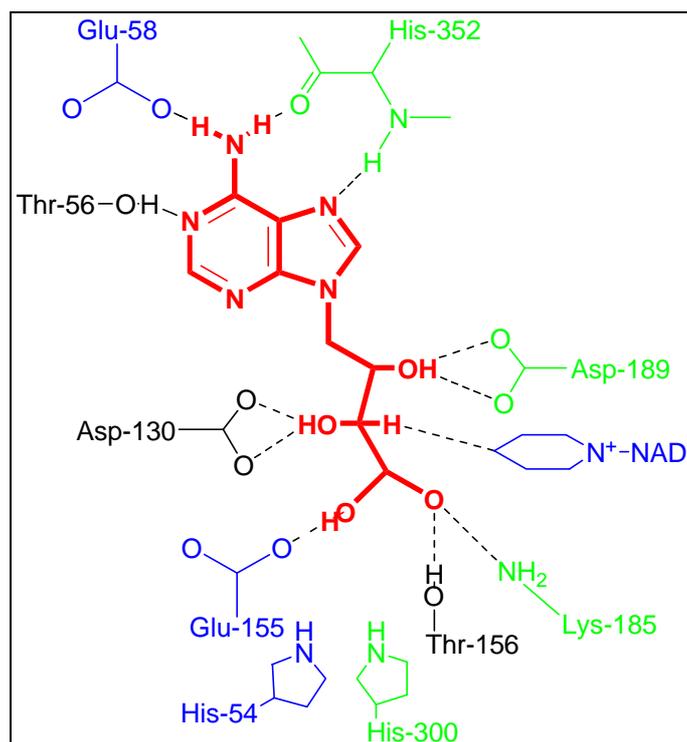
Les résultats de cette étude qui sont illustrés sur la Figure 15 rendent possible la comparaison des modes de « binding » de l'adénosine et de la **DEA** dans la forme « fermée » de l'enzyme recombinante de foie de rat.

Il ressort de cette étude cristallographique remarquable que :

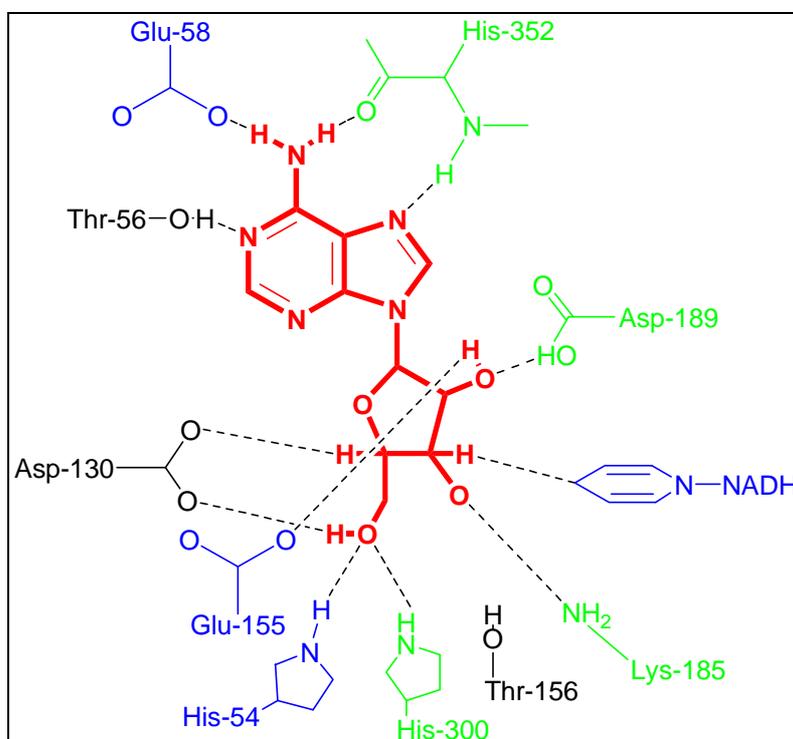
- Le noyau adénine dans le **DEA** et le substrat (**Ado**) est stabilisé dans le site catalytique de l'enzyme de façon similaire (liaisons hydrogène avec le Glu-58, l'His-352 et la Thr-56),
- L'hydroxyle en C-2' de la **DEA** (Figure 15A) est trop éloigné (distance > 4Å) du cofacteur **NAD<sup>+</sup>** pour être oxydé en dérivé carbonyle correspondant,
- Dans le site catalytique, les groupes hydroxyles en C-2' et C-3' et le groupe carboxylique en C-4' du **DEA** développent des liaisons hydrogène différentes de celles mises en évidence avec le groupement ribosyl de l'adénosine.

Les liaisons hydrogène observées avec le **DEA** impliquent des groupes accepteurs chargés (Asp-189, Asp-130, Glu-135 et Lys-185). Ces interactions de binding particulièrement fortes observées justifient à elles seules la grande stabilisation de la **DEA** dans le site actif de l'**AdoHcy** hydrolase et sa grande affinité pour l'enzyme.

Ces résultats démontrent qu'un acyclonucléoside analogue du substrat mais qui possède une plus grande flexibilité structurale peut développer des interactions nouvelles avec des résidus d'acides aminés constitutifs du site actif de l'enzyme. Cela ouvre de nouvelles perspectives pour la conception de nouveaux inhibiteurs compétitifs spécifiques et performants de l'**AdoHcy** hydrolase.



(A) Interactions de la D-érythroadénine avec le site actif de l'AdoHcy hydrolase de foie de rat (forme fermée)<sup>[62]</sup>



(B) Interactions de l'adénosine avec le site actif (forme fermée) de l'AdoHcy hydrolase de foie de rat<sup>[62]</sup>

**Figure 15**

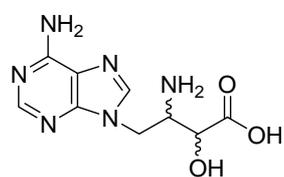
---

Dans un premier temps nous avons envisagé, pour optimiser les interactions de binding de nouveaux seconucléosides avec le site actif, de greffer sur la structure moléculaire de la **DEA** de nouveaux groupes fonctionnels :

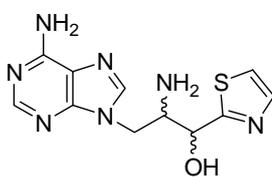
- Le remplacement de l'un ou l'autre des groupes C-2'-OH et C-3'-OH par des groupes amino (chargés au pH physiologique) devrait renforcer les interactions avec les résidus Asp-189 et Asp-130 (Figure 15A).
  
- De même, l'introduction en C-4' d'un groupe bioisostère de la fonction acide carboxylique tel qu'un groupe phosphonate, un acide hydroxamique ou un thiazole pourrait servir à sonder le site actif et permettre l'indentification d'interactions nouvelles avec les résidus d'acides aminés et peut être d'ajouter des interactions avec les histidines, His-54 et His-300 (Figure 15A).

La structure de ces nouveaux inhibiteurs potentiels est illustrée sur le schéma ci-contre (Schéma 59).

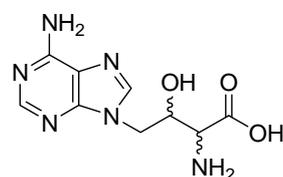
Avant d'entreprendre la synthèse de cette nouvelle série d'inhibiteurs, nous avons souhaité simuler par des expériences de modélisation moléculaire leurs interactions de binding avec le site catalytique de l'enzyme.



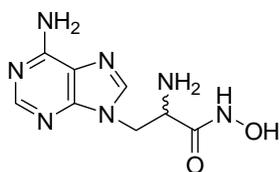
**63a** R R  
**63b** R S  
**63c** S S  
**63d** S R



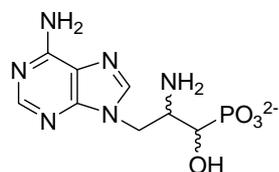
**64a** R R  
**64b** R S  
**64c** S S  
**64d** S R



**65a** R R  
**65b** R S  
**65c** S S  
**65d** S R



**66a** R  
**66b** S



**67a** R R  
**67b** R S  
**67c** S S  
**67d** S R

Schéma 59

### 3. MODELISATION DES SECONUCLEOSIDES 63, 64 ET 65 DANS LE SITE CATALYTIQUE DE L'AdoHcy HYDROLASE

#### 3.1 Protocole utilisé

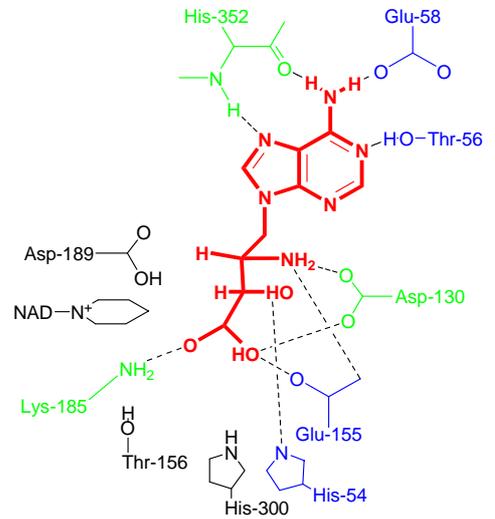
Pour ces expériences, les structures de l'AdoHcy hydrolase ont été extraites de la banque de données **P.D.B.** (Protein Data Bank) entrées 1A7A<sup>[56]</sup>, 1B3R<sup>[61]</sup> et 1K0U<sup>[62]</sup> pour les formes « ouverte » et « fermée » de l'enzyme cristallisée en présence ou non de la D-éritadénine<sup>[62]</sup>.

Les inhibiteurs **63a-d**, **64a-d** et **65a-d** ont été construits en utilisant le module AMPAC/MOPAC d'Insight grâce au champ de forces semi-empirique PM3<sup>[117, 118]</sup> et leur énergie potentielle respective minimisée avec le logiciel Insight II (Accelrys) qui décrit également la conformation la plus stable de chacun des inhibiteurs (la minimisation a été effectuée en utilisant le champ de forces CVFF via le module Discover).

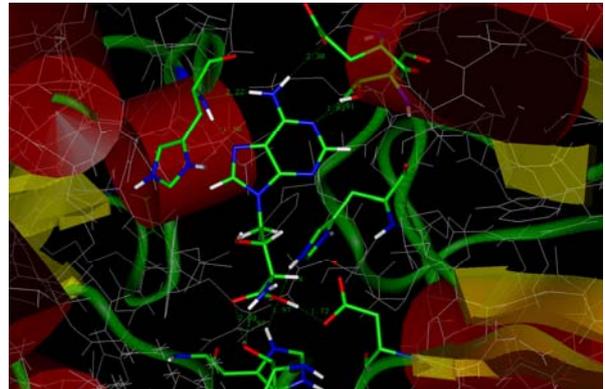
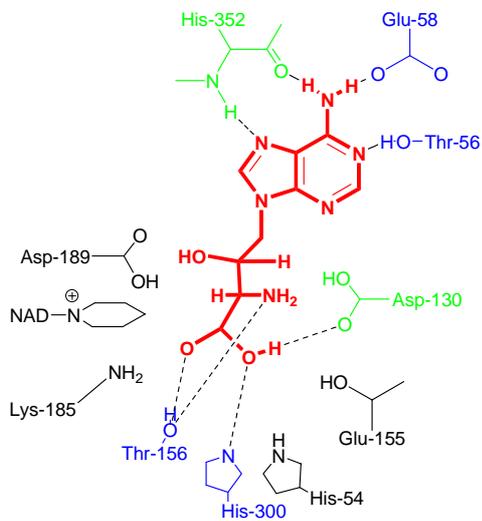
La structure de l'AdoHcy hydrolase utilisée pour les simulations de docking moléculaire correspond à la forme « fermée » de l'enzyme (**Enz-NAD<sup>+</sup>**) complexée par l'éritadénine. Cette structure est accessible dans la **P.D.B.** (Référence : 1K0U) et présente une résolution de 3 Å<sup>[62]</sup>.

Les charges partielles de l'enzyme et des inhibiteurs ont été attribuées via le champ de forces CVFF sous Insight puis importés grâce au format SYBYL dans Autodock.

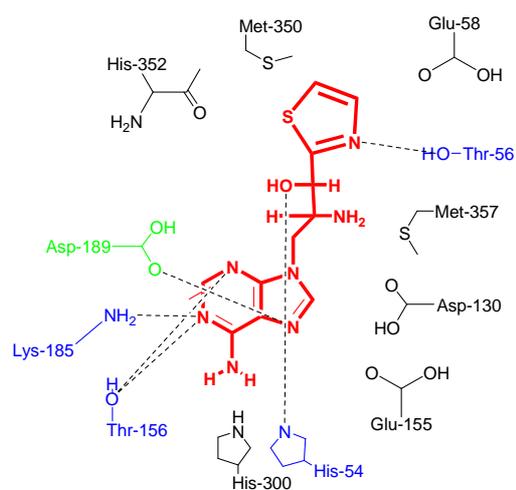
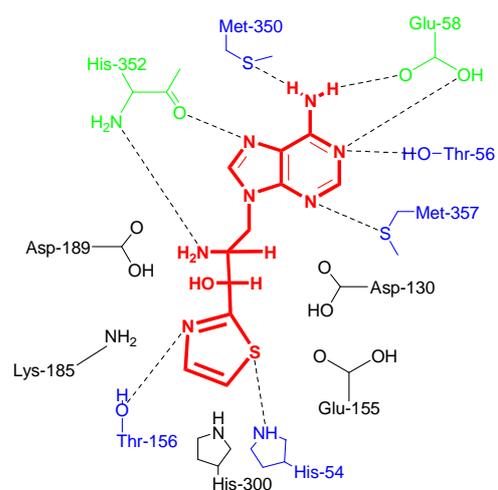
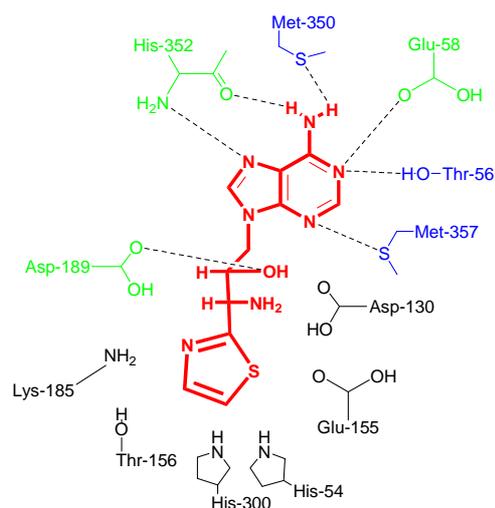
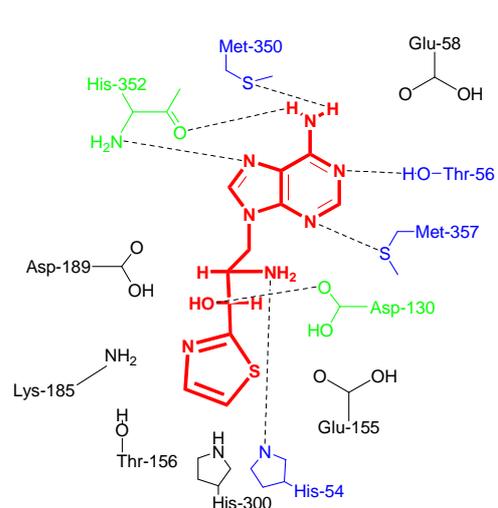
Autodock<sup>[119-121]</sup> est un ensemble de programmes automatisés particulièrement bien adapté pour la prédiction du mode d'interaction entre une petite molécule flexible et une cible rigide de structure tridimensionnelle connue. Une grille d'affinité a été générée, via le programme Autogrid, pour chaque type d'atome présent dans le ligand (seconucléoside modèle) en utilisant un pas de grille de 3 Å. Le calcul des grilles a été réduit à la partie correspondante à la poche active de l'enzyme, réduisant ainsi le temps de calcul effectif nécessaire à l'étude de chacun des inhibiteurs.



**Figure 16 : Modélisation des interactions de binding de 63d avec les résidus d'acides aminés du site actif de l'AdoHcy hydrolase,  $K_i$ (théorique) = 0,7 nM.**



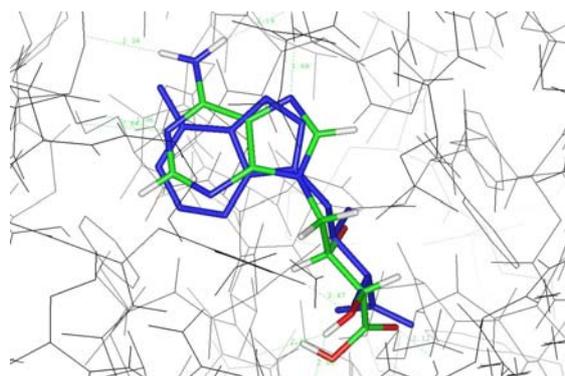
**Figure 17 : Modélisation des interactions de binding de 65a avec les résidus d'acides aminés du site actif de l'AdoHcy hydrolase,  $K_i$ (théorique) = 1,0 nM.**

**Composé 64a** $K_i(\text{théorique}) = 0,5 \text{ nM}$ **Composé 64b** $K_i(\text{théorique}) = 0,3 \text{ nM}$ **Composé 64c** $K_i(\text{théorique}) = 0,3 \text{ nM}$ **Composé 64d** $K_i(\text{théorique}) = 0,4 \text{ nM}$ 

**Figure 18 : Modélisation des interactions de binding de 64a-d avec les résidus d'acides aminés du site actif de l'AdoHcy hydrolase.**

### 3.2 Validation de la méthode de modélisation

La structure du complexe **Enzyme-DEA**<sup>[62]</sup> a été utilisée pour tester et valider les protocoles de docking utilisés. Les simulations obtenues à l'aide du logiciel Autodock reproduisent fidèlement le positionnement de la D-éritadénine dans le site actif tel qu'il existe dans la structure cristallographique (Figure 19).



**Figure 19 : Ancre de la DEA dans le site actif de l'AdoHcy hydrolase : comparaison entre les données issues de la diffraction des rayons X (en bleu) et les expériences de docking (en vert).**

Un  $K_i$  théorique (mesurant l'affinité de la **DEA** pour le site catalytique) de l'ordre du nanomolaire a été déduit des calculs des énergies d'interaction de « binding » développées. Le  $K_i$  théorique est similaire à celui déterminé à partir des cinétiques d'inhibition ( $K_i = 7$  nM) décrit dans la littérature.

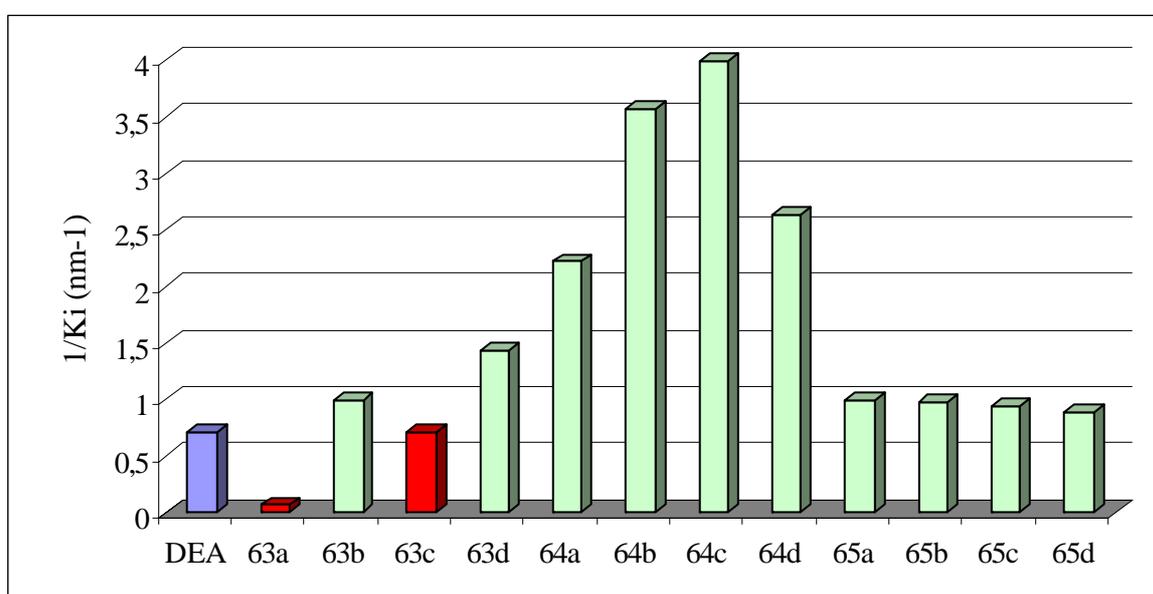
Ces deux résultats valident la méthode de docking utilisée. Cette méthode a donc été choisie pour la mise en œuvre de l'étude du mode de binding des seconucléosides modèles.

### 3.3 Mode de binding des seconucléosides 63a-d et 65a-d dans la forme fermée de l'AdoHcy hydrolase

Les résultats énergétiques et structuraux concernant le docking des premières structures étudiées (**63a-d**, **64a-d** et **65a-d**) dans le site actif de l'**AdoHcy** hydrolase ont permis d'obtenir les informations souhaitées concernant le mode de binding préférentiel ou spécifique de ces inhibiteurs modèles.

Les résultats sont illustrés sur les Figure 16, Figure 17 et Figure 18 pour six d'entre eux.

Les expériences de docking sont en faveur des hypothèses avancées. Les interactions nouvelles développées par les groupes amino des différents diastéréoisomères **63a-d** et **65a-d** permettent un bon ancrage dans le site actif. Les  $K_i$  estimés (Graphique 5) à partir de ces interactions sont de l'ordre du nanomolaire. Dans l'une et l'autre de ces deux séries d'inhibiteurs, les composés **63d** de configuration 2'S, 3'R et son isomère **65a** de configuration 2'R, 3'R seraient, selon l'estimation effectuée, les plus performants.



**Graphique 5 : Evaluation des  $K_i$  théoriques attendus pour les composés 63a-d, 64a-d et 65 a-d et comparaison par rapport au  $K_i$  de la DEA. En rouge sont figurés les  $K_i$  inférieurs ou équivalents à ceux de la DEA.**

Les résultats des simulations effectuées montrent que l'introduction d'un groupe thiazole en remplacement d'un groupe carboxylate dans la structure des inhibiteurs **63** et **65** accroît de façon significative la force des interactions de binding avec les aminoacides constitutifs du site actif de l'enzyme. Les constantes d'affinités calculées pour les quatre seconucléosides isomères **64a-d** sont de l'ordre du nanomolaire (Figure 18) et font de ces inhibiteurs des cibles particulièrement intéressantes.

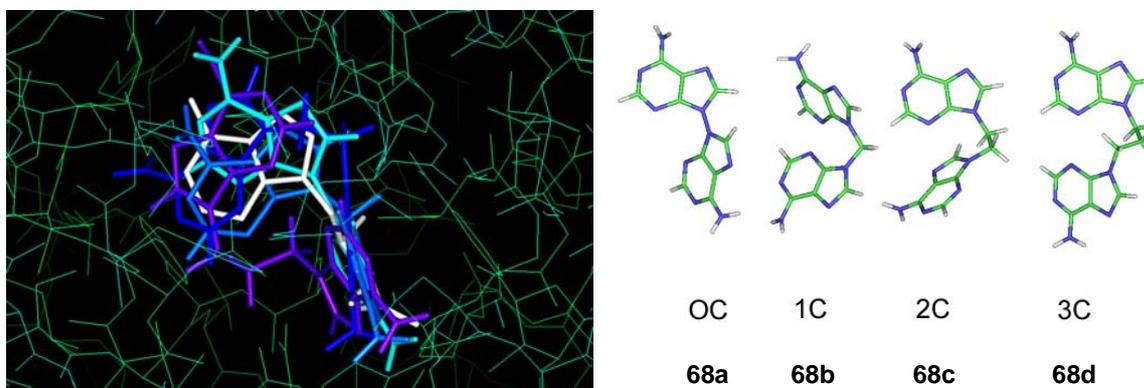
Un autre fait remarquable résultant de cette étude de simulation et qui mérite d'être souligné est la possibilité pour le groupe adényle, le déterminant essentiel des

seconucléosides, de pouvoir s'ancrer dans le site actif de l'enzyme en prenant deux orientations différentes (Figure 18).

Un observation similaire à celle décrite antérieurement lors d'expériences de « docking » de l'adénosine (substrat) dans le site catalytique de l'enzyme<sup>[65]</sup>.

*Ces deux résultats ouvrent sans nul doute de nouvelles perspectives pour le « design » de nouveaux modèles d'inhibiteurs de structures différentes des seconucléosides envisagés jusqu'à présent.*

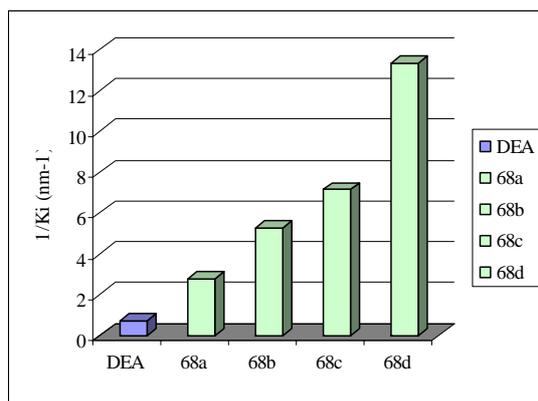
Dans une étude préliminaire destinée à tester cette nouvelle approche, une série de composés possédants deux groupes « adényles » associés directement par l'azote en position 9 ou par l'intermédiaire d'une chaîne carbonée flexible de 1 à 3 carbones (composés **68a-d**) ont été soumis au même protocole de simulation (Autodock, Insight II) pour estimer leur meilleur mode de binding dans le site actif de l'enzyme. Leurs interactions respectives avec le site actif de l'enzyme sont illustrées ci-dessous (Figure 20).



**Figure 20 : Conformations stables de 4 bis-adénines, étude de leurs interactions avec le site actif de l'enzyme : en blanc le composé 68a, en cyan le composé 68b, en bleu le composé 68c, en indigo le composé 68d**

Ces différentes expériences démontrent que chacune de ces quatre bis-adénines peuvent être stabilisées de façon remarquable dans le site actif de l'enzyme.

Les calculs résultant des énergies d'interactions de ces différentes bis-adénines avec le site actif de l'AdoHcy hydrolase laisse prédire pour ces inhibiteurs des constantes d'affinité  $K_i$  de l'ordre de 10 picomolaire (Graphique 6).



Graphique 6 : K<sub>i</sub> théoriques attendus pour les composés 68a-d et comparaison par rapport au K<sub>i</sub> de la DEA.

Sur la figure suivante sont illustrées à titre d'exemple les interactions développées par la bis-adénine **68c** avec le site actif de l'AdoHcy hydrolase.

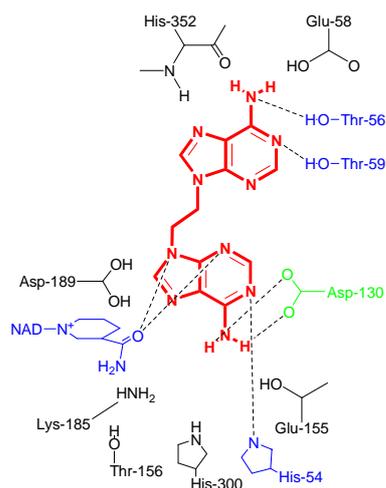
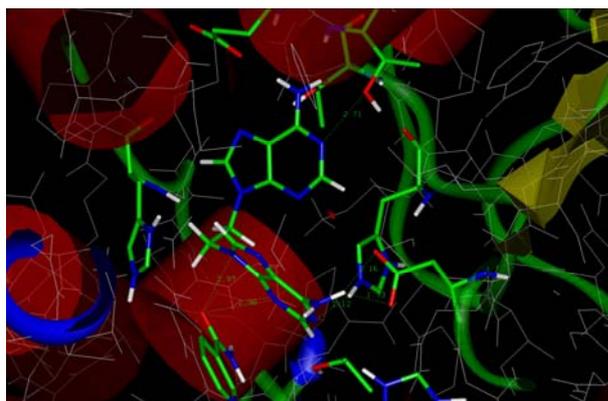


Figure 21 : Modélisation des interactions de binding de 68c avec les résidus d'aminoacides du site actif de l'AdoHcy hydrolase.

*Dans le cadre de cette thèse, à partir de l'ensemble des résultats de simulation de « docking » moléculaire sur les modèles proposés, décrits ci-dessus et fournis par le laboratoire du Professeur Alix, nous avons entrepris prioritairement la synthèse des seconucléosides 63d et 64d ainsi que celle de la bis-adénine 68c.*

*La détermination de leur pouvoir inhibiteur sur l'activité de l'AdoHcy hydrolase permettra un première évaluation de cette nouvelle stratégie d'inhibition proposée. La synthèse des autres modèles est actuellement en cours d'étude au laboratoire.*

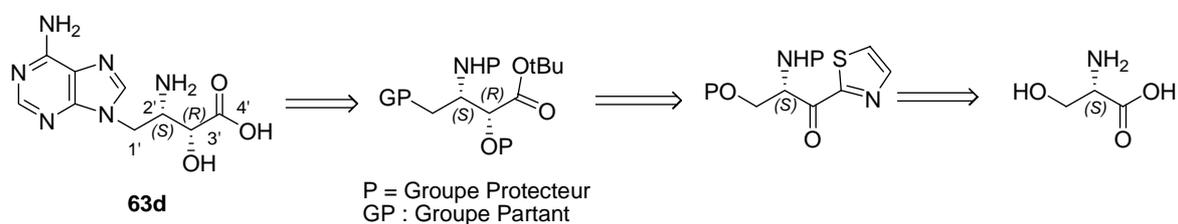
## 4. SYNTHÈSES

### 4.1 Synthèse de l'acide 4-(adén-9-yl)-(3S)-amino-(2R)-hydroxybutyrique 63d

La L-sérine a été choisie comme synthon chiral pour cette synthèse (Schéma 60). Dondoni et collaborateurs<sup>[122-124]</sup> ont étudié de façon exhaustive la réaction d'homologation d' $\alpha$ -aminoacides pour la préparation des aminohydroxyaldéhydes chiraux correspondants. Cette méthodologie exploite successivement la réaction d'addition d'organométalliques dérivés du cycle thiazole (fonction aldéhyde masquée) sur des esters dérivés d'aminoacides et la réduction stéréosélective des aminocétones correspondantes.

Cette méthode, appliquée à l'ester dérivé de la L-sérine et monoprotégé au niveau de son groupe amino devrait convenir pour la préparation de l'aminoalcool *syn* protégé qui servira de précurseur pour l'introduction de groupe adénosyle.

L'hydrolyse de la fonction thiazole suivie d'un déplacement nucléophile par l'adénine, après déprotection et activation sélective de la fonction alcool primaire, devrait permettre l'obtention du seconucléoside désiré.



**Schéma 60**

La suite des réactions mises en jeu dans cette synthèse est décrite ci-après.

### 4.1.1 Dérivatisation de la L-sérine

La dérivation de la L-sérine en ester méthylique protégé a été réalisée en quatre étapes en mettant en jeu des réactions classiques (Schéma 61).

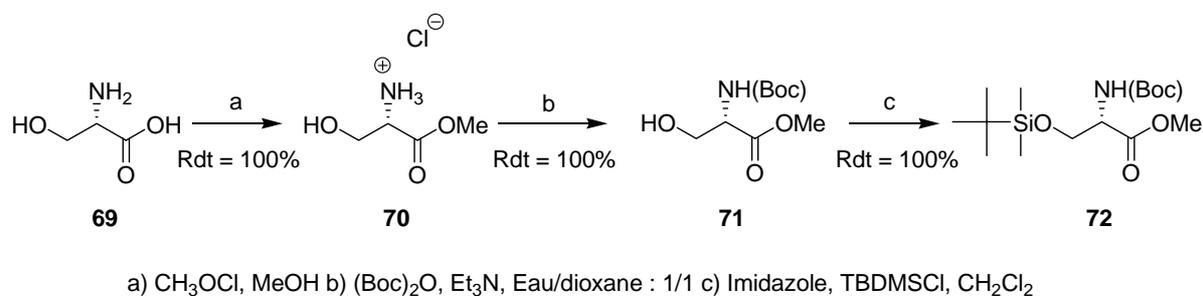


Schéma 61

### 4.1.2 Préparation des aminoalcools

Sur l'ester **72** dérivé de la L-sérine, l'addition du thiazolyl lithium généré *in situ* à partir du 2-bromothiazole et du butyl lithium conduit à l'aminocétone **73** correspondante. Sa réduction par  $\text{NaBH}_4$  conduit à un mélange des deux alcools diastéréoisomères **74** en proportion 1/1 (évaluation par RMN  $^1\text{H}$ ) (Schéma 62).

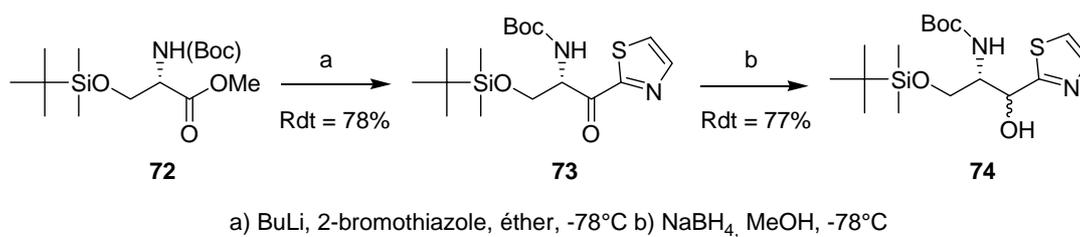
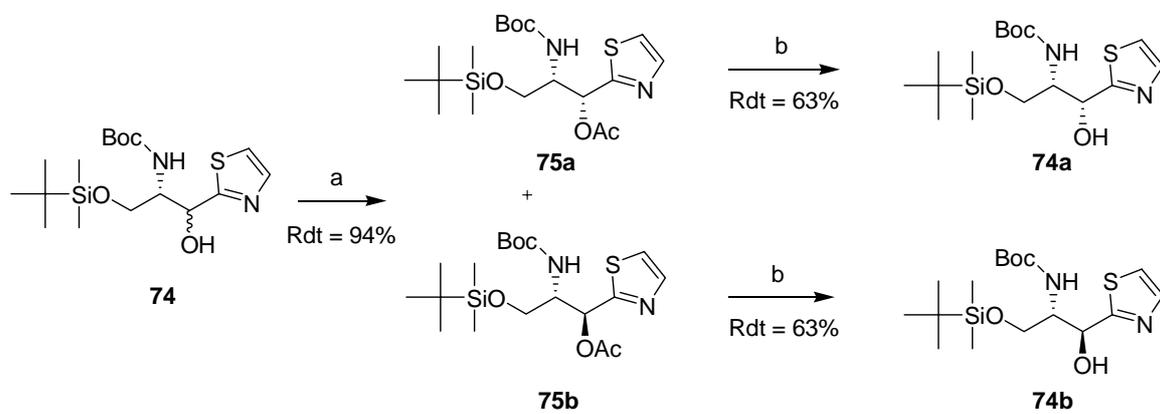


Schéma 62

Leur séparation nécessite leur dérivation sous forme de dérivés acétylés **75a-b** (Schéma 63, ci-contre). La configuration du nouveau stéréocentre obtenu en C-1 (dérivé **74a-b**) a été confirmée par corrélation chimique avec des authentiques. Après séparation par chromatographie éclair sur silice, les composés **75a** et **75b** sont désacétylés pour conduire respectivement aux deux aminoalcools **74a-b** déjà décrits dans la littérature<sup>[122]</sup> et qui ont servi de référence pour l'attribution de leur configuration respective en C-1.



a) Ac<sub>2</sub>O, Pyridine b) MeONa, MeOH

**Schéma 63**

La suite des synthèses a été conduite à partir de l'un ou l'autre des deux aminoalcools **74a** et **74b** diastéréoisomériquement purs (Schéma 65).

Dans une première série d'essais de synthèse du seconucléoside **63d** conduite à partir de l'intermédiaire **75a**, nous avons mis en évidence l'importance de la nature du groupe protecteur porté par l'azote lors de l'étape d'introduction du groupement adényle.

La simple désactivation de l'azote par un groupe tert-butoxycarbonyle n'est pas suffisante pour empêcher la formation quantitative d'aziridine lorsque le mésylate dérivé de **75a** est traité par l'adénine en milieu basique (Schéma 64).

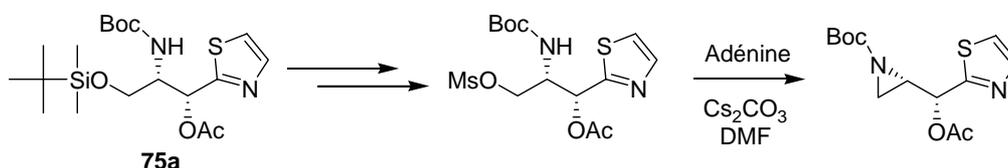
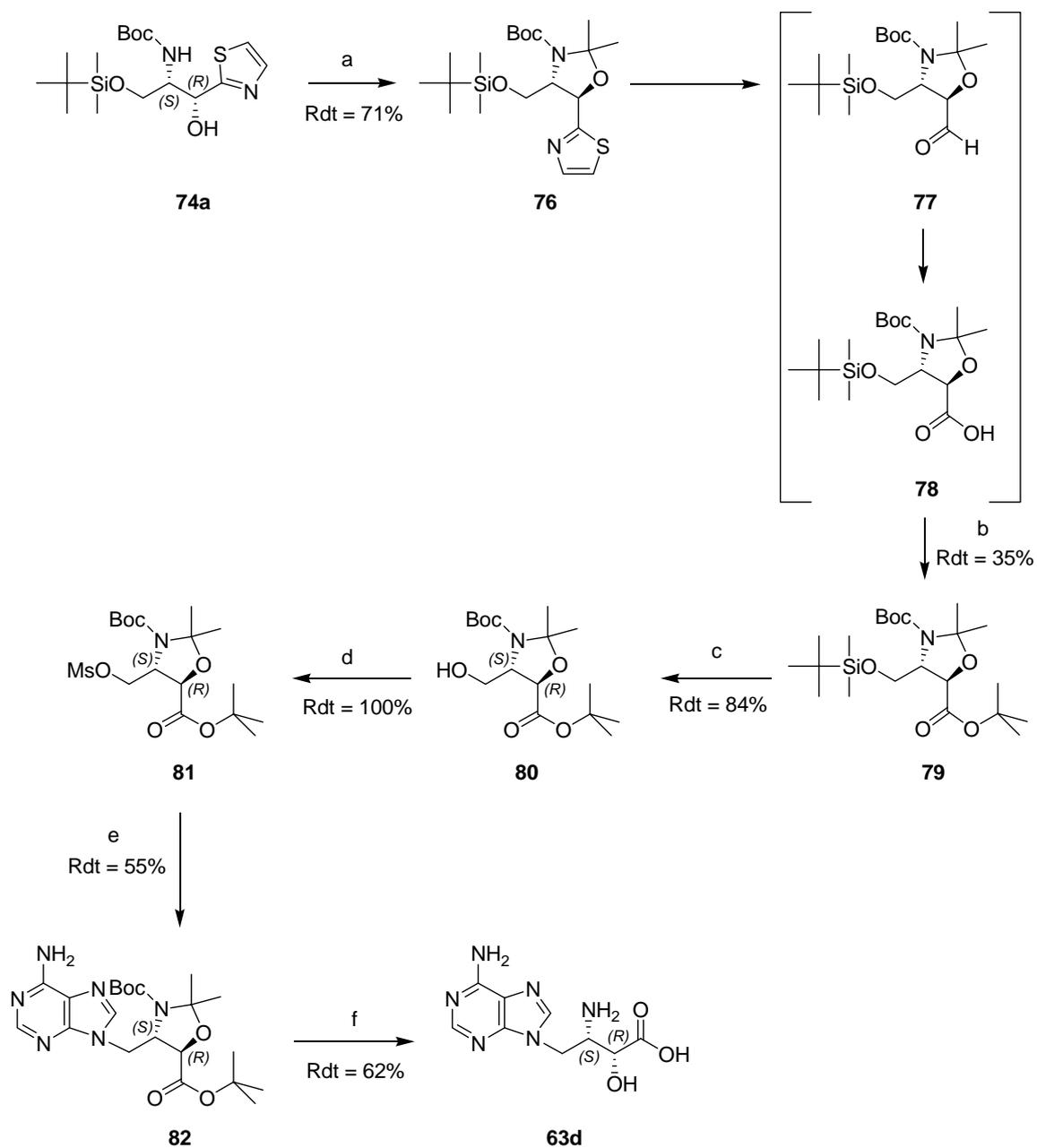


Schéma 64

Cette aziridine est stable dans les conditions réactionnelles utilisées et sa réouverture par un excès d'anion adényle n'a pas été observée compromettant ainsi l'approche synthétique envisagée à partir de l'intermédiaire **75a**.

Afin d'éviter cette réaction de substitution nucléophile intramoléculaire conduisant à une aziridine dans l'avant dernière étape de la synthèse du seconucléoside **63a**, nous avons choisi de transformer l' aminoalcool **75a** en oxazolidine correspondante **76** (Schéma 65). Cette protection empêche cette fois la formation d'aziridine. L'hydrolyse de la fonction thiazole permet d'obtenir l'aldéhyde **77** qui est oxydé en acide carboxylique puis estérifié pour donner l'ester tert-butyle **79**. La déprotection du groupement tertbutyldiméthylsilyle et la mise en place d'un groupement mésyle sur l'alcool primaire sont réalisées quantitativement. Le déplacement nucléophile de ce mésylate par l'adénine en présence de carbonate de césium se fait avec un rendement de 55 %. La déprotection finale des différents groupes protecteurs est réalisée en une seule étape (Schéma 65).



a) 2-méthoxypropène, acétone, PPTS<sub>cat</sub>, 60°C b) 1. CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN 2. NaBH<sub>4</sub>, MeOH 3. HgCl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O : 10/1 4. KMnO<sub>4</sub>, tBuOH, tampon phosphate de potassium 0,1M pH= 7,0 5. CCl<sub>3</sub>=NH-OtBu, BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> c) TBAF, THF d) MsCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP<sub>cat</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e) Adénine, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 80°C f) HCl 1M, 50°C, 4h

Schéma 65

## 4.2 Synthèse du (1R,2S)-3-(adén-9-yl)-2-amino-1-(thiazol-2-yl)propan-1-ol **64d**

La synthèse de l'inhibiteur **64d** a été effectuée à partir de l'intermédiaire **76d** préparé précédemment (Schéma 66).

La séquence réactionnelle utilisée est similaire à celle déjà décrite pour accéder au seconucléoside **63** (Schéma 65). Les différentes étapes mise en œuvre et les résultats obtenus sont illustrés ci contre (Schéma 66).

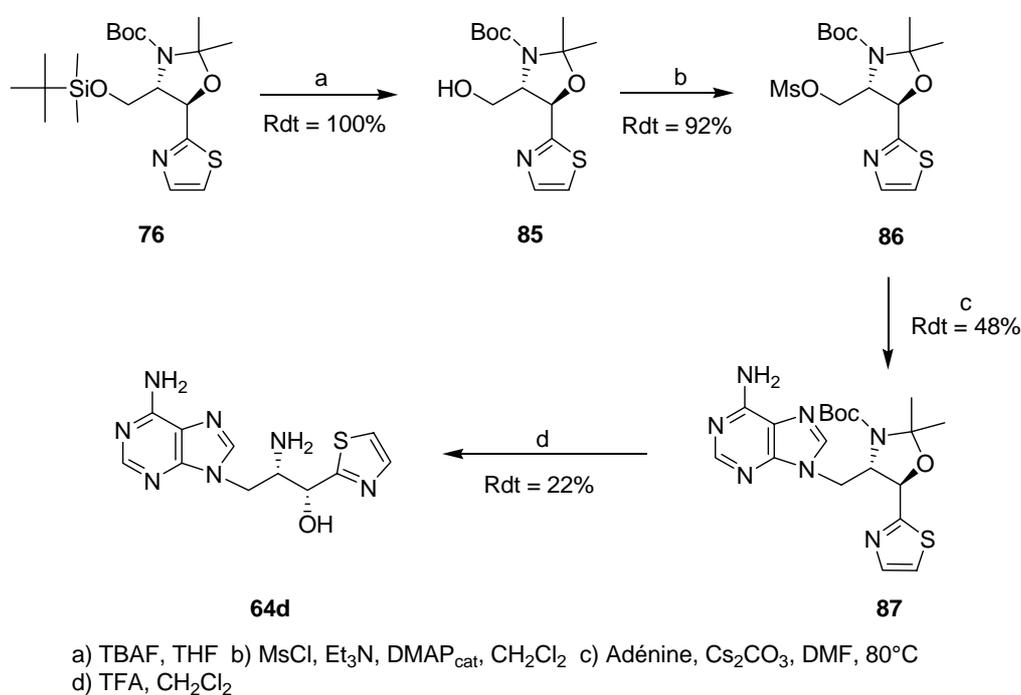
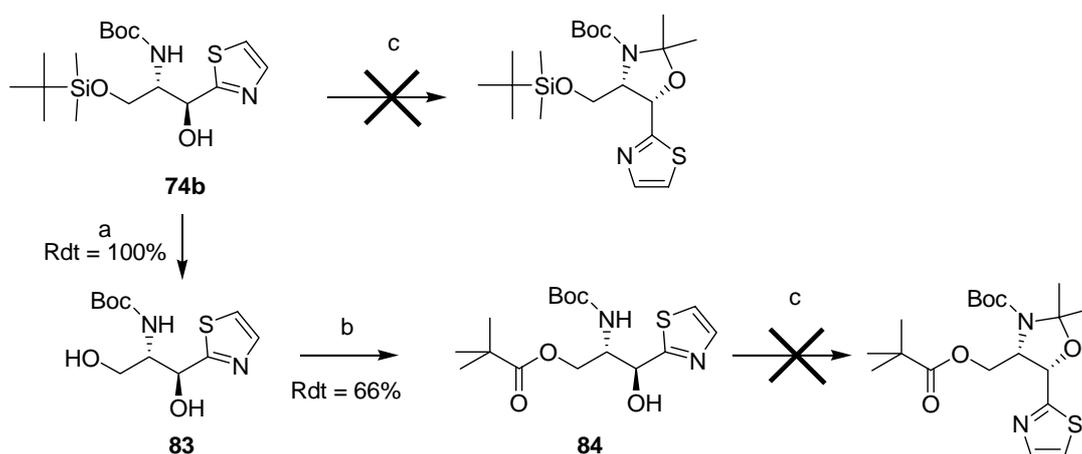


Schéma 66

## 4.3 Synthèse de l'acide 4-(adén-9-yl)-(3S)-amino-(2S)-hydroxybutyrique **63c**

La préparation de ce deuxième diastéréoisomère **63c** a été reprise à partir du composé **74b** séparé et purifié précédemment. Pour cette synthèse, nous avons souhaité suivre le même chemin réactionnel décrit sur le Schéma 65 et qui exige la transformation préalable de l'alcool **83** en oxazolidine correspondante.

Toutes les tentatives de dérivatisation de **74b** en oxazolidine se sont révélées infructueuses quelles que soient les méthodes utilisées. Le remplacement du groupement protecteur tert-butyl-diméthylsilyyle sur la structure moléculaire de **74b** par un groupement pivaloyle, supposé minimiser l'encombrement stérique des sites impliqués dans la cyclisation, ne nous a pas permis d'obtenir le produit désiré (Schéma 67).



a) TBAF, THF b) Piv-Cl, pyridine c) 2-méthoxypropène, acétone, PPTS<sub>cat</sub>, 60°C

Schéma 67

Faute de temps, les essais de synthèse ont été abandonnés mais une autre voie d'accès a été imaginée pour accéder au seconucléoside **63c** à partir d'un dérivé de **75b** doublement protégé sur le groupe amino (Schéma 68). Cette double protection au niveau de l'azote au même titre que l'oxazolidine devrait permettre de résoudre le problème.

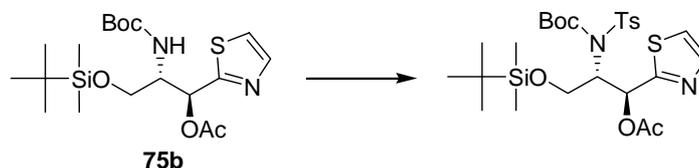


Schéma 68

#### 4.4 Synthèse du 1,2-di-(N<sup>9</sup>-adényl) éthane **68c**

Nous avons réalisé la préparation d'une des bis-adénines pour laquelle les résultats des expériences de modélisation moléculaires et de « docking » laissent prévoir une stabilisation remarquable dans le site actif de l'AdoHcy hydrolase. Un double déplacement nucléophile des atomes de brome du 1,2-dibromoéthane par l'anion dérivé de l'adénine généré dans le DMF à l'aide de l'hydruire de sodium conduit à la bis-adénine **68c** souhaitée (Schéma 69)<sup>[125]</sup>.

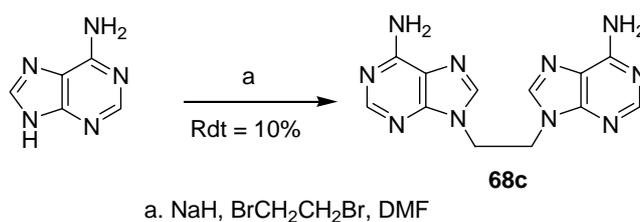


Schéma 69

Le faible rendement obtenu dans cette synthèse s'explique par les difficultés rencontrées lors de la purification de l'adduit **68c** insoluble dans l'eau et les solvants organiques usuels.

## 5. RESULTATS

Les cinétiques d'inhibition compétitive ont été réalisées à l'aide du test radioactif décrit précédemment. Les tests sont effectués sur 10 minutes avec des concentrations variables en adénosine (de 0,96  $\mu\text{M}$  à 6,02  $\mu\text{M}$ ) et en inhibiteur (de 0,1 à 676  $\mu\text{M}$ ). Les représentations graphiques selon les méthodes de Lineweaver et Burk d'une part et de Dixon d'autre part ont été utilisées pour les déterminations des constantes d'inhibition  $K_i$  des trois inhibiteurs synthétisés.

### 5.1 Interaction de 63d et 64d avec l'AdoHcy hydrolase

Les composés **63d** et **64d** ont été testés sur l'activité de l'AdoHcy hydrolase. Ils présentent tous deux un comportement d'inhibiteurs compétitifs. Les  $K_i$  ont été déterminés par la méthode de Lineweaver et Burk d'une part et de Dixon d'autre part (Graphique 8 et Graphique 9). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

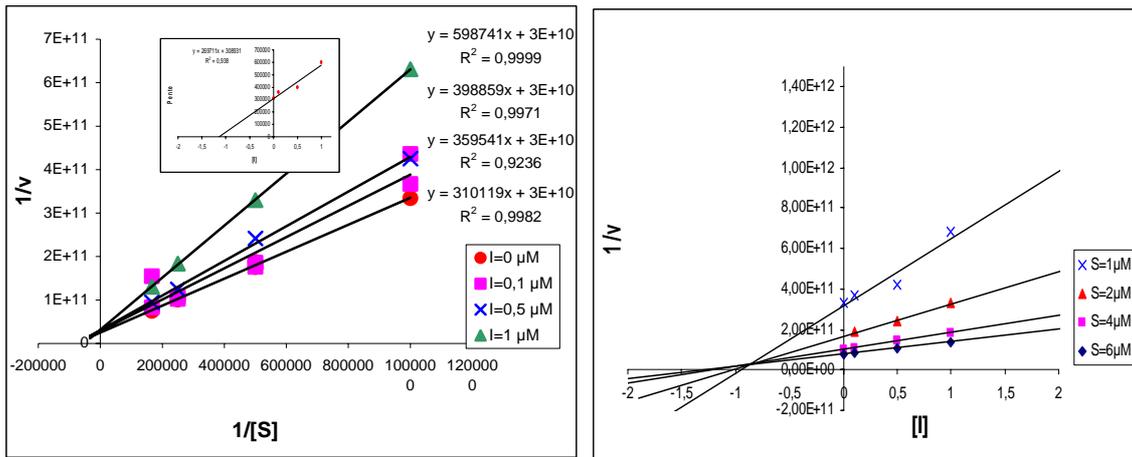
Composé	$K_i$
63d	1 $\mu\text{M}$
64d	1 mM

### 5.2 Cinétique d'inhibition du composé 68c

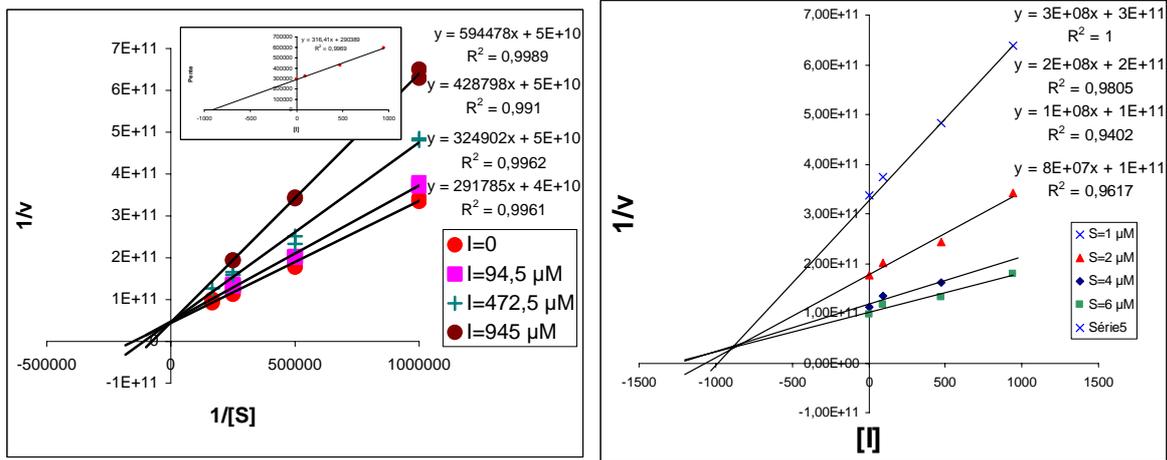
Le composé **68c**, comme nous l'avons mentionné, est totalement insoluble dans l'eau, dans un mélange eau/DMSO : 50/50 et dans le tampon phosphate utilisé pour les tests enzymatiques. Il a été transformé en chlorhydrate correspondant. Une solution mère de ce chlorhydrate a été préparée et ses dilutions utilisées pour préparer les différents milieux essais nécessaires à la mise en œuvre des cinétiques d'inhibition. Ce protocole présente un inconvénient majeur pour la détermination de la concentration effective en inhibiteur dans le tampon essai (tampon phosphate de potassium 20 mM, pH = 7,5). Une précipitation de la forme non protonée de **68c**, et qui ne serait pas visible à l'œil nu aux dilutions utilisées, reste

possible. Les valeurs des  $K_i$  mesurées dans cette dernière série d'essais ne peuvent pas être prises en considération.

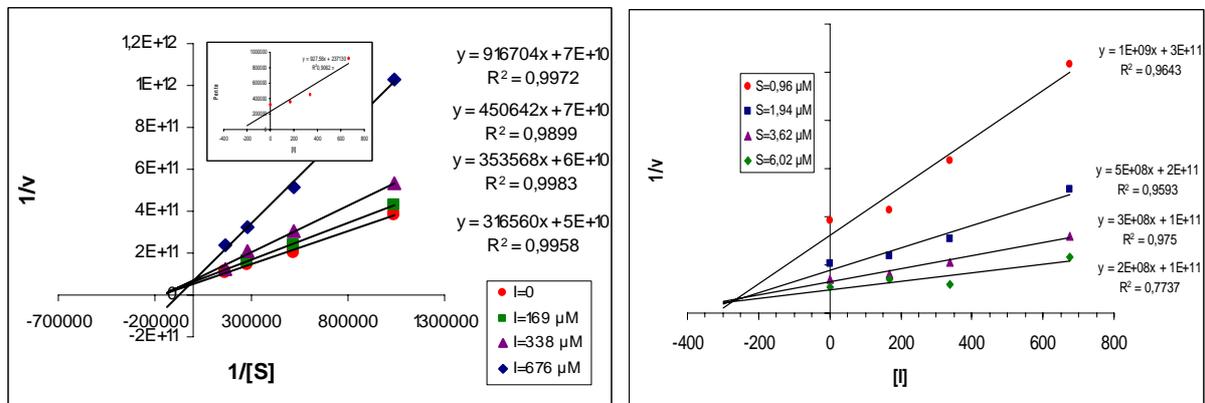
Les cinétiques observées (Graphique 9) permettent seulement d'affirmer que l'inhibition provoquée par **68c** est de type compétitif.



Graphique 7: Inhibition de l'AdoHcy hydrolase par 63d représentation selon Lineweaver et Burk et Dixon



Graphique 8: Inhibition de l'AdoHcy hydrolase par 64d représentation selon Lineweaver et Burk et Dixon



Graphique 9 : Inhibition de l'AdoHcy hydrolase par 68c sous la forme chlorhydrate, représentation selon Lineweaver et Burk et Dixon

## 6. CONCLUSION

Les rapports  $K_i/K_M$  (Ado) résultants de l'évaluation cinétique des deux premiers seconucléosides testés **63d** et **64d** sont respectivement de l'ordre de 0,1 et 100. Ces valeurs sont au moins cent fois supérieures à celles que l'on peut déduire des expériences de docking moléculaire effectuées avec ces deux inhibiteurs.

Il est certainement prématuré, à partir de ces résultats, concernant la mesure de l'affinité ( $K_i$  compétitif) d'un seul diastéréoisomère dans chacune des deux séries d'inhibiteurs, de pouvoir évaluer la pertinence des choix faits dans ces modèles (nature des déterminants structuraux) pour tenter d'optimiser les interactions de binding.

L'évaluation du pouvoir inhibiteur des six autres diastéréoisomères **63a-c** et **64a-c** dont la synthèse est en cours est nécessaire pour amorcer une analyse critique. De même, il aurait été utile pour discuter à ce stade de l'étude, de la validité des protocoles de modélisation utilisés, de pouvoir disposer des spectres de diffraction X des composés **63d** et **64d** afin de comparer leurs conformations dans leurs structures cristallines respectives avec celle retenue pour les expériences de "docking".

L'insolubilité, dans le tampon essai, de la bis-adénine **68c** n'a pas permis de tester la performance de ce dernier inhibiteur. L'adjonction sur la structure moléculaire de ce composé de deux groupes hydroxyles sur la chaîne en C<sub>2</sub> associant les groupes adényles est envisagée pour rendre soluble ce type d'inhibiteur et pouvoir déterminer les paramètres cinétiques d'un adduit porteur de deux groupes adényles.

## **CONCLUSION GENERALE**

Les objectifs synthétiques et enzymologiques de notre travail ont été consacrés à la recherche rationnelle de nouveaux inhibiteurs spécifiques de la S-adénosyl-L-homocysteine hydrolase.

A partir du mode d'action de l'enzyme, dont le mécanisme intime de chaque étape a pu être précisé grâce à la résolution des premiers spectres de diffraction X de la protéine cristallisée en présence ou absence d'inhibiteurs, nous avons pu exploiter trois nouvelles voies pour provoquer l'inhibition spécifique de l'enzyme.

Dans la première partie de notre travail nous avons synthétisé deux séries de nucléosides dont l'interaction avec l'étape hydrolytique du cycle catalytique était susceptible de générer dans le site actif de la forme fermée de l'enzyme des entités électrophiles puissantes et modifier de façon covalente un résidu nucléophile de la protéine impliqué dans la catalyse.

Les différentes cyanovinyladénosines et les esters dérivés de l'homoadénosine synthétisés, testés dans cette étude, provoquent tous l'inhibition irréversible de l'enzyme. Leur mécanisme d'inhibition a été précisé.

A l'exception de la (E)-6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-homoadénosine (**E**)-**4a** qui se comporte comme un marqueur d'affinité dirigé contre le site actif de l'enzyme et qui est capable de modifier chimiquement la protéine, les autres inhibiteurs sont tous substrats de l'activité oxydative de l'enzyme. Ils provoquent l'inhibition de celle-ci en réduisant de façon irréversible le cofacteur **NAD**<sup>+</sup> associé (Inhibiteur de **type I**).

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons démontré qu'il était possible, à l'aide de thionucléosides analogues du substrat, de cibler et modifier spécifiquement la cystéine 195 de l'**AdoHcy** hydrolase et provoquer son inactivation irréversible.

Les techniques de spectrométrie de masse **ESI/MS** et **LC/ESI-MS** appliquées à la protéine inhibée se sont révélées être des techniques de choix pour caractériser les modifications chimiques covalentes provoquées par la série d'inhibiteurs choisie dans cette étude.

Le résultat obtenu est particulièrement intéressant et apporte la preuve expérimentale du rôle central joué par la cystéine 195 dans le processus catalytique de l'enzyme.

Dans le dernier chapitre, les résultats obtenus, concernant le pouvoir inhibiteur des premiers séconucléosides testés sur l'activité de l'AdoHcy hydrolase ne sont pas à la hauteur des performances prédites à partir des expériences de docking moléculaires. Ce ne sont que des résultats préliminaires qui ne remettent pas en cause le bien fondé de notre démarche, qui exige d'être approfondie à l'aide des autres séconucléosides diastéréoisomères.

Le développement de cette étude est une des priorités de recherche du laboratoire et les synthèses de l'ensemble des inhibiteurs modèles, dont l'interaction avec le site actif de l'enzyme a été étudiée dans le laboratoire du Professeur A. Alix, sont en cours de réalisation.

Ma contribution à ce travail a été d'explorer une première voie d'accès aux premiers analogues de l'éritadénine, à partir de la L-sérine. Le chemin réactionnel utilisé avec succès pour la préparation des séconucléosides **63d** (2S,3R) et **64d** (2S,3R) sera utile pour la synthèse des deux autres diastéréoisomères dans ces séries, en utilisant cette fois la D-sérine comme synthon de départ.

Les inhibiteurs de l'**AdoHcy** hydrolase identifiés dans ce travail de recherche ont été confiés au Professeur E. De Clercq (Rega Institut, Louvain) pour l'évaluation de leurs propriétés antivirales et au Professeur P. Grellier pour l'évaluation de leurs propriétés antipaludiques.

En conclusion, dans ce travail j'ai abordé différents aspects de la recherche : synthèse organique, enzymologie, microbiologie et ouvert des voies qui seront utiles pour l'avancement du projet de recherche concernant l'inhibition de l'**AdoHcy** hydrolase.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Usdin, E.; Borchardt, R. T.; Creveling, R. C., *The biochemistry of S-Adenosylmethionine and related compounds*. Macmillan Press Ltd: London, 1982.
- [2] Borchardt, R. T., *Enzymatic basis of detoxification*. Academic Press: New York, 1980; 43.
- [3] Morita, Y.; Chiang, P. K.; Siraganian, R. P., Effect of inhibitors of transmethylation on histamine release from human basophils. *Biochem Pharmacol* **1981**, 30, (7), 785-91.
- [4] Chiang, P. K.; Gordon, R. K.; Tal, J.; Zeng, G. C.; Doctor, B. P.; Pardhasaradhi, K.; McCann, P. P., S-Adenosylmethionine and methylation. *Faseb J* **1996**, 10, (4), 471-80.
- [5] Pugh, C. S.; Borchardt, R. T.; Stone, H. O., Inhibition of Newcastle disease virion messenger RNA (guanine-7-)-methyltransferase by analogues of S-adenosylhomocysteine. *Biochemistry* **1977**, 16, (17), 3928-32.
- [6] Keller, B. T.; Borchardt, R. T., *Biological and drug design*; Humana Press: Clifton, New Jersey, 1986; 385-396.
- [7] Banerjee, A. K., *Pharmacol. Rev.* **1980**, 44, 175-205.
- [8] De Clercq, E., S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors as broad-spectrum antiviral agents. *Biochem Pharmacol* **1987**, 36, (16), 2567-75.
- [9] Boushey, C. J.; Beresford, S. A.; Omenn, G. S.; Motulsky, A. G., A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *Jama* **1995**, 274, (13), 1049-57.
- [10] Yuan, C.-S.; Saso, Y.; Lazarides, E.; Borchardt, R. T.; Robins, M. J., Recent Advances in S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitors and their potential clinical applications. *Exp. Opin. Ther. Patents* **1999**, 9, (9), 1197-1206.
- [11] Creedon, K. A.; Rathod, P. K.; Wellem, T. E., *Plasmodium falciparum* S-Adenosylhomocysteine Hydrolase : cDNA Identification, predicted protein sequence, and expression in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, (23), 16364-16370.
- [12] Shuto, S.; Minakawa, N.; Niizuma, S.; Kim, H.-S.; Wataya, Y.; Matsuda, A., New Neplanocin Analogues. 12. Alternative Synthesis and Antimalarial Effect of (6'R)-6'-C-

Methylneplanocin A, a Potent AdoHcy Hydrolase Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 45, 748-751.

[13] Kitade, Y.; Kozaki, A.; Miwa, T.; Nakanishi, M., Synthesis of base-modified noraristeromycin derivatives and their inhibitory activity against human and *Plasmodium falciparum* recombinant S-adenosyl-homocysteine hydrolase. *Tetrahedron* **2002**, 58, (7), 1271-1277.

[14] Kitade, Y.; Kojima, H.; Zulfiquir, F.; Kim, H.-S.; Wataya, Y., Synthesis of 2-Fluoronoraristeromycin and Its Inhibitory Activity against *Plasmodium falciparum* S-Adenosyl-L-homocysteine Hydrolase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, 13, 3963-3965.

[15] Bitonti, A. J.; Baumann, R. J.; Jarvi, E. T.; McCarthy, J. R.; McCann, P. P., Antimalarial Activity of a 4',5'-Unsaturated-5'-Fluoroadenosine Mechanism-Based Inhibitor of S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase. *Biochemical Pharmacology* **1990**, 40, (3), 601-606.

[16] Vandenplas, C.; Guillerme, D.; Guillerme, G., A new series of mechanism-based inhibitors of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from beef liver. *Nucleosides Nucleotides* **1999**, 18, (4-5), 569-70.

[17] Hoechst Marion Roussel Inc., US5624930, 1997.

[18] Merrel Dow Pharm. Inc, US5514688, 1996.

[19] Cools, M.; de Clercq, E., Correlation between the antiviral activity of acyclic and carbocyclic adenosine analogues in murine L929 cells and their inhibitory effect on L929 cells S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Biochem Pharmacol* **1989**, 38, (7), 1061-7.

[20] Guranowski, A.; Montgomery, J. A.; Cantoni, G. L.; Chiang, P. K., Adenosine analogues as substrates and inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Biochemistry* **1981**, 20, (1), 110-5.

[21] Hill, D. L.; Straight, S.; Allan, P. W.; Bennett, L. L., Jr., Inhibition of guanine metabolism of mammalian tumor cells by the carbocyclic analogue of adenosine. *Mol Pharmacol* **1971**, 7, (4), 375-80.

[22] De Clercq, E.; Descamps, J.; Somer, P. D.; Holy, A., (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenine : an aliphatic nucleoside analog with broad-spectrum antiviral activity. *Science* **1978**, 200, 563-565.

[23] De Clercq, E.; Holy, A., Antiviral activity of aliphatic nucleoside analogs : structure-function relationship. *Journal of Medicinal Chemistry* **1979**, 22, 510-513.

[24] Votruba, I.; Holy, A., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1980**, 45, 3039.

- [25] Huggin, S. J.; Zhang, Z. X.; Bray, M., *J. Infect. Dis.* **1999**, 179, 240-247.
- [26] Borchardt, R. T.; Keller, B. T.; Patel-Thombre, U., Neplanocin A. A potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and of vaccinia virus multiplication in mouse L929 cells. *J Biol Chem* **1984**, 259, (7), 4353-8.
- [27] Palmer, J. L.; Abeles, R. H., The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem* **1979**, 254, (4), 1217-26.
- [28] Wolfe, M. S.; Borchardt, R. T., S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase as a target for antiviral chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **1991**, 34, 1521-1530.
- [29] Borchardt, R. T., US Patent, 4859677, 1999.
- [30] Guillerm, D.; Muzard, M.; Allart, B.; Guillerm, G., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995**, 5, 1455-1460.
- [31] Endo, K.; Helmkamp, G. M., Jr.; Bloch, K., Mode of inhibition of beta-hydroxydecanoyl thioester dehydrase by 3-decynoyl-N-acetylcysteamine. *J Biol Chem* **1970**, 245, (17), 4293-6.
- [32] Helmkamp, G. M., Jr.; Brock, D. J.; Bloch, K., Beta-hydroxydecanoyl thioester dehydrase. Specificity of substrates and acetylenic inhibitors. *J Biol Chem* **1968**, 243, (12), 3229-31.
- [33] Carthy, J. R. M.; Jarvi, E. T.; Matthews, D. P.; Edwards, M. L.; Prakash, N. J.; Bowlin, T. L.; Medhi, S.; P.Bey, *The Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111, 1127-1128.
- [34] Yuan, C. S.; Yeh, J.; Liu, S.; Borchardt, R. T., Mechanism of inactivation of S-adenosylhomocysteine hydrolase by (Z)-4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-fluoroadenosine. *The Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, (23), 17030-17037.
- [35] Parry, R. J.; Muscate, A.; Askonas, L. J., 9-(5',6'-dideoxy-beta-D-ribo-hex-5'-ynofuranosyl)adenine, a novel irreversible inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Biochemistry* **1991**, 30, (41), 9988-97.
- [36] Parry, R. J.; Muscate, A.; Hertel, L. W., Comparison of the inhibition of type A and type B S-adenosylhomocysteine hydrolase: effects of cofactor content on inhibition behavior and nucleoside binding. *J Enzyme Inhib* **1995**, 8, (4), 243-53.
- [37] Robins, M. J.; Wnuk, S. F.; Yang, X.; Yuan, C. S.; Borchardt, R. T.; Balzarini, J.; De Clercq, E., Inactivation of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and antiviral activity with

5',5',6',6'-tetrahydro-6'-deoxy-6'-halohomoadenosine analogues (4'-haloacetylene analogues derived from adenosine). *J Med Chem* **1998**, 41, (20), 3857-64.

[38] Yuan, C. S.; Wnuk, S. F.; Robins, M. J.; Borchardt, R. T., A novel mechanism-based inhibitor (6'-bromo-5', 6'-didehydro-6'-deoxy-6'-fluorohomoadenosine) that covalently modifies human placental S-adenosylhomocysteine hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273, (29), 18191-18197.

[39] Wnuk, S. F.; Mao, Y.; Yuan, C. S.; Borchardt, R. T.; Andrei, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Robins, M. J., Discovery of type II (covalent) inactivation of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase involving its "hydrolytic activity": synthesis and evaluation of dihalohomovinyl nucleoside analogues derived from adenosine. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, 41, (16), 3078-3083.

[40] Muzard, M.; Vandenplas, C.; Guillerme, D.; Guillerme, G., The mechanism of inactivation of S-adenosylhomocysteine hydrolase by fluorinated analogs of 5'-methylthioadenosine. *J Enzyme Inhib* **1998**, 13, (6), 443-56.

[41] Guillerme, G.; Guillerme, D.; Vandenplas-Witkowski, C.; Rogniaux, H.; Carte, N.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A.; De Clercq, E.; Lambert, C., Synthesis, mechanism of action, and antiviral activity of a new series of covalent mechanism-based inhibitors of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, 44, (17), 2743-2752.

[42] Guillerme, D.; Guillerme, G.; Witkowski-Vandenplas, C., Inactivation of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase with fluorinated analogs of 2'- and 3'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, 20, (4-7), 689-93.

[43] Guillerme, G.; Guillerme, D.; Vandenplas Witkowski, C.; Glapski, C.; De Clercq, E., Inactivation of S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase with Novel 5'-Thioadenosine Derivatives. Antiviral Effects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, 13, 1649-1652.

[44] De La Haba, G.; Cantoni, G. L., *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 603-608.

[45] Holy, A.; Votruba, I.; Merta, A.; De Clercq, E.; Jelinek, R.; Slama, K.; Benes, K.; Melichar, O., *Biological methylation and drug design*, Humana Press: Clifton, New Jersey, 1986; 387.

[46] Richards, H. H.; Chiang, P. K.; Cantoni, G. L., Adenosylhomocysteine hydrolase. Crystallization of the purified enzyme and its properties. *J Biol Chem* **1978**, 253, (12), 4476-80.

[47] Fujioka, M.; Takata, Y., S-Adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. Purification and some properties. *J Biol Chem* **1981**, 256, (4), 1631-5.

- [48] Hershfield, M. S.; Aiyar, V. N.; Premakumar, R.; Small, W. C., S-Adenosylhomocysteine hydrolase from human placenta. Affinity purification and characterization. *Biochem J* **1985**, 230, (1), 43-52.
- [49] Hohman, R. J.; Guitton, M. C.; Veron, M., Purification of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Dictyostelium discoideum*: reversible inactivation by cAMP and 2'-deoxyadenosine. *Arch Biochem Biophys* **1984**, 233, (2), 785-95.
- [50] Yang, X.; Borchardt, R. T., Overexpression, Purification, and Characterization of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase from *Leishmania donovani*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, 383, (2), 272-280.
- [51] Henderson, D. M.; Hanson, S.; Allen, T.; Wilson, K.; Coulter-Karis, D. E.; Greenberg, M. L.; Hershfield, M. S.; Ullman, B., Cloning of the gene encoding *Leishmania donovani* S-adenosylhomocysteine hydrolase, a potential target for antiparasitic chemotherapy. *Mol Biochem Parasitol* **1992**, 53, (1-2), 169-83.
- [52] Nakanishi, M.; Iwata, A.; Yatome, C.; Kitade, Y., Purification and properties of recombinant *Plasmodium falciparum* S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Journal of Biochemistry* **2001**, 129, (1), 101-105.
- [53] Ogawa, H.; Gomi, T.; Mueckler, M. M.; Fujioka, M.; Backlund, P. S., Jr.; Aksamit, R. R.; Unson, C. G.; Cantoni, G. L., Amino acid sequence of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from rat liver as derived from the cDNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, 84, (3), 719-23.
- [54] Coulter-Karis, D. E.; Hershfield, M. S., *Ann. Hum. Genet.* **1989**, 53, 169-175.
- [55] Kasir, J.; Aksamit, R. R.; Backlund, P. S., Jr.; Cantoni, G. L., Amino acid sequence of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Dictyostelium discoideum* as deduced from the cDNA sequence. *Biochem Biophys Res Commun* **1988**, 153, (1), 359-64.
- [56] Turner, M. A.; Yuan, C. S.; Borchardt, R. T.; Hershfield, M. S.; Smith, G. D.; Howell, P. L., Structure determination of selenomethionyl S-adenosylhomocysteine hydrolase using data at a single wavelength. *Nature Structural Biology* **1998**, 5, (5), 369-376.
- [57] Yuan, C. S.; Ault-Riche, D. B.; Borchardt, R. T., Chemical modification and site-directed mutagenesis of cysteine residues in human placental S-adenosylhomocysteine hydrolase. *J Biol Chem* **1996**, 271, (45), 28009-16.
- [58] Gomi, T.; Date, T.; Ogawa, H.; Fujioka, M.; Aksamit, R. R.; Peter S. Backlund, J.; Cantoni, G. L., Expression of Rat Liver S-Adenosylhomocysteinase cDNA in *Escherichia Coli* and

Mutagenesis at the Putative NAD Binding Site. *The Journal of Biological Chemistry* **1989**, 264, (27), 16138-16142.

[59] Takata, Y.; Yamada, T.; Huang, Y.; Komoto, J.; Gomi, T.; Ogawa, H.; Fujioka, M.; Takusagawa, F., Catalytic Mechanism of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF ASP-130, LYS-185, ASP-189, AND ASN-190. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, (25), 22670-22676.

[60] Arredondo-Vega, F. X.; Charlton, J. A.; Edwards, Y. H.; Hopkinson, D. A.; Whithouse, D. B., *Ann. Hum. Genet.* **1989**, 53, 157-167.

[61] Hu, Y.; Komoto, J.; Huang, Y.; Gomi, T.; Ogawa, H.; Takata, Y.; Fujioka, M.; Takusagawa, F., Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. *Biochemistry* **1999**, 38, (26), 8323-33.

[62] Huang, Y.; Komoto, J.; Takata, Y.; Powell, D. R.; Gomi, T.; Ogawa, H.; Fujioka, M.; Takusagawa, F., Inhibition of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase by Acyclic Sugar Adenosine Analogue D-Eritadenine - Crystal Structure of S-Adenosylhomocysteine hydrolase complexed with D-eritadenine. *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, (9), 7477-7482.

[63] Yin, D.; Yang, X.; Hu, Y.; Kuczera, K.; Schowen, R. L.; Borchardt, R. T.; Squier, T. C., Substrate binding stabilizes S-adenosylhomocysteine hydrolase in a closed conformation. *Biochemistry* **2000**, 39, (32), 9811-9818.

[64] Elrod, P.; Zhang, J.; Yang, X.; Yin, D.; Hu, Y.; Borchardt, R. T.; Schowen, R. L., Contributions of active site residues to the partial and overall catalytic activities of human S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Biochemistry* **2002**, 41, (25), 8134-8142.

[65] Hu, Y.; Yang, X.; Yin, D. H.; Mahadevan, J.; Kuczera, K.; Schowen, R. L.; Borchardt, R. T., Computational characterization of substrate binding and catalysis in S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Biochemistry* **2001**, 40, (50), 15143-15152.

[66] Yuan, C. S.; Wnuk, S. F.; Liu, S.; Robins, M. J.; Borchardt, R. T., (E)-5',6'-didehydro-6'-deoxy-6'-fluorohomoadenosine: a substrate that measures the hydrolytic activity of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Biochemistry* **1994**, 33, (40), 12305-12311.

[67] Yang, X.; Yin, D.; Wnuk, S. F.; Robins, M. J.; Borchardt, R. T., Mechanisms of inactivation of human S-adenosylhomocysteine hydrolase by 5',5',6',6'-tetrahydro-6'-deoxy-6'-halohomoadenosines. *Biochemistry* **2000**, 39, (49), 15234-15241.

[68] Huang, Y.; Komoto, J.; Takata, Y.; Powell, D. R.; Gomi, T.; Ogawa, H.; Fujioka, M.; Takusagawa, F., Inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase by acyclic sugar adenosine

analogue D-eritadenine. Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase complexed with D-eritadenine. *J Biol Chem* **2002**, 277, (9), 7477-82.

[69] Votruba, I.; Holy, A., Eritadenines : novel type of potent inhibitors of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1982**, 47, 167-172.

[70] Merta, A.; Votruba, I.; Vesely, J.; Holy, A., Studies on S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. 9. S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase from mouse leukemia cells : isolation and properties. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1983**, 48, 2701-2708.

[71] Wong, H. N. C. et coll., *Chemical Reviews* **1989**, 89, 165-198.

[72] Chladek, S.; Smrt, J., Oligonucleotides. VIII. Synthesis of adenylyl-(5' -> 3')uridine, adenylyl-(5' -> 3')-cytidine, guanylyl-(5' -> 3')-uridine, guanylyl-(5' -> 3')-cytidine, cytidylyl-(5' -> 3')-cytidine, adenylyl-(5' -> 3')-uridylyl-(5' -> 3')-cytidine, and related compounds. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1964**, 29, 214-33.

[73] Ranganathan, R.; Jones, G. H.; Moffatt, J. G., Novel analogs of nucleoside 3',5'-cyclic phosphates. I. 5'-Mono- and dimethyl analogs of adenosine 3',5'-cyclic phosphate. *Journal of Organic Chemistry* **1974**, 39, (3), 290-8.

[74] Tronchet, J. M. J.; Martin, O. R., Cyanohalomethylidenetriphenylphosphoranes. *Helv. Chim. Acta* **1979**, 62, (5), 1401-5.

[75] Xu, Z. Q.; DesMarteau, D. D., A convenient one-pot synthesis of  $\alpha$ -fluoro- $\alpha,\beta$ -unsaturated nitriles from diethyl cyanofluoromethanephosphonate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1992**, (3), 313-15.

[76] Baader, E.; Bartmann, W.; Beck, G.; Below, P.; Bergmann, A.; Jendralla, H.; Kessler, K.; Wess, G., Enantioselective synthesis of a new fluoro-substituted HMG-CoA reductase inhibitor. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, (38), 5115-18.

[77] Singh, S.; DesMarteau, D. D.; Zuberi, S. S.; Witz, M.; Huang, H.-N., N-Fluoroperfluoroalkylsulfonimides. Remarkable New Fluorination Reagents. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 7194-7196.

[78] Tronchet, J. M. J.; Martin, O. R., Synthèse et propriétés physicochimiques de 5,6-didésoxy-6-halogéno-hept-5-éno-1,4-furanuronitriles. *Carbohydr. Res.* **1980**, 85, 187-200.

[79] Tronchet, J. M. J.; Martin, O. R., Synthèse et réactions de didésoxy-5,6-halogéno-6- $\alpha$ -D-xylo-hepténo-5-furanuronitriles. *Helv. Chim. Acta* **1977**, 60, (64), 585-589.

- [80] Young, J. A.; Tarrant, P., The Preparation of Some Derivatives of Chlorofluoroacetic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2432-2433.
- [81] Tilekar, J. N.; Palil, N. T.; Dhavale, D. D., Synthesis of C1-C6 Segment of carbonolide B : Wolff Rearrangement of Sugar  $\alpha$ -Diazo Ketones. *Synthesis* **2000**, 3, 395-398.
- [82] Patil, N. T.; Tilekar, J. N.; Dhavale, D. D., Intermolecular Michael Addition of Substituted Amines to a Sugar-Derived  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Ester : Synthesis of 1-Deoxy-D-*gluco*- and -L-*iodo*-homonojirimycin, 1-Deoxy-castanospermine and 1-Deoxy-8a-*epi*-castanospermine. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, (4), 1065-1074.
- [83] Nomoto, S.; Shimoyama, A., First synthesis of blastidic acid, a component amino acid in an antibiotic, blasticidin S. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, 1753-1755.
- [84] Epp, J. B.; Widlanski, T. S., Facile Preparation of Nucleoside-5'-carboxylic Acids. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 293-295.
- [85] Aoyama, T.; Shioiri, T., New methods and reagents in organic synthesis. 8. Trimethylsilyldiazomethane. A new, stable, and safe reagent for the classical Arndt-eistert synthesis. *Tetrahedron Letters* **1980**, 21, 4461-4462.
- [86] Ohba, T.; Tsuchiya, N.; Nishimura, K.; Ikeda, E.; Wakayama, J.; Takei, H., Mechanism-based inactivation of [ $\alpha$ ]-chymotrypsin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1996**, 6, (5), 543-546.
- [87] Brahms, D. L. S.; Dailey, W. P., Fluorinated Carbenes. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1585-1632.
- [88] Birchall, J. M.; Cross, G. E.; Haszeldine, R. N., *Proc. Chem. Soc.* **1960**, 81.
- [89] Bessard, Y.; Müller, U.; Schlosser, M., *gem*-Difluorocyclopropanes : an improved method for their preparation. *Tetrahedron* **1990**, 46, (15), 5213-5221.
- [90] Dolbier, W. R. J.; Wojtowicz, H.; Burkholder, C. R., New Zinc Difluorocarbenoid Reagent. *Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, 5420-5422.
- [91] Burton, D. D.; Naeae, D. G., Bromodifluoromethylphosphonium Salts. A Convenient Source of Difluorocarbene. *Journal of the American Chemical Society* **1973**, 95, 8467-8468.
- [92] Matysiak, S.; Fitznar, H.-P.; Schnell, R.; Pfeleiderer, W., Acetals as New 2'-O-Protecting Functions for the Synthesis of Oligoribonucleotides : Synthesis of Uridine Building Blocks and Evaluation of Their Relative Acid stability. *Helvetica Chimica Acta* **1998**, 81, 1545-1566.

- [93] Della Ragione, F.; Pegg, A. E., Effect of analogues of 5'-methylthioadenosine on cellular metabolism. Inactivation of S-adenosylhomocysteine hydrolase by 5'-isobutylthioadenosine. *The Biochemical Journal* **1983**, 210, (2), 429-435.
- [94] Hohman, R. J.; Guitton, M. C.; Veron, M., Inactivation of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase by cAMP results from dissociation of enzyme-bound NAD<sup>+</sup>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, 82, (14), 4578-4581.
- [95] Gomi, T.; Fujioka, M., Inactivation of Rat Liver S-Adenosylhomocysteinase by Iodoacetamide. *Biochemistry* **1982**, 21, 4171-4176.
- [96] Takata, Y.; Fujioka, M., 5'-[p-(Fluorosulfonyl)benzoyl]adenosine-Mediated Inactivation of S-Adenosylhomocysteinase. *Biochemistry* **1984**, 23, 4357-4362.
- [97] Aksamit, R. R.; Peter S. Backlund, J.; Malcolm Moos, J.; Caryk, T.; Gomi, T.; Ogawa, H.; Fujioka, M.; Cantoni, G. L., The Role of Cysteine 78 in Fluorosulfonylbenzoyladenosine Inactivation of Rat Liver S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, (6), 4084-4091.
- [98] Vandenplas Witkowski, C. Synthèses, mécanisme d'action et évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs suicides de la S-Adénosyl-L-homocystéine hydrolase. Recherche de nouveaux agents à propriétés antivirales. Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, 1999.
- [99] Houston, M. E., Jr.; Vander Jagt, D. L.; Honek, J. F., Synthesis and biological activity of fluorinated intermediates of the methionine salvage pathway. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1991**, 1, (11), 623-8.
- [100] Pignot, M.; Pljevaljcic, G.; Weinhold, E., Efficient Synthesis of S-Adenosyl-L-Homocysteine - Natural Product Analogues and Their Use to Elucidate the Structural Determinant for Cofactor Binding of the DNA Methyltransferase M.HhaI. *Eur. J. Org. Chem* **2000**, 549-555.
- [101] Kuhn, R.; Jahn, W., Vom Adenosin abgeleitete Thioäther und S-Oxide. *Chem. Ber.* **1965**, 98, 1699-1704.
- [102] Bordwell, F. G.; Andersen, H. M., The Reaction of Epoxides with Thiourea. *Journal of the American Chemical Society* **1953**, 75, 4959-4962.
- [103] Price, C. C.; Kirk, P. F., Some Observations on the Reaction of Alkali Thiocyanates with Epoxides. *Journal of the American Chemical Society* **1952**, 75, 2396-2400.

- [104] Tamelen, E. E. V., The Formation and Ring-Opening of Alkenes Sulfides. *Journal of the American Chemical Society* **1951**, 73, 3444-3448.
- [105] Chan, T. H.; Finkenbine, J. R., Facile Conversion of Oxiranes to Thiiranes by Phosphine Sulfides. Scope, Stereochemistry, and Mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, 94, (8), 2880-2882.
- [106] Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Bennani, Y. L.; Crispino, G. A.; Hartung, J.; Jeong, K. S.; Kwong, H. L.; Morikawa, K.; Wang, Z. M.; et al., The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and a process improvement. *Journal of Organic Chemistry* **1992**, 57, (10), 2768-71.
- [107] Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B., Catalytic Asymmetric Dihydroxylation. *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)* **1994**, 94, (8), 2483-547.
- [108] Vorbrüggen, H.; Höfle, G., *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1256-1268.
- [109] Vorbrüggen, H.; Krolkiewicz, K.; Bennua, B., *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1234-1255.
- [110] Kitz, K.; Wilson, Z. B., *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 3240-3249.
- [111] Clercq, E. D.; Holy, A., Alkyl Esters of 3-Adenin-9-yl-2-hydroxypropanoic Acid : A New Class of Broad-Spectrum Antiviral Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **1985**, 28, 282-287.
- [112] Chiang, P. K., Biological Effects of Inhibitors of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. *Pharmacology & Therapeutics* **1998**, 77, (2), 115-134.
- [113] Yin, D.; Yang, X.; Borchart, R. T.; Yuan, C.-S., Mechanism-Based S-Adenosyl-L-Homocystéine Hydrolase Inhibitors in the Search for Broad-Spectrum Antiviral Agents. *Biochemical Chemistry : Applying Chemical Principles to the Understanding and Treatment of disease*; Torrence, P. F., John Wiley & Sons, Inc: 2000; 41-71.
- [114] Okumura, K.; Matsumoto, K.; Fukamizu, M.; Yasuo, H.; Taguchi, Y.; Sugihara, Y.; Inoue, I.; Seto, M.; Sato, Y.; Takamura, N.; Kanno, T.; Kawazu, M.; Mizoguchi, T.; Saito, S.; Takashima, K.; Takeyama, S., Synthesis and Hypocholesterolemic Activities of Eritadenine Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **1974**, 17, (8), 846-855.
- [115] Clercq, E. D., Antiviral Activity of Aliphatic Nucleoside Analogues : Structure-Fonction Relationship. *Journal of Medicinal Chemistry* **1979**, 22, (5), 510-513.

- [116] Schanche, J. S.; Schanche, T.; Ueland, P. M.; Holy, A.; Votruba, I., The effect of aliphatic adenine analogue on *S*-adenosylhomocysteine and *S*-adenosylhomocysteine hydrolase in intact rat hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* **1984**, 26, 553-558.
- [117] Stewart, J. J. P., Optimization of Parameters for Semi-Empirical Methods II-Applications. *J. Comp. Chem.* **1989**, 10, 221.
- [118] Stewart, J. J. P., Optimization of Parameters for Semi-Empirical Methods I-Methods. *J. Comp. Chem.* **1989**, 10, 221.
- [119] Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J., Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comp. Chem.* **1998**, 19, 1639-1662.
- [120] Goodsell, D. S.; Olson, A. J., Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing. *Proteins : Str. Func. and Genet.* **1990**, 8, 195-202.
- [121] Goodsell, D. S.; Morris, G. M.; Olson, A. J., Docking of Flexible Ligands : Applications of Autodock. *J. Mol. Recognition* **1996**, 9, 1-5.
- [122] Dondoni, A.; Perrone, D., 2-Thiazolyl  $\alpha$ -Amino Ketones: A new Class of Reactive Intermediates for the Stereocontrolled Synthesis of Unusual Amino Acids. *Synthesis* **1993**, 11, 1162-1176.
- [123] Dondoni, A.; Perrone, D., Total Synthesis of (+)-Galactostatin. An Illustration of the Utility of the Thiazole-Aldehyde Synthesis. *Journal of Organic Chemistry* **1995**, 60, 4749-4754.
- [124] Dondoni, A.; Marra, A.; Perrone, D., Efficacious Modification of the Procedure for the Aldehyde Release from 2-Substituted Thiazoles. *Journal of Organic Chemistry* **1993**, 58, 275-277.
- [125] Browne, D. T.; Eisinger, J.; Leonard, N. J., Synthetic Spectroscopic Models Related to Coenzymes and Base Paires. Evidence for Intramolecular Base-Base Interactions in Dinucleotide Analogs. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, 90, (26), 7302-7323.
- [126] Bradford, M. M., *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248.
- [127] Cramer, F.; Weimann, G., *Chem. Ber.* **1961**, 94, 996-1007.

[128] Ranganathan, R. S.; Jones, G. H.; Moffatt, J. G., Novel analogs of nucleoside 3',5'-cyclic phosphates. I. 5'-Mono- and dimethyl analogs of adenosine 3',5'-cyclic phosphate. *J Org Chem* **1974**, 39, (3), 290-302.

[129] Parikh, J. R.; Wolff, M. E.; Burger, A., Analogs of Nucleotides. II. Phosphonate Esters of Ribose and Glucopyranosyl Purine Derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, 79, 2778-2781.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

---

## INDICATIONS GENERALES

Au cours de ce travail, l'appareillage suivant a été utilisé

### Spectroscopie RMN

Appareil à transformée de Fourier BRUKER AC 250 (250 MHz pour le proton, 62,5 MHz pour le carbone 13 et 235 MHz pour le fluor 19).

Le solvant utilisé pour l'enregistrement des spectres de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{19}\text{F}$  est  $\text{CDCl}_3$  sauf indication contraire. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane (TMS) utilisé comme référence interne (sauf indication contraire). Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz.

Les notations suivantes sont utilisées

s : singulet ; d : doublet ; t : triplet ; q : quadruplet ; m : multiplet ou massif non analysable ; dq : double quadruplet , tt : triplet de triplet ; etc...

### Spectrométrie Infra-Rouge

Les spectres IR ont été enregistrés avec le spectrophotomètre AVATAR 320 FT-IR. Les fréquences d'absorption sont exprimées en  $\text{cm}^{-1}$  à leur maximum d'intensité avec une incertitude absolue de  $5 \text{ cm}^{-1}$ .

### Spectrométrie de Masse

- Les spectres de masse ont été enregistrés avec un spectromètre de masse AUTOSPEC (VG Instruments). L'énergie du faisceau électronique d'ionisation est de 70 eV. Les spectres obtenus en electrospray ont été réalisés avec l'appareil Q-TOF de chez Micromass.
- Pour les études des protéines, l'ionisation chimique en mode électrospray a été réalisée avec un spectromètre de masse Micromass Q-TOF.
- L'étude des peptides obtenus après digestion par l'EndoLys C de la protéine a été réalisée avec un spectromètre de masse Q-TOF de chez Micromass couplé avec un

---

appareillage de Chromatographie Liquide Haute Performance Waters Alliance 2695 utilisant comme détecteur l'appareil Waters 2487.

### **Chromatographie en Phase Gazeuse (CG)**

Les chromatographies en phase gazeuse sont réalisées sur l'appareil Hewlett Packard HP6890 Series GC System en utilisant comme intégrateur l'appareil Hewlett Packard HP3395 Integrator.

### **CG-MS**

Les expériences de CG-MS ont été réalisées sur un appareil ThermoQuest CE Instruments avec l'appareil TRACE GC 2000 Series pour la chromatographie en phase gazeuse et l'appareil FINNIGAN Trace MS pour la spectrométrie de masse.

### **Spectrométrie Ultra-Violette**

Les spectres UV-visible ont été enregistrés avec un spectromètre Uvikon 941 (KONTRON). Les longueurs d'onde sont exprimées en nm.

### **Mesure des points de fusion**

Les points de fusion sont déterminés en tube capillaire à l'aide d'un appareil Büchi.

### **Mesure des pouvoirs rotatoires**

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés avec un polarimètre PERKIN ELMER 241, à 20°C. Ils sont notés comme suit :  $[\alpha]_D$  (c en g/mL, solvant).

### **Scintigraphie liquide**

Les activités des échantillons radioactifs ont été mesurées avec un compteur à scintillation liquide Packard. Le liquide scintillant utilisé pour les mesures est le cocktail Ultima-Flo AP (Packard).

---

### **Chromatographies sur couche mince**

- silice MERCK Art 5554 DC Alufolen Kieselgel 60 F
- silice greffée MERCK RP-18 F254S.

### **Chromatographies sur colonne**

Les chromatographies-éclair sur colonne ont été effectuées avec

- du gel de silice 9385 MERCK Kieselgel 60 de granulométrie comprise entre 0,040 et 0,063 mm.
- la résine hydrophobe HP 20 SS Prolabo.
- Un gel d'alumine neutre, Aluminiumoxid 90 MERCK avec une granulométrie comprise entre 0,063 et 0,200 mm.

### **Chromatographies du matériel biologique.**

- Cellulose Phosphate, résine de cellulose phosphorylée, échangeuse de cations, Bio Rad,
- DEAE cellulose DE 52 Whatman, résine échangeuse d'anions,
- Sephacryl S 200 high resolution Pharmacia Biotech
- Sephadex G-25 Pharmacia Fine Chemicals

### **HPLC**

Les analyses et les séparations par Chromatographie Liquide Haute Performance ont été réalisées avec un appareil Shimadzu LC-6A, sur des colonnes Interchrom ou Macherey Nagel

- Sphérisorb ODS2 5  $\mu$  250 x 4,6 mm (analytique)
- Nucléodur 5 $\mu$  250 x 4,6 mm (analytique)

La détection des composés a été réalisée à l'aide d'un détecteur UV/visible Shimadzu SPD-6AV.

### **Centrifugations**

- Les centrifugations ont été réalisées avec une centrifugeuse J2-MC Beckman.
- La centrifugation en continu à 40000 g a été faite avec une centrifugeuse CEPA Carl Padberg 402-25530.

### **Cultures bactériennes**

Les cultures bactériennes sont faites dans un réacteur Bioflo 3000-new brunswick scientific.

### **Electrophorèses**

Les électrophorèses ont été réalisées sur l'appareil mini-protean II Slab Cell, Bio Rad.

### **Fluorimètre**

La fluorescence est mesurée avec un appareil Perkin Elmer LS 50 E.

### **Analyse**

Les analyses élémentaires sont effectuées sur l'appareil Perkin Elmer 2400CHN Elemental Analyser.

---

## ENZYMOLOGIE

### Méthodes

#### 1. DOSAGE DES PROTEINES

Au cours de la purification, la concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford<sup>[126]</sup>. Le **BSA** (Bovin Serum Albumine) est utilisé comme standard.

#### 2. MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'activité de l'**AdoHcy** hydrolase est déterminée dans le sens synthétique<sup>[93]</sup> en mesurant la quantité de [2,8-<sup>3</sup>H]-**AdoHcy** formée au cours du temps à partir de la [2,8-<sup>3</sup>H]-**Ado** et de L-homocystéine après séparation des deux nucléosides sur des microcolonnes de cellulose phosphorylée (échangeuses de cations). Chaque essai enzymatique est effectué dans un volume total de 50 µL contenant :

- 10 µL d'**AdoHcy** hydrolase (0,02 U,  $7 \cdot 10^{-5}$  µmol)
- 10 µL d'un mélange de [2,8-<sup>3</sup>H]-**Ado** (10 µM ; 65000 dpm) et de D,L-homocystéine (5 mM).
- 30 µL de tampon phosphate de potassium 20 mM, **EDTA** 1 mM, **BSA** 1 mg/mL, pH=7,5.

Le milieu est incubé à 37 °C pendant 10 minutes après avoir initié la réaction par ajout d'enzyme à t = 0. La réaction enzymatique est stoppée par addition de 150 µL d'acide chlorhydrique 150 mM. Par la suite, 150 µL de l'échantillon sont déposés sur une microcolonne de résine Cellulose Phosphate 0,5 mL (cellulose phosphorylée échangeuse de cations, Sigma) équilibrée avec une solution d'acide chlorhydrique 10 mM. La [2,8-<sup>3</sup>H]-**Ado** résiduelle est éluée avec 5 mL d'acide chlorhydrique 10 mM. Une seconde élution par 5 mL d'acide chlorhydrique 0,5 M permet la récupération de la [2,8-<sup>3</sup>H]-**Ado** formée.

La radioactivité de chaque éluat est déterminée par comptage dans 6 mL de scintillant (Ultima Flo AP, Packard) (scintigraphie liquide).

Un "blanc" contenant le milieu réactionnel sans enzyme est traité selon le même protocole et la radioactivité résiduelle comptée est soustraite de celle mesurée dans chacun des essais enzymatiques.

### 3. PURIFICATION DE L'AdoHcy HYDROLASE RECOMBINANTE DE PLACENTA HUMAIN

La purification de l'**AdoHcy** hydrolase recombinante du placenta humain surproduite par *E. Coli* **JM 109**, modifiée par le plasmide **pPROK cd 20**, est réalisée selon le protocole suivant.

#### TAMPONS UTILISES.

- Tampon A : Milieu de culture **LB** (Luria Bertani).
  - Bactotryptone 10 g/L
  - Extrait de levure 5 g/L
  - NaCl 5 g/L
  - Milieu stérilisé 20 min à 110°C , pH ajusté à 7,2 avec NaOH
- Tampon B : Tris HCl 50 mM, **EDTA** 2 mM, pH = 7,5.
- Tampon C : Phosphate de potassium 100 mM, **EDTA** 1 mM, pH = 7,2.
- Tampon D : Phosphate de potassium 10 mM, **EDTA** 1 mM, pH = 7,2.
- Tampon E : Phosphate de potassium 50 mM, **EDTA** 1 mM, pH = 7,2.

Toutes ces opérations sont effectuées à 4 °C.

#### *3.1 Précultures*

Des milieux de culture **LB** (2x100 mL) stériles contenant de l'ampicilline (50 µg/mL) sont ensemencés à partir d'une gélose profonde et mis à incuber à 37 °C pendant une nuit.

#### *3.2 Cultures*

Dans le réacteur Bioflo 3000 - New brunswick scientific contrôlant la température, l'agitation, l'oxygène dissout et le pH, le milieu de culture (11 L) stérile contenant de l'Ampicilline (50 µg/mL) est ensemencé par la préculture (110 mL) et agité à 37°C jusqu'à l'obtention d'une **DO** (densité optique) de 0,6. **L'IPTG** (isopropyl-R-D-

---

thiogalactopyranoside) est alors ajouté ( $c_{\text{finale}} = 1 \text{ mM}$ ) comme inducteur et la croissance est poursuivie pendant 8 h jusqu'à une **DO** de 2,5-2,7. Le milieu bactérien est centrifugé en continu à 40000 g avec la centrifugeuse Ceba Carl Padberg 402 25530. Le culot de bactéries obtenu (24 g) est réparti par lot de 5, 3 et 1 g et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *3.3 Cassage des cellules*

7 g de bactéries, mises en suspension dans 80 mL de tampon B, sont agitées très lentement avec du lysozyme 1 mg/mL pendant 30 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . L'observation au microscope des fractions ainsi traitées permet de vérifier l'efficacité de l'action du lysozyme. Les cellules sont ensuite cassées par choc thermique, les échantillons sont refroidis dans un bain contenant un mélange éthanol/azote liquide et réchauffés brutalement dans un bain à  $37^{\circ}\text{C}$ . L'opération est répétée trois fois. L'ensemble est centrifugé 30 min à 20000 g.

### *3.4 DEAE Cellulose DE52 Whatman*

Afin d'éliminer les acides nucléiques, le surnageant est déposé sur une colonne échangeuse d'anions **DEAE Cellulose DE 52** Whatman ( $h=6,5 \text{ cm}$ ,  $V = 40 \text{ cm}^3$ ) équilibrée avec du tampon C. L'ensemble des protéines est élué par 150 mL de tampon C (débit 1 mL/min). Les fractions contenant l'activité enzymatique sont rassemblées et diluées avec du tampon D.

### *3.5 Fractionnement par le sulfate d'ammonium*

Deux coupes, à 35 % et à 60 % de saturation en sulfate d'ammonium, sont réalisées. La deuxième coupe est réalisée sur 12h à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les centrifugations se font à 10000 g pendant 30 min. Le culot obtenu lors de la dernière centrifugation et contenant l'activité enzymatique est remis en suspension dans un minimum de tampon D. Une dialyse contre 2 x 2 L de tampon D permet d'éliminer le sulfate d'ammonium.

### *3.6 Sephacryl S200 High Resolution – Pharmacia Biotech*

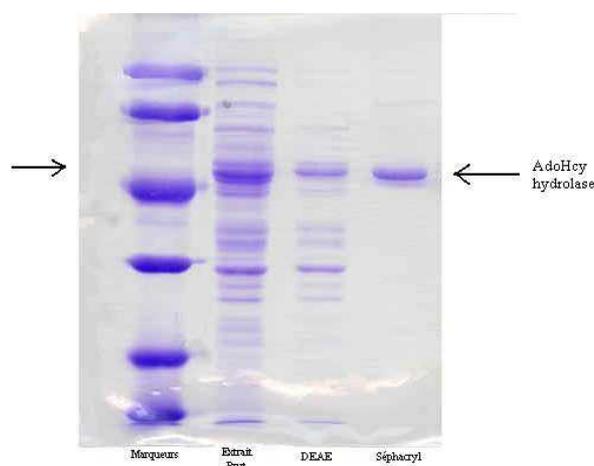
La solution protéinique obtenue est déposée sur une colonne d'exclusion-diffusion Séphacryl S200 high resolution - Pharmacia Biotech ( $h = 95 \text{ cm}$ ,  $V = 610 \text{ cm}^3$ )

préalablement équilibrée avec du tampon E. Le même tampon est utilisé pour l'élution des protéines (débit 0,5 mL/min). Toutes les fractions contenant l'activité enzymatique sont rassemblées, concentrées et échangées par du tampon D sur membrane Amicon (PM 10).

A ce stade de la purification enzymatique, la pureté de l'enzyme est contrôlée par spectrométrie de masse et par électrophorèse sur gel **SDS PAGE**. Sa pureté est jugée suffisante pour la suite des études. Pour les études de masse la fraction centrale correspondant au pic d'élution est concentrée et conservée à part.

### 3.7 Electrophorèse sur Gel SDS PAGE

Les électrophorèses (mini-protean II Slab cell, Biorad) en conditions dénaturantes (gel **SDS-Page**) sont effectuées sur un gel en plaque à 12 % de polyacrylamide contenant 1 % de **SDS** en tampon Tris HCl, pH = 8,8 selon le protocole de Laemmli. Les échantillons sont dilués dans 1 mL de tampon Tris 0,5 M, pH = 8.8, glycérol 1 %, **SDS** 2 %, 3mercaptoéthanol 0,5 % et bleu de bromophénol 0,5 %.



## 4. DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES D'INACTIVATION

### 4.1 Inhibiteurs irréversibles

Chaque expérience de préincubation est faite dans un volume total de 50  $\mu\text{L}$  contenant :

- 10  $\mu\text{L}$  d'enzyme (0,02 U,  $7 \cdot 10^{-5}$   $\mu\text{mol}$ ),

- 20 µL de tampon phosphate de potassium 20 mM, **EDTA** 1 mM, **BSA** 1 mg/mL, pH = 7,5,
- 10 µL d'inhibiteur de concentration variable (de 1 à 209 µM).

L'incubation se fait à 37 °C sur une période de temps de 0 à 60 minutes. Au temps t, 10 µL de milieu réactionnel sont ajoutés et l'activité résiduelle de l'enzyme est mesurée comme décrit précédemment.

Les cinétiques d'inactivation de l'AdoHcy hydrolase par les composés **(E)-4b**, **5a-b**, **6a-b**, **35**, **36**, **37**, **38c**, **38d**, **39a** et **39b** sont dépendantes du temps et de la concentration en inhibiteurs. Les paramètres cinétiques ont été déterminés par la méthode de Kitz et Wilson<sup>[110]</sup>. Les droites d'équation  $\log(\% \text{ act. résid.}) = f(t)$  sont tracées, la pente donne  $k_{app}$  et la droite d'équation :

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{1}{k_{inact}} + \frac{K_i}{k_{inact}} \frac{1}{[I]}$$

nous permet de déterminer la constante d'affinité  $K_i$  et la constante d'inactivation apparente  $k_{inact}$ .

La précision des mesures a été évaluée en doublant tous les essais. A partir des points expérimentaux une droite de régression linéaire a été tracée.

#### 4.2 inhibiteurs compétitifs

Pour les inhibiteurs compétitifs **63d**, **64d**, **68c** deux méthodes ont été utilisées pour la détermination des valeurs de  $K_i$

Chaque expérience est faite dans un volume total de 50 µL contenant :

- 10 µL d'enzyme (0,02 U,  $7 \cdot 10^{-5}$  µmol),
- 20 µL de tampon phosphate de potassium 20 mM, **EDTA** 1 mM, **BSA** 1 mg/mL, pH = 7,5,
- 10 µL d'inhibiteur de concentration variable.

A  $t_0$ , 10  $\mu\text{L}$  de milieu réactionnel (de 3 à 8  $\mu\text{M}$  en adénosine) sont ajoutés et l'essai est laissé à incuber le temps du test d'activité soit 10 minutes. L'activité résiduelle est alors mesurée comme précédemment.

La précision des mesures a été évaluée en doublant tous les essais. A partir des points expérimentaux une droite de régression linéaire a été tracée.

Dans le cas général de l'inhibition compétitive, l'équation de vitesse s'écrit :

$$v = \frac{V[S]}{K_m(1 + [I]/K_i) + [S]}$$

#### Méthode de Lineweaver et Burk

L'équation de vitesse en double inverse selon la représentation de Lineweaver et Burk est :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right] \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v}$$

Le tracé  $1/v = f(1/[S])$  nous permet de calculer la pente P de la droite pour une concentration en substrat et en inhibiteur donnée. Pour déterminer le  $K_i$ , nous représentons  $P = f([I])$ . L'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses nous donne la valeur  $-K_i$  donc le  $K_i$  de l'inhibiteur.

#### Méthode de Dixon

Dans le cas de la représentation de Dixon, l'équation générale est la suivante :

$$\frac{1}{v} = \left[ \frac{K_m}{V[S]K_i} \right] [I] + \frac{1}{V} \left[ 1 + \frac{K_m}{[S]} \right]$$

Pour chaque concentration de substrat, on représente  $1/v = f([I])$ . L'abscisse du point d'intersection de toutes ces droites donne la valeur de  $-K_i$ .

### 4.3 Détermination des temps de demi-vie pour les composés **4a**

De même que pour les inhibiteurs irréversibles, l'**AdoHcy** hydrolase est incubée en présence des deux composés **(Z)-4a** et **(E)-4a** à des concentrations variables. Chaque expérience est réalisée dans un volume total de 50  $\mu\text{L}$  contenant :

- 10  $\mu\text{L}$  d'enzyme (0,02 U,  $7.10^{-5}$   $\mu\text{mol}$ ),
- 20  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate de potassium 20 mM, **EDTA** 1 mM, **BSA** 1 mg/mL, pH = 7,5,
- 10  $\mu\text{L}$  d'inhibiteur de concentration variable (de 0,9 à 140  $\mu\text{M}$ ).

L'activité résiduelle de l'enzyme est mesurée, comme décrit auparavant, à différent temps t. Le graphique représentant le pourcentage d'activité résiduelle en fonction du temps permet de déterminer le temps de demi-vie de l'enzyme à une concentration donnée.

### 5. IRREVERSIBILITE

L'**AdoHcy** hydrolase (1  $\mu\text{g}$ ,  $2,25.10^{-11}$  mol) est incubée à 37 °C dans 1,5 mL de tampon phosphate 20 mM **EDTA** 1 mM, **BSA** 1 mg/ mL, pH = 7,5 en présence de chacun des inhibiteurs (environ 0,5 mM). Après inactivation totale de l'enzyme, l'essai est dialysé pendant 12 h contre deux litres de tampon phosphate 20 mM, pH = 7,5 à 4 °C. L'activité enzymatique résiduelle est mesurée sur les dialysats.

Un témoin ne contenant pas d'inhibiteur est mis dans les mêmes conditions. Après une dialyse effectuée dans des conditions semblables son activité enzymatique est conservée.

### 6. PROTECTION PAR LE SUBSTRAT

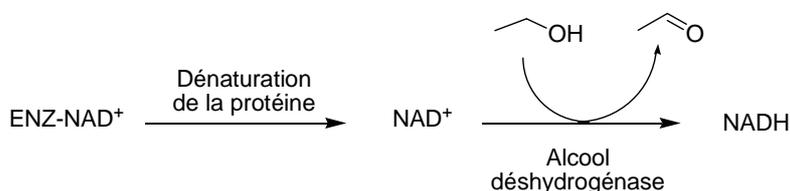
L'**AdoHcy** hydrolase ( 0,07  $\mu\text{g}$ ,  $1,5.10^{-12}$  mol) est préincubée à 37 °C pendant 20 min dans 100  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 20 mM, **EDTA** 1 mM, **BSA** 1 mg/mL, pH = 7,5 en présence de chacun des inhibiteurs (environ 50  $\mu\text{M}$ ) et d'adénosine (15, 30 ou 60  $\mu\text{M}$ ). Un témoin ne contenant pas d'adénosine est incubé dans les mêmes conditions.

10  $\mu\text{L}$  de ces milieux de préincubation sont prélevés aux mêmes intervalles de temps et testés pour mesurer l'activité résiduelle de l'enzyme et apprécier l'effet de protection par le substrat.

## 7. DOSAGE DU CONTENU EN COFACTEUR NAD<sup>+</sup>/NADH

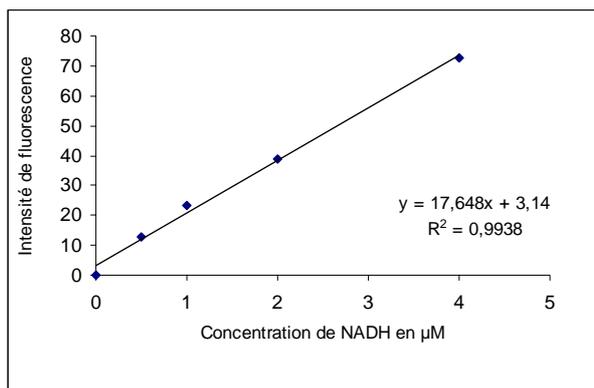
### 7.1 Dosage par fluorescence

La mesure des quantités de **NAD<sup>+</sup>** et **NADH** présents dans l'enzyme native et après inactivation par les inhibiteurs étudiés utilise les propriétés de fluorescence du **NADH** qui émet une fluorescence à 460 nm lorsqu'il est excité à 340 nm. Le **NADH** est mesuré directement et le **NAD<sup>+</sup>** est mesuré après avoir été transformé en **NADH** par addition d'alcool déshydrogénase et d'éthanol<sup>[34, 94]</sup>. Préalablement à chaque mesure, les nucléosides **NAD<sup>+</sup>** et **NADH** associés fortement à l'holoenzyme sont libérés par dénaturation de la protéine par ajout dans le milieu d'incubation d'éthanol.



L'enzyme recombinante de placenta humain 0,48 mg ( $1.10^{-8}$  mol) est incubée à 37 °C avec environ  $4.10^{-6}$  mol d'inhibiteur dans 500 µL de tampon phosphate 20 mM, pH = 7,5. L'enzyme est inactivée pendant 1 à 18h en fonction de l'inhibiteur à des taux variant de 75 à 100%. On additionne alors 2,5 volumes d'éthanol pour dénaturer l'enzyme et libérer les deux cofacteurs de l'holoenzyme. Cette opération est suivie d'une centrifugation à 4 °C pendant 5 minutes. Les culots sont lavés deux fois avec 200 µL d'éthanol. Les surnageants sont rassemblés. 15 mL d'eau sont ajoutés et le mélange est lyophilisé dans le noir. Le résidu est ensuite dissous dans 0,8 mL d'H<sub>2</sub>O et 1,2 mL de tampon phosphate de potassium 100 mM pH = 8,8. Le **NADH** produit lors de l'inactivation de l'enzyme est mesuré directement à 460 nm par fluorescence produite par excitation à 340 nm.

Une courbe d'étalonnage préalablement construite en mesurant la fluorescence de quantités connues de **NADH** sert dans cette méthode à la quantification des cofacteurs présents.



**Graphique 10 : Courbe d'étalonnage du NADH**

Le  $\text{NAD}^+$  présent est dosé dans une deuxième expérience sur le même échantillon. L'addition de 10  $\mu\text{L}$  d'une solution à 1 % d'alcool déshydrogénase de levure de boulanger et 20  $\mu\text{L}$  d'éthanol à 95 % provoque la réduction du  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$  qui est dosé par fluorescence de la même façon.

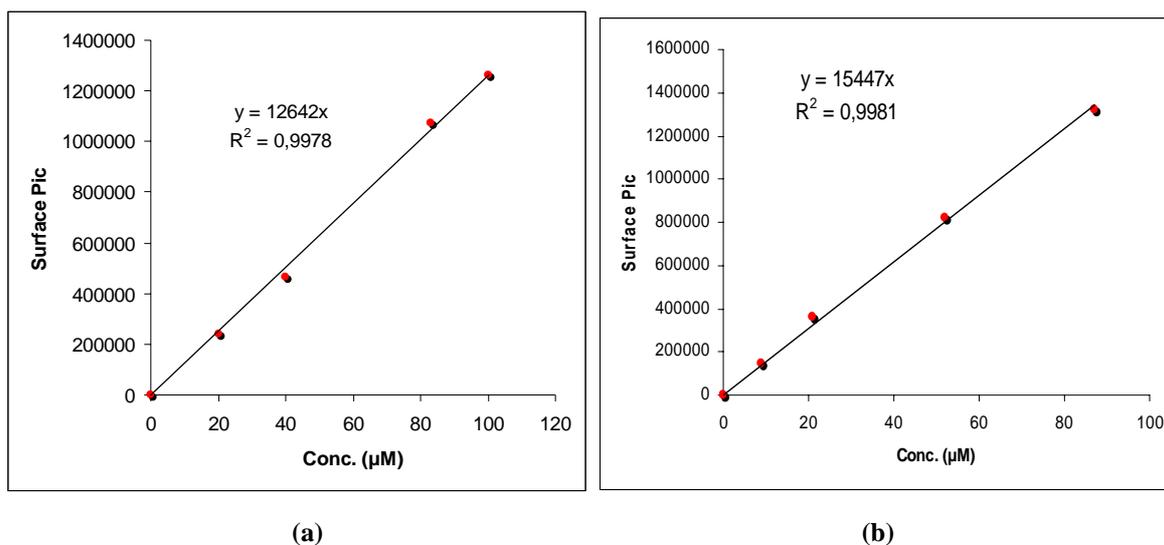
L'augmentation de l'émission de fluorescence obtenue permet la détermination de la quantité de  $\text{NADH}$  total présent et par différence, la détermination de la quantité de  $\text{NAD}^+$  associé à l'enzyme.

### 7.2 Dosage par HPLC

La fluorescence intrinsèque des composés **4a-b** gênant le dosage par fluorescence du contenu en cofacteur  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , un dosage par **HPLC** s'est avéré une alternative intéressante.

Deux courbes d'étalonnage ont été construites avec des gammes de concentrations allant de 0 à 100  $\mu\text{M}$ . Les échantillons étalons, à des concentrations connues de  $\text{NAD}^+$  ou de  $\text{NADH}$ , sont élués sur une colonne Nucleodur de 25cm, diamètre 0,5 cm, avec un débit de 1 mL/min. en utilisant comme système éluant un tampon phosphate de potassium 20 mM, pH = 7,0 contenant 2,5 % de  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Le détecteur UV est réglé sur 260 nm.

Les deux composés présentent dans ces conditions des temps de rétention différents à savoir :  $t_R = 7,0$  minutes pour le  $\text{NAD}^+$  et  $t_R = 10,0$  minutes pour le  $\text{NADH}$ .



Graphique 11 : Courbe d'étalonnage du NADH (a) et du NAD<sup>+</sup> (b)

#### Dosage du contenu en cofacteur de l'enzyme native

On met en solution 100 µg (2,1 nmoles) d'**AdoHcy** hydrolase dans 100 µL de tampon phosphate 20 mM, pH = 7,5. On ajoute 600 µL d'éthanol afin de dénaturer la protéine. L'échantillon est alors centrifugé une première fois. Le résidu est rincé avec 100 µL d'éthanol supplémentaire et centrifugé de nouveau. Les surnageants sont joints puis lyophilisés dans le noir. Le résidu obtenu est remis en solution dans 100 µL d'eau. L'échantillon ainsi traité est injecté dans les conditions **HPLC** décrites ci-dessous. L'air des pics correspondant au **NAD<sup>+</sup>** et au **NADH** est mesurée et la concentration déterminée grâce aux courbes d'étalonnage établies précédemment.

#### Dosage du contenu en cofacteur de l'enzyme inhibée par 4a-b

On met en solution 100 µg (2,1 nmoles) d'**AdoHcy** hydrolase dans 100 µL d'une solution aqueuse contenant l'inhibiteur à étudier (0,84 µmole, soit 400 éq.). L'échantillon est alors incubé pendant un à trois heures jusqu'à inactivation totale. On ajoute 600 µL d'éthanol et l'échantillon est centrifugé. Le résidu obtenu est rincé avec 100 µL d'éthanol supplémentaire et centrifugé de nouveau. Les surnageants sont joints puis lyophilisés dans le noir. Le résidu obtenu est remis en solution dans 100 µL d'eau. Comme dans le cas de l'enzyme native, l'échantillon est injecté en **HPLC** et les concentrations en **NAD<sup>+</sup>** et **NADH** déterminées.

Après l'injection de chaque échantillon, un cycle de rinçage de la colonne est réalisé en utilisant un tampon phosphate de potassium 20 mM, pH = 7,0 contenant 50% de CH<sub>3</sub>CN. La colonne nucléodur est ensuite rééquilibrée avec un tampon phosphate 20 mM, pH = 7,0 contenant 2,5% de CH<sub>3</sub>CN.

## 8. MODIFICATION COVALENTE DE L'AdoHcy HYDROLASE PAR LES INHIBITEURS (E)-4a, 5a, 35, 36, 37 et 39b : ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (ESI-MS)

### *8.1 Préparation de l'AdoHcy hydrolase pour l'étude en spectrométrie de masse*

L'**AdoHcy** hydrolase purifiée jusqu'à homogénéité (0,02 mg;  $4,2 \cdot 10^{-4}$  μmoles) Le tampon phosphate de potassium (20 mM, pH = 7,5) est diluée dans 400 μL de tampon acétate d'ammonium 10mM, pH= 7,0. L'échantillon est échangé trois fois contre 250 μL de tampon acétate d'ammonium (10 mM, pH = 7,0) par ultrafiltration sur des concentrateurs Ultrafree-MC (Millipore). L'échantillon est ensuite concentré jusqu'à 250 correspondant à une concentration en protéines de  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

### *8.2 Préparation des échantillons de l'AdoHcy hydrolase inhibée*

Dans 400 μL de tampon acétate d'ammonium 10mM, pH= 7,0, l'**AdoHcy** hydrolase purifiée jusqu'à homogénéité (0,02 mg;  $4,2 \cdot 10^{-10}$  mol) a été incubée à 37 °C en présence d'une concentration environ 750 fois plus importante d'inhibiteur jusqu'à inactivation totale de l'enzyme.

L'élimination de l'inhibiteur utilisé en excès se fait par ultrafiltration au travers d'une membrane cellulose (Ultrafree - MC, Millipore). L'échantillon est ensuite concentré jusqu'à 250 μL soit une concentration en protéines de  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

L'échantillon est dilué au demi avec un mélange acétonitrile/eau/acide formique (49/50/1) nécessaire à l'ionisation des protéines. 10 μL de chacun de ces échantillons ainsi préparés sont utilisés pour l'enregistrement des spectres de masse à ionisation par électrospray (**ESI**). Les spectres ont été enregistrés sur une échelle de 500 à 2000 m/z. La calibration a été faite avec la myoglobine de cœur de cheval (Sigma).

---

*9. RECHERCHE DU PEPTIDE MARQUE : ETUDES DE L'AdoHcy HYDROLASE INHIBEE PAR LC/ESI-MS APRES DIGESTION PAR L'EndoLys C*

A 200 µg (4,2 nmoles) d'enzyme native (homogène en **FPLC**) ou inhibée par **36** et **37** dans 60 µL de tampon formate d'ammonium 25mM, pH = 8,5, sont ajoutés 1,25 µg d'endoprotéinase Lys-C (Roche Diagnostics) dans 10 µL d'eau bidistillée.

La digestion est poursuivie une nuit à 35°C puis stoppée par congélation de l'échantillon à -20°C.

Les peptides obtenus sont analysés par **LC/ESI-MS** avec une détection UV à 210 nm et une détection **ESI-MS** en mode ions positifs. 30 µL du mélange de peptides est injecté sur une colonne Nucléosil 100-5C18 (150x4,6 mm, Macherey Nagel) et l'élution des peptides est réalisée avec le gradient suivant :

2% B (5 min.) puis

2% à 60% B (60 min) puis

60% à 80% B (5 min) et enfin

80% B (5 min)

Avec : Tampon A : 0,1% TFA dans H<sub>2</sub>O

Tampon B : 0,08% TFA dans CH<sub>3</sub>CN

*10. ANALYSE DES MILIEUX REACTIONNELS, RECHERCHE DE METABOLITES*

Dans 400 µL de tampon acétate d'ammonium 10mM, pH= 7,0, l'**AdoHcy** hydrolase purifiée jusqu'à homogénéité (0,02 mg; 4,2.10<sup>-10</sup> mol) a été incubée à 37 °C en présence d'une concentration environ 750 fois plus importante de **36** jusqu'à inactivation totale de l'enzyme.

L'échantillon est concentré par ultrafiltration sur des concentrateurs Ultrafree-MC (Millipore). Le filtrat est ensuite analysé en **HPLC** en utilisant une colonne Spherisorb ODS2 (25cm, diamètre 4,6 mm, débit 0,8 mL/min) en utilisant comme éluant un mélange MeOH/Eau : 40/60. La coinjection avec des authentiques permet d'identifier les différents pics du chromatogramme.

Les temps de rétention observés sont les suivants :

t<sub>R</sub> = 4,5 min. 5'-désoxy-5'-thioadénosine **35**

t<sub>R</sub> = 10,8 min. Adénosine 5'-méthylsulfure **36**

---

$t_R = 13,9$  min. Bis (5'-désoxy-5'-thioadénosyl) disulfure **37**

## 11. PREPARATION DE L'APO-AdoHcy HYDROLASE ET REACTIVATION SOUS LA FORME NAD<sup>+</sup>

Les tampons utilisés dans les opérations de dénaturation sont les suivants :

- Tampon A : solution de phosphate de potassium 25 mM, **EDTA** 1 mM, **DTT** 1  $\mu$ M, pH = 7,2
- Tampon B : solution de phosphate de potassium 25 mM, **EDTA** 1 mM, **DTT** 1  $\mu$ M, saturée en sulfate d'ammonium et ajustée à pH = 3,0 par une solution diluée d'acide sulfurique
- Tampon C : solution de phosphate de potassium 25 mM, **EDTA** 1 mM, **DTT** 1  $\mu$ M, saturée en sulfate d'ammonium à pH = 7,2
- Tampon D : solution de phosphate de potassium 50 mM, **EDTA** 1 mM, pH = 7,2

### *11.1 Préparation de l'Apo-AdoHcy hydrolase*

9,8 mg d'**AdoHcy** hydrolase recombinante de placenta humain (Activité Spécifique = 6,3 U/mg) sous la forme native (**NAD<sup>+</sup>/NADH** : 70/30) ont été solubilisés dans 4 mL de tampon A. On ajoute alors progressivement, sur une vingtaine de minutes, 8 mL de tampon B. L'agitation est poursuivie pendant 25 minutes à 4°C. Le milieu est alors centrifugé à 17400 g à 4°C pendant 20 minutes. Le précipité obtenu est remis en solution dans 4 mL de tampon A. A ce stade l'enzyme est dénaturée. On ajoute progressivement 8 mL de tampon C pour effectuer une nouvelle précipitation de l'enzyme. L'agitation est maintenue 20 minutes puis on centrifuge comme précédemment et on remet le culot en solution dans 5 mL de tampon D. Un dosage de protéines selon la méthode de Bradford nous indique que nous possédons 8,5 mg d'Apo-**AdoHcy** hydrolase dans la solution. L'Apo-**AdoHcy**-hydrolase ainsi obtenue ne possède aucune activité enzymatique.

### *11.2 Réactivation de l'Apo-AdoHcy hydrolase*

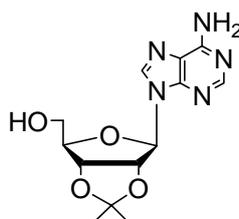
Aux 5 mL de la solution d'Apo-**AdoHcy** hydrolase obtenue précédemment, on additionne 500  $\mu$ L d'une solution de **NAD<sup>+</sup>** à une concentration de 20 mM. Après une nuit d'agitation à 4°C, le mélange est centrifugé pendant 5 minutes à 17400 g. L'activité de

---

l'**AdoHcy** hydrolase est présente à ce stade de la réactivation. Une purification sur une colonne Sephadex G25 (h = 30 cm, V= 15 cm<sup>3</sup>) équilibrée avec le tampon D permet de récupérer 6,7 mg d'AdoHcy hydrolase homogène sous la forme **NAD**<sup>+</sup> possédant une activité spécifique de 7,0 U/mg.

## CHIMIE

### 2',3'-*O*-isopropylidène adénosine 14



P.M. = 307 g.mol<sup>-1</sup>

10 g (37,5 mmoles) d'adénosine sont mis en suspension dans 300 mL d'acétone. 62,4 mL (375 mmoles, 10 éq.) de triéthylorthoformate et 8,5 g (44,9 mmoles, 1,2 éq.) d'APTS monohydraté sont additionnés. Le mélange devient homogène après une heure d'agitation, il est alors neutralisé par une solution d'ammoniaque 7M. Les sels sont filtrés et lavés à l'éther. Le filtrat est concentré sous pression réduite. L'isopropylidèneadénosine cristallise et est filtrée puis lavée à l'éther pour donner 10,7 g d'une poudre blanche.

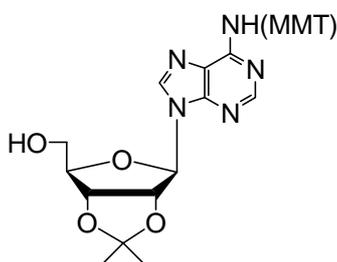
**Rendement** = 93 %

F = 210 °C (Litt<sup>[127]</sup> : 220°C, crist. : H<sub>2</sub>O)

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

1,4 et 1,65 (2 x s, 2 x 3H, CMe<sub>2</sub>) ; 3,8 (dd, 1H, H<sub>5a</sub>' , J<sub>gem</sub> = 13 Hz, J<sub>4',5'a</sub> = 1,5 Hz) ; 4,0 (dd, 1H, H<sub>5b</sub>' , J<sub>gem</sub> = 13 Hz, J<sub>4',5'b</sub> = 1,5 Hz) ; 4,55 (m, 1H, H<sub>4</sub>') ; 5,12 (dd, 1H, H<sub>3</sub>' , J<sub>2',3'</sub> = 5,7 Hz, J<sub>3',4'</sub> = 0,7 Hz) ; 5,2 (dd, 1H, H<sub>2</sub>' , J<sub>1',2'</sub> = J<sub>2',3'</sub> = 5,1 Hz) ; 5,86 (d, 1H, H<sub>1</sub>' , J<sub>1',2'</sub> = 5,1 Hz) ; 7,85 (s, 1H, H<sub>8</sub>) ; 8,3 (s, 1H, H<sub>2</sub>).

## 2', 3'-*O*-isopropylidène-*N*<sup>6</sup>-monométhoxytrityl adénosine 15



**P.M.** = 579 g.mol<sup>-1</sup>

Sous argon, 8 g (48,8 mmoles) de 2',3'-*O*-isopropylidène adénosine sont mis en solution dans 80 mL de pyridine anhydre. La solution est maintenue sous argon et on y additionne 6,6 mL (97,6 mmoles, 2éq.) de chlorure de triméthylsilyle fraîchement distillé. La solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 2 heures. 8,8 g (53,7 mmoles, 1,1 éq.) de chlorure de monométhoxytrityle sont additionnés. La solution est de nouveau agitée à température ambiante pendant 24 heures. 20 mL d'ammoniaque concentré sont ajoutés et la solution est de nouveau agitée pendant 2 heures. La pyridine est évaporée et coévaporée plusieurs fois avec du toluène à l'évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est repris par 100 mL d'eau et 100 mL de chloroforme. La phase organique est lavée avec une solution d'acide sulfurique 2M, puis avec de l'eau. Après séchage par le sulfate de magnésium, la phase organique est évaporée. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur silice (acétate d'éthyle / EP : 50/50) pour donner 7,3 g d'un solide blanc.

**Rendement** = 48 %

**P.F.** = 100°C

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

1,40 et 1,65 (s, 2 x 3H, CMe<sub>2</sub>) ; 3,7 (d, 1H, H<sub>5a</sub>' , J<sub>gem</sub>=12,6 Hz) ; 3,8 (s, 3H, OMe) ; 3,95 (d, 1H, H<sub>5b</sub>' , J<sub>gem</sub> = 12,6 Hz) ; 4,55 (s, 1H, H<sub>4</sub>' ) ; 5,1 (d, 1H, H<sub>3</sub>' , J<sub>2',3'</sub> = 4,9 Hz) ; 5,2 (t, 1H, H<sub>2</sub>' , J<sub>1',2'</sub> = J<sub>2',3'</sub> = 4,9 Hz) ; 5,85 (d, 1H, H<sub>1</sub>' , J<sub>1',2'</sub> = 4,9 Hz) ; 6,6 – 7,4 (m, 14H, ArH) ; 7,8 (s, 1H, H<sub>8</sub>) ; 8,0 (s, 1H, H<sub>2</sub>).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

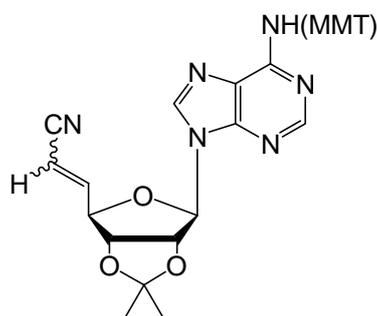
25,2 et 27,6 ( $\text{C}(\text{Me})_2$ ) ; 55,1 (Me du MMT) ; 63,3 ( $\text{C}_5'$ ) ; 71,1 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ . du MMT) ; 81,6 ( $\text{C}_3'$ ), 82,8 ( $\text{C}_4'$ ) ; 85,9 ( $\text{C}_2'$ ) ; 94,3 ( $\text{C}_1'$ ) ; 113,1 ( $\text{C}(\text{Me})_2$ ) ; 113,9 ( $\text{C}_5$ ) ; 126,9, 127,8, 127,9, 128,7 et 130,1 ( $\text{C}_{\text{aromatiques}}$ ) ; 136,8 ( $\text{C}_6$ ) ; 139,6 ( $\text{C}_8$ ) ; 144,8 et 151,7 ( $\text{C}_{\text{aromatiques}}$ ) ; 154,2 ( $\text{C}_2$ ) ; 158,3 ( $\text{C}_4$ ).

**Masse (DCI /  $\text{NH}_3$ )**  $m/z = 580 (\text{M}+\text{H})^+$

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -70,5^\circ$  ( $c = 11,4 \times 10^{-3} \text{ g.mL}^{-1}$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

**IR**  $3223 \text{ cm}^{-1}$  (OH);  $3412 \text{ cm}^{-1}$  (NH)

**6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-2',3'-O-isopropylidène-N<sup>6</sup>-  
monométhoxytrityl homoadénosine 17**



**P.M.** =  $600 \text{ g.mol}^{-1}$

Sous argon, 300 mg (0,52 mmole) de 2', 3'-O-isopropylidène-N<sup>6</sup>-monométhoxytrityl adénosine sont mis en solution dans 2,4 mL de DMSO fraîchement distillé sur  $\text{CaH}_2$ . A cette solution, on ajoute 369 mg de DCC (1,82 mmole, 3,5 éq.) ainsi que 25  $\mu\text{L}$  d'acide dichloroacétique (0,26 mmole, 0,5 éq.). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 15 minutes. 153 mg (0,52 mmoles, 1 éq.) de cyanométhylidènetriphénylphosphorane sont ajoutés au mélange. La suspension obtenue est laissée sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. 117 mg (1,3 mmole, 2,5 éq.) d'acide oxalique en solution dans 1 mL de méthanol sont alors additionnés lentement au

mélange. Après 30 minutes d'agitation, la solution est filtrée et le solide récupéré est lavé au méthanol froid. Le filtrat est concentré sous pression réduite puis repris au chloroforme. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en hydrogénocarbonate de sodium, une solution aqueuse saturée en NaCl puis à l'eau. Cette dernière est ensuite séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrée sous pression réduite. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie éclair sur silice (EG / AE : 60/40). Le produit résultant qui se présente sous la forme d'une mousse blanche contient les deux isomères E et Z (285 mg).

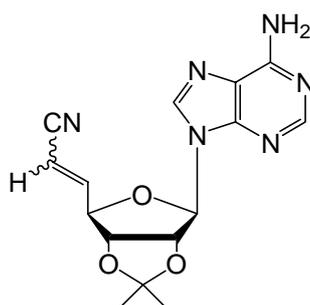
**Rendement** = 91 %

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

1,30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,53 (s, 1,5H, CH<sub>3</sub>); 1,58 (s, 1,5H, CH<sub>3</sub>); 3,70 (s, 3H, OMe); 4,66 (m, 0,5H, H<sub>4'</sub>); 5,10 (m, 1,5H, H<sub>3'</sub> et H<sub>4'</sub>); 5,24 (m, 0,5H, H<sub>6'</sub>); 5,31 (m, 0,5H, H<sub>6'</sub>); 5,37 (m, 0,5H, H<sub>2'</sub>); 5,44 (m, 0,5H, H<sub>2'</sub>); 6,02 (m, 1H, H<sub>1'</sub>); 6,63 (dd, 0,5H, H<sub>6'</sub>, J<sub>4',5'</sub> = 8,8 Hz ; J<sub>5',6'</sub> = 11,2 Hz); 6,73 (m, 4,5H, MMT et H<sub>6'</sub>); 6,89 (m, 1H, MMT); 7,20 (m, 9H, MMT); 7,73; 7,75; 7,93; 7,95 (4s, 2H, H<sub>2</sub> et H<sub>8</sub>).

**Masse (ESI)** m/z = 601 (M+H)<sup>+</sup>

### **6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-2',3'-O-isopropylidène homoadénosine 18**



**P.M.** = 328 g.mol<sup>-1</sup>

Sous argon, 235 mg (0,39 mmole) de 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-2',3'-O-isopropylidène-N<sup>6</sup>-monométhoxytrityl homoadénosine sont dissous dans 10 mL d'un mélange eau / acide acétique : 20/80. Après trois heures d'agitation à température ambiante, le milieu

réactionnel est concentré sous pression réduite. Les deux isomères E et Z, présents dans le produit brut obtenu, sont séparés et purifiés par chromatographie éclair sur silice avec un gradient d'éluion AE  $\rightarrow$  AE/Méthanol : 95/5. Les deux isomères Z et E sont séparés (129 mg).

**Rendement = 100 %**

**Isomère E (84 mg, 65 %)**

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

1,27 et 1,61 (2s, 2x3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 4,72 (m, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 5,19 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = 6,0$  Hz,  $J_{3',4'} = 3,7$  Hz) ; 5,37 (dd, 1H,  $\text{H}_{6'}$  ;  $J_{4',6'} = 1,6$  Hz,  $J_{5',6'} = 16,3$  Hz) ; 5,54 (dd, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{1',2'} = 1,0$  Hz,  $J_{2',3'} = 6,0$  Hz) ; 6,13 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 1,0$  Hz) ; 6,50 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 6,83 (dd, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ,  $J_{4',5'} = 5,1$  Hz,  $J_{5',6'} = 16,3$  Hz) ; 7,83 et 8,28 (2s, 2H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

25,2 et 26,9 ( $\text{CMe}_2$ ) ; 83,8 ( $\text{C}_{2'}$ ) ; 84,0 ( $\text{C}_{3'}$ ) ; 86,4 ( $\text{C}_{4'}$ ) ; 90,5 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 100,8 ( $\text{C}_{6'}$ ) ; 114,8 ( $\text{CMe}_2$ ) ; 116,3 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 120,1 (CN) ; 139,9 ; 148,9 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 150,2 ( $\text{C}_{5'}$ ) ; 153,1 ; 155,8 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ).

**Isomère Z (45 mg, 35%)**

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

1,41 (s, 3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 1,66 (s, 3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 5,15 (dd, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ,  $J_{3',4'} = 3,1$  Hz,  $J_{4',5'} = 8,4$  Hz) ; 5,27 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = 6,0$  Hz,  $J_{3',4'} = 3,1$  Hz) ; 5,40 (d, 1H,  $\text{H}_{6'}$ ,  $J_{5',6'} = 11,1$  Hz) ; 5,54 (d, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{2',3'} = 6,0$  Hz) ; 5,80 (s large, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 6,12 (s, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ) ; 6,65 (dd, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ,  $J_{4',5'} = 8,4$  Hz,  $J_{5',6'} = 11,1$  Hz) ; 7,87 et 8,31 (2s, 2H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

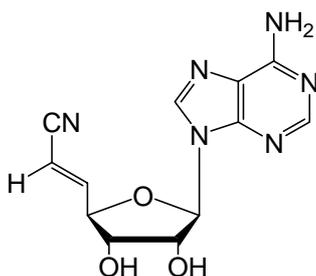
**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

25,4 et 27,0 ( $\text{CMe}_2$ ) ; 84,4 ( $\text{C}_{2'}$ ) ; 85,0 ( $\text{C}_{3'}$ ) ; 86,0 ( $\text{C}_{4'}$ ) ; 91,0 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 101,8 ( $\text{C}_{6'}$ ), 114,6 ( $\text{CMe}_2$ ) ; 114,7 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 120,4 (CN) ; 140,5 ; 148,9 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 150,2 ( $\text{C}_{5'}$ ) ; 153,0 ; 155,7 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ).

## Déprotection des 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-2',3'-*O*-isopropylidène homoadénosine 4

Dans un ballon, la 6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-2',3'-*O*-isopropylidène homoadénosine est mis en solution dans un mélange acide formique / eau : 50/50. L'agitation est maintenue jusqu'à déprotection totale des positions 2' et 3'. Le milieu réactionnel est alors concentré sous pression réduite. Le produit résultant est purifié sur une résine hydrophobe HP20SS en utilisant un gradient eau → eau / méthanol : 70/30. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et lyophilisées.

### (E)-6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxyhomoadénosine (E)-4a



P.M. = 288 g.mol<sup>-1</sup>

m = 20 mg

Rendement = 20 %

F = 197°C

HPLC :

Eluant : Eau / Méthanol : 60/40                      t<sub>R</sub> = 4,2 min

(nucléodur 25cm, diamètre = 4,6 mm, D = 0,8 mL/min)

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :**

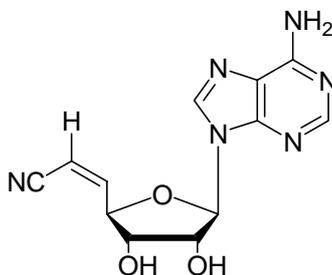
4,36 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 5,0$  Hz); 4,57 (ddt, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ,  $J_{3',4'} = J_{4',5'} = 5,0$  Hz,  $J_{4',6'} = 1,7$  Hz); 4,77 (dd, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{1',2'} = J_{2',3'} = 5,0$  Hz); 5,85 (dd, 1H,  $\text{H}_{6'}$ ,  $J_{4',6'} = 1,7$  Hz,  $J_{5',6'} = 16,3$  Hz); 6,02 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 5,0$  Hz); 7,02 (dd, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ,  $J_{4',5'} = 5,0$  Hz,  $J_{5',6'} = 16,3$  Hz); 8,20 et 8,30 (2s, 2H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :**

74,2 ( $\text{C}_{2'}$ ); 75,0 ( $\text{C}_{3'}$ ); 84,3 ( $\text{C}_{4'}$ ); 90,6 ( $\text{C}_{1'}$ ); 101,7 ( $\text{C}_{6'}$ ); 118,0 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ); 120,8 (CN); 141,8; 150,6 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ); 152,3 ( $\text{C}_{5'}$ ); 154,0; 157,4 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ).

**IR** 3335  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ ); 3185  $\text{cm}^{-1}$  (OH); 2229  $\text{cm}^{-1}$  (CN); 1649  $\text{cm}^{-1}$  (C=C)

**Masse (ESI)**  $m/z = 289$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ )

**(Z)-6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxyhomoadénosine (Z)-4a**

**P.M.** = 288  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**m** = 10 mg

**Rendement** = 18 %

**F** = 210°C

**HPLC :**

Eluant : Eau / Méthanol : 60/40  $t_R = 3,8$  min

(nucléodur 25cm, diamètre = 4,6 mm, D = 0,8 mL/min)

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :**

4,38 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 5,2$  Hz); 4,77 (m, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ); 4,85 (m, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ) ; 5,67 (dd, 1H,  $\text{H}_{6'}$ ,  $J_{4',6'} = 1,1$  Hz,  $J_{5',6'} = 11,2$  Hz) ; 5,96 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 4,4$  Hz) ; 6,83 (dd, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ,  $J_{4',5'} = 8,4$  Hz,  $J_{5',6'} = 11,2$  Hz) ; 8,10 et 8,15 (2s, 2H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :**

74,7 ( $\text{C}_{2'}$ ) ; 75,7 ( $\text{C}_{3'}$ ) ; 83,8 ( $\text{C}_{4'}$ ) ; 90,7 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 102,6 ( $\text{C}_{6'}$ ) ; 116,5 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 120,5 (CN) ; 141,8 ; 150,4 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 151,8 ( $\text{C}_{5'}$ ) ; 153,9 ; 157,1 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ).

**IR**  $3406\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ ) ;  $3272\text{ cm}^{-1}$  ;  $3127\text{ cm}^{-1}$  (OH) ;  $2240\text{ cm}^{-1}$  (CN) ;  $1679\text{ cm}^{-1}$  (C=C)

**Masse (ESI)**  $m/z = 289$  (M+H)<sup>+</sup>

### Hypochlorite de tert-butyle

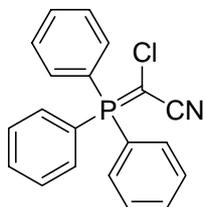
#### tBuClO

10 mL de tert-butanol (0,1 mole) et 6,6 mL d'acide acétique (0,11 mole) sont introduit dans un erlen refroidi dans un bain de glace. 140 mL d'une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium à 5,25 % sont additionnés au mélange à 0°C. Le tout est agité pendant 5 minutes à l'abri de la lumière. La mixture obtenue est alors versée dans une ampoule à décanter et la phase inférieure est soustraite. L'huile jaune restante est lavée avec une solution aqueuse saturée en carbonate de sodium puis à l'eau. L'huile est alors recueillie et séchée sur chlorure de calcium. Un dosage en retour de l'iode par les thiosulfates permet de déterminer le titre de l'huile en ion hypochlorite.

**m** = 5,2 g

**Titre de la solution** : 2,1 mmoles d'hypochlorite de tert-butyle pour 220 mg de l'huile

## Chlorocyanométhylidènetriphénylphosphorane **7b**



$$\text{P.M.} = 336 \text{ g.mol}^{-1}$$

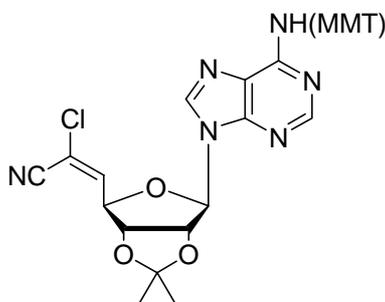
Dans un ballon sous argon et sous agitation, 1 g (3,3 mmoles) de cyanométhylidène triphénylphosphorane sont mis en solution dans 15 mL de dichlorométhane fraîchement distillé. Le tout est refroidit à  $-70^{\circ}\text{C}$  puis 370 mg (3,3 mmoles, 1 éq.) d'hypochlorite de tert-butyle en solution dans 2,5 mL de dichlorométhane sont introduits goutte à goutte au mélange. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à  $-70^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes puis à température ambiante pendant 1h30. Le solvant est ensuite évaporé. Le produit brut est repris par du chloroforme et le phosphorane **7b** précipite par addition d'éther. On recueille ainsi 950 mg de cristaux jaunes.

**Rendement** = 85 %

**F** =  $180^{\circ}\text{C}$  (Lit.<sup>[74]</sup> :  $182,6-183,4^{\circ}\text{C}$ )

<b>Analyse</b>	$\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{ClNP}$		
Calculé	C : 71,54	H : 4,50	N : 4,17
Expérimental	C : 71,69	H : 4,27	N : 4,06

**(E)-6'-chloro-6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-2',3'-O-isopropylidène-N<sup>6</sup>-monométhoxytrityl homoadénosine (E)-19**



$$\text{P.M.} = 635 \text{ g.mol}^{-1}$$

Sous argon, 400 mg (0,68 mmole) de 2', 3'-O-isopropylidène-N<sup>6</sup>-monométhoxytrityl adénosine sont mis en solution dans 3,2 mL de DMSO fraîchement distillé sur CaH<sub>2</sub>. On additionne ensuite 492 mg de DCC (2,4 mmoles, 3,5 éq.) ainsi que 34 µL d'acide dichloroacétique (0,34 mmole, 0,5 éq.). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 15 minutes. 228 mg (0,68 mmole, 1 éq.) de chlorocyanométhylidènetriphénylphosphorane sont ajoutés au mélange. La suspension obtenue est laissée sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. 154 mg (1,8 mmole, 2,5 éq.) d'acide oxalique en solution dans 1 mL de méthanol sont alors additionnés lentement au mélange. Après 30 minutes d'agitation, la solution est filtrée et le solide récupéré est lavé au méthanol froid. Le filtrat est alors concentré sous pression réduite puis repris au chloroforme. La phase organique est alors lavée successivement avec une solution aqueuse saturée en hydrogencarbonate de sodium, une solution aqueuse saturée en NaCl puis à l'eau. Cette dernière est ensuite séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie éclair sur silice en utilisant l'acétate d'éthyle comme éluant. Cette purification permet la séparation de l'isomère E pur (le moins polaire dans les conditions utilisées) sous forme d'une mousse jaune. L'isomère Z minoritaire est obtenu en mélange avec l'isomère E. On obtient au total 383 mg des deux isomères dans un rapport 4/1 : E/Z.

**Rendement** = 87 %

**F** = 109°C (isomère E)

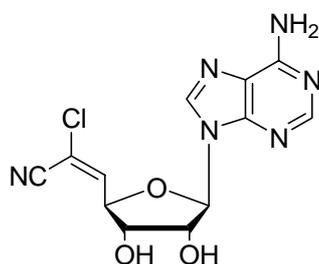
**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) – Isomère E (80%):**

1,27 (s, 3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 1,53 (s, 3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 3,70 (s, 3H, MeO) ; 4,99 (dd, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ,  $J_{3',4'} = 3,2$  Hz,  $J_{4',5'} = 9,0$  Hz) ; 5,19 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = 5,9$  Hz,  $J_{3',4'} = 3,2$  Hz) ; 5,37 (d, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{2',3'} = 5,9$  Hz) ; 6,02 (s, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ) ; 6,79 (d, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ,  $J_{4',5'} = 9,0$  Hz) ; 6,70, 6,89, 7,10-7,30 (m, 14H, ArH) ; 7,74 et 7,95 (2s, 2H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) – Isomère E (80%):**

25,1 et 27,0 ( $\text{CMe}_2$ ) ; 55,2 (OMe du MMT) ; 71,0 ( $\text{C}(\text{MMT})$ ) ; 84,5 ( $\text{C}_{2'}$ ) ; 84,7 ( $\text{C}_{3'}$ ) ; 85,5 ( $\text{C}_{4'}$ ) ; 91,0 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 106,0 ( $\text{C}_{6'}$ ) ; 113,2 ( $\text{CMe}_2$ ) ; 121,7 (CN) ; 126,9 ; 127,9 ; 128,8 ; 130,1 (CH du MMT) ; 136,9 ; 139,6 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 144,9 ; 152,3 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  MMT) ; 154,3 ; 158,3 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ).

**Masse (ESI)**  $m/z = 635$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

**(E)-6'-chloro-6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxyhomoadénosine (E)-4b**

**P.M.** = 322,7  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

94 mg de (E)-6'-chloro-6'-cyano-5',6'-déhydro-6'-désoxy-2',3'-O-isopropylidène- $\text{N}^6$ -monométhoxytrityl homoadénosine (0,15 mmole) sont mis en solution dans 6 mL d'un mélange acide formique / eau : 80/20. Après 18 heures d'agitation, le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le produit brut est purifié sur résine hydrophobe HP20SS en utilisant un gradient Eau  $\rightarrow$  Eau/méthanol : 50/50. Les fractions contenant le composé désiré sont rassemblées et lyophilisées pour conduire à 26 mg d'un solide blanc.

**Rendement** = 55 %

**F** = 105°C

**HPLC :**

Eluant : Eau / Méthanol : 60/40  $t_R = 11,4$  min  
 (nucléodur 25cm, diamètre = 4,6 mm, D = 0,8 mL/min)

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :**

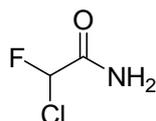
4,54 (t, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 5,0$  Hz) ; 4,79 (dd, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ,  $J_{3',4'} = 5,0$  Hz,  $J_{4',5'} = 8,9$  Hz) ; 4,84 (t, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{1',2'} = J_{2',3'} = 5,0$  Hz) ; 6,08 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 5,0$  Hz) ; 7,18 (d, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ,  $J_{4',5'} = 8,9$  Hz), 8,20 et 8,30 (2s, 2H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :**

74,8 ( $\text{C}_{2'}$ ) ; 75,7 ( $\text{C}_{3'}$ ) ; 83,4 ( $\text{C}_{4'}$ ) ; 91,6 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 106,3 ( $\text{C}_{6'}$ ) ; 113,9 (CN) ; 120,9 ; 141,9 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 150,5 ( $\text{C}_{5'}$ ) ; 150,5 ; 153,9 ; 157,4 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ).

Masse (ESI)  $m/z = 323,2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) (Pic moléculaire du  $^{35}\text{Cl}$ )

IR  $1647\text{ cm}^{-1}$  (C=C) ;  $2231\text{ cm}^{-1}$  (CN) ;  $3189\text{ cm}^{-1}$  (OH) ;  $3338\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ )

**2-Chloro-2-fluoro-acetamide 12**

**P.M.** =  $111,5\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Dans un ballon, 14 g (71,2 mmoles) de chlorofluoroacétate d'éthyle sont mis en solution dans 70 mL de MeOH séché sur tamis. Le tout est refroidi à  $0^\circ\text{C}$  et on fait barboter de l'ammoniac dans cette solution. Au bout d'une heure, le barbotage est interrompu et le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite pour donner le 2-chloro-2-fluoroacétamide pur. Le produit (12g) se présente sous la forme d'un liquide incolore.

**Rendement** = 100 %

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

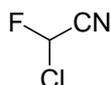
6,33 (d, 1H,  $J_{\text{H,F}} = 50,9$  Hz), 7,0 et 7,5 (2s, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

**R.M.N.  $^{19}\text{F}$  ( $\text{CDCl}_3$ )**

-142,0 (d, 1F,  $J_{\text{H,F}} = 50,9$  Hz).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

93,5 (d,  $\text{C}_{\text{quat}}$ ,  $J_{\text{C,F}} = 255,9$  Hz) ; 167,2 (d,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $J_{\text{C,F}} = 23,4$  Hz).

**Chloro-fluoro-acetonitrile 13**

**P.M.** = 93,5  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

12 g de 2-chloro-2-fluoroacétamide (0,1 mole) et 9,6 g de  $\text{P}_2\text{O}_5$  (0,05 mol, 0,5 éq.) sont introduits dans un ballon sous argon surmonté d'une colonne à distiller. La suspension est alors chauffée à  $120^\circ\text{C}$ . Le chlorofluoroacétonitrile formé distille à  $66^\circ\text{C}$  sous 760 mm de Hg. Le produit (5,5g) est un liquide incolore très volatil.

**Rendement** = 54 %

**$E_b$**  =  $66^\circ\text{C}$  / 760 mm Hg

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

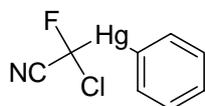
6,55 (d, 1H,  $J_{\text{H,F}} = 47,7$  Hz).

**R.M.N.  $^{19}\text{F}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

-139,9 (d, 1F,  $J_{\text{H,F}} = 47,7$  Hz).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

81,3 (d,  $\text{C}_{\text{quat}}$ ,  $J_{\text{C,F}} = 245,9$  Hz) ; 112,0 (d,  $\text{CN}$ ,  $J_{\text{C,F}} = 34,5$  Hz).

**(chlorocyanofluorométhyl)phénylmercure 10**

$$\text{P.M.} = 370 \text{ g.mol}^{-1}$$

Dans un tricol sous argon et sous agitation, 1,7 g de chlorofluoroacétonitrile (18,2 mmoles, 1 éq.) et 4 g de chlorure de phénylmercure (12,7 mmoles, 0,7 éq.) sont mis en suspension dans 25 mL de THF fraîchement distillé. Le tout est refroidi à  $-78^{\circ}\text{C}$ . Sous forte agitation, une suspension de 2g de tert-butylate de potassium (18, mmoles, 1 éq.) et de 1,7 mL de tert-butanol (18,2 mmoles, 1 éq.) dans 13 mL de THF fraîchement distillé est alors additionnée sur 30 minutes. La suspension obtenue est agitée vigoureusement pendant une heure à  $-70^{\circ}\text{C}$ . L'huile brune obtenue est versée dans 130 mL d'eau glacée contenant 1,5 mL d'HCl 12 M puis le tout est extrait par 150 mL de chloroforme. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est repris par 20 mL de chloroforme et placé une heure à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le précipité formé est filtré, le filtrat est récupéré puis concentré sous pression réduite. Le produit brut obtenu est repris une dernière fois par un mélange de 20 mL de chloroforme et de 20 mL d'essence G puis placé une nuit à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les cristaux beiges obtenus sont filtrés et séchés sous vide sur  $\text{P}_2\text{O}_5$ . 2,45 g de (chlorocyanofluorométhyl)phénylmercure sont obtenus de cette façon.

**Rendement** = 52 %

**F** =  $130^{\circ}\text{C}$  (Lit.<sup>[74]</sup> :  $128,7\text{-}131^{\circ}\text{C}$ )

**R.M.N.  $^1\text{H}$  (Acétone- $\text{d}_6$ ) :**

7,3 – 7,6 (m, 5H, ArH).

**R.M.N.  $^{19}\text{F}$  (Acétone- $\text{d}_6$ ) :**

-124,9 (s,  $\text{CFCICN}$  et d,  $\text{CFCICN}$ ,  $J_{\text{F,Hg } 199} = 513,0 \text{ Hz}$ ).

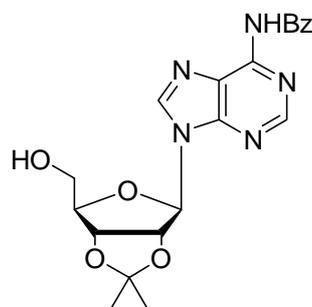
**Masse (EI)**  $m/z = 279$  ( $\text{M-CFCICN}^+$ ) (22%)

$m/z = 92$  ( $\text{CFCICN}^+$ ) (8%)

$m/z = 77$  ( $\text{C}_6\text{H}_5^+$ ) (100 %)

IR 2227 cm<sup>-1</sup> (CN)

**N<sup>6</sup>-benzoyl-2',3'-O-isopropylidène adénosine 21**



**P.M.** = 411 g.mol<sup>-1</sup>

Dans un ballon sous argon et protégé de la lumière, 5,8 g (18,8 mmoles) de 2',3'-O-isopropylidène adénosine sont mis en solution dans 80 mL de pyridine. 11 mL (5 équ., 94 mmoles) de chlorure de benzoyle sont ajoutés goutte à goutte. L'agitation est maintenue pendant 4 heures toujours à l'abri de la lumière. La solution est ensuite versée dans un mélange eau et glace puis extraite au chloroforme. La phase organique est lavée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis évaporée. Le produit brut ainsi obtenu est repris dans 80 mL de pyridine et 80 mL d'une solution de soude 1M. L'agitation est maintenue 30 minutes, la solution prend une couleur rouge orangée. La solution est alors neutralisée par ajout d'acide acétique glacial, évaporée et coévaporée au toluène. Le résidu est repris dans du chloroforme puis lavé avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. La phase organique est recueillie, séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée. Le produit est purifié par recristallisation dans un mélange éther-acétate d'éthyle pour donner 5,4 g d'un solide blanc.

**Rendement** = 70 %

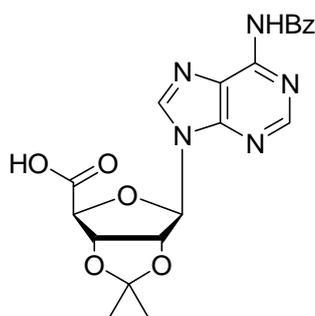
**F** = 148°C (Litt: 152°C, crist. : H<sub>2</sub>O<sup>[128]</sup> ; 132°C<sup>[72]</sup>)

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

1,40 et 1,68 (2s, 6H, CMe<sub>2</sub>) ; 3,82 (dd, 1H, H<sub>5'a</sub>, J<sub>4',5'a</sub> = 1,9 Hz, J<sub>5'a,5'b</sub> = 12,6 Hz); 4,00 (dd, 1H, H<sub>5'b</sub>, J<sub>4',5'b</sub> = 1,5 Hz, J<sub>5'a,5'b</sub> = 12,6 Hz); 4,57 (m, 1H, H<sub>4'</sub>); 5,14 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>2',3'</sub> = 6,1

Hz,  $J_{3',4'} = 1,1$  Hz) ; 5,25 (dd,  $H_{2'}$ ,  $J_{1',2'} = 4,6$  Hz,  $J_{2',3'} = 6,1$  Hz) ; 5,87 (d, 1H,  $H_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 4,6$  Hz) ; 7,53 et 8,06 (m, 5H, Bz) ; 8,11 et 8,80 (2s, 2H,  $H_2$  et  $H_8$ ) ; 9,23 (s large, 1H, NH).

### Acide 2',3'-*O*-isopropylidène- $N^6$ -benzoyl-adénosine-5'-carboxylique 22



**P.M.** = 425 g.mol<sup>-1</sup>

Dans un ballon sous agitation et sous argon, 2,6 g de 2',3'-*O*-isopropylidène- $N^6$ -benzoyl adénosine (6,3 mmoles) sont mis en solution dans 12 mL d'un mélange CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O : 1/1. 200 mg de TEMPO (0,1 éq., 0,63 mmole) et 2,24 g de BAIB (2,2 éq., 13,9 mmoles) sont alors introduits. La solution est agitée pendant 5 heures puis le solvant est évaporé puis coévaporé deux fois avec de l'acétonitrile. Un minimum d'éther est ajouté au résidu, le produit cristallise immédiatement. Le produit est filtré, lavé et séché pour donner 2,25 g d'un solide légèrement coloré.

**Rendement** = 84 %

**F** : 201°C (Litt.<sup>[84]</sup> : 208-209°C)

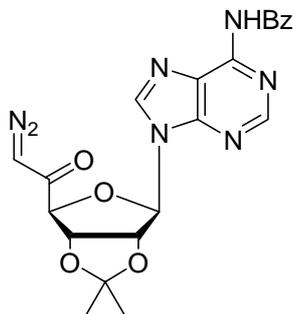
**R.M.N. <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) :**

1,40 et 1,60 (2s, 2x3H, CMe<sub>2</sub>) ; 4,80 (pic large, 1H,  $H_{4'}$ ) ; 5,55 (pic large, 2H,  $H_{2'}$  et  $H_{3'}$ ) ; 6,45 (pic large, 1H,  $H_{1'}$ ) ; 7,50 – 8,10 (m, 5H, Ar) ; 8,60 et 8,70 (2s, 2H,  $H_2$  et  $H_8$ ) ; 11,25 (s, 1H, NH).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) :**

24,9 et 26,5 (CMe<sub>2</sub>) ; 83,4 ; 83,8 ; 85,7 ; 89,8 ; 112,7 (CMe<sub>2</sub>) ; 125,4 ; 128,5 ; 132,5 ; 133,4 ; 150,3 ; 152,0 (C de la base et du Bz) ; 170,8 (C=O).

## 5'-désoxy-5'-diazon<sup>6</sup>-N<sup>6</sup>-benzoyl-2',3'-O-isopropylidène adénosine 24



**P.M.** = 449 g.mol<sup>-1</sup>

A une solution composée de 31 mL de dichlorométhane séché sur CaCl<sub>2</sub> et de 1,25 g (2,9 mmoles) d'acide 2',3'-O-isopropylidène-N<sup>6</sup>-benzoyladénosine-5'-carboxylique, on additionne 635 µL de chlorure de thionyle (8,7 mmoles, 3 éq.) fraîchement distillé. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 4 heures à température ambiante puis évaporé et coévaporé avec du dichlorométhane. Le résidu est remis en suspension dans 24 mL d'un mélange CH<sub>3</sub>CN / THF : 50/50. 4,3 mL de triméthylsilyldiazométhane (2M dans l'hexane, 8,7 mmoles, 3 éq.) sont introduit lentement à la seringue et à 0°C. La solution est agitée pendant 3 heures, en laissant remonter à température ambiante, puis le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie éclair sur silice (Acétate d'éthyle) pour obtenir 1,02 g d'un solide jaune.

**Rendement** = 77 %

**P.F.** = 86°C

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

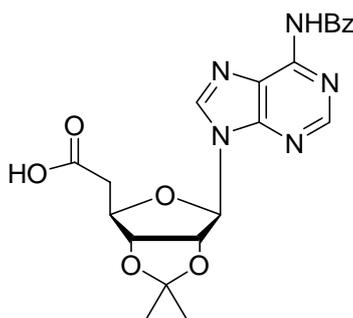
1,4 (s, 3H, CMe<sub>2</sub>) ; 1,6 (s, 3H, CMe<sub>2</sub>) ; 4,7 (pic large, 1H, H<sub>4'</sub>) ; 5,2 (s, 1H, H<sub>6'</sub>) ; 5,5 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 1,0 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 6,2 Hz) ; 5,6 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>2',3'</sub> = 6,2 Hz, J<sub>3',4'</sub> = 2,1 Hz) ; 6,3 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 1,0 Hz) ; 7,5 – 8,0 (m, 5H, Ar) ; 8,1 et 8,7 (2s, 2H, H<sub>2</sub> et H<sub>8</sub>).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) :**

24,9 et 26,5 (CMe<sub>2</sub>) ; 53,1 (C<sub>6'</sub>) ; 83,1 (C<sub>3'</sub>) ; 83,4 (C<sub>2'</sub>) ; 90,5 (C<sub>4'</sub>) ; 91,1 (C<sub>1'</sub>) ; 114,1 (CMe<sub>2</sub>) ; 123,2 ; 127,7 ; 127,8 ; 128,5 ; 132,5 ; 132,6 ; 133,1 ; 142,4 ; 149,7 ; 151,1 ; 152,3 (11C, 6C du Bz et 5C de la base) ; 164,8 (C=O du Bz) ; 191,4 (C=O de CHN<sub>2</sub>).

<b>Masse (ESI)</b>	$m/z = 450 (M+H)^+$
<b>IR (pastille KBr)</b>	$1700 \text{ cm}^{-1} (\text{C=O}) ; 2111 \text{ cm}^{-1} (\text{CHN}_2) ; 3256 \text{ cm}^{-1} (\text{NH})$

**Acide 2',3'-*O*-isopropylidène-N<sup>6</sup>-benzoylhomoadénosine-6'-carboxylique 25**



**P.M.** =  $441 \text{ g.mol}^{-1}$

Dans un ballon sous argon surmonté d'un réfrigérant, 1,09 g (2,3 mmoles) de 5' désoxy-5'-diazon<sup>6</sup>-benzoyl-2',3'-*O*-isopropylidène adénosine est mis en solution dans 18 mL de dioxane et 9 mL d'eau. Le mélange est porté à reflux pendant deux heures après avoir ajouté 50 mg (0,1 éq., 0,23 mmole) de benzoate d'argent. La transformation n'étant pas totale, le reflux est poursuivi deux heures supplémentaires au cours desquelles deux fois 0,1 éq. de benzoate d'argent sont ajoutés en supplément. Le solvant est évaporé. Le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur silice en utilisant un gradient acétate d'éthyle → acétate d'éthyle / méthanol : 90/10 → acétate d'éthyle / méthanol : 50/50. Le produit obtenu est un solide blanc.

**Rendement** = 47 %

**P.F.** = 97°C

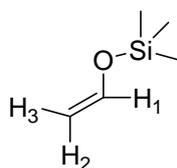
**R.M.N. <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) :**

1,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub> de l'isopropylidène) ; 1,60 (s, 3H, CH<sub>3</sub> de l'isopropylidène) ; 2,7 (dd, 1H, H<sub>5a'</sub>, J<sub>gem</sub> = 16 Hz, J<sub>4',5a'</sub> = 7,5 Hz) ; 2,8 (dd, 1H, H<sub>5b'</sub>, J<sub>gem</sub> = 16 Hz ; J<sub>4',5b'</sub> = 5,9 Hz) ; 4,63, (m, 1H, H<sub>4'</sub>) ; 5,09 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>3',4'</sub> = 3,0 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 6,5 Hz) ; 5,58 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,7 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 6,5 Hz) ; 6,29 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,7 Hz).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :**

25,5, 27,4 ( $\text{CH}_3$  de l'isopropylidène) ; 39,0 ( $\text{C}_5'$ ) ; 85,0 ( $\text{C}_4'$ ) ; 85,3 ( $\text{C}_3'$ ) ; 85,5 ( $\text{C}_2'$ ) ; 92,0 ( $\text{C}_1'$ ) ; 115,5 (C quat. de l'isopropylidène) ; 129,4, 129,7, 133,3, 152,9 (C du phényl et de la base) ; 145,0 ( $\text{C}_8$ ) ; 153,3 ( $\text{C}_2$ ) ; 168,2 (Carbonyle du benzoyl) ; 174,0 (carbonyle de l'acide).

**IR (pastille KBr)** 1705  $\text{cm}^{-1}$  (C=O); 3099  $\text{cm}^{-1}$  (OH); 3262  $\text{cm}^{-1}$  (N-H)

**(vinyloxy)triméthylsilane 26**

**P.M.** = 116  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Dans un ballon équipé d'un piège contenant de la glace, on mélange 20 mL de DMF, 14 mL d' $\text{Et}_3\text{N}$  (0,1 mol), 10,2 mL de  $\text{TMSCl}$  (0,0804 mol) fraîchement distillé. Le ballon est placé dans la glace et 12 mL (0,2 mmole) d'acétaldéhyde sont ajoutés à l'aide d'une canule. La solution prend une couleur orange puis vire au marron. L'agitation est maintenue pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est dilué avec 10 mL de xylène fraîchement distillé. Une colonne à distiller est adaptée et la fraction distillant entre 25°C et 90°C est récupérée. Le distillat est alors dilué avec 40 mL de xylène et la solution obtenue lavée avec 30 mL d'eau glacée, 3 fois 15 mL d'une solution d' $\text{HCl}$  1M glacée, 10 mL d'une solution de bicarbonate de sodium saturée glacée. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  pendant 15 minutes puis de nouveau distillée, la fraction ayant un point d'ébullition de 75°C est récupérée. Elle contient 4,47 g de l'éther d'énol silylé.

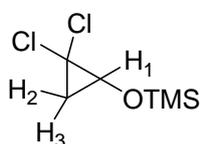
**Rendement** = 47 %

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

0,20 (s, 9H, 3 x Me du TMS) ; 4,12 (d, 1H,  $\text{H}_2$ ,  $J_{1,2} = 5,7$  Hz) ; 4,42 (d, 1H,  $\text{H}_3$ ,  $J_{1,3} = 13,7$  Hz) ; 6,4 (dd, 1H,  $\text{H}_1$ ,  $J_{1,2} = 5,7$  Hz,  $J_{1,3} = 13,7$  Hz).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

0,0 (3 x Me du TMS), 94,2 ( $\text{CH}_2$ ) ; 145,7 (CH).

***O*-triméthylsilyl-2,2-dichlorocyclopropan-1-ol 27**

**P.M.** = 199  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Dans un tricol sous argon, on introduit 60 mL de pentane séché sur sodium, 3,9 g (33,6 mmoles) de (vinyloxy)triméthylsilane et 3,4g de méthylate de sodium frais (62,4 mmoles, 1,85 éq.). Le tout est mis en suspension et refroidit à 0°C. 8,7 mL de trichloroacétate d'éthyle (62,4 mmoles, 1,85 éq.) sont alors ajoutés rapidement à la seringue. La suspension prend une couleur orange puis brune. Au bout de 6h30 d'agitation à 0°C, la solution est filtré sur un fritté. La solution recueillie est évaporée à l'évaporateur rotatif (bain froid). Le résidu ainsi obtenu est distillé sous pression réduite, on recueille la fraction distillant à 59°C sous 15 mm de Hg. La purification de cette fraction est complétée par une filtration sur un colonne d'alumine neutre. On obtient ainsi 731 mg du produit désiré.

**Rendement** = 11 %

**E<sub>b</sub>** = 59°C (15 mm Hg)

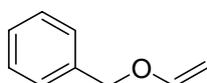
**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

0,25 (s, 9H, 3 $\text{CH}_3$ ) ; 1,42 (dd, 1H,  $\text{H}_2$ ,  $J_{1,2} = 6,2$  Hz,  $J_{2,3} = 8,0$  Hz) ; 1,62 (dd, 1H,  $\text{H}_3$ ,  $J_{1,3} = J_{2,3} = 8,0$  Hz) ; 3,70 (dd, 1H,  $\text{H}_1$ ,  $J_{1,2} = 6,2$  Hz,  $J_{2,3} = 8,0$  Hz).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

-0,3 ( $3\text{CH}_3$ ) ; 29,0 ( $\text{CH}_2$ ) ; 57,9 ( $\text{CH}$ ) ; 64,0 ( $\text{CCl}_2$ ).

**Masse (DCI /  $\text{NH}_3$ )**             $m/z = 163,1$  (24%) ( $\text{M-Cl}^+$ )  
     $m/z = 73$  (100 %) ( $\text{SiMe}_3^+$ )

**Vinyloxyméthyl-benzene 29**

**P.M.** =  $134 \text{ g.mol}^{-1}$

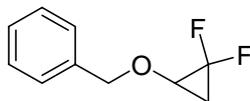
Sous argon et à  $0^\circ\text{C}$ , on prépare une solution contenant 31,2 mL d'alcool benzylique (0,3 mole), 105 mL d'éthylvinyléther (0,6 mmole, 2 éq.) et 150 mg de trifluoroacétate de mercure (II) (0,3 mmol). La solution est agitée à température ambiante pendant 2h30. 180 mL d'acétate d'éthyle sont additionnés. La phase organique est lavée avec deux fois 120 mL d'une solution saturée en hydrogénocarbonate de soude et deux fois avec 60 mL d'une solution saturée en chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  puis évaporée. Le brut est purifié par chromatographie éclair sur silice avec un gradient essence G  $\rightarrow$  essence G / acétate d'éthyle : 99 / 1. On récupère ainsi 24 g d'une huile légèrement colorée. Il est à noter que le produit est lacrymogène.

**Rendement** = 60 %

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

4,12 (dd, 1H,  $J = 6,8 \text{ Hz}$ ,  $J = 2,7 \text{ Hz}$ ) ; 4,35 (dd, 1H,  $J = 14,3 \text{ Hz}$ ,  $J = 2,1 \text{ Hz}$ ) ; 4,80 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 6,60 (dd, 1H,  $J = 14,3 \text{ Hz}$ ,  $J = 6,8 \text{ Hz}$ ) ; 7,30 – 7,40 (m, 5H, ArH).

***O*-benzyl-2,2- difluorocyclopropan-1-ol 30**



$$\text{P.M.} = 184 \text{ g.mol}^{-1}$$

Dans un tricol sous argon surmonté d'un réfrigérant et d'une ampoule à brome, on prépare une solution de 3,2 g de vinyloxyméthyl-benzène (17,4 mmoles) dans 22 mL de diglyme séché sur sodium. Le mélange est porté au reflux du diglyme (180°C). Une solution de 32 mL de diglyme séché sur sodium et de 11,5 g de chlorodifluoroacétate de sodium (3,1 éq., 53,9 mmoles) sont introduits dans l'ampoule à brome. Une fois à reflux, le contenu de l'ampoule à brome est additionné lentement, l'addition se fait sur 4 heures. On laisse le mélange revenir à température ambiante et on le reprend par l'essence G. La solution obtenue est lavée à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée. La purification est réalisée par chromatographie sur alumine neutre avec comme éluant l'essence G puis une seconde chromatographie éclair sur silice avec comme éluant un mélange essence G / acétate d'éthyle : 70/30. On obtient ainsi 2,9 g de 30 sous forme d'une huile.

**Rendement** = 66 %

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

1,50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 3,65 (m, 1H, CH) ; 4,7 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O) ; 7,3 à 7,5 (m, 5H, ArH).

**R.M.N. <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>) :**

-135,7 (dddd, 1F, J<sub>gem</sub> = 168,4 Hz, J = 16,4 Hz, J = 9,4 Hz, J = 4,7 Hz) ; -149,1 (dddd, 1F, J<sub>gem</sub> = 168,4 Hz, J = 14,1 Hz, J = 7,0 Hz, J = 4,7 Hz).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) :**

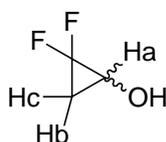
18,0 (t, CH<sub>2</sub>, J = 10,8 Hz) ; 56,3 (dd, CH, J = 13,8 Hz, J = 8,9 Hz) ; 76,6 (CH<sub>2</sub>O) ; 111,4 (t, CF<sub>2</sub>, J = 283,4 Hz) ; 128,1 ; 128,2 ; 128,5 ; 136,5 (ArH).

**Masse (EI)**  $m/z = 164$  (M-HF)<sup>+</sup>  
 $m/z = 91$  (ion tropyllium)

**Analyse**  $C_{10}H_{10}OF_2$   
 Calculé C : 65,21 H : 5,43  
 Expérimental C : 65,36 H : 5,79

**IR**  $3092\text{ cm}^{-1}$  et  $3033\text{ cm}^{-1}$  (CH cyclopropane) ;  $2873\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub> de l'éther)

### 2,2-Difluorocyclopropan-1-ol 31



**P.M.** =  $91\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Dans un ballon à hydrogéner préalablement purgé à l'argon, on prépare une solution de 3g de *O*-benzyl-2,2-difluorocyclopropan-1-ol (16,3 mmoles) dans 20 mL de THF fraîchement distillé. A cette solution, on ajoute 285 mg de Pd(OH)<sub>2</sub> / C et l'hydrogénation est conduite sous pression d'H<sub>2</sub> pendant 2 heures sous agitation vigoureuse. Le THF est ensuite distillé sous pression réduite (200 mm Hg, E<sub>b</sub> = 28-30°C). L'alcool difluorocyclopropanique obtenu contient du toluène et quelques traces de THF. On obtient ainsi 2,7 g d'une solution à 30% en 2,2-difluoro-cyclopropan-1-ol (estimation par RMN <sup>1</sup>H).

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

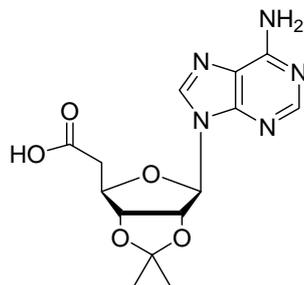
1,30 (m, 1H, H<sub>b</sub>); 1,50 (m, 1H, H<sub>c</sub>); 3,75 (sous le THF, 1H, H<sub>a</sub>).

**R.M.N. <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>) :**

-132,4 (dddd, 1F, J<sub>gem</sub> = 166,4 Hz, J = 15,5 Hz, J = 11,2 Hz, J = 5,1 Hz) ; -149,5 (dddd, 1F, J<sub>gem</sub> = 166,4 Hz, J = 16,4 Hz, J = 6,9 Hz, J = 3,8 Hz).

**Masse (EI)**  $m/z = 91$  (M)<sup>+</sup>

## Acide 2',3'-*O*-isopropylidène-homoadénosine-6'-carboxylique 32



**P.M.** = 335 g.mol<sup>-1</sup>

Dans un ballon sous argon, on met en solution 200 mg (0,46 mmole) d'acide 2',3'-*O*-isopropylidène-*N*<sup>6</sup>-benzoylhomoadénosine-6'-carboxylique dans 20 mL de MeOH. On introduit ensuite 46 mg de méthylate de sodium (2 éq., 0,92 mmole). L'agitation est maintenue une nuit puis la solution est neutralisée par une solution d'acide chlorhydrique 1M. Le solvant est évaporé puis le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur silice avec comme solvant un mélange acétate d'éthyle / méthanol : 50/50 pour donner 146 mg d'un solide légèrement coloré.

**Rendement** = 96%

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) :**

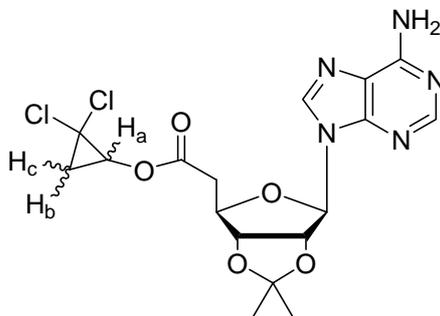
1,40 et 1,60 (2s, 2x3H, 2CH<sub>3</sub>) ; 2,62 (dd, 1H, H<sub>5'a</sub>, J<sub>4',5'a</sub> = 7,1 Hz, J<sub>5'a,5'b</sub> = 15,7 Hz) ; 2,72 (dd, 1H, H<sub>5'b</sub>, J<sub>4',5'b</sub> = 6,1 Hz, J<sub>5'a,5'b</sub> = 15,7 Hz) ; 4,60 (m, 1H, H<sub>4'</sub>) ; 5,05 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>2',3'</sub> = 6,3 Hz, J<sub>3',4'</sub> = 2,9 Hz) ; 5,48 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,7 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 6,3 Hz) ; 6,12 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,7 Hz) ; 8,20 et 8,30 (2s, 2H, H<sub>2</sub> et H<sub>8</sub>).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD) :**

25,5 et 27,4 (CMe<sub>2</sub>) ; 41,1 (C<sub>5'</sub>) ; 85,3 (C<sub>4'</sub>) ; 85,4 (C<sub>3'</sub>) ; 85,5 (C<sub>2'</sub>) ; 91,5 (C<sub>1'</sub>) ; 115,4 (CMe<sub>2</sub>) ; 120,4 ; 141,7 ; 150,4 ; 154,0 ; 157,3 (C<sub>base</sub>) ; 176,5 (C=O).

**Masse (DCI / NH<sub>3</sub>)**                      m/z = 336 (M+H)<sup>+</sup>

**Ester 2,2-dichlorocyclopropanique de l'acide 2',3'-*O*-isopropylidène-homoadénosine-6'-carboxylique 33a**



$$\text{P.M.} = 443 \text{ g.mol}^{-1}$$

Dans un ballon sous argon, on prépare une solution contenant 147 mg (0,44 mmole) de l'acide 2',3'-*O*-isopropylidène-homoadénosine-6'-carboxylique sont dissous dans 4,5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> distillé sur CaH<sub>2</sub>. La solution est agitée et on introduit 100 mg (0,52 mmole, 1,2 éq.) d'EDCI ainsi qu'une quantité catalytique de HOBT. L'agitation est maintenue 15 minutes à température ambiante. On ajoute lentement à la seringue la solution de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> contenant le dichlorocyclopropanol (10 éq.) (10 éq. de *O*-triméthylsilyl-2,2-dichlorocyclopropan-1-ol sont mis en solution dans 1 mL de THF anhydre. On ajoute une quantité catalytique d'HCl 1M. Après 30 minutes d'agitation, la solution est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et introduite directement dans la solution contenant l'acide 32). L'agitation est maintenue 4 heures. Au bout de ces 4 heures, l'acide 2',3'-*O*-isopropylidène-homoadénosine-6'-carboxylique est totalement consommé (contrôle CCM). Le solvant est évaporé, le produit brut est repris au CHCl<sub>3</sub> et lavé à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis le solvant est évaporé. Le résidu ainsi obtenu est purifié par chromatographie éclair sur silice en utilisant comme solvant : Acétate d'éthyle/Méthanol : 95/5. L'ester dichlorocyclopropanique 33a (86 mg, laque) est obtenu sous forme de mélange de diastéréoisomères qui ne sont pas séparés.

**Rendement** = 44%

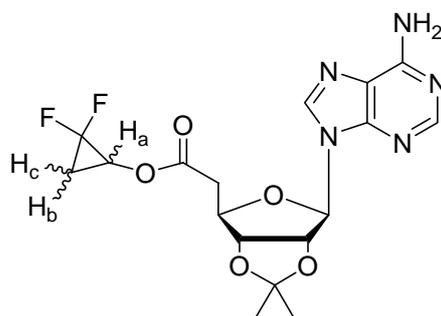
**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : (Mélange de diastéréoisomères)**

1,4 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,64 (m, 4H, CH<sub>3</sub> et H<sub>b</sub>), 1,85 (m, 1H, H<sub>c</sub>); 2,92 (m, 2H, 2H<sub>5'</sub>); 4,38 (m, 1H, H<sub>a</sub>); 4,65 (m, 1H, H<sub>4'</sub>); 5,10 (m, 1H, H<sub>3'</sub>); 5,50 (m, 1H, H<sub>2'</sub>); 6,10 (s, 1H, H<sub>1'</sub>); 7,9 et 8,00 (2s,

1H, H<sub>2</sub> de chacun des diastéréoisomères); 8,30 et 8,35 (2s, 1H, H<sub>8</sub> de chacun des diastéréoisomères).

**Masse (DCI / NH<sub>3</sub>)**  $m/z = 444 (M+H)^+$

**Ester 2,2-difluorocyclopropanique de l'acide 2',3'-*O*-isopropylidène-homoadénosine-6'-carboxylique 33b**



**P.M.** = 411 g.mol<sup>-1</sup>

Dans un ballon sous argon et agitation, 166 mg (0,51 mmole) de l'acide 2',3'-*O*-isopropylidène-homoadénosine-6'-carboxylique sont mis en solution dans 6 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> distillé sur CaH<sub>2</sub>. On ajoute ensuite 105 mg (0,56 mmole, 1,1 éq.) d'EDCI ainsi qu'une quantité catalytique de HOBT. L'agitation est maintenue 30 minutes à température ambiante. On ajoute alors lentement à la seringue 2 équivalents de 2,2-difluorocyclopropanol en solution (Cf préparation du 2,2-cyclopropan-1-ol). L'agitation est maintenue 1 heure puis on ajoute de nouveau 2 éq. de 2,2-difluorocyclopropanol ainsi que 1,1 éq. d'EDCI. L'opération est reconduite jusqu'à consommation totale de l'acide 2',3'-*O*-isopropylidène-homoadénosine-6'-carboxylique. Le milieu réactionnel est dilué au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et extrait à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis le solvant est évaporé. Le résidu ainsi obtenu est purifié par chromatographie éclair sur silice en utilisant un gradient acétate d'éthyle/CH<sub>3</sub>CN : 90/10 → acétate d'éthyle/CH<sub>3</sub>CN : 50/50 → CH<sub>3</sub>CN. L'ester difluorocyclopropanique (35 mg, laque) est obtenu sous forme de mélange de diastéréoisomères qui ne sont pas séparés.

**Rendement** = 16 %

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : Mélange de diastéréoisomères**

1,42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,54 (m, 1H,  $\text{H}_b$ ), 1,64 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,80 (m, 1H,  $\text{H}_c$ ); 2,90 (m, 2H,  $2\text{H}_5$ ); 4,34 (m, 1H,  $\text{H}_a$ ); 4,69 (m, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ); 5,10 (m, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ); 5,52 (m, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ); 5,90 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 6,10 (m, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ); 7,91 et 7,95 (2s, 1H,  $\text{H}_2$  de chacun des diastéréoisomères), 8,38 (s, 1H,  $\text{H}_8$  de chacun des diastéréoisomères).

**R.M.N.  $^{19}\text{F}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

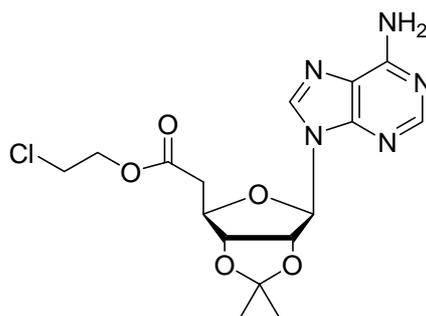
-142,2 (m, 1F); -132,9 (m, 1F).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

17,8 (m,  $\text{CH}_2$ ) ; 25,3 et 27,0 ( $\text{CH}_3$ ) ; 37,4 ( $\text{C}_{5'}$ ) ; 51,4 (m, CH) ; 83,1 et 83,2 ( $\text{C}_{4'}$ ) ; 83,9 ( $\text{C}_{3'}$ ) ; 84,1 ( $\text{C}_{2'}$ ) ; 90,7 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 108,6 (m,  $\text{CF}_2$ ) ; 114,6 ( $\text{CMe}_2$ ) ; 120,2 ; 140,2 ; 149,1 ; 152,9 ; 155,4 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 169,9 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

**IR**            1732  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ )

**Ester 2-chloroéthyle de l'acide 2',3'-*O*-isopropylidène-homoadénosine-6'-carboxylique 34a**



**P.M.** = 397,5  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Dans un ballon sous argon, 104 mg (0,3 mmole) de l'acide 2',3'-*O*-isopropylidène-homoadénosine-6'-carboxylique sont dissous dans 3 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  distillé sur  $\text{CaH}_2$ . A cette solution, on additionne 69 mg (0,36 mmole, 1,2 éq.) d'EDCI ainsi qu'une quantité catalytique de HOBT. L'agitation est maintenue 15 minutes à température ambiante. On ajoute alors

lentement à la seringue 170  $\mu\text{L}$  (3 mmoles, 10  $\text{eq.}$ ) de 2-chloroéthanol-1-ol. L'agitation est maintenue 2 heures puis on ajoute de nouveau 1,2  $\text{eq.}$  d'EDCI et une quantité catalytique de HOBT. L'opération est reconduite une nouvelle fois avant l'extraction de l'ester formé. Le milieu réactionnel est dilué par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et la solution obtenue est lavée à l'eau. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  puis le solvant est évaporé. Le résidu ainsi obtenu est purifié par chromatographie éclair sur silice en utilisant un gradient Acétate d'éthyle  $\rightarrow$  Acétate d'éthyle/Méthanol : 90/10 pour donner 76 mg de l'ester **34a** sous forme d'une laque.

**Rendement** = 61 %

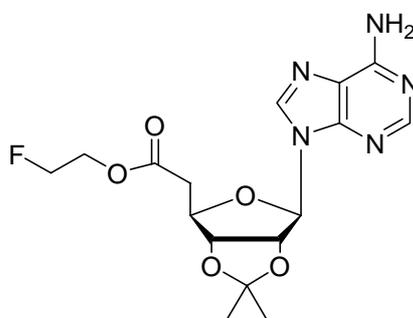
**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

1,4 (s, 3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 1,6 (s, 3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 2,9 (m, 2H,  $\text{H}_{5'}$ ) ; 3,6 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 5,5 \text{ Hz}$ ) ; 4,3 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 5,5 \text{ Hz}$ ) ; 4,7 (dt, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ,  $J_{3',4'} = 3,3 \text{ Hz}$ ,  $J_{4',5'} = 7,0 \text{ Hz}$ ) ; 5,1 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = 6,4 \text{ Hz}$ ,  $J_{3',4'} = 3,3 \text{ Hz}$ ) ; 5,5 (dd, 1H,  $\text{H}_{2'}$  ;  $J_{1',2'} = 2,2 \text{ Hz}$ ,  $J_{2',3'} = 6,4 \text{ Hz}$ ) ; 6,1 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 2,2 \text{ Hz}$ ) ; 6,2 (s large, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 7,9 et 8,4 (2s, 2H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

25,3 ( $\text{CMe}_2$ ) ; 27,0 ( $\text{CMe}_2$ ) ; 37,7 ( $\text{C}_{5'}$ ) ; 41,3 ( $\text{CH}_2$ ) ; 64,2 ( $\text{CH}_2$ ) ; 83,3 ( $\text{C}_{4'}$ ) ; 83,9 ( $\text{C}_{3'}$ ) ; 84,1 ( $\text{C}_{2'}$ ) ; 90,6 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 114,5 ( $\text{CMe}_2$ ) ; 120,2 ; 140,0 ; 149,1 ; 153,1 ; 155,7 (C de la base) ; 170,0 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

**Ester 2-fluoroéthyle de l'acide 2',3'-O-isopropylidène-homoadénosine-6'-carboxylique 34b**



**P.M.** = 381  $\text{g.mol}^{-1}$

Dans un ballon sous argon, 200 mg (0,6 mmole) de l'acide 2',3'-*O*-isopropylidène-homoadénosine-6'-carboxylique sont dissous dans 8 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> distillé sur CaH<sub>2</sub>. 136 mg (0,7 mmole, 1,2 éq.) d'EDCI sont alors additionnés ainsi qu'une quantité catalytique de HOBT. L'agitation est maintenue 15 minutes à température ambiante. On ajoute alors lentement à la seringue 347 µL (6 mmoles, 10 éq.) de 2-fluoroéthan-1-ol. L'agitation est maintenue 4 heures puis on ajoute de nouveau 1,2 éq. d'EDCI et une quantité catalytique de HOBT. L'opération est reconduite jusqu'à disparition totale de l'acide de départ. Le milieu réactionnel est dilué au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et extrait à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis le solvant est évaporé. Le produit brut ainsi obtenu est purifié par chromatographie éclair sur silice avec pour éluant : Acétate d'éthyle/Méthanol : 90/10. On obtient ainsi 158 mg de l'ester **34b** sous forme d'une laque.

**Rendement** = 69 %

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

1,4 et 1,6 (2s, 2x3H, CMe<sub>2</sub>) ; 2,82 (m, 2H, H<sub>5'</sub>) ; 4,24 (dt, 2H, CH<sub>2</sub>, J<sub>CH<sub>2</sub></sub> = 4,6 Hz, J<sub>CH<sub>2</sub>,F</sub> = 28,6 Hz) ; 4,50 (dt, 2H, CH<sub>2</sub>, J<sub>CH<sub>2</sub></sub> = 4,6 Hz, J<sub>CH<sub>2</sub>,F</sub> = 50,4 Hz) ; 4,60 (m, 1H, H<sub>4'</sub>) ; 5,03 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>2',3'</sub> = 6,2 Hz, J<sub>3',4'</sub> = 3,3 Hz) ; 5,44 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,0 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 6,2 Hz) ; 5,87 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 6,02 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,0 Hz) ; 7,9 et 8,3 (2s, 2H, H<sub>2</sub> et H<sub>8</sub>).

**R.M.N. <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>) :**

-224,6 (tt, 1F, J = 28,6 Hz, J = 50,4 Hz).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) :**

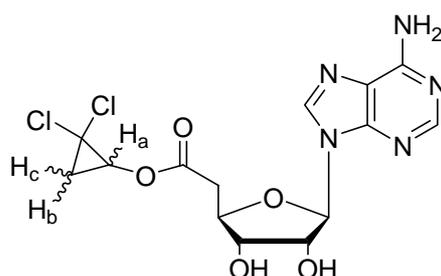
25,3 et 27,0 (CMe<sub>2</sub>) ; 37,7 (C<sub>5'</sub>) ; 63,5 (d, 1C, CH<sub>2</sub>, J = 20,2 Hz) ; 81,0 (d, 1C, CH<sub>2</sub>, J = 70,7 Hz) ; 82,4 (C<sub>4'</sub>) ; 83,2 (C<sub>3'</sub>) ; 84,2 (C<sub>2'</sub>) ; 90,6 (C<sub>1'</sub>) ; 114,6 (CMe<sub>2</sub>) ; 120,5 ; 140,0 ; 149,2 ; 153,0 ; 155,6 (C de la base) ; 170,2 (C=O).

### Déprotection des esters **33a-b** et **34a-b**

Dans un ballon, les esters **33a-b** et **34a-b** sont mis en solution dans un mélange HCOOH / Eau : 80/20. La solution est agitée pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est concentré sous

pression réduite et le produit brut purifié sur résine hydrophobe HP20SS en utilisant un gradient eau → eau/méthanol : 40/60. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et lyophilisées.

**Ester 2,2-dichlorocyclopropanique de l'acide homoadénosine-6'-  
carboxylique 5a**



**P.M.** = 403 g.mol<sup>-1</sup>

**m** = 61 mg

**Rendement** = 81 %

**HPLC :**

Eluant : Eau/Méthanol : 50/50

$t_R$  = 6,8 et 7,4 min.

(spherisorb ODS2 25cm, diamètre = 4,6 mm, D = 0,8 mL/min)

**R.M.N. <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) : Mélange de diastéréoisomères**

1,80 (m, 1H, H<sub>b</sub>); 2,05 (m, 1H, H<sub>c</sub>); 2,95 (m, 2H, 2H<sub>5'</sub>); 4,15 (m, 1H, H<sub>3'</sub>); 4,28 (m, 1H, H<sub>4'</sub>); 4,48 (dd, 1H, H<sub>a</sub>, J<sub>H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub></sub> = 5,3 Hz, J<sub>H<sub>a</sub>, H<sub>c</sub></sub> = 8,4 Hz); 4,77 (dd, 0,5H, H<sub>2'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = J<sub>2',3'</sub> = 5,0 Hz) et 4,84 (dd, 0,5H, H<sub>2'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = J<sub>2',3'</sub> = 5,0 Hz); 5,45 (s large, 1H, OH<sub>3'</sub>); 5,57 (d, 1H, OH<sub>2'</sub>, J = 5,6 Hz); 5,87 (s, 0,5H, H<sub>1'</sub>) et 5,90 (s, 0,5H, H<sub>1'</sub>), 7,35 (s large, 2H, NH<sub>2</sub>); 8,15 et 8,17 (2s, H, H<sub>2</sub> de chacun des diastéréoisomères); 8,36 et 8,38 (2s, H, H<sub>8</sub> de chacun des diastéréoisomères).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

26,0 ( $\text{CH}_2$ ); 37,5 ( $\text{C}_5'$ ); 56,8 ( $\text{CH}$ ); 72,4 ( $\text{C}_3'$ ); 72,9 ( $\text{C}_4'$ ); 80,1 ( $\text{C}_2'$ ); 87,7 ( $\text{C}_1'$ ); 106,0 ( $\text{CCl}_2$ ); 120,0; 140,0; 149,3; 152,6; 156,0 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ); 170,0 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

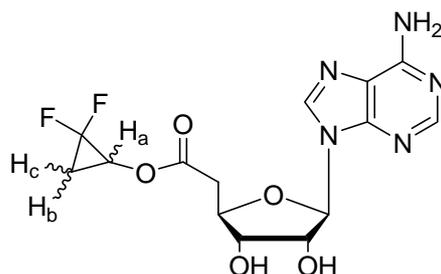
**Masse (DCI /  $\text{NH}_3$ )**  $m/z = 404 (\text{M}+\text{H})^+$

**Masse Exacte** Calculée 404,052849

Expérimentale 404,045592

**IR** 1750  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ )

**Ester 2,2-difluorocyclopropanique de l'acide homoadénosine-6'-  
carboxylique 5b**



**P.M.** = 371  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Note : Le gradient d'éluion est effectué en remplaçant le méthanol par de l'acétonitrile pour éviter la réaction de transestérification par le méthanol.

**m** = 18 mg

**Rendement** = 27 %

**HPLC :**

Eluant : Eau/Méthanol : 60/40

$t_R = 8,1$  min.

(spherisorb ODS2 25cm, diamètre = 4,6 mm, D = 0,8 mL/min)

**R.M.N.  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) : Mélange de diastéréoisomères**

1,73 (m, 1H,  $\text{H}_b$ ); 2,00 (m, 1H,  $\text{H}_c$ ); 2,91 (m, 2H,  $2\text{H}_5$ ); 4,13 (m, 1H,  $\text{H}_3$ ); 4,22 (m, 1H,  $\text{H}_a$ ); 4,48 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ); 4,72 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ); 5,35 (s large, 1H,  $\text{OH}_3$ ); 5,55 (s large, 1H,  $\text{OH}_2$ ); 5,89 (s, 0,5H,  $\text{H}_1$ ) et 5,91 (s, 0,5H,  $\text{H}_1$ ); 7,30 (s large, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 8,10 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ); 8,30 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ).

**R.M.N.  $^{19}\text{F}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

-146,3 (m, 1F); -133,8 (m, 1F).

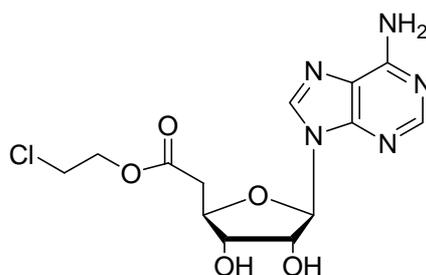
**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

17,1 (m,  $\text{CH}_2$ ); 37,5 ( $\text{C}_5$ ); 50,9 (m, CH); 72,5 ( $\text{C}_3$ ); 72,8 ( $\text{C}_4$ ); 80,1 ( $\text{C}_2$ ); 87,7 ( $\text{C}_1$ ); 107,0 (m,  $\text{CF}_2$ ); 119,2; 140,0; 149,3; 152,6; 156,0 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ); 170,3 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

**Masse (DCI /  $\text{NH}_3$ )**  $m/z = 372 (\text{M}+\text{H})^+$

**Masse Exacte** Calculée 372,111950

Expérimentale 372,114892

**Ester 2-chloroéthylque de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique 6a**

**P.M.** = 357,5  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**m** = 17 mg

**Rendement** = 48%

**F** = 91°C

**HPLC :**

Eluant : Eau/Méthanol : 50/50  $t_R = 5,1$  min.

(spherisorb ODS2 25cm, diamètre = 4,6 mm, D = 0,8 mL/min)

**R.M.N.  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

2,82 (dd, H,  $\text{H}_{5'a}$ ,  $J_{4',5'a} = 8,5$  Hz,  $J_{5'a,5'b} = 16,0$  Hz) ; 2,92 (dd, H,  $\text{H}_{5'b}$ ,  $J_{4',5'b} = 4,8$  Hz,  $J_{5'a,5'b} = 16,0$  Hz); 3,80 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 5,4$  Hz); 4,16 (m, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ) ; 4,27 (m, 3H,  $\text{CH}_2$  et  $\text{H}_{4'}$ ) ; 4,74 (dd, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{1',2'} = 5,4$  Hz,  $J_{2',3'} = 10,5$  Hz) ; 5,39 (d, 1H,  $\text{OH}_{3'}$ ,  $J = 4,7$  Hz) ; 5,56 (d, 1H,  $\text{OH}_{2'}$ ,  $J = 5,8$  Hz), 5,89 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J = 5,4$  Hz) ; 7,25 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 8,1 et 8,3 (2s, 2H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

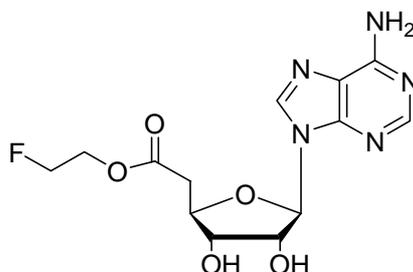
**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

38,3 ( $\text{C}_{5'}$ ); 42,8 ( $\text{CH}_2$ ); 64,4 ( $\text{CH}_2$ ); 72,9 ( $\text{C}_{4'}$ ); 73,2 ( $\text{C}_{3'}$ ); 80,6 ( $\text{C}_{2'}$ ); 88,0 ( $\text{C}_{1'}$ ); 119,5; 140,3; 149,7; 153,0; 156,4 (C de la base); 170,6 (C=O).

Masse (DCI /  $\text{NH}_3$ )  $m/z = 358$  (M+H) $^+$

Masse Exacte	Calculée	358,092738
	Expérimentale	358,091822

IR  $1736\text{ cm}^{-1}$  (C=O) ;  $3336\text{ cm}^{-1}$  (OH et  $\text{NH}_2$ )

**Ester 2-fluoroéthyle de l'acide homoadénosine-6'-carboxylique 6b**

P.M. =  $341\text{ g.mol}^{-1}$

**m** = 64 mg

**Rendement** = 70 %

**F** = 51°C

**HPLC :**

Eluant : Eau/Méthanol : 40/60

$t_R$  = 4,1 min.

(spherisorb ODS2 25cm, diamètre = 4,6 mm, D = 0,8 mL/min)

**R.M.N.  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

2,76 (dd, 1H,  $\text{H}_{5'a}$ ,  $J_{4',5'a} = 9,0$  Hz,  $J_{5'a,5'b} = 16,0$  Hz); 2,87 (dd, 1H,  $\text{H}_{5'b}$ ,  $J_{4',5'b} = 4,5$  Hz,  $J_{5'a,5'b} = 16,0$  Hz); 4,11 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = 10,0$  Hz,  $J_{3',4'} = 4,8$  Hz); 4,21 (m, 3H,  $\text{CH}_2$  et  $\text{H}_{4'}$ ); 4,54 (ddd, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J_{\text{CH}_2,\text{F}} = 47,7$  Hz,  $J = 4,8$  Hz,  $J = 3,5$  Hz); 4,67 (dd, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{1',2'} = 5,3$  Hz,  $J_{2',3'} = 10,0$  Hz); 5,32 (d, 1H,  $\text{OH}_{3'}$ ,  $J = 5,2$  Hz); 5,50 (d, 1H,  $\text{OH}_{2'}$ ,  $J = 5,9$  Hz); 5,84 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 5,3$  Hz); 7,35 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 8,15 et 8,40 (2s, 2H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

**R.M.N.  $^{19}\text{F}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

-222,4 (tt, 1F,  $J = 30,2$  Hz,  $J = 47,7$  Hz).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ )**

38,0 ( $\text{C}_{5'}$ ) ; 63,4 (d, 1C,  $\text{CH}_2$ ,  $J_{\text{C},\text{F}} = 9,3$  Hz); 72,6 ( $\text{C}_{2'}$ ); 72,8 ( $\text{C}_{3'}$ ); 79,2 ( $\text{C}_{4'}$ ); 81,5 (d,  $\text{CH}_2$ ,  $J_{\text{C},\text{F}} = 83,0$  Hz) ; 87,6 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 119,1 ; 139,9 ; 149,3 ; 152,6 ; 156,1 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 170,7 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

**Masse (DCI /  $\text{NH}_3$ )**

$m/z = 342$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

**Masse Exacte**

Calculée

342,121372

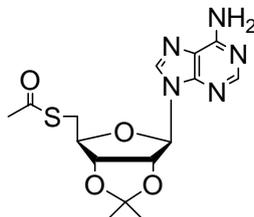
Expérimentale

342,123671

**IR**

1733  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ )

### 5'-S-acétylthio-5'-désoxy-2',3'-O-isopropylidène adénosine 41



$$\text{P.M.} = 365 \text{ g.mol}^{-1}$$

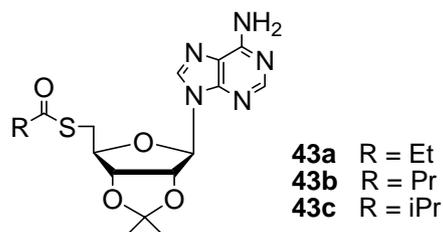
Dans un tricol sous argon et sous agitation sont introduits 40 mL de THF anhydre et 9,5 g de  $\text{PPh}_3$  (36,2 mmol, 2,2 éq.). La solution obtenue est refroidie à 0°C. On ajoute alors lentement à la seringue 5,65 mL de DEAD (36,2 mmol, 2,2 éq.). La solution prend une couleur jaune, l'agitation est alors maintenue pendant 30 minutes toujours à 0°C. 5 g d'adénosine (16,3 mmol, 1 éq.) sont alors ajoutés. La solution redevient limpide assez rapidement. L'agitation est maintenue encore pendant 10 minutes. 2,5 mL d'acide thioacétique fraîchement distillé (36,2 mmol, 2,2 éq.) en solution dans 5 mL de THF sont alors additionnés lentement. La solution prend une couleur orange puis redevient jaune. L'agitation est maintenue jusqu'à transformation totale (contrôle CCM : Eluant acétate d'éthyle / méthanol : 95/5,  $R_f = 0,34$ ). Le THF est évaporé sous vide et le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash (Silice, AE / MeOH : 95/5). Le produit contenant encore des résidus de phosphine, une seconde chromatographie éclair sur silice est effectuée avec un gradient d'élution (AE puis AE / MeOH : 90/10) pour donner 5,5 g d'une mousse blanche.

**Rendement** = 92 %

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

1,40 et 1,60 (2 x s, 2 x 3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 2,35 (s, 1H,  $\text{COCH}_3$ ) ; 3,20 (dd, 1H,  $\text{H}_{5a'}$ ,  $J_{\text{gem}} = 13,7$  Hz,  $J_{5'a,4'} = 6,9$  Hz) ; 3,30 (dd, 1H,  $\text{H}_{5b'}$ ,  $J_{\text{gem}} = 13,7$  Hz,  $J_{5'b,4'} = 6,9$  Hz) ; 4,35 (dt, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ,  $J_{4',3'} = 2,9$  Hz,  $J_{5',4'} = 6,9$  Hz) ; 5,00 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = 6,2$  Hz,  $J_{3',4'} = 2,9$  Hz) ; 5,50 (dd, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{1',2'} = 2,0$  Hz,  $J_{2',3'} = 6,2$  Hz) ; 6,05 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 2,0$  Hz) ; 6,36 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 7,85 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ) ; 8,30 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ).

## 5'-S-alcanoylthio-5'-désoxy-2',3'-O-isopropylidène adénosine 43a-c



### Méthode Générale

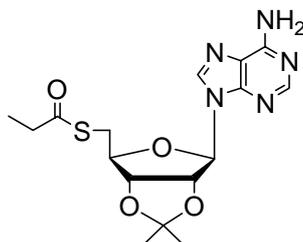
#### 1. Génération de la 2',3'-O-isopropylidène-5'-désoxy-5'-thioadénosine à partir de la 5'-acétylthio-5'-déoxy-2',3'-O-isopropylidèneadénosine

50 mL de méthanol sont dégazés par de l'argon et portés à 0°C. On fait alors barboter de l'ammoniac pendant une vingtaine de minutes. 500 mg (1,4 mmoles) de 5'-acétylthio-5'-déoxy-2',3'-O-isopropylidèneadénosine sont alors introduits et laissés à réagir pendant une heure. Le méthanol est évaporé et le produit brut obtenu est constitué du thiol et est utilisé immédiatement pour la suite de la synthèse.

#### 2. Mise en place du groupement alkylcarboxyl

Dans un ballon sous agitation et sous argon, on introduit 450 mg (1,4 mmoles) du thiol précédent et 20 mL de DMF anhydre. 160 mg (1,5 mmole, 1 éq.) de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sont alors introduits dans le milieu réactionnel ainsi que 2 éq. des anhydrides d'acides correspondant aux acides éthanoïque, propanoïque et isopropanoïque. La réaction est suivie par CCM et est terminée au bout d'environ une heure, le DMF est alors évaporé. Le thioester correspondant est extrait au chloroforme et à l'eau. La phase organique est récupérée, séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée. Le produit résultant est ensuite purifié par chromatographie éclair sur silice (AE/MeOH : 90/10). Les produits sont obtenus sous forme d'huile.

**5'-désoxy-5'-S-propanoylthio-2',3'-O-isopropylidène adénosine 43a**



**P.M.** = 379 g.mol<sup>-1</sup>

**m** = 435 mg

**Rendement** = 80 %

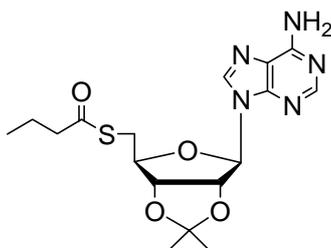
**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

1,15 (t, 3H, CH<sub>3</sub> de Et, J = 7,6 Hz) ; 1,40 et 1,60 (2 x s, 2 x 3H, CMe<sub>2</sub>) ; 2,60 (q, 2H, CH<sub>2</sub> de Et, J = 7,6 Hz) ; 3,15 (dd, 1H, H<sub>5a'</sub>, J<sub>gem</sub> = 13,7 Hz, J<sub>5'a,4'</sub> = 6,9 Hz) ; 3,30 (dd, 1H, H<sub>5b'</sub>, J<sub>gem</sub> = 13,7 Hz, J<sub>5'b,4'</sub> = 6,9 Hz) ; 4,35 (dt, 1H, H<sub>4'</sub>, J<sub>3',4'</sub> = 3,2 Hz, J<sub>4',5'</sub> = 6,9 Hz) ; 4,95 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>2',3'</sub> = 6,3 Hz, J<sub>3',4'</sub> = 3,2 Hz) ; 5,50 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,3 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 6,3 Hz) ; 6,07 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,3 Hz) ; 6,25 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 7,85 (s, 1H, H<sub>8</sub>) ; 8,30 (s, 1H, H<sub>2</sub>).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) :**

9,5 (CH<sub>3</sub> de Et) ; 24,6 – 25,3 (CH<sub>3</sub> de CMe<sub>2</sub>) ; 30,8 (CH<sub>2</sub> de Et) ; 37,3 (C'<sub>5</sub>) ; 83,6 (C'<sub>4</sub>) ; 84,1 (C'<sub>3</sub>) ; 86,1 (C'<sub>2</sub>) ; 90,8 (C'<sub>1</sub>) ; 114,4 (C quaternaire de CMe<sub>2</sub>) ; 120,1 ; 139,8 ; 149,0 ; 153,0 ; 155,7 (C<sub>base</sub>) ; 198,9 (C=O).

**5'-S-butanoylthio-5'-désoxy-2',3'-O-isopropylidène adénosine 43b**



**P.M.** = 393 g.mol<sup>-1</sup>

**m** = 357 mg**Rendement** = 66 %**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

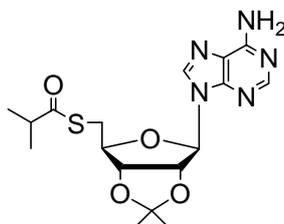
0,90 (t, 3H,  $\text{CH}_3$  de Et,  $J = 7,3$  Hz) ; 1,40 et 1,60 (2 x s, 2 x 3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 1,70 (m, 1H,  $\text{CH}_2$  de Et) ; 2,55 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  de Et,  $J = 7,3$  Hz) ; 3,20 (dd, 1H,  $\text{H}_{5a}'$ ,  $J_{\text{gem}} = 13,7$  Hz,  $J_{4',5'a} = 6,9$  Hz) ; 3,30 (dd, 1H,  $\text{H}_{5b}'$ ,  $J_{\text{gem}} = 13,7$  Hz,  $J_{4',5'b} = 6,9$  Hz) ; 4,35 (dt, 1H,  $\text{H}_4'$ ,  $J_{3',4'} = 3,0$  Hz,  $J_{4',5'} = 6,9$  Hz) ; 4,95 (dd, 1H,  $\text{H}_3'$ ,  $J_{2',3'} = 6,5$  Hz,  $J_{3',4'} = 3,0$  Hz) ; 5,50 (dd, 1H,  $\text{H}_2'$ ,  $J_{1',2'} = 2,3$  Hz,  $J_{2',3'} = 6,5$  Hz) ; 5,85 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 6,10 (d, 1H,  $\text{H}_1'$ ,  $J_{1',2'} = 2,3$  Hz) ; 7,90 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ) ; 8,30 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

13,4 ( $\text{CH}_3$  de Pr) ; 19,0 ( $\text{CH}_2$  de Pr) ; 25,3 ; 27,0 ( $\text{CH}_3$  de  $\text{CMe}_2$ ) ; 30,8 ( $\text{CH}_2$  de Pr) ; 45,9 ( $\text{C}'_5$ ) ; 83,6 ( $\text{C}'_4$ ) ; 84,1 ( $\text{C}'_3$ ) ; 86,1 ( $\text{C}'_2$ ) ; 90,9 ( $\text{C}'_1$ ) ; 114,5 (C quaternaire de  $\text{CMe}_2$ ) ; 120,3 ; 139,9 ; 149,0 ; 153,2 ; 155,6 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 198,1 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

### 5'-désoxy-5'-S-(2-méthylpropanoylthio)-2',3'-O-isopropylidène adénosine

#### 43c

**P.M.** = 393  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **m** = 433 mg**Rendement** = 78 %**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

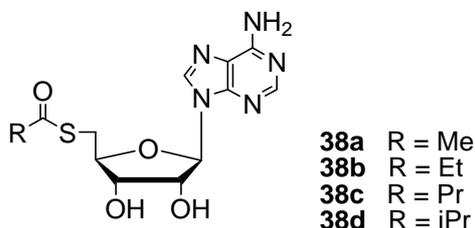
1,20 (d, 6H, 2  $\text{CH}_3$ ,  $J = 6,9$  Hz) ; 1,40 et 1,60 (2 x s, 2 x 3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 2,75 (m, 1H, CH) ; 3,15 (dd, 1H,  $\text{H}_{5a}'$ ,  $J_{\text{gem}} = 13,7$  Hz,  $J_{4',5'a} = 6,9$  Hz) ; 3,25 (dd, 1H,  $\text{H}_{5b}'$ ,  $J_{\text{gem}} = 13,7$  Hz,  $J_{4',5'b} = 6,9$  Hz) ; 4,35 (dt, 1H,  $\text{H}_4'$ ,  $J_{3',4'} = 3,0$  Hz,  $J_{4',5'} = 6,9$  Hz) ; 4,95 (dd, 1H,  $\text{H}_3'$ ,  $J_{2',3'} = 6,3$  Hz,  $J_{3',4'}$

= 3,0 Hz) ; 5,50 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,1 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 6,3 Hz) ; 6,00 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 6,09 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,1 Hz) ; 7,90 (s, 1H, H<sub>8</sub>) ; 8,30 (s, 1H, H<sub>2</sub>).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) :**

19,3 (2 CH<sub>3</sub>) ; 25,3 ; 27,0 (CH<sub>3</sub> de CMe<sub>2</sub>) ; 30,6 (C'<sub>5</sub>) ; 43,1 (CH) ; 83,6 (C'<sub>4</sub>) ; 84,1 (C'<sub>3</sub>) ; 86,1 (C'<sub>2</sub>) ; 90,8 (C'<sub>1</sub>) ; 114,4 (C quaternaire de CMe<sub>2</sub>) ; 120,2 ; 139,9 ; 149,2 ; 153,0 ; 155,5 (C<sub>base</sub>) ; 202,8 (C=O).

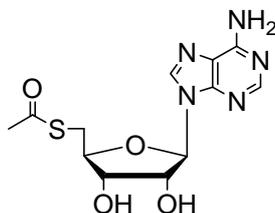
### 5'-S-alcanoylthio-5'-désoxyadénosine **38a-d**



### Méthode Générale

Les 5'-S-alcanoylthio-5'-désoxy-2',3'-O-isopropylidène adénosine **41** et **43a-c** sont introduites dans 15 mL d'une solution d'acide formique à 50 % dans l'eau à température ambiante. L'agitation est maintenue pendant 48 heures. Un contrôle CCM permet de suivre l'avancement de la réaction. Le solvant est alors évaporé, le résidu est repris plusieurs fois à l'éthanol afin d'enlever les dernières traces d'acide formique. Le produit est ensuite purifié sur résine hydrophobe HP20SS éluée par un gradient eau/méthanol : 40/60. Les fractions contenant le nucléoside (contrôle HPLC) sont rassemblées et le solvant est évaporé pour conduire aux thioesters **38a-d**.

### 5'-acétylthio-5'-désoxyadénosine 38a



**m** = 435 mg

**P.M.** = 325 g.mol<sup>-1</sup>

**F** = 56°C

**Rendement** = 97 %

#### HPLC :

Eluant : méthanol / eau : 70/30

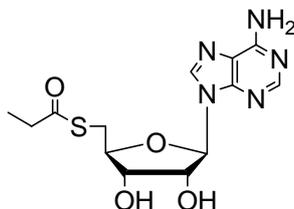
$t_R$  = 3,2 min

(spherisorb ODS2 25cm, diamètre = 4,6 mm, D = 0,8 mL/min)

#### R.M.N. <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) :

2,32 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3,20 (dd, 1H, H<sub>5'a</sub>,  $J_{gem} = 13,9$  Hz,  $J_{4',5'a} = 7,4$  Hz); 3,40 (dd, 1H, H<sub>5'b</sub>,  $J_{gem} = 13,9$  Hz,  $J_{4',5'b} = 5,6$  Hz); 3,95 (m, 1H, H<sub>4'</sub>); 4,15 (m, 1H, H<sub>3'</sub>); 4,80 (m, 1H, H<sub>2'</sub>); 5,90 (d, 1H, H<sub>1'</sub>,  $J_{1',2'} = 5,6$  Hz); 7,35 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 8,15 (s, 1H, H<sub>2</sub>); 8,35 (s, 1H, H<sub>8</sub>).

### 5'-désoxy-5'-S-propanoylthioadénosine 38b



**m** = 204 mg

**P.M.** = 339 g.mol<sup>-1</sup>

**F** = 60°C

**Rendement** = 57 %

**HPLC :**

Eluant : méthanol / eau : 70/30  $t_R = 3,6$  min  
 (spherisorb ODS2 25cm, diamètre = 4,6 mm, D = 0,8 mL/min)

**R.M.N.  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

1,10 (t, 3H,  $\text{CH}_3$  de Et,  $J = 7,6$  Hz) ; 2,60 (q, 2H,  $\text{CH}_2$  de Et,  $J = 7,6$  Hz) ; 3,15 (dd, 1H,  $\text{H}_{5a}'$ ,  $J_{\text{gem}} = 13,7$  Hz,  $J_{5'a,4'} = 7,3$  Hz) ; 3,40 (1H,  $\text{H}_{5b}'$ , sous le pic de l'eau) ; 3,90 (m, 1H,  $\text{H}_4'$ ) ; 4,10 (q, 1H,  $\text{H}_3'$ ,  $J_{\text{OH}} = J_{2',3'} = J_{3',4'} = 5,3$  Hz) ; 4,80 (q, 1H,  $\text{H}_2'$ ,  $J_{\text{OH}} = J_{1',2'} = J_{2',3'} = 5,3$  Hz) ; 5,40 (d, 1H,  $\text{OH}_{3'}$ ,  $J = 5,3$  Hz) ; 5,60 (d, 1H,  $\text{OH}_{2'}$ ,  $J = 5,3$  Hz) ; 5,90 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 5,3$  Hz) ; 7,35 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 8,15 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ) ; 8,40 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

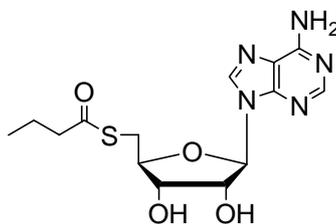
9,5 ( $\text{CH}_3$  de Et) ; 30,9 ( $\text{CH}_2$  de Et) ; 36,9 ( $\text{C}'_5$ ) ; 72,6 ( $\text{C}'_3$  et  $\text{C}'_4$ ) ; 83,0 ( $\text{C}'_2$ ) ; 87,6 ( $\text{C}'_1$ ) ; 119,2 ; 140,2 ; 149,5 ; 152,8 ; 156,0 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 199,3 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

$[\alpha]_D^{20} = -6,1^\circ$  ( $c = 0,392 \times 10^{-2}$  g.mL $^{-1}$ ; MeOH)

**IR**  $1650$  cm $^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ )

**Masse (DCI /  $\text{NH}_3$ )**  $m/z = 340$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ )

<b>Masse Exacte</b>	Théorique	340,107951
	Expérimentale	340,105159

**5'-S-butanoylthio-5'-désoxyadénosine 38c**

**m** = 146 mg

**P.M.** = 353 g.mol $^{-1}$

**F** = 92°C

**Rendement** = 63 %

**HPLC :**Eluant : méthanol / eau : 70/30  $t_R = 4,5$  min

(spherisorb ODS2 25cm, diamètre = 4,6 mm, D = 0,8 mL/min)

**R.M.N.  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

0,90 (t, 3H,  $\text{CH}_3$  de Pr,  $J = 7,2$  Hz) ; 1,60 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  de Pr) ; 2,60 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  de Pr,  $J = 7,2$  Hz) ; 3,20 (dd, 1H,  $\text{H}_{5a'}$ ,  $J_{\text{gem}} = 13,7$  Hz,  $J_{4',5'a} = 7,3$  Hz) ; 3,40 (1H,  $\text{H}_{5b'}$ , sous le pic de l'eau) ; 3,95 (m, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 4,10 (q, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{\text{OH}} = J_{2',3'} = J_{3',4'} = 5,3$  Hz) ; 4,80 (q, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{\text{OH}} = J_{1',2'} = J_{2',3'} = 5,3$  Hz) ; 5,40 (d, 1H,  $\text{OH}_{3'}$ ,  $J = 5,3$  Hz) ; 5,60 (d, 1H,  $\text{OH}_{2'}$ ,  $J = 5,3$  Hz) ; 5,90 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 5,3$  Hz) ; 7,85 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 8,20 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ) ; 8,40 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

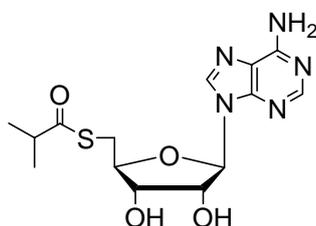
13,2 ( $\text{CH}_3$  de Pr) ; 18,6 ( $\text{CH}_2$  de Pr) ; 30,9 ( $\text{CH}_2$  de Pr) ; 45,1 ( $\text{C}'_5$ ) ; 72,5 ( $\text{C}'_4$ ) ; 72,6 ( $\text{C}'_3$ ) ; 82,9 ( $\text{C}'_2$ ) ; 87,5 ( $\text{C}'_1$ ) ; 119,2 ; 139,9 ; 149,4 ; 152,6 ; 156,0 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 198,2 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

$[\alpha]_D^{20} = -1,5^\circ$  ( $c = 1,036 \times 10^{-2}$  g.mL $^{-1}$ ; MeOH)

**IR**  $1650$  cm $^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ )

**Masse (DCI /  $\text{NH}_3$ )**  $m/z = 354$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ )

<b>Masse Exacte</b>	Théorique	354,123601
	Expérimentale	354,122433

**5'-désoxy-5'-S-(2-méthylpropanoylthio)adénosine 38d**

**m** = 193 mg

**P.M.** = 353 g.mol $^{-1}$

**F** = 55°C

**Rendement** = 73 %

**HPLC:**

Eluant : méthanol / eau : 70/30  $t_R = 4,9$  min

(spherisorb ODS2 25cm, diamètre = 4,6 mm, D = 0,8 mL/min)

**R.M.N.  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

1,12 (d, 6H, 2 CH<sub>3</sub>, J = 6,9 Hz) ; 2,77 (m, 1H, CH) ; 3,15 (dd, 1H, H<sub>5a'</sub>, J<sub>gem</sub> = 14,1 Hz, J<sub>5'a,4'</sub> = 7,6 Hz) ; 3,40 (1H, H<sub>5b'</sub>, sous l'eau) ; 3,90 (m, 1H, H<sub>4'</sub>) ; 4,10 (q, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>OH</sub> = J<sub>2',3'</sub> = J<sub>3',4'</sub> = 5,3 Hz) ; 4,80 (q, 1H, H<sub>2'</sub>, J<sub>OH</sub> = J<sub>1',2'</sub> = J<sub>2',3'</sub> = 5,3 Hz) ; 5,40 (d, 1H, OH<sub>3'</sub>, J = 5,3 Hz) ; 5,60 (d, 1H, OH<sub>2'</sub>, J = 5,3 Hz) ; 5,90 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 5,3 Hz) ; 7,35 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 8,20 (s, 1H, H<sub>8</sub>) ; 8,40 (s, 1H, H<sub>2</sub>).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

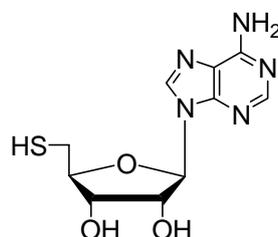
19,0 (2 CH<sub>3</sub>) ; 30,6 (C'<sub>5</sub>) ; 42,3 (CH) ; 72,5 (C'<sub>3</sub> et C'<sub>4</sub>) ; 82,8 (C'<sub>2</sub>) ; 87,5 (C'<sub>1</sub>) ; 119,2 ; 140,0 ; 149,4 ; 152,5 ; 156,0 (C<sub>base</sub>) ; 202,6 (C=O).

$[\alpha]_D^{20} = -0,4^\circ$  (c = 1,466 x 10<sup>-2</sup> g.mL<sup>-1</sup> ; MeOH)

**IR** 1650 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**Masse (DCI / NH<sub>3</sub>)** m/z = 354 (M+H)<sup>+</sup>

<b>Masse Exacte</b>	Théorique	354,123601
	Expérimentale	354,121755

**5'-désoxy-5'-thioadénosine 35**

**P.M.** = 283 g.mol<sup>-1</sup>

28 mL d'un mélange méthanol / eau : 5 / 2 est soniqué à 0°C pendant une heure sous un barbotage d'argon. On fait alors barboter de l'ammoniac gazeux pendant 15 minutes. 180 mg (0,55 mmole) de 5'-acétylthio-5'-désoxyadénosine sont additionnés toujours à 0°C. La solution est mise sous agitation et sous barbotage d'ammoniac à 0°C jusqu'à hydrolyse totale du thioester (1 heure, contrôle par CCM). L'ammoniac en excès et le méthanol sont alors éliminés à l'évaporateur rotatif puis le résidu est lyophilisé pour donner 155 mg d'un solide blanc conservé sous argon. La pureté du produit est contrôlée par HPLC.

**Rendement** = quantitatif

**HPLC :**

Eluant : Méthanol / Eau : 40 / 60  $t_R = 5,7$  min

(Spherisorb ODS 2 25cm, diamètre = 4,6 mm, 0,8 mL/min)

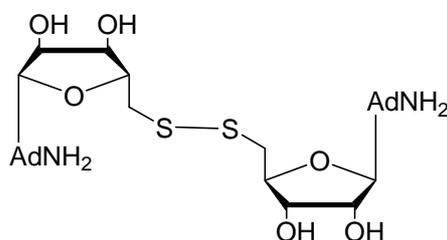
**R.M.N.  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

2,70-3,0 (m, 2H,  $2\text{H}_5'$ ), 3,95 (m, 1H,  $\text{H}_4'$ ); 4,20 (m, 1H,  $\text{H}_3'$ ); 4,80 (m, 1H,  $\text{H}_2'$ ); 5,90 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 6,1$  Hz); 7,35 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 8,15 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ); 8,40 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ).

**Masse (DCI /  $\text{NH}_3$ )**  $m/z = 284$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

<b>Masse Exacte</b>	Théorique	284,081736
	Expérimentale	284,081671

### **bis(5'-désoxy-5'-thioadénosyl)disulfure 37**



**P.M.** = 564 g.mol<sup>-1</sup>

La 5'-désoxy-5'-thioadénosine préparée précédemment est reprise dans 20 mL de méthanol et une solution de diiode dans le méthanol ( $c = 0,1 \text{ M}$ ) est alors ajoutée goutte à goutte jusqu'à persistance d'une coloration jaune. La solution est alors neutralisée par  $\text{NaHCO}_3$  solide (disparition de la coloration) puis évaporée. Le disulfure formé est précipité par addition d'eau puis laissé à froid pendant une nuit. Le solide est recueilli par filtration, rincé à l'eau et séché sous vide sur  $\text{P}_2\text{O}_5$  pour donner 127 mg d'un solide blanc.

**Rendement** = 37 % en deux étapes

**F** =  $160^\circ\text{C}$  (Litt<sup>[101]</sup> :  $164\text{-}166^\circ\text{C}$ )

### HPLC :

Eluant : Méthanol / Eau : 40 / 60

$t_R = 10,8 \text{ min}$

(Spherisorb ODS 2 25cm, diamètre = 4,6 mm, 0,8 mL/min)

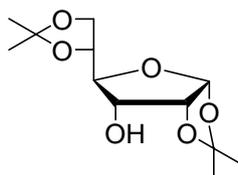
### R.M.N. $^1\text{H}$ (DMSO- $d_6$ ) :

3,15 (dd, 2H,  $\text{H}_{5'a}$ ,  $J_{\text{gem}} = 14,0 \text{ Hz}$ ,  $J_{4',5'a} = 7,4 \text{ Hz}$ ); 3,23 (dd, 2H,  $\text{H}_{5'b}$ ,  $J_{\text{gem}} = 14,0 \text{ Hz}$ ,  $J_{4',5'b} = 5,7 \text{ Hz}$ ) ; 4,20 (m, 4H,  $\text{H}_{3'}$  et  $\text{H}_{4'}$ ) ; 4,85 (dd, 2H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{1',2'} = 5,9 \text{ Hz}$ ,  $J_{2',3'} = 11,1 \text{ Hz}$ ) ; 5,47 (d, 2H,  $\text{OH}_{3'}$ ,  $J_{3',\text{OH}} = 4,8 \text{ Hz}$ ) ; 5,60 (d, 2H,  $\text{OH}_{2'}$ ,  $J_{2',\text{OH}} = 6,1 \text{ Hz}$ ) ; 5,95 (d, 2H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 6,0 \text{ Hz}$ ); 7,35 (s, 4H,  $\text{NH}_2$ ); 8,20 (s, 2H,  $\text{H}_2$ ); 8,40 (s, 2H,  $\text{H}_8$ ).

### R.M.N. $^{13}\text{C}$ (DMSO- $d_6$ ) :

41,0 ( $\text{C}_{5'}$ ) ; 72,6 ( $\text{C}_{2'}$  et  $\text{C}_{3'}$ ) ; 82,6 ( $\text{C}_{4'}$ ) ; 87,4 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 119,2 ; 140,0; 149,4 ; 152,7; 156,0 (C de la base).

## 1,2-5,6-di-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-allofuranose 45



**P.M.** =  $260 \text{ g.mol}^{-1}$

15 g (57,6 mmoles) de diacétone-D-glucose sont mis en solution dans 180 mL de dichlorométhane et portés à reflux. 20 mL (211 mmoles, 3,6 eq.) d'anhydride acétique sont introduits, puis 22 g (58 mmoles, 1eq.) de dichromate de pyridinium sont ajoutés en plusieurs fois. Après 2h30 de chauffage à reflux, la solution est déposée sur silice afin d'éliminer les sels de chrome, le produit est élué à l'acétate d'éthyle. L'huile ainsi obtenue (15 g) après évaporation est utilisée sans purification pour la suite de la synthèse.

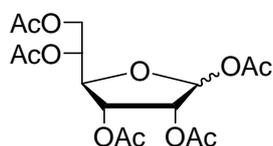
Dans 100 mL d'éthanol absolu, on ajoute successivement à froid 15 g de 1,2-5,6-di-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofurano-3-ulose (58,1 mmoles) puis 3,2 g de borohydrure de sodium (84,2 mmoles). Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 heures. L'excès de borohydrure de sodium est neutralisé par addition goutte à goutte d'acide acétique à 50 %, puis la solution est évaporée à sec et le résidu est repris au chloroforme. La phase organique est lavée par une solution saturée de chlorure de sodium et séchée sur sulfate de magnésium. Après évaporation du solvant, on récupère 12,5 g d'une huile légèrement jaune.

**Rendement** = 83 %

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

1,35 (s, 6H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 1,45 et 1,55 (2s, 2 x 3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 3,8 (dd, 1H,  $\text{H}_3$ ,  $J_{2,3} = 4,8$  Hz,  $J_{3,4} = 8,4$  Hz) ; 4,05 (m, 3H,  $\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_6$ ) ; 4,3 (dt, 1H,  $\text{H}_5$ ,  $J_{4,5} = 6,0$  Hz,  $J_{5,6} = 6,0$  Hz) ; 4,6 (dd, 1H,  $\text{H}_2$ ,  $J_{1,2} = 4,0$  Hz,  $J_{2,3} = 4,8$  Hz) ; 5,8 (d, 1H,  $\text{H}_1$ ,  $J_{1,2} = 4,0$  Hz).

### 1, 2, 3, 5, 6-penta-*O*-acétyl-D-allofuranose 46



**P.M.** = 390  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

A 10,5 g (40mmoles) de 1,2-5,6-di-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-allofuranose dans 210 mL d'acide acétique sont ajoutés 44,2 mL (400 mmoles, 10 éq.) d'anhydride acétique et 228 mg (12

mmoles, 0,3 éq.) d'acide para-toluène sulfonique. Le mélange est chauffé pendant une nuit à 110°C puis l'acide acétique est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris à l'acétate d'éthyle et lavé avec une solution saturée de carbonate de sodium. La phase organique est séchée avec du sulfate de magnésium. Les deux épimères sont obtenus dans un rapport  $\alpha/\beta = 3/7$  (RMN  $^1\text{H}$ ), non séparés pour la suite de la synthèse, et sont purifiés par chromatographie éclair sur silice (AE/EP : 60/40) pour donner 11,5 g d'une huile légèrement jaune.

**Rendement** = 79 %

**CCM :**

Eluant : Acétate d'éthyle / EP : 60/40

$R_f(\alpha) = 0,7$

$R_f(\beta) = 0,6$

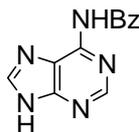
**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), épimère  $\alpha$  :**

2,04 ; 2,05 ; 2,08 ; 2,09 et 2,10 (5s, 5 x 3H, OAc) ; 4,1 (dd, 1H,  $\text{H}_{6a}$ ,  $J_{5,6a} = 5,7$  Hz ;  $J_{6a,6b} = 12,2$  Hz) ; 4,3 (dd, 1H,  $\text{H}_4$ ,  $J_{4,5} = 6,1$  Hz,  $J_{3,4} = 6,5$  Hz) ; 4,4 (dd, 1H,  $\text{H}_{6b}$ ,  $J_{5,6b} = 3,5$  Hz,  $J_{6a,6b} = 12,2$  Hz) ; 5,2 (td, 1H,  $\text{H}_5$ ,  $J_{4,5} = 6,1$  Hz,  $J_{5,6a} = 5,7$  Hz,  $J_{5,6b} = 3,5$  Hz) ; 5,3 (d, 1H,  $\text{H}_2$ ,  $J_{2,3} = 4,9$  Hz) ; 5,5 (dd, 1H,  $\text{H}_3$ ,  $J_{2,3} = 4,9$  Hz,  $J_{3,4} = 6,5$  Hz) ; 6,15 (s, 1H,  $\text{H}_1$ ).

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), épimère  $\beta$  :**

2,04 ; 2,05 ; 2,08 ; 2,09 et 2,10 (5s, 5 x 3H, OAc) ; 4,1 (dd, 1H,  $\text{H}_{6a}$ ,  $J_{5,6a} = 5,7$  Hz ;  $J_{6a,6b} = 12,2$  Hz) ; 4,4 (m, 2H,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_6$ ) ; 5,2 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_5$ ) ; 5,5 (dd, 1H,  $\text{H}_3$ ,  $J = 3,0$  Hz,  $J = 6,5$  Hz) ; 6,4 (d, 1H,  $\text{H}_1$ ,  $J_{1,2} = 4,6$  Hz).

### **N<sup>6</sup>-benzoyl adénine 49**



**P.M.** = 239 g.mol<sup>-1</sup>

10 g d'adénine (74 mmoles) sont mis en suspension dans 25 mL de pyridine. Cette suspension est portée à reflux pendant 2 heures après ajout de 22 mL de chlorure de benzoyle (190 mmoles, 2,5 éq.). La gomme obtenue est traitée avec une solution saturée chaude de bicarbonate de sodium puis du chloroforme est ajouté lentement. Les deux phases sont décantées. La cristallisation se produit rapidement à l'interface. Les cristaux (10,9 g) sont récupérés par filtration et lavés à l'eau et au chloroforme.

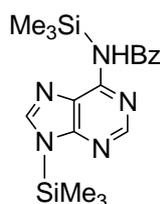
**Rendement** = 65 %

F = 235°C (Litt<sup>[129]</sup> : 242-244°C)

**R.M.N. <sup>1</sup>H (DMSO-d<sup>6</sup>) :**

7,6 (m, 3H, Ar) ; 8,1 (d, 2H, J = 6 Hz) ; 8,5 (s, 1H, H<sub>8</sub>) ; 8,8 (s, 1H, H<sub>2</sub>).

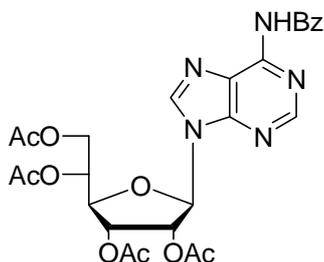
### **N<sup>6</sup>-benzoyl-N<sup>9</sup>-bis(triméthylsilyl) adénine 50**



**P.M.** = 332 g.mol<sup>-1</sup>

Sous atmosphère inerte (argon), 1,4 g (5,85 mmoles) de N<sup>6</sup>-benzoyl adénine sont mis en suspension dans une solution contenant 30 mL d'hexaméthylsilylazane (HMDS), 3,4 mL de pyridine et 1,8 mL de chlorure de triméthylsilyle. La solution est agitée et chauffée au reflux du HMDS (125°C) jusqu'à homogénéité de la solution (4 heures). Une colonne à distiller est adaptée et le HMDS est distillé sous pression réduite puis codistillé avec du toluène. Le dérivé silylé correspondant est alors immédiatement utilisé dans la réaction de couplage (couplage de Vorbrüggen) avec le sucre acétylé.

## **N<sup>6</sup>-benzoyl-9-(2',3',5',6'-penta-*O*-acétyl-β-D-allofuranosyl)adénine 47**



**P.M.** = 569 g.mol<sup>-1</sup>

Sous atmosphère inerte, 1,6 g de 1, 2, 3, 5, 6-penta-*O*-acétyl-*D*-allofuranose (mélange de  $\alpha$  et de  $\beta$ , 4,08 mmoles) dans 10 ml de 1,2-dichloroéthane sont ajoutés, sous agitation constante, à la N<sup>6</sup>-benzoyl-N<sup>6</sup>,N<sup>9</sup>-bis(triméthylsilyl)adénine (8,4 mmoles, 2 éq.) préparée précédemment en solution dans 30 mL de 1,2-dichloroéthane. 1,9 mL de tétrachlorure d'étain (16,32 mmoles, 4 éq.) sont additionnés. La solution est agitée à température ambiante pendant une nuit. Le résidu est extrait au chloroforme puis neutralisé et lavé avec une solution saturée en bicarbonate de sodium. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur silice (AE). On obtient ainsi 3,5g d'une huile légèrement jaune.

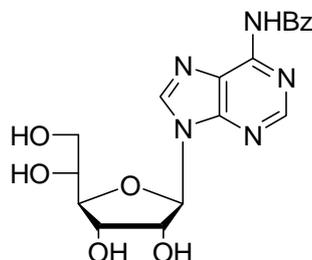
**Rendement** = 65 %

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

2,03 ; 2,06 ; 2,13 ; 2,16 (4s, 4x3H, OAc) ; 4,1 (dd, 1H, H<sub>5',6'b</sub> = 5Hz, J<sub>6'a,6'b</sub> = 12,2 Hz) ; 4,4 (dd, 1H, H<sub>4'</sub>, J<sub>3',4'</sub> = 3,2 Hz, J<sub>4',5'</sub> = 5,3 Hz) ; 4,5 (dd, 1H, H<sub>6'a</sub>, J<sub>5',6'a</sub> = 3,8 Hz, J<sub>6'a,6'b</sub> = 12,2 Hz) ; 5,5 (m, 1H, H<sub>5'</sub>) ; 5,8 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>2',3'</sub> = 6,5 Hz, J<sub>3',4'</sub> = 3,2 Hz) ; 6,1 (m, 2H, H<sub>1'</sub> et H<sub>2'</sub>) ; 7,5 -8,0 (m, 5H, Ar) ; 8,1 et 8,7 (2s, 2x1H, H<sub>2</sub> et H<sub>8</sub>).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) :**

20,3 ; 20,6 ; 20,8 et 21,0 (Me de OAc), 61,8 (C<sub>6'</sub>) ; 70,5 (C<sub>4'</sub>) ; 71,8 (C<sub>3'</sub>) ; 77,2 (C<sub>5'</sub>) ; 81,3 (C<sub>2'</sub>) ; 86,1 (C<sub>1'</sub>) ; 127,5 (C<sub>5</sub>) ; 128,5 ; 132,4 et 133,5 (Bz) ; 141,7 (C<sub>6</sub>) ; 149,8 (C<sub>8</sub>) ; 151,5 (C<sub>2</sub>) ; 152,9 (C<sub>4</sub>) ; 164,5 (C=O du Bz) ; 169,1 ; 169,3 ; 169,8 et 170,4 (C=O de OAc).

Masse (DCI / NH<sub>3</sub>)m/z = 570 (M+H)<sup>+</sup>**N<sup>6</sup>-benzoyl-9-(β-D-allofuranosyl)adénine 48****P.M.** = 401 g.mol<sup>-1</sup>

3,6 g de N<sup>6</sup>-benzoyl-9-(2',3',5',6'-penta-*O*-acétyl-β-D-allofuranosyl)adénine (6,5 mmoles) sont mis en solution dans un mélange de 15 mL d'éthanol et de 8,5 mL de soude 2M (17 mmoles, 2,6 éq.). Après 15 minutes d'agitation à température ambiante, la solution est neutralisée par de l'acide chlorhydrique 1M. L'éthanol est évaporé sous pression réduite puis quelques mL d'eau sont additionnés. Après une nuit le produit cristallise. Il est filtré et séché sous vide. On obtient ainsi 1,7 g d'un solide blanc.

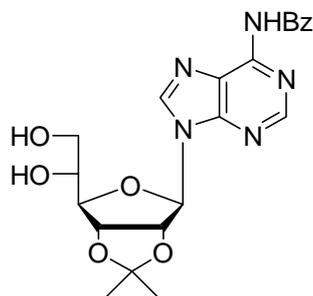
**Rendement** = 92 %**F** = 158°C**R.M.N. <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) :**

3,4 (m, 2H, H<sub>6'a</sub>, H<sub>6'b</sub>); 3,8 (pic large, 1H, H<sub>5'</sub>); 4,0 (pic large, 1H, H<sub>4'</sub>); 4,2 (pic large, 1H, H<sub>3'</sub>); 4,7 (pic large, 1H, H<sub>2'</sub>); 6,0 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 7,2 Hz); 7,5 – 8,0 (m, 5H, Ar); 8,7 et 8,8 (2s, 2x1H, H<sub>2</sub> et H<sub>8</sub>).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) :**

62,5 (C<sub>6'</sub>) ; 69,6 (C<sub>3'</sub>) ; 71,7 (C<sub>4'</sub>) ; 73,7 (C<sub>5'</sub>) ; 86,3 (C<sub>2'</sub>) ; 87,1 (C<sub>1'</sub>) ; 125,9 (C<sub>5</sub>) ; 128,5 ; 132,4 et 133,5 (Bz) ; 143,2 (C<sub>6</sub>) ; 150,6 (C<sub>8</sub>) ; 151,5 (C<sub>2</sub>) ; 152,2 (C<sub>4</sub>) ; 165,8 (C=O du Bz).

**N<sup>6</sup>-benzoyl-9-(2',3'-*O*-isopropylidène-β-D-allofuranosyl)adénine 52**



**P.M.** = 441 g.mol<sup>-1</sup>

300 mg de N<sup>6</sup>-benzoyl-9-(β-D-allofuranosyl)adénine (2,1 mmoles) sont mis en suspension dans 10 mL d'acétone puis 1 mL de diméthoxypropane (21 mmoles, 10 éq.) et 43 mg d'acide paratoluène sulfonique (0,22 mmole, 0,3 éq.) sont additionnés. La solution devient homogène au bout de 15 minutes. Au bout de 5 heures d'agitation à température ambiante, le mélange est évaporé sous pression réduite puis extrait à l'acétate d'éthyle et à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée sous pression réduite.

Les 350 mg de N<sup>6</sup>-benzoyl-9-(2',3',5',6'-di-*O*-isopropylidène-β-D-allofuranosyl)adénine (1,7 mmoles) obtenus sont mis en solution dans 20 mL d'un mélange d'acide acétique / eau (7/3). Après 48 heures, la solution est neutralisée par une solution de soude 2M. Le produit est extrait au chloroforme et avec une solution saturée en bicarbonate de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair sur silice (AE / Méthanol : 90/10) conduisant à 220 mg d'une huile très visqueuse.

**Rendement** = 67 % en deux étapes

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

1,4 (s, 3H, CMe<sub>2</sub>); 1,6 (s, 3H, CMe<sub>2</sub>); 3,5 (dd, 1H, H<sub>6'a</sub>, J<sub>5',6'a</sub> = 11,4 Hz, J<sub>6'a,6'b</sub> = 6,1 Hz); 3,6 (dd, 1H, H<sub>6'b</sub>, J<sub>5',6'b</sub> = 11,4 Hz, J<sub>6'a,6'b</sub> = 6,1 Hz); 3,8 (dt, 1H, H<sub>5'</sub>, J<sub>5',6'</sub> = 6,1 Hz, J<sub>4',5'</sub> = 5,0 Hz); 4,3 (dd, 1H, H<sub>4'</sub>, J<sub>3',4'</sub> = 2,7 Hz, J<sub>4',5'</sub> = 5,0 Hz); 5,2 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>2',3'</sub> = 6,5 Hz, J<sub>3',4'</sub> = 2,7

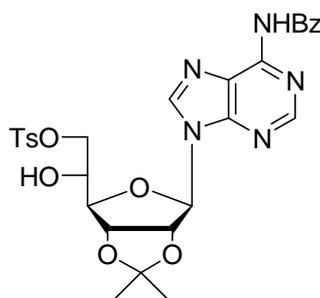
Hz) ; 5,4 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,7 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 6,5 Hz) ; 6,2 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,7 Hz) ; 7,8 et 8,0 (m, 5H, Ar) ; 8,3 et 8,8 (2s, 2x1H, H<sub>8</sub> et H<sub>2</sub>).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) :**

25,1 ; 27,2 (2C, Me de CMe<sub>2</sub>) ; 62,8 (C<sub>6'</sub>) ; 71,9 (C<sub>3'</sub>) ; 80,2 (C<sub>5'</sub>) ; 83,6 (C<sub>4'</sub>) ; 87,5 (C<sub>2'</sub>) ; 92,7 (C<sub>1'</sub>) ; 114,5 (C de CMe<sub>2</sub>) ; 123,6 (C<sub>5</sub>) ; 128,0 ; 128,7 et 132,8 (Ar de Bz) ; 134,1 (C<sub>6</sub>) ; 142,4 (C<sub>8</sub>) ; 151,4 (C<sub>2</sub>) ; 152,3 (C<sub>4</sub>) ; 165,3 (C=O du Bz).

**N<sup>6</sup>-benzoyl-9-(2',3'-O-isopropylidène-6'-O-tosyl-β-D-allofuranosyl)adénine**

**53**



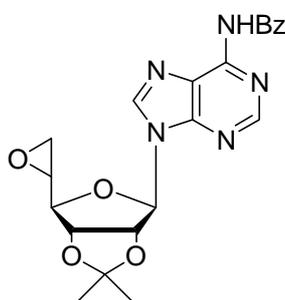
**P.M. = 595 g.mol<sup>-1</sup>**

1,5 g de N<sup>6</sup>-benzoyl-9-(2',3'-O-isopropylidène-β-D-allofuranosyl)adénine (3,4 mmoles) sont mis en solution dans 40 mL de pyridine et refroidit à -20°C sous argon. 1,03 g de chlorure de tosylate (5,44 mmoles, 1,6 éq.) sont additionnés. Le mélange est laissé à température ambiante et sous agitation pendant 48 heures. L'extraction se fait à l'aide de chloroforme et d'eau puis la phase organique est lavée par une solution 2M d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> afin d'éliminer toutes traces de pyridine. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur silice (AE / Méthanol : 90/10). On obtient une huile (1,15 g) dont la pureté et l'homogénéité sont contrôlées par RMN.

**Rendement = 60 %**

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

1,3 (s, 3H,  $\text{CMe}_2$ ); 1,5 (s, 3H,  $\text{CMe}_2$ ); 2,4 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  de Ts); 4,1 (m, 3H,  $2\text{H}_{6'}$  et  $\text{H}_{4'}$ ); 4,4 (s large, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ); 5,0 (d, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = 6,1$  Hz); 5,1 (dd, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{1',2'} = 3,0$  Hz,  $J_{2',3'} = 6,1$  Hz); 5,9 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 3$  Hz); 7,5 et 8,1 (m, 5H, Ar du Bz); 7,7 et 8,0 (d, 2x2H, H du Ts); 8,3 et 8,8 (2s, 2H,  $\text{H}_8$  et  $\text{H}_2$ ).

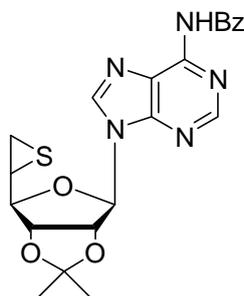
**(5'S)-N<sup>6</sup>-benzoyl-5'-désoxy-5'-époxy-2',3'-O-isopropylidène adénosine 54**

**P.M.** =  $423 \text{ g.mol}^{-1}$

Sous atmosphère inerte, et à température ambiante, 1,15 g de N<sup>6</sup>-benzoyl-9-(2',3'-O-isopropylidène-6'-O-tosyl- $\beta$ -D-allofuranosyl)adénine (1,93 mmoles) sont mis en solution dans 60 mL de THF anhydre. 116 mg de NaH (60% dans l'huile minérale, 2,9 mmoles, 1,5 éq.) sont ensuite additionnés. Après 4 heures, quelques gouttes d'eau sont ajoutées afin d'hydrolyser le milieu lequel est ensuite évaporé sous pression réduite, extrait au chloroforme et lavé par une solution saturée en bicarbonate de sodium. L'époxyde formé (800 mg) est alors utilisé tel quel pour la suite de la synthèse.

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

1,40 et 1,60 (2s, 2x3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 2,65 (dd, 1H,  $\text{H}_{6'a}$ ,  $J_{5',6'a} = 3,0$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 4,0$  Hz); 2,82 (dd, 1H,  $\text{H}_{6'b}$ ,  $J_{5',6'b} = J_{6'a,6'b} = 4,0$  Hz); 3,25 (dt, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ,  $J_{4',5'} = 4,0$  Hz,  $J_{5',6'} = 3,0$  Hz); 4,35 (dd, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ,  $J_{3',4'} = J_{4',5'} = 4,0$  Hz) ; 4,95 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = 6,0$  Hz,  $J_{3',4'} = 4,0$  Hz) ; 5,45 (dd, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{1',2'} = 2,0$  Hz,  $J_{2',3'} = 6,0$  Hz) ; 6,3 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 2,0$  Hz) ; 7,5 – 8,0 (m, 5H, Ar) ; 8,3 et 8,8 (2s, 2x1H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

**(5'R)-N<sup>6</sup>-benzoyl-5'-désoxy-5'-épithio-2',3'-O-isopropylidène adénosine 55**

**P.M.** = 439 g.mol<sup>-1</sup>

La (5'S)-N<sup>6</sup>-benzoyl-5'-désoxy-5'-époxy-2',3'-O-isopropylidène adénosine préparée précédemment (800 mg) est reprise directement dans 25 mL de méthanol absolu. Sous agitation et température ambiante, 231 mg de thiourée (3mmoles, 1,6 éq.) sont additionnés. Après une nuit, le méthanol est évaporé sous pression réduite et le résidu extrait au chloroforme et lavé à l'eau. Une purification par chromatographie éclair sur silice (AE / EP : 80/20) fourni 455 mg de l'épisulfure 55 sous forme d'une huile.

**Rendement** = 55 %

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

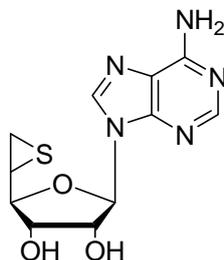
1,40 et 1,60 (2s, 2x3H, CMe<sub>2</sub>) ; 2,40 (dd, 1H, H<sub>6'a</sub>, J<sub>5',6'a</sub> = 5,3 Hz, J<sub>6'a,6'b</sub> = 1,5 Hz) ; 2,50 (dd, 1H, H<sub>6'b</sub>, J<sub>5',6'b</sub> = 6,5 Hz, J<sub>6'a,6'b</sub> = 1,5 Hz) ; 3,20 (m, 1H, H<sub>5'</sub>) ; 4,10 (dd, 1H, H<sub>4'</sub>, J<sub>3',4'</sub> = 3,4 Hz, J<sub>4',5'</sub> = 7,2 Hz) ; 5,10 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>2',3'</sub> = 6,0 Hz, J<sub>3',4'</sub> = 3,4 Hz) ; 5,40 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,3 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 6,0 Hz) ; 6,2 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,3 Hz) ; 7,5 – 8,0 (m, 5H, Ar) ; 8,3 et 8,8 (2s, 2H, H<sub>2</sub> et H<sub>8</sub>).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) :**

23,1 (C<sub>6'</sub>) ; 25,4 et 27,1 (2C, Me de CMe<sub>2</sub>) ; 35,0 (C<sub>5'</sub>) ; 77,1 (C<sub>3'</sub>) ; 83,8 (C<sub>2'</sub>) ; 84,4 (C<sub>4'</sub>) ; 90,4 (C<sub>1'</sub>) ; 114,8 (C de CMe<sub>2</sub>) ; 123,5 (C<sub>5</sub>) ; 127,8 ; 128,8 ; 132,9 (Ar de Bz) ; 133,5 (C<sub>6</sub>) ; 142,0 (C<sub>8</sub>) ; 149,7 (C<sub>2</sub>) ; 152,8 (C<sub>4</sub>) ; 164,5 (C=O de Bz).

**Masse (DCI / NH<sub>3</sub>)**

m/z = 440 (M+H)<sup>+</sup>

**(5'R)-5'-désoxy-5'-épithio adénosine 39a**

**P.M.** = 295g.mol<sup>-1</sup>

422 mg de (5'R)-N<sup>6</sup>-benzoyl-5'-désoxy-5'-épithio-2',3'-*O*-isopropylidène adénosine (1,04 mmoles) sont mis en solution dans 10 mL d'acide formique à 80% et après environ 12 heures d'agitation à température ambiante, l'acide formique est évaporé sous pression réduite. Après addition de quelques gouttes d'eau, le produit brut (300 mg) est lyophilisé puis repris dans 20 mL de méthanol. 81 mg de MeONa (1,5 mmoles, 2 équ.) sont ajoutés. Après 12 heures d'agitation, le milieu est neutralisé par addition d'HCl 1M. Le méthanol est évaporé sous pression réduite et le résidu brut est purifié sur résine hydrophobe HP20SS éluée avec un mélange MeOH/Eau : 60/40. Les fractions contenant le nucléoside sont rassemblées après analyse HPLC, évaporées puis lyophilisées. On obtient de cette façon 80 mg d'un solide blanc.

**Rendement** = 50 %

**HPLC :**

Eluant : Méthanol / Eau : 40 / 60  $t_R = 3,7$  min

(Spherisorb ODS 2 25cm, diamètre = 4,6 mm, 0,8 mL/min)

**R.M.N. <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) :**

2,40 (d, 1H, H<sub>6'a</sub>, J<sub>5',6'a</sub> = 5,7 Hz) ; 2,62 (d, 1H, H<sub>6'b</sub>, J<sub>5',6'b</sub> = 5,7 Hz); 3,40 (dd, 1H, H<sub>5'</sub>, J<sub>4',5'</sub> = 8,0 Hz, J<sub>5',6'</sub> = 5,7 Hz); 3,50 (dd, 1H, H<sub>4'</sub>, J<sub>3',4'</sub> = 5,0 Hz, J<sub>4',5'</sub> = 8,0 Hz) ; 4,35 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>2',3'</sub> = 10,0 Hz, J<sub>3',4'</sub> = 5,0 Hz) ; 4,75 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 5,0 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 10,0 Hz) ; 5,9 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 5,0 Hz) ; 8,20 et 8,35 (2s, 2x1H, H<sub>2</sub> et H<sub>8</sub>).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

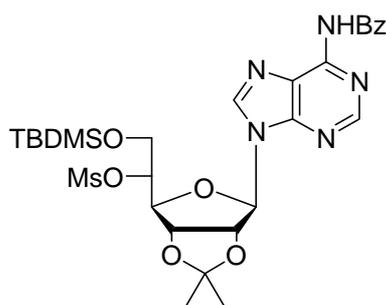
21,7 ( $\text{C}_6'$ ); 36,2 ( $\text{C}_5'$ ); 73,5 ( $\text{C}_4'$ ); 79,2 ( $\text{C}_3'$ ); 87,5 ( $\text{C}_2'$ ); 88,1 ( $\text{C}_1'$ ); 119,2 ( $\text{C}_5$ ); 139,7 ( $\text{C}_6$ ); 149,4 ( $\text{C}_8$ ); 152,8 ( $\text{C}_2$ ); 156,1 ( $\text{C}_4$ ).

$[\alpha]_D^{20} = +22,5^\circ$  ( $c = 6.10^{-3} \text{ g.mL}^{-1}$ ;  $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} : 4/1$ )

**Masse (DCI /  $\text{NH}_3$ )**  $m/z = 296 (\text{M}+\text{H})^+$

<b>Masse Exacte</b>	Théorique	296,081736
	Expérimentale	296,078404

**$\text{N}^6$ -benzoyl-9-(2',3'-*O*-isopropylidène-5'-*O*-mésyl-6'-*O*-  
tertiobutyldiméthylsilyl- $\beta$ -D-allofuranosyl)adénine 56**



**P.M.** =  $633 \text{ g.mol}^{-1}$

Sous argon, 1,4 g (3,17 mmoles) de  $\text{N}^6$ -benzoyl-9-(2',3'-*O*-isopropylidène- $\beta$ -D-allofuranosyl)adénine sont mis en solution dans 35 mL de dichlorométhane. 539 mg (7,9 mmoles, 2,5 équ.) d'imidazole, puis 570 mg (3,8 mmoles, 1,2 équ.) de chlorure de tertibutyldiméthylsilyle sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 1 heure, la solution est diluée au chloroforme puis lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  puis évaporée. Le nucléoside silylé résultant (1,76 g) est utilisé sans purification dans la suite de la synthèse.

1,76 g du brut de  $\text{N}^6$ -benzoyl-9-(2',3'-*O*-isopropylidène-6'-*O*-tertiobutyldiméthylsilyl- $\beta$ -D-allofuranosyl)adénine sont mis en solution dans 35 mL de pyridine. Le milieu réactionnel est

refroidi sous argon à 0°C. 662  $\mu\text{L}$  (7,9 mmoles, 2,5  $\text{eq.}$ ) de chlorure de mésyle est ajouté lentement à la solution. La réaction se poursuit une heure à température ambiante, la pyridine est coévaporée avec du toluène et le résidu est repris par 50 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  puis concentrée. Le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur silice (acétate d'éthyle / éther de pétrole : 80/20) pour conduire au dérivé **56** (854 mg) sous forme d'huile.

**Rendement** = 46 % en deux étapes

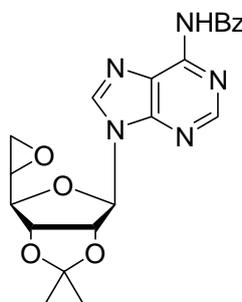
**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

0,10 (s, 2x3H,  $\text{CH}_3$  du Si) ; 0,80 (s, 9H, tBu du Si) ; 1,40 (s, 3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 1,60 (s, 3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 3,00 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  du Ms) ; 3,75 (dd, 1H,  $\text{H}_{6'a}$ ,  $J_{5',6'a} = 4,0$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 9,9$  Hz) ; 3,90 (dd, 1H,  $\text{H}_{6'b}$ ,  $J_{5',6'b} = 4,0$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 9,9$  Hz) ; 4,40 (dd, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ,  $J_{3',4'} = 3,5$  Hz,  $J_{4',5'} = 5,7$  Hz) ; 5,00 (dt, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ,  $J_{4',5'} = 5,7$  Hz,  $J_{5',6'} = 4,0$  Hz) ; 5,30 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = 6,1$  Hz,  $J_{3',4'} = 3,5$  Hz) ; 5,90 (dd, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{1',2'} = 2,7$  Hz,  $J_{2',3'} = 6,1$  Hz) ; 6,20 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 2,7$  Hz) ; 7,50 – 8,10 (m, 5H, Ar) ; 8,20 et 8,85 (2s, 2H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

-5,8 et -5,6 (C de  $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; 14,1 (C de tBuSi) ; 18,1 ; 20,9 et 25,3 (C de  $\text{CH}_3$  de tBu) ; 25,6 et 27,2 (2C, Me de  $\text{CMe}_2$ ) ; 38,6 ( $\text{CH}_3$  de Ms) ; 60,3 ( $\text{C}_{6'}$ ) ; 62,2 ( $\text{C}_{5'}$ ) ; 80,2 ( $\text{C}_{4'}$ ) ; 83,4 ( $\text{C}_{3'}$ ) ; 84,0 ( $\text{C}_{2'}$ ) ; 90,0 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 115,1 (C de  $\text{CMe}_2$ ) ; 123,5 ( $\text{C}_5$ ) ; 127,8 ; 128,7 ; 132,8 (Ar du Bz) ; 133,5 ( $\text{C}_6$ ) ; 142,4 ( $\text{C}_8$ ) ; 151,2 ( $\text{C}_2$ ) ; 152,8 ( $\text{C}_4$ ) ; 164,7 (C=O du Bz).

**(5'R)-N<sup>6</sup>-benzoyl-5'-désoxy-5'-époxy-2',3'-O-isopropylidène adénosine **58****



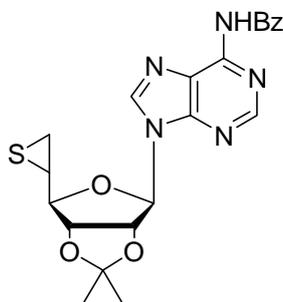
**P.M.** = 423  $\text{g.mol}^{-1}$

Sous argon, 2 g (3,17 mmoles) de N<sup>6</sup>-benzoyl-9-(2',3'-*O*-isopropylidène-5'-*O*-mésyl-6'-*O*-tertiobutyldiméthylsilyl-β-D-allofuranosyl)adénine sont mis en solution dans 20 mL de THF anhydre. 3,5 mL de fluorure de tétrabutylammonium 1M dans le THF sont ajoutés goutte à goutte au milieu réactionnel. Après 4 heures d'agitation sous argon et à température ambiante, la solution est hydrolysée puis extraite à l'eau et au chloroforme. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée sous pression réduite. L'époxyde ainsi formé (1,2 g) est utilisé sans purification dans la suite de la synthèse.

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

1,40 et 1,60 (2s, 2x3H, CMe<sub>2</sub>) ; 2,35 (dd, 1H, H<sub>6'a</sub>, J<sub>5',6'a</sub> = 1,5 Hz, J<sub>6'a,6'b</sub> = 7,0 Hz) ; 2,50 (dd, 1H, H<sub>6'b</sub>, J<sub>5',6'b</sub> = 1,5 Hz, J<sub>6'a,6'b</sub> = 7,0 Hz) ; 3,20 (m, 1H, H<sub>5'</sub>) ; 4,1 (m, 1H, H<sub>4'</sub>) ; 5,1 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>2',3'</sub> = 6,1 Hz, J<sub>3',4'</sub> = 3,5 Hz) ; 5,4 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,3 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 6,1 Hz) ; 6,2 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>1',2'</sub> = 2,3 Hz) ; 7,5 – 8,0 (m, 5H, Ar) ; 8,3 et 8,8 (2s, 2H, H<sub>2</sub> et H<sub>8</sub>).

**(5'S)-N<sup>6</sup>-benzoyl-2',3'-*O*-isopropylidène-5'-désoxy-5'-épithio adénosine 59**



**P.M.** = 439 g.mol<sup>-1</sup>

Dans 25 mL de méthanol, 600 mg du brut de (5'R)-N<sup>6</sup>-benzoyl-5'-désoxy-5'-époxy-2',3'-*O*-isopropylidène adénosine et 174 mg (2,28 mmoles, 1,6 éq.) de thiourée sont additionnés. La solution est agitée à température ambiante, sous argon, pendant une nuit. Le méthanol est évaporé sous pression réduite, le brut est repris au chloroforme et la phase organique lavée à l'eau et séchée sur MgSO<sub>4</sub>. L'épisulfure obtenu est purifié par chromatographie éclair sur silice (acétate d'éthyle / éther de pétrole : 80/20) pour conduire à 480 mg d'une huile visqueuse.

**Rendement** = 77 % en deux étapes

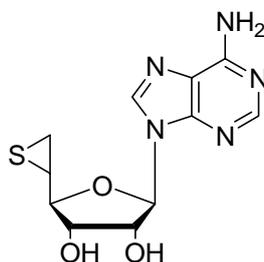
**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

1,40 et 1,60 (1s, 2x3H,  $\text{CMe}_2$ ) ; 2,25 (d, 1H,  $\text{H}_{6'a}$ ,  $J_{5',6'a} = 5,3$  Hz); 2,50 (d, 1H,  $\text{H}_{6'b}$ ,  $J_{5',6'b} = 6,1$  Hz); 3,20 (m, 1H,  $\text{H}_5'$ ); 3,9 (dd, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ,  $J_{3',4'} = 2,7$  Hz;  $J_{4',5'} = 7,9$  Hz); 5,20 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = 6,1$  Hz,  $J_{3',4'} = 2,7$  Hz) ; 5,60 (d, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{2',3'} = 6,1$  Hz) ; 6,15 (s, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ) ; 7,5 – 8,0 (m, 5H, Ar) ; 8,3 et 8,8 (2s, 2H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

24,2 ( $\text{C}_6'$ ) ; 25,1 et 26,9 (2C, Me de  $\text{CMe}_2$ ) ; 33,8 ( $\text{C}_5'$ ) ; 83,6 ( $\text{C}_3'$ ) ; 84,0 ( $\text{C}_2'$ ) ; 91,8 ( $\text{C}_4'$ ) ; 92,2 ( $\text{C}_1'$ ) ; 114,5 (C de  $\text{CMe}_2$ ) ; 123,7 ( $\text{C}_5$ ) ; 127,8 ; 128,8 et 132,8 (Ar du Bz) ; 133,4 ( $\text{C}_6$ ) ; 142,3 ( $\text{C}_8$ ) ; 149,8 ( $\text{C}_2$ ) ; 152,8 ( $\text{C}_4$ ) ; 164,6 (C=O du Bz).

**(5'S)-5'-désoxy-5'-épithio adénosine 39b**



**P.M.** = 295  $\text{g.mol}^{-1}$

480 mg (1,1 mmole) de (5'S)- $\text{N}^6$ -benzoyl-5'-désoxy-5'-épithio-2',3'-*O*-isopropylidène adénosine sont mis en solution dans 10 mL d'acide formique à 80%. Après 12 heures à température ambiante, l'acide formique est évaporé sous pression réduite. Après addition de quelques mL d'eau, le résidu obtenu (300 mg) est lyophilisé puis repris par 20 mL de méthanol. 81 mg de MeONa (1,5 mmole, 2 éq.) sont ajoutés. Après 12 heures d'agitation, le milieu est neutralisé par addition d'HCl 1M. Le méthanol est évaporé sous pression réduite et le produit brut est purifié sur résine hydrophobe HP20SS éluée avec un mélange MeOH/Eau :

60/40. Les fractions contenant l'épisulfure sont rassemblées, évaporées et enfin lyophilisées pour conduire à 57 mg d'un solide blanc dont l'homogénéité a été contrôlée par HPLC.

**Rendement** = 50 %

**HPLC :**

Eluant : Méthanol / Eau : 50 / 50  $t_R = 4,6$  min

(Spherisorb ODS 2 25cm, diamètre = 4,6 mm, 0,8 mL/min)

**R.M.N.  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

2,40 (d, 1H,  $\text{H}_{6'a}$ ,  $J_{5',6'a} = 5,7$  Hz) ; 2,62 (d, 1H,  $\text{H}_{6'b}$ ,  $J_{5',6'b} = 5,7$  Hz) ; 3,40 (dd, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ,  $J_{4',5'} = 8,0$  Hz,  $J_{5',6'} = 5,7$  Hz) ; 3,5 (dd, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ,  $J_{3',4'} = 5,0$  Hz,  $J_{4',5'} = 8,0$  Hz) ; 4,35 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $J_{2',3'} = 10,0$  Hz,  $J_{3',4'} = 5,0$  Hz) ; 4,75 (dd, 1H,  $\text{H}_{2'}$ ,  $J_{1',2'} = 5,0$  Hz,  $J_{2',3'} = 10,0$  Hz) ; 5,9 (d, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ,  $J_{1',2'} = 5,0$  Hz) ; 8,15 et 8,45 (2s, 2x1H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

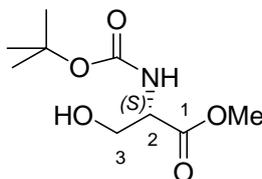
24,1 ( $\text{C}_{6'}$ ) ; 34,5 ( $\text{C}_{5'}$ ) ; 72,2 ( $\text{C}_{3'}$ ) ; 73,3 ( $\text{C}_{2'}$ ) ; 87,2 ( $\text{C}_{4'}$ ) ; 88,7 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 119,2 ( $\text{C}_5$ ) ; 140,0 ( $\text{C}_6$ ) ; 149,5 ( $\text{C}_8$ ) ; 152,6 ( $\text{C}_2$ ) ; 156,1 ( $\text{C}_4$ ).

$[\alpha]_D^{20} = -50^\circ$  ( $c = 3.10^{-3}$  g.mL $^{-1}$  ;  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} : 4/1$ )

**Masse (DCI /  $\text{NH}_3$ )**

$m/z = 296$  (M+H) $^+$

## Ester méthylique de la *N*-(tert-butoxycarbonyl)-L-sérine 71



$$\text{P.M.} = 219 \text{ g.mol}^{-1}$$

Dans un ballon préalablement purgé à l'argon et refroidit dans un bain de glace, on additionne goutte à goutte 19,3 mL de chlorure d'acétyle à 130 mL de méthanol sec. La solution est agitée pendant 10 minutes puis 10g de L-sérine sont ajoutés. La solution est portée à reflux du méthanol pendant 2h30. Le solvant est évaporé et le résidu obtenu est coévaporé plusieurs fois avec du chloroforme. On obtient 10 g de l'ester méthylique correspondant à la L-sérine. Ces 10 g sont remis en solution dans 80 mL d'un mélange eau / dioxane : 1/1. On additionne à cette solution 18 mL de triéthylamine et 15 g de (Boc)<sub>2</sub>O. Le mélange est agité à température ambiante pendant 18 heures avant d'être neutralisé par une solution aqueuse d'acide citrique à 10%. Une extraction au chloroforme est réalisée puis la phase organique récupérée est séchée sur sulfate de magnésium. On obtient ainsi 16,2 g d'une huile légèrement jaune.

**Rendement** = 78 %

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

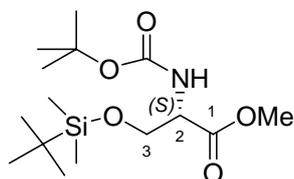
1,45 (s, 9H, tBu) ; 3,78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ; 3,85 (dd, 1H, H<sub>3a</sub>, J<sub>2,3a</sub> = 3,5 Hz , J<sub>gem</sub> = 11,2 Hz) ; 3,97 (dd, 1H, H<sub>3b</sub>, J<sub>2,3b</sub> = 3,5 Hz , J<sub>gem</sub> = 11,2 Hz) ; 4,37 (m, 1H, H<sub>2</sub>) ; 5,72 (d, 1H, NH, J<sub>H<sub>2</sub>,NH</sub> = 8,1 Hz).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) :**

28,6 (C du tBu) ; 52,9 (OCH<sub>3</sub>) ; 56,1 (C<sub>2</sub>) ; 63,5 (C<sub>3</sub>) ; 80,6 (C<sub>quat</sub> du tBu) ; 156,3 (C=O<sub>carbamate</sub>) ; 171,9 (C=O<sub>ester</sub>).

$[\alpha]_D^{20} = +8,2^\circ$  (c = 47,5.10<sup>-3</sup> g.mL<sup>-1</sup> ; CHCl<sub>3</sub>)

**Ester méthylique de la *N*-(tert-butoxycarbonyl)-*O*-(tert-butyldiméthylsilyl)-  
L-sérine 72**



**P.M.** = 333 g.mol<sup>-1</sup>

A une solution de 6 g (27,4 mmoles) de L-sérine protégée dans 100 mL de dichlorométhane distillé sur CaH<sub>2</sub>, on additionne 4,7 g (68,5 mmoles, 2,5 équ.) d'imidazole et 4,5 g de chlorure de tert-butyldiméthylsilyle (30,1 mmoles, 1,1 équ.). Après une nuit d'agitation, la phase organique est lavée par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée puis par une solution de chlorure de sodium saturée. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée. On obtient 7,6 g d'une huile légèrement colorée.

**Rendement** = 83 %

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

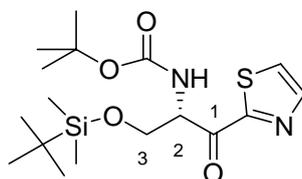
0,00 et 0,03 (2s, 2x3H, Me du TBDMS) ; 0,83 (s, 9H, tBu du TBDMS) ; 1,45 (s, 9H, tBu du Boc) ; 3,72 (s, 3H, OMe) ; 3,80 (dd, 1H, H<sub>3a</sub>, J<sub>2,3a</sub> = 2,8 Hz, J<sub>gem</sub> = 10,0 Hz) ; 4,02 (dd, 1H, H<sub>3b</sub>, J<sub>2,3b</sub> = 2,8 Hz, J<sub>gem</sub> = 10,0 Hz) ; 4,33 (dt, 1H, H<sub>2</sub>, J<sub>2,3</sub> = 2,8 Hz, J<sub>H<sub>2</sub>,NH</sub> = 8,8 Hz) ; 5,33 (d, 1H, NH, J<sub>H<sub>2</sub>,NH</sub> = 8,8 Hz).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) :**

-5,7 et -5,6 (Me du TBDMS) ; 18,1 (C<sub>quat</sub> du tBu du TBDMS) ; 25,6 (tBu du TBDMS) ; 28,2 (tBu du Boc) ; 52,2 (OMe) ; 55,5 (C<sub>2</sub>) ; 63,7 (C<sub>3</sub>) ; 79,8 (C<sub>quat</sub> du TBDMS) ; 155,4 (C=O<sub>carbamate</sub>) ; 171,2 (C=O<sub>ester</sub>).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +18,8° (c = 76,8.10<sup>-3</sup> g.mL<sup>-1</sup> ; CHCl<sub>3</sub>)

**2-[N-(tert-butoxycarbonyl)-O-(tert-butyldiméthylsilyl)-L-sérinyl]-1,3-thiazole 73**



$$\text{P.M.} = 386 \text{ g.mol}^{-1}$$

Dans un tricol refroidit à  $-78^{\circ}\text{C}$  et purgé à l'argon, on met en solution 18 mL de BuLi (28,8 mmoles, 4,2 éq.) 1,6 M dans l'hexane dans 30 mL d'éther sec fraîchement distillée. On ajoute alors lentement à la seringue 1,38 mL de 2-bromothiazole (15,3 mmoles, 2,2 éq.). La solution prend une couleur jaune. Une solution contenant 2,29g de l'ester méthylique dans 10 mL d'éther sec est ajoutée lentement goutte à goutte. L'agitation est maintenue 30 minutes après la fin de l'ajout. On laisse revenir à température ambiante après avoir ajouter une solution d'hydrogénocarbonate de sodium. La phase organique est recueillie puis séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et enfin évaporée sous pression réduite. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie éclair sur silice (éluant : EG / AE : 90/10). 2,08 g d'une huile légèrement jaune est obtenue.

**Rendement** = 78 %

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

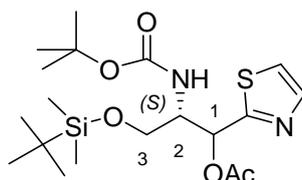
-0,10 et 0,00 (2s, 2x3H, Me du TBDMS) ; 0,75 (s, 9H, tBu du TBDMS) ; 1,55 (s, 9H, tBu du Boc) ; 4,12 (dd, 1H,  $\text{H}_{3a}$ ,  $J_{2,3a} = 3,0 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{gem}} = 10,3 \text{ Hz}$ ) ; 4,50 (dd, 1H,  $\text{H}_{3b}$ ,  $J_{2,3b} = 2,4 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{gem}} = 10,3 \text{ Hz}$ ) ; 5,53 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ) ; 5,75 (d, 1H, NH,  $J_{\text{H}_2,\text{NH}} = 8,5 \text{ Hz}$ ) ; 7,80 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ,  $J = 2,9 \text{ Hz}$ ) ; 8,11 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ,  $J = 2,9 \text{ Hz}$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

-5,4 et -5,3 (Me du TBDMS) ; 19,5 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  du tBu du TBDMS) ; 26,0 (tBu du TBDMS) ; 28,7 (tBu du Boc) ; 59,5 ( $\text{C}_2$ ) ; 64,8 ( $\text{C}_3$ ) ; 80,2 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  du TBDMS) ; 126,9 ( $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ) ; 145,3 ( $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ) ; 155,8 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{carbamate}}$ ) ; 165,1 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  du thiazole) ; 190,3 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{cétone}}$ ).

$[\alpha]_D^{20} = +15,3^\circ$  ( $c = 11,9 \cdot 10^{-3} \text{ g.mL}^{-1}$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

**(2S)-(tert-butoxycarbonylamino)-3-(tert-butyldiméthylsilyloxy)-1-(1,3-thiazol-2-yl)propyl acétate 75**



**P.M.** =  $430 \text{ g.mol}^{-1}$

Dans un ballon, on met en solution 2 g (5,18 mmoles) du composé **73** dans 30 mL de méthanol. On additionne, à  $-78^\circ\text{C}$ , 392 mg de  $\text{NaHB}_4$  (10,36 mmoles, 2 éq.). On laisse sous agitation pendant 30 minutes et on laisse revenir à température ambiante. Le méthanol est évaporé sous pression réduite et on reprend le résidu avec une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium. La solution est extraite à l'éther et la phase organique obtenue est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et enfin évaporée. On obtient ainsi 2,1 g d'une huile très légèrement jaune. 1,23 g (3,16 mmoles) de l'huile obtenue sont remis en solution dans 20 mL de pyridine préalablement distillée sur KOH. On additionne 900  $\mu\text{L}$  (9,48 mmoles, 3 éq.) d'anhydride acétique à cette solution et on laisse sous agitation pendant une nuit. La pyridine est évaporée sous pression réduite et coévaporée plusieurs fois avec du toluène. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie éclair sur silice (EG/AE : 80/20) pour donner chacun des deux isomères séparés **75a** et **75b** (Rdt = 94 %, 1,28g).

**Composé 75a Syn (1R,2S), 663 mg,  $R_f = 0,5$**

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

0,00 (2s, 2x3H, Me du TBDMS) ; 0,85 (s, 9H, tBu du TBDMS) ; 1,35 (s, 9H, tBu du Boc) ; 2,12 (s, 3H, Me de OAc) ; 3,58 (dd, 1H,  $\text{H}_{3a}$ ,  $J_{2,3a} = 6,2 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{gem}} = 10,1 \text{ Hz}$ ) ; 3,68 (dd, 1H,  $\text{H}_{3b}$ ,  $J_{2,3b} = 4,1 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{gem}} = 10,1 \text{ Hz}$ ) ; 4,25 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ) ; 5,40 (d, 1H, NH,  $J_{\text{H}_2, \text{NH}} = 9,7 \text{ Hz}$ ) ; 6,32 (d, 1H,  $\text{H}_1$ ,  $J_{1,2} = 5,0 \text{ Hz}$ ) ; 7,30 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ,  $J = 3,0 \text{ Hz}$ ) ; 7,75 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ,  $J = 3,0 \text{ Hz}$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

-5,2 et -5,1 (2xMe du TBDMS) ; 18,6 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  du tBu du TBDMS) ; 21,2 (Me de OAc) ; 26,2 (tBu du TBDMS) ; 28,7 (tBu du Boc) ; 55,2 ( $\text{C}_3$ ) ; 62,4 ( $\text{C}_2$ ) ; 71,7 ( $\text{C}_1$ ) ; 80,0 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  du TBDMS) ; 119,9 ( $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ) ; 143,2 ( $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ) ; 155,6 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{carbamate}}$ ) ; 167,2 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  du thiazole) ; 169,9 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{acétate}}$ ).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +17,0^\circ$  ( $c = 12,0 \cdot 10^{-3} \text{ g.mL}^{-1}$  ;  $\text{CHCl}_3$ )

**Composé 75b Anti (1S,2S), 616 mg,  $R_f = 0,6$** **R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

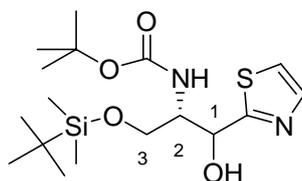
-0,05 et 0,00 (2s, 2x3H, Me du TBDMS) ; 0,90 (s, 9H, tBu du TBDMS) ; 1,35 (s, 9H, tBu du Boc) ; 2,10 (s, 3H, Me de OAc) ; 3,51 (dd, 1H,  $\text{H}_{3a}$ ,  $J_{2,3a} = 6,1 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{gem}} = 10,0 \text{ Hz}$ ) ; 3,80 (dd, 1H,  $\text{H}_{3b}$ ,  $J_{2,3b} = 4,1 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{gem}} = 10,0 \text{ Hz}$ ) ; 4,27 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ) ; 5,60 (d, 1H, NH,  $J_{\text{H}_2,\text{NH}} = 9,6 \text{ Hz}$ ) ; 6,18 (d, 1H,  $\text{H}_1$ ,  $J_{1,2} = 6,2 \text{ Hz}$ ) ; 7,30 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ,  $J = 3,0 \text{ Hz}$ ) ; 7,75 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ,  $J = 3,0 \text{ Hz}$ ).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

-5,2 (2xMe du TBDMS) ; 18,6 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  du tBu du TBDMS) ; 21,3 (Me de OAc) ; 26,2 (tBu du TBDMS) ; 28,7 (tBu du Boc) ; 54,8 ( $\text{C}_3$ ) ; 62,3 ( $\text{C}_2$ ) ; 70,7 ( $\text{C}_1$ ) ; 79,8 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  du TBDMS) ; 120,3 ( $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ) ; 143,0 ( $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ) ; 155,9 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{carbamate}}$ ) ; 166,6 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  du thiazole) ; 170,0 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{acétate}}$ ).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -15,3^\circ$  ( $c = 12,8 \cdot 10^{-3} \text{ g.mL}^{-1}$  ;  $\text{CHCl}_3$ )

**(2S)-(tert-butoxycarbonylamino)-3-(tert-butyltriméthylsilyloxy)-1-(1,3-thiazol-2-yl)propan-1-ol 74**



**P.M.** = 388 g.mol<sup>-1</sup>

On met en solution 1,5 mmole du produit acétylé 75 dans 20 mL de MeOH séché sur tamis 3Å. On ajoute à ce mélange 3,0 mmoles de MeONa soit 2 équivalents. La solution est agitée pendant une nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur silice (AE/EG : 80/20).

**Composé 74a Syn (1R,2S), 380 mg, Rdt = 63%**

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

0,07 et 0,13 (2s, 2x3H, Me du TBDMS) ; 0,93 (s, 9H, tBu du TBDMS) ; 1,43 (s, 9H, tBu du Boc) ; 3,83 (dd, 1H, H<sub>3a</sub>, J<sub>2,3a</sub> = 6,2 Hz, J<sub>gem</sub> = 10,0 Hz) ; 3,97 (dd, 1H, H<sub>3b</sub>, J<sub>2,3b</sub> = 3,8 Hz, J<sub>gem</sub> = 10,0 Hz) ; 4,25 (m, 1H, H<sub>2</sub>) ; 4,80 (s, 1H, OH) ; 5,32 (m, 1H, H<sub>1</sub>) ; 5,60 (d, 1H, NH, J<sub>H<sub>2</sub>,NH</sub> = 8,7 Hz) ; 7,30 (d, 1H, CH<sub>thiazole</sub>, J = 3,2 Hz) ; 7,75 (d, 1H, CH<sub>thiazole</sub>, J = 3,2 Hz).

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +10,7° (c = 76,0.10<sup>-3</sup> g.mL<sup>-1</sup> ; CHCl<sub>3</sub>)**

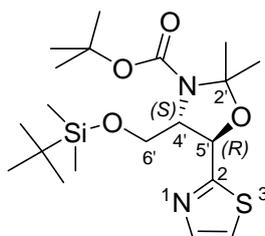
**Composé 74b Anti (1S,2S), 350 mg, Rdt = 63%**

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

0,10 et 0,20 (2s, 2x3H, Me du TBDMS) ; 0,85 (s, 9H, tBu du TBDMS) ; 1,45 (s, 9H, tBu du Boc) ; 3,83 (m, 1H, H<sub>3a</sub>) ; 3,93 (m, 1H, H<sub>3b</sub>) ; 4,25 (m, 1H, H<sub>2</sub>) ; 4,95 (d, 1H, OH, J<sub>H<sub>1</sub>,OH</sub> = 7,9 Hz) ; 5,15 (dd, 1H, H<sub>1</sub>, J<sub>1,2</sub> = 4,1 Hz, J<sub>H<sub>1</sub>,OH</sub> = 7,9 Hz) ; 5,43 (d, 1H, NH, J<sub>H<sub>2</sub>,NH</sub> = 7,9 Hz) ; 7,30 (d, 1H, CH<sub>thiazole</sub>, J = 3,0 Hz) ; 7,75 (d, 1H, CH<sub>thiazole</sub>, J = 3,0 Hz).

$[\alpha]_D^{20} = +0,3^\circ$  ( $c = 70,0 \cdot 10^{-3} \text{ g.mL}^{-1}$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

**2-[2',2'-diméthyl-(5'R)-N-(tert-butoxycarbonyl)-(4'S)-(tert-butyl)diméthylsilyloxyméthylène]-1',3'-oxazolidin-5'-yl]-1,3-thiazole 76**



**P.M.** =  $428 \text{ g.mol}^{-1}$

Dans un ballon préalablement purgé à l'argon, on introduit 370 mg (0,95 mmole) de produit **74a** dans 4 mL d'acétone. On additionne à ce mélange 0,93 mL de 2-méthoxypropène (9,5 mmoles, 10 éq.) et une quantité catalytique de PPTS. On chauffe alors au reflux de l'acétone pendant une nuit. L'acétone est ensuite évaporée et le résidu obtenu est purifié par chromatographie éclair sur silice (EG/AE : 80/20). On obtient ainsi 291 mg du produit protégé sous forme d'huile.

**Rendement** = 71 %

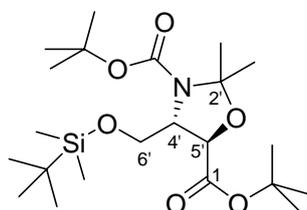
**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

0,00 (s, 2x3H, Me du TBDMS) ; 0,93 (s, 9H, tBu du TBDMS) ; 1,20 (s, 9H, tBu du Boc) ; 1,27 (s, 6H,  $\text{CH}_3$  de l'oxazolidine) ; 4,00 (m, 3H,  $\text{H}_{4'}$  et  $\text{H}_{6'}$ ) ; 5,17 (m, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ) ; 7,30 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ,  $J = 2,9 \text{ Hz}$ ) ; 7,75 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ,  $J = 2,9 \text{ Hz}$ ).

**Masse (ESI)**  $m/z = 429 (\text{M}+\text{H})^+$

$[\alpha]_D^{20} = -0,5^\circ$  ( $c = 56,0 \cdot 10^{-3} \text{ g.mL}^{-1}$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

**1-[2',2'-diméthyl-(5'R)-N-(tert-butoxycarbonyl)-(4'S)-(tert-butyl)diméthylsilyloxyméthylène)-1',3'-oxazolidin-5'-yl]méthanoate de tert-butyl 79**



P.M. = 445 g.mol<sup>-1</sup>

*A partir du composé **76**, les opérations de d'hydrolyse du groupement thiazole, d'oxydation de l'aldéhyde résultant en acide et son estérification sont réalisées sans purification des intermédiaires obtenus.*

On met en solution 438 mg (1,02 mmole) du composé **76** dans 10 mL d'acétonitrile contenant du tamis 4 Å. La solution obtenue est agitée pendant 10 minutes puis on ajoute lentement 150 µL (1,33 mmole, 1,3 éq.) de CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>. Le mélange est laissé 40 minutes sous agitation à température ambiante puis le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est remis en solution dans 10 mL de MeOH puis le tout est refroidit à 0°C. Le NaBH<sub>4</sub> (125 mg, 3,2 éq., 3,2 mmole) est alors ajouté doucement par portions. L'agitation est maintenue 10 minutes puis la solution est diluée dans l'acétone, filtrée sur célite et enfin évaporée. Le résidu obtenu est remis de nouveau en solution dans 8 mL d'un mélange CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O : 10/1. On additionne alors 280 mg de HgCl<sub>2</sub> (1 éq, 1,02 mmole). L'agitation est maintenue pendant 15 minutes puis la mixture est filtrée sur célite. Le solvant est évaporé puis le résidu sec est remis en solution dans le dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse de KI à 20% et séché sur MgSO<sub>4</sub>. Le solvant est évaporé sous pression réduite donnant 300 mg de l'aldéhyde correspondant qui est oxydé sans purification préalable.

Les 300 mg de l'aldéhyde (0,80 mmole) sont mis en solution dans 4,5 mL de tert-butanol auquel on a ajouté 3 mL d'un tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH = 7,0. On ajoute lentement à la seringue 4,5 mL d'une solution aqueuse de permanganate de potassium 1M. L'agitation est maintenue pendant 30 minutes à température ambiante puis l'excès d'oxydant

est éliminé par ajout d'une solution saturée de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . Le pH est ajusté à 3,0 par addition de HCl 1M froid. Le mélange obtenu est extrait à l'éther. La phase organique est recueillie puis séché sur  $\text{MgSO}_4$  et enfin évaporée sous pression réduite. De cette manière, 320 mg de l'acide carboxylique correspondant sont obtenus et estérifiés sans purification préalable.

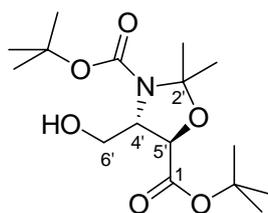
L'acide carboxylique (230 mg, 0,56 mmole) est mis en solution dans 4 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et le tout est refroidit à  $0^\circ\text{C}$  dans un bain de glace. On ajoute à la solution 250 mg (2 éq., 1,12 mmole) de  $\text{CCl}_3\text{CNH-OtBu}$  en solution dans 4 mL d'hexane et 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$  comme catalyseur. L'agitation est maintenue pendant 20 minutes puis 48 mg de  $\text{NaHCO}_3$  (1 éq., 0,56 mmole) sont additionnés. Le mélange obtenu est filtré sur célite puis la solution évaporée sous pression réduite. On dispose ainsi, après purification par chromatographie éclair sur silice (EG/AE : 90/10), de 160 mg de l'ester tert-butylique souhaité.

**Rendement** = 35 %

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

0,00 (s, 6H, 2Me du TBDMS) ; 0,85 (s, 9H, tBu du TBDMS) ; 1,45 (s, 21H, 2 x tBu et un Me) ; 1,60 (s, 3H, Me) ; 3,70 (m, 2H,  $\text{H}_{6'}$ ) ; 4,05 (m, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 4,50 (m, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ).

**1-[2',2'-diméthyl-(4'S)-(hydroxyméthyl)-(5'R)-N-(tert-butoxycarbonyl)-1',3'-oxazolidin-5'-yl]méthanoate de tert-butyl 80**



**P.M.** =  $331 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

L'ester **79** obtenu précédemment (160 mg, 0,36 mmole) est mis en solution dans 2 mL de THF. On additionne 360  $\mu\text{L}$  de TBAF 1M dans le THF. La solution est agitée pendant 30 minutes à température ambiante puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est alors

purifiée par chromatographie éclair sur silice (EG/AE : 80/20). On obtient de cette manière 100 mg de l'alcool **80** sous forme d'huile.

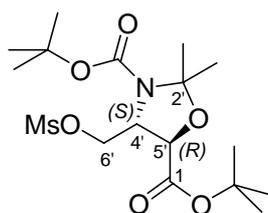
**Rendement** = 84 %

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

1,38 et 1,40 (2s, 2 x 9H, 2 x tBu) ; 1,35 et 1,50 (2s, 2 x 3H, 2 x Me) ; 3,75 (m, 2H,  $\text{H}_{6'}$ ) ; 4,15 (m, 2H,  $\text{H}_{4'}$  et  $\text{H}_{5'}$ ).

**Masse (ESI)**  $m/z = 354 (\text{M}+\text{Na})^+$

**1-[2',2'-diméthyl-(4'S)-((méthylsulfonyloxy)méthyl)-(5'R)-N-(tert-butoxycarbonyl)-1',3'-oxazolidin-5'-yl]méthanoate de tert-butyl **81****



**P.M.** = 409  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Dans un ballon préalablement purgé à l'argon et refroidit dans un bain de glace, on met en solution 100 mg (0,30 mmole) de **80** dans 3 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A cette solution, on ajoute 4 mg de DMAP (0,03 mmol, 0,1 éq.) et 50  $\mu\text{L}$  de triéthylamine (0,36 mmole, 1,2 éq.). On additionne alors lentement à la seringue 30  $\mu\text{L}$  de chlorure de mésyle (0,33 mmole, 1,1 éq.). La solution est laissée sous agitation pendant 15 minutes. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est purifié par chromatographie éclair sur silice (EG/AE : 50/50). On obtient ainsi 128 mg d'une huile incolore.

**Rendement** = 100 %

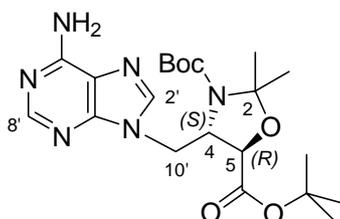
**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

1,42 et 1,43 (2s, 2 x 9H, 2 x tBu) ; 1,48 et 1,53 (2s, 2 x 3H, 2 x Me) ; 4,35 (m, 2H,  $\text{H}_{6'}$ ) ; 4,45 (m, 2H,  $\text{H}_{4'}$  et  $\text{H}_{5'}$ ).

**Masse (ESI)**  $m/z = 432 (\text{M}+\text{Na})^+$

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0,8^\circ$  ( $c = 32,0 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

**(4S)-[(adén-9-yl)méthyl]-2,2-diméthyl-N-(tert-butoxycarbonyl)-(5R)-tertbutylcarboxylate-1,3-oxazolidine 82**



**P.M.** =  $448 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Dans un ballon préalablement purgé à l'argon, le mésylate **81** (100 mg, 0,25 mmole) est mis en solution dans 2 mL de DMF préalablement distillé sur  $\text{CaH}_2$ . On additionne ensuite 70 mg d'adénine (0,50 mmole, 2 éq.) et 155 mg de carbonate de césium (0,50 mmole, 2 éq.). Le mélange est chauffé à  $80^\circ\text{C}$  pendant 21 heures sous forte agitation. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite et le produit brut purifié par chromatographie éclair sur silice (AE/MeOH : 90/10). On récupère de cette façon 60 mg du produit de couplage **82**.

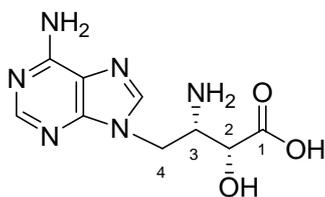
**Rendement** = 55 %

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

1,41 et 1,52 (2s, 2 x 9H, 2 x tBu) ; 1,49 et 1,54 (2s, 2 x 3H, 2 x Me) ; 4,60 (m, 2H,  $\text{H}_{10'}$ ) ; 4,75 (m, 2H,  $\text{H}_4$  et  $\text{H}_5$ ) ; 5,70 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 7,76 et 8,35 (2s, 2 x 1H,  $\text{H}_{2'}$  et  $\text{H}_{8'}$ ).

**Masse (ESI)**  $m/z = 449 (\text{M}+\text{H})^+$

### Acide 4-(adén-9-yl)-(3S)-amino-(2R)-hydroxybutyrique 63d



$$\text{P.M.} = 252 \text{ g.mol}^{-1}$$

On met en solution dans 4 mL d'une solution aqueuse d'HCl 1M 60 mg (0,13 mmole) du composé **82**. La solution est chauffée à 50°C et agitée pendant 4 heures. L'eau est alors évaporée sous pression réduite et le résidu obtenu est coévaporé plusieurs fois par du toluène. Le produit est purifié par chromatographie sur une colonne de résine hydrophobe HP20SS. On récupère ainsi 21 mg d'un solide blanc.

**Rendement** = 62 %

**R.M.N.  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

4,07 (m, 1H,  $\text{H}_3$ ) ; 4,29 (d, 1H,  $\text{H}_2$ ,  $J_{2,3} = 3,3$  Hz) ; 4,61 (m, 2H,  $\text{H}_4$ ) ; 8,42 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 8,56 et 8,57 (2s, 2H,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_8$  de la base).

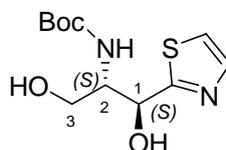
**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ) :**

43,5 ( $\text{C}_4$ ) ; 51,1 ( $\text{C}_3$ ) ; 67,5 ( $\text{C}_2$ ) ; 118,4 ; 144,2 ; 145,5 ; 149,2 ; 150,6 ( $\text{C}_{\text{base}}$ ) ; 172,0 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

**Masse (ESI)**  $m/z = 253$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ )

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6,2^\circ$  ( $c = 2,9 \cdot 10^{-3}$  g.mL $^{-1}$  ;  $\text{H}_2\text{O}$ )

**(1S)-(1,3-thiazol-2-yl)-(2S)-(tert-butoxycarbonylamino)-3-hydroxypropan-1-ol 83**



**P.M.** = 274 g.mol<sup>-1</sup>

Dans un ballon contenant 388 mg (1,0 mmole) du composé **74b** en solution dans 10 mL de THF, on additionne 1 mL d'une solution de TBAF 1M dans le THF (1,0 mmole, 1 éq.). L'agitation est maintenue pendant 30 minutes à température ambiante puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur silice (Et<sub>2</sub>O/MeOH : 35/1) pour conduire à 257 mg du diol **83** sous forme d'une huile incolore.

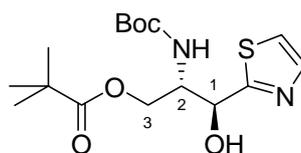
**Rendement** = 94 %

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :**

1,32 (s, 9H, tBu) ; 3,72 (dd, 1H, H<sub>3'a</sub>, J<sub>2,3a</sub> = 4,5 Hz, J<sub>gem</sub> = 11,7 Hz) ; 4,05-4,15 (m, 2H, H<sub>3b</sub> et H<sub>2</sub>) ; 5,12 (s large, 1H, H<sub>1</sub>) ; 5,45 (s, 1H, NH) ; 7,30 (s large, 1H, CH<sub>thiazole</sub>) ; 7,75 (s large, 1H,).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -75,9° (c = 3,4.10<sup>-3</sup> g.mL<sup>-1</sup> ; CHCl<sub>3</sub>)

**(1S)-(1,3-thiazol-2-yl)-(2S)-(tert-butoxycarbonylamino)-3-pivaloyl-propan-1-ol 84**



**P.M.** = 358 g.mol<sup>-1</sup>

Le diol **83** (257 mg, 0,94 mmole) est mis en solution dans 3 mL de pyridine fraîchement distillée sur KOH. Le chlorure de pivaloyle (116  $\mu$ L, 0,94 mmole, 1  $\text{eq.}$ ) est alors additionné goutte à goutte. Après 3 heures d'agitation, on ajoute 50  $\mu$ L de chlorure de pivaloyle supplémentaire. L'opération est reconduite jusqu'à disparition complète du produit de départ. Le solvant est alors évaporé et coévaporé par du toluène. Le résidu ainsi obtenu est purifié par chromatographie éclair su silice ( $\text{Et}_2\text{O}/\text{EG}$  : 80/20) pour conduire à 240 mg d'une huile incolore.

**Rendement** = 66 %

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

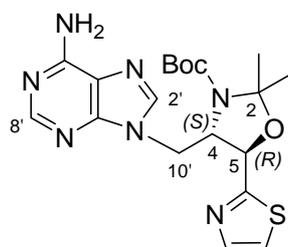
1,18 (s, 9H, tBu du carbonate); 1,41 (s, 9H, tBu du carbamate); 4,12 (dd, 1H,  $\text{H}_{3a}$ ,  $J_{2,3a} = 4,4$  Hz,  $J_{3a,3b} = 11,3$  Hz); 4,33 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ); 4,43 (dd, 1H,  $\text{H}_{3b}$ ,  $J_{2,3b} = 7,5$  Hz,  $J_{3a,3b} = 11,3$  Hz); 5,1 (m, 2H,  $\text{H}_1$  et NH); 7,34 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ,  $J = 2,0$  Hz); 7,76 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ,  $J = 2,0$  Hz).

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

27,0 (tBu du carbonate); 28,2 (tBu du carbamate); 38,8 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  du carbonate); 55,5 ( $\text{C}_2$ ); 62,5 ( $\text{C}_3$ ); 72,4 ( $\text{C}_1$ ); 80,4 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  du carbamate); 119,6 ( $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ); 142,4 ( $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ); 156,4 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{carbamate}}$ ); 171,5 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  du thiazole); 178,5 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{carbonate}}$ ).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -11,5^\circ$  ( $c = 40,0 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

**(4S)-[(adén-9-yl)méthyl]-2,2-diméthyl-N-(tert-butoxycarbonyl)-(5R)-(1,3-thiazol-2-yl)-1,3-oxazolidine **87****



**P.M.** = 431  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

A une solution contenant 280 mg du produit silylé **75a** (0,64 mmole) dans 6 mL de THF, on ajoute 640  $\mu$ L de TBAF 1M dans le THF (0,64 mmole, 1  $\text{eq.}$ ). La solution est laissée sous agitation pendant une nuit puis le THF est évaporé sous pression réduite. On obtient ainsi 205 mg de l'alcool correspondant sous forme d'une huile.

Dans un ballon purgé à l'argon et dans un bain de glace, 205 mg (0,65 mmole) de l'alcool précédemment obtenu sont mis en solution dans 4 mL de dichlorométhane sec. On ajoute 9 mg de DMAP (0,065 mmole, 0,1  $\text{eq.}$ ) et 110  $\mu$ L de triéthylamine (0,78 mmole, 1,2  $\text{eq.}$ ). On additionne lentement ensuite à la seringue 56  $\mu$ L de chlorure de mésyle (0,71 mmole, 1,2  $\text{eq.}$ ). La solution est alors laissée sous agitation pendant 1 heure à température ambiante. Le dichlorométhane est évaporé et on obtient 230 mg d'une huile légèrement jaune.

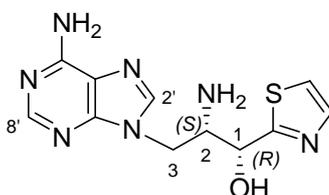
On met en suspension dans 2 mL de DMF distillé sur  $\text{CaH}_2$  100 mg du mésylate précédent (0,26 mmole), 70 mg d'adénine (0,52 mmole, 2  $\text{eq.}$ ) et 168 mg de carbonate de césium (0,52 mmole, 2  $\text{eq.}$ ). On maintient l'agitation pendant 48 heures à 80°C. Le DMF est alors évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est purifié par chromatographie éclair sur silice (AE/MeOH : 90/10) pour donner 53 mg d'une laque.

**Rendement** = 44 % sur 3 étapes

**R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :**

1,45 (s, 3H, Me de l'oxazolidine) ; 1,50 (s, 9H+3H, tBu du Boc + Me de l'oxazolidine) ; 4,70 (m, 2H,  $\text{H}_{10}$ ) ; 4,87 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ) ; 5,60 (m, 1H,  $\text{H}_5$ ) ; 6,35 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 7,30 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{thiazole}}$ ,  $J = 2,9$  Hz) ; 7,70 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{thiazole}}$  et  $\text{H}_8$ ) ; 8,35 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5,4^\circ$  ( $c = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

**(1R,2S)-3-(adén-9-yl)-2-amino-1-(1,3-thiazol-2-yl)propan-1-ol 64d**

**P.M.** = 291 g.mol<sup>-1</sup>

On met en solution 40 mg du produit protégé **87** dans 1,5 mL de TFA à 20% dans le dichlorométhane. Après 6 heures d'agitation, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur une résine hydrophobe HP20SS en utilisant un gradient eau → eau/MeOH : 70/30. On obtient ainsi 6 mg du produit déprotégé.

**Rendement** = 22 %

**HPLC :**

Eluant : Méthanol / Eau : 50 / 50 t<sub>R</sub> = 8,3 min  
(Nucleodur 25cm, diamètre = 4,6 mm, 0,8 mL/min)

**R.M.N. <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) :**

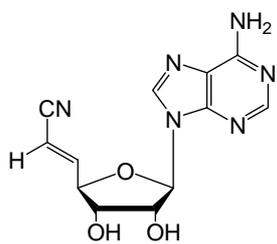
4,29 (m, 1H, H<sub>2'</sub>) ; 4,63 (dd, 1H, H<sub>1'a</sub>, J<sub>1'a,2'</sub> = 7,1 Hz, J<sub>gem</sub> = 15,0 Hz) ; 4,70 (dd, 1H, H<sub>3b</sub>, J<sub>2,3b</sub> = 5,4 Hz, J<sub>gem</sub> = 15,0 Hz) ; 5,11 (d, 1H, H<sub>1</sub>, J<sub>1,2</sub> = 4,3 Hz) ; 7,55 (d, 1H, CH<sub>thiazole</sub>, J = 3,2 Hz) ; 7,73 (d, 1H, CH<sub>thiazole</sub>, J = 3,2 Hz) ; 8,29 et 8,33 (2s, 2H, H<sub>2'</sub> et H<sub>8'</sub>).

**R.M.N. <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD) :**

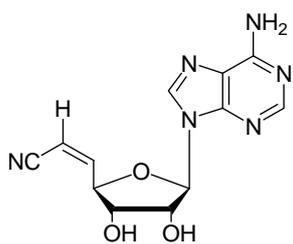
45,0 (C<sub>3</sub>) ; 56,4 (C<sub>2</sub>) ; 69,3 (C<sub>1</sub>) ; 120,6 (C<sub>base</sub>) ; 122,5 et 144,5 (C<sub>thiazole</sub>) ; 145,0 ; 149,4 ; 151,4 ; 154,5 (C<sub>base</sub>) ; 173,0 (C<sub>quat</sub> du thiazole).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -16,7° (c = 2,8.10<sup>-3</sup> g.mL<sup>-1</sup> ; H<sub>2</sub>O)

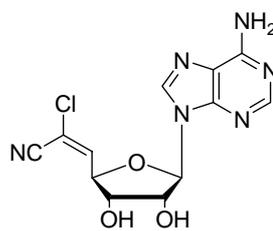
**Masse (ESI)** m/z = 292 (M+H)<sup>+</sup>



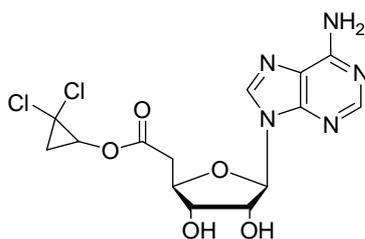
**(E)-4a**



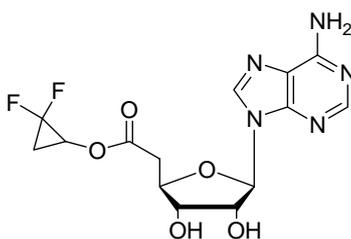
**(Z)-4a**



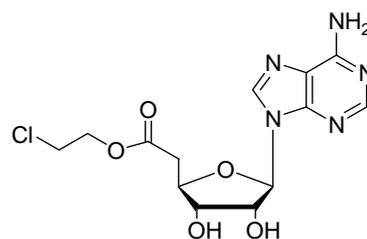
**(E)-4b**



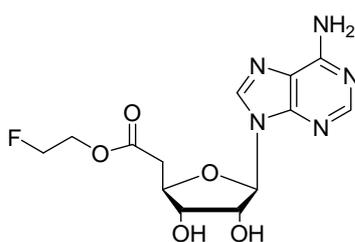
**5a**



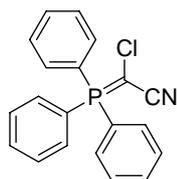
**5b**



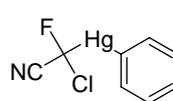
**6a**



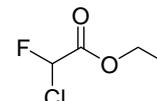
**6b**



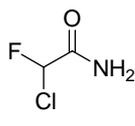
**7b**



**10**



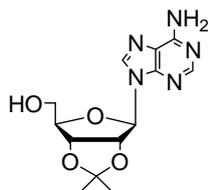
**11**



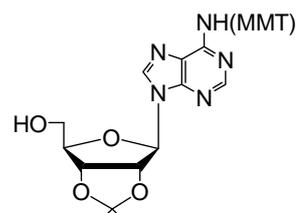
**12**



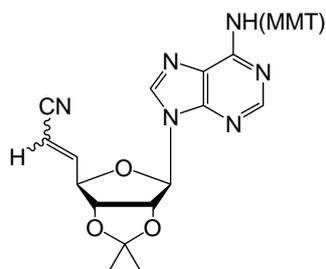
**13**



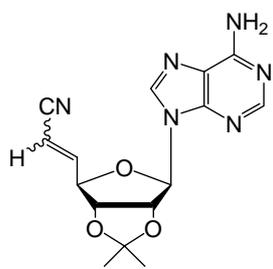
**14**



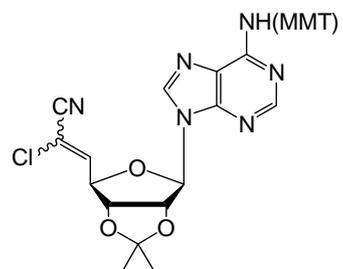
**15**



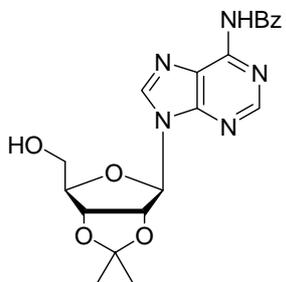
**17**



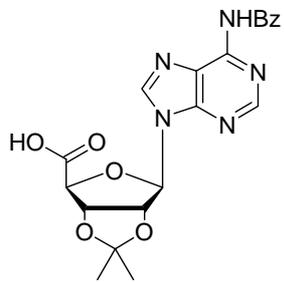
**18**



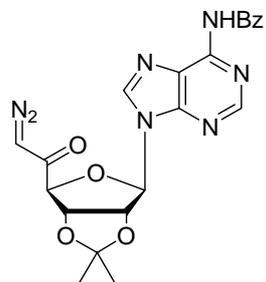
**19**



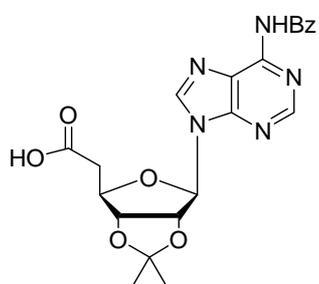
21



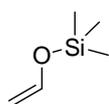
22



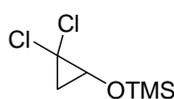
24



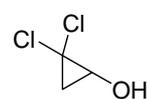
25



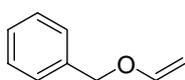
26



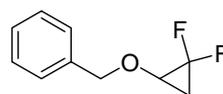
27



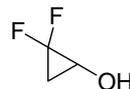
28



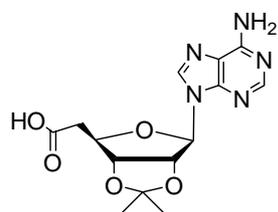
29



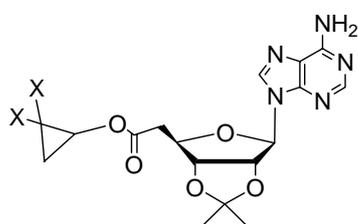
30



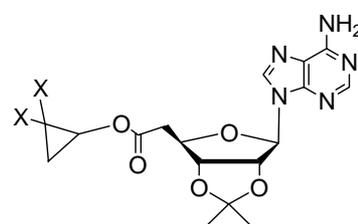
31



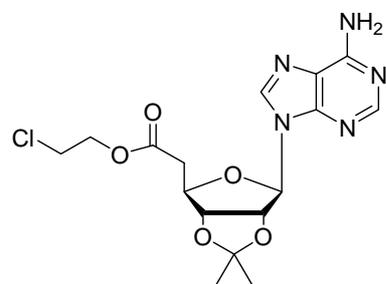
32



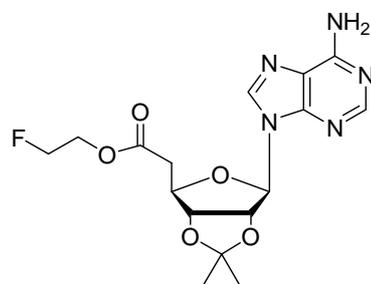
33a



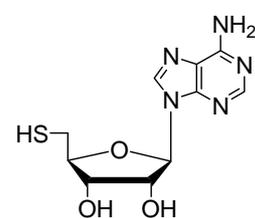
33b



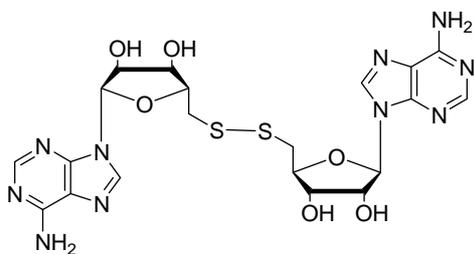
34a



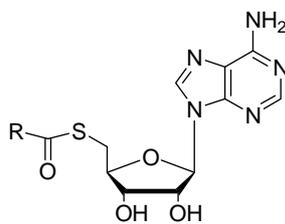
34b



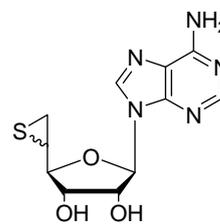
35



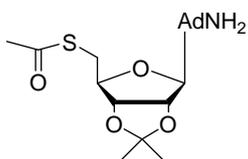
**37**



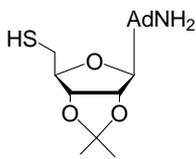
**38a** R = Me  
**38b** R = Et  
**38c** R = Pr  
**38d** R = iPr



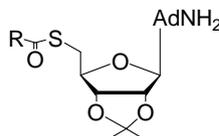
**39a** (5'R)  
**39b** (5'S)



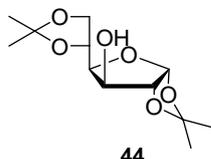
**41**



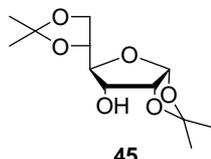
**42**



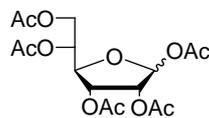
**43a** R=Et  
**43b** R=Pr  
**43c** R=iPr



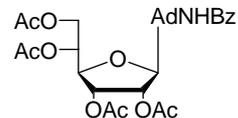
**44**



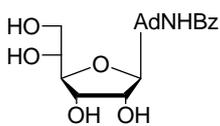
**45**



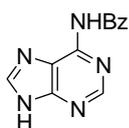
**46**



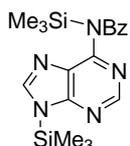
**47**



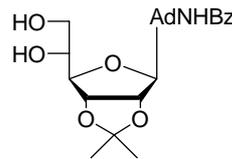
**48**



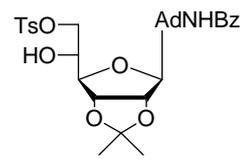
**49**



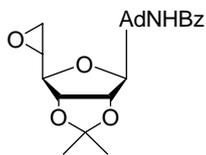
**50**



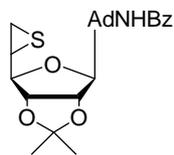
**52**



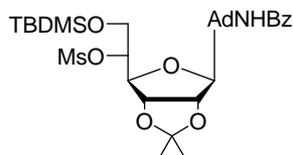
**53**



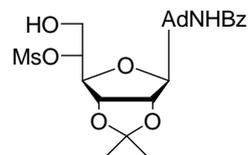
**54**



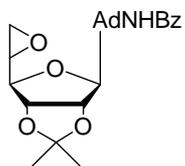
**55**



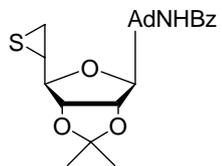
**56**



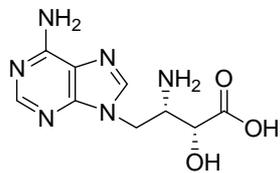
**57**



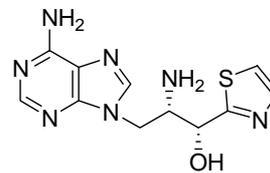
58



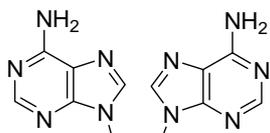
59



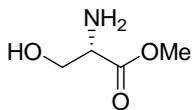
63d



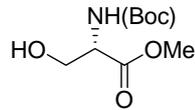
64d



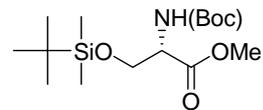
68c



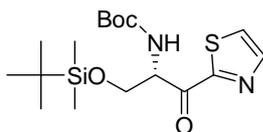
70



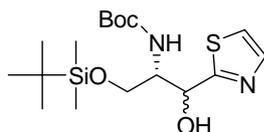
71



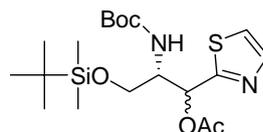
72



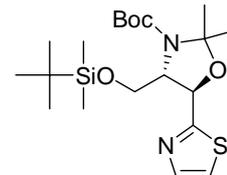
73



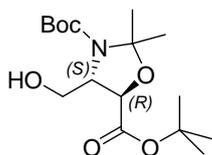
74



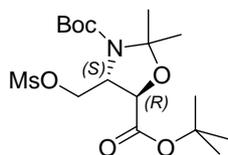
75



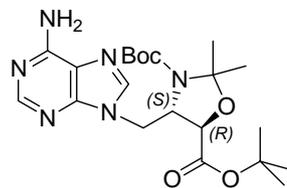
76



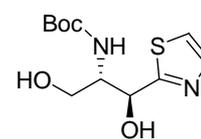
80



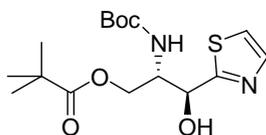
81



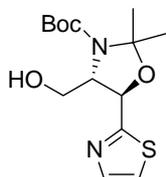
82



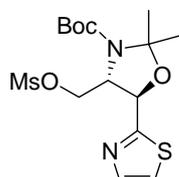
83



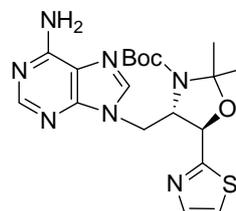
84



85



86



87

## RESUME

*La S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase (AdoHcy hydrolase) est considérée aujourd'hui comme une bonne cible pharmacologique pour la conception de nouveaux antiviraux à spectre large. Tout au long de cette étude, nous avons cherché à exploiter le mécanisme d'action de l'enzyme et les données structurales récemment publiées pour provoquer son inhibition.*

*Dans un premier temps, nous avons souhaité utiliser l'activité hydrolytique de l'enzyme en proposant comme inhibiteurs potentiels des esters nucléosidiques, homologues de l'adénosine, qui pourraient libérer dans le site actif de l'enzyme une espèce électrophile capable d'interagir avec les résidus d'acides aminés du site actif.*

*Plus récemment, l'hypothèse concernant le rôle joué par la Cystéine 195 dans le maintien du potentiel d'oxydoréduction du cofacteur  $NAD^+/NADH$  associé à l'enzyme nous a conduit à cibler et à marquer cet acide aminé par création d'un pont disulfure avec un inhibiteur portant en position C-5' une fonction thiol ou disulfure.*

*Enfin, les données issues de la cristallisation de l'AdoHcy hydrolase en présence d'un de ses inhibiteurs, la D-Eritadénine, ont permis de concevoir d'autres structures d'inhibiteurs de forte affinité. L'utilisation de la modélisation moléculaire permet de rationaliser le design de telles molécules et d'orienter les synthèses vers les acyclonucléosides les plus efficaces.*

*Nous avons donc réalisé :*

- *la synthèse de ces trois familles d'inhibiteurs : les esters homologues de l'adénosine, les thioadénosines et les acyclonucléosides,*
- *l'évaluation de leur pouvoir inhibiteur sur l'AdoHcy hydrolase recombinante de placenta humain purifiée jusqu'à homogénéité au laboratoire,*
- *l'étude de leur mécanisme d'action.*

*La famille des esters homologues de l'adénosine s'est révélée être une famille d'inhibiteur de type I affectant le cofacteur  $NAD^+$ . Les thionucléosides ont atteint leur cible : la Cystéine 195 : l'étude de la protéine inactivée en ESI-MS puis l'étude des peptides obtenus après digestion par l'EndoLys C de l'enzyme inhibée nous permet de confirmer le mécanisme d'action de ces composés. L'évaluation des acyclonucléosides cible est toujours en cours mais les résultats préliminaires demeurent encourageants et ouvrent la voie vers de nouvelles structures.*

## MOTS CLES

*AdoHcy hydrolase, antiviraux, inhibiteurs irréversibles, inhibiteurs de grande affinité, modélisation moléculaire, nucléosides, enzymologie, ESI-MS des protéines, marquage covalent, adénosine, homocystéine, acyclonucléosides, thionucléosides.*