



HAL
open science

Synthèse et évaluation de nouveaux nucléosides ciblant l'hépatite C dans un système réplicon

Nicolas Joubert

► **To cite this version:**

Nicolas Joubert. Synthèse et évaluation de nouveaux nucléosides ciblant l'hépatite C dans un système réplicon. Autre. Université d'Orléans, 2006. Français. NNT : . tel-00250329

HAL Id: tel-00250329

<https://theses.hal.science/tel-00250329>

Submitted on 11 Feb 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE D'ORLEANS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE

Discipline : Chimie et Physico-Chimie des Composés d'Intérêt Biologique

par

Nicolas JOUBERT

SYNTHESE ET EVALUATION DE NOUVEAUX NUCLEOSIDES CIBLANT L'HEPATITE C DANS UN SYSTEME REPLICON

Soutenue publiquement le 20 Décembre 2005

MEMBRES DU JURY

MM.	L.A. AGROFOGLIO	Professeur, Université d'Orléans	<i>Directeur de thèse</i>
	N. PATINO	Maître de Conférences, Université de Nice Sophia-Antipolis	<i>Rapporteur</i>
	C. LEN	Professeur, Université de Poitiers	<i>Rapporteur</i>
	F. ZOULIM	Professeur, INSERM de Lyon	<i>Examineur</i>
	U. ASSELINE	Directeur de recherche, CNRS d'Orléans	<i>Examineur</i>
	P. ROLLIN	Professeur, Université d'Orléans	<i>Président du Jury</i>

A mes amis,

A ma famille,

A mes parents, à mes frères,

A la mémoire de mon frère Sébastien.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Gérard Guillaumet pour m'avoir accueilli au sein de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) de l'université d'Orléans. Je lui exprime ma plus profonde reconnaissance pour sa disponibilité, son écoute attentive, et son soutien tout au long de cette thèse.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur Luigi A. Agrofoglio. Je tiens à lui adresser ma profonde reconnaissance pour m'avoir confié ce thème de recherche passionnant, pour l'aide qu'il m'a apportée tout au long de ces trois années de travail, et surtout pour m'avoir fait confiance. Son regard critique et ses conseils avisés m'ont aidé dans la conduite mais également dans la rédaction de cette thèse.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Professeur Christophe Len (Université de Poitiers) et au Docteur Nadia Patino (Université de Nice Sophia Antipolis) pour avoir accepté de juger ce travail et honoré de leurs présences le jury de cette thèse.

Mes sincères remerciements s'adressent également au Professeur Fabien Zoulim (INSERM de Lyon), Ulysse Asseline (CNRS d'Orléans), et au Professeur Patrick Rollin (Université d'Orléans) pour l'honneur qu'ils me font de siéger dans ce jury.

Je tiens à remercier le Docteur T. Zevaco (GmbH, Inst. Techn. Chemie, Bereich Chemisch-Physikalische Verfahren, D-7601 Karlsruhe, Germany) pour la réalisation d'expériences poussées de RMN qui m'a permis de déterminer les structures de composés décrits dans cette thèse. Mes remerciements vont aussi au Professeur P. Guénot (Université de Rennes) pour la réalisation des HRMS.

J'associe à ces remerciements tous mes collègues de laboratoire présents et passés et particulièrement les Docteurs Vincent Aucagne, Hiroki Kumamoto et Franck Amblard pour leurs conseils pertinents, et les discussions fructueuses échangées tout au long de cette thèse, qui m'ont permis de progresser et de faire avancer mes recherches. Je remercie également mes stagiaires pour leur aide ou leur motivation: Monsieur Vincent Quetglas, Monsieur Alexandre Tournier et Mademoiselle Valérie Poirier. Je remercie Mademoiselle Pauline Peltier et Monsieur Damien Jegourel pour avoir su apporter une très bonne ambiance de travail au sein du laboratoire.

Je remercie également le Docteur Sylvain Routier pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer des vacances de TP à l'IUT d'Orléans, ainsi que tout le personnel de l'IUT pour leur accueil et pour la bonne ambiance de travail. Mes remerciements particuliers vont au Docteur Valérie Bénéteau pour sa gentillesse, sa disponibilité, et son aide qui ont contribué à la bonne réalisation des encadrements de ces TP.

Je remercie également les chargés de communication de l'institut, Laurent Robin et le Docteur Philippe Compain, pour m'avoir fait partager leur passion communicative de la vulgarisation scientifique, et pour l'enrichissement personnel qu'ils ont su m'apporter lors des Journées Portes Ouvertes de l'Université ou lors des Fêtes de la Science.

Je remercie aussi les responsables RMN : les Docteurs Pascal Bouyssou, Philippe Compain, et Franck Suzenet pour avoir partagé leur savoir sur l'utilisation de cet outil formidable qu'est la RMN.

Je tiens à exprimer ma sympathie à tous les membres de l'ICOA présents et passés, et qui font que l'institut est un agréable lieu de vie propice au travail dans la bonne humeur et aux relations humaines enrichissantes, et tout particulièrement aux Docteurs Valérie Desvergues, Philippe Compain, Chrystel Lopin, Valérie Bénéteau et Franck Suzenet.

Mes plus sincères remerciements s'adressent également à la personne ayant participé à la relecture efficace du manuscrit.

Enfin, je remercie profondément les membres de ma famille et mes proches, en particulier mes parents, mes frères, Mesdames Françoise Caron et Colette Barnier, qui m'ont toujours fait confiance et aidé quels que furent mes choix, et pour leur soutien permanent tout au long de cette thèse. Pour finir, je remercie tout particulièrement mon frère Pierre-Alain pour son soutien matériel et logistique.

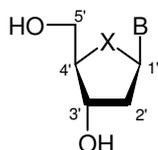
Sigles et abréviations

(COCl) ₂ : chlorure d'oxalyle	dppe : diphénylphosphinoéthane
(PhCN) ₂ PdCl ₂ : dichloro bis(benzonitrile) palladium	dppf : diphénylphosphinoferrrocène
A : adénine	ddpp : diphénylphosphinopropane
Ac : acétyl	d ₄ T : 2',3'-didéhydro-3'-désoxythymidine
Ac ₂ O : anhydride acétique	EC ₅₀ : concentration effective requise pour réduire de 50 % le niveau d'ARN/ADN viral (activité)
AcOH : acide acétique	EC ₉₀ : concentration effective requise pour réduire de 90 % le niveau d'ARN/ADN viral (activité)
AcOEt : acétate d'éthyle	EP : éther de pétrole
AgDCP : perchlorate de di-sym-collidine et d'argent	éq : équivalent
AgNO ₃ : nitrate d'argent	Et : éthyle
ACN : acétonitrile	Et ₂ O : éther diéthylique
ADN : acide désoxyribonucléique	Et ₃ N : triéthylamine
AIBN : 2,2'-azobis(2-méthyl-propionitrile)	EtOH : éthanol
AMT : 3'-amino-3'-désoxythymidine	F.D.A. : food and drugs administration
APTS : acide paratoluènesulfonique	FIAC : 2'-fluoro-5-iodo-1-β-D- arabinofuranosylcytosine
ARN(m) : acide ribonucléique (messenger)	FIAU : 2'-fluoro-5-iodo-1-β-D- arabinofuranosyluracile
ATP : adénosine 5'-triphosphate	FLT : 3'-Fluoro-3'-désoxythymidine
AZT : 3'-azido-3'-désoxythymidine	FMAU : 2'-fluoro-5-méthyl-1-β-D- arabinofuranosyluracile
Bis-(POM) PMEAs : bis (pivaloyloxyméthyl) 9-(2-phosphonylméthoxyéthyl) adénine	(-)-FTC : 5-fluoro-3'-thiacytidine
BrDCP : perchlorate de di-sym-collidine et de bromonium	5-FU : 5-fluorouracile
Bu : butyle	G : guanine
<i>t</i> Bu : <i>tert</i> -butyle	GMP : guanosine 5'-monophosphate
Bu ₃ SnH : hydrure de tributyle étain	GTP : guanosine 5'-triphosphate
BVDU : 5-(2-bromovinyl)-2'-désoxyuridine	HAART : highly active antiretroviral therapy
BVDV : virus de la diarrhée bovine	HEPT : 1-[(2-hydroxyéthoxy)méthyl]-6- (phénylthio)thymine
C : cytosine	HOMO : highest occupied molecular orbitale
CAN : nitrate de cérium et d'ammonium	HRMS : spectrométrie de masse haute résolution
CC ₅₀ : concentration cytotoxique requise pour réduire de 50 % le niveau d'ARN/ADN viral (toxicité)	HNO ₃ : acide nitrique
CEM : cellules de type lymphocytes	HSV-1 et 2 : <i>herpes simplex</i> virus type 1 et 2
CH ₂ Cl ₂ : dichlorométhane	IC ₅₀ : concentration requise pour avoir 50 % d'inhibition d'une enzyme <i>in vitro</i>
CMV : cytomégalo virus	IC ₉₀ : concentration requise pour avoir 90 % d'inhibition d'une enzyme <i>in vitro</i>
CTP : cytosine 5'-triphosphate	IDCP : perchlorate de di-sym-collidine et d'iodonium
CuI : iodure de cuivre	IDU : 2'-désoxy-5-iodouridine
DAST : trifluorure de diéthylaminosulfure	IFN : interféron
db : double brin	IMPDH : <i>Inosine monophosphate</i> <i>déshydrogénase</i>
dba : dibenzylidèneacétone	IMP : inosine 5'-monophosphate
ddA : 2',3'-didésoxyadénosine	IRES : Internal ribosomal entry site (site d'entré ribosomique interne)
ddC : 2',3'-didésoxycytosine	5-IU : 5-iodouracile
ddI : 2',3'-didésoxyinosine	K ₂ CO ₃ : carbonate de potassium
DBU : 1,8-diaza-bicyclo[5.4.0]undéc-7-ène	
DGJ : déoxygalactonojirimicine	
dN : 2'-déoxynucléoside	
DMAP : diméthylaminopyridine	
DMF : diméthylformamide	
DMSO : diméthylsulfoxyde	
DNJ : déoxynojoirimicine	
dppb : diphénylphosphinobutane	

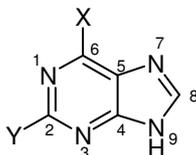
KOH : hydroxyde de potassium
 L-dT : L-thymidine
 LiAlH₄ : hydrure de lithium et d'aluminium.
 LiH : hydrure de sodium
 LUMO : lowest unoccupied molecular orbitale
 mCPBA : acide métachloroperbenzoïque
 Me : méthyle
 MeCN : acétonitrile
 MeOH : méthanol
 MMTr : monométhoxytrityle
 MMTrCl : chlorure de monométhoxytrityle
 MsCl : chlorure de mésyle
 N : nucléoside
 NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
 NAD⁺ : forme oxydée de la NAD
 NADH : forme réduite de la NAD
 NaH : hydrure de sodium
 NaHCO₃ : hydrogénéocarbonate de sodium
 NaN₃ : azoture de sodium
 NaOH : soude
 NaOEt : éthanolate de sodium
 nBu₄NF : fluorure de tétrabutyle ammonium
 ND : non déterminé
 NI : nucleoside inhibitor
 NIH : National Health Institute
 NNI : non-nucleoside inhibitor
 NMP : nucléoside 5'-monophosphate
 NDP : nucléoside 5'-diphosphate
 NTP : nucléoside 5'-triphosphate
 Nu : nucléoside
 obs. : observé
 PBM : cellules mononucléaires du sang périphériques humain
 Pd₂(dba)₃ : palladium tris(dibenzilidène-acétone)
 Pd(0) : palladium au degré d'oxydation 0
 Pd(II) : palladium au degré d'oxydation II
 Pd(PPh₃) : palladium tétrakis triphénylphosphine
 PdCl₂(PPh₃)₂ : chlorure de bis(triphénylphosphine)palladium (II)
 PEG : pégylé
 PNP : *purine nucleoside phosphorylase*
 Ph : phényle
 PhI(OCOCF₃)₂ : Bis-(trifluoroacétoxy)iodobenzène
 Pr : propyle
*i*Pr : isopropyle
 Rdt : rendement
 RdRp : RNA dependent RNA polymerase (ARN polymérase ARN-dépendante)
 RE : réticulum endoplasmique
 RMN : résonance magnétique nucléaire
 SAH : *S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase*
 SATE : S-pivaloyl-2-thioéthyle
 sb : simple brin
 SI : indice de sélectivité
 SIDA : syndrome d'immuno-déficience acquise
 SN₂ : substitution nucléophile de type 2
 T : thymine
 T.A. ou t.a. : température ambiante
 TBAF : fluorure de tétrabutyle ammonium
 TBDMS : tert-butyldiméthylesilane
 3TC : 3'-thiacytidine
 TFA : acide trifluoroacétique
 THF : tétrahydrofurane
 TK : *thymidine kinase*
 T.M. : tamis moléculaire
 TMS : triméthylsilane
 TTMSSH : tris(triméthylsilyl) silane
 U : uracile
 VERO : cellule du callitriche africain
 VHA : virus de l'hépatite A
 VHB : virus de l'hépatite B
 VHC : virus de l'hépatite C
 VIH : virus de l'immunodéficience humaine
 VZV : varicella zoster virus
 XMP : xanthosine 5'-monophosphate

CONVENTIONS ET NOMENCLATURE

Les conventions et règles internationales utilisées pour la nomenclature et la numérotation des nucléosides sont résumées dans le schéma suivant.

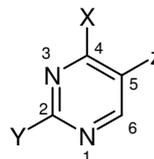


B = base nucléique
X = O, CH₂



Bases puriques naturelles

Adénine (X = NH₂, Y = H)
Guanine (X = OH, Y = NH₂)
Hypoxanthine (X = OH, Y = H)



Bases pyrimidiniques naturelles

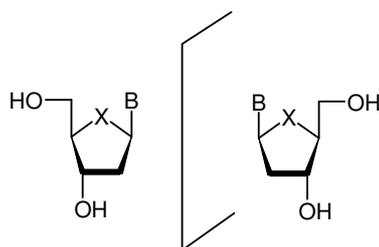
Cytosine (X = NH₂, Y = OH, Z = H)
Thymine (X = OH, Y = OH, Z = CH₃)
Uracile (X = OH, Y = OH, Z = H)

Un substituant est dit en orientation β s'il se trouve en *cis* du groupement 4'-hydroxyméthyle par rapport au plan moyen du sucre ou du cyclopentane. Il est dit en α s'il se trouve en *trans* de cette fonction.

Dans les structures des analogues de nucléosides, les bases puriques (adénine, guanine) ou pyrimidiniques (cytosine, thymine, uracile) peuvent être abrégées respectivement par A, G, C, T, U, tandis que l'abréviation B ou Base est utilisée pour représenter un hétérocycle.

Les bases hétérocycliques sont « classiquement » liées à la partie osidique *via* une liaison N-glycosidique impliquant l'azote N(9) des bases puriques ou N(1) des bases pyrimidiniques.

Enfin, les nucléosides peuvent exister sous deux formes énantiomères, les D-nucléosides dits de « configuration naturelle » et les L-nucléosides appelés nucléosides non naturels.



D-nucléosides

L-nucléosides

X = O, CH₂
B = base nucléique

SOMMAIRE

Introduction générale	15
Chapitre I : L'hépatite C	19
I. Introduction générale sur la chimie antivirale et les nucléosides	21
I.1. Préambule	21
I.2. Introduction générale sur les virus	22
I.3. Enzymes clefs	24
I.3.1. Les kinases	24
I.3.2. Les polymérase	26
I.3.3. L'IMPDH	27
I.4. Nucléosides et analogues en chimiothérapie antivirale	28
I.5. Limites actuelles des chimiothérapies antivirales	31
I.5.1. Métabolisme et biodisponibilité	31
I.5.2. La toxicité et les effets secondaires	34
I.5.3. Les phénomènes de résistance	34
I.6. Conclusion	34
II. Présentation de la maladie et du virus de l'hépatite C	36
II.1. Introduction	36
II.2. La maladie et les limites thérapeutiques	37
II.2.1. La maladie dans le monde et son évolution chez l'individu	37
II.2.2. Symptômes et diagnostic	38
II.2.3. Les co-infections liées au VHC	38
II.2.4. Le traitement actuel et ses limites	39
II.2.5. Conclusion	41
II.3. Description génomique du virus	41
II.4. Identification des cibles thérapeutiques possibles et de leurs inhibiteurs	42
II.5. Méthodes d'évaluation de nouveaux inhibiteurs du VHC	44
II.5.1. Introduction	44
II.5.2. Le réplicon subgénomique	44
II.5.3. Le BVDV et les autres virus	45
II.5.4. La polymérase virale	45
II.5.5. Dernières avancées majeures et perspectives	46
II.5.6. Conclusion	46
III. Présentation des cibles thérapeutiques et de leurs inhibiteurs associés	48
III.1. IRES – Site d'Entrée Ribosomique Interne	48
III.1.1. Description	48
III.1.2. Inhibiteurs	48
III.2. La protéine p7	49
III.2.1. Description	49

III.2.2. Inhibiteurs	49
III.3. La protéine NS3 (au sens large NS2/NS3/NS4A)	52
III.3.1. Description	52
III.3.2. Inhibiteurs	53
III.4. La protéine NS5B	57
III.4.1. Description	57
III.4.2. Inhibiteurs non-nucléosidiques	58
III.4.3. Inhibiteurs nucléosidiques	60
III.4.3.1. Structures de type ribofuranosyle et ses dérivés	60
III.4.3.2. Analogues carbocycliques de la ribavirine de type 1,2,3-triazolo-3'-déoxynucléoside	65
III.4.3.3. Les analogues phosphonates et les pro-drogues de type SATE	66
III.4.3.4. Nouvelles structures émergentes	69
III.5. Conclusion	70

Chapitre II : Synthèse et évaluation biologique de dérivés nucléosidiques 5-haloéthynyl- et 5-(1,2-dihalo)vinyluracile

I. Introduction	73
II. Rappels bibliographiques	76
II.1. La réaction de couplage de Sonogashira	76
II.1.1. Notions sur la chimie du palladium	76
II.1.2. Généralités	77
II.1.3. Mécanisme général	78
II.1.4. Les catalyseurs	78
II.1.5. Les ligands	79
II.1.6. La réaction de Sonogashira en chimie des nucléosides	79
II.1.7. Conclusion	82
II.2. La réaction d'addition d'un dihalogène sur un alcyne	82
II.2.1. Généralités sur l'addition d'un électrophile sur un alcyne	82
II.2.2. Généralités sur l'addition électrophile d'un dihalogène sur une liaison insaturée	83
II.2.3. Etude de la régio- et de la stéréochimie d'une réaction de di-halogénéation sur un alcyne	84
II.2.4. Conclusion	85
III. Nouveaux dérivés en série ribo, 2'-déoxy- et 3'-déoxyribosyle	86
III.1. Synthèse chimique	86
III.1.1. Synthèse des intermédiaires clefs <i>via</i> une réaction de Sonogashira	86
III.1.2. Etape clef de mono-halogénéation d'une triple liaison	88
III.1.3. Etape clef de di-halogénéation d'une triple liaison	89
III.1.4. Déprotection finale	91
III.2. Evaluation biologique	92
III.2.1. Evaluation anti-VHC	92
III.2.2. Evaluation anti-VIH-1	94

III.2.3. Discussion	95
III.3. Conclusion	99
IV. Nouveaux dérivés en série 2',3'-didéoxy-3'-fluororibosyle et 3'-azido-2',3'-didéoxyribosyle	100
IV.1. Introduction	100
IV.2. Synthèse chimique	103
IV.2.1. Synthèse de l'intermédiaire clef <i>via</i> une réaction de Sonogashira	103
IV.2.2. Synthèse de l'intermédiaire clef en série 3'-fluoro	106
IV.2.3. Synthèse des dérivés halogénés en série 3'-fluoro	112
IV.2.4. Synthèse de l'intermédiaire clef en série 3'-azido	113
IV.2.5. Synthèse des dérivés halogénés en série 3'-azido	114
IV.2.6. Déprotection finale	115
IV.3. Evaluation biologique	117
IV.3.1. Evaluation anti-VIH-1	117
IV.3.2. Discussion	117
IV.4. Conclusion	117
V. Nouveaux dérivés en série 2',3'-didéoxyribosyle	118
V.1. Introduction	118
V.2. Synthèse chimique	119
V.2.1. Synthèse du dérivé alcyne <i>via</i> une réaction de Sonogashira	119
V.2.2. Etape clef d'halogénéation d'une triple liaison	123
V.3. Evaluation biologique	124
V.3.1. Evaluation anti-VIH-1	124
V.3.2. Discussion	125
V.4. Conclusion	125
Chapitre III : Synthèse et évaluation biologique de nouveaux dérivés carbocycliques triazoliques de nucléosides	127
I. Introduction et travaux préliminaires	129
II. Synthèse des dérivés 1,2,3-triazoles	132
II.1. Synthèse malonique de l'époxyde alcool	132
II.2. Synthèse de l'hétérocycle triazole <i>via</i> une cycloaddition 1,3 dipolaire	133
II.2.1. Synthèse du dérivé azido diol pour la réaction de cycloaddition	133
II.2.2. Rappel bibliographique sur la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire	134
II.2.3. Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire	136
II.2.4. Synthèse de l'intermédiaire clef iodé	138
II.3. Etape clef de couplage <i>via</i> une réaction de Sonogashira	140
II.4. Déprotection finale	144
III. Synthèse de dérivés de la famille des 8-aza-3-déazapurines	146
III.1. Bibliographie sur la cyclisation intramoléculaire pour l'obtention	

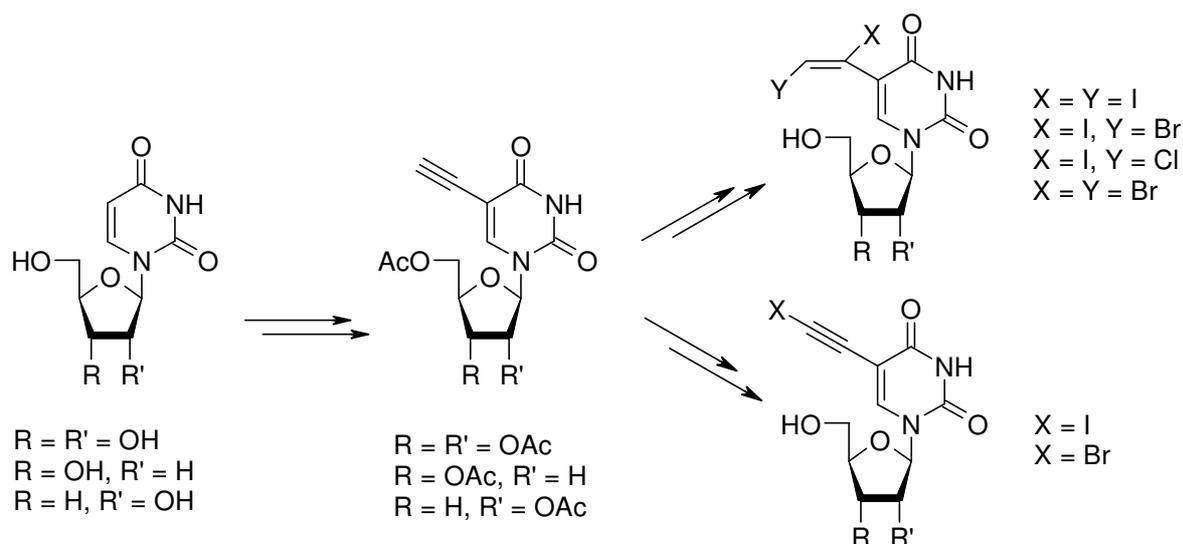
de lactame bicyclique	146
III.1.1. Cyclisation intramoléculaire entre un alcyne et un amide en présence d'une amine	146
III.1.2. Hétéroannulation pallado-catalysée	147
III.2. Réaction monotope de cyclisation intramoléculaire et de déprotection	147
IV. Evaluation biologique	150
IV.1. Introduction	150
IV.2. Evaluation anti-VIH-1	151
IV.3. Discussion	151
IV.4. Conclusion	152
Conclusion générale	153
Partie expérimentale	159
Notes et références bibliographiques	287
Articles et communications par l'auteur sur le sujet	309

Introduction générale

Le virus de l'hépatite C (VHC) a évolué ces dernières années, au même titre que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) avant lui, en passant du stade d'épidémie, à celui de pandémie, pour finalement être caractérisé d'endémie au niveau mondial. Ce virus, qui touche aujourd'hui plus de 170 millions de personnes à travers le monde, soit près de 3 % de la population mondiale, a été suspecté pour la première fois en 1982. Il sera dans un premier temps mal appréhendé, et décrit comme étant responsable des hépatites non-A non-B. Ce n'est qu'en 1989, par clonage génétique, que la structure à ARN du VHC sera clairement identifiée. Un seul traitement combiné, à base de Ribavirine et d'interféron α , a été approuvé contre la maladie qui en résulte, mais il présente de nombreux effets secondaires et limitations. C'est pourquoi le VHC fait l'objet de nombreuses recherches, qui se sont d'abord inspirées des leçons tirées des études menées sur le VIH, puis qui se sont intensifiées et diversifiées au cours de ces dernières années.

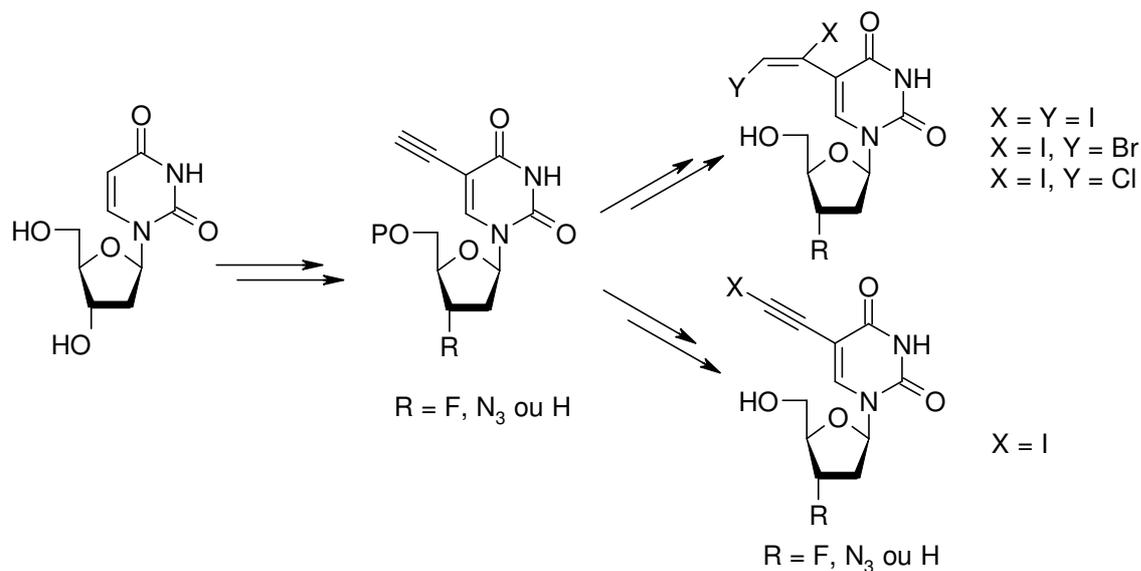
Dans un premier chapitre, une courte approche historique sera dressée pour évoquer la découverte de l'étiologie virale. Elle sera suivie par une description des principales cibles visées pour lutter contre les pathologies associées aux virus, accompagnée d'une présentation du rôle des nucléosides utilisés en chimiothérapie antivirale. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au VHC. Ainsi, une caractérisation plus détaillée de ce virus sera effectuée, incluant la maladie qui en découle, son origine, son traitement et les cibles thérapeutiques qui lui sont associées. De ce fait, nous situerons par rapport au contexte actuel la stratégie antivirale qui a été adoptée au cours de cette thèse pour cibler ce virus.

Alors que de nombreux inhibiteurs nucléosidiques ont été conçus pour inhiber différentes enzymes virales, il n'existait à notre connaissance que très peu de structures nucléosidiques avant 2002, visant l'ARN polymérase ARN-dépendante du VHC. Pour cette raison, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la conception et la synthèse de nouveaux nucléosides ciblant la réplication de l'hépatite C. Ainsi, la deuxième partie de cette thèse exposera les travaux portant sur de nouveaux dérivés de l'uridine possédant une fonction haloéthynyle ou 1,2-dihaloéthynyle sur la position 5 de l'uracile, en série ribosyle, 2'-déoxy- ou 3'-déoxyribosyle.

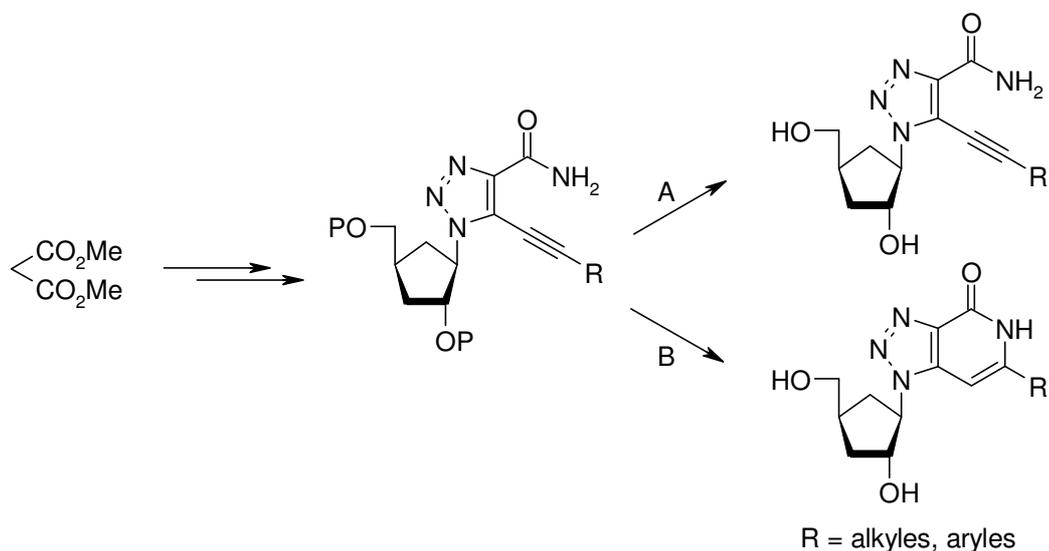


Les résultats des évaluations biologiques mesurées sur ces composés, qui seront exposés et discutés, nous ont conduit à synthétiser des analogues en série 2',3'-

didéoxyribosyle dans le but d'améliorer la sélectivité de certains de nos composés pour les enzymes virales du VHC ou du VIH.



Enfin, si les dérivés ribofuranosyles représentent la majorité des structures nucléosidiques employées en chimiothérapie antivirale, leurs analogues carbocycliques ont également prouvé leur intérêt comme inhibiteur de la réplication de certains virus. C'est pourquoi nous nous sommes également intéressés à cette famille de composés, qui font l'objet du chapitre III, où deux familles de dérivés carbocycliques de la Ribavirine possédant un hétérocycle de type 1,2,3-triazole ou 8-aza-3-déazapurine, ont été synthétisées à l'aide d'un couplage de Sonogashira.



Les activités antivirales des composés synthétisés ont été évaluées en collaboration avec les équipes du Professeur Fabien Zoulim (INSERM-Lyon-France) et du Professeur Raymond F. Schinazi (Veteran Affairs Medical Center-emory University-Atlanta-USA), et seront discutées tout au long de cette thèse.

Chapitre I

L'hépatite C

I. Introduction sur la chimie antivirale et les nucléosides

I.1. Préambule

À la fin des années 1880, et grâce aux travaux de Louis Pasteur et de Robert Koch, la théorie germinale des maladies infectieuses est établie : pour chaque maladie infectieuse on peut trouver un micro-organisme spécifique. Celui-ci est visible au microscope, peut être cultivé sur un milieu nutritif approprié, et est retenu par le filtre Chamberland (figure 1).

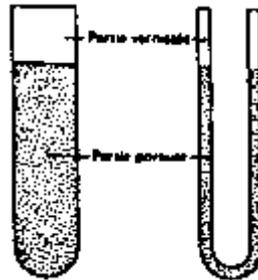


Figure 1 : Filtre de Chamberland : la partie vernissée est en blanc et la partie poreuse en pointillé

Charles Chamberland est un assistant de Pasteur qui cherche à améliorer la qualité bactériologique de l'eau distribuée à Paris. Il invente (en 1884) un filtre de porcelaine (encore appelé le filtre "Chamberland"). Ce filtre retient toutes les bactéries. C'est grâce au filtre Chamberland que l'on va suspecter l'existence d'agents infectieux particuliers et découvrir les virus. Dès 1881, Pasteur a montré que l'agent infectieux responsable de la rage est invisible au microscope et qu'il est impossible de l'isoler sur des milieux de culture artificiels.

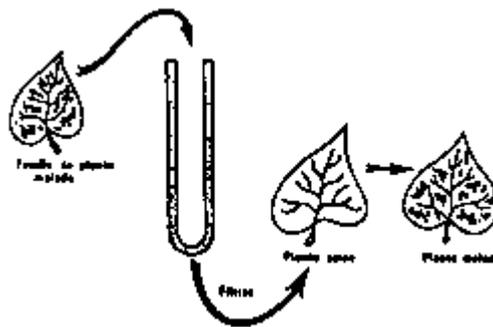


Schéma 1 : Ivanovski (1 fois) - Beijerinck (en série)

En 1892, Ivanovski découvre qu'une maladie du tabac (la mosaïque du tabac) peut être transmise par la sève d'une plante malade passée sur filtre Chamberland et inoculée à une plante saine. Pour lui, l'effet est imputable à une toxine. Plus tenace, Beijerinck poursuit l'expérimentation : en contaminant un troisième plant à partir du second et ainsi de suite, il démontre que l'agent causal n'est pas une toxine mais un nouveau type d'agent infectieux se multipliant dans les cellules de son hôte (schéma 1). C'est un "*contagium virum fluidum*" : un agent ultrafiltrable (1898).

Dès lors, quand ils ne parviennent pas à isoler l'agent responsable d'une maladie présumée infectieuse, les microbiologistes triturent les lésions engendrées au cours de la maladie infectieuse (végétale ou animale) et filtrent la suspension obtenue sur filtre

Chamberland (Schéma 2) : si l'injection du filtrat à une plante ou à un animal sain (de la même espèce que la plante ou l'animal malade) reproduit la maladie, **un virus** en est à l'origine.

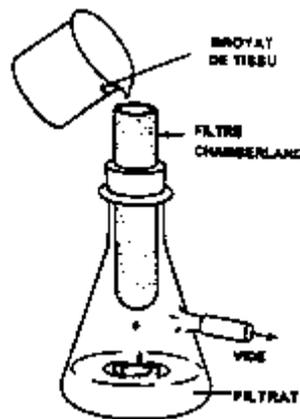


Schéma 2

Rapidement, l'étiologie virale est ainsi démontrée pour de nombreuses maladies : la mosaïque du tabac (sur le végétal) et la fièvre aphteuse (chez l'animal) en 1898, la fièvre jaune en 1903 (chez le singe, l'homme et le moustique), la grippe dès 1918, les poliomyélites dans les années 30, les virus à herpès dans les années 60, le SIDA dans les années 80, les infections opportunistes associées au virus du SIDA dont le cytomégalovirus (CMV) et plus récemment les hépatites B et C. Jusque dans les années 60, la stratégie principale, par ailleurs toujours d'actualité, pour contrôler les infections virales était le développement de vaccins. Cette technique ayant permis entre autres d'endiguer les épidémies de rage, de poliomyélite et de variole. Avec l'identification des acides nucléiques dans la cellule, la découverte de la structure à double hélice de l'ADN et l'identification du code génétique, les chercheurs se sont penchés sur l'étude de molécules capables de bloquer ou de modifier le métabolisme cellulaire. Ainsi, l'idée que ces composés puissent interférer avec un ou plusieurs de ces processus biologiques a conduit à la découverte de plusieurs familles de médicaments. Parmi celles-ci on retrouve les analogues de nucléosides naturels de l'ADN qui se sont avérés de bons agents antiviraux inhibant la synthèse des acides nucléiques.

I.2. Introduction générale sur les virus¹

Le mot « virus » est un terme ancien puisqu'il vient du latin et signifie poison. Un virus est un parasite intracellulaire obligatoire ne pouvant se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule hôte et utilisant sa machinerie cellulaire. Il contient une information génétique sous forme d'ADN ou d'ARN, et une structure de protection souvent protéique, compacte, pour protéger son acide nucléique : la capsid (Figure 2). Cette dernière peut être de symétrie icosaédrique (ou encore hexagonale) ou hélicoïdale (comme le virus de la mosaïque du tabac).

¹ Challand, R.; Young, R. J. *Antiviral chemotherapy*. Spektrum Akademischer Verlag, 1997.

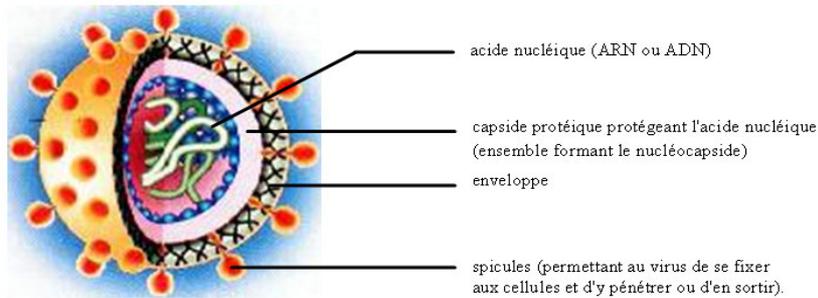


Figure 2 : structure générale d'un virus

La Capside est une structure qui protège le génome du virus (génome qui est souvent de petite taille). Le virus utilise un nombre de gènes minimal pour constituer cette capsidite formée de plusieurs unités répétitives (les protéines de capsidite). La capsidite protège le virion lorsque celui-ci se trouve à l'extérieur. Pour les virus nus (sans enveloppe), c'est elle qui porte les déterminants viraux qui se lient spécifiquement à des récepteurs cellulaires. La capsidite de certains virus peut être entourée d'une enveloppe de même nature lipidique que les cellules infectées. Cette enveloppe porte alors les déterminants viraux (glycoprotéines...) qui se lient aux récepteurs cellulaires de manière spécifique. Après fixation aux récepteurs de la membrane cellulaire, l'enveloppe peut fusionner avec cette membrane et permettre l'introduction de la nucléocapsidite dans la cellule (ex: le virus de l'immunodéficience acquise VIH). Il est important de noter que le caractère enveloppé d'un virus lui confère une certaine fragilité.

Il existe différents types d'acides nucléiques chez les virus : ADN double brin (+/-) linéaire, ADN db circulaire (rare), ADN simple brin (+) (rare), ADN sb (-) (rare), ARN sb (+), ARN sb (-), et ARN sb (+/-) (rare).² Les virus à ARN (+) possèdent la particularité d'avoir un ARN qui peut être immédiatement traduit par les ribosomes en protéines virales qui assurent la réplication du génome virale et la synthèse des protéines de capsidite. Tandis que les virus à ARN (-) ont un génome (ARN) qui doit être préalablement transcrit en ARN (+) (ARNm) par une polymérase virale.

Les virus peuvent être classés selon 4 critères essentiels établis par Lwoff, Horne et Tournier³: la nature du matériel génétique, (c'est à dire le type d'acides nucléiques), le type de symétrie de la capsidite (cubique ou hélicoïdale), le caractère nu (ne possédant pas d'enveloppe) ou enveloppé (possédant une enveloppe autour de la capsidite) et les caractéristiques morphologiques du virion.

Pour se répliquer, les virus doivent pénétrer et prendre le contrôle d'une cellule (cellule hôte) où se trouvent la matière première, les sources d'énergie et les enzymes nécessaires à la multiplication virale : tous les systèmes de la cellule sont canalisés pour fabriquer du virus. Le cycle de multiplication d'un virus peut se décomposer en 4 étapes: **l'attachement**, la **pénétration** avec ou sans décapsidation, la **réplication**, et la **libération**.

² La nature de ce génome permet de faire une première classification de ces virus entre virus à ADN (Adénovirus) et virus à ARN (Rétrovirus): Hsiung, G.D. Use of ultrafiltration for animal virus grouping. *Bacteriol. Rev.* **1965**, 29, 477-486.

³ (a) Lwoff, A. The concept of virus. *J. Gen. Microbiol.* **1957**, 17, 239-253. (b) Lwoff, A.; Horne, R.; Tournier, P. A system of viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1962**, 27, 51-55. (c) Lwoff, A.; Horne, R.; Tournier, P. A virus system. *C. R. Acad. Sci., Paris* **1962**, 254, 4225-4227. (d) Lwoff, A.; Anderson, T.F.; Jacob, F. Remarks on the characteristics of the infectious viral particles. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **1959**, 97, 281-289.

Tout composé pouvant interférer sélectivement avec une de ces étapes, indispensable au cycle de réplication du virus, est un candidat potentiel pour une chimiothérapie antivirale. En ce qui concerne les analogues de nucléosides, ils vont principalement agir sur l'étape de réplication des acides nucléiques, en intervenant au niveau de différentes enzymes clefs dont les polymérases, les kinases, ou bien encore *l'inosine monophosphate déshydrogénase* (IMPDH).

I.3. Les enzymes clefs

I.3.1. Les kinases

Ces enzymes jouent un rôle primordial dans la synthèse d'acides nucléiques.

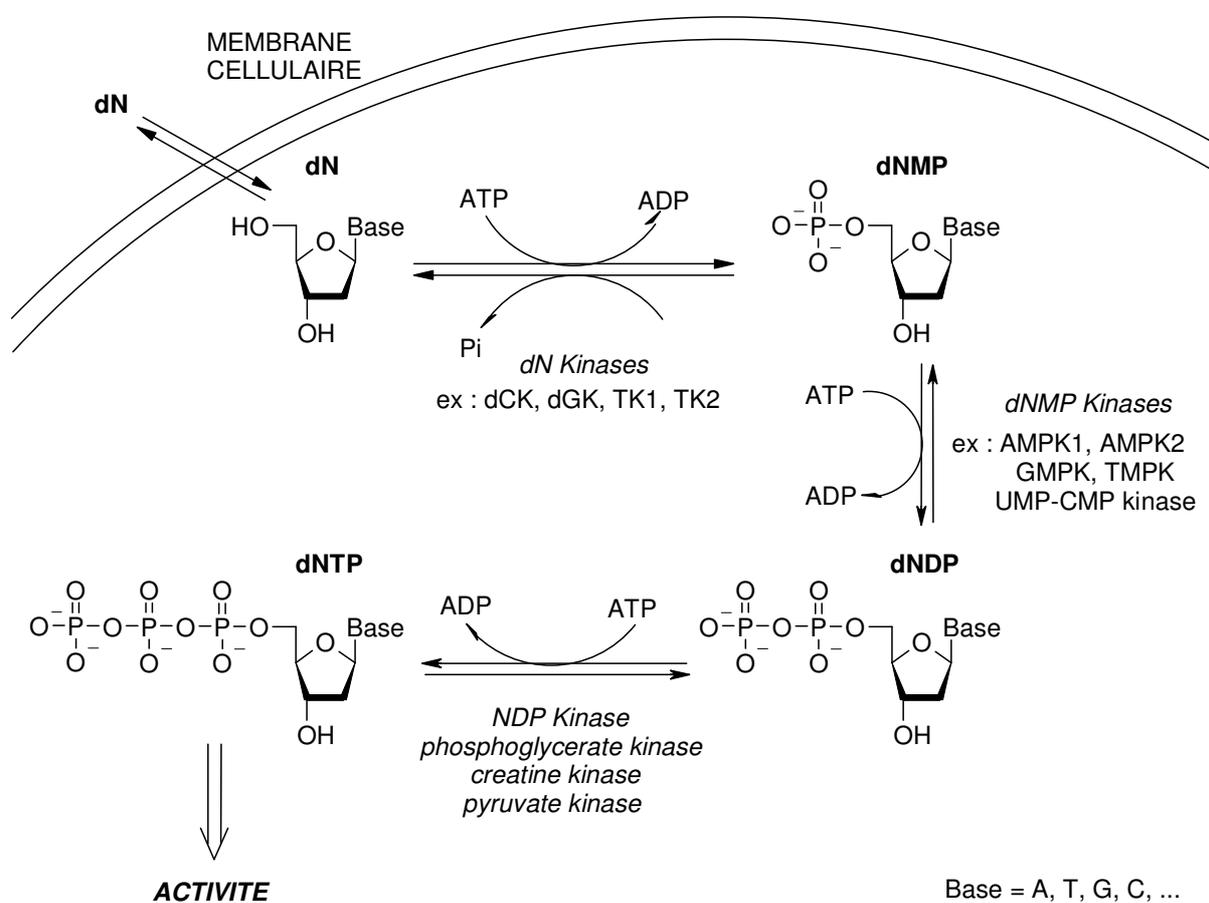


Schéma 3 : Voie cellulaire de récupération pour les nucléosides

En effet, elles catalysent la phosphorylation⁴ du groupement 5'-hydroxyle des nucléosides ou analogues,⁵ en utilisant l'ATP comme source de phosphate pour donner un

⁴ (a) Schlichting, I.; Reinstein, J. Structures of active conformations of UMP kinase from *Dictyostelium discoideum* suggest phosphoryl transfer is associative. *Biochemistry* **1997**, *36*, 9290-9296. (b) Rudolph MG, Veit TJ, Reinstein J. The novel fluorescent CDP-analogue (Pbeta)MABA-CDP is a specific probe for the NMP binding site of UMP/CMP kinase. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2697-2704. (c) Segura-Pena, D.; Sekulic, N.; Ort, S.; Konrad, M.; Lavie, A. Substrate-induced conformational changes in human UMP/CMP kinase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33882-33889.

nucléotide triphosphorylé incorporable à l'acide nucléique en cours d'élongation. En effet, un nucléoside a besoin, après pénétration cellulaire, d'être activé en dérivé monophosphate (NMP) puis diphosphate (NDP) pour donner finalement la forme active : le triphosphate (NTP)⁶ (Schéma 3).

Si toutes les cellules possèdent leurs propres kinases, il existe également des kinases virales qui présentent suffisamment de différences structurales pour en faire des cibles thérapeutiques. Le HSV-1, par exemple, possède une *thymidine* kinase (TK) dont la spécificité de substrat est plus large que celle de l'enzyme cellulaire ; ainsi la TK virale⁷ peut reconnaître non seulement la thymidine mais également la L-thymidine, des dérivés de la guanine, des nucléosides carbocycliques et de nombreux analogues de la 2'-déoxyuridine substituée sur la base en position 5.

- les virus possédant une kinase (TK⁺)

Ces virus, dont la plupart fait partie de la famille des herpès, possèdent leur propre kinase, ce qui donne la possibilité de trouver des molécules sélectives de cette enzyme, donc d'une cellule infectée. Le meilleur exemple de cette sélectivité est l'acyclovir **1**, dérivé acyclique de la guanosine, qui a la particularité d'être uniquement substrat de la *thymidine* kinase virale du HSV-1 et 2 et du VZV et non des kinases de la cellule hôte (Schémas 4 et 5). De ce fait, sa phosphorylation et l'intégration de sa forme triphosphate dans l'ADN ne peut avoir lieu que dans des cellules infectées (HSV⁺). L'acyclovir sous sa forme triphosphorylée va alors agir en tant que terminateur de chaîne entraînant l'arrêt de la synthèse de l'ADN viral.

ACYCLOVIR DANS UNE CELLULE HOTE NON INFECTEE

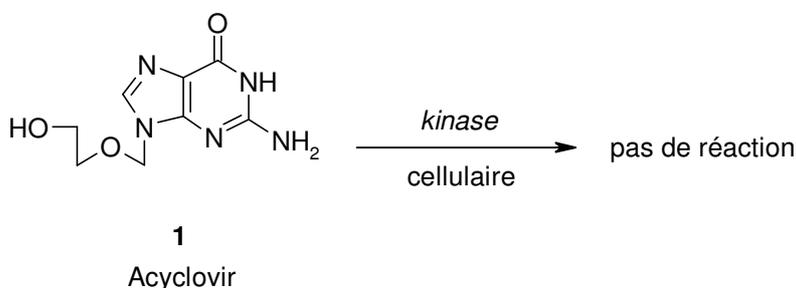


Schéma 4.

⁵ (a) Lavie, A.; Vetter, I.R.; Konrad, M.; Goody, R.S.; Reinstein, J.; Schlichting, I. Structure of thymidylate kinase reveals the cause behind the limiting step in AZT activation. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 595-597. (b) Muller, H.C.; Meier, C.; Balzarini, J.; Reinstein, J. Novel nucleotide analogues as potential substrates for TMPK, a key enzyme in the metabolism of AZT. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **2003**, *22*, 821-823. (c) Pasti, C.; Gallois-Montbrun, S.; Munier-Lehmann, H.; Veron, M.; Gilles, A.M.; Deville-Bonne, D. Reaction of human UMP-CMP kinase with natural and analog substrates. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1784-1790.

⁶ Il est important de noter que la forme active est souvent le triphosphate. Cependant, cette forme, tétrachargée à pH physiologique, ne peut franchir les membranes lipidiques des cellules. Le nucléoside est transformé par la machinerie cellulaire en son analogue triphosphorylé. Il en résulte donc une absence ou une réelle difficulté à établir des relations structure-activité entre les NTP et les cibles virales.

⁷ Spadari, S.; Maga, G.; Focher, F.; Cianocchi, G.; Manservigi, R.; Arcomone, F.; Capobianco, M. Carcuro, A.; Colonna, F.; Iotti, S. Garbesi, A. L-Thymidine is phosphorylated by herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and inhibits viral growth. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4214-4220.

ACYCLOVIR DANS UNE CELLULE HSV+

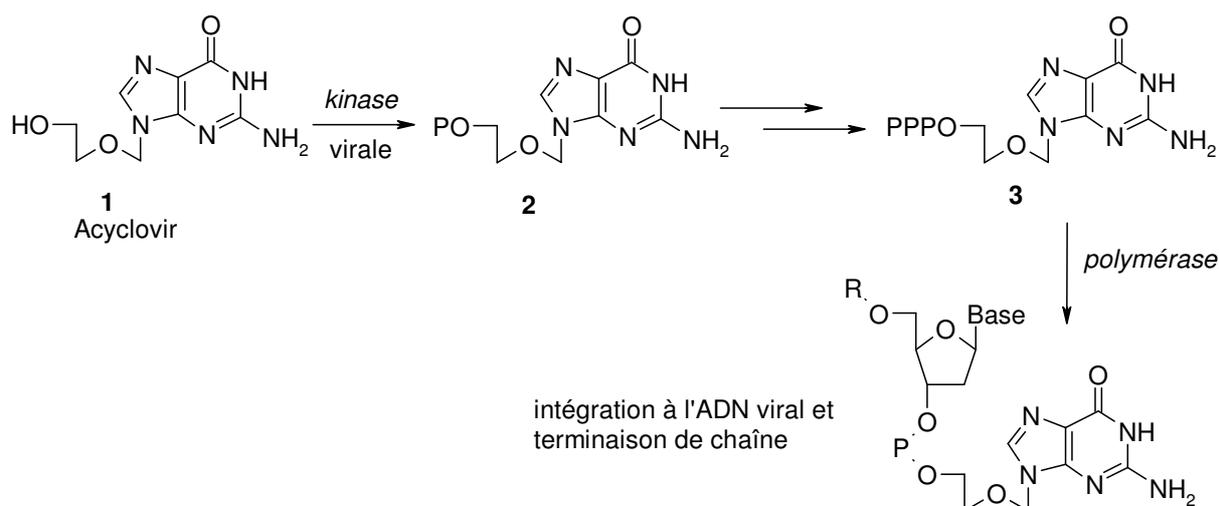


Schéma 5.

- les virus dépourvus de kinases (TK⁻)

Ces virus (le VIH, le VHB, la grippe ...) ne possèdent pas leurs propres kinases, ce qui les contraint à utiliser les enzymes cellulaires. Dans le cas où la molécule à tester n'est pas substrat de la kinase cellulaire, il n'y aura aucune phosphorylation et le composé sera considéré comme inactif et *a priori* non toxique. Dans le cas contraire, il y aura formation du triphosphate qui pourra soit inhiber la polymérase de la cellule hôte entraînant alors une toxicité, soit inhiber uniquement la polymérase virale (cas du médicament idéal). En réalité, la plupart des composés sont à la fois substrats des polymérases virales et cellulaires. L'activité éventuelle provient donc d'une compétition entre l'inhibition des deux enzymes.

I.3.2. Les polymérases

Une fois triphosphorylés, les nucléosides peuvent alors être substrats de polymérases (ADN ou ARN dépendantes) et incorporés à l'acide nucléique en cours d'élongation.

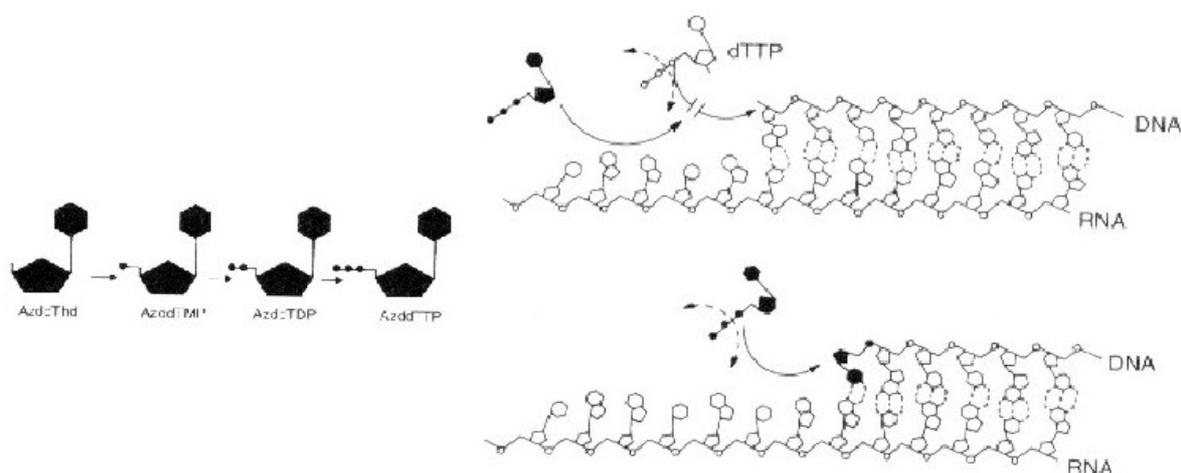


Schéma 6. Mécanisme d'action des 2',3'-didéoxynucléosides (ici l'AZT) comme terminateur de chaînes

Cette élongation peut être stoppée par l'incorporation d'un analogue nucléosidique sous la forme triphosphorylée inhibant la polymérase virale elle-même ou agissant comme terminateur de chaînes (Schéma 6).

Du fait de l'existence de polymérases virales (VHC, VIH, VHB) (Figure 3) mais également de polymérases cellulaires,^{8a} l'activité d'une molécule provient, d'une différence d'affinité entre les deux types d'enzymes, et l'absence de sélectivité d'un composé entraîne le plus souvent des phénomènes de toxicité.

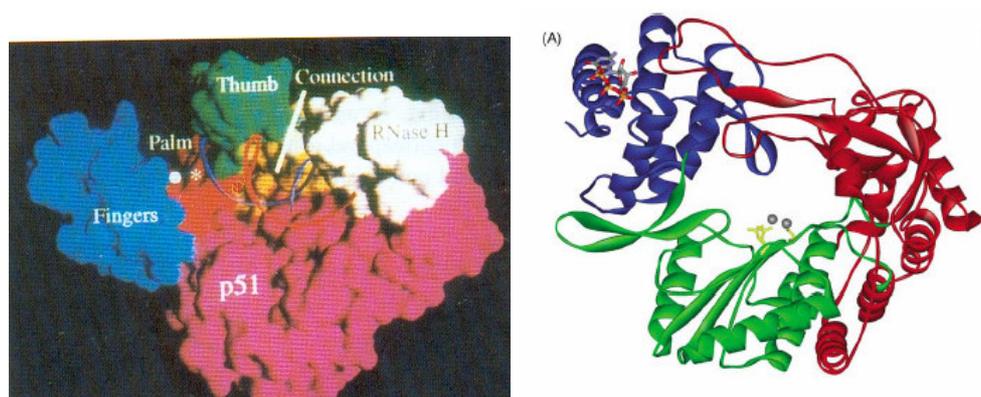


Figure 3. La transcriptase inverse du VIH^{8b} (à gauche) et le domaine NS5B de la polymérase du VHC^{8c} (à droite), cibles privilégiées dans les thérapies antivirales.

I.3.3. L'IMPDH

Il existe d'autres enzymes cellulaires pouvant être des cibles potentielles d'une chimiothérapie antivirale. Par exemple, l'*inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH)* est une enzyme qui catalyse l'étape limitante de la biosynthèse *de novo* de GTP^{9,10} (Schéma 7): la réduction de l'inosine 5'-phosphate en xanthosine 5'-phosphate :



L'*IMPDH* est une enzyme clef associée à la prolifération cellulaire, et peut être considérée comme une cible potentielle pour la chimiothérapie anticancéreuse.

En chimiothérapie antivirale, il a été montré que l'inhibition de l'*IMPDH* par la ribavirine jouait un rôle dans l'activité anti-VHC de la ribavirine,¹¹ mais que cet effet pris seul

⁸ (a) Il existe au moins 4 types distincts de polymérases à ADN, désignées, par ordre de découverte par les lettres α , β , γ , δ . L' α , le β et le δ sont situées dans le noyau tandis que le γ se trouve dans les mitochondries. (b) De Clercq, E. New perspectives for the treatment of HIV infection. *Collectz. Czech. Chem. Commun.* **1998**, 63, 449-479. (c) De Francesco, R.; Tomei, L.; Altamura, S.; Summa, V.; Migliaccio, G. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* **2003**, 58, 1-16.

⁹ Magasanik, B., Moyed, H.S. and Gehring, L.B. Enzymes essential for the biosynthesis of nucleic acid guanine; inosine 5'-phosphate dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.* **1957**, 226, 339-350.

¹⁰ Turner, J.F. and King, J.E. Inosine 5-phosphate dehydrogenase of pea seeds. *Biochem. J.* **1961**, 79, 147-151.

¹¹ Zhou, S.; Liu, R.; Baroudy, B.M.; Malcolm, B.A.; Reyes, G.R. The effect of ribavirin and *IMPDH* inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* **2003**, 310, 333-342.

n'est pas suffisant pour produire un effet anti-VHC significatif. L'inhibition de l'*IMPDH* peut également permettre de cibler des poxvirus (dont la variole).^{12,13}

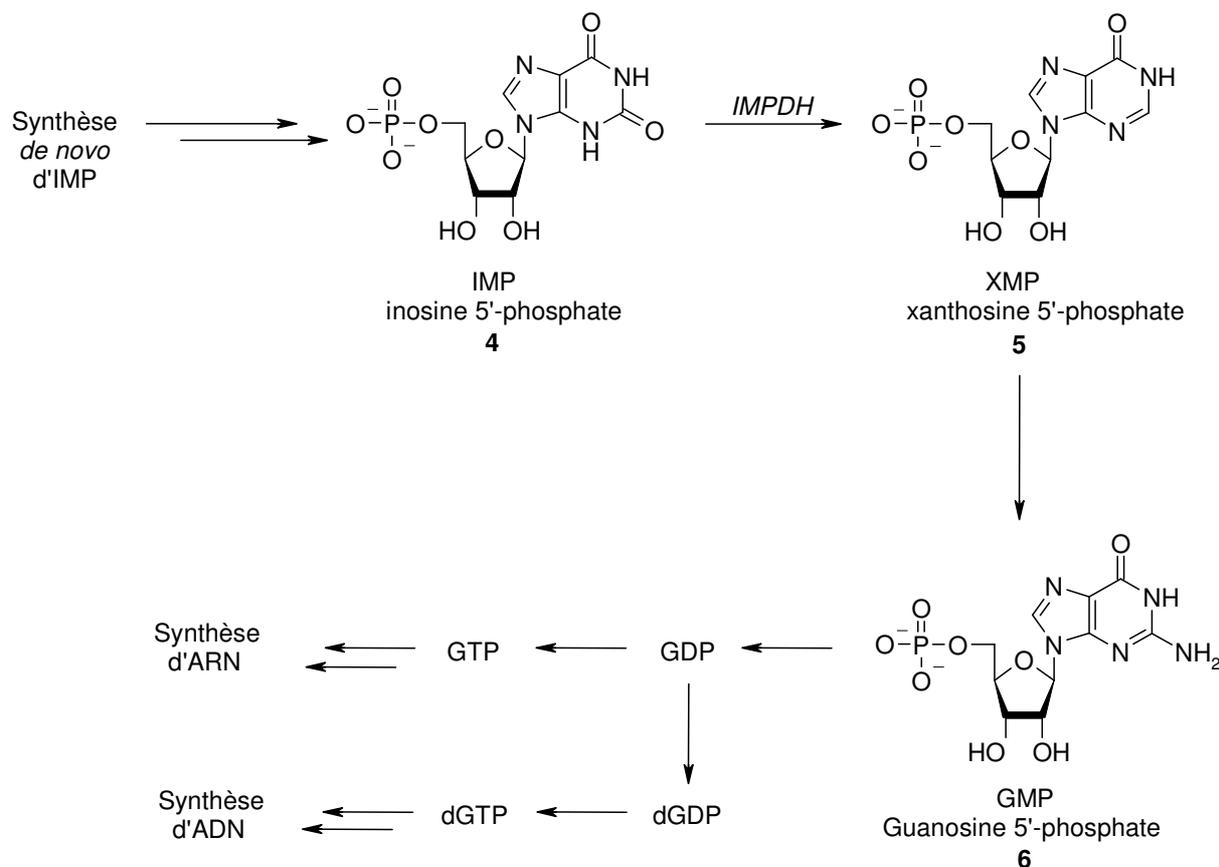


Schéma 7 : biosynthèse *de novo* de GTP : l'*IMPDH* catalyse la réduction de l'inosine 5'-phosphate en xanthosine 5'-phosphate

Toute la difficulté de la chimiothérapie antivirale réside dans la capacité d'inhiber la synthèse des constituants viraux sans perturber gravement les synthèses cellulaires.

I.4. Nucléosides et analogues en chimiothérapie antivirale

Un des premiers analogues de nucléosides possédant une activité antivirale intéressante fut la β -D-5-iodo-2'-déoxyuridine (IDU **7**) décrite par Prussof *et coll.*¹⁴ au début des années 60. Ce composé a été utilisé dans le traitement de certaines infections herpétiques mais son utilisation n'a pas été poursuivie à cause de son manque de sélectivité et des effets secondaires intolérables en utilisation systématique.

¹² Baker, R.O.; Bray M.; Huggins, J.W. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. *Antiviral Res.* **2003**, *57*, 13-23.

¹³ Neyts, J.; De Clercq, E. Therapy and short-term prophylaxis of poxvirus infections: historical background and perspectives. *Antiviral Res.* **2003**, *57*, 25-33.

¹⁴ Prussof, W. H. Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochem. Biophys. Acta* **1959**, *32*, 295-296.

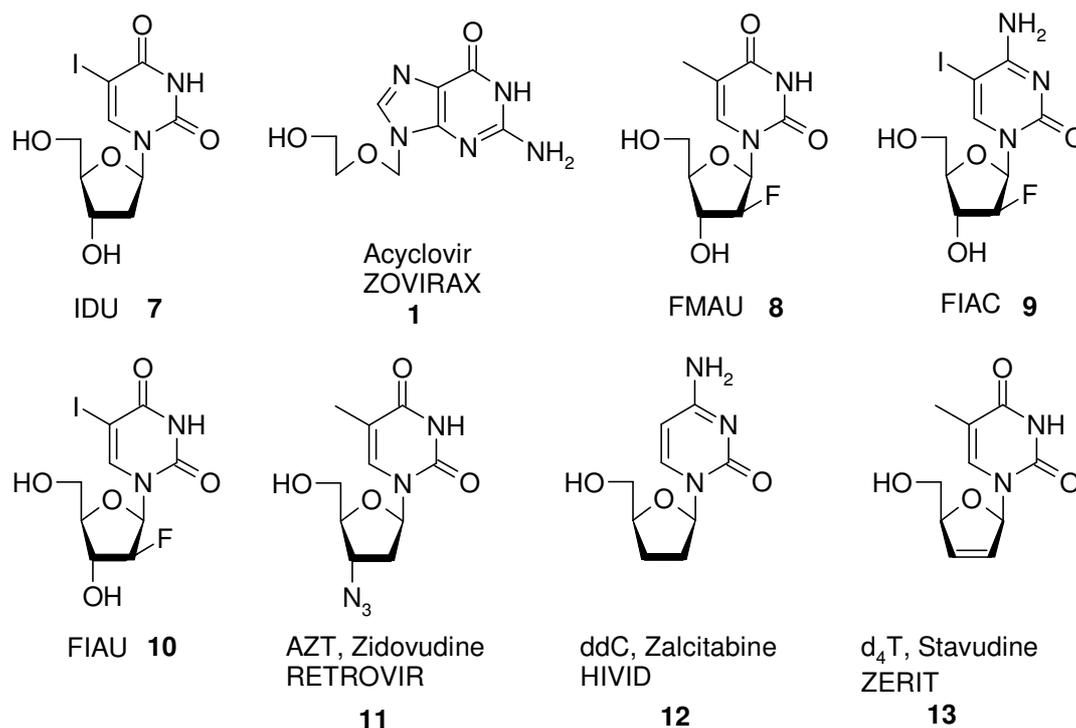


Figure 4.

En 1977, l'activité anti-herpétique et la sélectivité de l'acyclovir **1**¹⁵ découvert par De Miranda *et coll.* ont bouleversé la recherche antivirale et provoqué un engouement sans précédent pour les acyclonucléosides. Depuis, la recherche de nouveaux nucléosides possédant des activités antivirales ou antitumorales a été largement explorée, guidée par le désir d'obtenir une molécule beaucoup plus active et dépourvue de toxicité (Figure 4). Ainsi, sont apparus, les β -D-arabino nucléosides, incluant des composés comme la 2'-fluoro-5-iodo-1- β -D-arabinofuranosyl cytosine (FIAC) **9**, le 2'-fluoro-5-méthyl-1- β -D-arabinofuranosyl uracile (FMAU) **8** et le 2'-fluoro-5-iodo-1- β -D-arabinofuranosyl uracile (FIAU) **10** qui possèdent des activités anti-HSV.¹⁶

L'intense effort international résultant de l'émergence du virus du SIDA dans les années 80 a ensuite permis le développement de plusieurs inhibiteurs d'une des étapes de répllication de ce virus dont par exemple des 2',3'-didéoxynucléosides¹⁷ comme la 3'-azido-

¹⁵ (a) De Miranda, P.; Elion, G.; Bauer, D. J.; Collins, P.; Schaeffer, J. H.; Beauchamp, L. 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* **1978**, *272*, 583-585. (b) Elion, G. B.; Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; De Miranda, P.; Beauchamp, L.; Schaeffer, H. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxyméthyl)guanine. *J. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **1977**, *74*, 5716-5220. (c) Furman, P. A.; St. Clair, M. H.; Fyfe, J. A.; Rideout, J. L.; Keller, P. M.; Elion, G. B. Inhibition of herpes simplex virus-induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by 9-(hydroxyethoxyméthyl) guanine and its triphosphate. *J. Virol.* **1979**, *32*, 72-77.

¹⁶ (a) Brodfuehrer, P.; Brundige, S.; Howell, J.; Howell, H.; Sapino, C.; Tann, C. Fluorocarbohydrates in synthesis. An efficient synthesis of 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil (β -FIAU) and 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)thymine (β -FMAU). *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3644-3647. (b) Fox, J.; Schinazi, R.; Su, T.-L.; Watanabe, K. Synthesis and antiviral effects of several 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-5-alkyluracils. Some structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 151-154. (c) Beningni, D.; Brodfuehrer, P.; Brundidge, S.; Howell, H.; Sapino, C. Antiviral nucleosides. A stereospecific, total synthesis of 2'-fluoro-2'-deoxy- β -D-arabinofuranosyl nucleosides. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 85-88.

¹⁷ (a) Furman, P. A.; Fyle, J. A.; St. Clair, M. H.; Weinhold, K.; Rideout, J. L.; Freeman, G. A.; Nusinoff-Lehrmann, S.; Bolognesi, D. P.; Broder, S.; Mitsuya, H.; Barry, D. W. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse

3'-déoxythymine (AZT) **11**, la 2',3'-didéoxycytidine (ddC) **12** et la 2',3'-didéoxyinosine (ddI) **13**.

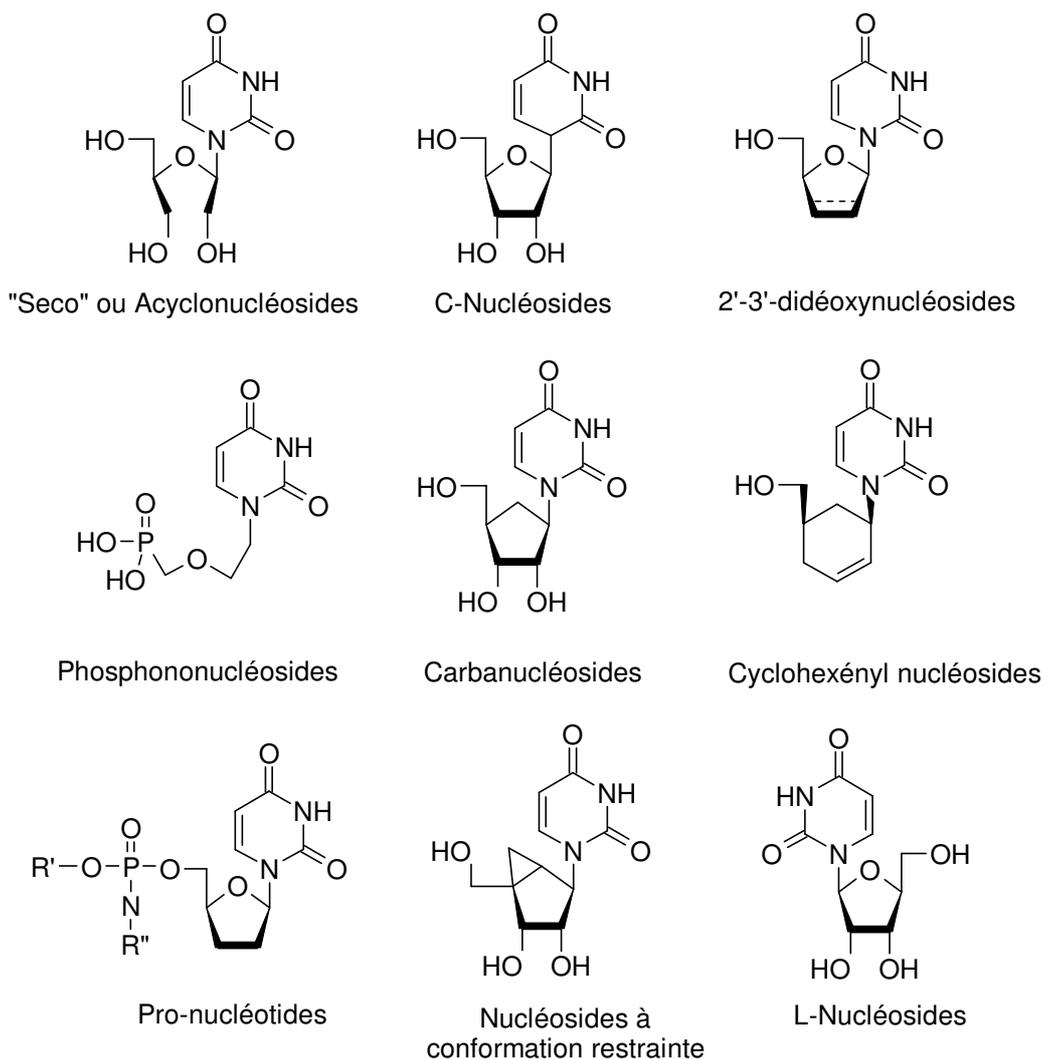


Figure 5.

Globalement, depuis maintenant près de 50 ans, de nombreuses modifications structurales ont été réalisées tant sur la base que sur la partie osidique¹⁸ afin de découvrir de nouvelles molécules plus actives et moins toxiques (Figure 5). Ces dérivés peuvent être classés en diverses familles (Figure 5) qui s'appuient sur un rationnel biologique ou thérapeutique. Malgré les succès rencontrés en la matière, la recherche de nouvelles structures actives se heurte à de nombreuses limitations.

transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, 83, 8333-8337. (b) Collier, A. C.; Bozzette, S.; Combs, R. W. A pilot of low dose zidovudine in human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **1990**, 323, 1015-1021. (c) Yarchoan, R.; Thomas, R. V.; Allain, J.-P.; McAtee, N.; Duminski, R.; Mitsuya, H.; Lawley, T. J.; Safai, B.; Myers, C. E.; Perno, C. F.; Keecker, R. W.; Wills, R. J.; Fischl, M. A.; MacNeely, M. C.; Pluda, J. M.; Leuther, M.; Collins, J. M.; Broder, S. Phase I studies of 2',3'-dideoxycytidine in severe human immunodeficiency virus infection as a single agent and alternating with zidovudine (AZT). *Lancet.* **1988**, 1, 76-81. (d) Lin, T.-S.; Schinazi, R. F.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, 36, 2713. (e) De Clercq, E. Chemotherapeutic approaches to the treatment of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1561-1569.

¹⁸ Ichikawa, E.; Kato, K.; Sugar-modified nucleosides in past 10 years, a review. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 385-423.

I.5. Limites actuelles des chimiothérapies antivirales

I.5.1. Métabolisme et biodisponibilité

Pour une substance active, entre la quantité délivrée au site actif Q' et la quantité administrée Q, une grande différence est souvent constatée due à des problèmes de métabolisme et de biodisponibilité de la molécule considérée (Tableau 1).

Site d'administration	Barrière biologique	Tissus	Cellules	Compartiments subcellulaires
Profil de libération Q Solubilité Stabilité	Diffusion Stabilité	Spécificité Effets secondaires	Pénétration Spécificité	

Tableau 1.

Des stratégies “prodrogues” ont été développées afin de contourner les problèmes liés à la biodisponibilité des nucléosides et de leurs analogues dérivés phosphates ou phosphonates. Certaines prodrogues contournent la monophosphorylation (Schéma 8).

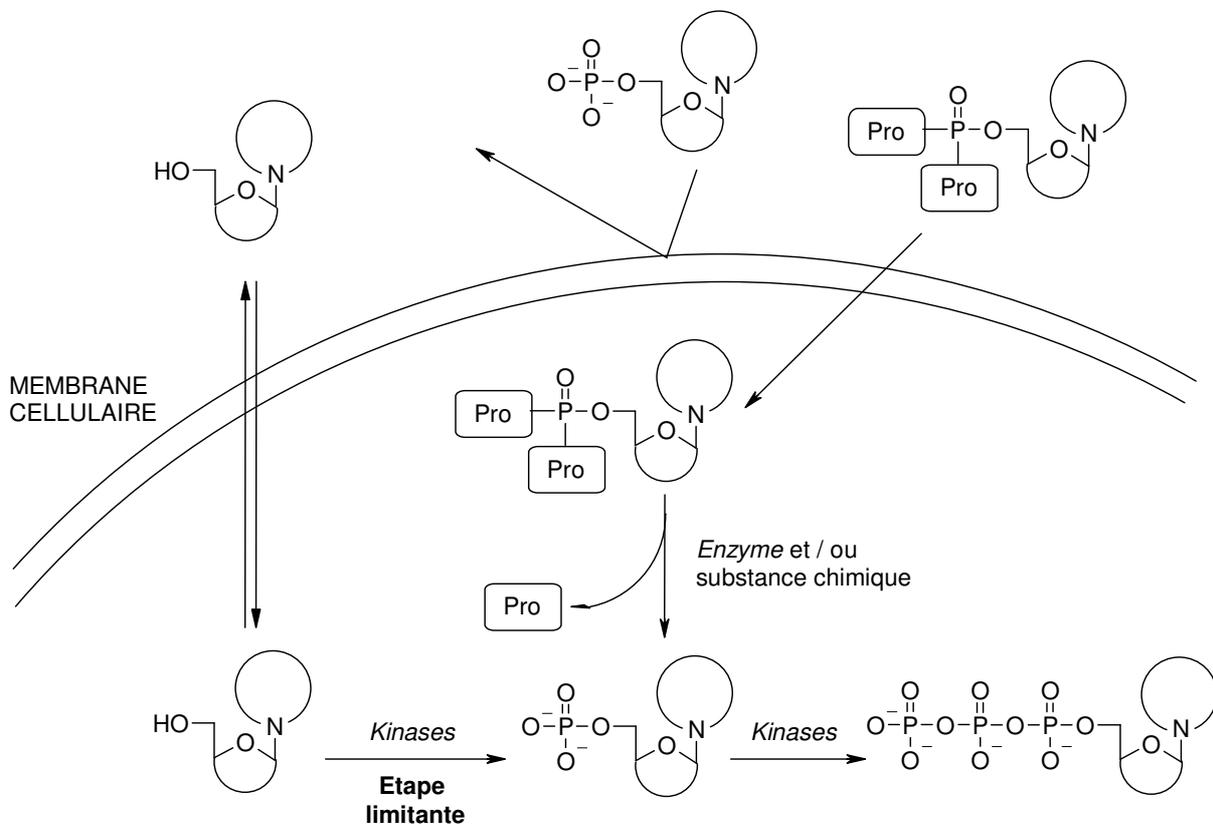


Schéma 8.

En effet, du fait de leur caractère dichargé à pH physiologique, les phosphononucléosides ou les nucléosides monophosphates sont peu ou pas capables de traverser la membrane cellulaire. Une stratégie prodrogue permet alors de contourner ce problème en masquant le phosphate ou le phosphonate sous forme d'esters afin d'obtenir un composé neutre et lipophile. Ces dérivés pro-nucléotides¹⁹ doivent alors répondre à deux critères (Schéma 8):

- être suffisamment lipophile pour passer la membrane cellulaire.
- être capable de délivrer le nucléoside en milieu intracellulaire après hydrolyse enzymatique tout en relarguant un groupement non toxique.

Ainsi la protection temporaire de ces fonctions sous forme de phosphotriesters ou de dialkylphosphonates clivables en milieu intracellulaire par des estérases a permis la mise en avant de composés comme le bis-(POM) PMEa (ou Adéfovir dipivoxil) **14** ou le phosphoramidate **15**, prodrogue du d4T, développé par McGuigan²⁰ (Figure 6).

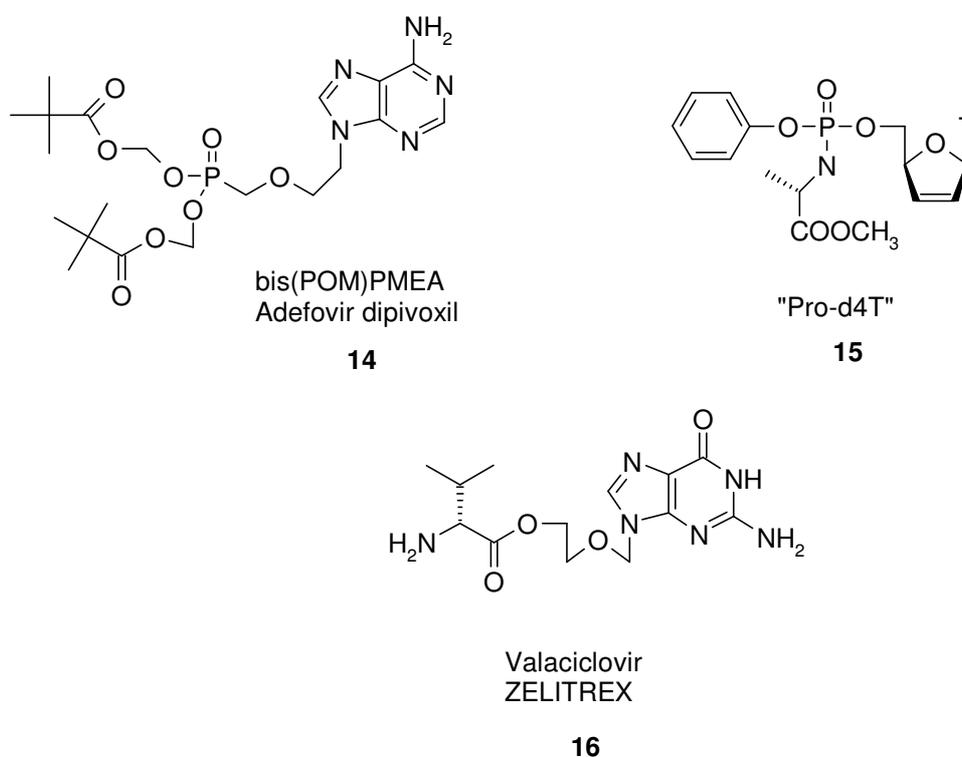


Figure 6.

D'autres prodrogues augmentent la biodisponibilité. Même si l'acyclovir est l'agent anti-herpétique le plus actif, son absorption orale est très pauvre puisqu'elle n'excède pas 15 à

¹⁹ (a) Meier, C. Pro-Nucleotides-recent advances in the design of efficient tools for the delivery of biologically active nucleoside monophosphates. *Synlett* **1998**, 233-242. (b) Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417-451.

²⁰ (a) Siddiqui, A.; McGuigan, C.; Ballatore, C.; Zuccotto, F.; Gilbert, I.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Design and synthesis of lipophilic phosphoramidate d4T-MP prodrugs expressing high potency against VIH in cell culture: Structural determinants for in vitro activity and QSAR. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4122-4128. (b) Saboulard, D.; Naesens, L.; Cahard, D.; Salgado, A.; Pathirana, R.; Velazquez, S.; McGuigan, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Characterization of the activation pathway of phosphoramidate triester prodrugs of stavudine and zidovudine. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 693-704.

20% de la dose. Ainsi le Valaciclovir **16**, prodrogue de type 5'-O-valinylester, est intracellulairement clivé en Acyclovir par les estérases circulantes.

En plus de ces problèmes de biodisponibilité, les analogues de nucléosides peuvent être rapidement métabolisés par diverses enzymes cellulaires telles que des phosphorylases, des déaminases, etc (Schéma 9).

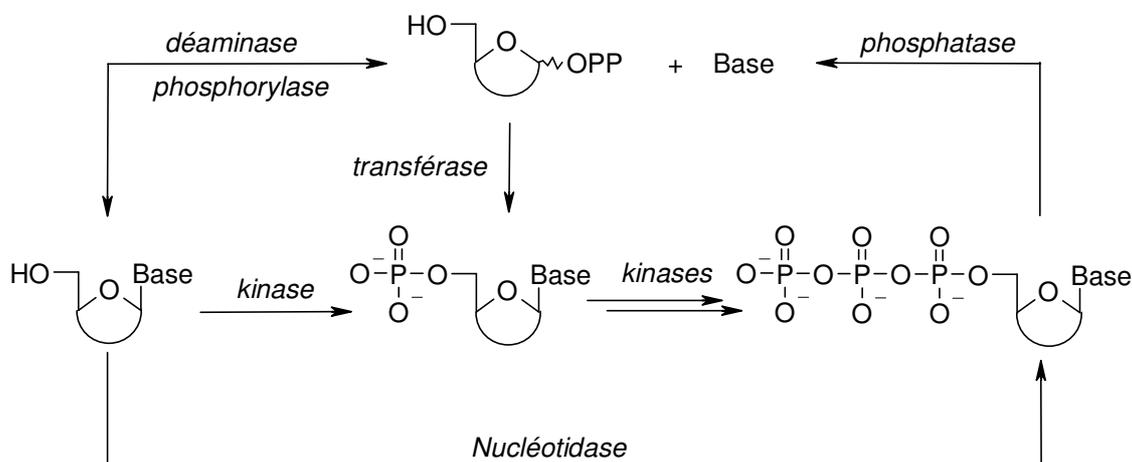


Schéma 9.

Le BVDU **17**, agent antiherpétique, fournit une assez bonne illustration de cette limitation. En effet, il est à la fois substrat des kinases virales et/ou cellulaires mais également de la *purine nucléoside phosphorylase* (PNP) cellulaire. Cette enzyme clive rapidement la liaison *N*-glycosidique rendant immédiatement ce composé inutilisable (Schéma 10).

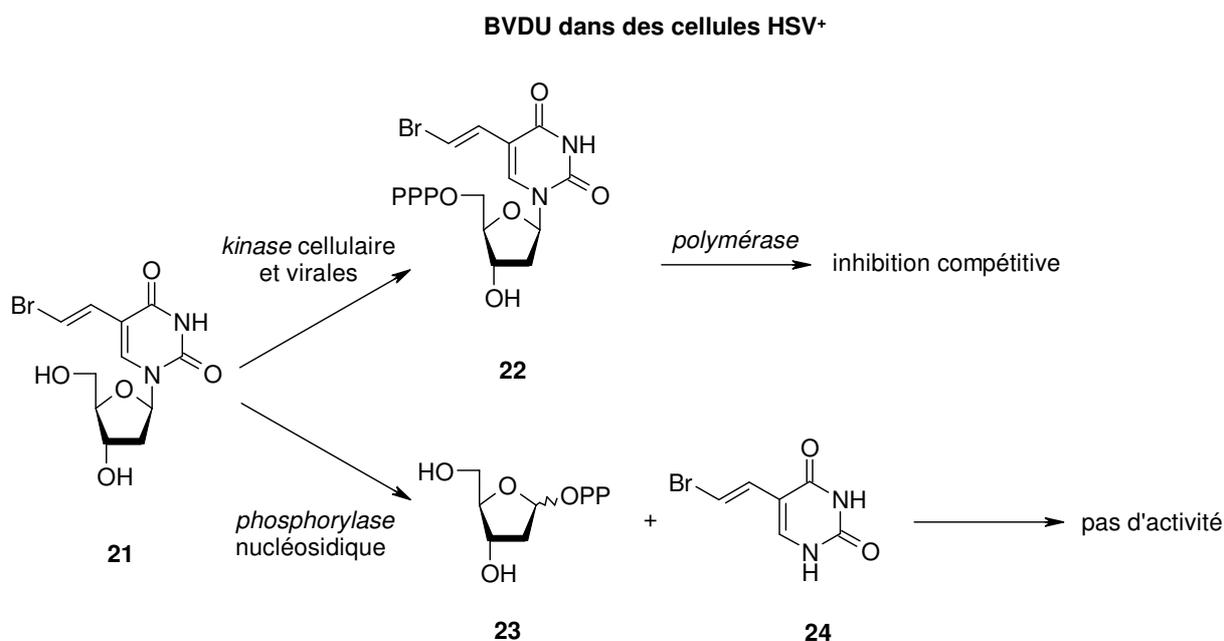


Schéma 10.

I.5.2. La toxicité et les effets secondaires

Tous les nucléosides utilisés dans les différentes thérapies antivirales n'inhibent pas sélectivement le processus viral et entraînent donc différents effets secondaires indésirables. L'AZT par exemple utilisé dans le traitement du SIDA, possède une très faible biodisponibilité et son principal catabolite est le 5'-glucuronide dérivé inactif. Cependant, des études complémentaires sur son métabolisme ont permis l'identification de deux autres catabolites formés dans les cellules hépatiques: la 3'-amino-3'-déoxythymidine (AMT) et son glucuronide conjugué (le 3'-amino-3'-déoxythymidine-glucuronide).^{21a} L'AMT se trouve être un métabolite nocif qui entraîne des toxicités au niveau de la moelle osseuse et induit donc des neutropénies. En outre, le traitement prolongé au moyen d'AZT induit une destruction des mitochondries. La ddC qui est l'un des plus puissants inhibiteurs du VIH cause également des effets secondaires comme des neuropathies périphériques.^{21b} Sa toxicité provient de la réduction du taux d'ADN mitochondrial cellulaire après inhibition de l'ADN polymérase γ dans les mitochondries ($K_i = 0,016 \mu\text{M}$).^{21c,d} Enfin, on peut également parler du d4T, dont le catabolisme génère la base hétérocyclique et un sucre toxique au niveau de la moelle osseuse entraînant là encore des neuropathies périphériques. Les solutions à ces problèmes restent uniquement palliatives, c'est à dire que l'on fait prendre au malade d'autres médicaments afin d'annuler les effets secondaires des précédents.

I.5.3. Les phénomènes de résistance

Tous les inhibiteurs de virus engendrent des résistances dues à la variabilité génétique des virus. Par exemple dans le cas du VHC, on observe jusqu'à 10^{20} mutations/jour. Le développement de ces résistances diminue l'efficacité clinique des médicaments. Afin d'essayer de limiter ce phénomène et d'attaquer plusieurs sites de réplication virale en même temps, les traitements combinent, depuis quelques années, plusieurs agents antiviraux. Dans le cas du VIH, ces thérapies connues sous le nom de polythérapies (trithérapies) ou HAART « highly active antiretroviral therapy » associent un inhibiteur de la protéase et deux de la transcriptase inverse.

I.6. Conclusion

Avec maintenant environ 40 molécules officiellement approuvées, les analogues de nucléosides sont l'un des grands succès de la chimiothérapie antivirale. Ils représentent actuellement des armes puissantes dans la panoplie thérapeutique du SIDA, des hépatites et de l'herpès. Cependant, de nombreux problèmes persistent quant à leurs utilisations (toxicité, résistance, etc.) ce qui rend nécessaire la découverte de nouvelles molécules originales, quel que soit le virus visé.

²¹ (a) Cretton, E.; Schinazi, R.-F.; McClure, H.; Anderson, D.; Sommadossi, J.-P. Pharmacokinetics of 3'-azido-3'-deoxythymidine and its catabolites and interactions with probenecid in rhesus monkeys. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 801-807. (b) Les neuropathies périphériques se manifestent sous la forme de fourmillements des extrémités, des sensations de brûlure et des crampes. (c) Chen, C. H.; Cheng, Y. S. Delayed cytotoxicity and selective loss of mitochondrial DNA in cells treated with the anti-human immunodeficiency virus compound 2',3'-dideoxycytidine. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11934-11937. (d) Starnes, M. C.; Cheng, Y. C. Cellular metabolism of 2',3'-dideoxycytidine, a compound active against human immunodeficiency virus in vitro. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 988-991.

Depuis le début des années 1980, les études menées sur le VIH ont permis le développement extraordinaire de la chimie antivirale. Ce virus atteint aujourd'hui 43 millions de personnes dans le monde. Devant l'échec des différentes monothérapies, et au fur et à mesure que la compréhension de son cycle de répllication s'améliorait, les scientifiques sont arrivés à la conclusion qu'il fallait cibler non pas une, mais plusieurs étapes de la répllication. C'est cette observation qui a conduit à la conception puis à l'utilisation des trithérapies dans le traitement du SIDA.

Parallèlement au VIH se sont développés des virus tels que le VHA ou le VHB. Dès 1982, on va suspecter un autre agent pathogène, qui sera dans un premier temps mal appréhendé, mais qualifié de responsable des hépatites non-A non-B : c'est le virus de l'hépatite C, ou VHC. Identifié en 1989, ce virus, qui touche aujourd'hui plus de 170 millions de personnes et ce dans toutes les régions du globe (soit 3 % de la population mondiale), est la première cause de transplantation du foie aux Etats-Unis.

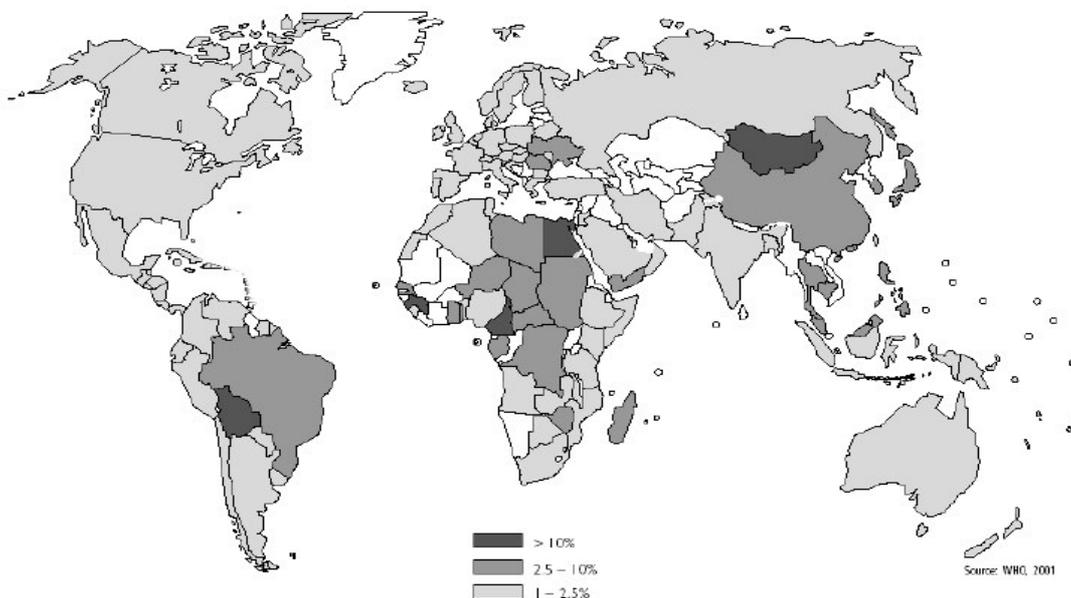


Figure 7 : Distribution de la prévalence de l'infection au VHC dans le monde.

Un seul traitement a été approuvé contre la maladie qui en résulte, mais il présente de nombreux effets secondaires et limitations. De plus, on estime que dans 10 ans, le VHC causera plus de morts que le VIH. Le VHC a fait l'objet de nombreuses recherches, qui se sont d'abord inspirées des leçons tirées des études menées sur le VIH, puis qui se sont intensifiées au cours de ces dernières années, y compris au sein de notre laboratoire.

Avant de discuter de la stratégie antivirale adoptée, une présentation du virus de l'hépatite C sera effectuée incluant la maladie qui en découle, son origine, son traitement et les cibles thérapeutiques qui lui sont associées pour mettre au point une chimiothérapie plus efficace, qui semble aujourd'hui s'orienter vers une trithérapie comme pour le traitement du SIDA.

II. Présentation de la maladie et du virus de l'hépatite C

II.1. Introduction

Hépatite signifie simplement « inflammation du foie ». Cette inflammation peut être provoquée par des virus, des produits chimiques toxiques, des médicaments ou d'autres facteurs. Les formes les plus répandues d'hépatite virale incluent les infections par le virus de l'hépatite A (VHA), le virus de l'hépatite B (VHB) et l'infection au virus de l'hépatite C (VHC). Le seul point commun de ces trois virus est qu'ils affectent le foie.

Le foie est responsable de quelque 500 fonctions vitales : il traite tout ce que nous mangeons, respirons ou absorbons par la peau. Le foie convertit les substances que nous absorbons en énergie et en molécules essentielles aux muscles, aux hormones, aux facteurs de coagulation et aux facteurs immunitaires. Il stocke des vitamines, des minéraux et des sucres en vue de leur utilisation ultérieure. Les cellules du foie produisent de la bile, qui contribue à la digestion et à l'absorption des substances nutritives. Le foie détoxique également les substances qui sont nocives pour le corps. Il possède aussi la capacité de se régénérer : jusqu'à 3/4 du foie peut être régénéré en l'espace de quelques semaines.

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un virus transmis par le sang. Cette forme d'hépatite était autrefois appelée hépatite non A non B. Le VHC entre dans le corps par contact sanguin direct. Le virus s'attaque aux cellules du foie, où il se multiplie (réplique). Le VHC provoque une inflammation du foie dont il détruit les cellules. Jusqu'à 70 % des personnes initialement infectées par le VHC peuvent devenir chroniquement infectées (c'est-à-dire que l'infection ne disparaît pas dans les 6 mois). La plupart des personnes atteintes d'une infection chronique au VHC ne présentent pas de symptômes et mènent une vie normale. Cependant, dans 10 à 25 % des cas, la maladie évolue sur une période de 10 à 40 ans et peut entraîner de graves lésions du foie, une cirrhose (cicatrisation du foie) et un cancer du foie. Aujourd'hui, le VHC est la première cause de transplantations du foie aux États-Unis. Il n'existe actuellement pas de vaccin contre le VHC mais divers traitements peuvent éradiquer le virus et/ou ralentir voire arrêter l'évolution de la maladie chez certaines personnes.

Quelques données relatives au VHC :

- Les National Institutes of Health ou NIH (Instituts nationaux de la santé aux États-Unis) estiment à 4 millions le nombre d'Américains infectés par le VHC.
- Environ 8 000 à 10 000 Américains meurent chaque année des complications liées au VHC. Ce chiffre devrait tripler pendant les 10 à 20 années prochaines.
- Le VHC est la première cause de transplantation du foie aux États-Unis.
- Les personnes atteintes par le VHC doivent éviter la consommation d'alcool et l'usage de drogues à des fins récréatives.
- Les personnes atteintes par le VHC doivent être vaccinées contre l'hépatite A et l'hépatite B.

II.2. La maladie et les limites thérapeutiques

II.2.1. La maladie dans le monde et son évolution chez l'individu

Actuellement, au moins 180 millions de personnes sont chroniquement atteintes par le VHC, ce qui représente 3% de la population mondiale, et fait du VHC le pathogène sanguin le plus répandu chez l'homme.

Le VHC, l'agent étiologique principal des hépatites non-A non-B, est un virus qui se transmet par le sang. Il a été suspecté dès 1982, mais ce n'est qu'en 1989 qu'il a été identifié pour la première fois par clonage moléculaire.^{22,23} Le VHC est transmis par contact sanguin direct. Avant 1992, un grand nombre de cas d'hépatite C était dû aux transfusions sanguines et de produits sanguins. Un test sanguin fiable permettant d'identifier les anticorps anti-VHC est disponible depuis 1992 et, depuis lors, le sang et les produits sanguins sont systématiquement analysés. Aujourd'hui, le risque de contracter le VHC par du sang infecté est inférieur à 0,01 %. Un faible pourcentage de personnes (estimé entre 1 et 3 % de la population hétérosexuelle monogame) peut contracter le VHC suite à des rapports sexuels non protégés. La transmission périnatale, avant la naissance ou pendant l'accouchement, des femmes infectées par le VHC à leur bébé survient dans moins de 5 % des cas. Chez jusqu'à 10 % des personnes infectées par le VHC, la voie de transmission est impossible à déterminer. Le VHC n'est pas transmis par simple contact comme un éternuement, la toux, une étreinte ou le partage de couverts et de verres.

Après l'exposition au VHC, la période d'incubation est généralement de 2 à 26 semaines. La phase initiale de l'hépatite C s'appelle l'infection aiguë. Ce stade aigu dure environ 2 à 12 semaines. Cependant, l'infection devient chronique chez approximativement 70% des individus exposés au VHC.²⁴ La plupart des porteurs chroniques du VHC ne présente pas de symptômes et mène une vie relativement normale. Mais dans 10 à 25 % des cas, la maladie évolue sur une période de 10 à 40 ans. L'infection chronique au VHC peut entraîner des lésions du foie, la formation de tissu fibreux dans le foie (fibrose), des dépôts de graisse dans le foie (stéatose), la cicatrisation du foie (cirrhose)²⁵ et un cancer du foie.²⁶ Dans les cas graves, une transplantation du foie peut s'avérer nécessaire.

²² Choo, Q.L.; Kuo, G.; Weiner, A.J.; Overby, L.R.; Bradley, D.W.; Houghton, M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **1989**, *244*, 359-362.

²³ Houghton, M. Hepatitis C viruses. In : *Fields*, B.N., Knipe, David M., Howley, Peter M. (Eds.), *Virology*, vol. 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 1996; pp. 1035-1058.

²⁴ Knipe, D.M.; Howley, P.M. In *Fields Virology*, fourth Ed., vol. 1, 2001, p. 1147.

²⁵ Une cirrhose est une affection dans laquelle les cellules du foie sont endommagées ou détruites et remplacées par du tissu cicatriciel. La formation étendue de tissu cicatriciel entrave la circulation sanguine dans le foie, ce qui détruit davantage de cellules et entraîne la perte de la fonction hépatique. Une cirrhose est dite compensée dans le cas où le foie est profondément cicatrisé mais encore capable d'accomplir la plupart des fonctions ; les personnes atteintes de cirrhose compensée présentent peu ou pas de symptômes. Si le foie est profondément cicatrisé et incapable de fonctionner, on parle de cirrhose décompensée. Les personnes atteintes de cirrhose décompensée présentent souvent des complications telles que des varices (vaisseaux sanguins étirés et affaiblis) dans l'œsophage et dans l'estomac, des saignements internes, des ascites (accumulations de liquide) et d'autres états menaçant potentiellement la vie. Ces personnes peuvent également subir une confusion mentale réversible.

²⁶ (a) Takahashi, M.; Yamada, G.; Miyamoto, R.; Doi, T.; Endo, H.; Tsuji, T. Natural course of Hepatitis C, *Am. J. Gastroenterol.* **1993**, *88*, 240-243. (b) Tong, M.J.; El-Farra, N.S.; Reikes, A.R.; Co, R.L. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C, *N. Engl. J. Med.* **1995**, *332*, 1463-1466. (c) Le cancer du foie est généralement présent aux stades tardifs de l'infection au VHC, et typiquement après 25 à 30 ans. Le type de cancer associé au VHC s'appelle carcinome hépatocellulaire (CHC) primitif.

II.2.2. Symptômes et diagnostic

Beaucoup de personnes signalent peu ou pas de symptômes pendant le stade aigu de l'infection au VHC. La plupart des porteurs chroniques du VHC n'ont aucun symptôme et mènent une vie relativement normale.²⁷ Avec le temps (souvent plusieurs années, voire des dizaines d'années) les porteurs chroniques du VHC peuvent présenter divers symptômes liés à une lésion au foie. L'infection chronique au VHC est également associée à une gamme étendue d'affections potentiellement liées.²⁸

Le dépistage du VHC n'étant pas systématique, il convient de le demander à un médecin. Différents tests sont alors disponibles : tests pour détecter les anticorps anti-VHC, tests de charge virale (mesurent la quantité de VHC qui circule dans le sang), tests de génotype (déterminent le traitement), tests biochimiques et de fonction hépatique (évaluent le fonctionnement du foie) ou biopsie du foie (évalue l'étendue de l'inflammation et de la cicatrisation ainsi que l'état général du foie).

II.2.3. Les co-infections²⁹ liées au VHC

Le VHC, le VHB et le VIH sont transmis de façon similaire et certaines personnes sont infectées par deux, voire les trois virus.

La co-infection VIH-VHC est un problème de santé publique d'intérêt croissant. Jusqu'à un tiers des Américains infectés par le VIH peut aussi être infecté par le VHC (bien que les taux de co-infection soient plus élevés dans certaines populations telles que chez les usagers de drogues injectables) et près de 10 % des personnes atteintes par le VHC sont également atteintes par le VIH. La plupart des études démontre qu'une infection au VIH entraîne une hépatite C plus agressive et augmente le risque d'atteinte hépatique. Les conséquences du VHC sur l'infection au VIH sont moins claires. Le VHC ne paraît pas accélérer l'évolution de la maladie VIH, mais peut entraver la récupération du système immunitaire après le démarrage d'un traitement anti-VIH. La plupart des personnes coinfectées VHC-VIH peuvent être traitées efficacement pour les deux maladies. La dernière déclaration de consensus des NIH relative à l'hépatite C recommande que toutes les personnes atteintes par le VHC et le VIH soient envisagées pour le traitement anti-VHC.

Comme l'hépatite C, l'hépatite B peut entraîner de graves lésions au foie, y compris la cirrhose et le cancer. La co-infection VHB-VHC est encore mal comprise et la recherche commence tout juste à aborder l'interaction entre ces deux virus. À ce jour, les études

²⁷ Cependant, d'autres présentent des symptômes grippaux légers. Certaines personnes présentent des symptômes grippaux plus prononcés ainsi qu'une jaunisse (jaunissement de la peau et du blanc des yeux).

²⁸ Plusieurs affections différentes ont été liées au VHC. Certaines sont des maladies auto-immunes dans lesquelles le système immunitaire s'attaque aux tissus du corps. Les affections qui sont parfois présentes chez les porteurs chroniques du VHC incluent : le syndrome de Sjögren (sècheresse des yeux et de la bouche), des affections rénales telles que la glomérulonéphrite, des troubles cardiaques et circulatoires tels qu'une thrombose (caillots sanguins), et des affections cutanées comme le lichen plan (caractérisé par des lésions ou des papules blanches) et la porphyrie cutanée tardive (caractérisé par un érythème sensible au soleil). D'autres affections associées incluent certains types d'arthrite (inflammation des articulations), l'arthralgie (douleurs articulaires), les maladies thyroïdiennes, la vascularite (lésions des vaisseaux sanguins) et la cryoglobulinémie (niveau élevé d'une protéine du sang qui se dépose dans les reins, la peau et les extrémités nerveuses). La plupart des affections graves sont associées à l'hépatite C au stade avancé, lorsque le foie est endommagé et ne fonctionne plus normalement. Beaucoup de personnes atteintes par le VHC ne présentent jamais ces affections.

²⁹ La co-infection signifie l'infection à deux ou plusieurs agents responsables de maladie.

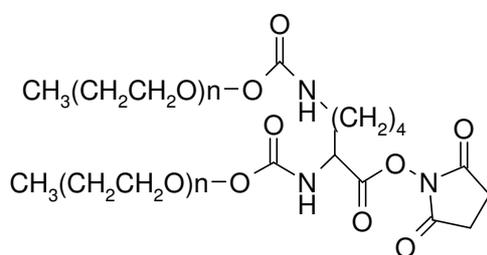
indiquent que la co-infection VHB-VHC peut provoquer de plus graves lésions hépatiques que le VHB ou le VHC seul. Les personnes co-infectées VHB-VHC courent un risque plus important de développer un cancer du foie et une hépatite fulgurante, une inflammation aiguë du foie pouvant entraîner rapidement des lésions hépatiques et le décès. Certaines études suggèrent que même les personnes ayant récupéré de l'hépatite B courent un risque plus important de développer une cirrhose et un cancer du foie si elles sont infectées ultérieurement par le VHC.

II.2.4. Le traitement actuel et ses limites

Le VHC présente six principaux génotypes (et plusieurs sous-types) : 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 et 6 (les génotypes 1a et 1b sont plus difficiles à traiter).³⁰ Cette variété extraordinaire (plus de 90 génotypes répertoriés) explique pourquoi actuellement encore il n'y a aucun vaccin contre le VHC.

Approximativement 46% de tous les individus infectés ne réagissent pas au seul traitement disponible³¹ basé depuis 1998 sur une thérapie combinée d'interféron α pégylé et de ribavirine (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (1), seuls médicaments approuvés par la Food and Drug Administration ou FDA (Agence pour l'alimentation et les produits pharmaceutiques aux États-Unis) pour le traitement de l'hépatite C.³²

L'interféron α , administré par injection, est un produit synthétisé par génie génétique à partir d'une série de protéines sécrétées naturellement par les lymphocytes (globules blancs du sang humain) du système immunitaire et permet la résistance de cellules infectées par un virus à d'autres infections virales. L'interféron pégylé (PEG³³) est une forme d'interféron à action prolongée pouvant être injectée une fois par semaine (Figure 8).³⁴



25

Figure 8 : un carbonate de benzotriazole de 40 kDa a été couplé à la lysine pour donner l'entité pégylée **25** qui conjuguée à l'interféron α 2a donne l'agent anti-VHC : l'interféron α pégylé (PEG IFN- α 2a).

Le PEG IFN- α 2a est caractérisé par une capacité améliorée à maintenir un taux d'interféron plus constant dans le sang et à diminuer la capacité du VHC à se répliquer. On

³⁰ J Bukh, J.; Purcell, R.H.; Miller, R.H. Sequence Analysis of the Core Gene of 14 Hepatitis C Virus Genotypes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 8239-8243.

³¹ Fried, M.W.; Shiffman, M.L.; Reddy, K.R.; Smith, C.; Marinos, G.; Goncalves, F.L.; Haunssinger, D.; Diago, M.; Carosi, G.; Dhumeaux, D.; Craxi, A.; Lin, A.; Hoffman, J.; Yu, J., 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 975-982.

³² il existe actuellement deux différentes combinaisons d'interféron pégylé/ribavirine qui ont été approuvées par la FDA : Peg-Intron de Scheringet ribavirine de la marque Rebetol, et Pegasys de Roche et ribavirine de la marque Copegus.

³³ PEG signifie polyéthylène glycol de formule générale $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$

³⁴ Tan, S.L.; Pause, A. Shi, Y.; Sonenberg, N. Hepatitis C therapeutics : current status and emerging therapies. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2002**, *1*, 867-881.

connaît mal les mécanismes d'action de l'interféron α , mais on sait qu'il renforce la réponse immunitaire de l'organisme et qu'il a des propriétés antivirales.

La ribavirine **26** est un analogue de nucléoside découvert en 1972, qui possède un large spectre d'activité antivirale (Figure 9).³⁵ La ribavirine seule n'a aucun effet sur l'hépatite C, contrairement à l'interféron α (auquel elle doit être associée pour le traitement combiné). Son mécanisme d'action dans la bithérapie reste encore discuté:^{36,37} sous sa forme monophosphate, elle inhiberait l'*IMPDH*, réduisant ainsi le pool de GTP cellulaire (la matière première pour la reproduction du virus); et sous sa forme triphosphorylée, elle entraînerait une synthèse anormale de l'ARN du virus.³⁸ Mais globalement, la ribavirine est reconnue pour influencer principalement sur la réponse immunitaire.

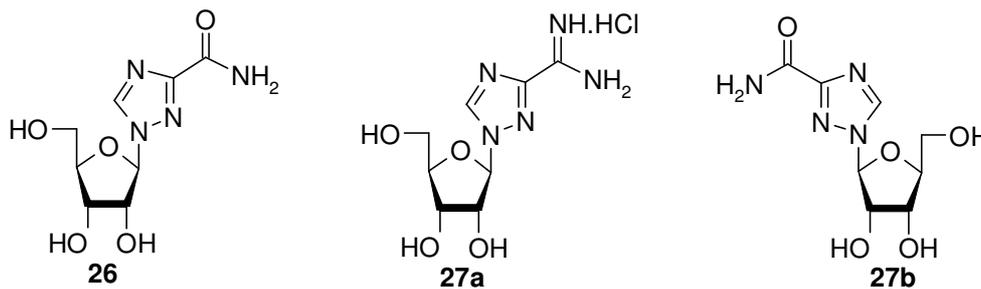


Figure 9. Structure chimique de la Ribavirine **26**, de sa pro-drogue la Viramidine **27a**, et de son analogue en série L la Lévovirine **27b**

Le but du traitement est l'éradication complète du virus afin d'éviter la constitution d'une cirrhose et par là même l'apparition d'un cancer. En dépit de son efficacité plutôt bonne, ce traitement³⁹ est très souvent mal toléré, et possède certaines limitations.⁴⁰

Il existe néanmoins actuellement de nombreuses perspectives d'amélioration de ce traitement (Figure 9). En remplacement de la Ribavirine sont désormais testées en clinique la Viramidine (en phase III^{35,41}) et la Lévovirine (en phase II³⁵). La première est une pro-drogue de la Ribavirine qui possède le même effet anti-VHC, mais avec des effets secondaires moins marqués⁴² (en terme d'anémie notamment). La seconde est bien tolérée et possède une activité immuno-modulatrice identique à son analogue en série D. En parallèle, des études

³⁵ McHutchinson, J.C.; Patel, K. Future therapy of hepatitis C. *Hepatology* **2002**, *36*, S245-S252.

³⁶ Lau, J.Y.; Tam, R.C.; Liang, T.J.; Hong, Z. Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology* **2002**, *35*, 1002-1009.

³⁷ Maag, D.; Castro, C.; Hong, Z.; Cameron, C.E. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 46094-46098.

³⁸ Crotty, S.; Maag, D.; Arnold, J.J.; Zhong, W.; Lau, J.Y.; Andino, R.; Cameron, C.E. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA mutagen. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1375-1379.

³⁹ Les personnes qui reçoivent un traitement anti-VHC doivent être testées à intervalles réguliers pour surveiller les effets secondaires et assurer leur réponse au traitement. Si aucune réponse n'est détectée après trois mois de traitement, il est peu probable qu'un traitement supplémentaire élimine le virus. Beaucoup de médecins conseillent alors d'arrêter la prise des médicaments. Certaines preuves suggèrent cependant que l'interféron peut atténuer la cicatrisation et l'inflammation et améliorer l'état du foie, même s'il n'élimine pas le virus.

⁴⁰ (a) Le traitement perturbe le métabolisme cellulaire normal et induit une cytotoxicité. (b) Au cours de l'infection virale, les signes cliniques apparaissent après que le virus se soit multiplié dans les cellules et que les lésions se soient constituées. (c) Il n'y a pas de réponse satisfaisante pour 40% des cas traités.

⁴¹ Aora, S.; Xu, C.; Teng, A.; Peterson, J.; Yeh, L.T.; Gish, R.; Lau, D.; Rossi, S.; Lin, C.C. Ascending multiple-dose pharmacokinetics of viramidine, a prodrug of ribavirin, in adult subjects with compensated hepatitis C infection. *J. Clin. Pharmacol.* **2005**, *45*, 275-285.

⁴² Lin, C.C.; Philips, L.; Xu, C.; Yeh, L.T. Pharmacokinetics and safety of viramidine, a prodrug of ribavirin, in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **2004**, *44*, 265-275.

sont actuellement en cours pour améliorer l'interféron α : l'Albuféron, qui est un interféron α recombinant génétiquement fusionné avec de l'albumine, permettrait de traiter le VHC avec une efficacité améliorée^{43a,b} (une injection par mois au lieu d'une par semaine avec le pégylé classique).

II.2.5. Conclusion

On dénombre plus de 170 millions de personnes atteintes dans le monde par le VHC, et il n'existe qu'un seul traitement approuvé par la FDA. Or, ce traitement n'est efficace que dans moins de 50 % des patients traités, et il possède de nombreux effets secondaires. Toutes ces constatations font que la découverte d'inhibiteurs spécifiques de la réplication du VHC est un but important à atteindre pour améliorer le traitement et les résultats actuels en termes de réponse virologique soutenue.

II.3. Description génomique du virus

L'élaboration d'un nouveau médicament passe d'abord par une connaissance détaillée du virus, de son génome, et une compréhension de son mécanisme de réplication. L'identification de cibles thérapeutiques potentielles est ensuite nécessaire. Nous verrons également comment notre incapacité à reproduire *in vitro* le virus peut être contournée pour parvenir à l'élaboration de tests d'activités biologiques fiables pour l'identification de nouvelles molécules à visée anti-VHC. Ensuite, nous décrirons chaque cible thérapeutique et les inhibiteurs potentiels qui lui sont associés.

Le VHC est un virus possédant un brin d'ARN positif de la famille *Flaviviridae*, du genre *Hepacivirinae* (Figure 10).

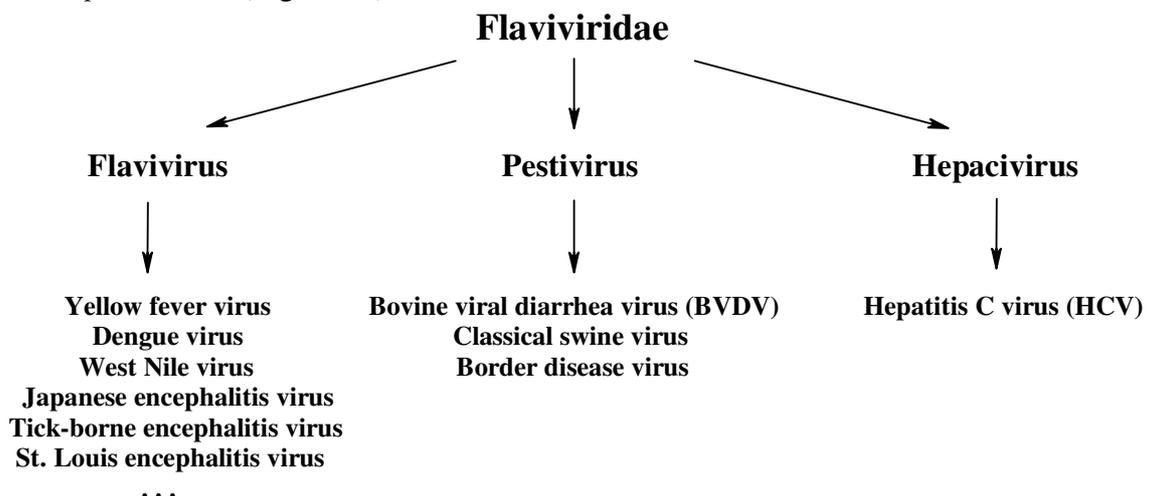


Figure 10 : arborescence des virus de la famille *Flaviviridae*

⁴³ (a) Osborn, B.L.; Olsen, H.S.; Nardelli B.; Murray J.H.; Zhou J.X.; Garcia A.; Moody G.; Zaritskaya L.S.; Sung C. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *303*, 540-548. (b) Sung, C.; Nardelli, B.; LaFleur, D.W.; Blatter, E.; Corcoran, M.; Olsen, H.S.; Birse, C.E.; Pickeral, O.K.; Zhang, J.; Shah, D.; Moody, G.; Gentz, S.; Beebe, L.; Moore, P.A. An IFN-beta-albumin fusion protein that displays improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in nonhuman primates. *J. Interferon Cytokine Res.* **2003**, *23*, 25-36.

Son génome, composé de 9000 à 9300 nucléotides, est un ARN simple brin qui code une polyprotéine de 3010 acides aminés, qui est ensuite clivée par les protéases virales et cellulaires en diverses protéines virales structurales (protéine noyau C et glycoprotéines E1 et E2 et protéine p7) et non-structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) qui sont essentielles pour la réplication, la traduction, et le découpage de la polyprotéine (Figure 11).⁴⁴ En outre, le génome contient deux régions non traduites (NTRs) : la première, dans la région 5'-non codante, qui fonctionne comme site d'entrée ribosomique interne (IRES), et la deuxième à l'extrémité 3'-non codante qui joue probablement un rôle en démarrant la réplication du brin d'ARN (-).⁴⁵

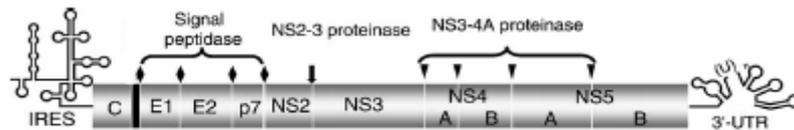


Figure 11 : organisation génomique du VHC

II.4. Identification des différentes cibles thérapeutiques possibles et de leurs inhibiteurs

Chaque étape qui intervient dans le cycle de reproduction du virus est une cible thérapeutique potentielle (Schéma 11).

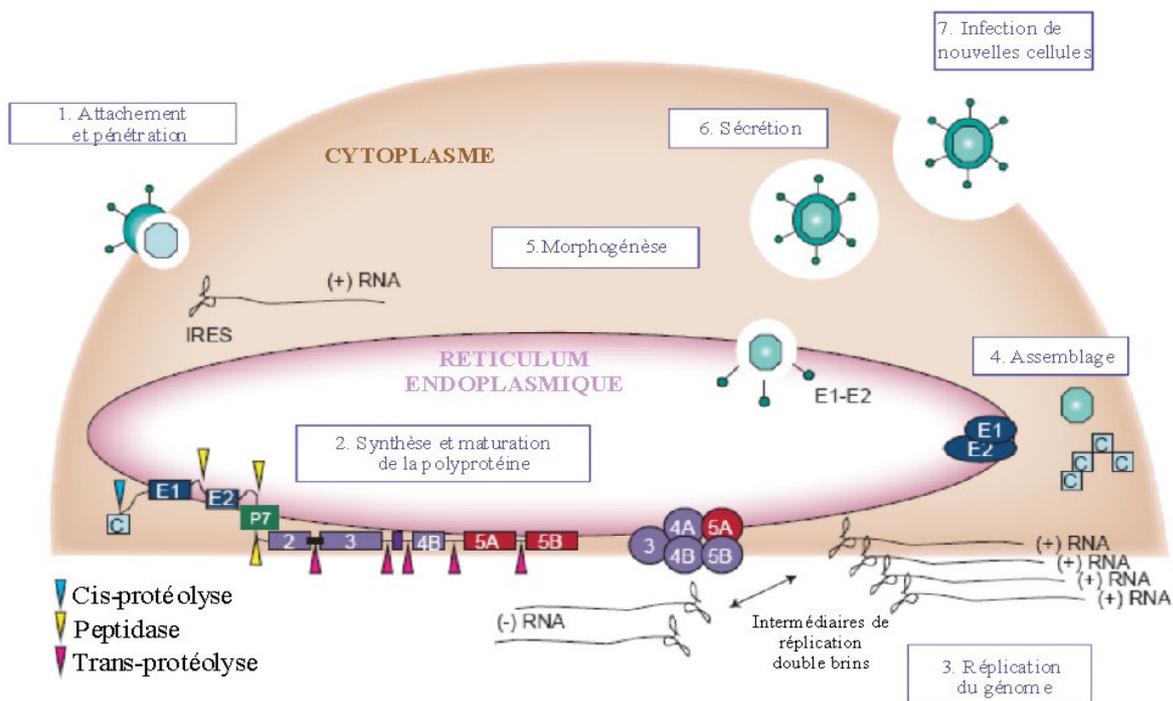
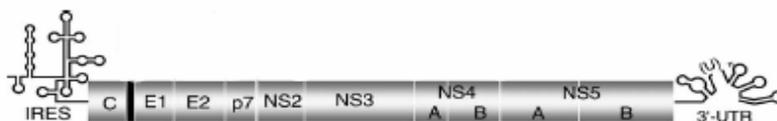


Schéma 11 : Cycle de reproduction du VHC et cibles pour une thérapie antivirale.

⁴⁴ Rosenberg, S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C Virus. *J. Mol. Biol.* **2002**, *313*, 451-464.

⁴⁵ Ogata, N.; Alter, H.J.; Miller, R.H.; Purcell, R.H. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 3392-3396.

Ce cycle est commun à celui que nous avons déjà décrit pour un virus en général : adsorption du virion, pénétration dans la cellule et décapsidation, réplication des protéines et des acides nucléiques, formation de nouveaux virions et relargage de ces derniers à l'extérieur de la cellule. Chacune de ces étapes utilisent une fonction associée à une portion du génome de l'hépatite C qui peut être inhibée de manière distincte (Figure 12 et tableau 2)⁴⁶ :



Cibles	Taille (kDa)	Fonction	Inhibiteurs
IRES		traduction	petites molécules oligonucléotides antisenses
C	21	nucléocapside	
E1/E2	31,7	glycoprotéine d'enveloppe	inhibiteur d'adsorption de E2 inhibiteurs de récepteurs lipoprotéiniques
p7	7	virioportine	Iminosucres, amantadine
NS2	23	forme une autoprotéase avec NS3 autoactivée par le zinc	inhibiteurs de protéase NS2 peptides à base NS4A
NS3	70	sérine protéase	analogues peptidiques, petites molécules non peptidiques, aptamers d'ARN
		NTPase/hélicase	analogues nucléosidiques, inhibiteurs allostériques, compétiteurs d'attache à l'ARN, intercalants de type polynucléotides
NS4A	8	cofacteur de la NS3-protéase	analogues de la NS4A
NS4B	27	sécurise la réplication du VHC ⁴⁷	
NS5A	56	sensibilité à l'interféron	
NS5B	68	ARN polymérase ARN dépendante	inhibiteurs de polymérase de type nucléo- sidiques ou non, mimes de pyrophosphates

Figure 12 et tableau 2 : fonction de chaque portion du génome de l'hépatite C et inhibiteurs qui lui sont associés (d'après la réf. 46)

De même que ce fut le cas pour le VIH, les efforts pour développer des agents anti-VHC spécifiques se sont concentrés sur l'inhibition des enzymes virales cruciales pour la réplication virale, telles la NS3 sérine protéase/NTPase/hélicase et la NS5B ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) dans le cas du VHC.

Cependant, d'autres opportunités existent pour le développement de cibles thérapeutiques dans le génome du VHC.⁴⁸

⁴⁶ Gordon, C.P.; Keller, P.A. Control of hepatitis C: a medicinal chemistry perspective. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1-20.

⁴⁷ Lundin, M.; Monne, M.; Widell, A.; Von Heijne, G.; Persson, M.A. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J. Virol.* **2003**, *77*, 5428-5438.

⁴⁸ Durantel, D.; Escuret, V.; Zoulim, F. Current and emerging therapeutic approaches for hepatitis C infection. *Expert Rev. Anti-infec. Ther.* **2003**, *1*, 441-454.

II.5. Méthodes d'évaluation de nouveaux inhibiteurs du VHC

II.5.1. Introduction

La découverte des inhibiteurs spécifiques de la réplication du VHC est un but important à atteindre pour améliorer le traitement et les résultats actuels en termes de réponse virologique soutenue. Le développement de telles molécules a été très difficile en l'absence, jusqu'à peu, d'un système fiable de culture cellulaire pour la réplication complète du virus.⁴⁹

II.5.2. Le réplicon subgénomique

Cela fait seulement 5 ans que divers systèmes de modèle de culture cellulaire, basés sur les cellules Huh7 contenant et assurant l'autoréplication d'un réplicon subgénomique du VHC, ont été développés (Figure 13).⁵⁰

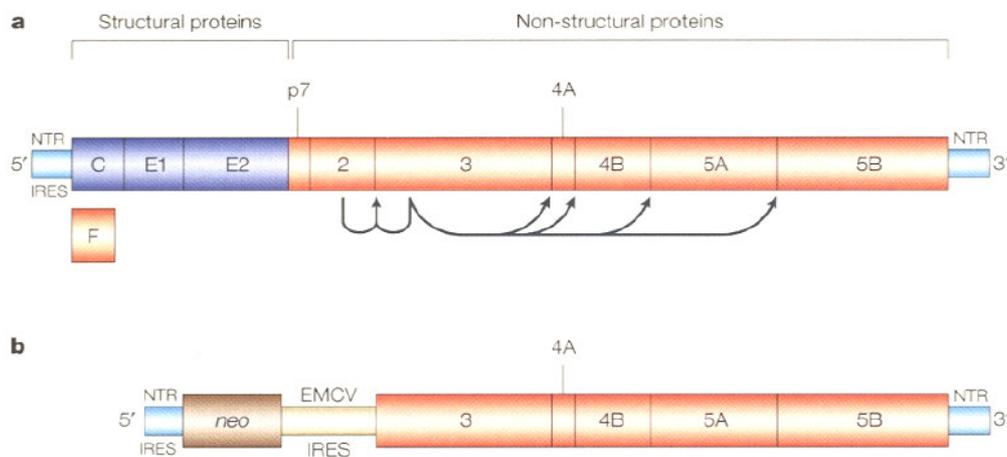


Figure 13 : a) ARN du VHC b) modèle de réplicon subgénomique du VHC

La disponibilité de ces systèmes *in vitro* a rendu possible la recherche d'inhibiteurs (de l'activité des protéines non structurales) qui pourraient avoir une utilité clinique pour le traitement des maladies provoquées par le VHC. De plus, la culture cellulaire de réplicon subgénomique du VHC a été reconnue comme méthode valable et disponible pour la découverte de nouveaux agents anti-VHC.⁵¹ Cependant, les cellules hébergeant des réplicons ne produisent pas et ne sécrètent pas des virions infectieux. Ainsi, elles ne peuvent pas être employées pour l'identification et la caractérisation des agents antiviraux agissant aux étapes préliminaires ou en retard du cycle viral de réplication, telles que l'attachement, l'entrée, la

⁴⁹ Moriishi, K.; Matsuura, Y. Mechanisms of hepatitis C virus infection. *Antivir. Chem. Chemother.* **2003**, *14*, 285-297.

⁵⁰ (a) Blight, K.J.; Kolykhalov, A.A.; Rice, C.M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **2000**, *290*, 1972-1974. (b) Lohmann, V.; Korner, F.; Koch, J.; Herian, U.; Theilmann, L.; Bartenschlager, R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **1999**, *285*, 100-113.

⁵¹ Larkin, J.; Jin, L.; Farmen, M.; Venable, D.; Huang, Y.; Tan, S.L.; Glass, J.I. Synergistic antiviral activity of human interferon combinations in the hepatitis C virus replicon system. *J. Interferon Cytokine Res.* **2003**, *23*, 247-257.

maturation, et le relargage des virions.⁵² De même, des agents antiviraux qui réduisent l'infectiosité des virions relargués ne peuvent pas être identifiés avec le système de réplicon.⁵³

II.5.3. Le BVDV et les autres virus apparentés

Le virus de la diarrhée bovine (BVDV), un membre du genre pestivirus, partage plusieurs caractéristiques importantes avec le VHC et fournit ainsi un modèle de remplacement⁵³ en particulier pour l'évaluation de composés antiviraux.^{54,55} Par conséquent, les divers systèmes comprenant l'analyse anti-BVDV en cellules de MDBK sont utiles pour l'évaluation de candidats prometteurs pour le traitement de l'infection au VHC. Cette analyse anti-BVDV est également un outil valable approprié pour évaluer la thérapie combinée et pour déterminer si l'effet synergique peut être obtenu, comme avec l'interféron α et la ribavirine.⁵² La synergie entre l'interféron α et la ribavirine n'a pas été décrite dans toutes les publications.⁵⁶

D'autres alternatives peuvent se présenter pour effectuer des tests biologiques. En effet, pour évaluer une possible activité anti-VHC, certaines équipes ont utilisé des virus tels le West Nile Virus, le virus de la dengue ou le virus de la fièvre jaune, qui appartiennent également à la famille des *Flaviviridae*.⁵⁷ Ces virus peuvent être considérés comme des modèles de remplacement dignes d'intérêt. Par exemple le virus de la fièvre jaune peut lui aussi comme le BVDV mesurer un effet synergique entre la ribavirine et l'interféron α .

II.5.4. La polymérase virale

Pour évaluer l'activité antivirale d'un nouvel analogue de nucléoside, des tests en milieu de culture cellulaire sont d'abord pratiqués (système réplicon, BVDV). Mais ces tests ne permettent pas de comprendre le mode d'action des molécules. Or, pour atteindre leur forme active triphosphorylée, les nucléosides doivent être substrats des nucléotidases, kinases

⁵² Yanagida, K.; Baba, C.; Baba, M. Inhibition of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by mizoribine : synergistic effect of combination with interferon- α . *Antiviral Res.* **2004**, *64*, 195-201.

⁵³ Buckwold, V.E.; Beer, B.E.; Donis, R.O. Bovine viral diarrhoea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. *Antiviral Res.* **2003**, *60*, 1-15.

⁵⁴ Ouzounov, S.; Mehta, A.; Dwek, R.A.; Block, T.M.; Jordan, R. The combination of interferon- α -2b and n-butyl-deoxyjirimycin has a greater than additive antiviral effect upon the production of infectious bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in vitro: implications for hepatitis C virus (HCV) therapy. *Antiviral Res.* **2002**, *55*, 425-435.

⁵⁵ Durantel, D.; Carrouee-Durantel, S.; Branza-Nichita, N.; Dwek, R.A.; Zitzmann, N., 2004. Effects of interferon, ribavirin, and iminosugar derivatives on cells persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 497-504.

⁵⁶ Tanabe, Y.; Sakamoto, N.; Enomoto, N.; Kurosaki, M.; Ueda, E.; Maekawa, S.; Yamashiro, T.; Nakagawa, M.; Chen, C.H.; Kanazawa, N.; Kakinuma, S.; Watanabe, M. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- α . *J. Infect. Dis.* **2004**, *189*, 1129-1139.

⁵⁷ (a) Buckwold, V.E.; Wei, J.; Wenzel-Mathers, M.; Russell, J. Synergistic In Vitro Interactions between Alpha Interferon and Ribavirin against Bovine Viral Diarrhoea Virus and Yellow Fever Virus as Surrogate Models of Hepatitis C Virus Replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2293-2298. (b) Malet, I.; Wychowski, C.; Huriaux, J.M. Agut, H.; Cahour, A. Yellow fever 5' noncoding region as a potential element to improve hepatitis C virus production through modification of translational control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *253*, 257-264.

ou autres enzymes d'activation présentes naturellement dans le milieu biologique.⁵⁸ Des tests existent pour établir si les nouveaux analogues de nucléosides sont substrats de telles enzymes. Si c'est le cas, ces molécules sont alors susceptibles de viser leur cible biologique.

Molécule à tester	test cellulaire du Nu	test sur NS5B du NuPPP	Conclusion
Nucléoside (Nu)	actif	actif	le nucléoside est substrat des kinases et cible la NS5B
		inactif	le nucléoside est un substrat des kinases et est un antimétabolite
	inactif	actif	le nucléoside cible la NS5B mais n'est pas substrat des kinases, ou ne pénètre pas dans la cellule
		inactif	le nucléoside est inactif

Tableau 3

En complément de ces tests, les nucléosides conçus pour viser la NS5B peuvent être testés directement sur cette polymérase virale sous leur forme triphosphorylée. De puissants inhibiteurs de la réplication du VHC ont été découverts grâce à ce test.⁵⁹ Ainsi, il est possible d'établir le mode d'action d'un nouvel analogue de nucléoside au sein du milieu cellulaire (Tableau 3).

II.5.5. Dernières avancées majeures et perspectives

Même si le BVDV et le système réplicon sont reconnus comme fiables pour la recherche de nouveaux inhibiteurs de la réplication du VHC, ces deux systèmes possèdent chacun leurs défauts et leurs limitations. Ainsi, le réplicon ne permet pas dans la majorité des cas l'observation d'effet synergique entre deux substances et l'activité des molécules peut venir d'une toxicité sur les cellules ; le système cellulaire MBDK du BVDV, quant à lui, ne permet pas une triphosphorylation convenable des nucléosides, sachant que les nucléosides sont actifs sous leur forme tri-phosphorylées, les résultats obtenus avec ce système peuvent donc être sujet à caution. Il convient donc d'être prudent avec les résultats biologiques obtenus par ces deux systèmes d'évaluation. Pour atténuer ses défauts et ses limitations, le système réplicon est en cours d'amélioration, comme on peut le constater dans un rapport récent,⁶⁰ qui a décrit le développement, l'optimisation, et l'implémentation d'une analyse cellulaire pour le criblage à haut-débit dont le but est l'identification efficace d'inhibiteurs de la réplication du VHC.

⁵⁸ Peter, K.; Gambertoglio, J.G. Intracellular phosphorylation of zidovudine (ZDV) and other nucleoside reverse transcriptase inhibitors (RTI) used for human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 819-825.

⁵⁹ Carroll, S.S., Tomassini, J.E., Bosserman, M., Getty, K., Stahlhut, M.W., Eldrup, A.B., Bhat, B., Hall, D., Simcoe, A.L., LaFemina, R., Rutkowski, C.A., Wolanski, B., Yang, Z., Migliaccio, G., De Francesco, R., Kuo, L.C., MacCoss, M., Olsen, D.B. Inhibition of Hepatitis C Virus RNA Replication by 2'-Modified Nucleoside Analogs. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11979-11984.

⁶⁰ Zuck, P.; Murray, E.M.; Stec, E.; Grobler, J.A.; Simon, A.J.; Strulovici ; Inglese, J.; Flores, O.A.; Ferrer, M. A cell-based β -lactamase reporter gene assay for the identification of inhibitors of hepatitis C virus replication. *Anal. Biochem.* **2004**, *334*, 344-355.

L'année 2005 a été très prometteuse en matière de découverte et de validation de tests d'évaluation biologique encore plus fiables pour la découverte de nouveaux composés d'intérêt anti-VHC. Ainsi, il a été découvert en 2003⁶¹ puis amélioré et validé en 2005 un nouveau système de répllication du génome complet du VHC basé sur les cellules OR6.⁶² Ce génome, dérivé du brin O, possède toutes les parties génomiques du VHC avec une mutation adaptative dans la région NS3 hélicase qui permet de contrôler la répllication du VHC dans un système de lignée cellulaire ORN/C-5B/KE (ou OR6). Ce système a montré un effet anti-VHC de l'interféron α équivalent à celui que l'on peut trouver dans les cellules humaines après traitement par cette substance. Et contrairement à de nombreux systèmes basés sur les cellules Huh-7, ce système permet d'observer un effet synergique entre la Ribavirine et l'interféron α .

Plus récemment encore, 3 équipes ont publié la découverte d'un système de culture cellulaire capable de répliquer dans sa totalité le VHC.⁶³ Ce système utilise un système réplicon subgénomique du génotype 2a, basé sur les cellules Huh 7.5.1 dérivées des cellules Huh-7.5. Ce système est également capable de générer des particules virales dans le milieu, sans perte d'infectivité (ces particules sont capables d'infecter les autres cellules), ce qui n'était pas possible auparavant.

Là encore, ces dernières publications semblent attrayantes mais les résultats d'évaluation biologique obtenus en utilisant ce nouveau système réplicon basé sur les cellules Huh-7.5.1 devront être considérés avec prudence. En effet, ce système étant basé sur le génotype 2a, il ne garantit pas les mêmes résultats sur les génotypes 1a et 1b, connus pour être plus difficiles à traiter. Néanmoins, il s'agit d'une avancée majeure, puisque c'est le premier système *in vitro* capable de produire des particules virales capables d'infecter les cellules voisines et de conserver une charge virale importante dans le milieu de culture cellulaire.

III.5.6. Conclusion

Il convient de rappeler que toutes les analyses d'activité biologique données au cours de cette thèse issues de notre laboratoire ou d'autres équipes de recherches, ont été réalisées sur un système réplicon basé sur les cellules Huh-7, sur la polymérase virale ou sur le système BVDV basé sur les cellules MBDK. Nous venons de voir les faiblesses de chacune de ces approches. Néanmoins, il ne faut pas oublier qu'avant 2005 seuls ces systèmes d'évaluation étaient utilisés pour la découverte de nouvelles molécules ciblant le VHC *in vitro*, et que par conséquent c'est grâce à eux et au clonage que l'on doit la caractérisation du VHC.

⁶¹ Kato, N.; Sugiyama, K.; Namba, K.; Dansako, H.; Nakamura, T.; Takami, M.; Naka, K.; Nozaki, A.; Shimotohno, K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *306*, 756-766.

⁶² Ikeda, M.; Abe, K.; Dansako, H.; Nakamura, T.; Takami, M.; Naka, K.; Kato, N. Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a *luciferase* reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *329*, 1350-1359.

⁶³ (a) Zhong, J.; Gastaminza, P.; Cheng, G.; Kapadia, S.; Kato, T.; Burton, B.R.; Wieland, S.F.; Uprichard, S.L.; Wakita, T.; Chisari, F.V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 9294-9299. (b) Wakita, T.; Pietschmann, T.; Kato, T.; Date, T.; Miyamoto, M.; Zhao, Z.; Murthy, K.; Habermann, A.; Kräusslich, H.-G.; Mizokami, M.; Bartenschlager, R.; Liang, T.J. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* **2005**, *11*, 791-796. (c) Lindenbach, B.D.; Evans, M.J.; Syder, A.J.; Wölk, B.; Tellinghuisen, T.L.; Liu, C.C.; Maruyama, T.; Hynes, R.O.; Burton, D.R.; McKeating, J.A.; Rice, C.M. Complete Replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **2005**, *309*, 623-626.

III. Cibles thérapeutiques et leurs inhibiteurs associés

III.1. IRES – Site d'Entrée Ribosomique Interne

III.1.1. Description

La partie 5'-non codante du génome de l'ARN du VHC constitue un site d'entrée interne ribosomique (IRES) qui s'attache aux ribosomes des cellules infectées qui initient la traduction du génome de l'ADN proviral.⁶⁴ L'IRES permet au VHC d'outrepasser le mécanisme cellulaire normal d'initiation de la synthèse protéinique par attachement de l'ARN viral aux ribosomes, et lui permet de posséder son propre mécanisme de traduction indépendant. De plus, la séquence génomique de l'IRES est conservée à plus de 85 % dans tous les génotypes du VHC, ce qui en fait une cible thérapeutique parfaite pour une thérapie antivirale pouvant cibler n'importe quel génotype du virus.^{65,66}

III.1.2. Inhibiteurs

Les fonctions d'IRES peuvent être inhibées par de petites molécules (Figure 14)⁶⁷ (par interaction et formation de liaisons hydrogènes), ou par des antiviraux à base d'oligonucléotides antisenses, d'aptamers⁶⁸ (type ARN) ou de ribozymes⁶⁹. L'oligonucléotide antisense ISIS 14803⁷⁰ et le ribozyme Heptazyme⁷¹ sont entrés en phase II de tests cliniques. Mais l'heptazyme a montré une très grande toxicité sur les primates, et ces deux types de composés possèdent de nombreuses limitations en termes de pharmacocinétique et de biodisponibilité dans les cellules de mammifères.

⁶⁴ Ito, T.; Tahara, S.M.; Lai, M.M. The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J. Virol.* **1998**, *72*, 8789-8796.

⁶⁵ Kamoshita, N.; Tsukiyama-Kohara, K.; Kohara, M.; Nomoto, A. Genetic analysis of internal ribosomal entry site on hepatitis C virus RNA: implication for involvement of the highly ordered structure and cell type-specific transacting factors. *Virology* **1997**, *233*, 9-18.

⁶⁶ Zhao, W. Genetic analysis of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. Ph.D. Dissertation, State University of New York, Stony Brook, NY, 2001 (AN 2002:594323).

⁶⁷ (a) Klinck, R.; Westhof, E.; Walker, S.; Afshar, M.; Collier, A.; Aboul-Ela, F. A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *RNA* **2000**, *6*, 1423-1431. (b) Rando, R.; Welch, E. Methods for identifying small molecules that bind specific RNA structural motifs and uses highthroughput screening of combinatorial libraries. WO 2002083953, 2002. (c) Le, S.-Y.; Zhang, K.; Maizel, J. V., Jr. RNA molecules with structure dependent functions are uniquely folded. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3574-3582. strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 837-847.

⁶⁸ (a) Kikuchi, K.; Fukuda, K.; Umehara, T.; Hwang, J.; Kuno, A.; Hasegawa, T.; Nishikawa, S. In vitro selection of RNA aptamers that bind to domain II of HCV IRES. *Nucleic Acids Res., Suppl.* **2002**, 267-268. (b) Kikuchi, K.; Umehara, T.; Fukuda, K.; Hwang, J.; Kuno, A.; Hasegawa, T.; Nishikawa, S. Structure-inhibition analysis of RNA aptamers that bind to HCV IRES. *Nucleic Acids Res., Suppl.* **2003**, 291-292. (c) Kikuchi, K.; Umehara, T.; Fukuda, K.; Hwang, J.; Kuno, A.; Hasegawa, T.; Nishikawa, S. RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. *J. Biochem.* **2003**, *133*, 263-270.

⁶⁹ Ryu, K.-J.; Lee, S.-W. Identification of the most accessible sites to ribozymes on the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *36*, 538-544.

⁷⁰ Witherell, G. W. ISIS-14803 (Isis Pharmaceuticals). *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2001**, *2*, 1523-1529.

⁷¹ (Pas d'auteur listé) Heptazyme. *Drug News Perspect.* **2000**, *13*, 112.

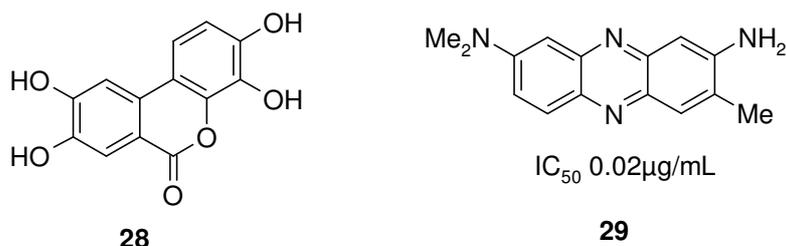


Figure 14 : structure chimique d'inhibiteur d'IRES : le composé **28**, un dérivé de l'acide ellagique, inhibe 30 % à 70 % de la traduction du VHC : il se lie spécifiquement à l'IRES du VHC sans toucher aux composants du complexe de traduction cellulaire ; le composé **29** se fixe dans une des nombreuses poches formées par IRES, et à été isolé lors d'un screening de 132000 extraits fongiques.

III.2. La protéine p7

III.2.1. Description

La protéine p7 est une petite protéine hydrophobe localisée entre la région structurale et la région non-structurale de la polyprotéine.^{72,73} Ces caractéristiques sont apparentées à un groupe de protéines appelées les viroporines. Ces protéines s'oligomérisent entre elles, formant des canaux ioniques, et sont fréquemment impliquées dans les processus d'adsorption et de relargage des particules virales.⁷⁴ Dans le cas de la protéine p7, il s'agit d'hexamères qui forment des canaux ioniques viraux. Il a été prouvé que l'inhibition des fonctions des viroporines abroge l'infectivité virale, faisant de ces protéines de parfaites cibles pour le développement de nouveaux médicaments antiviraux. Il en va donc de même pour la protéine p7.

Il n'a pas été déterminé si p7 est une protéine de structure ou non, et son rôle dans le cycle de réplication du virus n'est que partiellement connu.⁷⁵ Cependant, elle est spécifique à chaque génotype du virus⁷⁶ et il a été montré que p7 est essentielle pour l'infectivité du VHC. En effet, des réplicons dépourvus de p7 peuvent se répliquer dans les cellules de type Huh-7.^{75,77} De même, des souches mutantes de BVDV sans p7 peuvent se répliquer mais n'infectent pas les autres cellules.⁷⁸ L'inhibition de la formation et/ou de la fonction de ces canaux ioniques pourrait donc diminuer voire supprimer l'infectivité du virus.

⁷² Selby, M.J.; Glazer, E.; Masiarz, F.; Houghton, M. Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology* **1994**, *204*, 114-122.

⁷³ Lin, C.; Lindebach, B.D.; Pragai, B.M.; McCourt, D.W.; Rice, C.M. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J. Virol.* **1994**, *68*, 5063-5073.

⁷⁴ Griffin, S.D.C.; Beales, L.P.; Clarke, D.S.; Worsfold, O.; Evans, S.D.; Jaeger, J.; Harris, M. P.G.; Rowlands, D.J. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* **2003**, *535*, 34-38. et citations incluses.

⁷⁵ Lohmann, V.; Korner, F.; Koch, J.; Herain, U.; Theilmann, L.; Bartenschlager, R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **1999**, *285*, 110-113.

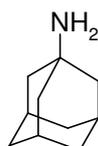
⁷⁶ Sakai, A.; St. Claire, M.; Faulk, K.; Govindarajan, S.; Emerson, S.U.; Purcell, R.H., Bukh, J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 11646-11651.

⁷⁷ Blight, K.J.; Kolykhalov, A.A.; Rice, C.M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **2000**, *290*, 1972-1974.

⁷⁸ Harada, T.; Tautz, N.; Thiel, H.J. E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J. Virol.* **2000**, *74*, 9498-9506.

III.2.2. Inhibiteurs

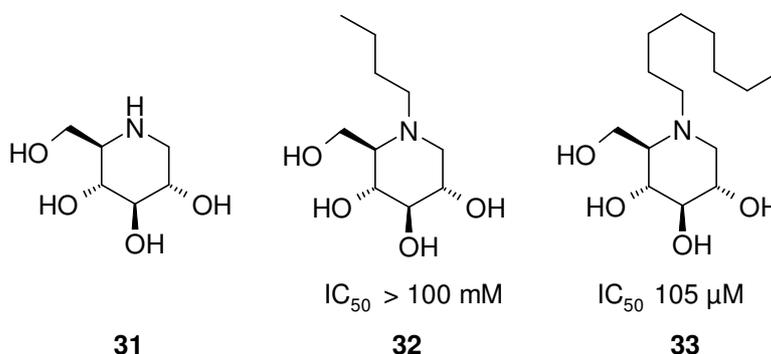
L'amantadine **30** (Figure 15) est un agent antiviral approuvé en 1976 pour le traitement du virus Influenza A.^{79,80} Elle inhibe les canaux ioniques de ce virus en empêchant leur ouverture et ainsi la circulation des ions H⁺ requis pour l'acidité nécessaire qui permet la décapsulation du virus. En 2003 il a été découvert que l'amantadine bloquait également les canaux ioniques de p7.⁷⁴ Son efficacité a également été prouvée en association avec les traitements courants utilisés contre le VHC. Malheureusement, le bénéfice apporté fut trop faible pour présenter un intérêt suffisant pour se pencher davantage sur ce composé en tant qu'agent anti-VHC.



30

Figure 15 : structure de l'Amantadine

Les iminosucres, et plus particulièrement les dérivés de la déoxynojirimycine (DNJ) **31** (Figure 16), sont des inhibiteurs connus des α -glucosidases I et II du réticulum endoplasmique (RE),^{81,82} et cette inhibition mène au mauvais repliement de nombreuses glycoprotéines virales et cellulaires, incluant celles du BVDV⁸³ et du VHC⁸⁴.



31

32

33

Figure 16 : dérivés d'iminosucres et pouvoir inhibiteur de la protéine p7 testé sur le BVDV : la déoxynojirimycine (ou DNJ, **31**), la N-butyl-DNJ (NB-DNJ, **32**) et la N-nonyl-DNJ (NN-DNJ, **33**)

⁷⁹ Hay, A.J.; Wolstenholme, A.J.; Skehel, J.J.; Smith, M.H. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.* **1985**, *4*, 3021-3024.

⁸⁰ Duff, K.C.; Ashley, R.H. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *Virology* **1992**, *190*, 485-489.

⁸¹ Bergeron, J.J.; Brenner, M.B.; Thomas, D.Y.; Williams, D.W. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 124-128.

⁸² Peterson, J.R.; Ora, A.; Van, P.N.; Helenius, A. Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Mol. Biol. Cell* **1995**, *6*, 1173-1184

⁸³ Branza-Nichita, N.; Durantel, D.; Carrouee-Durantel, S.; Dwek, R.A.; Zitzmann, N. Antiviral Effect of N-Butyldeoxyxojirimycin against Bovine Viral Diarrhea Virus Correlates with Misfolding of E2 Envelope Proteins and Impairment of Their Association into E1-E2 Heterodimers. *J. Virol.* **2001**, *75*, 3527-3536

⁸⁴ Chouki, A.; Ung, S.; Wychowski, C.; Dubuisson, J. Molecular virology of hepatitis C virus. *J. Virol.* **1998**, *72*, 3851-3858.

Ainsi, les dérivés de la DNJ montrent également des activités antivirales sur le BVDV, comme ceux de la déoxygalactonojirimycine (DGJ) **34** (Figure 17).⁸⁵ Mais ces derniers ne présentant aucune inhibition des α -glucosidases I et II du RE, le mécanisme d'action antiviral semble être indépendant et/ou complémentaire d'une action sur les glycoprotéines. Ces dérivés portent une chaîne alkyle sur l'azote, et l'activité antivirale est liée à une longueur minimale de cette chaîne, qui a la propriété d'inhiber les canaux ioniques.⁸⁶ Il en résulte une diminution des sécrétions virales et une baisse d'infectivité des nouvelles particules relarguées.

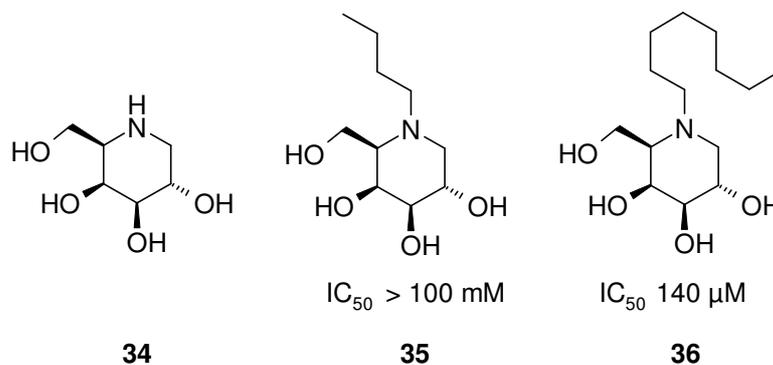


Figure 17 : dérivés d'iminosucres et pouvoir inhibiteur de la protéine p7 testé sur le BVDV : la déoxygalactonojirimycine (ou DGJ, **34**), la *N*-butyl-DGJ (NB-DGJ, **35**) et la *N*-nonyl-DGJ (NN-DGJ, **36**)

Ces molécules agissent comme des « interferons-like » : il serait donc judicieux d'étudier, sur un modèle comme le BVDV (ou un modèle plus récent incluant la réplication complète du VHC), si ces molécules sont capables d'un quelconque effet synergique avec la ribavirine, ou pourquoi pas un analogue de nucléoside connu pour avoir des propriétés anti-VHC potentielles.

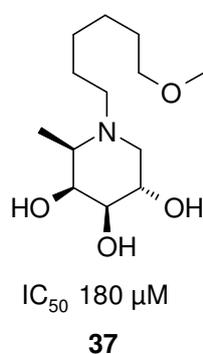


Figure 18 : l'iminosucre *N*-7-oxanonyl-6-déoxy-DGJ **37**

Une certaine toxicité observée sur les dérivés de la DNJ n'en fera pas de bons candidats pour une thérapie antivirale. Mais le dérivé d'iminosucre *N*-7-oxanonyl-6-déoxy-DGJ **37** (Figure 18), bien qu'il ne possède pas la meilleure activité *in vitro*, ne présente *in vivo* qu'une très faible toxicité chez la souris, le rat, le chien et le singe, ce qui l'a fait rentrer en phase clinique I en Juillet 2002, l'a placé en phase II en 2004.

⁸⁵ Durantel, D.; Branza-Nichita, N.; Carrouee-Durantel, S.; Butters, T.D.; Dwek, R.A.; Zitzmann, N. Study of the mechanism of antiviral action of iminosugar derivatives against bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* **2001**, *75*, 8987-8998.

⁸⁶ Pavlovic, D.; Neuville, D.C.A.; Argaud, O.; Blumberg, B.; Dwek, R.A.; Fisher, W.B.; Zitzmann, R. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 6104-6108

III.3. La protéine NS3

III.3.1. Description

La recherche d'un traitement plus efficace contre le VIH a apporté plusieurs leçons qui ont servi de base pour s'attaquer au VHC. Les cycles de réplication de ces virus ont en commun l'intervention d'un grand nombre d'enzymes pour assurer leur réplication. Les trithérapies contre le SIDA visent justement plusieurs de ces enzymes simultanément (la reverse transcriptase et la protéase du VIH). C'est la raison qui a poussé un grand nombre de compagnies pharmaceutiques à s'intéresser à l'enzyme protéolytique NS3 du VHC.

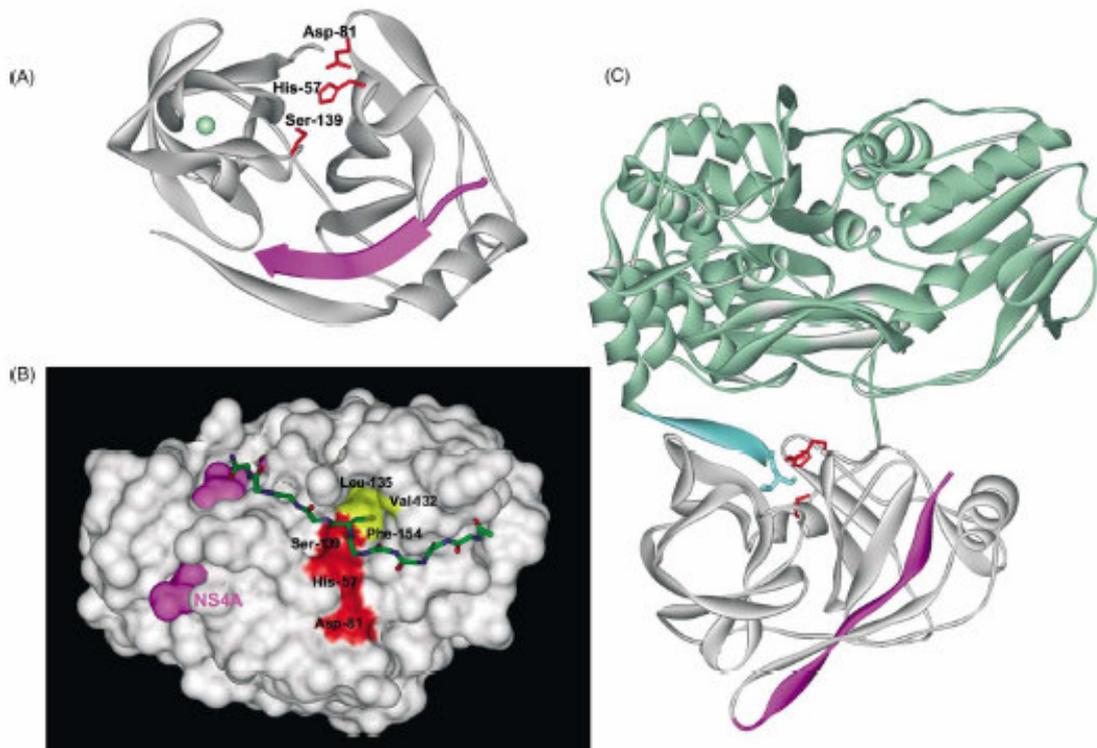


Figure 19 : Structure cristallographique de la protéase NS3/NS4A obtenue par rayons X. (A) Domaine de la protéase de NS3-4A. Les chaînes latérales des résidus formant la triade catalytique (His-57, Asp-81, et Ser-139) sont montrées en rouge. Le cofacteur NS4A est montré en violet, l'ion zinc est modélisé en vert clair. (B) Un décapeptide (épine dorsale seulement) est modélisé dans l'emplacement actif de la protéase de NS3-4A. Le cofacteur NS4A est en violet. Les chaînes latérales des résidus formant la triade catalytique sont montrées en rouge. Les chaînes latérales des résidus formant la poche de la spécificité S1 de l'enzyme (Val-132, Leu-135, et Phe-154) sont en jaune. (C) Produit d'inhibition dans le complexe de NS3/4A. Le peptide de NS4A (rouge) a été artificiellement lié au domaine N-terminal de la protéase NS3 (gris) dans la construction à chaîne unique utilisée pour la cristallisation. Les chaînes latérales des résidus formant la triade catalytique de la protéase sont en rouge. Le domaine hélicase (partie supérieure de la molécule) est dépeint dans vert clair. La partie C-terminale de NS3 résidu de la réaction de clivage de NS3/NS4A, formes un brin de type β qui occupe le site actif de la protéinase (en bleu-clair).

La NS3 possède en fait deux enzymes protéolytiques : la NS2/3, qui possède l'activité sérine protéase, nécessaire au clivage de la polyprotéine, et la NS3/NS4A (figure 19), qui possède l'activité NTPase/hélicase.⁸⁷

⁸⁷ (a) Bartenschlager, R.; Lohmann, V.; Wilkinson, T.; J.O. Complex formation between the NS3 serine type-proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J. Virol.* **1995**, *29*, 7519-7528. (b) Butkiewicz, N.J.; Wendel, M.; Zhang, R.; Jubin, R.; Pichardo, J.; Smiyh, E.B. et al.

Ainsi, en complément d'une protéase, le VHC possède une hélicase NS3/4A (Figure 20). Cette dernière n'a reçu que peu d'attention en tant que cible antivirale, car son clivage est en partie assuré par des protéases cellulaires, ce qui en fait une cible peu attrayante pour le développement de nouveaux médicaments.^{88,89} Mais elle est capable de séparer des duplexes d'ADN, d'ARN ou ADN-ARN.^{90,91} Cette activité est essentielle lors du cycle de réplication virale. C'est la raison pour laquelle plusieurs stratégies ont vu le jour pour tenter d'inhiber l'activité hélicase de la NS3.



Figure 20 : structure cristalline de la NS3 hélicase complexée par un ADN simple brin (octamère de la déoxyuridine en jaune).

III.3.2. Inhibiteurs

Les mécanismes d'action potentiels d'une molécule capable d'interférer avec l'activité NS3 hélicase sont les suivants : a) inhibition de l'activité NTPase, en empêchant l'attache et l'hydrolyse des nucléotides ; b) inhibition de l'attache des acides nucléiques ; c) inhibition des activités complémentaires d'hydrolyse de NTP et de séparation des duplexes.

Des nucléosides ont été reportés en tant qu'inhibiteurs de la NS3 NTPase du VHC : sous leur forme triphosphorylée, ils se lient au site actif et entrent en compétition avec l'ATP : c'est le cas de la D₄T (2',3'-didéhydro-2',3'-didéoxythymidine) **13**, de l'AZT (3'-Azidothymidine) **11** ou de la FLT (3'-fluoro-2',3'-didéoxythymidine) **38** (Figure 21) par exemple.⁹² De nombreux nucléotides peuvent posséder cette propriété en raison de la grande

Enhancement of hepatitis C virus NS3 proteinase activity by association with NS4A-specific synthetic peptides : identification of sequence and critical residues of NS4A for the cofactor activity. *Virology* **1996**, 225, 328-338. (c) Kwong, A.D.; Kim, J.L.; Rao, G.; Lipovsek, D.; Raybuck, S.A. Hepatitis C virus NS3/4A protease. *Antiviral Res.* **1999**, 41, 67-84.

⁸⁸ Reed, K.E.; Rice, C.M. Expression and characterization of the HCV NS2 protease. *Method Mol. Med.* **1998**, 19, 331-342.

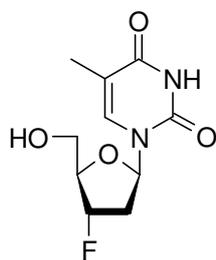
⁸⁹ Pallaoro, M.; Lahm, A.; Biasol, G.; Brunetti, M.; Nardella, C.; Orsatti, L.; Bonelli, F.; Orru, S.; Narjes, F.; Steinkulher, C. Characterisation of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *J. Virol.* **2001**, 75, 9939-9946.

⁹⁰ Tai, C.L.; Chi, W.K.; Chen, D.S.; Hwang, L.H. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J. Virol.* **1996**, 70, 8477-8484.

⁹¹ Tackett, A.J.; Wei, L.; Cameron, C.E.; Raney, K.D. Unwinding of nucleic acids by HCV NS3 helicase is sensitive to the structure of duplex. *Nucl. Acids Res.* **2001**, 29, 565-572.

⁹² Locatelli, G.A.; Gosselin, G.; Spadari, S.; Maga, G. Hepatitis C virus NS3 NTPase/Helicase: Different stereoselectivity in nucleoside triphosphate utilisation suggests that NTPase and helicase activities are coupled by a nucleotide-dependent rate limiting step. *J. Mol. Biol.* **2001**, 313, 683-694.

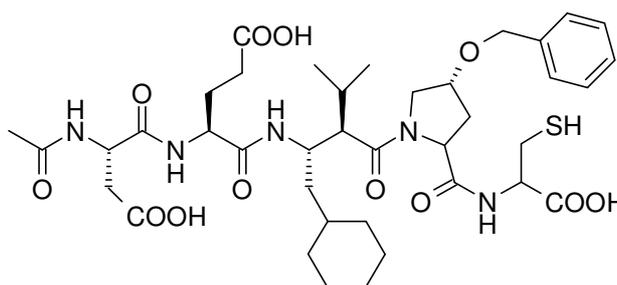
flexibilité du site enzymatique en matière de reconnaissance de substrat de la NS3 hélicase. Ils sont également hydrolysés par la NS3 NTPase, fonction essentielle pour l'activité de cette enzyme.^{93,94} Ils perturbent ainsi son activité de déplacement de fragment d'ADN.



38

Figure 21 : formule chimique de la FLT

L'activité de la NS3 protéase peut être inhibée⁹⁵ par des polypeptides qui miment ceux relâchés après clivage de la polyprotéine, assurés justement par cette NS3 protéase. Après optimisation, en étudiant notamment des effets stériques et électrostatiques, des hexapeptides inhibiteurs noncovalents et compétitifs ont été synthétisés (**39**), reproduisant des fragments des protéines NS4A/NS4B ou NS5A/NS5B (Figure 22).⁹⁶



39

hexapeptide : mime de produit NS5A/NS5B

IC₅₀ 0.033 μM

Figure 22 : structure d'un inhibiteur de la protéase NS3 du VHC

Dans un souci de diminution de la taille puis du caractère peptidique des inhibiteurs de la NS3 protéase (Figure 23), ont suivi des inhibiteurs de type tripeptidiques (**40**)^{97,98} puis macrocycliques (**41**).⁹⁹

⁹³ Lohman, T.M.; Bjornson, K.P. Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 169-214.

⁹⁴ Gwak, Y.; Kim, D.W.; Han, J.H.; Choe, J. DNA helicase activity of the hepatitis C virus non-structural protein 3. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 47-54.

⁹⁵ Lemon, S.M.; Yi, M.; Li, K. "Strong reasons make strong actions"- The antiviral efficacy of NS3/4A protease inhibitors. *Hepatology* **2005**, *41*, 671-674.

⁹⁶ Narjes, F.; Brunetti, M.; Colarusso, S.; Gerlach, B.; Koch, U.; Biasiol, G.; Fattori, D.; De Francesco, R.; Matassa, V.G.; Steinkuehler, V. A-Ketoacids are potent slow binding inhibitors of the hepatitis C Virus (HCV) NS3 protease. *Biochemistry* **2000**, *39*, 1849-1861.

⁹⁷ Barbato, G.; Cicero, D.O.; Nardi, M.C.; Steinkuehler, C.; Cortese, R.; De Francesco, R.; Bazzo, R. The solution structure of the N-terminal proteinase domain of the hepatitis C virus (HCV) NS3 protein provides new insights into its activation and its catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* **1999**, *289*, 371-384.

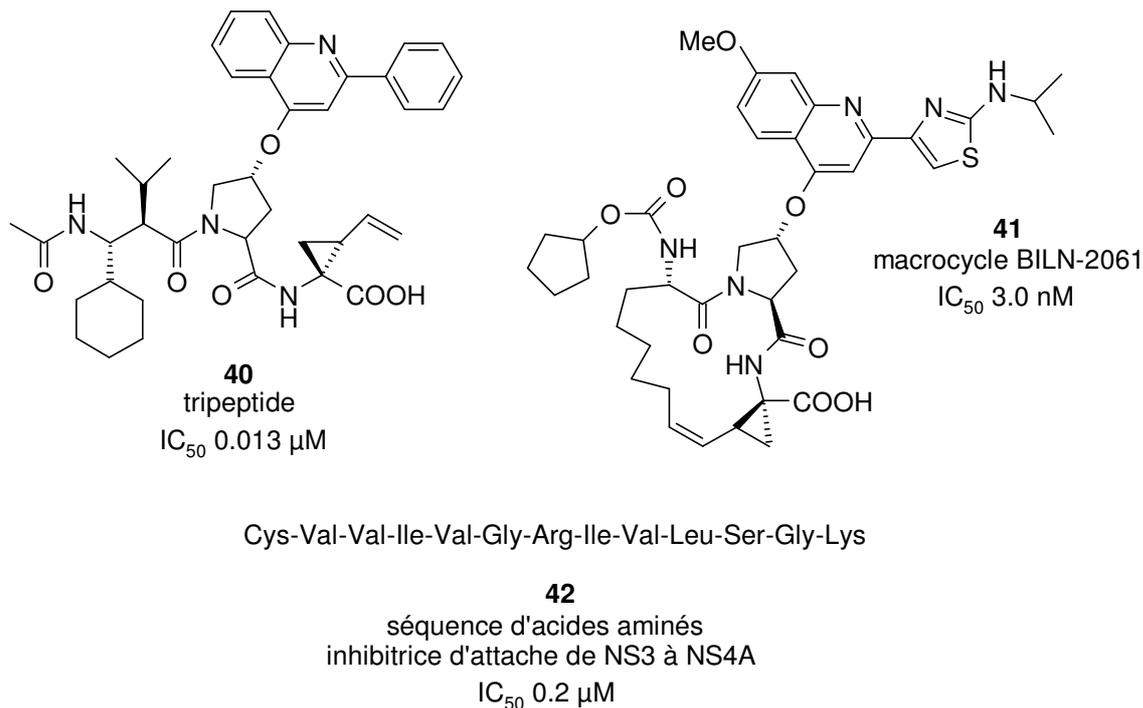


Figure 23 : structures d'inhibiteurs de la protéase NS3 du VHC

Il existe également des inhibiteurs du site d'attache de la NS3 protéase à la NS4A, ce sont des séquences d'acides aminés (**42**) dont le mécanisme d'action n'est pas encore bien élucidé (Figure 23).^{89,100}

Les aptamers d'ARN sont des mono brins d'acides nucléiques qui inhibent directement l'activité d'une protéine *via* une structure tridimensionnelle spécifique qui dicte la haute affinité d'attache à la protéine visée. Ils sont donc similaires à des anticorps monoclonaux ou à des petites molécules. Dans une stratégie de sélection génétique, les aptamers G6-16 et G6-19¹⁰¹ ont montré *in vitro* une inhibition de la NS3 protéase, mais également de l'activité NS3 hélicase. Inhibant deux importantes fonctions de la protéine NS3, les aptamers peuvent donc se révéler utiles comme agents thérapeutiques.¹⁰²

⁹⁸ Barbato, G.; Cicero, D.O.; Cordier, F.; Narjes, F.; Gerlach, B.; Sambucini, S.; Grzesiek, S.; Matassa, V.G.; De Francesco, R.; Bazzo, R. Inhibitor binding induces active site stabilization of the HCV NS3 protein serine protease domain. *EMBO J.* **2000**, *6*, 1195-1206.

⁹⁹ Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.

¹⁰⁰ (a) Walker, M.A.; Hepatitis C virus : an overview of current approaches and progress. *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 518-529. (b) Zhang, R.; Mui, P.W.; Weber, P.C. Synthetic inhibitors of hepatitis C virus NS3 protease. WO 1997043310, 1997.

¹⁰¹ Kumar, P.K.R.; Machida, K.; Urvil, P.T. Kakuichi, N.; Vishnuvardhan, D.; Shimothono, K.; Taira, K.; Nishikawa, S. Inhibition of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA. *Virology* **1997**, *237*, 270-282.

¹⁰² Nishikawa, F.; Kakiuchi, N.; Funaji, K.; Fukuda, K.; Sekiya, S.; Nishikawa, S. Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 1935-1943.

Ainsi, plusieurs inhibiteurs de la NS3 ont été découverts (Figure 23), bien qu'un seul d'entre eux ait subi des tests cliniques (le BILN-2061 de Boehringer Ingelheim, Allemagne).^{103,104} Malheureusement, il a été montré que l'administration de ce composé pourrait mener à la sélection de mutants résistants *in vitro* dans le système de réplique.^{105,106} En outre, le développement clinique de ce composé a été freiné à cause d'une certaine cardiotoxicité observée chez les primates. Cependant, ce composé clinique est actuellement en phase III où il est très bien toléré par administration orale. Il présente une très bonne activité antivirale, en réduisant la quantité d'ARN viral en seulement 2 jours, pour les patients atteints du génotype 1¹⁰⁷ (moins bons résultats pour les génotypes 2 et 3).¹⁰⁸

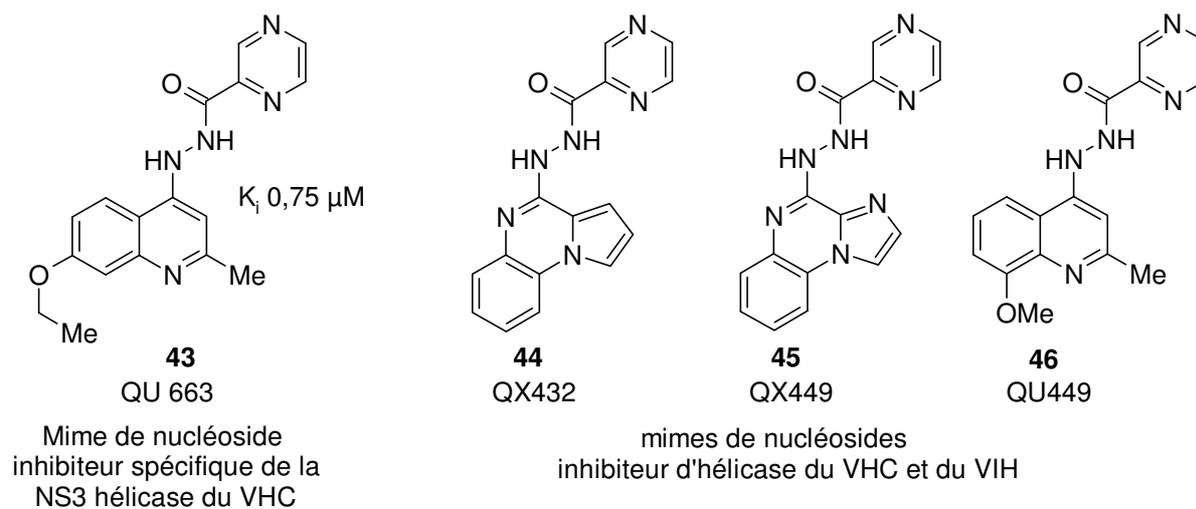


Figure 24 : mimes de nucléosides inhibiteurs de l'activité hélicase d'enzyme virale

¹⁰³ Pause, A.; Kukolj, G.; Bailey, M.; Brault, M.; Do, F.; Halmos, T.; Lagace, L.; Maurice, M.; Marquis, M.; McKercher, G.; Pellerin, C.; Pilote, L.; Thibeault, D.; Lamarre, D. An NS3 serine protease inhibitor abrogates replication of subgenomic hepatitis C virus RNA. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20374-20380.

¹⁰⁴ Lamarre, D.; Anderson, P. C.; Bailey, M.; Beaulieu, P.; Bolger, G.; Bonneau, P.; Boes, M.; Cameron, D.R.; Cartier, M.; Cordingley, M.G.; Faucher, A.-M.; Goudreau, N.; Kawai, S.H.; Kukolj, G.; Lagace, L.; LaPlante, S.R.; Narjes, H.; Poupart, M.-A.; Rancourt, J.; Sentjens, R.E.; St. George, R.; Simoneau, B.; Steinmann, G.; Thibeault, D.; Tsantrizos, Y.S.; Weldon, S.M.; Yong, C.-L.; Llinas-Brunet, M. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* **2003**, *426*, 186-189.

¹⁰⁵ Lin, C.; Lin, K.; Luong, Y. P.; Rao, B. G.; Wei, Y. Y.; Brennan, D.L.; Fulghum, J.R.; Hsiao H.M.; Ma, S.; Maxwell, J.P.; Cotrell, K.M.; Perni, R.B.; Gates, C.A.; Kwong, A.D. In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17508-17514.

¹⁰⁶ Lu, L.; Pilot-Matias, T. J.; Stewart, K. D.; Randolph, J. T.; Pithawalla, R.; He, W.; Huang, P.P.; Klein, L.L.; Mo, H.; Molla, A. Mutations conferring resistance to a potent hepatitis C virus serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2004**, *48*, 2260-2266.

¹⁰⁷ Hinrichsen, H.; Benhamou, Y.; Wedemeyer, H.; Reiser, M.; Sentjens, R.E.; Calleja, J.L.; Forns, X.; Erhardt, A.; Cronlein, J.; Chaves, R.L.; Yong, C.L.; Nehmiz, G.; Steinmann, G.G. Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology* **2004**, *127*, 1347-1355.

¹⁰⁸ Reiser, M.; Hinrichsen, H.; Benhamou, Y.; Reesink, H.W.; Wedemeyer, H.; Avendano, C.; Riba, N.; Yong, C.L.; Nehmiz, G.; Steinmann, G.G. Antiviral efficacy of NS3-serine protease inhibitor BILN-2061 in patients with chronic genotype 2 and 3 hepatitis C. *Hepatology* **2005**, *41*, 832-835.

Un nouvel espoir a vu le jour très récemment, avec la découverte de petites molécules, mimes de nucléosides ciblant la NS3 hélicase (Figure 24),¹⁰⁹ qui sont déjà considérées par certains comme une nouvelle classe de principe actif pour de futurs médicaments anti-VHC.

Jusqu'ici, les petites molécules ciblant cette enzyme étaient peu sélectives et donc peu intéressantes pour une application médicale. Le prototype de cette nouvelle classe de molécule QU663 (**43**) cible de manière spécifique la NS3 du VHC. Des squelettes de molécules voisines (**44-46**) ont quant à eux montré des inhibitions d'enzyme du VHC et du VIH, rendant possible le développement de molécules bifonctionnelles pour le traitement des co-infections par le VHC et le VIH.

III.4. La protéine NS5B

III.4.1. Description

La NS5B est une protéine de 65 kDa, et ses activités ont été intensivement caractérisées *in vitro*.¹¹⁰ Elle exprime une activité ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), essentielle dans la réplication virale de génome, et exigée pour la synthèse du brin négatif (c.-à-d. intermédiaire de réplication) et positif de l'ARN. Les cellules non infectées n'expriment pas une RdRp normalement. Par conséquent il est probable d'envisager le développement d'inhibiteurs spécifiques de cette enzyme qui pourraient bloquer la réplication du VHC, et présentant une cytotoxicité négligeable. C'est la raison pour laquelle cette enzyme est la principale cible pour une thérapie visant le VHC.

Récemment, Bressanelli *et coll.*¹¹¹ ont rapporté une première co-cristallisation de la NS5B du VHC avec des ribonucléotides, menant à l'identification d'une poche de fixation de GTP spécifique et unique en dehors du site actif. Ainsi, les inhibiteurs spécifiques de cette polymérase NS5B RdRp peuvent conduire à des agents antiviraux efficaces.^{112,113} La plupart des polymérases virales sont capables d'initiation *de novo* de la synthèse d'ARN (par un nucléoside triphosphate). La NS5B purifiée est capable d'un mécanisme d'initiation indépendant d'une amorce,¹¹⁴ car elle semble lancer la synthèse d'ARN préférentiellement par

¹⁰⁹ Maga, G.; Gemma, S.; Fattorusso, C.; Locatelli, G.A.; Butini, S.; Persico, M.; Kukrega, G.; Romano, M.P.; Chiasserini, L.; Savini, L.; Novellino, E. Nacci, V.; Spadari, S.; Campiani, G. Specific targeting of hepatitis C Virus NS3 RNA helicase. Discovery of the potent and selective competitive Nucleotide-mimicking inhibitor QU663. *Biochemistry* **2005**, *44*, 9637-9644.

¹¹⁰ Migliaccio, G.; Tomassini, J.E.; Carroll, S.S.; Tomei, L.; Altamura, S.; Bhat, B.; Bartholomew, L.; Bosserman, M.R.; Ceccacci, A.; Colwell, L.F.; Cortese, R.; De Francesco, R.; Eldrup, A.B.; Getty, K.L.; Hou, X.S.; LaFemina, R.L.; Ludmerer, S.W.; MacCoss, M.; McMasters, D.R.; Stahlhut, M.W.; Olsen, D.B.; Hazuda, D.J.; Flores, O.A. Characterization of Resistance to Non-obligate Chain-terminating Ribonucleoside Analogs That Inhibit Hepatitis C Virus Replication in Vitro. *J.Biol.Chem.* **2003**, *278*, 49164-49170.

¹¹¹ Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F.A., De Francesco, R. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J. Virol.* **2002**, *76*, 3482-3492.

¹¹² De Francesco, R.; Tomei, L.; Altamura, S.; Summa, V.; Migliaccio, G. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral. Res.* **2003**, *58*, 1-16.

¹¹³ Tan, S. L.; Pause, A.; Shi, Y.; Sonenberg, N. Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 867-881.

¹¹⁴ (a) Luo, G.; Hamatake, R.K.; Mathis, D.M.; Racela, J.; Rigat, K.L.; Lemm, J.; Colonno, R.J. De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J. Virol.* **2000**, *74*, 851-863. (b) Shim, J.H.; Larson, G.; Wu, J.Z.; Hong, Z. Selection 3'-template bases and initiating nucleotides by hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **2002**, *76*, 7030-7039. (c)

l'intermédiaire d'un mécanisme de "copie arrière".¹¹⁵ En employant ce mécanisme, l'enzyme purifiée peut copier le génome entier du VHC d'une façon processive.¹¹⁶ On accepte généralement que le VHC dans les cellules infectées utilise le mécanisme d'initiation *de novo* pour la synthèse d'ARN afin de répliquer son génome,¹¹⁷ et la structure récemment décrite de la polymérase NS5B complexée avec des nucléotides¹¹¹ a apporté davantage d'appui à cette hypothèse (Figure 25). L'initiation *de novo* doit alors être suivie de l'élongation de l'ARN, de l'arrêt de la polymérisation et du dégagement du brin naissant. En principe, chacune de ces étapes peut être vue comme cible pour une intervention thérapeutique.

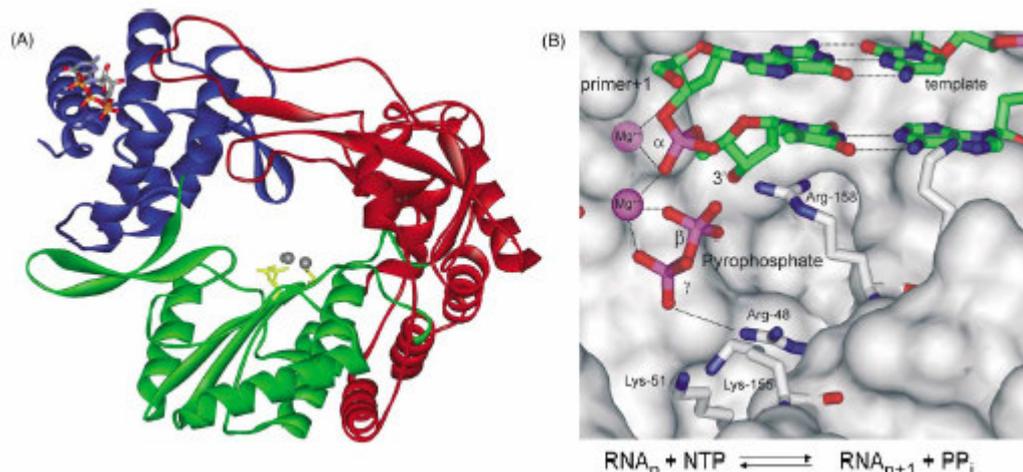


Figure 25 : Structure cristallographique de la protéine NS5B RdRp du VHC obtenue par diffraction des rayons X. (A) RdRp : le pouce, la paume, et les domaines des doigts sont indiqués en bleu, vert, et rouge, respectivement. Les deux ions de Mg^{2+} (en gris) et les aspartates (en jaune) sont montrés au centre du site actif. Une molécule de GTP est liée au sein d'un site allostérique sur la surface du domaine de pouce. (B) Le centre catalytique des "deux-ion-métal" de la polymérase après la formation d'une liaison de type phosphodiester. L'ARN template et la chaîne naissante d'ARN (contenant l'amorce + 1) sont montrés sur cette figure. Le groupe partant pyrophosphate est coordonné par un ion Mg^{2+} du centre catalytique enzymatique. Le schéma de la réaction qui a lieu au sein de la polymérase est montré sous la figure.

L'inhibition de l'activité polymérasique virale est le mécanisme d'action le plus ciblé parmi la majorité des médicaments antiviraux approuvés.^{118,119} Ceci explique pourquoi beaucoup d'équipes de recherche se sont concentrées sur l'identification des inhibiteurs de la polymérase NS5B pour empêcher la répllication du VHC.¹²⁰ Selon leur structure chimique et mécanisme d'action, des inhibiteurs existants de la polymérase NS5B peuvent être classés en deux catégories principales: (i) analogues de nucléosides (NI), et (ii) inhibiteurs de type non-nucléosides (NNI).

Zhong, W.; Uss, A.S.; Ferrari, E.; Lau, J.Y.; Hong, Z. *De novo* initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J. Virol.* **2002**, *74*, 2017-2022.

¹¹⁵ Behrens, S.E.; Tomei, L.; De Francesco, R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* **1996**, *15*, 12-22.

¹¹⁶ Lohmann, V.; Korner, F.; Herian, U.; Bartenschlager, R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J. Virol.* **1997**, *71*, 8416-8428.

¹¹⁷ Butcher, S.J.; Grimes, J.M.; Makeyev, E.V.; Bamford, D.H.; Stuart, D.I. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* **2001**, *410*, 235-240.

¹¹⁸ De Clercq, E. ASPET Otto Kraye Award lecture. Molecular targets for antiviral agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *297*, 1-10.

¹¹⁹ De Clercq, E. Antiviral drugs : current state of the art. *J. Clin. Virol.* **2001**, *22*, 73-89.

¹²⁰ Durantel, D.; Escuret V.; Zoulim, F. Current and emerging therapeutic approaches to hepatitis C infection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2003**, *1*, 441-454.

III.4.2. Inhibiteurs non-nucléosidiques

Un certain nombre d'inhibiteurs de la polymérase NS5B de type non-nucléosidique (NNIs) a été rapporté. Les benzimidazoles¹²¹ **47** et **48** (Figure 26) interagissent dans un site allostérique de l'enzyme et modifient sa conformation, ce qui empêche cette dernière d'assurer sa fonction lors de la réplication du virus. Certains d'entre eux ont fait l'objet de tests cliniques.

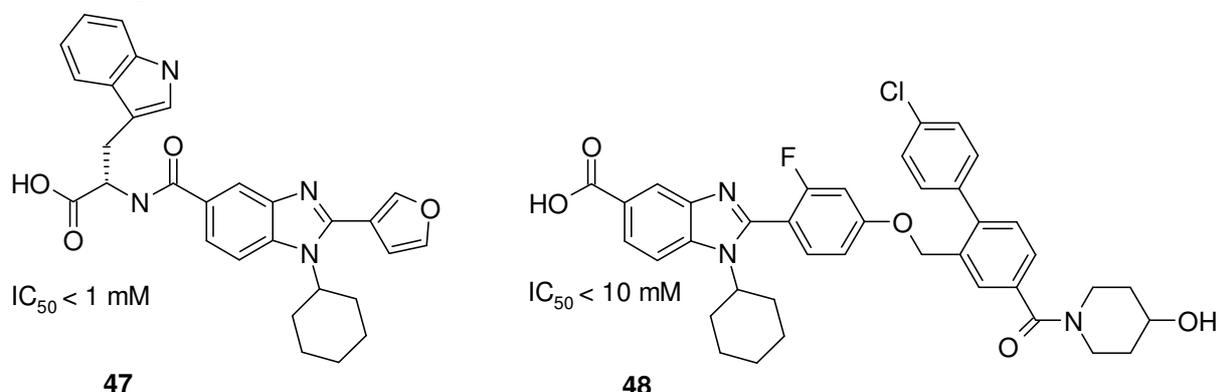


Figure 26 : Structure chimique d'inhibiteurs de l'activité HCV NS5B RdRp de type benzimidazole (**47**) ou (**48**)

Les benzothiadiazines¹²² **49** interagissent directement avec la polymérase virale et inhibent la synthèse d'ARN (Figure 27). Quant aux acides dicétoniques^{123,124} **50** et **51**, ce sont des mimes de pyrophosphates; plus de 200 ont été répertoriés. Ils empêchent l'attache de la partie phosphorylée des nucléotides au site actif de l'enzyme¹²⁵ et interagissent dans le site actif enzymatique par chélation avec un ion métallique (Figure 27).

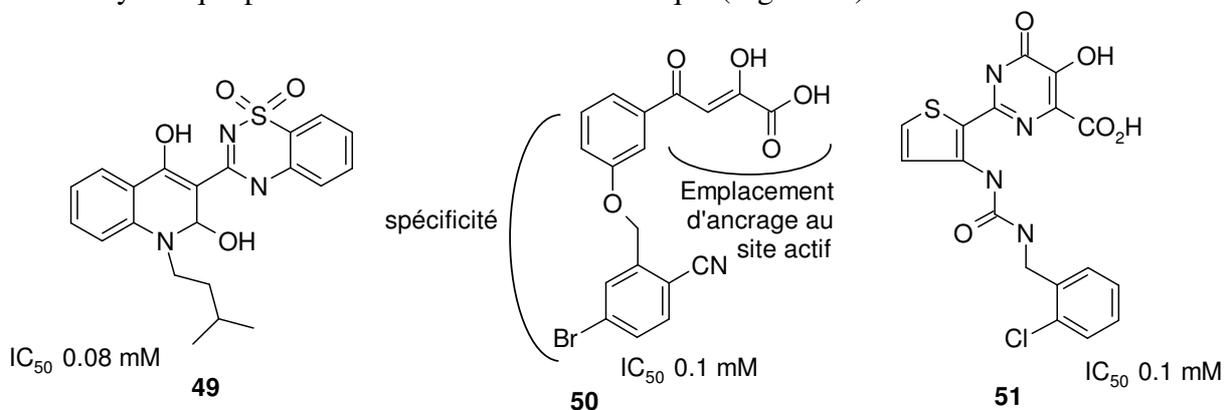


Figure 27 : Structure chimique d'inhibiteurs de l'activité HCV NS5B RdRp de type benzothiazine (**49**) ou acides dicétoniques (**50**) et (**51**)

¹²¹ (a) Beaulieu, P.-L.; Llinas-Brunet, M. Therapies for hepatitis C infection : targeting the non-structural proteins of HCV. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *1*, 163-176. (b) Beaulieu, P.-L.; Fazal, G.; Gillard, J.; Kukolj, G.; Austel, V. Preparation of benzimidazolecarboxylates and related compounds as viral polymerase inhibitors. WO 2002004425, 2002. (c) Hashimoto, H.; Mizutani, K.; Yoshida, A. Preparation of heterocyclic compounds as remedies for hepatitis C. WO 200147883, 2001.

¹²² Dhanak, D.; Kaura, A.; Shaw, A. Preparation of 3-(1,1-dioxo-2H-benzo-1,2,4,-thiadiazin-3-yl)-2-quinolones as novel anti-infectives. WO 2001085172, 2001.

¹²³ Altamura, S.; Tomei, L.; Koch, J.O.; Neuner, P.J.S.; Summa, V. Diketoacid-derivatives as inhibitors of viral polymerases. WO 2000006529, 2000.

¹²⁴ Gardelli, C.; Giuliano, C.; Harper, S.; Koch, U.; Narjes, F.; Ontoria, J. M.; Poma, M.; Ponzi, S.; Stansfield, I.; Summa, V. Dihydropyrimidine carboxylic acids as viral polymerase inhibitors. WO 2002006426, 2002.

¹²⁵ Bretner, M. Existing and future therapeutic options for hepatitis C virus infection. *Acta Biochim. Pol.* **2005**, *52*, 57-70.

Les phénylalanines *N,N*-disubstituées¹²⁶ **52** (Figure 28) sont spécifiques des polymérase virales dont ils inhibent l'activité par interaction dans un site allostérique de l'enzyme.

Récemment des pyrano-indoles¹²⁷ **53** (Figure 28) ont été identifiés comme inhibiteurs sélectifs de la NS5B (par rapport à d'autres polymérase humaines).

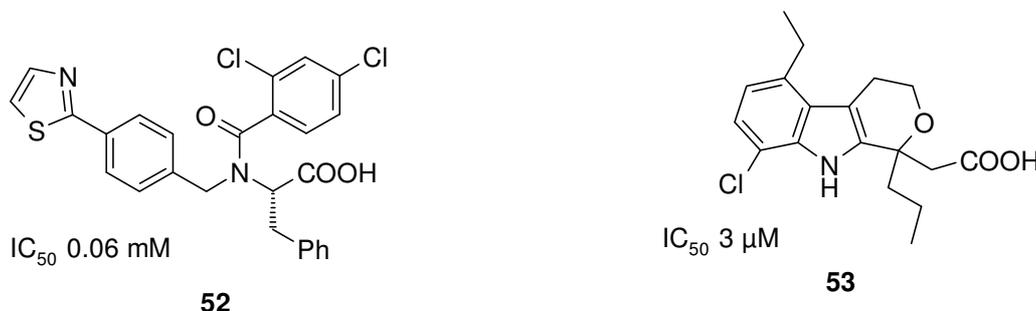


Figure 28 : Structure chimique d'inhibiteurs de l'activité HCV NS5B RdRp de type phénylalanines *N,N*-disubstituées (**52**) ou pyrano-indole (**53**)

III.4.3. Inhibiteurs nucléosidiques

III.4.3.1. Structures de type ribofuranosyle et ses dérivés

Jusqu'en 2003, alors que de nombreux inhibiteurs non-nucléosidiques ont été rapportés, seulement quelques inhibiteurs nucléosidiques ont été identifiés.¹²⁸ Depuis cette année là, de nombreux analogues de nucléosides ont été synthétisés et de nombreuses études de type structure-activité ont été proposées pour expliquer leurs propriétés biologiques.

Plusieurs analogues de nucléosides modifiés en position 2' du sucre,^{128a} des 3'-déoxyribonucléosides,^{128b} et des analogues de nucléoside dont la base hétérocyclique est modifiée, tels que la β -D-N4-hydroxycytidine (Figure 33),¹²⁹ ont montré une aptitude à

¹²⁶ Chan, L.; Reddy, T.J.; Proulx, M.; Das, S.K.; Pereira, O.; Wang, W.; Siddiqui, A.; Yannopoulos, C.G.; Poisson, C.; Turcotte, N.; Drouin, A.; Alaoui-Ismaili, M.H.; Bethell, R.; Hamel, M.; L'Heureux, L.; Bilimoria, D.; Nguyen-Ba, N. Identification of *N,N*-Disubstituted Phenylalanines as a novel class of inhibitors of hepatitis C NS5B polymerase. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1283-1285.

¹²⁷ Gopalsamy, A.; Lim, K.; Ciszewski, G.; Park, K.; Ellingboe, J.W.; Bloom, J.; Insaf, S.; Upešlacis, J.; Mansour, T.S.; Krishnamurthy, G.; Damarla, M.; Pyatski, Y.; Ho, D.; Howe, A.Y.M.; Orłowski, M.; Feld, B.; O'Connell, J. Discovery of Pyrano[3,4b]indoles as potent and selective HCV NS5B polymerase inhibitor. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6603-6608.

¹²⁸ (a) Carroll, S.S.; Tomassini, J.E.; Bosserman, M.; Getty, K.; Stahlhut, M.W.; Eldrup, A.B.; Bhat, B.; Hall, D.; Simcoe, A.L.; LaFemina, R.; Rutkowski, C.A.; Wolanski, B.; Yang, Z.; Migliaccio, G.; De Francesco, R.; Kuo, L.C.; MacCoss, M.; Olsen, D.B. Inhibition of Hepatitis C Virus RNA Replication by 2'-Modified Nucleoside Analogs. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11979-11984. (b) Shim, J.; Larson, G.; Lai, V.; Naim, S.; Wu, J.Z. Canonical 3'-deoxyribonucleotides as a chain terminator for HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* **2003**, *58*, 243-251. (c) Migliaccio, G.; Tomassini, J.E.; Carroll, S.S.; Tomei, L.; Altamura, S.; Bhat, B.; Bartholomew, L.; Bosserman, M.R.; Ceccacci, A.; Colwell, L.F.; Cortese, R.; De Francesco, R.; Eldrup, A.B.; Getty, K.L.; Hou, X.S.; LaFemina, R.L.; Ludmerer, S.W.; MacCoss, M.; McMasters, D.R.; Stahlhut, M.W.; Olsen, D.B.; Hazuda, D.J.; Flores, O.A. Characterization of Resistance to Non-obligate Chain-terminating Ribonucleoside Analogs That Inhibit Hepatitis C Virus Replication in Vitro. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 49164-49170.

¹²⁹ Stuyver, L.J.; Whitaker, T.; McBrayer, T.R.; Hernandez-Santiago, B.I.; Lostia, S.; Tharnish, P.M.; Ramesh, M.; Chu, C.K.; Jordan, R.; Shi, J.; Rachakonda, S.; Watanabe, K.A.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F. Ribonucleoside

bloquer la réplication du VHC dans un système réplicon. Récemment, Sommadossi et Lacolla,¹³⁰ ont décrit une série de nucléosides modifiés en 1', 2'- ou 3'- utilisable une fois par jour par voie orale dans un traitement utilisé contre les flavivirus et les pestivirus (Figure 29). Parmi ces derniers, la β -D-2'-méthyl-ribofuranosyl-guanosine (**57**) et l'analogue de cytosine (**58**) étaient les inhibiteurs les plus efficaces, et étaient phosphorylés en culture cellulaire.

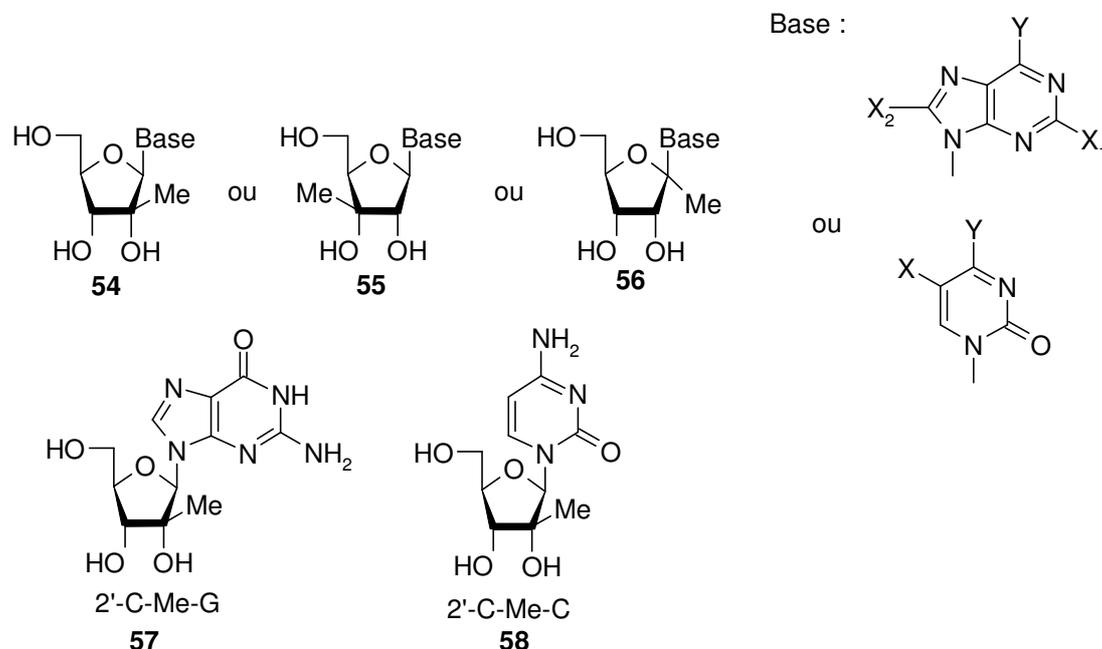


Figure 29 : Quelques nucléosides anti-NS5B méthylés sur le sucre (Idenix Pharmaceuticals: WO 2001092282, 2001)

De même, Carroll *et coll.* ont décrit^{128a} en 2003 l'inhibition de la réplication du VHC par des analogues de nucléoside 2'-modifiés, comme la 2'-C-méthyladénosine (**59**) et la 2'-O-méthylcytidine (**60**), dans une lignée cellulaire de réplicon subgénomique (Figure 30 et tableau 4). Migliaccio *et coll.* ont appuyé cette étude : ces molécules et la 2'-C-méthylguanidine (**57**) ont présenté un profil pharmacologique favorable dans le cadre d'un traitement contre le VHC et toute autre infection causée par un *flavivirus*.^{128c}

Composé	IC ₅₀ (μM)		NTP intracell. (pmole/10 ⁶ cells)
	Réplicon VHC	NS5B (VHC)	
2'-C-Me-A 59	0,25 ± 0,6	1,9 ± 0,4	105 + 31
2'-C-Me-G 57	4,2 ± 2,5	0,13 ± 0,04	0,2 + 0,1
2'-O-Me-C 60	21,2 ± 3,2	3,8 ± 0,3	0,1 + 0,08

59 **60**

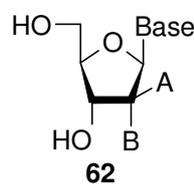
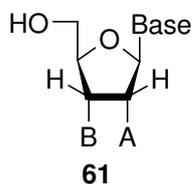
2'-C-Me-A 2'-O-Me-C

analogue that blocks replication of bovine diarrhea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 244-254.

¹³⁰ Sommadossi, J.P., Lacolla, P. Methods and compositions for treating flaviviruses and pestiviruses. WO 2001092282, 2001.

Figure 30 et tableau 4 : Quelques nucléosides anti-NS5B (de MERCK; WO 20020057425, 2002.)

D'ailleurs, Eldrup *et coll.*¹³¹ ont récemment présenté une étude structure-activité des ribonucléosides à base purine pour l'inhibition de la RdRp du VHC (Figure 31 et tableaux 5 & 6). Cette étude a montré l'importance de la configuration des groupements hydroxyles du sucre en position 2'- et 3'- pour l'inhibition de la réplication du VHC dans un système réplicon.



A	B	Base	NS5B IC ₅₀ (μM)	Réplicon ^a EC ₅₀ (μM)
OH	H	adénine	22	46
OH	H	guanine	0.6	50
OH	F	adénine	28	1,2
OH	F	guanine	1.8	> 50
OCH ₃	OH	adénine	47	> 50
OCH ₃	OH	guanine	1.6	> 50

^a valeurs du réplicon : à 24 h.

A	B	Base	NS5B IC ₅₀ (μM)	Replicon ^a EC ₅₀ (μM)
H	OCH ₃	adénine	47	> 50
H	OCH ₃	guanine	1.6	> 50
H	F	adénine	> 50	> 50
H	F	guanine	substrat	> 50
OH	H	adénine	50	> 50
OH	H	guanine	20	> 50
CH ₃	OH	adénine	1.9	0,3
CH ₃	OH	guanine	0.13	3.5

Figure 31 et tableaux 5 & 6. Pouvoir inhibiteur de nucléosides triphosphates 2'-, et 3'- modifiés sur la synthèse d'ARN catalysée par la NS5B (NS5B IC₅₀) et pouvoir inhibiteur de nucléosides triphosphates 2'-, et 3'- modifiés sur la synthèse d'ARN dans un système réplicon (EC₅₀).

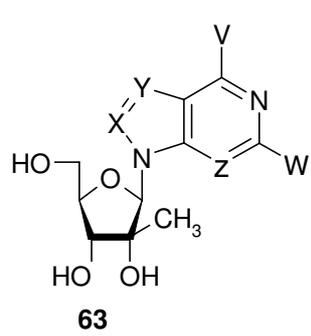
La capacité d'agir des 3'-déoxynucléotides comme terminateurs de chaînes pour la RdRp NS5B du VHC a également été prouvée.^{128b} Parmi les diverses modifications faites aux nucléosides en position 2'- et 3'- qui ont été examinées ci-dessus, seule l'introduction du groupe 2'-C-méthyle a mené à l'inhibition efficace de la réplication d'ARN du VHC dans un système réplicon. D'ailleurs, la substitution méthylique du furanose change la conformation du sucre. De toutes les substitutions de méthyle examinées, seulement la position β du méthyle sur le C-2' maintient la préférence pour la conformation C3'-*endo* du furanose. Mais ces composés présentent une activité limitée ainsi qu'un profil métabolique et une biodisponibilité non satisfaisants, même pour la 2'-C-méthyladénosine. Ces limitations ont pu être contournées par des modifications sur l'hétérocycle. Par cette approche, Eldrup *et coll.*¹³² ont décrit une étude structure-activité d'inhibiteurs de la réplication du VHC appartenant à la famille des ribonucléosides 2'-C-méthyle dont la base hétérocyclique a été modifiée.

Cette étude structure-activité (Figure 32 et tableau 7), dans une série de ribonucléosides 2'-C-méthyle dont la base hétérocyclique a été modifiée, a indiqué que la 4-

¹³¹ Eldrup, A.B.; Allerson, C.R.; Bennett, C.; Bera, S.; Bhat, B.; Bhat, N.; Bosserman, M.R.; Brooks, J.; Burlein, C.; Carroll, S.S.; Cook, P.D.; Getty, K. L.; MacCoss, M.; McMasters, D.R.; Olsen, D.B.; Prakash, T.P.; Prhac, M.; Song, Q.; Tomassini, J.E.; Xia, J. Structure-Activity Relationship of Purine Ribonucleosides for Inhibition of Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2283-2295.

¹³² Eldrup, A.B.; Prhac, M.; Brooks, J.; Bhat, B.; Prakash, T.P.; Song, Q.; Bera, S.; Bhat, N.; Dande, P.; Cook, D.P.; Bennett, C.F.; Carroll, S.S.; Ball, R.G.; Bosserman, M.; Burlein, C.; Colwell, L.F.; Fay, J.F.; Flores, O.A.; Getty, K.; LaFemina, R.L.; Leone, J.; MacCoss, M.; McMasters, D.R.; Tomassini, J.E.; Von Langen, D.; Wolanski, B.; Olsen, D.B. Structure-Activity Relationship of heterobase-modified 2'-C-méthyl ribonucleosides as inhibitors of hepatitis C virus RNA replication. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5284-5297.

amino-7-(2-C-méthyl-β-D-ribofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine, et la 4-amino-5-fluoro-7-(2-C-méthyl-β-D-ribofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine, agissent comme inhibiteur de la NS5B dans un système réplicon avec une IC₅₀ < 100 μM.^{133,134} Les composés suivants, la 4-amino-1-(2-C-méthyl-β-D-ribofuranosyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine et la 4-amino-7-(2-C-méthyl-β-D-arabinofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine, ont un profil de stabilité accru en présence d'enzymes, et le dernier (le composé le plus efficace), est bio-disponible par voie orale chez le rat.



63

X	Y	Z	V	W	Réplicon	MTS
					EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
CH	N	N	NH ₂	H	0.26	> 100
CH	N	N	HO	NH ₂	3.5	> 100
CH	CH	N	NH ₂	H	0.25	> 100
N	CH	N	NH ₂	H	> 100	> 100
CH	CH	CH	NH ₂	H	> 100	> 100
CH	CH	N	HO	NH ₂	> 100	> 100
CH	CF	N	NH ₂	H	0.07	> 100
CH	CCl	N	NH ₂	H	0.13	50
CH	CBr	N	NH ₂	H	0.24	40
CH	CMe	N	NH ₂	H	34	> 100
CH	CCN	N	NH ₂	H	3.1	50
CH	CCONH ₂	N	NH ₂	H	0.08	33
CH	CCOOH	N	NH ₂	H	70	> 100
CH	CH	N	NH ₂	NH ₂	100	> 100
CH	CH	N	NH ₂	F	100	> 100

Figure 32 et tableau 7 : Le pouvoir inhibiteur (EC₅₀) de nucléosides possédant une hétérobase modifiée sur la réplication d'ARN du VHC dans un réplicon subgénomique hébergé dans les cellules Hb-1 et la cytotoxicité (CC₅₀) comme mesuré par MTS.

Parrallèlement, la β-D-N4-hydroxycytidine (**64**), un analogue de nucléoside dont la base est modifiée (Figure 33), s'est avéré avoir des activités anti-pestivirus et anti-hépacivirus,¹²⁹ et une activité sélective anti-VHC (EC₉₀ de 5 μM) dans le système réplicon.¹³⁵

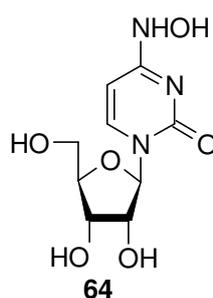


Figure 33 : Formule de la β-D-N4-hydroxycytidine anti-NS5B.

¹³³ Carroll, S.S., Lafemina, R.L., Hall, Dawn L., Himmelberger, A.L., Kuo, L.C., Maccoss, M., Olsen, D.B., Rutkowski, C.A., Tomassini, J.E., An, H., Bhat, B., Bhat, N., Cook, P.D., Eldrup, A.B., Guinasso, C.J., Prhavc, M., Prakash, T.P. Preparation of nucleoside derivatives as inhibitors of RNA-dependent RNA viral polymerase. WO 20020057425, 2002.

¹³⁴ Carroll, S.S., Maccoss, M., Olsen, D.B., Bhat, B., Bhat, N., Cook, P.D., Eldrup, A.B., Prakash, T.P., Prhavc, M., Song, Q. Preparation of nucleoside derivatives as inhibitors of RNA-dependent RNA viral polymerase. WO 20020057287, 2002.

¹³⁵ Hernandez-Santiago, B.I.; Thierry Beltran, T.; Lieven Stuyver, L.; Chung K. Chu, C.K.; Schinazi, R.F. Metabolism of the Anti-Hepatitis C Virus Nucleoside β-N4-Hydroxycytidine in Different Liver Cells *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 4636-4642.

Plus récemment,⁶² un système de réplication complète du VHC en milieu cellulaire, basé sur les cellules OR6, a permis de prouver que la ribavirine (**26**) seule, mais aussi la mizoribine (**65**) (Figure 34), possèdent bien un effet sur la réplication du VHC, bien que cet effet soit moins important que celui de l'interféron α .¹³⁶ En outre, pour la première fois ces deux composés ne présentent pas de cytotoxicité (ici sur les cellules OR6), démontrant ainsi que l'activité ne provient pas de la toxicité. Contrairement à de nombreux systèmes basés sur les cellules Huh-7, ce système permet d'observer un effet synergique entre la ribavirine (**26**) et l'interféron α , et également entre la mizoribine (**65**) et l'interféron α , le second étant au moins aussi important que le premier.

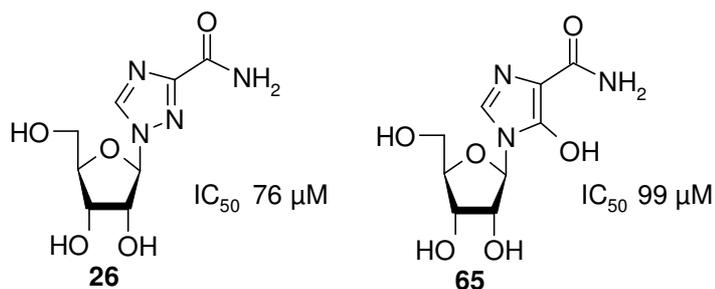
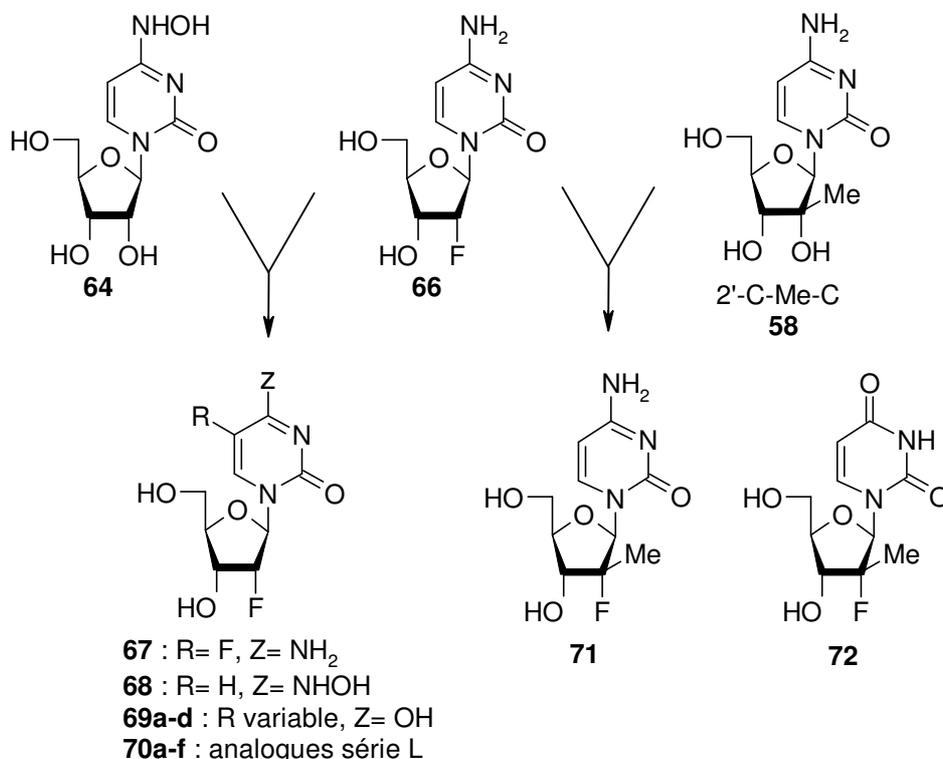


Figure 34 : la ribavirine (**26**) et la mizoribine (**65**), deux nucléosides apparentés anti-NS5B, et leur activité anti-VHC testés avec le nouveau système de culture cellulaire OR6.

En 2005, plusieurs équipes (dont la nôtre) se sont intéressées à optimiser les activités de molécules modèles synthétisées au sein de leur propre laboratoire, en apportant des modifications structurales bien choisies, dictées par les règles d'isostéries électroniques et / ou stérique.



¹³⁶ Naka, K.; Ikeda, M.; Abe, K.; Dansako, H.; Kato, N. Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication : effect of a combination with interferon- α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 330, 871-879.

Figure 35.

Ainsi, Shi *et coll.*¹³⁷ sont partis de composés actifs et non toxiques **64** et **66**, pour synthétiser une série de nouveaux analogues de la 2'-FdC (Figure 35). Le composé **67** obtenu est actif mais très toxique, tandis que les dérivés **68**, **69a-d** et **70a-f** ne sont ni actifs ni toxiques (Tableau 8). Par contre, avec le dérivé 2'-F-2'-C-Me-C **71**, Clark *et coll.*¹³⁸ ont réussi à gagner en activité tout en conservant l'absence de toxicité des composés dont ils se sont inspirés (la 2'-FdC **66** et la 2'-C-Me-C **58**).

Composés	BVDV ^a	BVDV ^a	Réplicon ^b	rRNA ^c
	EC ₉₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	EC ₉₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
64	5.4	ND	5.0	> 100
66	> 100	ND	5.6 - 6.5	> 100
67	ND	ND	9.4	< 1
68	ND	ND	> 100	> 100
69a-d	> 100	ND	> 100	> 100
70a-f	> 100	ND	> 100	> 100
58	2.3	> 100	19.0	> 100
71	> 100	> 100	5.4	> 100
72	> 100	> 100	> 100	> 100

Tableau 8 : pouvoir inhibiteur (EC₉₀) de nucléosides modifiés sur la synthèse d'ARN dans un système réplicon (EC₅₀) (b: au bout de 96h) et sur le système BVDV en cellules MBDK (a: au bout de 96h), et cytotoxicité (CC₅₀ au bout de 4 jours)

III.4.3.2. Analogues carbocycliques de la ribavirine de type 1,2,3-triazolo-3'-déoxynucléosides

La synthèse de divers 1,2,3-triazolo a été décrite par notre équipe¹³⁹ (composés **73** à **75**, Figure 34).

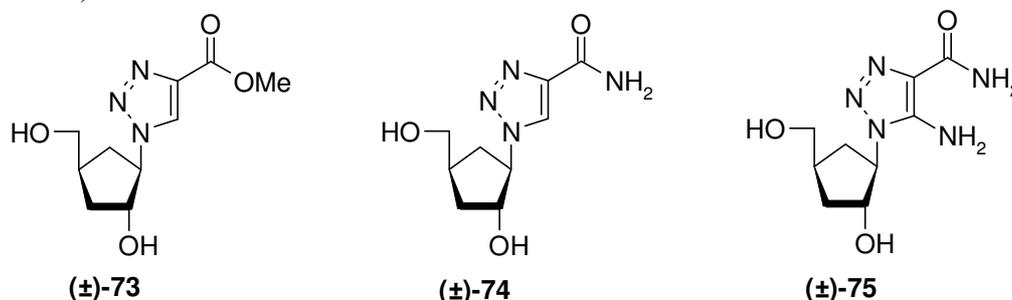


Figure 34 : analogues carbocycliques 1,2,3-triazole de la ribavirine **73-75**.

Etant donné l'idée qu'une des formes actives de la ribavirine est la forme monophosphate inhibant l'*IMPDH*, diminuant ainsi la concentration intracellulaire de GTP, et induisant une diminution de la synthèse protéinique virale, des analogues de type phosphonate

¹³⁷ Shi, J.; Du, J.; Ma, T.; Pankiewicz, K.W.; Patterson, S.E.; Tharnish, P.M.; McBrayer, T.R.; Stuyver, L.J.; Otto, M.J.; Chu, C.K.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A. Synthesis and anti-viral activity of a series of D- and L-2'-deoxy-2'-fluororibonucleosides in the subgenomic HCV replicon system. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1641-1652.

¹³⁸ Clark, J.L.; Hollecker, L.; Mason, J.C.; Stuyver, L.J.; Tharnish, P.M.; Lostia, S.; McBrayer, T.R.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A.; Otto, M.J.; Furman, P.A.; Stec, W.J.; Patterson, S.E.; Pankiewicz, K.W. Design, Synthesis, and Antiviral Activity of 2'-Deoxy-2'-fluoro-2'-C-méthylcytidine, a Potent Inhibitor of Hepatitis C Virus Replication. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5504-5508.

¹³⁹ Saito, Y.; Escuret, V.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Schinazi, R.F.; Agrofoglio, L.A. Synthesis of 1,2,3-triazolo-carbanucleoside analogues of ribavirin targeting an HCV in replicon. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3633-3639.

ont aussi été synthétisés au sein de notre laboratoire (composés **76** à **78**, Figure 35). Malheureusement, tous les composés synthétisés n'ont montré aucune activité sur la réplication du VHC dans le système réplicon, ni de toxicité sur les cellules Huh-7. Ceci est sûrement lié à un problème de pénétration cellulaire.

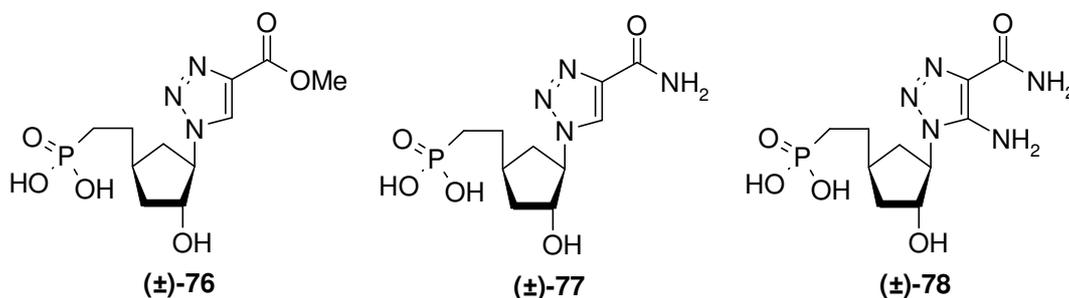
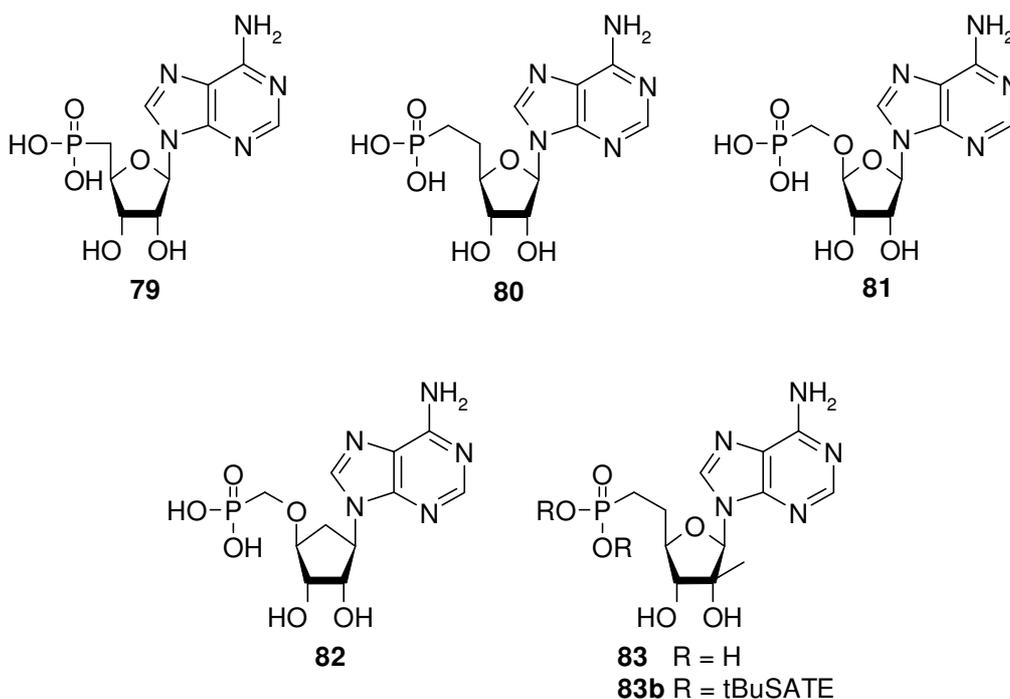


Figure 35 : analogues carbocycliques phosphonates 1,2,3-triazole de la ribavirine **76-78**.

III.4.3.3. Les analogues phosphonates et les pro-drogues de type SATE

Le nucléoside 5'-phosphonate mime le nucléoside 5'-monophosphate. Cependant, le phosphonate possède comme avantage par rapport à son analogue phosphate d'avoir une plus grande stabilité métabolique, car sa liaison carbone-phosphate n'est pas sensible à l'hydrolyse des phosphatases. Plus important encore, la présence du 5'-phosphonate permet de contourner la première étape de phosphorylation du nucléoside, étape souvent considérée comme limitante et inefficace dans le mécanisme qui mène au nucléoside 5'-triphosphate, la forme active des nucléosides. En effet, comme les nucléosides monophosphates, les nucléosides phosphonates sont substrats des kinases nucléotidiques cellulaires. Le concept du phosphonate a été utilisé pour concevoir des terminateurs de chaînes anti-HIV et a montré qu'il est valide. En dépit de ces succès, ce concept n'a été que très peu exploré pour les virus à ARN.¹⁴⁰ Notre équipe s'y est intéressée (Figure 35), mais sans résultat positif.



¹⁴⁰ Holy, A. Phosphonomethoxyalkyl analogues of nucleotides. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, 9, 2567-2592.

Composés	Réplicon ^a	
	EC ₉₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
79	ND ^b	ND ^b
80	200	> 300
81	65	> 300
82	30	300
83	35	> 300
83b	25	30

Figure 36 et tableau 9 : structures et évaluation biologique sur un système réplicon (a) de dérivés phosphonate de l'adénosine conçus pour viser la NS5B du VHC. (b) : non déterminé pour cause de solubilité insuffisante.

Plus récemment, Koh *et coll.*¹⁴¹ ont synthétisé et évalué l'activité antivirale d'analogues phosphonates de l'adénosine (Figure 36 et tableau 9).

Les analogues triphosphates des phosphonates peuvent être terminateurs de chaînes ou simplement inhibiteurs compétitifs de l'ATP sur la NS5B. Seulement **80 TP** et **81 TP** sont incorporés dans l'ARN par la NS5B RdRp, mais moins bien que l'ATP. Ils agissent comme terminateurs de chaînes. Leur faible différence structurale (par rapport à l'ATP) entraîne une reconnaissance similaire par la NS5B mais également de graves conséquences sur la catalyse de cette enzyme virale. Les composés **79 TP**, **82 TP** et **83 TP** ne sont pas incorporés dans la chaîne d'ARN, mais sont inhibiteurs compétitifs de l'ATP. Enfin, le dérivé pro-drogue de type bis-SATE **83b** est légèrement plus actif que le dérivé **83** comme attendu, mais de manière surprenante sa toxicité est largement augmentée. Ceci laisse à penser que **83** possède un large spectre d'activité sur des enzymes de la cellule hôte, et que sa cytotoxicité n'apparaît que lorsqu'il est réellement délivré à l'intérieur de la cellule.

Les dérivés de type 5'-bis-SATE (*t*BuSATE ou *S*-pivaloyl-2-thioethyl) esters^{142,143} sont des pro-drogues de nucléoside 5'-monophosphate ou phosphonate, dont l'efficacité et le rationnel ont été prouvés sur le VIH,¹⁴⁴ conçus par l'équipe de Périgaud.¹⁴⁵

Prakash *et coll.*¹⁴⁶ ont repris récemment ce concept pour l'appliquer à la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs de la réplication du VHC (Figure 37 et tableau 10).

¹⁴¹ Koh, Y.-H.; Shim, J.H.; Wu, J.Z.; Zhong, W.; Hong, Z. Girardet, J.-L. Design, synthesis, and antiviral activity of adenosine 5'-phosphonate analogues as chain terminators against hepatitis C virus. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2867-2875.

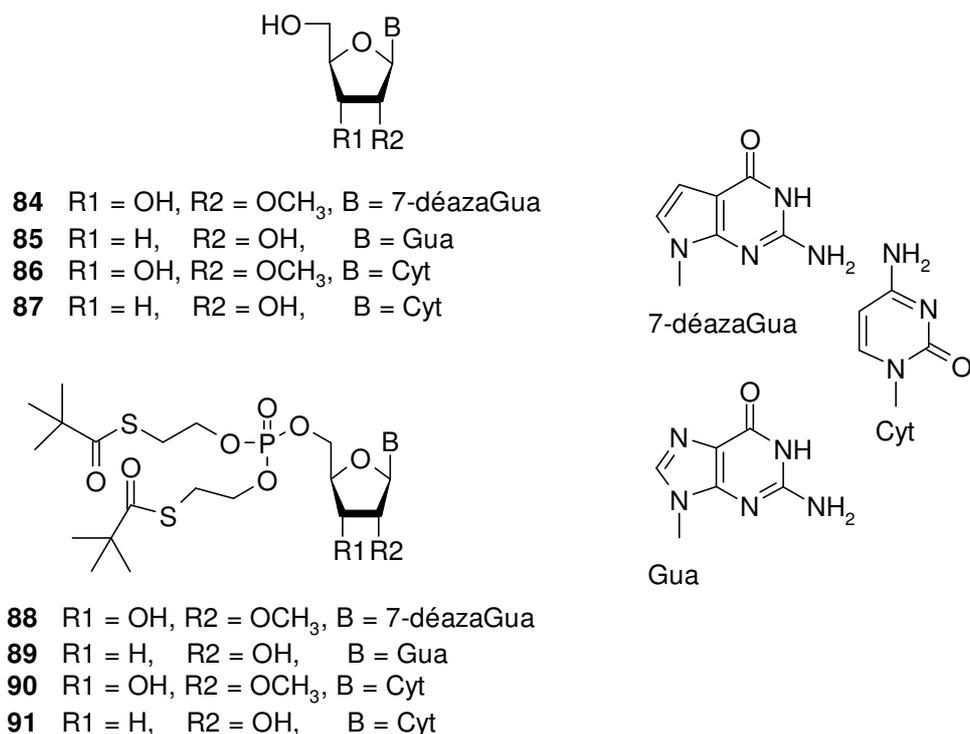
¹⁴² Parang, K.; Wiebe, L.I.; Knaus, E.E. Novel approaches for designing 5'-O-ester prodrugs of 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (AZT). *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 995-1039.

¹⁴³ Peyrottes, S.; Egron, D.; Lefebvre, I.; Gosselin, G.; Imbach, J.L.; Périgaud, C. SATE pronucleotide approaches: an overview. *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 395-408.

¹⁴⁴ Périgaud, C.; Gosselin, G.; Lefebvre, I.; Girardet, J.L.; Benzaria, S.; Barber, I.; Imbach, J.L. Rational design for cytosolic delivery of nucleoside monophosphates : SATE and DTE as enzyme-labile transient phosphate protecting groups. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2521-2526.

¹⁴⁵ (a) Pompon, A.; Lefebvre, I.; Imbach, J.L. Kahn, S.; Farquhar, D. Decomposition pathway of the mono- and bis(pivaloyloxyméthyl) esters of azidothymidine 5'-monophosphate in cell extract and in tissue culture medium : an application of the "online ISRP-cleaning" HPLC technique. *Antivir. Chem. Chemother.* **1994**, *5*, 91-98. (b) Girardet, J.L.; Périgaud, C.; Aubertin, A.-M.; Gosselin, G.; Kirn, A.; Imbach, J.L. Increase of the anti-VIH activity of d4T in human T-cell culture by the use of the sate pronucleotide approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2981-2984. (c) Périgaud, C.; Aubertin, A.-M.; Benzaria, S.; Pelicano, H.; Girardet, J.L.; Kirn, A.; Gosselin, G.; Imbach, J.L. Equal inhibition of the replication of the human immunodeficiency virus in human T-cell culture by ddA bis(SATE)phosphotriester and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 11-14.

¹⁴⁶ Prakash, T.P.; Prhavic, M.; Eldrup, A.B.; Cook, P.D.; Carroll, S.S.; Olsen, D.B.; Stahlut, M.W.; Tomassini,



	Composés	Réplicon EC ₉₀ (μM)	Réplicon CC ₅₀ (μM)
84	2'-O-Me-7-déazaG	> 50	ND
85	3'-déoxyG	> 50	ND
86	2'-O-Me-C	21	> 100
87	3'-déoxyC	25	> 50
88	5'-SATE-2'-O-Me-7-déazaG	> 50	> 100
89	5'-SATE-3'-déoxyG	23	> 50
90	5'-SATE-2'-O-Me-C	3	> 100
91	5'-SATE-3'-déoxyC	1.4	> 100

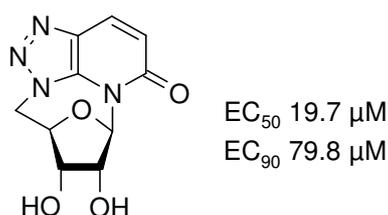
Figure 37 et tableau 10 : Structures et évaluations biologiques d'analogues de nucléosides **84-87** et de leurs dérivés esters 5'-bis(*t*BuSATE)monophosphate **88-91** correspondants sur un système réplicon basé sur des cellules HBI10A.

L'apport du SATE varie suivant la structure nucléosidique considérée. Dans tous les cas, aucun SATE n'est toxique sur le système réplicon, et les dérivés de type 5'-bis-SATE (*t*BuSATE ou *S*-pivaloyl-2-thioéthyle) esters sont au moins aussi actifs que les dérivés 5'OH. Le SATE joue donc parfaitement son rôle de prodrogue. En particulier, il assure une meilleure pénétration cellulaire et une délivrance du monophosphate au sein de la cellule, qui permet d'accéder aux dérivés triphosphates qui ciblent la NS5B (IC₅₀ de ces composés testés directement sur la polymérase virale du VHC comprises entre 0,08 et 3,8 μM). L'apport du SATE est particulièrement visible pour la 2'-O-Me-C et la 3'-déoxy-C dans le système réplicon des cellules HBI10A.

III.4.3.4. Nouvelles structures émergentes

Les anhydro-nucléosides, dont la base nucléique est liée au sucre par un pont anhydro, ont attiré l'attention en tant qu'intermédiaires de synthèse pour l'obtention de nouvelles structures originales.¹⁴⁷

Fin 2004, Wang *et coll.* ont décrit un nouveau composé de cette famille (**92**) ayant une activité antivirale intéressante (EC_{50} de 19,7 μ M sur un système de réplique du VHC et aucune toxicité sur les cellules PBM et VERO). Cette molécule (Figure 38) n'est pas substrat de l'ARN polymérase (à cause de l'absence d'hydroxyle libre en 5'), mais agirait plutôt sur des enzymes virales.¹⁴⁸



92

Figure 38 : structure d'un dérivé nucléosidique anhydro ciblant des enzymes.

Cette observation fait de ce nouveau composé original un modèle intéressant pour élaborer de nouvelles molécules visant le VHC. En effet, dès début 2005, la même équipe (Chun *et coll.*¹⁴⁹) publie la synthèse de nouveaux dérivés anhydro apparentés à **92**, dont les dérivés **93** et **95** qui possèdent une meilleure activité que **92** (Figure 39).

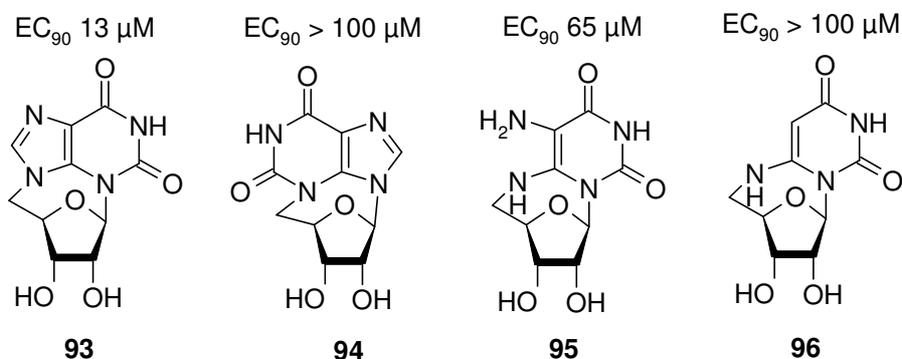


Figure 39 : structures de molécules ciblant des enzymes.

III.5. Conclusion

Nous venons de voir à travers ce chapitre que les analogues de nucléosides ont joué un rôle important en chimiothérapie antivirale, en ciblant notamment des ADN polymérases de

¹⁴⁷ Sako, M.; Saito, T.; Kameyama, K.; Hirota, K.; Maki, Y. A facile synthesis of 5'-O,6-Cyclo-5,5-dihalogeno-5,6-dihydropyrimidine nucleoside. *Synthesis* **1987**, 829-831.

¹⁴⁸ Wang, P.; Hollecker, L.; Pankiewicz, K.W.; Patterson, S.E.; Whitaker, T.; McBrayer, T.R.; Tharnish, P.M.; Sidwell, R.W.; Stuyver, L.J.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A. Synthesis of N3,5'-Cyclo-4-(β -D-ribofuranosyl)-vic-triazolo[4,5-b]pyridin-5-one, a Novel Compound with Anti-Hepatitis C Virus Activity. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6100-6103.

¹⁴⁹ Chung, B.-K.; Wang, P.; Hassan, A.; Du, J.; Tharnish, P.M.; Stuyver, L.J.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A. Synthesis of 5',9-anhydro-3-(β -D-ribofuranosyl)xanthine, and 3,5'-anhydro-xanthosine as potential anti-hepatitis C virus agents. *Tet. Lett.* **2005**, *46*, 2825-2827.

virus. Mais curieusement, jusqu'en 2001, ces composés n'ont pas été conçus et synthétisés dans le but de viser sélectivement des ARN polymérases de virus, comme celle de l'hépatite C par exemple.

Ce n'est qu'à partir de cette date que des recherches portant sur la conception, la synthèse et l'évaluation biologique d'analogues de nucléosides pouvant viser sélectivement des ARN polymérases ont vu le jour, permettant ainsi la naissance d'études structure-activités jamais élaborées dans ce domaine de recherche auparavant.

Cette stratégie est celle qui a été choisie au sein de notre laboratoire dans le cadre des travaux de cette thèse portant sur la conception et la synthèse de nouveaux nucléosides ciblant la réplication de l'hépatite C dans un système réplicon.

Chapitre II

Synthèse et évaluation biologique de dérivés nucléosidiques 5-haloéthynyl- et 5-(1,2-dihalo)vinyluracile

I. Introduction

L'importance pharmaceutique des analogues de nucléoside visant des enzymes virales (figure 40) telles que les polymérase virale d'ADN, a incité certaines équipes à concevoir et synthétiser des analogues de nucléosides visant une polymérase virale d'ARN.

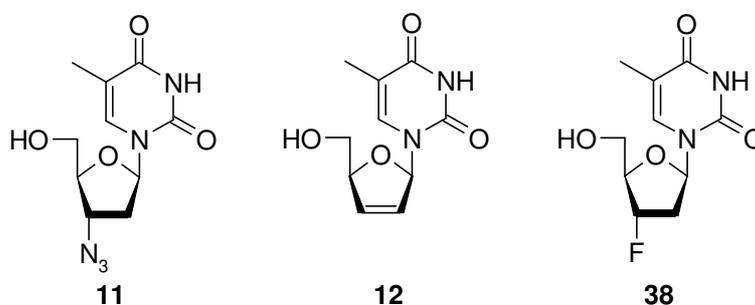


Figure 40 : Analogues de nucléosides, visant des enzymes virales, utilisés dans le traitement du SIDA

Comme nous avons pu le voir au cours du chapitre I, alors que nombreux inhibiteurs de type non-nucléoside (NNI) agissant sur la réplication du VHC et visant la protéine NS5B RdRp ont été décrits,¹⁵⁰ seuls quelques inhibiteurs de type nucléoside (NI) ont été identifiés avant 2002.¹⁵¹ Comme ce fut le cas pour le virus du VIH et du VHB, certains de ces composés induisent des mutations à l'intérieur des gènes des polymérase. Ces mutants sont résistants aux médicaments usuels dans le système réplique.^{46,152} Par conséquent, la découverte de

¹⁵⁰ (a) Dhanak, D.; Duffy, K.J.; Johnston, V.K.; Lin-Goerke, J.; Darcy, M.; Shaw, A.N.; Gu, B.; Silverman, C.; Gates, A.T.; Nonnemacher, M.R.; Earnshaw, D.L.; Casper, D.J.; Kaura, A.; Baker, A.; Greenwood, C.; Gutshall, L.L.; Maley, D.; DelVecchio, A.; Macarron, R.; Hofmann, G.A.; Alnoah, Z.; Cheng, H.-Y.; Chan, G.; Khandekar, S.; Keenan, R.M.; Sarisky, R.T. Identification and biological characterization of heterocyclic inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 38322-38327. (b) Chan, L.; Reddy, T. J.; Proulx, M.; Das, S. K.; Pereira, O.Z.; Wang, W.; Siddiqui, A.; Turcotte, N.; Drouin, A.; Yannopoulos, C.; Poisson, C.; Alaoui, H.M.A.; Bethell, R.; Hamel, M.; Bilimoria, D.; Nguyen-Ba, N.P.; L'Heureux, L. Identification of *N,N*-disubstituted phenylalanines as a novel class of inhibitors of hepatitis C NS5B polymerase. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1283-1285. (c) Wang, M.; Ng, K. K.; Cherney, M. M.; Chan, L.; Yannopoulos, C. G.; Bedard, J.; Morin, N.; Nguyen-Ba, N.; Alaoui-Ismaili, M.H.; Berhell, R.C.; James, M.N. Non-nucleoside analogue inhibitors bind to an allosteric site on HCV NS5B polymerase. Crystal structures and mechanism of inhibition. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9489-9495.

¹⁵¹ (a) Carroll, S. S.; Tomassini, J. E.; Bosserman, M.; Getty, K.; Stahlhut, M. W.; Eldrup, A.B.; Bhat, B.; Hall, D.; Simcoe, A.L.; LaFemina, R.; Rutkowski, C.A.; Wolanski, B.; Yang, Z.; Migliaccio, G.; De Francesco, R.; Kuo, L.C.; MacCoss, M.; Olsen, D.B. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by 2'-modified nucleoside analogs. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11979-11984. (b) Stuyver, L. J.; Whitaker, T.; McBrayer, T. R.; Hernandez-Santiago, B. I.; Lostia, S.; Tharnish, P.M.; Ramesh, M.; Chu, C.K.; Jordan, R.; Shi, J.; Rachakonda, S.; Watanabe, K.A.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F. Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 244-254. (c) Eldrup, A. B.; Allerson, C. R.; Bennett, C. F.; Bera, S.; Bhat, B.; Bhat, N.; Bosserman, M.R.; Brooks, J.; Burlein, C.; Carroll, S.S.; Cook, P.D.; Getty, K.L.; MacCoss, M.; McMasters, D.R.; Olsen, D.B.; Prakash, T.P.; Prhavc, M.; Song, Q.; Tomassini, J.E.; Xia, J. Structure-activity relationship of purine ribonucleosides for inhibition of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2283-2295.

¹⁵² (a) Nguyen, T. T.; Gates, A. T.; Gutshall, L. L.; Johnston, V. K.; Gu, B.; Duffy, K.J.; Sarisky, R.T. Resistance profile of a hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase benzothiadiazine inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3525-3530. (b) Migliaccio, G.; Tomassini, J. E.; Carroll, S. S.; Tomei, L.; Altamura, S.; Bhat, B.; Bartholomew, L.; Bosserman, M.R.; Ceccacci, A.; Colwell, L.F.; Cortese, R.; De Francesco, R.; Eldrup, A.B.; Getty, K.L.; Hou, X.S.; LaFemina, R.L.; Ludmerer, S.W.; MacCoss, M.; McMasters, D.R.; Stahlhut, M.W.; Olsen, D.B.; Hazuda, D.J.; Flores, O.A. Characterization of resistance to non-obligate chain-terminating ribonucleoside analogs that inhibit hepatitis C virus replication in vitro. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*,

nouveaux inhibiteurs du VHC est une étape obligatoire à franchir dans la perspective du développement d'une nouvelle thérapie combinée.¹⁵³

De nombreux analogues de nucléosides substitués en position C-5 de l'uracile sont connus pour avoir des propriétés biologiques intéressantes (Figure 41 : anticancéreux (**97**) et antiviraux (**7** et **98-103**)).

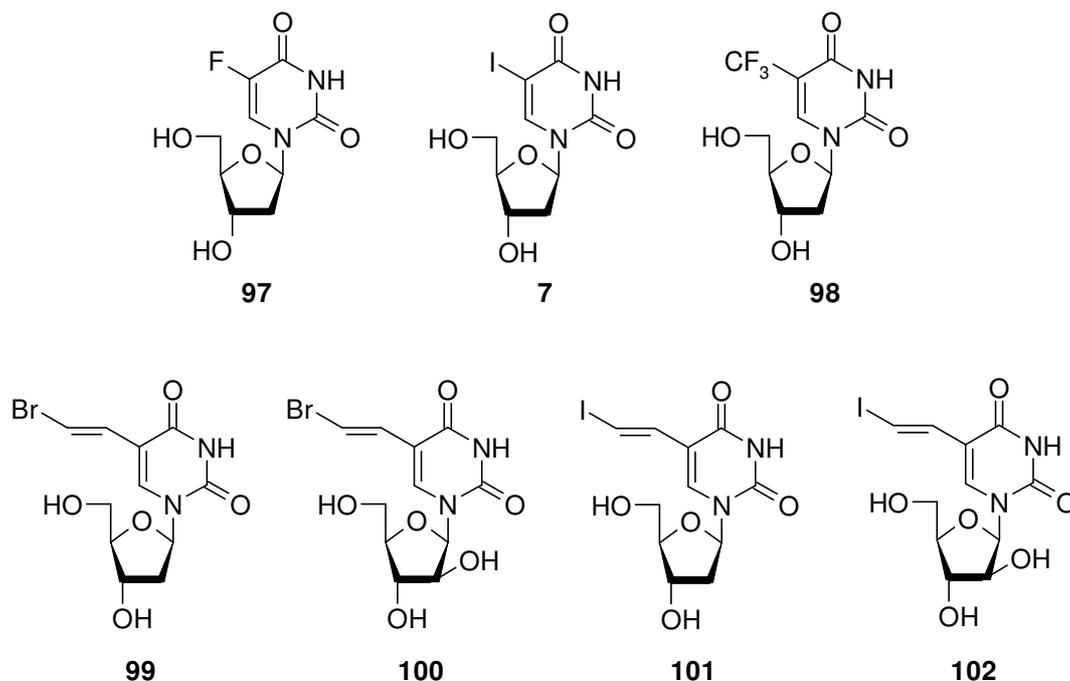


Figure 41 : Analogues de nucléosides comme agents anticancéreux (**97**) ou antiviraux : anti-*HSV1*, *HSV2* et *VZV* (**7-98**), anti-*HSV1* et *HSV2* (**99-102**).

Parmi eux, les 2'-déoxyuridines possédant un groupement vinyle mono-substitué **99-102** en position 5 de l'uracile se sont avérés être des inhibiteurs efficaces et sélectifs des *herpesviruses* (*HSV-1* et *HSV-2*).^{154,155} Une étude des relations structure-activité a montré que des substituants électroattracteurs en position 5 de l'hétérocycle seraient directement liés à l'activité antivirale.¹⁵⁶

Ces molécules **99-102** possèdent toutes un seul halogène sur un groupement vinyle greffé en position 5 de l'uracile. Considérant les propriétés biologiques de ces molécules,

49164-49170. (c) Young, K. C.; Lindsay, K. L.; Lee, K. J.; Liu, W. C.; He, J. W.; Milstein, S.L.; Lai, M.M.C. Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology* **2003**, *38*, 869-878. (d) Sommadossi, J.-P.; La Colla, P. Methods and compositions for treating flaviviruses and pestiviruses. Int. Pat. Appl. WO 200192282, 2001.

¹⁵³ Agrofoglio, L. A.; Joubert, N.; Escuret V.; Durantel, D.; Zoulim F. The use of hcv replicon system for evaluation of new nucleoside analogs. In "Framing the Knowledge of Viral Hepatitis", RF Schinazi Ed. **2005** sous presse.

¹⁵⁴ De Clercq, E.; Descamps, J.; Verhelst, G.; Walker, R. T.; Jones, A. S.; Torrence, F.; Shugar, D. Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus. *J. Infect. Dis.* **1980**, *141*, 563-574.

¹⁵⁵ De Clercq, E. Biochemical aspects of the selective antiherpes activity of nucleoside analogues. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 2159-2169.

¹⁵⁶ Goodchild, J.; Porter, R. A.; Raper, R. H; Sim, I. S.; Upton, R. M.; Viney, J.; Wadsworth, H. J. Structural requirements of olefinic 5-substituted deoxyuridines for antiherpes activity. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1252-1257.

nous nous sommes alors intéressés à la synthèse de molécules portant non pas un, mais deux halogènes sur un groupement vinyle, ou un halogène sur un groupement éthyne, en position 5 de l'uracile. La synthèse de tous ces composés serait appliquée en série ribo-, 2'-déoxyribo- ou 3'-déoxyribose.

Ces composés possèderaient un substituant insaturé en position C-5 conjugué avec l'uracile. Pour les molécules dihalogénés, le substituant vinyle présenterait une seule stéréochimie et deux éléments électronégatifs.¹⁵⁶

L'activité anti-VHC et la toxicité cellulaire de ces nouveaux dérivés de l'uridine 5-halosubstitués seront évaluées en utilisant une lignée cellulaire hébergeant un réplicon subgénomique du VHC de génotype-1b.¹⁵⁷ Pour quelques composés, l'activité anti-BVDV sera évaluée sur un brin d'ARN NADL. Les molécules feront également l'objet de tests d'activité anti-VIH-1 en utilisant différentes lignées cellulaires et leur cytotoxicité sera évaluée sur les lignées cellulaires suivantes : CEM (cellules type lymphocytes), VERO (cellule du callitriche africain) et PBM (cellules mononucléaires du sang périphérique humain).

En série ribo-, 2'-déoxyribo- ou 3'-déoxyribose, la rétrosynthèse (Schéma 12) pour l'obtention de tels composés peut être envisagée comme suit :

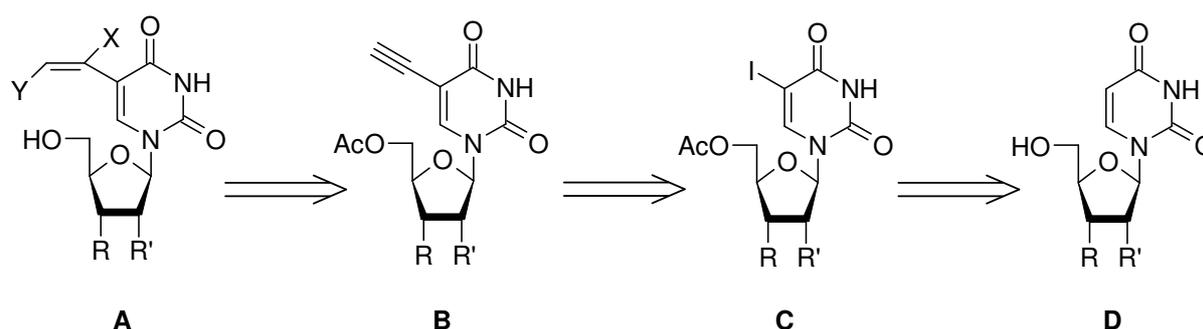


Schéma 12 : Schéma de rétrosynthèse.

Le composé **A** est obtenu *via* une réaction de di-halogénéation (resp. mono-halogénéation) de **B** (suivie d'une déprotection), lui même obtenu à partir **C** *via* l'étape de couplage de Sonogashira, effectuée à partir du dérivé 5-iodouracile protégé, facilement accessible à partir de **D** (l'uridine, la 2'-déoxyuridine, ou la 3'-déoxyuridine selon la série considérée).

Cette synthèse passe par deux étapes clefs: le couplage de Sonogashira et l'halogénéation d'un alcyne. Nous allons effectuer brièvement quelques rappels bibliographiques, sur la réaction de couplage de Sonogashira et sur la di-halogénéation d'un alcyne, avant de passer à la synthèse chimique proprement dite des composés désirés.

¹⁵⁷ Guo, J. T.; Bichko, V. V.; Seeger, C. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J. Virol.* **2001**, *75*, 8516-8523.

II. Rappels bibliographiques

II.1. La réaction de couplage de Sonogashira

II.1.1 Notions sur la chimie du palladium

Les réactions d'addition ou de substitution catalysées au Pd se sont particulièrement développées depuis de nombreuses années.¹⁵⁸ Ces réactions régio- et stéréospécifiques avec des complexes au Pd permettent de nombreuses modulations et une adaptation à un grand nombre de substrats, ce qui en fait actuellement un outil de choix en chimie organique. Les complexes de palladium sont ainsi utilisés lors de couplages avec différents dérivés organométalliques comme les dérivés de l'étain (réaction de Stille), du magnésium (réaction de Kumada), du silicium (réaction de Hiyama) et du bore (Réaction de Suzuki-Miyaura). On trouve également des couplages avec des alcynes (réaction de Sonogashira) ou des alcènes (réaction de Heck), avec des amines (réaction de Buchwald-Hartwig) et enfin des réactions d'allylations catalysées au Pd(0) (réaction de Tsuji-Trost) (Schéma 13).

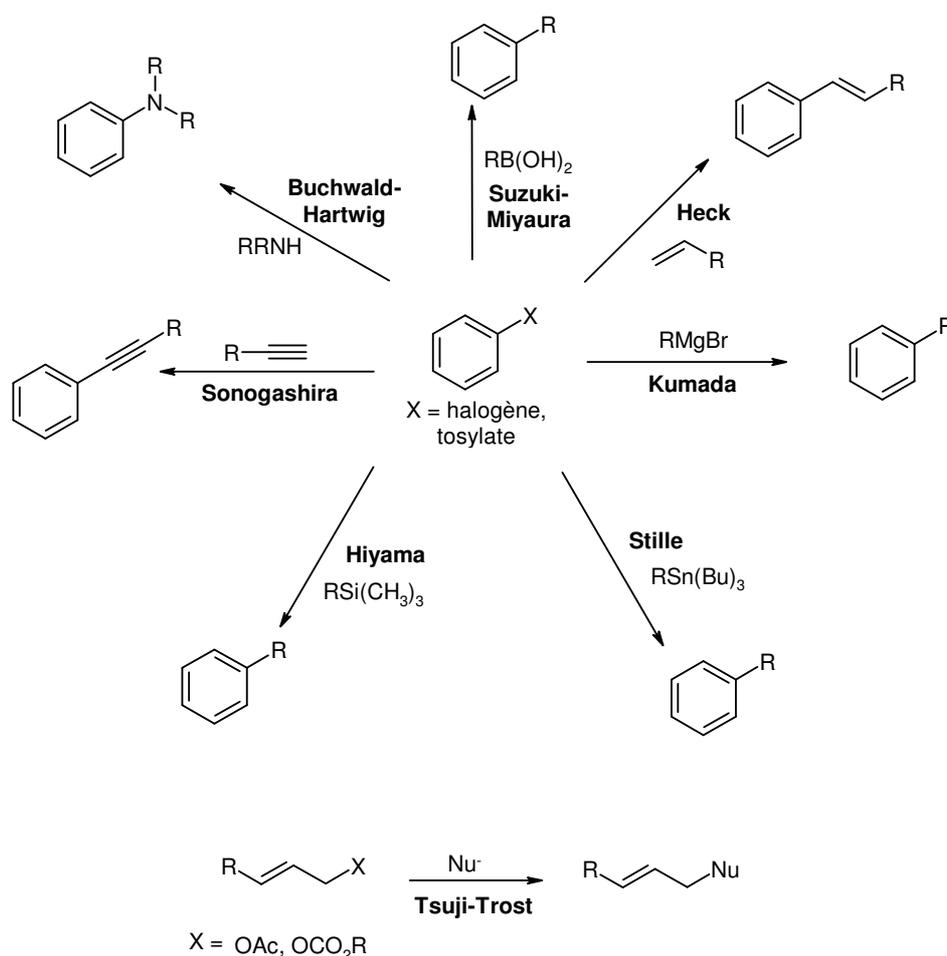


Schéma 13.

¹⁵⁸ Campagne, J.-M.; Prim, D. *Les complexes de palladium en synthèse organique*. Edition CNRS, 2001.

Parmi toutes les possibilités qu'offrent ces réactions catalysées au palladium (Schéma 13), nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la réaction de Sonogashira, comme méthode d'obtention de nouveaux analogues de nucléosides. En effet, cette méthode est la plus appropriée pour coupler un alcyne en position 5 de l'uracile. L'alcyne ainsi greffé pourra subir différentes modifications chimiques pour garantir l'obtention des composés souhaités.

II.1.2. Généralités

La formation de liaison entre un carbone sp^2 et un alcyne vrai peut être réalisée facilement en utilisant le palladium *via* la réaction de Sonogashira.

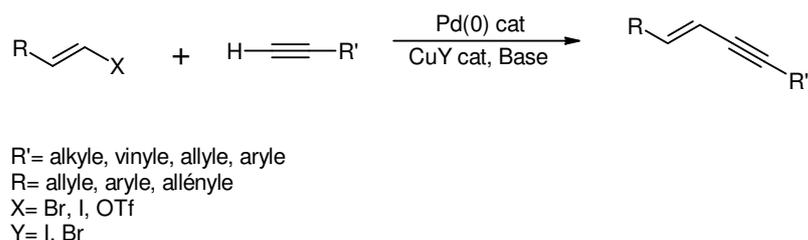


Schéma 14.

Un dérivé aromatique ou vinylique porteur d'un groupement partant de type triflate ou halogène peut réagir avec un alcyne en présence d'un catalyseur au palladium (et d'un co-catalyseur comme l'iodure de cuivre) pour former l'alcyne disubstitué correspondant (Schéma 14).

Historiquement, la réaction de Sonogashira a été inspirée par des travaux¹⁵⁹ portant sur des couplages oxydatifs d'alcynes vrais,¹⁶⁰ puis par Stephens et Castro^{161,162} qui ont décrit la préparation d'alcynes disubstitués à partir d'un iodure aromatique et d'un cuprate d'alcyne en l'absence de toute source de palladium. La version plus moderne de cette réaction, qui permet de travailler en utilisant des conditions opératoires plus douces, est catalysée par le palladium et a été mise au point par Sonogashira. Au cours de l'évolution de la réaction de couplage entre un alcyne vrai et un dérivé halogéné, le cuivre est passé successivement du rang de catalyseur unique à celui de co-catalyseur, pour finalement être aujourd'hui omis dans de nombreuses réactions (Schéma 15).^{163,164}

¹⁵⁹ Chodkiewicz, W.; Cadiot, P. New synthesis of symmetrical and asymmetrical conjugated polyacetylenes. *C.R. Hebd. Seances. Acad. Sci.* **1955**, *241*, 1055-1057.

¹⁶⁰ Siemsen, P.; Livingston, R.C.; Diedrich, F. Acetylenic coupling: a powerful tool in molecular construction. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 2632-2657.

¹⁶¹ Castro, C.E.; Stephens, R.D. Substitutions by ligands of low valent transition metals. A preparation of tolans and heterocyclics from aryl iodides and cuprous acetylides. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2163-2163.

¹⁶² Stephens, R.D.; Castro, C.E. The substitution of aryl iodides with cuprous acetylides. A synthesis of tolans and heterocyclics. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3313-3315.

¹⁶³ Casalnuovo, A.L.; Calabrese, J.C. Palladium-catalyzed alkylations in aqueous media. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4324-4330.

¹⁶⁴ Amatore, C.; Blart, E.; Genêt, J.-P.; Jutand, A.; Lemaire-Audoire, S.; Savignac, M. New synthetic applications of water-soluble acetate Pd/TPPTS catalyst generated in Situ. evidence for a true Pd(0) species intermediate. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6829-6839.

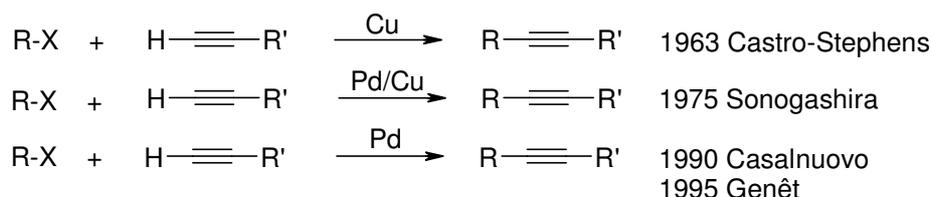


Schéma 15.

II.1.3. Mécanisme général

Comme la plupart des réactions au Pd (à l'exception des réactions de Heck et de Tsuji-Trost), la réaction de Sonogashira passe par un mécanisme à 4 étapes (Schéma 16):

- 1) La génération de l'espèce catalytique active : le palladium de degré d'oxydation (0).
- 2) L'addition oxydante, c'est à dire l'insertion du Pd(0) dans une liaison C-X avec oxydation concomitante du métal (qui passe du Pd(0) au Pd(II)).
- 3) La transmétallation qui correspond à un échange de métal pour conduire à une espèce palladée, toujours de degré d'oxydation (II), comportant les deux fragments carbonés R et R' à coupler.
- 4) L'élimination réductrice qui permet à la fois de libérer le produit de la réaction et de régénérer l'espèce catalytique Pd(0).

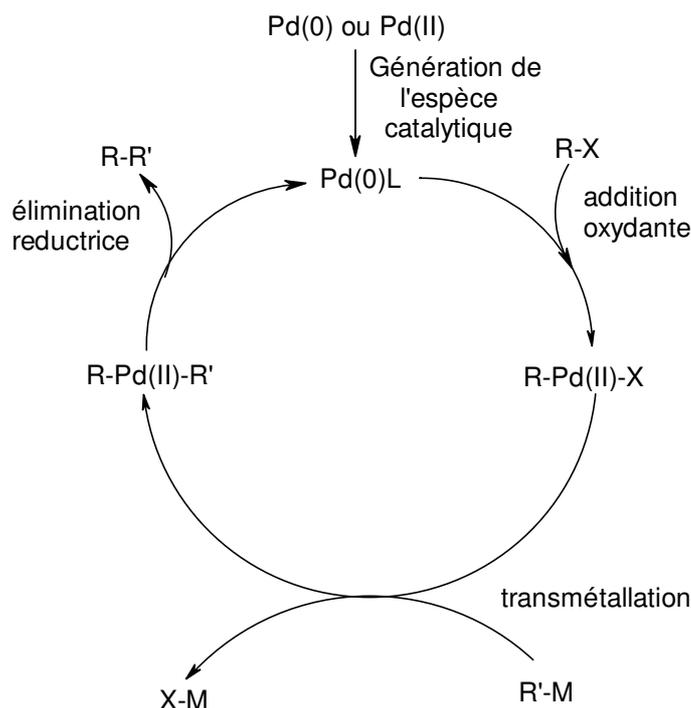


Schéma 16.

II.1.4. Les catalyseurs

Les réactions pallado-catalysées font toutes intervenir du palladium au degré d'oxydation (0). Ce Pd(0) peut soit être apporté directement dans la réaction en utilisant des catalyseurs comme Pd(PPh₃)₄ ou Pd₂dba₃.CHCl₃, soit être formé *in situ* par réduction d'un

catalyseur au Pd(II) type Pd(OAc)₂ ou PdCl₂(PPh₃)₂. Cette réduction est alors réalisée grâce à l'ajout d'un hydrure, d'une phosphine ou bien par une quantité catalytique d'organométallique.

II.1.5. Les ligands

De manière générale, les ligands sont utilisés afin de former des complexes de Pd(0) plus réactifs. Ils peuvent être classés en fonction de leurs effets stériques (angle de Tolman) et électronique (pK_a). Il faut toutefois noter que ces notions restent théoriques et que, pour une réaction donnée, il est extrêmement difficile de rationaliser ces différents effets. Il est donc recommandé, pour mettre au point toute réaction catalysée au Pd, de « tester » différents ligands avec des propriétés électroniques et stériques variées.

Parmi les différents types de ligands existants, la triphénylphosphine (PPh₃) ou la triphénylarsine (AsPh₃) restent les plus utilisées. Les phosphines bidentées comme dppe, dppp, dppb peuvent également être utilisées lors de certains couplages. D'autres ligands donnent d'excellents résultats lors de certaines réactions, comme le dppf. (Figure 42).

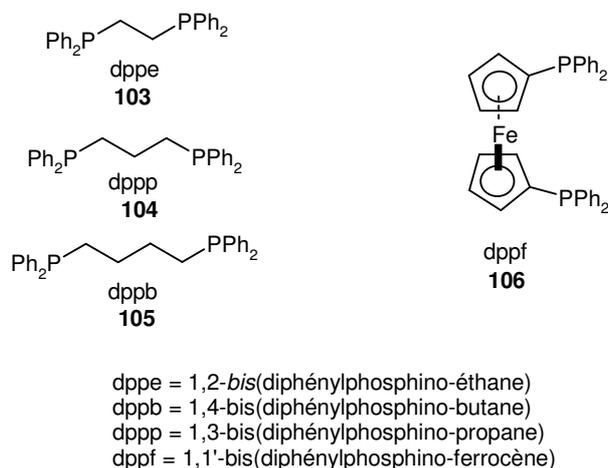


Figure 42.

II.1.6. La réaction de Sonogashira en chimie des nucléosides¹⁶⁵

Cette réaction catalysée au Pd(0) peut être utilisée pour la modification d'une structure de type nucléosidique. La modification de l'hétérocycle sur un nucléoside, *via* une réaction de couplage de Sonogashira, permet une fonctionnalisation en position C-5 de pyrimidines ou sur les positions C-2, C-6 ou C-8 de purines, et a été largement utilisée par le passé pour l'accès à de nouvelles structures aux propriétés variées (Schéma 17).

¹⁶⁵ Revue: Agrofoglio, L. A.; Gillaizeau, I.; Saito, Y. Palladium-Assisted Routes to Nucleosides. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1875-1916.

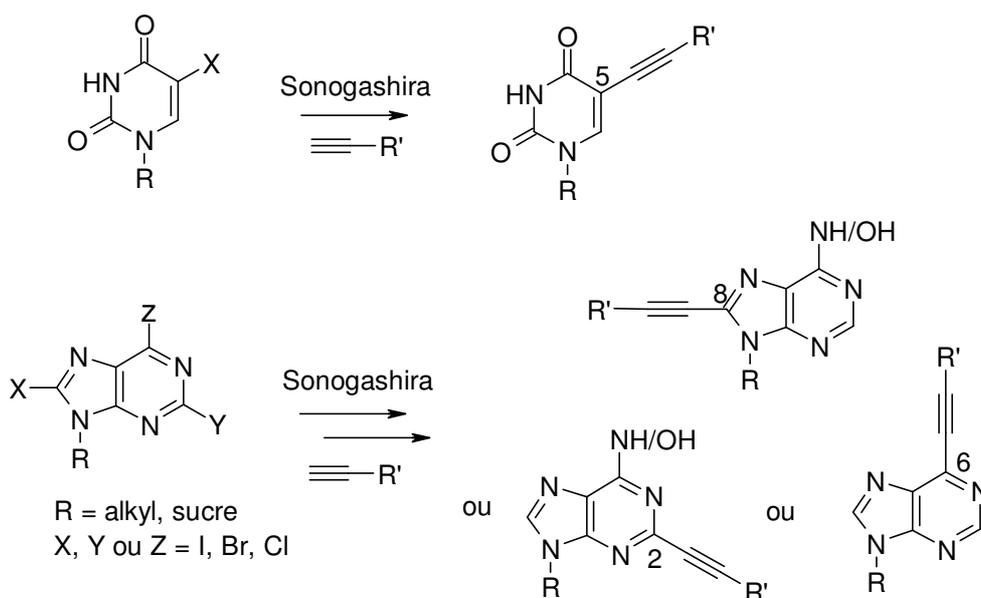


Schéma 17.

Par exemple, cette réaction de Sonogashira a été appliquée à la synthèse d'analogues d'un agent anti-VIH : le HEPT.¹⁶⁶ Le composé iodé **107** a été engagé dans des réactions de type Sonogashira avec différents alcynes dans un mélange MeCN/Et₃N et en présence de CuI et de palladium pour donner les dérivés **108a-c** avec des rendements modérés à bons (Schéma 18).

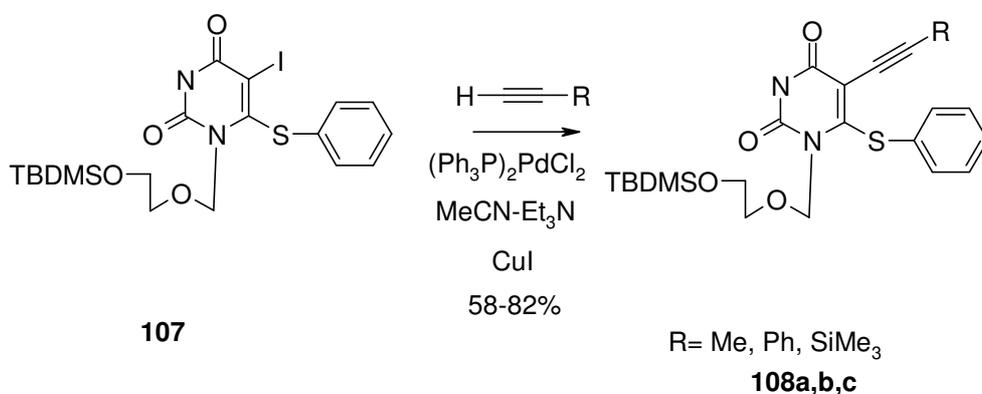
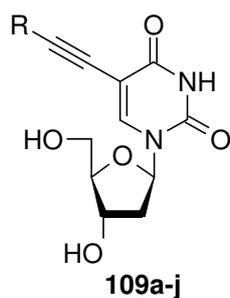


Schéma 18.

Cette réaction a aussi été utilisée pour l'obtention de nouveaux nucléosides **109a-j** aux propriétés anti-herpétiques. Les 5-alkynyl-2'-déoxyuridines **109a-j** ont également été évaluées en tant qu'agent antiviraux (Figure 43).¹⁶⁷

¹⁶⁶ Tanaka, H.; Baba, M.; Hayakawa, H.; Sakamaki, T.; Miyasaka, T.; Ubasawa, M.; Takashima, H.; Sekiya, K.; Nitta, I.; Shigeta, S.; Walker, R. T.; Balzarini, J.; De Clercq, E. A new class of VIH-1 specific 6-substituted acyclouridine derivatives: synthesis and anti-VIH-1 activity of 5- or 6-substituted analogs of 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT). *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 349-357.

¹⁶⁷ De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P.; Barr, P. J.; Jones, A. S.; Walker, R. T. (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, *76*, 2947-2951.



R=Bu, Ph, Cl(CH₂)₃, NC(CH₂)₃, etc

Figure 43.

Lors des réactions de Sonogashira sur la 5-iodo-2'-déoxyuridine **7**,¹⁶⁸ la formation minoritaire de composés de type furanopyrimidine **111** peut parfois être observée, issus de la cyclisation de l'alkyne **110** (Schéma 19). L'équipe de McGuigan¹⁶⁹ a récemment montré que ces dérivés bicycliques de type **111** possèdent une activité et une sélectivité remarquable vis-à-vis du VZV (Varicella Zoster Virus). La cyclisation du composé **110** pour donner **111** a été décrite par Robins¹⁷⁰ avec des rendements relativement faibles (< 20%), et a été optimisée au sein de notre laboratoire (rendement quantitatif).¹⁷¹

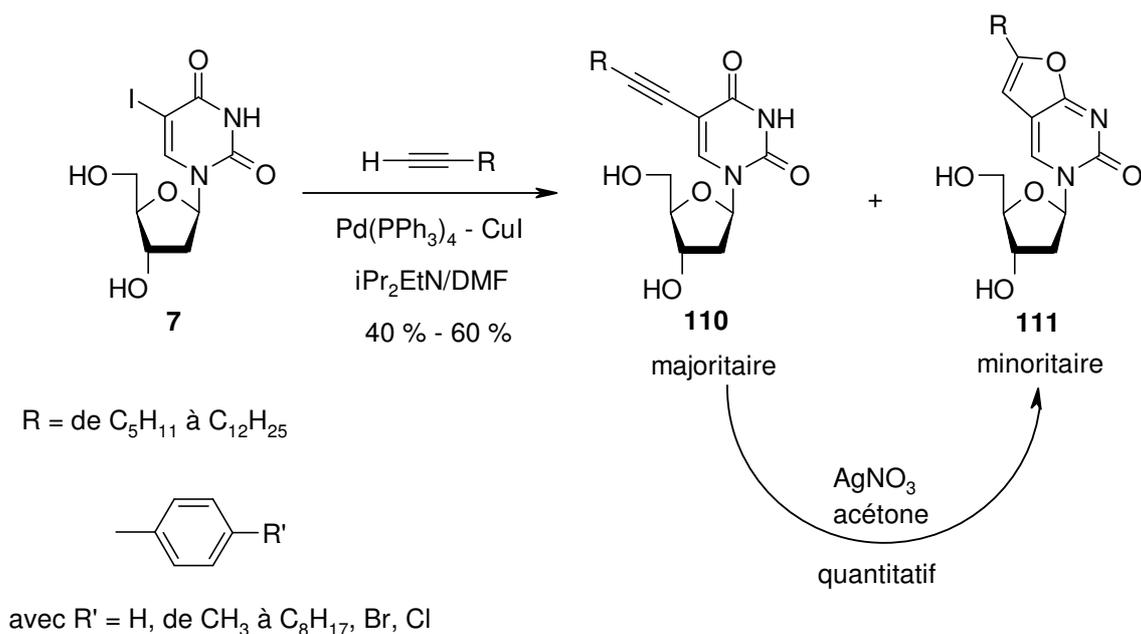


Schéma 19.

¹⁶⁸ Crisp, G.; Flynn, B. L. Palladium-catalyzed coupling of terminal alkynes with 5-(trifluoromethane sulfonyloxy)pyrimidine nucleosides *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6614-6619.

¹⁶⁹ McGuigan, C.; Yarnold, C. J.; Jones, G.; Velasquez, S.; Barucki, H.; Brancale, A.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E. Potent and selective inhibition of varicella-zoster virus (VZV) by nucleoside analogues with an unusual bicyclic base. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4479-4484.

¹⁷⁰ Robins, M. J.; Barr, P. J. Nucleic acid related compounds. Efficient conversion of 5-iodo to 5-alkynyl and derived 5-substituted uracil bases and nucleoside. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1854-1862.

¹⁷¹ Aucagne, V.; Amblard, F.; Agrofoglio, L.A. Highly Efficient AgNO₃-Catalyzed Preparation of Substituted Furanopyrimidine Nucleosides. *Synlett* **2004**, 2406-2408.

Le couplage de Sonogashira a aussi été réalisé sur diverses positions d'une base purique. Par exemple, un couplage de Sonogashira en position 6 suivi d'un couplage catalysé au cuivre donne l'accès à des paires de bases covalentes **112-113** (Figure 44), qui peuvent s'intercaler dans l'ADN, inhibant ainsi sa synthèse *de novo* et la division cellulaire.¹⁷² Tandis qu'un couplage en position 2 permet d'obtenir des agonistes des récepteurs d'adénosines **114** (Figure 44).¹⁷³

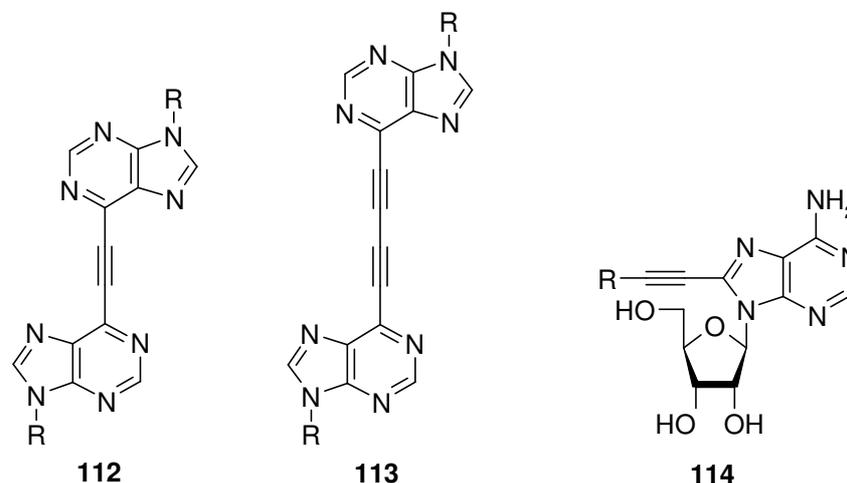


Figure 44 : Formule chimique d'intercalant de l'ADN (**112-113**) et de la 2-éthynyl-adénosine(**114**), agoniste des récepteurs d'adénosines

II.1.7. Conclusion

La réaction de couplage de Sonogashira catalysées au Pd (0) reste aujourd'hui encore très utilisée en chimie des nucléosides pour accéder à des analogues originaux de structures variées, en créant des liaisons Csp₂-Csp₁ difficilement accessibles en utilisant d'autres approches. Cette réaction représente donc un outil de choix pour accéder à de nouvelles structures de type nucléosidique possédant un groupement éthynyle en position C-5 de l'uracile, et constitue l'une des étapes clef pour la synthèse des composés halogénés désirés. Les structures ainsi obtenues pourront subir une réaction d'addition sur l'alcyne pour aboutir aux composés que nous désirons.

II.2. La réaction d'addition d'un dihalogène sur un alcyne

II.2.1. Généralités sur l'addition d'un électrophile sur un alcyne

L'addition d'un électrophile sur une triple liaison conduit à la formation d'une nouvelle liaison σ et d'un cation vinylique (Schéma 20).

¹⁷² Hocek, M.; Votruba, I. Covalent analogues of DNA base-pairs and triplets. Part 2: Synthesis and cytostatic activity of Bis(purin-6-yl)acetylenes, -diacetylenes and related compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1055-1058.

¹⁷³ Revue: Muller, C.E. Adenosine receptor ligands-recent developments part I. Agonists. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1269-1288.

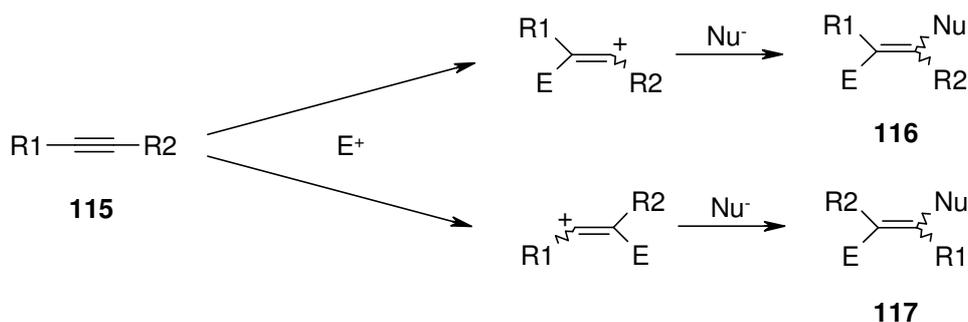


Schéma 20.

L'attaque d'un nucléophile peut alors avoir lieu sur l'un des deux atomes de carbone de l'alcyne pour donner, en théorie, deux produits (Schéma 20). En pratique, cependant, un seul produit est observé de manière prédominante au détriment de l'autre. Les ratios des deux produits peuvent être expliqués de manière rationnelle en considérant la stabilité des carbocations intermédiaires formés. Dans la plupart des cas, R1 et R2 possèdent une capacité de stabilisation de l'espèce carbocation formée suffisamment différente pour qu'un seul produit soit observé.

Pour des alcynes terminaux, par exemple, c'est l'atome de carbone interne qui porte la charge positive.¹⁷⁴ Lorsque R est un groupement électrodonneur (R = Ph par exemple), il stabilise le cation α -phénylvinyle, qui est ainsi formé de manière préférentielle.¹⁷⁵

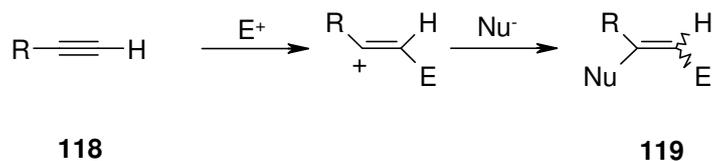


Schéma 21.

II.2.2. Généralités sur l'addition électrophile d'un dihalogène sur une liaison insaturée

En ce qui concerne l'addition d'un dihalogène IX (avec X = Br, Cl) sur une double ou une triple liaison, la forte électrophilie de l'atome d'iode est la force motrice de la réaction.

¹⁷⁴ (a) Jacobs, T.L.; Searles, S. Acetylenic Ethers. IV.¹ Hydration. *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 686-689. (b) Drenth, W.; Hogeveen, H. Mechanism of reactions of unsaturated ethers and thio ethers. I. Acid catalyzed addition of water to acetylenic thio ethers. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1960**, *59*, 1002-1011. (c) Stamhuis, E.J. Drenth, W. Mechanism of reactions of unsaturated ethers and thio-ethers. III. Acid-catalyzed addition of water to ethynyl ethers. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1961**, *66*, 797-809. (d) Hogeveen, H.; Drenth, W. Mechanism of reactions of unsaturated ethers and thioethers. VII. Linear free energy relationships and inverse secondary deuterium isotope effect in the addition of water to 1-alkynyl thioethers. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1963**, *82*, 375-384. (e) Stamhuis, E.J. Drenth, W. Mechanism of reactions of unsaturated ethers and thioethers. IX. Acidcatalyzed alkyl-oxygen fission of alkyl ethynyl ethers. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1963**, *82*, 394-404. (f) Bott, R.W.; Eaborn, C.; Walton, D.R.M. Substituent effects in the acid-catalyzed hydration of phenylacetylenes. *J. Chem. Soc.* **1965**, 384-388. (g) Noyce, D.S.; Schiavelli, M.D. Acid-catalyzed hydration of phenylacetylene. Evidence for the vinyl cation intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1020-1022. (h) Noyce, D.S.; Schiavelli, M.D. Isotope effects in the acid-catalyzed hydration of phenylacetylene. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1023-1026. ¹⁷⁵ Marcuzzi J.; Meloni, G. Electrophilic additions to acetylenes. V. Stereochemistry of the electrophilic addition of alkyl halides and hydrogen halides to phenyl-substituted acetylenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *98*, 3295-3300.

Si l'on considère l'addition d'IBr sur une liaison double,¹⁷⁶ en général, une bonne régiosélectivité et une haute stéréosélectivité sont observées (addition *anti*), et les études mécanistiques montrent le passage *via* un pont iodonium intermédiaire. En ce qui concerne la régiosélectivité de l'addition d'IBr, elle dépend de la structure de l'alcène initial. Ainsi, il peut également être observé un produit résultant d'une addition anti-Markovnikov (Tableau 11).

Alcène	% Markovnikov	% anti-Markovnikov
<i>t</i> -BuCH=CH ₂	0	100
PhCH=CH ₂	100	0

Tableau 11.

Si l'on considère l'addition d'ICl sur une liaison double,¹⁷⁷ la formation du chloriodoalcane vicinal *via* une addition d'ICl sur un alcène a lieu avec une haute stéréospécificité *anti*, impliquant le passage par un pont iodonium lors de la séquence réactionnelle. Les alcènes asymétriques réagissent typiquement selon une addition de type Markovnikov.¹⁷⁸ La régiosélectivité et la stéréosélectivité des additions d'IX sur des alcynes sont très dépendantes de la nature des alcynes de départ.

II.2.3. Etude de la régio- et de la stéréochimie d'une réaction de dihalogénéation sur un alcyne

Cette réaction a justement fait l'objet des travaux de Bellina *et coll.*,¹⁷⁹ qui ont publié récemment une étude approfondie sur la réaction d'alcynes en présence d'ICl. Des études poussées de RMN du ¹³C ont prouvé la stéréochimie des produits issus d'une réaction d'addition d'ICl sur une triple liaison, par comparaison entre les déplacements chimiques du ¹³C calculés à partir de différents paramètres caractéristiques de substituents portés par des dérivés vinyliques,¹⁸⁰ et les déplacements chimiques du ¹³C observés expérimentalement.¹⁸¹ La stabilité relative des différents produits stéréoisomères a également été prise en compte.¹⁸²

Tous les composés d'addition ont montré une stéréochimie unique *trans*,¹⁸³ prouvant ainsi que l'addition d'ICl sur une triple liaison a lieu avec une haute stéréosélectivité.

¹⁷⁶ Schmid, G.H.; Garratt, D.G.; in *The Chemistry of doubly-bonded functional groups*; Patai, S., Ed.; Wiley: New York, 1977; Part 2, pp 799-801.

¹⁷⁷ (a) McClelland, C.W. in *Synthetic reagents*; Pizey, J.S., Ed.; Wiley: New York, 1983; Vol. 5, pp 85-164. (b) Schmid, G.H.; Garratt, D.G.; in *The Chemistry of doubly-bonded functional groups*; Patai, S., Ed.; Wiley: New York, 1977; Part 2, pp 796-799.

¹⁷⁸ Ingold, C.K.; Smith, H.G. Mode of addition to conjugated unsaturated systems. VI. Addition of halogens and hydrogen halides to conjugated unsaturated carboxylic acids and esters. *J. Chem. Soc.* **1931**, 79-86.

¹⁷⁹ Bellina, F.; Colzi, F.; Mannina, L.; Rossi, R.; Viel, S. Reaction of alkynes with iodine monochloride revisited. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 10175-10177.

¹⁸⁰ Stothers, J.B. *Carbon-13 NMR Spectroscopy*; Academic Press: New York, 1972; pp 71 et 184.

¹⁸¹ Uemura, S.; Okasaki, H.; Onoe, A.; Okano, M. Chlorination and chloriodination of acetylenes with copper(II) chloride. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 676-680.

¹⁸² Heasley, V.L.; Buczala, D.M.; Chappell, A.E.; Hill, D.J.; Whisenand, J.M.; Shellhamer, D.F. Addition of Bromine Chloride and Iodine Monochloride to Carbonyl-Conjugated, Acetylenic Ketones: Synthesis and Mechanisms. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2183-2187.

¹⁸³ Pour chaque produit, de nombreuses expériences de RMN ¹H et ¹³C ont été pratiquées, et l'attribution de la stéréochimie unique (*E*) a pu être faite sans équivoque par l'utilisation combinée de plusieurs expériences de RMN à deux dimensions, incluant ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C COSY, et ¹H-¹³C HMBC (corrélation hétéronucléaire à longue distance).

La régiosélectivité de la réaction a été établie en prenant en compte les différents effets des atomes d'iode et de chlore sur le déplacement chimique de l'atome de carbone qui les porte. En effet, un atome de chlore induit une diminution du champ de résonance de l'atome de carbone à cause de sa haute électronégativité, tandis qu'un atome d'iode conduit à une augmentation du champ de résonance de l'atome de carbone à cause du « big atome effect » (« l'effet gros atome »).¹⁸⁴

Ainsi, de cette étude découle que la régio- et la stéréochimie de la réaction d'addition d'ICl sur un alcyne peuvent être rationalisées comme suit: la réaction d'addition électrophile fait intervenir une attaque *anti* d'un ion chlorure sur un pont iodonium (Schéma 22) conduisant à un seul produit de configuration (*E*).

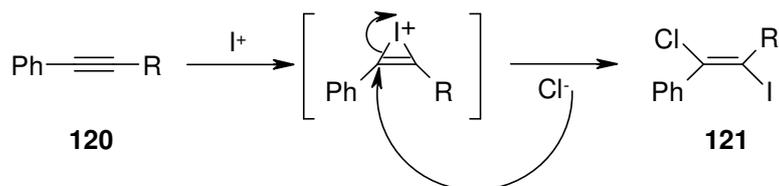


Schéma 22.

On peut légitimement penser qu'il en va de même pour IBr. La stéréochimie *trans* est d'autant plus favorisée que le brome est plus volumineux que le chlore.

Les mêmes remarques s'appliquent également à I₂ pour les mêmes raisons.

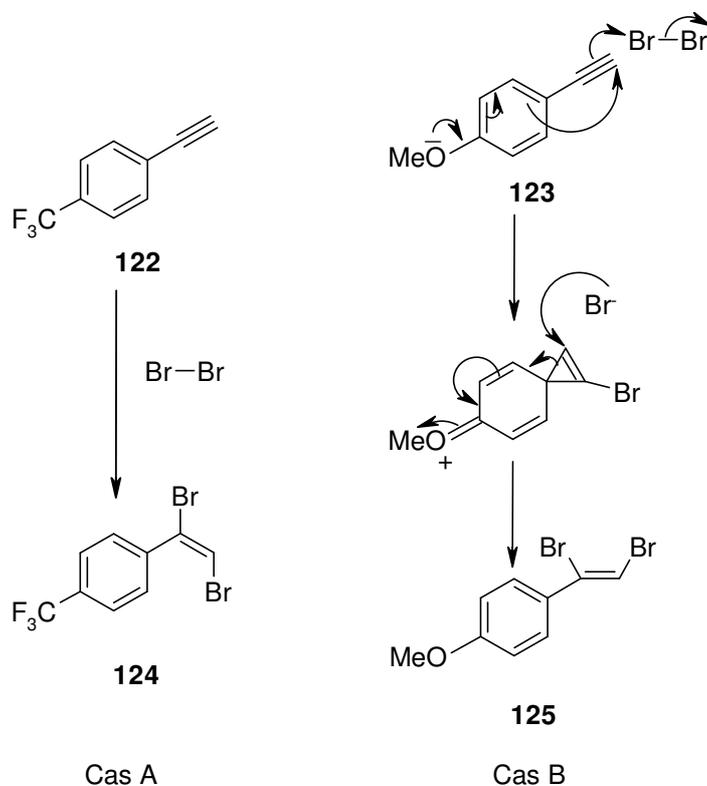


Schéma 23.

¹⁸⁴ Friebolin, H. *Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy*; VHC Publisher: New York, 1991; p 56.

Quant à l'addition de Br₂ sur un alcyne, elle conduit à un seul isomère. En l'absence de groupement participant au sein de la molécule, la dibromation s'effectue également *via* un pont bromonium qui subit une attaque en *anti* d'un ion bromure (Schéma 23 cas A). Mais s'il existe un groupement participant dans la molécule, il est alors possible d'obtenir une stéréochimie *cis* (Schéma 23 cas B).

Cette réaction confirme que la nature de l'alcyne de départ influe sur la structure de l'alcène d'arrivée.

II.2.4. Conclusion

Dans la majorité des cas de di-halogenation d'une triple liaison, les données de la littérature ont montré que la réaction s'effectue avec une régiosélectivité unique, et que la stéréosélectivité conduit à un produit majoritaire voire unique de stéréochimie *anti*.

C'est la raison qui nous a poussé à appliquer ces réactions de di-halogenation au cours de ce travail sur des substrats nucléosidiques de type 5-éthynyluracile. La synthèse chimique des composés ainsi obtenus est détaillée ci-après.

III. Nouveaux dérivés en série ribo, 2'-déoxy- et 3'-déoxyribosyle

III.1. Synthèse chimique

III.1.1. Synthèse des intermédiaires clefs *via* une réaction de Sonogashira

Intéressons nous à présent à la synthèse chimique des composés 5-haloéthynyl- et 5-(1,2-dihalo)vinyluracile qui ont été synthétisés au cours de cette thèse, et qui font l'objet de ce chapitre.

Pour procéder à la réaction d'iodation en position C-5 de l'uracile, plusieurs méthodes s'offrent à nous : I₂ en présence de HNO₃ dans le dioxanne,¹⁸⁵ I₂ en présence de HIO₃ dans un mélange {AcOH, CCl₄, H₂O},¹⁸⁶ NIS dans le DCM,¹⁸⁷ ICl (en présence de Et₃N),¹⁸⁸ ou I₂ en présence de CAN dans l'acétonitrile.¹⁸⁹ De toutes ces méthodes, c'est cette dernière que nous

¹⁸⁵ Robins, M.J.; Barr, P.J.; Giziewicz, J. Nucleic acid related compounds. 38. Smooth and high-yield iodination and chlorination at C-5 of uracil bases and p-tolyl-protected nucleosides. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 554-557

¹⁸⁶ Lin, T. S.; Chen, M.S.; McLaren, C.; Gao, Y.S.; Ghazzouli, I.; Prusoff, W.H. Synthesis and antiviral activity of various 3'-azido, 3'-amino, 2',3'-unsaturated, and 2',3'-dideoxy analogs of pyrimidine deoxyribonucleosides against retroviruses. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 440-444.

¹⁸⁷ Beres, J.; Bentrude, W.G.; Kalman, A.; Parkanyi, L.; Balzarini, J.; De Clercq, E. Synthesis, structure, and antitumor and antiviral activities of a series of 5-halouridine cyclic 3',5'-monophosphates. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 488-493.

¹⁸⁸ Classon, B.; Samuelsson, B. Synthesis of 5-iodo-1-(sodium 2-deoxy-β-D-ribofuranosyluronate)uracil and 5-iodo-1-(sodium β-D-ribofuranosyluronate)uracil. *Acta Chemica Scandinavica, Series B: Organic Chemistry and Biochemistry* **1985**, *B39*, 501-504.

¹⁸⁹ (a) Asakura, J.; Robins, M.J. Cerium(IV) catalyzed iodination at C5 of uracil nucleosides. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2855-2858. (b) Asakura, J.-I.; Robins, M. J. Cerium(IV)-mediated halogenation at C-5 of uracil derivatives. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4928-4933.

avons finalement retenu. En effet, ce protocole d'halogénéation au nitrate d'ammonium et de cérium $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ présente plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes d'halogénéation, à savoir des conditions réactionnelles plus douces et des temps de réaction plus courts. De plus, les rendements sont parfaitement reproductibles avec cette méthode, ce qui n'est pas toujours le cas avec les autres conditions expérimentales qui ont été testées.

Ainsi, les pyrimidines **127a-c** ont été préparées par réaction directe avec des halogènes, d'après le protocole expérimental décrit par Asakura et al., *via* une halogénéation promue par le cérium (IV) sur la position C-5 des dérivés de l'uracile. De cette façon, le traitement des nucléosides connus acétylés **126a-c** par l'iode élémentaire et le CAN dans l'acétonitrile à 80°C, a donné les nucléosides 5-iodouraciles protégés correspondants **127a-c** avec d'excellents rendements (Schéma 24).

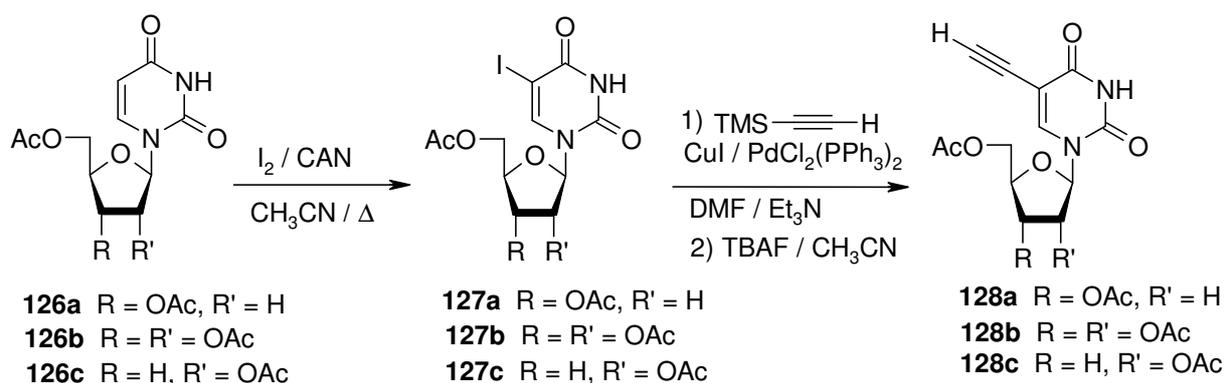


Schéma 24: Synthèse de nucléosides acétylés de type 5-éthynyluracile **128a-c**.

Le mécanisme de la réaction est le suivant (schéma 25) : le CAN est un oxydant qui, en présence d'iode, sert à générer l'espèce I^+ , qui subit une attaque nucléophile de l'uracile pour générer le dérivé 5-iodouracile.

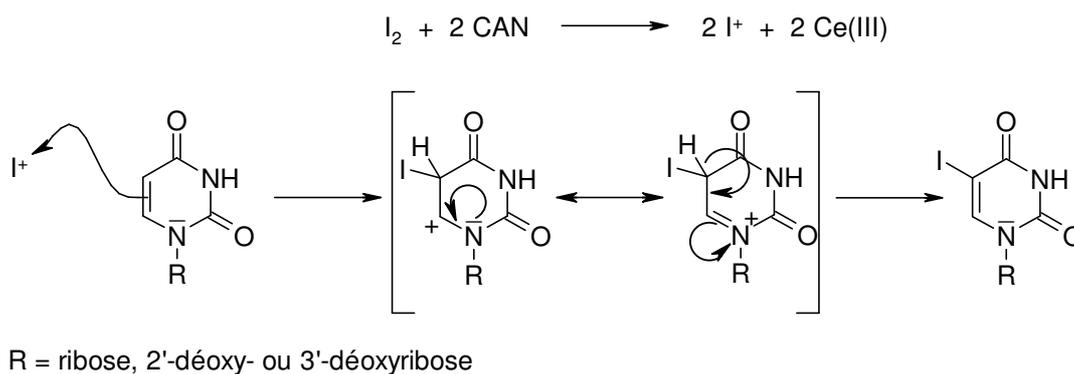


Schéma 25.

L'introduction d'une triple liaison (groupement éthynyle) en position C-5 de l'uracile a été effectuée par une réaction catalysée au Pd(0), en utilisant les conditions de Sonogashira.¹⁹⁰

¹⁹⁰ (a) Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. Convenient synthesis of acetylenes. Catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromo alkenes, iodo arenes, and bromopyridines. *Tetrahedron Lett* **1975**, *16*, 4467-4470. (b) Sonogashira, K. *Comprehensive Organic Synthesis*; Pergamon Press: New York, 1991; pp 521. (c)

Ainsi, la réaction des dérivés 5-iodouracile acétylés purs **127a-c** avec le triméthylsilylacétylène en présence de Et₃N (base), de CuI (co-catalyseur) et de PdCl₂(PPh₃)₂ (catalyseur) dans le DMF à température ambiante, suivie du déplacement du groupe triméthylsilyle avec *n*Bu₄NF a permis d'obtenir les nucléosides 5-éthynyluraciles **128a-c** correspondants avec un rendement élevé (80-99%). Dans la plupart des cas, il a été observé qu'une légère augmentation de la température de réaction a mené à un plus grand taux de couplage. Dans tous les cas, un sous-produit a été formé, dérivé de furanopyrimidine,¹⁹¹ et a été soit isolé avec un rendement inférieur à 7 %, soit juste détecté lors du suivi par la chromatographie sur couche mince.

Dès lors, nous disposions des intermédiaires clefs possédant un alcyne vrai sur lesquels nous pouvons procéder à des réactions de mono-halogénéation ou de di-halogénéation.

III.1.2. Etape clef de mono-halogénéation d'une triple liaison

A partir de ces dérivés alcyniques, la synthèse a été poursuivie par une réaction de mono-halogénéation dans le but d'accéder à des dérivés nucléosidiques de type 5-haloéthynyluraciles **137a-c** et **138a-c** (p 92), pour lesquels seul le dérivé 5-bromoéthynyl-2'-déoxyuridine avait déjà été décrit¹⁹² pour posséder une certaine sélectivité (semblable à celle du dérivé E-5-(bromovinyl)-2'-déoxyuridine) contre le virus HSV-1. Néanmoins, ce composé n'avait pas été testé contre le VHC ni le VIH, c'est la raison pour laquelle nous l'avons également synthétisé.

La mono-halogénéation des dérivés d'alcynes **128a-c** a été réalisée en utilisant le perchlorate de di-sym-collidine et d'iodonium (IDCP, pour la réaction de iodation) ou le perchlorate de di-sym-collidine et de bromonium (BrDCP, pour la bromation) dans l'acétonitrile anhydre. Les deux réactifs (Figure 45) sont connus pour agir en tant qu'électrophile très réactif (I⁺ et Br⁺, respectivement).

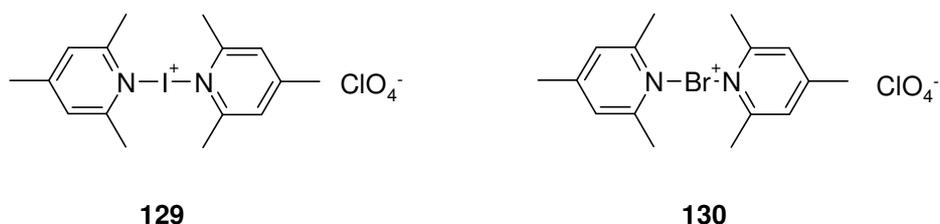


Figure 45 : Formule chimique de l'IDCP **129** et de BrDCP **130**.

Les composés iodés **131a-c** ont été obtenus avec de bons rendements allant de 68% à 93%. En revanche, la bromation a conduit aux dérivés nucléosidiques de type 5-

Ratovelomana, V.; Linstrumelle, G. New synthesis of the sex pheromone of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Synth. Commun.* **1981**, *11*, 917-923. (d) Takahashi, S.; Kuroyama, Y.; Sonogashira, K.; Hagihara, N. A convenient synthesis of ethynylarenes and diethynylarenes. *Synthesis* **1980**, 627-630.

¹⁹¹ Bleackley, R. C.; Jones, A. S.; Walker, R. T. Incorporation of 5-substituted uracil derivatives into nucleic acids - III : Synthesis of 5-substituted uracils derived from 5-acetyluracil. *Tetrahedron* **1976**, *32*, 2795-2797.

¹⁹² Eger, K.; Jalalian, M.; Schmidt, M. Synthesis of a potential antiviral compound: 5-bromoethynyl-2'-deoxyuridine. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *50*, 8371-8380.

bromoéthynyluraciles désirés **132a-c** avec des rendements nettement inférieurs, s'échelonnant entre 21 et 58 % (Schéma 26).

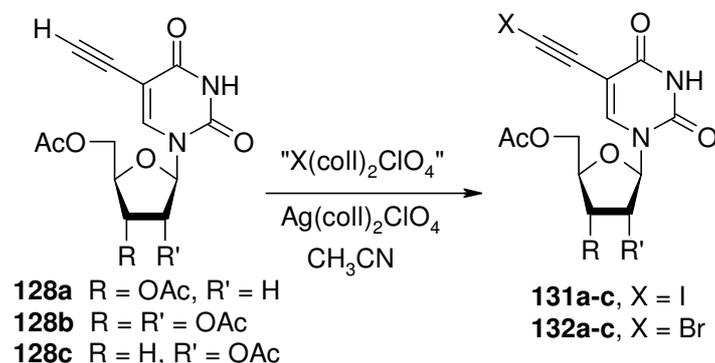


Schéma 26: Réactions de mono-halogenation menant aux nucléosides 5-haloéthynyluracile **131a-c** et **132a-c**.

Le mécanisme de la réaction de mono-iodation est le suivant (schéma 27) : AgDCP permet d'activer la triple liaison, qui attaque l'espèce I^+ (présente sous la forme IDCP) pour générer le dérivé nucléosidique 5-iodoéthynyluracile désiré. La réaction de mono-bromation s'effectue suivant le même mécanisme.

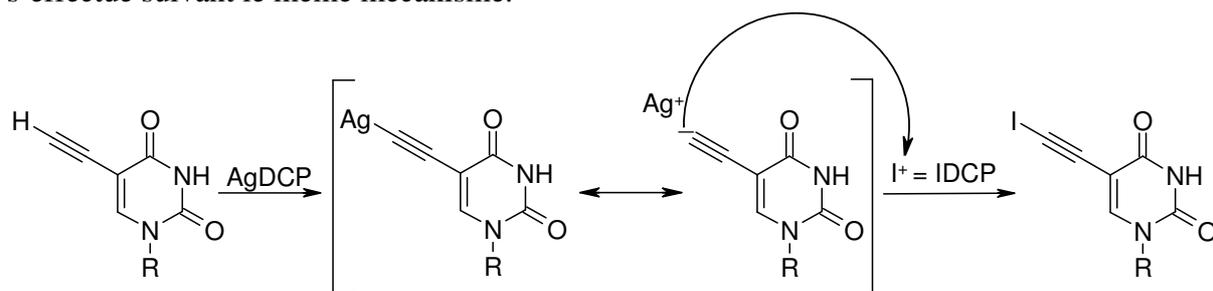


Schéma 27.

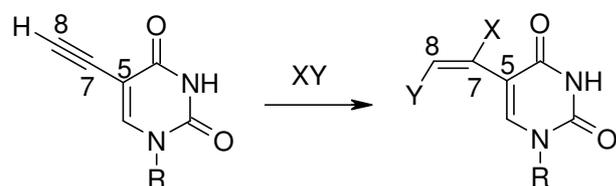
III.1.3. Etape clef de di-halogenation d'une triple liaison

A partir des dérivés alcyamiques précédemment obtenus **128a-c**, une réaction de dihalogénéation a été effectuée pour obtenir des nucléosides dérivés du type 5-(1,2-dihalo)vinyluracile **133a-c** à **136a-c** jusqu'ici inconnus et qui nous paraissent particulièrement intéressants (p 91). Plusieurs réactifs d'halogénéation (c.-à-d. I_2 , IBr, ICl ou Br_2) ont été employés pour obtenir les dérivés nucléosidiques 5-(1,2-dihalo)vinyluracile correspondants.

Dans tous les cas de dihalogénéation, la formation d'un unique di-halo-alcène vicinal (**133a-c** à **136a-c**) a été observée en RMN du ^{13}C ou du 1H (ou lors du suivi de la réaction par ccm), et ce quelles que soient les conditions de dihalogénéation utilisées. La réaction est donc régiosélective et stéréosélective.

Une étude de la RMN du ^{13}C permet de déterminer la position des substituants sur la double liaison. En effet, un atome de chlore, ou de brome dans une moindre mesure, induit un déblindage (c'est-à-dire une diminution du champ de résonance, soit une valeur en ppm plus grande sur le spectre RMN) de l'atome de carbone sur lequel il est directement lié à cause de

sa haute électronégativité, tandis qu'un atome d'iode conduit à une augmentation du champ de résonance de l'atome de carbone à cause du « big atom effect ».¹⁸⁴ Nous allons donc comparer les déplacements chimiques des carbones C-7 et C-8 entre le produit de départ et les produits de chaque réaction de dihalogénéation.



R = ribofuranose

Substrat	Sustituants X-Y	C-7 δ (ppm)	C-8 δ (ppm)
alcyne	aucun	87,5	74,5
alcène	I-I	85,3	87,5
alcène	I-Br	113,8	82,4
alcène	I-Cl	114,2	80,6
alcène	Br-Br	113	109,4

Schéma 28 et tableau 12 : Comparaison des données RMN du ^{13}C , en série ribofuranosyle, entre le produit portant l'alcyne vrai et les produits portant un alcène di-halogénéé.

Pour chaque produit, l'attribution des pics en RMN du ^1H et du ^{13}C a été faite par comparaison avec les données de la littérature, et par l'utilisation combinée de plusieurs expériences de RMN à deux dimensions, incluant les expériences de ^1H - ^1H COSY et de ^1H - ^{13}C COSY.

Dans tous les cas de halo-iodation, le déplacement chimique du C-8 en RMN ^{13}C ne varie que très peu. Il apparaît très clairement que l'iode est toujours situé sur le carbone C-8. De plus, le déplacement chimique du carbone C-7 varie de manière prononcée suivant le réactif de di-halogénéation qui a été utilisé : pour les produits issus de l'halogénéation par ICl ou IBr respectivement, le déplacement chimique du carbone C-7 augmente par rapport à celui du composé de départ. Cet effet est dû à l'atome de chlore, ou de brome respectivement, qui induit une diminution du champ de résonance de l'atome de carbone sur lequel il est directement lié. Alors que lorsqu' I_2 est utilisé, le déplacement chimique du carbone C-7 est diminué (« effet gros atome »). Il est intéressant de noter que, comme attendu, lors de la dibromation, une augmentation du déplacement chimique de C-7 et de C-8 est observée. Ces remarques sont également valables pour tous les composés des séries 2'-déoxy- et 3'-déoxyribose.

Ces arguments vont, dans notre cas, dans le sens d'une halogénéation où l'atome d'iode se situe sur C-8 quelle que soit la réaction considérée.

Le problème de la stéréochimie de la réaction reste alors posé, et il s'agit de supposer la configuration *trans* ou *cis* de la double liaison. D'après les données de la littérature,¹⁷⁹ une réaction de halo-iodation sur une triple liaison ferait intervenir une attaque *anti* d'un ion chlorure sur un pont iodonium (Schéma 29 voie A) conduisant à un seul produit de configuration (*E*). D'autre part, une addition électrophile (de I^+) sur un alcyne peut passer par un carbocation vinylique dont la charge positive est portée par le carbone le plus substitué de la double liaison: il s'en suit une attaque nucléophile (de X^-) en *anti* si l'on considère la gêne stérique de l'iode dans notre cas (Schéma 29 voie B). Ainsi, il est possible de postuler le mécanisme réactionnel suivant :

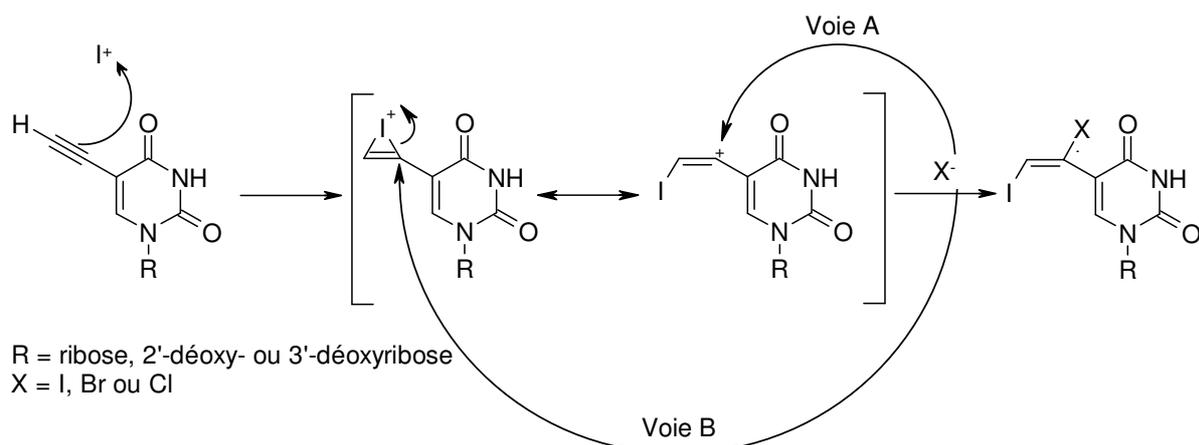


Schéma 29.

La formation de **136a-c** en employant Br₂ se produirait également avec une stéréochimie de type *E*.

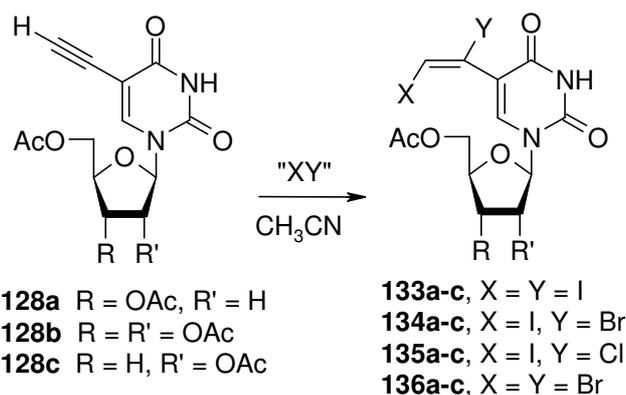


Schéma 30: Réactions de di-halogénéation menant aux nucléosides 5-(1,2-dihalo)vinyluracile **133a-c** à **136a-c**.

Les nucléosides 5-(1,2-diiodo)vinyluraciles **133a-c**, les dérivés 1-bromo-2-iodo **134a-c**, 1-chloro-2-iodo **135a-c**, et les analogues 1,2-dibromoalcène **136a-c** sont obtenus avec des rendements satisfaisants s'échelonnant entre 82% et 97%.

III.1.4. Déprotection finale

De manière à obtenir les produits finaux et à les faire tester, nous avons réalisé le déprotection des groupements hydroxyles.

La désacétylation des nucléosides **131a-c** et **132a-c** a été réalisée dans des conditions basiques douces (solution 1M de NaOH dans un mélange H₂O/EtOH/pyridine à -10°C), et les nucléosides 5-haloéthynyluraciles **137a-c** (pour X = I) et **138a-c** (pour X = Br) ont été obtenus, respectivement, avec des rendements modérés à bons (Schéma 31).

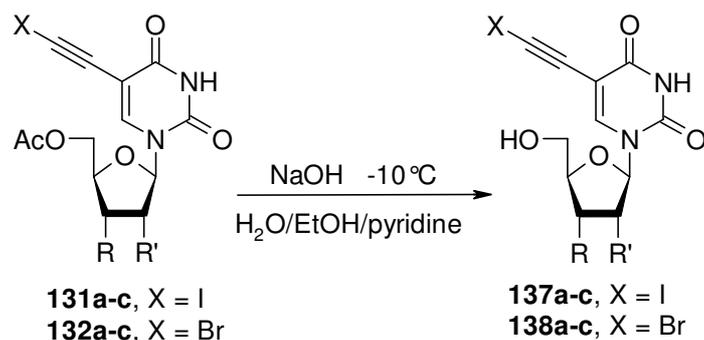


Schéma 31 : Obtention des nucléosides 5-haloéthynyluracile **137a-c** et **138a-c**.

De la même manière, la déprotection des nucléosides acétylés **133a-c** à **136a-c** a été réalisée dans des conditions basiques douces (solution 1M de NaOH dans un mélange H₂O/EtOH/pyridine), pour mener aux nucléosides 5-(1,2-dihalo)vinyluraciles **139a-c** (pour X = Y = I), **140a-c** (pour X = I, Y = Br), **141a-c** (pour X = I, Y = Cl), **142a-c** (pour X = Y = Br), respectivement (Schéma 32). Tous les composés ont été obtenus avec de très bons rendements, et ont été entièrement caractérisés par RMN du proton et du carbone, ainsi que par HRMS.

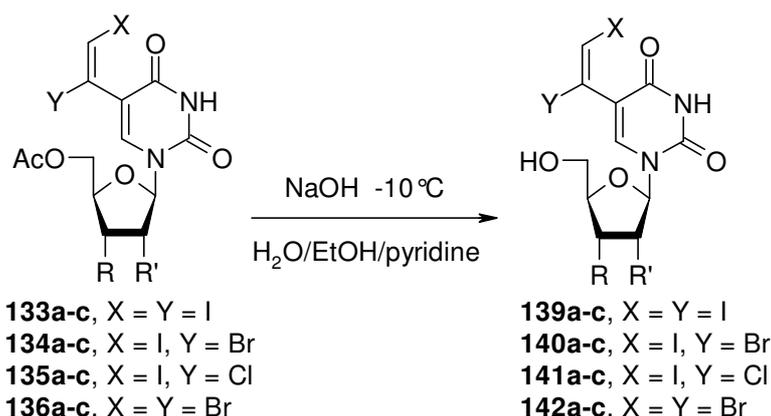


Schéma 32 : Obtention des nucléosides 5-(1,2-dihalo)vinyluracile **139a-c** à **142a-c**.

III.2. Evaluation biologique

III.2.1. Evaluation anti-VHC

Tous les composés synthétisés, c'est-à-dire les nucléosides 5-haloéthynyluraciles (**137a-c** et **138a-c**) et les nucléosides 5-(1,2-dihalo)-vinyluraciles (**139a-c** à **142a-c**), et les composés antiviraux connus (ici la ribavirine et l'IFN α -2b pour le VHC), ont été testés pour leurs activités anti-VHC *in vitro*. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 13.

L'EC₅₀ (resp. EC₉₀) donne l'activité : c'est la concentration effective requise pour réduire de 50 % (resp. 90 %) le niveau d'ARN du VHC (ou du BVDV suivant le test). La CC₅₀ donne la toxicité : c'est la concentration cytotoxique requise pour réduire de 50 % le niveau d'ARN du VHC.

Le système de réplicon subgénomique du VHC a été employé pour évaluer l'activité inhibitrice des composés synthétisés sur la réplication du VHC. Parmi les analogues 2'-*déoxyuridine* (**137a-142a**), les 5-iodoéthynyl-2'-déoxyuridine (**137a**) et les 5-(1-chloro-2-iodo)-2'-déoxyuridine (**141a**) ont le meilleur indice de sélectivité (SI) sur la réplication du VHC, respectivement de 3,2 et 2,7. La ribavirine dans le même système n'a eu qu'un SI < 1, suggérant de ce fait une plus grande efficacité de l'activité inhibitrice des composés **137a** et **141a**. Toutefois dans cette série, tous les analogues iodés étaient également les plus toxiques en cellules Huh7 et également en cellules PBM, CEM et VERO, tandis que les composés bromés (**138a, 142a**) étaient moins toxiques, mais également incapable d'inhiber le VHC de manière significative. La toxicité importante développée par les dérivés 2'-déoxyuridine sur les cellules est également en faveur d'une inhibition non spécifique de la réplication virale du génome par ces composés.

Des composés efficaces capables d'inhiber la réplication du VHC ont aussi été trouvés parmi les analogues de l'*uridine*. La 5-bromoéthynyluridine (**138b**), la 5-(1,2-diiodo)vinyluridine (**139b**) et la 5-(1-chloro,2-iodo)vinyluridine (**141b**) ont montré une EC₅₀ de 58 µM, de 162 µM, et 75 µM, respectivement, contre le réplicon du VHC, et avec une CC₅₀ > 200 µM pour **139b** et **141b**. L'index de sélectivité contre le VHC, pour **138b, 139b** et **141b**, s'est avéré égal à 3,2, à 1,5 et à 2,8, respectivement.

En conclusion, les nucléosides 3'-*déoxyribosyle* (**137c-142c**), n'ont montré aucune activité antivirale ni contre le VHC ni contre le BVDV (pour les composés examinés, voir le tableau 14).

	Composés #	Activité anti-VHC et toxicité sur le système réplicon (cellules Huh-7)			
		CC ₅₀	EC ₅₀	EC ₉₀	SI
	IFNα-2b	> 1000	19	760	52
	Ribavirin	110	170	> 512	< 1
	MPA	7	40		< 1
Série 2'-deoxyribose	137a - I	> 182	57.1	> 239	> 3.2
	138a - Br	> 200	> 200	> 200	≤ 1
	139a - I ₂	76.7	> 161	> 263	< 1
	140a - IBr	43	> 100	> 100	< 1
	141a - ICl	213	79.8	> 207	2.7
	142a - Br ₂	> 200	< 200	> 200	≥ 1
Série ribose	137b - I	147.5	> 200	> 200	< 1
	138b - Br	188.3	58	> 200	3.2
	139b - I ₂	> 250	161.7	> 250	> 1.5
	140b - IBr	> 100	> 100	> 100	≤ 1
	141b - ICl	> 200	74.9	> 250	> 2.8
	142b - Br ₂	> 200	> 200	> 200	≤ 1
Série 3'-deoxyribose	137c - I	> 200	> 200	> 200	≤ 1
	138c - Br	> 300	> 300	> 300	≤ 1
	139c - I ₂	> 200	> 200	> 200	≤ 1
	140c - IBr	> 200	> 200	> 200	≤ 1
	141c - ICl	> 200	> 200	> 200	≤ 1
	142c - Br ₂	> 200	≥ 200	> 200	≤ 1

Tableau 13 : Évaluation de l'activité antivirale et de la toxicité cellulaire (obtenue avec l'essai rouge neutre) contre la réplication du VHC en utilisant une lignée cellulaire hébergeant un réplicon subgénomique du VHC. Les résultats sont exprimés en µM, excepté pour l'IFN qui est exprimé en unités internationales/mL. L'index de sélectivité (SI) est le rapport entre la toxicité CC₅₀ et l'activité EC₅₀.

D'autre part, la ribavirine, qui a montré une activité *in vivo* chez les patients chroniquement infectés lorsqu'elle est associée avec l'IFN α , est inactive contre la réplication du VHC dans le système réplicon, mais empêche la réplication virale dans le système BVDV en combinaison avec l'IFN α .⁵⁵ Il est bien connu que la ribavirine utilisée seule n'a aucune activité antivirale chez l'homme atteint par le VHC.

Tous nos composés, qui ont montré des activités inhibitrices intéressantes sur la réplication du VHC dans un système réplicon, mériteraient une évaluation plus poussée. Par exemple, ils pourraient être testés, en combinaison avec l'IFN α , dans un système *in vitro* qui rend mieux compte des phénomènes biologiques qui ont lieu au sein du foie (comme ceux à base de cellules OR6 ou Huh 7.5.1. qui ont été développés très récemment), ou encore sur des modèles animaux judicieusement choisis.

Composé#	CC ₅₀ (Neutral Red)	EC ₅₀ ECP inhibition	SI
Ribavirine	> 100	36	> 2.8
137a-c, 138b, 139a-c, 140c, 141a-c	> 100	> 100	< 1

Tableau 14: Toxicité (test neutre rouge) et activité antivirale sur un brin NADL du BVDV exprimés en μM .

III.2.2. Evaluation anti-VIH-1

Tous les composés synthétisés, les nucléosides 5-haloéthynyluraciles (**137a-c** et **138a-c**) et les nucléosides 5-(1,2-dihalo)-vinyluraciles (**139a-c** à **142a-c**) et les composés antiviraux connus (ici l'AZT pour le VIH), ont également été testés pour leurs activités anti-VIH *in vitro*, et les résultats sont rassemblés dans le tableau 15. Des cellules humaines PBM ont été employées pour analyser leur capacité à inhiber le VIH-1.¹⁹³

Parmi les nucléosides *2'-déoxyribofuranosyles*, **137a-142a** exhibent une activité anti-VIH modérée dont la concentration efficace médiane (EC₅₀) s'échelonne entre 0,9 μM et 73,3 μM . La meilleure activité anti-VIH a été constatée chez le composé 5-(1-bromo-2-iodo)-vinyl-2'-déoxyuridine (**140a**) (EC₅₀ = 0,9 μM , SI = 14,8). Néanmoins, tous ces composés ont montré par ailleurs une toxicité contre les cellules PBM, CEM ou VERO, probablement en empêchant la synthèse cellulaire d'ADN.

Parmi les dérivés de l'*uridine* substitués en C-5 **137b-142b**, la meilleure activité (mais modérée) anti-VIH a été obtenue pour le composé **137b** (5-iodoéthynyluridine) avec un EC₅₀ de 20,8 μM (SI > 4,8); cet analogue de nucléoside ne possède pas de toxicité sur les cellules PBM, CEM ou VERO.

Dans la série *3'-déoxyribofuranosyle*, une activité anti-VIH faible à nulle a également pu être notée pour les composés **137c-142c**. Ceux-ci se sont avérés non toxiques.

¹⁹³ Stuyver, L. J.; Lostia, S.; Adams, M.; Mathew, J. S.; Pai, B. S.; Grier, J.; Tharnish, P.M.; Choi, Y.; Chong, Y.; Choo, H.; Chu, C.K.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F. Antiviral activities and cellular toxicities of modified 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrocytidine analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3854-3860.

	Composé #	Activité Anti-VIH			Cytotoxicité (CC ₅₀)		
		EC ₅₀	EC ₉₀	SI	PBM	CEM	VERO
		AZT	0.016		> 6250	> 100	14.0
Série 2'-deoxyribose	137a - I	9.2	34.8	< 1	7.5	15.8	> 100
	138a - Br	73.3	> 100	> 1.4	> 100	> 100	> 100
	139a - I ₂	10.3	39.1	1.4	14.7	19.5	19.5
	140a - IBr	0.9	6.9	14.8	13.3	0.13	6.6
	141a - ICl	2.6	20.3	1.2	3.2	14.8	1.4
	142a - Br ₂	43.2	86.9	> 2.3	> 100	43.9	> 100
Série ribose	137b - I	20.8	> 100	> 4.8	> 100	> 100	> 100
	138b - Br	95.2	> 100	1	> 100	> 100	> 100
	139b - I ₂	> 100	> 100	≤ 1	> 100	41.7	49.5
	140b - IBr	62.4	> 100	> 1.6	> 100	93.6	> 100
	141b - ICl	90.8	> 100	> 1.1	> 100	> 100	> 100
	142b - Br ₂	60.1	> 100	> 1.7	> 100	> 100	59.8
Série 3'-deoxyribose	137c - I	88.7	> 100	> 1.1	> 100	> 100	3.2
	138c - Br	> 100	> 100	≤ 1	> 100	> 100	6.4
	139c - I ₂	49.4	> 100	1.8	87.2	> 100	42.6
	140c - IBr	44.5	90.7	1.6	71.5	79.3	> 100
	141c - ICl	47.8	> 100	2	94.4	66.6	15.3
	142c - Br ₂	81.1	> 100	> 1.2	> 100	79.3	7.8

Tableau 15 : Évaluation de l'activité antivirale contre le VIH-1 en cellules PBM et de la cytotoxicité contre les cellules PBM, CEM et VERO *in vitro*. Les résultats sont exprimés en µM. La toxicité est donnée par la CC₅₀ et l'activité par l'EC₅₀.

III.2.3. Discussion

Différents analogues de nucléosides capables d'empêcher la réplication du VHC ont été décrits dans la littérature. Certains d'entre eux sont des terminateurs de chaînes, tandis que d'autres sont incorporés pendant l'élongation de l'ARN viral naissant et peuvent induire des mutations dans le génome viral. Les nucléosides terminateurs de chaînes qui visent les polymérases virales représentent une classe importante d'agents antiviraux. Les nucléosides à base pyrimidine ou purine peuvent agir en tant que terminateur de chaînes et sont caractérisés par l'absence du 3'-hydroxyle sur le ribose, qui altère l'élongation de la chaîne suivante. Cependant, la plupart des terminateurs de chaînes connus sont dirigés contre une polymérase virale d'ADN (HSV) ou la transcriptase inverse (VHB, VIH) et sont des 2',3'-didéoxynucléosides.

Jusqu'à peu, il n'y avait aucune recherche sur les nucléosides terminateurs de chaîne spécifiques de la polymérase virale d'ARN. Cependant, Shim *et al.*^{128b} ont montré, dans un test enzymatique *in vitro*, que chacun des quatre 3'-déoxyribonucléosides triphosphates (3'-dNTP) est incorporé lors de l'élongation de la chaîne d'ARN et que leur incorporation termine la synthèse d'ARN catalysée par la NS5B. En utilisant un test d'élongation de chaîne ARN, la 3'-dCTP était la plus efficace pour l'inhibition de l'élongation avec un $K_i = 0.72 \pm 0.20$, alors que la 3'-dUTP était moins efficace avec un $K_i = 5,90 \pm 0,5$.^{128b}

Il est important de noter que ces analyses antivirales sans cellule ne traduisent pas l'activité *in vitro* dans le système de réplicon (Stuyver *et coll.*).¹⁹⁴ Des études récentes de la structure cristalline d'un complexe de la NS5B avec des ribonucléotides (triphosphate) ont montré le rôle important du 2'-OH pour la spécificité lors de la reconnaissance du substrat par la NS5B.¹¹¹ L'étude de Shim *et coll.* a confirmé que la NS5B est plus sélective pour un nucléotide contenant un groupe 2'-OH et que la liaison carbone-carbone 2'-3' est un facteur important pour l'identification du nucléoside par la NS5B.^{128b} Il y avait cependant une différence importante entre l'activité efficace de ces 3'-dNTP trouvée *in vitro* et leur activité cellulaire faible dans le système de réplicon. Le métabolisme intracellulaire de ces analogues de nucléoside a pu expliquer cette différence. En fait, les concentrations intracellulaires¹⁹⁵ de nucléosides triphosphate (NTP) sont ATP > GTP ≥ UTP > CTP, ce qui pourrait expliquer que la 3'-dCTP est la plus efficace dans les tests cellulaires.¹⁹⁶ Dans un test cellulaire, la 3'-dCTP possède une EC₅₀ = 45 μM et une CC₅₀ > 300 μM. La 3'-dUTP n'était pas très active (EC₅₀ = 200 μM and CC₅₀ > 300 μM). Dans nos résultats et ceux de Stuyver *et coll.*,¹⁸⁴ les dérivés de type 3'-déoxyuridine sont des terminateurs de chaîne potentiels, qui pourraient être reconnus par la polymérase de NS5B parce qu'ils possèdent un groupement 2'-hydroxyle et une liaison carbone-carbone 2'-3' non modifiée.

Malheureusement, ces composés n'ont pas induit une inhibition significative de la réplication du VHC, dans les conditions expérimentales *in vitro* utilisées par l'équipe du Pr Zoulim. Comme il a été montré que la ribavirine n'inhibe pas la réplication du VHC de manière significative dans des systèmes réplicon, mais montre un effet synergique anti-VHC avec l'interféron alpha, il serait intéressant d'évaluer leur activité antivirale *in vivo* en présence d'interféron alpha sur des modèles animaux fiables quand ils deviendront disponibles (ou sur des systèmes *in vitro* mieux adaptés comme ceux à base de cellules OR6 ou Huh 7.5.1.).

Plusieurs hypothèses peuvent être faites pour expliquer ces résultats :

- l'absence ou l'insuffisance de la conversion de ces analogues dans leur forme 5'-triphosphate active, liée ou non à des problèmes de pénétration cellulaire.
- leurs concentrations doivent surmonter les concentrations cellulaires élevées de NTP pour l'incorporation dans les chaînes virales d'ARN.
- les nucléosides TP ne sont pas substrats de la NS5B.
- l'hypothèse d'une dégradation des composés par différents processus cellulaires tels que le clivage de la base a pu également réduire leur pouvoir inhibiteur.
- l'importance du groupement 3'-hydroxyle pour l'activité antivirale dans des tests cellulaires a été également réaffirmée par Stuyver *et coll.*¹⁹⁷ La β-D-N4-hydroxycytidine (NHC) s'est

¹⁹⁴ Stuyver, L. J.; McBrayer, T. R.; Tharnish, P. M.; Hassan, A. E. A.; Chu, C. K.; Pankiewicz, K. W.; Watanabe, K. A.; Schinazi, R. F.; Otto, M. J. Dynamics of subgenomic hepatitis C virus replicon RNA levels in Huh-7 cells after exposure to nucleoside antimetabolites. *J. Virol.* **2003**, *77*, 10689-10694.

¹⁹⁵ Traut, T. W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell. Biochem.* **1994**, *140*, 1-22.

¹⁹⁶ Dans les cellules saines, la concentration de CTP est la plus faible des concentrations de NTPs, donc la plus facile à atteindre ou à concurrencer pour un analogue de nucléoside à visée antivirale.

¹⁹⁷ Stuyver, L. J.; Whitaker, T.; McBrayer, T. R.; Hernandez-Santiago, B. I.; Lostia, S. Tharnish, P.M.; Ramesh, M.; Chu, C.K.; Jordan, R.; Shi, J.; Rachakonda, S.; Watanabe, K.A.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F. Ribonucleoside

avérée avoir des activités antipeptidase et antihépatite, mais ses dérivés 3'-déoxy n'étaient pas efficaces pour inhiber le BVDV et le VHC lors de tests cellulaires.¹⁹⁸ Nos résultats sont en accord avec ceux d'autres équipes ayant constaté l'incapacité générale des 3'-déoxyribonucléosides (possédant une base purine ou pyrimidine) à inhiber la réplication du VHC lors de tests cellulaires en dépit de leur inhibition efficace de la polymérase NS5B constatée lors de test *in vitro*.^{151d}

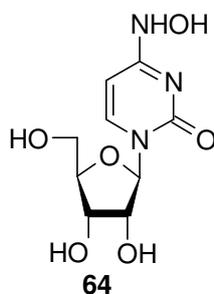


Figure 33 : Formule chimique de la β -D-4-hydroxycytidine anti-NS5B.

Dans nos résultats, les dérivés iodés de la 2'-déoxyuridine ont un effet cytotoxique : les composés **139a** et **140a** sur les cellules Huh7 et les composés **137a**, **139a**, **140a**, et **141a** sur des cellules PBM, CEM et VERO (Figure 46). Ils empêchent probablement la synthèse cellulaire d'ADN. Par conséquent, ces composés sont les antimétabolites possibles et empêchent indirectement la réplication du VHC et du VIH. De tels agents antimétabolites ont déjà été décrits dans la littérature.^{183,199} Alors que la réplication du VHC semble être associée à la prolifération des cellules,²⁰⁰ les inhibiteurs du cycle cellulaire empêchent également la synthèse du génome de VHC.

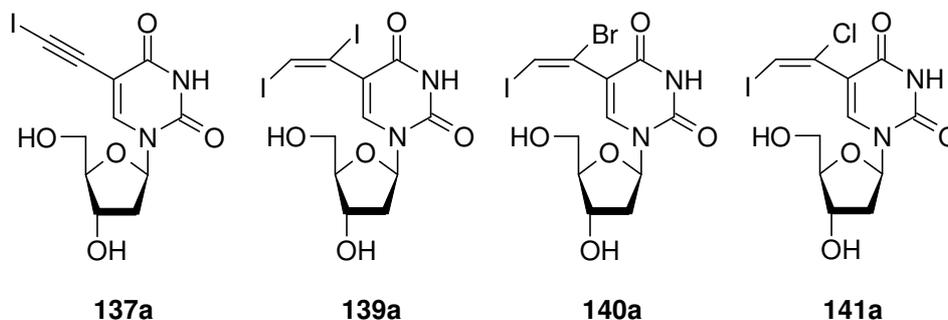


Figure 46 : Formule chimique des composés **137a**, **139a**, **140a** et **141a**.

analogue that blocks replication of bovine viral diarrhoea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 244-254.

¹⁹⁸ Hollecker, L.; Choo, H.; Chong, Y.; Chu, C. K.; Lostia, S.; McBrayer, T.R.; Stuyver, L.J.; Mason, J.C.; Du, J.; Rachakonda, S.; Shi, J.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A. Synthesis of beta-enantiomers of N4-hydroxy-3'-deoxypyrimidine nucleosides and their evaluation against bovine viral diarrhoea virus and hepatitis C virus in cell culture. *Antivir. Chem. Chemother.* **2004**, *15*, 43-55.

¹⁹⁹ Stuyver, L. J.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Tharnish, P. M.; Ramesh, M. Lostia, S.; Cartee, L.; Shi, J.; Hobbs, A.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A.; Otto, M.J. Inhibition of the subgenomic hepatitis C virus replicon in huh-7 cells by 2'-deoxy-2'-fluorocytidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 651-654.

²⁰⁰ Pietschmann, T.; Lohmann, V.; Rutter, G.; Kurpanek, K.; Bartenschlager, R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J. Virol.* **2001**, *75*, 1252-1264.

Stuyver *et coll.*²⁰¹ ont rapporté l'effet de différents antimétabolites de nucléoside, et ont prouvé que les agents antimétabolites empêchent la biosynthèse *de novo* des nucléosides, épuisant ainsi les réserves de nucléosides et induisant un effet cytostatique dépendant de la concentration, responsable de l'inhibition de la réplication de l'ARN du VHC.

Cependant, dans leur étude, si tous les antimétabolites examinés induisent un effet cytostatique sur les cellules, les antimétabolites empêchant la biosynthèse *de novo* de CTP et d'UTP étaient les seuls capables de diminuer la réplication d'ARN du VHC. Basé sur les concentrations physiologiques des purines et des pyrimidines, de la présence des concentrations élevées d'UTP et de CTP semblent être critiques pour maintenir une réplication dans un état d'équilibre de l'ARN du VHC dans les cellules Huh7.¹⁸³ L'importance d'UTP pour la réplication d'ARN du VHC pourrait alors expliquer l'activité anti-VHC de certains de nos dérivés d'uridine.

D'autre part, de tels antimétabolites pourraient se révéler être appropriés comme agents anticancéreux. Dans nos résultats, les dérivés 2'-déoxyuridine (**137a** et **141a**) et les analogues d'uridine (**138b** et **141b**) étaient les composés les plus actifs pour empêcher la réplication du VHC. Basé sur l'observation des composés probablement toxiques (**137b**, **139a**, **140a**) qui ont montré une activité antivirale seulement modeste (SI < 1), ceci peut donc indiquer pour **138b** et **141b** (Figure 47) un effet spécifique anti-VHC, car ces composés n'étaient pas actifs contre la réplication du BVDV, un membre étroitement lié au virus appartenant à la famille *flaviviridae* (tableau 14).

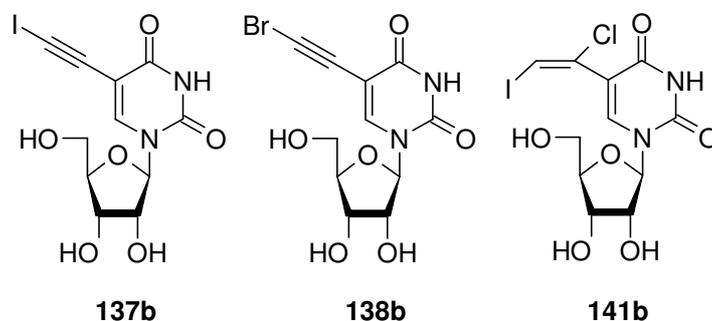


Figure 47 : Formule chimique des composés **137b**, **138b**, et **141b**.

Le fait que tous les composés examinés n'ont montré aucune activité anti-BVDV peut être dû à une phosphorylation insatisfaisante de ces nucléosides au sein des cellules MDBK, comme il a été montré que la Gemcitabine **143** (Figure 48), un agent anticancéreux efficace montrant une inhibition nanomolaire dans la plupart des cellules humaines, n'a pas montré d'activité inhibitrice dans cette lignée cellulaire.¹⁸³ Ceci permet de suggérer que le test d'activité antivirale MDBK-cpBVDV ne soit pas toujours un modèle fiable pour prévoir l'activité anti-VHC.

²⁰¹ Stuyver, L. J.; McBrayer, T. R.; Tharnish, P. M.; Hassan, A. E. A.; Chu, C. K.; Pankiewicz, K. W.; Watanabe, K. A.; Schinazi, R. F.; Otto, M. J. Dynamics of subgenomic hepatitis C virus replicon RNA levels in Huh-7 cells after exposure to nucleoside antimetabolites. *J. Virol.* **2003**, *77*, 10689-10694.

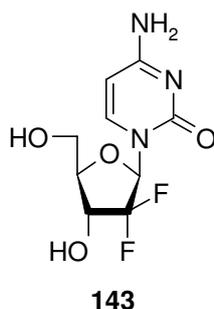


Figure 48 : Formule chimique de la Gemcitabine **143**.

Comme conclusion, la 5-iodoéthynyl-2'-déoxyuridine (**137a**), la 5-(1-chloro-2-iodo)-2'-déoxyuridine (**141a**), la 5-bromoéthynyl-uridine (**138b**), et la 5-(1-chloro-2-iodo)vinyluridine (**141b**) montrent une activité antivirale contre la réplication du VHC *in vitro*. Puisque tous ces composés actifs possèdent un groupement 3'-hydroxyle sur le ribose, nos résultats confirment le rôle crucial de ce groupement pour l'inhibition de la polymérase du VHC.²⁰²

III.3. Conclusion

En résumé, les dérivés 2'-déoxyuridines **137a** et **141a** et les uridines **138b**, **139b** et **141b** ont montré une activité anti-VHC dans le système de réplique du VHC. Parmi ces composés actifs, la présence d'un groupement haloéthynyle en C-5 (**137a** et **138b**) semble conférer une activité légèrement meilleure que des analogues substitués par un vinyle; néanmoins, ces deux composés montrent également une toxicité contre les cellules PBM, CEM ou VERO. Finalement, les meilleurs composés en terme de SI obtenu avec le système réplique du VHC, mais également sur leur cytotoxicité sur les lignées cellulaires PBM, CEM et VERO, possèdent un groupement (1-chloro,2-iodo)vinyle en position C-5 (**141a** et **141b**) sur leur base hétérocyclique (Figure 49).

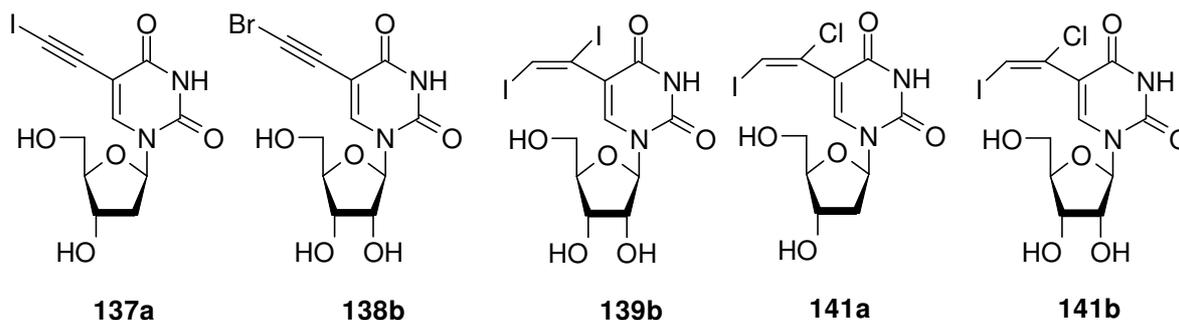


Figure 49 : Formule chimique des composés **137a**, **138b**, **139b**, **141a** et **141b**.

En conclusion, tous les composés actifs ont un groupement hydroxyle en position 3' du sucre (que ce soit en série ribose ou 2'-déoxyribose) alors que tous les analogues 3'-

²⁰² Gallois-Montbrun, S.; Chen, Y.; Dutartre, H.; Sophys, M.; Morera, S.; Guerreiro, C.; Schneider, B.; Mulard, L.; Janin, J.; Veron, M.; Deville-Bonne, D.; Canard, B. Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by NDP kinase: comparison with other ribavirin targets. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 538-546.

déoxyuridine ne possèdent aucune activité antivirale ni contre le VHC ni contre le VIH-1. Par conséquent, ce groupement 3'-hydroxyle semble être important pour une activité anti-VHC. Ainsi, basé sur l'activité anti-VHC et la cytotoxicité de ces composés, l'ordre d'importance du pouvoir inhibiteur anti-VHC de ces analogues de nucléoside substitués s'est avéré être le suivant: ribose > 2'-déoxyribose > 3'-déoxyribose.

Afin de diminuer la toxicité et d'augmenter l'activité anti-VIH-1, en améliorant la spécificité des ces composés pour les enzymes virales (par rapport aux enzymes cellulaires), il paraissait judicieux d'effectuer la synthèse de ses dérivés 5-haloéthynyl- ou 5-(1,2-dihalo)vinyluracile en série 2',3'-dideoxy-3'-fluoro- et 3'-azido-2',3'-dideoxyribofuranosyle. Ce travail de synthèse fait l'objet de la partie suivante.

IV. Nouveaux dérivés en série 2',3'-dideoxy-3'-fluororibosyle et 3'-azido-2',3'-dideoxyribosyle

IV.1. Introduction

Nous avons décrit lors de la partie précédente la synthèse et l'évaluation biologique de dérivés nucléosidiques originaux portant un groupement vinyle di-halogéné, ou un groupement éthynyle mono-halogéné, en position 5 de l'uracile. Ces dérivés possèdent une activité notable sur le VHC, et assez moyenne sur le VIH-1, exhibant notamment une certaine toxicité sur les cellules PBM, CEM ou VERO, en série 2'-déoxyribosyle notamment.

Récemment, la conception de nucléosides portant un atome de fluor²⁰³ a fait l'objet d'un intérêt croissant compte tenu de leur potentielle activité antivirale.²⁰⁴ Pour découvrir de nouvelles substances actives, de nombreux nucléosides portant un atome de fluor sur le sucre ont été synthétisés.^{205,206} Par exemple, ses recherches ont mené à la découverte de la FLT, analogue fluoré de l'AZT synthétisé pour la première fois en 1971 (Figure 50).²⁰⁷ Il a été prouvé que le remplacement d'un groupement hydroxyle en position 3' par un atome de fluor

²⁰³ Revues: (a) Pankiewicz, K.W. Fluorinated nucleosides. *Carbohydr. Res.* **2000**, 327, 87-105. (b) Tsuchiya, T. Chemistry and developments of fluorinated carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, 48, 91-277.

²⁰⁴ (a) Owen, G.R.; Verheyden, J.P.; Moffatt, J.G. 4'-substituted nucleosides. 3. Synthesis of some 4'-fluorouridine derivatives. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 3010-3017. (b) Marquez, V.E.; Tseng, C.K.; Mitsuya, H.; Aoki, S.; Kelley, J.A.; Ford, H. Jr.; Roth, J.S.; Broder, S.; Johns, D.G.; Driscoll, J.S. Acid-stable 2'-fluoro purine dideoxynucleosides as active agents against HIV. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 978-985. (c) Balakrishna Pai, S.; Liu, S.H.; Zhu, Y.L.; Chu, C.K.; Cheng, Y.C. Inhibition of hepatitis B virus by a novel L-nucleoside, 2'-fluoro-5-methyl-beta-L-arabinofuranosyl uracil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40, 380-386. (d) Chun, B.K.; Schinazi, R.F.; Cheng, Y.C.; Chu, C.K. Synthesis of 2',3'-dideoxy-3'-fluoro-L-ribonucleosides as potential antiviral agents from D-sorbitol. *Carbohydr. Res.* **2000**, 328, 49-59.

²⁰⁵ Schinazi, R.F.; Mellors, J.; Bazmi, H.; Diamond, S.; Garber, S.; Gallagher, K.; Geleziunas, R.; Klabe, R.; Pierce, M.; Rayner, M.; Wu, J.T.; Zhang, H.; Hammond, J.; Bacheler, L.; Manion, D.J.; Otto, M.J.; Stuyver, L.; Trainor, G.; Liotta, D.C., Erickson-Viitanen S. DPC 817: a cytidine nucleoside analog with activity against zidovudine- and lamivudine-resistant viral variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 1394-1401.

²⁰⁶ Lin, T.-S.; Luo, M.Z.; Liu, M.C.; Zhu, Y.L.; Gullen, E.; Dutschman, G.E.; Cheng, Y.C. Design and synthesis of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-beta-L-cytidine (beta-L-d₄C) and 2',3'-dideoxy 2',3'-didehydro-beta-L-5-fluorocytidine (beta-L-Fd₄C), two exceptionally potent inhibitors of human hepatitis B virus (HBV) and potent inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1757-1759.

²⁰⁷ Etzold, G.; Hintsche, R.; Kowollik, G. Langen, P. Nucleoside von Fluorzucker-VI. Synthese und Reaktivitaet von 3-Fluor- und 3-Chlor-3-Desoxythymidin. *Tetrahedron* **1971**, 27, 2463-2472.

renforce la liaison *N*-glycosidique, rendant le nucléoside fluoré plus stable que son analogue hydroxylé vis-à-vis de la *thymidine phosphorylase*.²⁰⁸

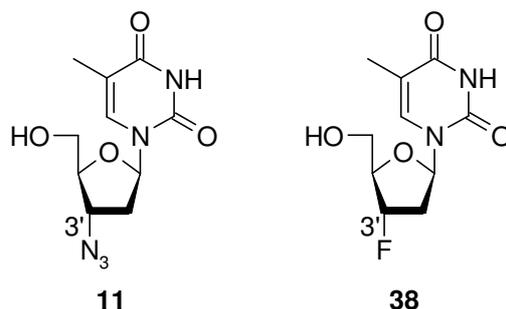
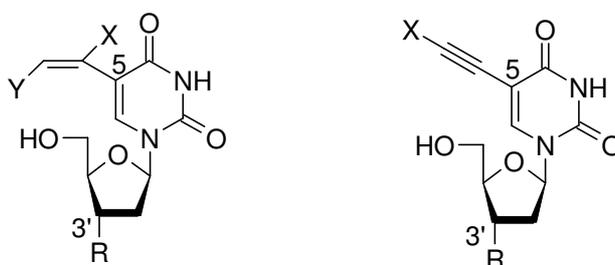


Figure 50 : Formule chimique de l'AZT **11** et de la FLT **38**

Il a été montré que la FLT et l'AZT, qui possèdent une modification structurale en position 3', pourraient viser la NS3 NTPase du VHC, enzyme qui intervient indirectement dans la réplication virale : ces molécules se lieraient au site actif et entreraient en compétition avec l'ATP.⁹² De nombreux nucléotides pourraient ainsi posséder cette propriété en raison de la grande flexibilité du site enzymatique en matière de reconnaissance de substrat. Ils sont également hydrolysés par la NS3 hélicase, fonction essentielle pour l'activité de cette enzyme: les nucléotides peuvent donc perturber son activité de déplacement de fragment d'ARN, indispensable à la réplication du virus.

Pour ces raisons, nous nous sommes alors intéressés à la synthèse de composés (Figure 51) portant à la fois une modification originale sur la position 5 de l'uracile (un groupement vinyle di-halogéné, ou un groupement éthyne mono-halogéné), et une modification en position 3' du sucre (introduction d'un atome de fluor ou d'un groupement azido) :



R=N₃ ou F, et X,Y=halogène

Figure 51 : Formule chimique des nouveaux analogues de nucléosides à synthétiser.

Il est légitime d'attendre une activité accrue de ces molécules sur la réplication du VHC par rapport aux composés déjà synthétisés, car ils pourraient viser à la fois la NS3 du VHC,²⁰⁹ en tant qu'inhibiteurs compétitifs, et la NS5B du VHC, en tant que terminateurs de

²⁰⁸ Ajmera, S.; Bapat, A.R.; Danenberg, K.; Danenberg, P.V. Synthesis and biological activity of 5-fluoro-2',3'-dideoxy-3'-fluorouridine and its 5'-phosphate. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 11-14.

²⁰⁹ Zhang, N.; Chen, H.-M.; Koch, V.; Schmitz, H.; Liao, C.-L.; Bretner, M.; Bhadti, V.S.; Fattom, A.I.; Naso, R.B.; Hosmane, R.S.; Borowski, P. Ring-expanded ("Fat") nucleoside and nucleotide analogues exhibit potent in vitro activity against *Flaviviridae* NTPases/helicases, including those of the west Nile virus, hepatitis C virus and Japanese encephalitis virus. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4149-4164.

chaînes spécifiques de l'ARN, ou en s'incorporant lors de l'élongation de l'ARN viral naissant ce qui engendrerait des mutations et l'arrêt de la propagation du virus.

Dans le traitement du SIDA, un certain nombre d'agents utilisables en chimiothérapie ont été développés. Parmi eux, les nucléosides restent à la pointe des traitements thérapeutiques anti-VIH. Malheureusement, l'apparition de phénomènes de résistances²¹⁰ dus à ces composés rendent plus difficile l'éradication du virus, et ont poussé les chercheurs à concevoir et à synthétiser de nouveaux dérivés nucléosidiques pour pallier ce problème.

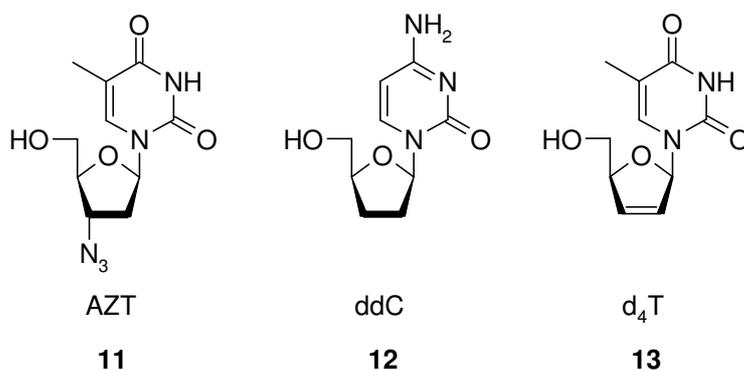


Figure 52 : Analogues de nucléosides utilisés dans le traitement du SIDA

Les intenses efforts déployés de part le monde pour la recherche d'agents antiviraux plus actifs et moins toxiques contre le VIH et le VHB ont conduit à la découverte d'analogues de nucléosides de la famille des 2',3'-dideoxy-nucléosides, comme l'AZT²¹¹, le d₄T²¹² ou la ddC, utilisés dans le traitement du SIDA (Figure 52).²¹³ La FLT présente une activité anti-VIH1 similaire à celle de l'AZT.²¹⁴

Ces observations montrent que la synthèse de composés portant à la fois une modification originale sur la position 5 de l'uracile (un groupement vinyle di-halogéné, ou un groupement éthyne mono-halogéné), et une modification en position 3' du sucre

²¹⁰ (a) Richman, D.D. Resistance of clinical isolates of human immunodeficiency virus to antiretroviral agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 1207-1213. (b) Schinazi, R.F. Competitive inhibitors of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Persp. Drug. Des.* **1993**, 1, 151. (c) De Clercq, E. HIV resistance to reverse transcriptase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 155-169. (d) Tisdale, M.; Alnadaf, T.; Coursens, D. Combination of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase required for resistance to the carbocyclic nucleoside 1592U89. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 1094-1098. (e) Tantillo, C.; Ding, J.; Jacobo-Molina, A.; Nanni, R.G.; Boyer, P.L.; Hughs, S.H. Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase: implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J. Mol. Biol.* **1994**, 243, 369-387.

²¹¹ Furman, P.A.; Fyfe, J.A.; St. Clair, M.H.; Weinhold, K.; Rideout, J.L.; Freeman, G.A.; Lehrman, S.N.; Bolognesi, D.P.; Broder, S.; Mitsuya, H. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, 83, 8333-8337.

²¹² Lin, T.S.; Schinazi, R.F.; Prusoff, W.H. Potent and selective in vitro activity of 3'-deoxythymidin-2'-ene (3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine) against human immunodeficiency virus. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, 36, 2713-2718.

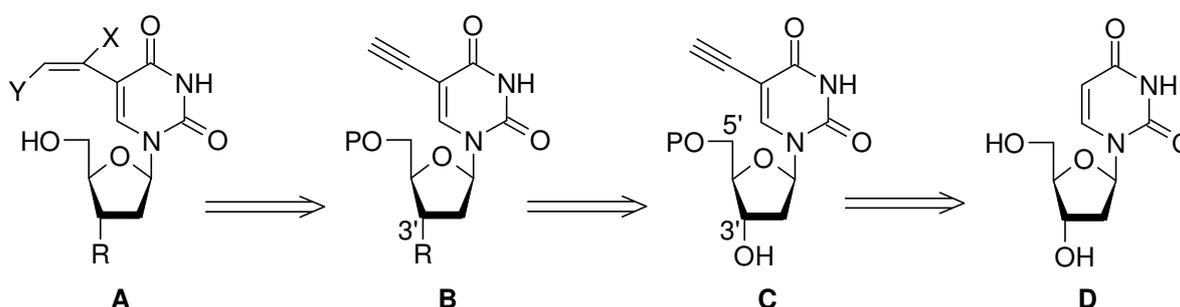
²¹³ Yarchoan, R.; Perno, C.F.; Thomas, R.V.; Klecker, R.W.; Allain, J.P.; Wills, R.J.; McAtee, N.; Fischl, M.A.; Dubinsky, R.; McNeely, M.C. Phase I studies of 2',3'-dideoxycytidine in severe human immunodeficiency virus infection as a single agent and alternating with zidovudine (AZT). *Lancet* **1988**, 1, 76-80.

²¹⁴ Kong, X.B.; Zhu, Q.Y.; Vidal, P.M.; Watanabe, K.A.; Polsky, B.; Armstrong, D.; Ostrander, M.; Lang, S.A. Jr.; Muchmore, E.; Chou, T.C. Comparisons of anti-human immunodeficiency virus activities, cellular transport, and plasma and intracellular pharmacokinetics of 3'-fluor-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, 36, 808-818.

(introduction d'un atome de fluor ou d'un groupement azido), pourrait mener à des molécules présentant une activité VIH-1 accrue par rapport aux composés présentés lors de la partie précédente. De plus, le remplacement de l'hydroxyle en 3' par un groupement azido ou fluoro rendra la molécule plus lipophile : on peut alors espérer une concentration intracellulaire accrue par rapport aux dérivés 2'-déoxy, due à une meilleure pénétration cellulaire, permettant ainsi une concentration inhibitrice du virus plus faible, ce qui diminuerait une éventuelle cytotoxicité.

Les composés que nous souhaitons synthétiser seraient donc susceptibles de viser à la fois le VHC et le VIH, et pourraient se montrer intéressants dans le cadre d'un traitement d'une co-infection VHC-VIH.

La rétrosynthèse envisagée pour ce type de composés est la suivante :



R=N₃ ou F, et X,Y=halogène

Schéma 32 : Schéma de rétrosynthèse.

Le schéma de rétrosynthèse (Schéma 32) est identique pour les séries 3'-fluoro et 3'-azido. Le composé **A** est obtenu par di-halogénéation (resp. mono-halogénéation), réaction qui s'effectue en dernier (suivie d'une déprotection), à partir d'un nucléoside **B** portant le motif 5-éthynyluracile et la modification en position 3'. Cette modification en 3' s'effectue à partir du dérivé 3'-OH **C** portant le motif 5-éthynyluracile, ce motif est obtenu *via* l'étape de couplage de Sonogashira, effectuée à partir du dérivé 5-iodouracile protégé en 5', facilement accessible à partir de la 2'-déoxyuridine **D**.

IV.2. Synthèse chimique

IV.2.1. Synthèse de l'intermédiaire clef *via* une réaction de Sonogashira

La première étape de la synthèse est la protection sélective en position 5' de la 2'-déoxyuridine. Il s'agit de choisir un groupement protecteur qui résistera à toutes les étapes de la synthèse, et qui se clivera de manière aisée sans toucher aux autres parties de la molécule. Pour cela, notre choix s'est porté sur le groupement monométhoxytrityle (MMTr), un analogue du trityle portant un groupement méthoxy substitué en para sur l'un des noyaux aromatiques. Ce choix peut être justifié par les raisons suivantes : les premières étapes de la synthèse ont déjà été effectuées sur des analogues de notre molécule possédant un groupement MMTr en 5', cela signifie que ce groupement est compatible avec les étapes de synthèse envisagées, que ce soit l'accès aux dérivés 5-éthynyl-uracile, ou les modifications du sucre

pour atteindre les dérivés 3'-azido ou 3'-fluoro.²¹⁵ Ce groupement devrait résister lors de l'étape clef de mono- ou di-halogénéation. Il paraît facilement clivable en fin de synthèse. On aurait pu également penser au groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS), mais ce choix n'aurait pas été judicieux, car le clivage du TMS sur l'alcyne aurait été accompagné du clivage du TBDMS sur le 5'OH lors de l'étape de désilylation, et nous aurait obligé à reprotéger sélectivement l'hydroxyle en 5' avant de poursuivre la synthèse. Ainsi, la protection régiosélective de la 2'-déoxyuridine **144** se fait dans la pyridine à reflux pendant 2h en présence de MMTrCl, pour donner **145** avec un rendement quasi quantitatif (Schéma 33). Il est important de noter que si le temps de réaction est trop long, ou si la température est trop élevée, il y a un certain pourcentage de produits di-protégés qui se forment, diminuant ainsi le rendement de la mono-protection désirée.

L'étape suivante est une iodation de l'uracile en position 5 : elle s'effectue suivant le même protocole que celui décrit précédemment sur les séries ribofuranosyles, à un détail près : le traitement de **145** avec l'iode élémentaire et le CAN dans l'acétonitrile à reflux (80°C), en présence de NaHCO₃, conduit au nucléoside 5-iodouracile correspondant **146** avec un rendement de 57 %. Plusieurs observations peuvent être faites sur ce rendement simplement correct. Cette réaction s'est montrée plus lente lorsqu'elle est effectuée sur une quantité de produit de départ supérieure à 10g : nous avons alors arrêté la réaction avant qu'elle ne soit terminée, mais une colonne chromatographie effectuée dans de bonnes conditions d'éluion permet de récupérer le produit souhaité (57 %), ainsi que le produit de départ (35 %) qui peut être réengagé dans une réaction d'iodation. De plus, le CAN qui rend le milieu acide pour générer l'entité réactive I⁺, est neutralisé par la présence de NaHCO₃, présent dans le milieu pour prévenir un éventuel clivage du groupement MMTr, ce qui explique une cinétique plus lente de la réaction (Schéma 33).

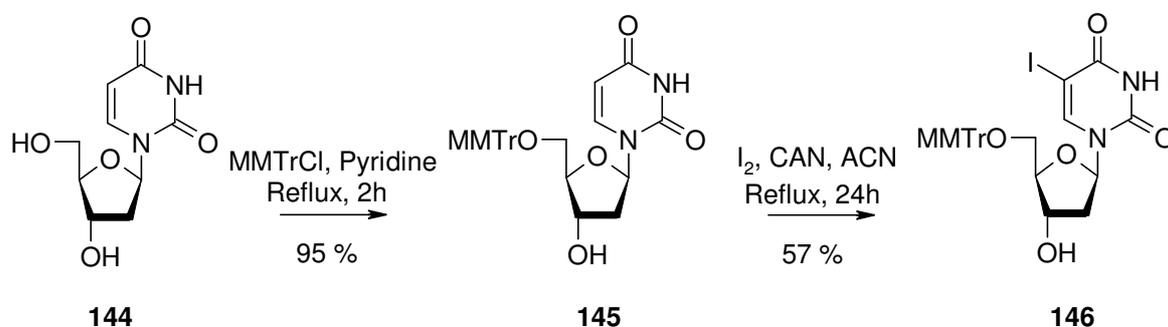


Schéma 33 : Obtention de l'intermédiaire **146**.

L'introduction d'une triple liaison en position C-5 de l'uracile a été effectuée par une réaction catalysée au Pd(0), en utilisant les conditions de Sonogashira.¹⁹⁰ Ainsi, la réaction du dérivé 5-iodouracile **146** avec le triméthylsilylacétylène (75 %) en présence de Et₃N (base), de CuI (co-catalyseur) et de PdCl₂(PPh₃)₂ (catalyseur) dans le DMF à température ambiante, suivie du clivage du groupe triméthylsilyle (85%) avec *n*Bu₄NF a permis d'obtenir le nucléoside 5-éthynyluracile **148** correspondant avec un rendement satisfaisant. Un tel rendement pour le couplage de Sonogashira a été obtenu après 3 passages sur colonne de gel de silice, les dérivés du palladium étant particulièrement difficiles à éliminer sur cette série, à cause d'une faible différence de polarité (Schéma 34).

²¹⁵ Lin, T.S.; Mancini, W.R. Synthesis and antineoplastic activity of 3'-azido and 3'-amino analogues of pyrimidine deoxyribonucleoside. *J. Med. Chem.* **1983**, 544-548.

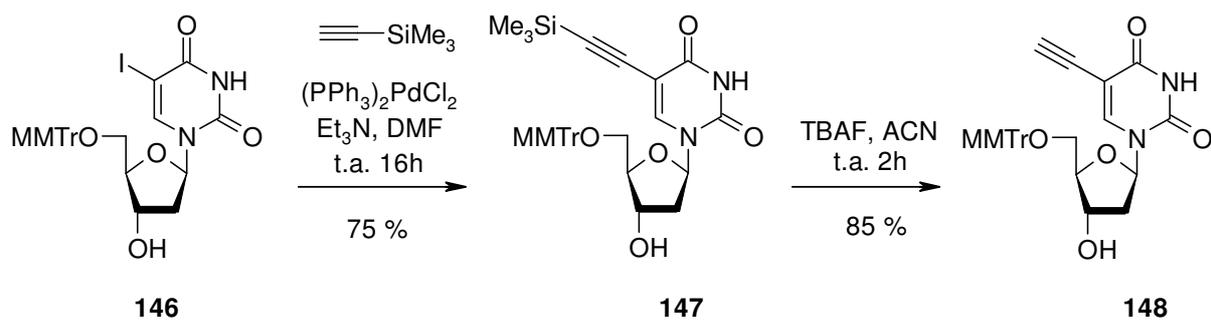


Schéma 34 : Obtention de l'intermédiaire **148**.

Ces 4 étapes permettent l'accès au premier intermédiaire clef de la synthèse : le composé **148**. L'avantage de la stratégie de synthèse est présenté dans le schéma suivant (Schéma 35). Elle nous a donné accès à trois séries de molécules. De plus, cette stratégie pourrait potentiellement mener à deux autres séries de composés : les 2',3'-didéoxynucléosides et les 2',3'-didéoxy-2',3'-didéshydronucléosides : la première série serait obtenue par une réaction de Barton McCombie²¹⁶ (voir partie V), tandis que la chimie du sélénium permettrait l'accès à la seconde.²¹⁷

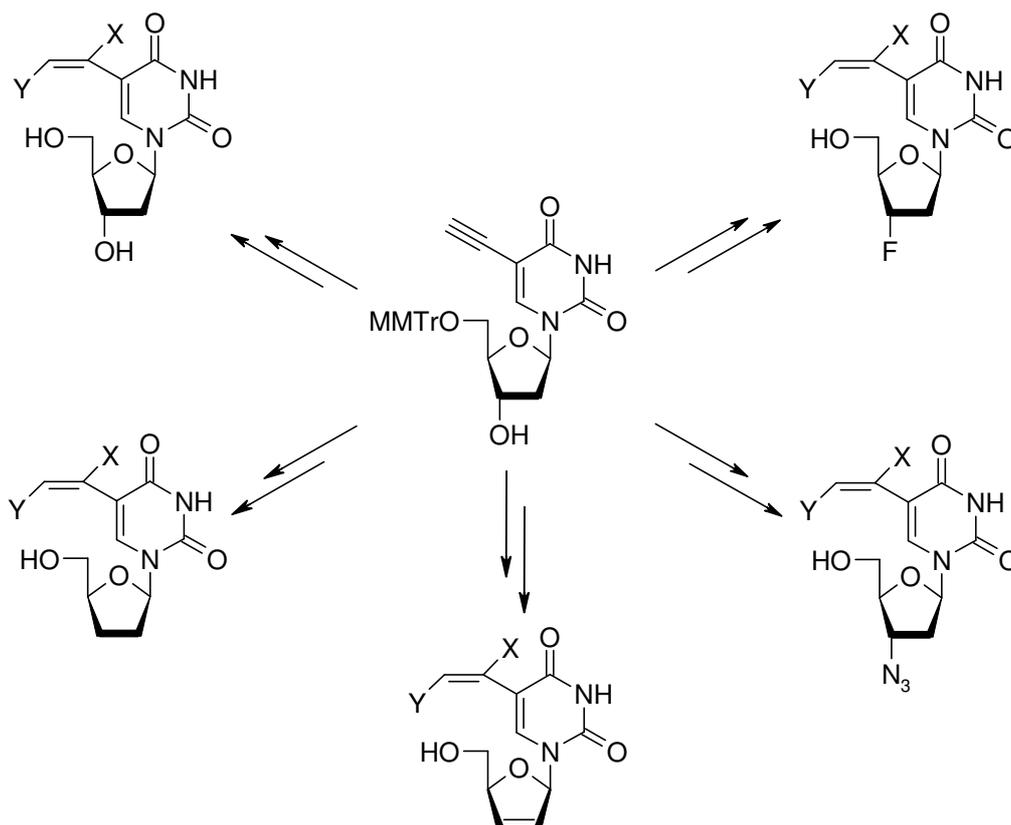


Schéma 35 : Avantages de la stratégie de synthèse.

²¹⁶ Barton, D.H.R.; McCombie, S.W. A new method for the deoxygenation of secondary alcohols. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*. **1975**, 1574-1585.

²¹⁷ Haragushi, K.; Tanaka, H.; Maeda, H.; Itoh, Y.; Saito, S.; Miyusaka, T. Selenoxide elimination for the synthesis of unsaturated-sugar uracil nucleosides. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5401-5408.

Il nous a été possible de synthétiser les dérivés de la série 2'-déoxyribofuranosyle par cette voie de synthèse (Schéma 36): il suffit d'effectuer une di-halogénéation, ou une mono-halogénéation, puis de cliver le groupement MMTr pour aboutir aux composés dont les caractéristiques physico-chimiques ont été décrites dans la partie précédente de ce chapitre. Cette voie de synthèse donne cependant des rendements plus faibles par rapport à ceux exposés lors de la partie III de ce chapitre, en partie du à la déprotection du 5'-OH moins aisée (par rapport à une simple désacétylation). Les caractéristiques physicochimiques des composés **137a**, **139a**, **140a**, **141a** et **149** sont conformes à celles qui sont issues de la voie de synthèse précédente.

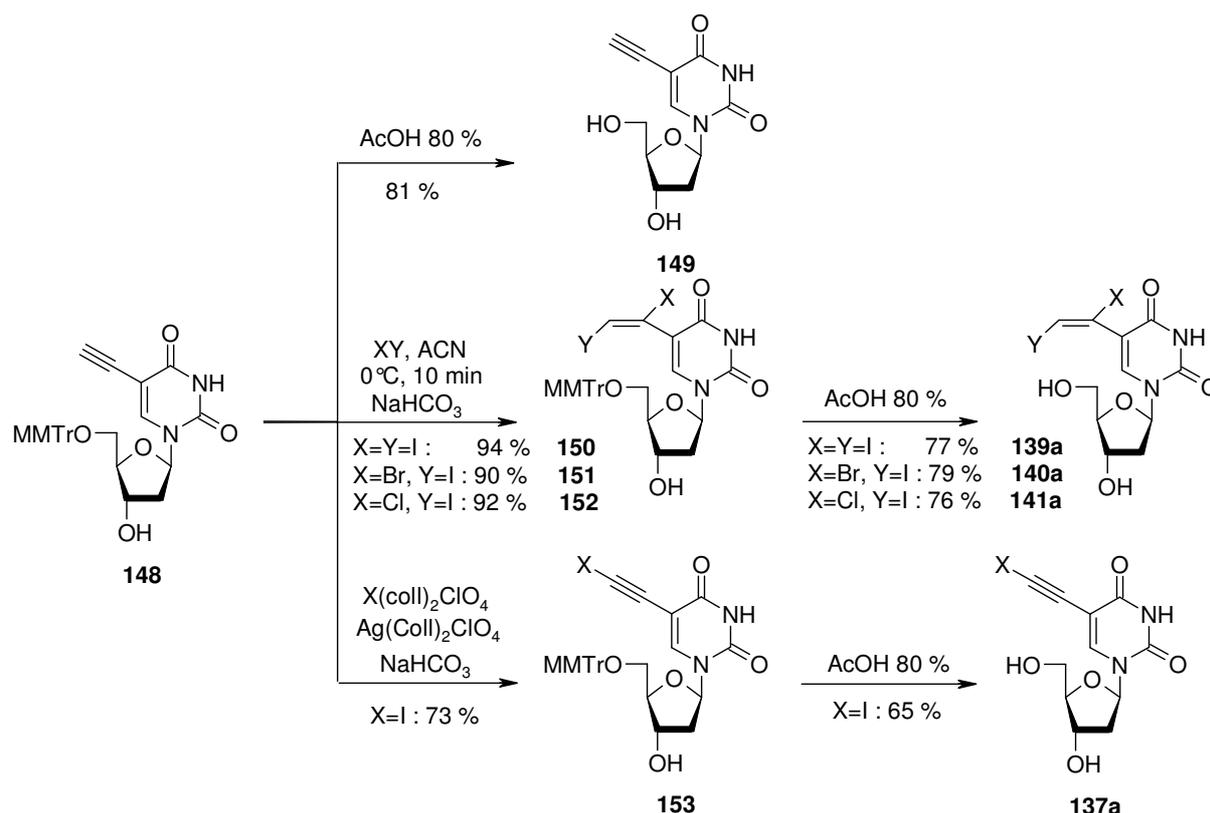


Schéma 36 : synthèse des dérivés de la série 2'-déoxyribofuranosyle.

Les composés désirés dans les séries 3'-azido et 3'-fluoro sont obtenus comme nous allons le voir ci-après, à partir de **148** par modification du sucre en position 3', puis par di- ou mono-halogénéation de la triple liaison, suivie d'une déprotection en position 5' pour accéder aux composés souhaités.

IV.2.2. Synthèse de l'intermédiaire clef 3'-fluoro

Les dérivés 3'-fluoro peuvent être obtenus à partir du dérivé **148**. Dans un premier temps, il s'agit d'effectuer la substitution d'un groupement hydroxyle par un fluor. Deux méthodes classiques sont décrites dans la littérature (Schéma 37) : dans les deux cas elles engendrent une inversion de configuration. La première permet de substituer un OH par un F

en utilisant le trifluorure de diéthylaminosulfure (DAST)²¹⁸ comme agent de fluoration, et la seconde permet de substituer un hydroxyle mésylé par un ion fluorure en utilisant le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF).^{16a,219}

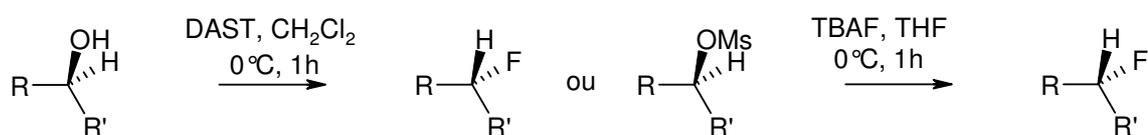


Schéma 37 : Méthodes d'introduction d'un atome de fluor.

Nous avons choisi d'appliquer la première méthode, car elle permet de s'affranchir de l'étape de mésylation qui est nécessaire si on veut utiliser le TBAF, sachant que les deux méthodes sont équivalentes en terme de rendement de réaction. Ainsi, la molécule hydroxylée est mise en présence de DAST dans le CH_2Cl_2 anhydre à 0°C pour donner le composé fluoré souhaité *via* une $\text{S}_\text{N}2$ selon une procédure de la littérature.²²² L'inversion de configuration n'est cependant pas systématique. Aussi, il faudra vérifier la stéréochimie du carbone C-3' du (ou des) composé(s) obtenu (s).

Si l'on considère l'hypothèse (qui sera vérifiée) du passage par un mécanisme de type $\text{S}_\text{N}2$, sachant que nous souhaitons un fluor en α , alors il faut inverser la configuration du groupement hydroxyle en 3' avant d'effectuer la réaction de fluoration : pour cela, le dérivé **148** est mis en présence de MsCl à 0°C dans la pyridine, et laissé à t.a. pendant 14h. Après traitement, le nucléoside **154** portant le groupement partant est obtenu avec un rendement quantitatif (Schéma 38).

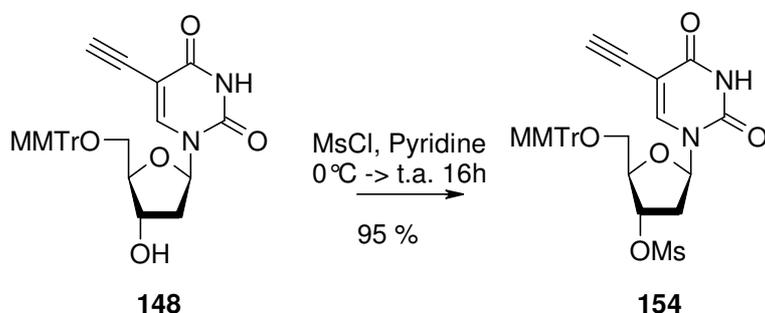


Schéma 38 : Obtention de l'intermédiaire **154**.

On pourrait penser qu'une simple $\text{S}_\text{N}2$ en présence de soude suffirait à déplacer le mésyle pour obtenir le groupement 3'-OH en α . Mais en chimie des nucléosides, il est connu

²¹⁸ (a) Middleton, W. New fluorinating reagents. Dialkylaminosulfur fluorides. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 574-578. (b) Markovskij, L.N.; Pashinnik, V.E.; Kirsanov, A.V. Application of Dialkylaminosulfur Trifluorides in the Synthesis of Fluoroorganic Compounds. *Synthesis* **1973**, 787-789.

²¹⁹ (a) Ikehara, M.; Kaneyasu, T.; Matsugi, J.; Uesugi, S. Uesugi, Seiichi; Kaneyasu, Toshinori; Matsugi, Jitsuhiro; Ikehara, Morio. Improved synthesis of 2'-fluoro-2'-deoxyadenosine and synthesis and carbon-13 NMR spectrum of its 3',5'-cyclic phosphate derivative. *Nucleosides Nucleotides* **1983**, *2*, 373-385. (b) Fox, J.J.; Schinazi, R.F.; Su, T.-L.; Watanabe, K. Nucleosides. 136. Synthesis and antiviral effects of several 1-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)-5-alkyluracils. Some structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 151-154. (d) Benigni, D.; Brodfuehrer, P.; Brundidge, S.; Howell, H.; Sapino, C. Antiviral nucleosides. A stereospecific, total synthesis of 2'-fluoro-2'-deoxy-.beta.-D-arabinofuranosyl nucleosides. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 85-88.

que les ions hydroxydes, qui ne sont pas nucléophiles, sont assez basiques pour capter le proton de l'azote N-3, et permettent la formation intermédiaire d'un pont anhydro, qui peut lui-même être ouvert, non par l'attaque de l'ion hydroxyde sur le sucre en 3', mais pas une attaque de cet ion sur l'hétérocycle en position 2 (Schéma 39).

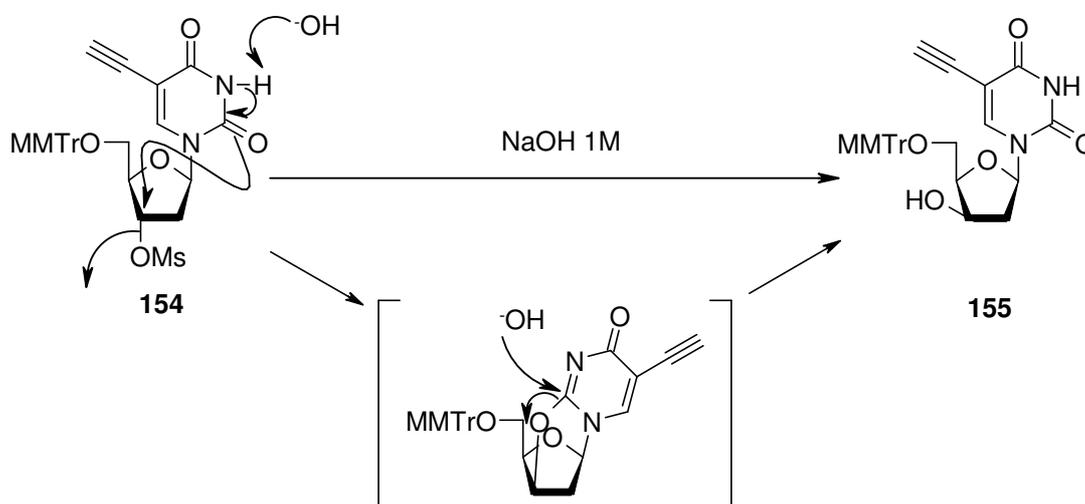


Schéma 39 : Formation et ouverture d'un pont anhydro.

Une optimisation a été nécessaire pour effectuer la formation et l'ouverture de ce pont anhydro, comme le montre le tableau ci-dessous (Tableau 16). Conformément aux données de la littérature, le DAST permet, en captant le proton de l'azote grâce aux ions fluorures, de former le pont anhydro mais pas de l'ouvrir.²²⁰ De même en utilisant le TBAF,²²¹ la formation du pont anhydro s'effectue avec un rendement similaire de 41 %. Avec le DBU,²²² le rendement est amélioré. Contrairement à la littérature cette fois, nous n'avons pas observé de réaction en utilisant le NaH,²²³ car dans notre cas nous avons le proton de l'alcyne (site mou) qui peut réagir avec l'hydruure qui est un nucléophile mou. Après la formation du pont anhydro, nous nous sommes intéressés à son ouverture: là encore malgré les données de la littérature indiquant un rendement très élevé en utilisant une solution de soude dans l'acétonitrile,²²⁴ nous n'avons obtenu qu'un rendement d'ouverture médiocre de 24 %. Nous nous sommes alors penchés sur une réaction monotope de formation et d'ouverture du pont anhydro en présence d'une solution de soude. Si le premier essai dans l'éthanol s'est révélé

²²⁰ Agyei-Aye, K.; Yan, S.; Hebbler, A.K.; Baber, D.C. Preparation of 2,3'-anhydropyrimidine nucleosides using diethylaminosulfur trifluoride (DAST). *Nucleosides Nucleotides* **1989**, 8, 327-337.

²²¹ Cox, D.P.; Terpinski, J.; Lawrynowicz, W. "Anhydrous" tetrabutylammonium fluoride: A mild but highly efficient source of nucleophilic fluorine ion. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 3216-3219.

²²² Hrebabecky, H.; Holy, A.; De Clercq, E. Synthesis of 3'-azido-2',3'-dideoxy-6-methyluridine, 2',3'-dideoxy-6-methyluridine and 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-6-methyluridine. *Collect. Czech. Chem. Comm.* **1990**, 55, 1801-1811.

²²³ Kvrno, L.; Wightman, R.H.; Wengel, J. Synthesis of a novel bicyclic nucleoside restricted to an S-type conformation and initial evaluation of its hybridization properties when incorporated into oligodeoxynucleotides. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5106-5112

²²⁴ Huang, J.-T.; Chen, L.-C.; Wang, L.; Kim, M.-H.; Warshaw, J.A.; Armstrong, D.; Zhu, Q.-Y.; Chou, T.C.; Watanabe, K.A.; Matulic-Adamic, J.; Su, T.-L.; Fox, J.J.; Polsky, B.; Baron, A.B.; Gold, J.W.M.; Hardy, W.D.; Zuckerman, E. Fluorinated sugar analogues of potential anti-HIV-1 nucleosides. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1640-1646.

décevant,²²⁵ le second en revanche, dans le dioxanne,²²³ nous a permis d'obtenir le composé désiré **155** avec un rendement de 94 %.

Substrat	Conditions	Formation du	
		pont anhydro	Ouverture du pont
ROH	DAST - CH ₂ Cl ₂ - 0°C	41%	
ROMs	TBAF - THF - t.a.	41%	
ROMs	NaH, THF, t.a.	0 %	
ROMs	DBU - THF - Reflux	69%	
Pont	NaOH 1M - CH ₃ CN		24%
ROMs	NaOH 1M - EtOH	échec	
ROMs	NaOH 1M - Dioxanne	2 étapes en « one-pot » : 94 %	

Tableau 16 : Mise au point de la formation et de l'ouverture du pont anhydro.

Ainsi, une solution du composé **154** dans un mélange de dioxanne et d'une solution de soude 1M portée au reflux pendant 2h permet l'obtention du composé **155** avec un excellent rendement après optimisation (Schéma 40).

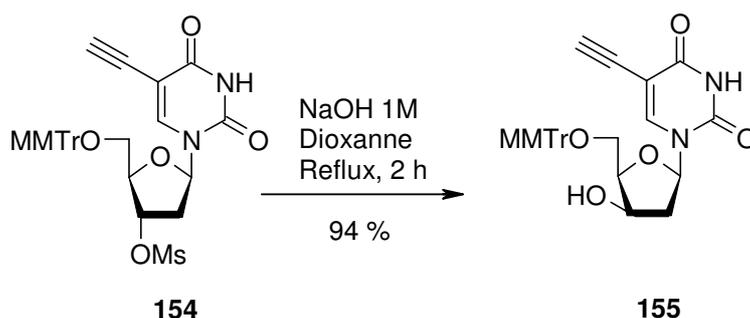


Schéma 40 : Obtention de l'intermédiaire **155**.

La fluoration s'effectue alors sur ce composé. Après plusieurs essais, les conditions opératoires optimales pour la fluoration sont les suivantes : à 0°C, **155** est mis en présence de DAST dans le CH₂Cl₂ anhydre pour donner **156** avec un bon rendement de 58 % conforme aux données de la littérature (Schéma 41).²²⁶

Un seul composé est formé: la stéréochimie du carbone C-3' portant l'atome de fluor peut être déterminée par l'étude des constantes de couplage caractéristiques du fluor en RMN

²²⁵ Lin, T.-S.; Mancini, W.R. Synthesis and antineoplastic activity of 3'-azido and 3'-amino analogues of pyrimidine deoxyribonucleoside. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 544-548.

²²⁶ (a) Matulic-Adamic, J.; Takahashi, K.; Chou, T.C.; Gadler, H.; Price, R.W.; Venugopola Reddy, A.R.; Kalman, T.I.; Watanabe, K.A. Nucleosides. 150. Synthesis and some biological properties of 5-monofluoromethyl, 5-difluoromethyl, and 5-trifluoromethyl derivatives of 2'-deoxyuridine and 2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyluracil. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1642-1647. (b) von Janta-Lipinski, M.; Costisella, B.; Ochs, H.; Hübscher, U.; Hafkemeyer, P.; Matthes, E. Newly synthesized L-enantiomers of 3'-fluoro-modified β-2'-deoxyribonucleoside 5'-triphosphates inhibit hepatitis B DNA polymerases but not the five cellular DNA polymerases α, β, γ, δ, and ε nor HIV-1 reverse transcriptase. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2040-2046.

du proton. Pour cela, le composé **156** est déprotégé en présence d'une solution d'acide acétique sur la position 5' pour donner **157** (Schéma 41).

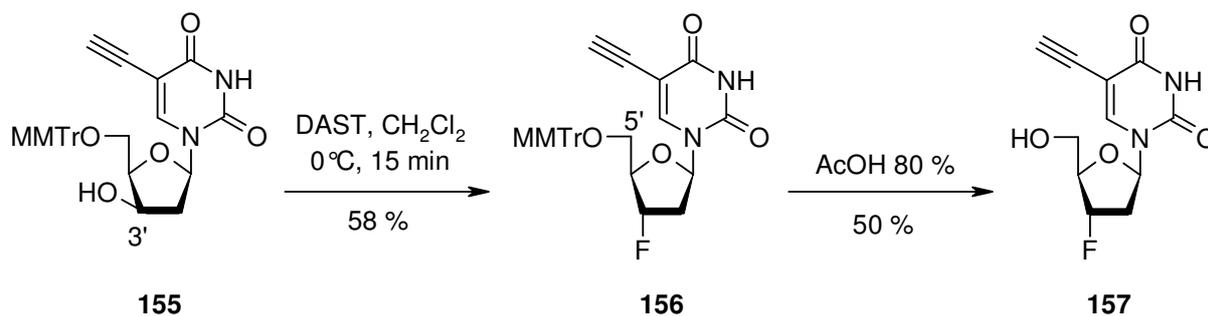


Schéma 41 : Obtention de l'intermédiaire **156** et de la molécule **157**.

Pour vérifier la stéréochimie du C-3', nous avons choisi de comparer notre molécule **157** à la FLT **38**, qui porte un fluor en α en position 3'. La structure chimique de la FLT **38** est très voisine de celle de **157** : la FLT **38** porte un groupement méthyle en position 5 de l'uracile, tandis que **157** porte un groupement éthyne sur la même position. La comparaison des signaux relatifs aux protons H-3' et H-4' entre les deux molécules va nous renseigner sur la position α ou β du fluor en 3' sur la molécule **157**. La figure 53a montre l'allure des pics correspondants aux protons H-3' et H-4' sur le spectre du composé **157**. Le proton H-3' couple avec le fluor et H-2', tandis que le couplage entre H-3' et H-4' n'est pas visible. Le proton H-4' couple avec le fluor et avec les deux protons H-5' et H-5''.

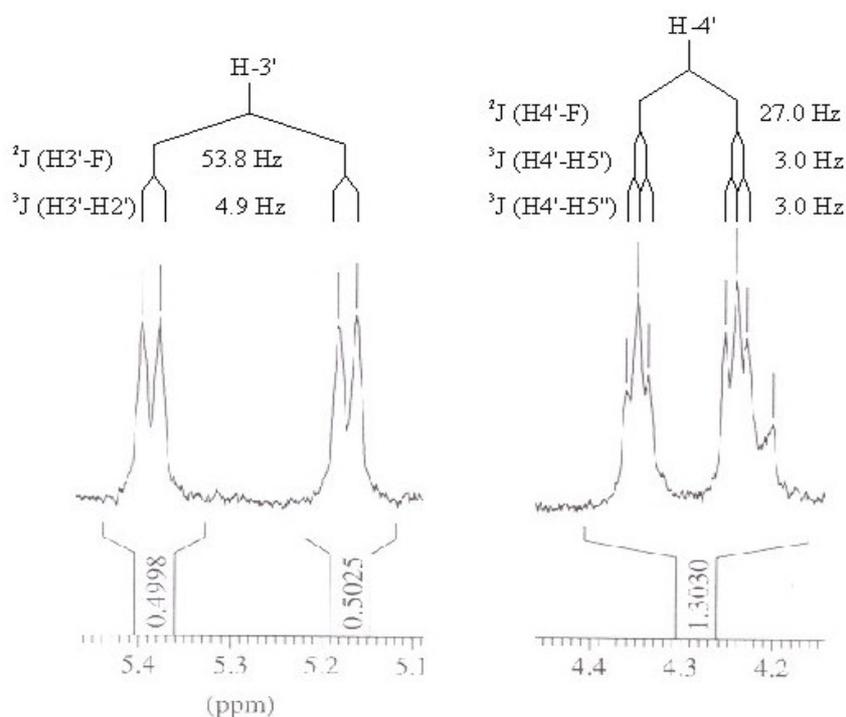


Figure 53a : Constantes de couplage observées sur le spectre RMN ^1H du composé **157**.

La figure 53b montre l'allure des pics qui correspondent aux protons H-3' et H-4' sur le spectre de la FLT **38**. Le proton H-3' couple avec le fluor et H-2', tandis que le

couplage entre H-3' et H-4' n'est pas visible. Le proton H-4' couple avec le fluor et avec les deux protons H-5' et H-5''. La représentation schématique du spectre de la FLT est accompagnée de la formule chimique et de la structure obtenues par diffraction des rayons X de la molécule, preuve indéniable de la stéréochimie du C-3'.

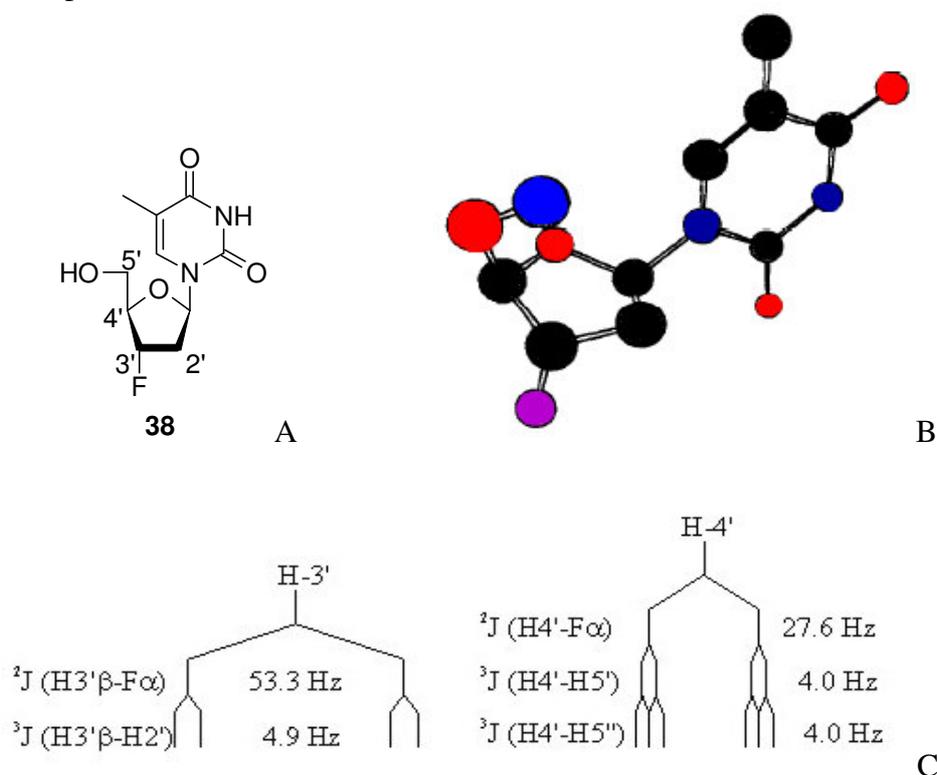


Figure 53b : A : Formule chimique de la FLT **38**. B : Structure de la FLT **38** obtenue par diffractions des rayons X, montrant l'atome de fluor en position α sur le carbone C-3'. C : Constantes de couplage observées sur le spectre RMN ^1H de la FLT.

Il apparaît très clairement que les deux molécules possèdent des spectres identiques non seulement dans leur allure mais aussi au niveau des valeurs des constantes de couplage et des déplacements chimiques. Nous pouvons ainsi affirmer que l'atome de fluor sur le carbone C-3' est en position α . Ainsi, nous venons de vérifier l'inversion de configuration qui a lieu au cours de la réaction de fluoruration.

Le mécanisme de la réaction (Schéma 42) est alors le suivant :

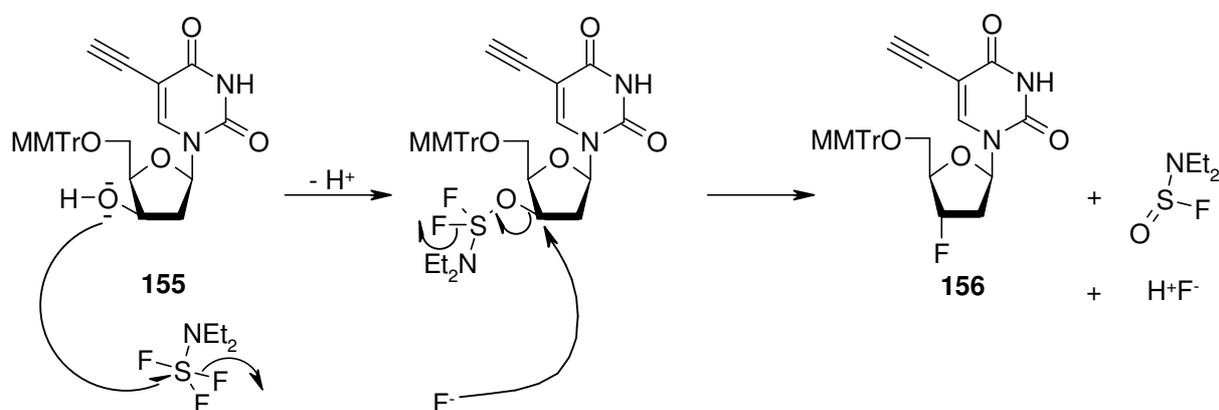


Schéma 42 : Mécanisme de la réaction de fluoruration au DAST.

Le composé **156** est l'intermédiaire clef fluoré à partir duquel seront tentées les réactions de di-halogénéation et de mono-halogénéation.

IV.2.3. Synthèse des dérivés halogénés en série 3'-fluoro

La dihalogénéation des nucléosides de type 5-éthynyle a été réalisée pour l'obtention des nucléosides dérivés du 5-(1,2-dihalo)vinyluracile **158a-c**. Plusieurs réactifs d'halogénéation (c.-à-d. I₂, IBr, ou ICl) ont été employés pour obtenir les dérivés nucléosidiques 5-(1,2-dihalo)vinyluracile correspondant, à 0°C en présence cette fois de NaHCO₃ pour tamponner le milieu. Dans tous les cas de halo-iodation, la formation des halo-iodoalcènes vicinaux (**158a-c**) s'est produite avec une haute stéréosélectivité *anti* et une unique régiosélectivité, mais avec l'apparition de produits secondaires cette fois, ce qui explique les rendements modestes de dihalogénéation, par rapport à ceux décrits dans la partie III de ce chapitre (Schéma 43).

Les rendements de ces réactions sur la série 2'-déoxyuridine sont équivalents quelque soit la protection de la molécule (peracétylée sur les hydroxyles ou mono-protégé en 5'). Par conséquent, la baisse de rendement constaté ne provient que de la modification en 3' du sucre, l'ion fluor donnant certainement des réactions secondaires avec les dihalogènes. Les structures de ces produits n'ont pas pu être déterminées car ils formaient un mélange inséparable par chromatographie sur gel de silice.

Quant à la mono-halogénéation du dérivé **156**, elle a été réalisée en utilisant le perchlorate de di-sym-collidine et d'iodonium (IDCP, pour la réaction d'iodation) dans le CH₃CN anhydre (Schéma 10). Le nucléoside 5-iodoéthynyluracile **159** a été obtenu avec rendement très médiocre de 26 %. Là encore, de nombreux produits secondaires, difficilement séparables après passage sur gel de silice, ont pu être observés (Schéma 43).

Il ne reste plus qu'une déprotection du 5'-OH pour accéder aux composés finaux.

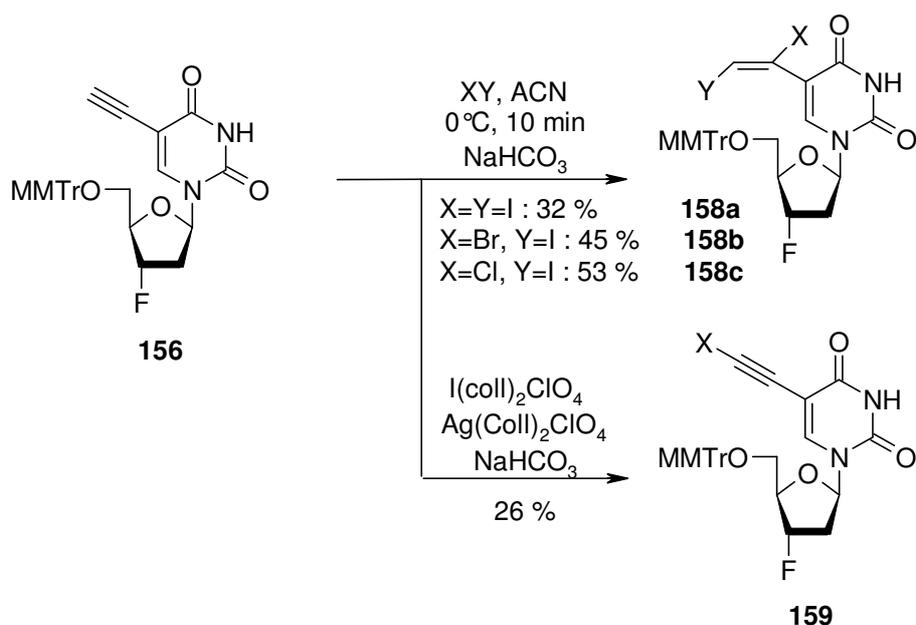


Schéma 43 : Obtention des intermédiaires **158a-c** et **159**.

IV.2.4. Synthèse de l'intermédiaire clef 3'-azido

L'obtention de l'intermédiaire clef 3'-azido sur lequel seront effectuées les réactions d'halogénéation est similaire à celle du dérivé 3'-fluoro: à partir de **148**, un groupement partant de type mésylate est formé en 3' (composé **154**) pour permettre la formation et l'ouverture d'un pont anhydro pour donner le composé 3'-azido **160** (Schéma 44).

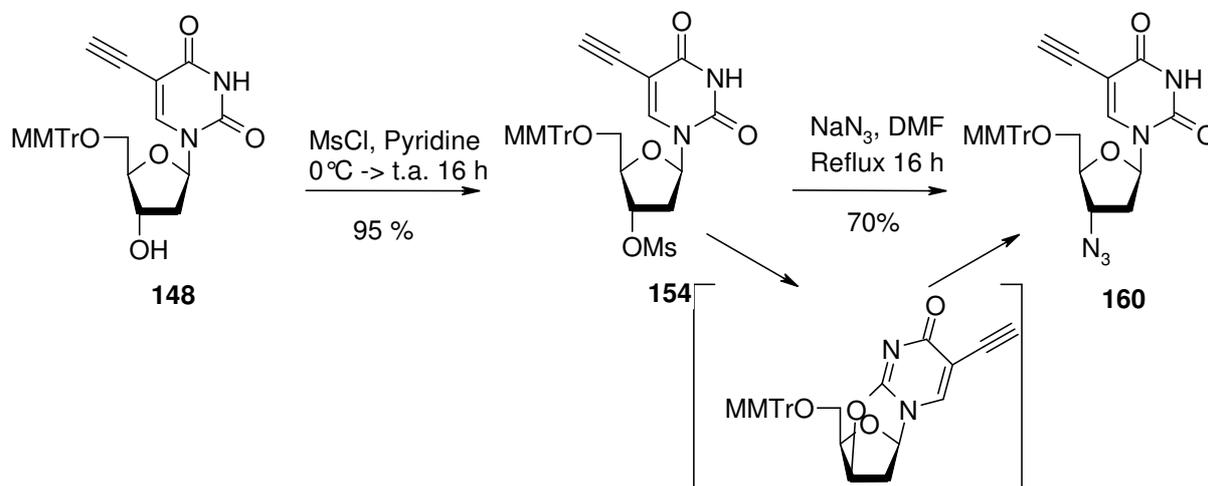


Schéma 44 : Obtention de l'intermédiaire **160**.

Le composé **154** en solution dans le DMF à reflux est mis en présence d'azote de sodium pendant 16h : les ions azoture captent le proton sur l'azote de la base hétérocyclique, formant ainsi le pont anhydro, qui est ouvert cette fois non pas sur la base, mais sur le sucre en 3' par les ions N₃ pour donner **160** avec un bon rendement.²²⁷ Une faible proportion (< 10 %) de composés possédant le groupement azido en β, résultant de l'attaque nucléophile directe de l'azoture sur le mésylate en position 3' du sucre, a pu être isolé, ce qui révèle le caractère à la fois basique et nucléophile des ions azoture.

Le composé **160** est déprotégé pour donner **161** (Schéma 45).

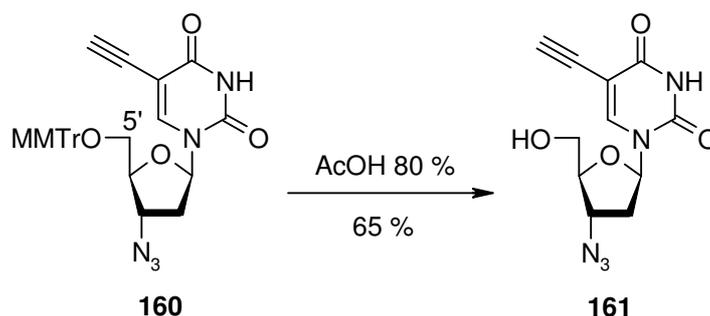


Schéma 45 : Obtention du composé **161**.

²²⁷ Matsuda, A.; Watanabe, K.A.; Fox, J.J. Nucleosides. 115. Reaction of 3'-O-Mesylthymidine. Formation of 1-(3-azido-2,3-dideoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)thymidine and its conversion into 6,3'-imino-1-(2,3-dideoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)thymidine *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3274-3278.

Ceci permet une étude comparative entre le spectre RMN ^1H du composé **161** et de l'AZT **11** (Figure 54). Lors de cette étude, menée de la même manière que pour le composé **157** et la FLT **38**, il est apparu clairement que les deux molécules **11** et **161** possèdent des spectres identiques non seulement dans leur allure mais aussi au niveau des valeurs des constantes de couplage et des déplacements chimiques associés aux protons H-3' et H-4'. Nous pouvons ainsi affirmer que le groupement azido porté par le carbone C-3' du composé **161** est en position α .

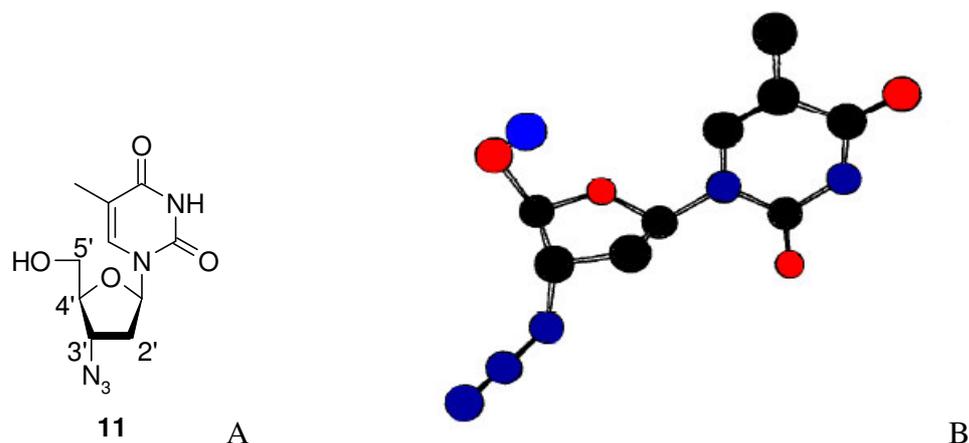


Figure 54 : A : Formule chimique de l'AZT **11**. B : Structure de l'AZT **11** obtenue par diffractions des rayons X, montrant le groupement azido en position α sur le carbone C-3'.

Maintenant que nous disposons de l'intermédiaire clef 3'-azido **160**, nous pouvons procéder aux réactions de di-halogénéation et de mono-halogénéation pour accéder aux composés souhaités.

IV.2.5. Synthèse des dérivés halogénés en 3'-azido

Les méthodes sont strictement les mêmes que celles exposées pour les dérivés 3'-fluoro.

Pour la di-halogénéation (Schéma 46), plusieurs réactifs (c.-à-d. I₂, IBr, ou ICl) ont été employés pour obtenir les dérivés nucléosidiques dihalogénés correspondants, à 0°C en présence de NaHCO₃. Dans tous les cas de di-halogénéation, la formation des dérivés 5-(1,2-dihalo)vinyluracile (**162a-c**) s'est produite avec une haute stéréosélectivité (*anti* à priori) et une unique régiosélectivité. Des produits secondaires ont été observés comme dans le cas du fluor, ce qui explique les rendements corrects de di-halogénéation, certes plus modestes que ceux décrits dans la partie III de ce chapitre, mais légèrement supérieurs à ceux décrits sur les molécules fluorées: les dérivés 3'-azido semblent chimiquement plus stable que les 3'-fluoro.

La mono-halogénéation du dérivé **160**, en présence d'IDCP a été réalisée dans le CH₃CN anhydre (Schéma 46). Le nucléoside 5-iodoéthynyluracile **163** a été obtenu avec rendement de 74 %. Pour cette réaction, les mêmes remarques que dans le cas de la di-halogénéation peuvent être avancées : l'azido en 3' est la cause de réactions secondaires, comme dans le cas du fluor, mais il demeure chimiquement plus stable que ce dernier, ce qui

explique pourquoi les rendements sont plus élevés dans le cas des réactions d'halogénéation sur la série 3'-azido que celles effectuées sur la série 3'-fluoro.

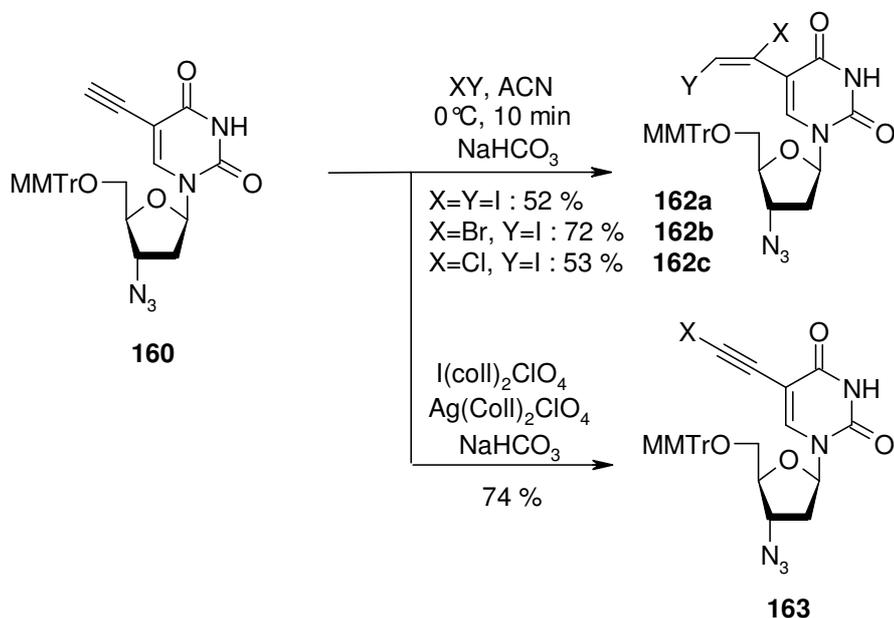


Schéma 46 : Obtention des intermédiaires **162a-c** et **163**.

Seule une déprotection du 5'-OH reste à accomplir pour accéder aux composés finaux.

IV.2.6. Déprotection finale

Pour accéder aux composés finaux désirés, la déprotection en position 5' s'effectue dans des conditions opératoires classiques: soit une solution TFA/H₂O²²⁸ dont les proportions respectives sont variables, soit une solution d'AcOH 80 %.²²⁹

La première entraîne trop de dégradation et nous a obligé à nous rabattre sur la seconde, plus douce (moins de formation de produit secondaires).

L'application de cette méthode aux dérivés 3'-fluoro **158a-c** et **159** conduit respectivement aux dérivés déprotégés **164a-c** et **165** (Schéma 47), avec des rendements moyens à corrects (45-76 %). Là encore la formation de quelques produits secondaires inséparables (30-40 %), imputables au fluor en position 3', a diminué le rendement des réactions de déprotection.

²²⁸ Sekine, M.; Hata, T. 3-(Imidazol-1-ylmethyl)-4',4''-dimethoxytrityl: a new functionalized 5'-hydroxyl protecting group capable of rapid internucleotidic bond formation in the phosphorothio ester approach. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 946-948.

²²⁹ Smith, M.; Rammler, D.H.; Goldberg, I.H.; Khorana, H.G. Polynucleotides. XIV. Specific synthesis of the C3'-C5' internucleotide linkage. Synthesis of uridylyl(3' → 5')-uridine and uridylyl-(3' → 5')-adenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430-440.

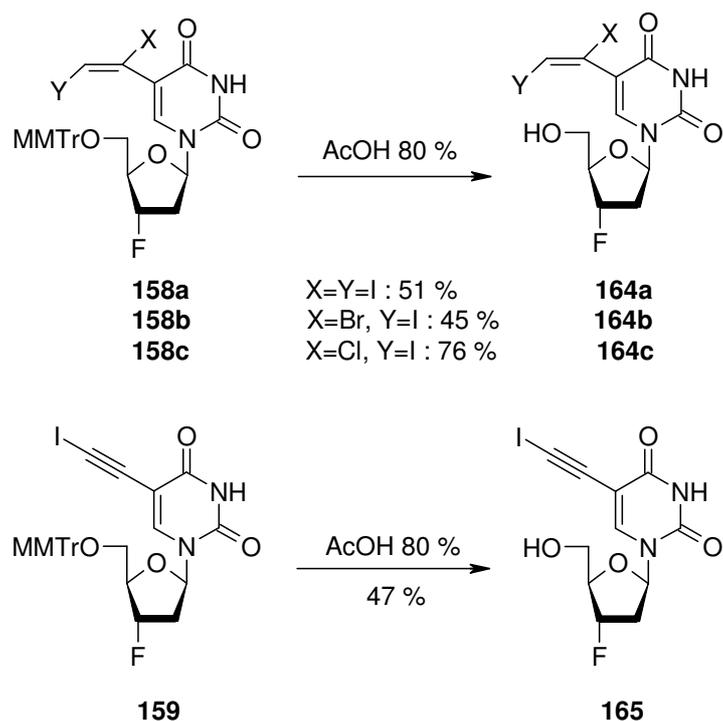


Schéma 47 : Obtention des molécules finales en série 2',3'-didéoxy-3'-fluoro-ribofuranosyle.

L'application de cette méthode aux dérivés 3'-azido **162a-c** et **163** conduit respectivement aux dérivés déprotégés **166a-c** et **167** (Schéma 48), avec des rendements corrects (53-78 %). Le rendement moyen de cette étape est du la formation de produits secondaires.

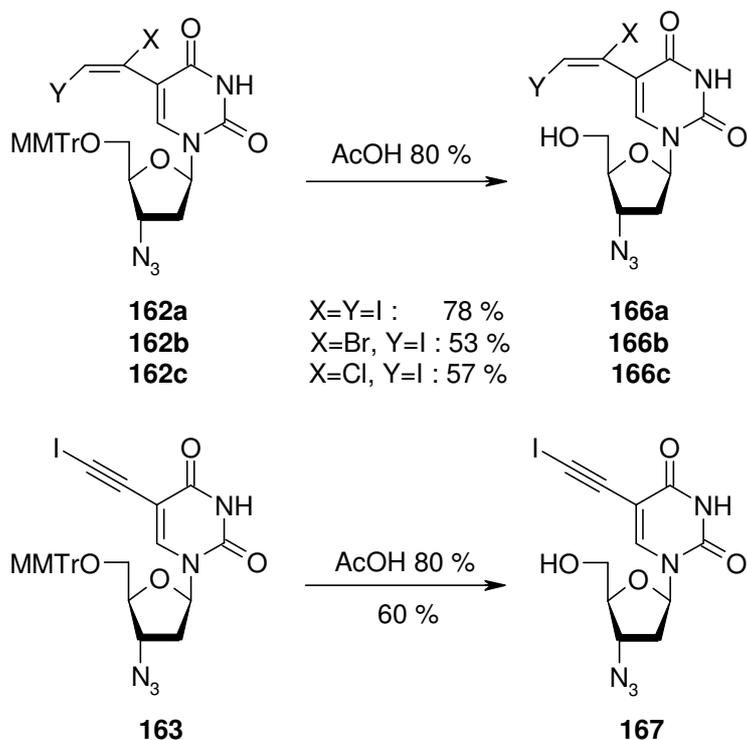


Schéma 48 : Obtention des molécules finales en série 3'-azido-2',3'-didéoxy-ribofuranosyle.

IV.3. Evaluation biologique des dérivés 3'-azido et 3'-fluoro.

IV.3.1. Evaluation biologique

Tous les composés synthétisés, et l'AZT **38** pour référence, ont été testés pour leurs activités anti-VIH *in vitro*, et les résultats sont rassemblés dans le tableau 17. Des cellules humaines PBM ont été employées pour analyser leur capacité à inhiber le VIH-1.

	Composé #	Activité Anti-VIH			Cytotoxicité (CC ₅₀)		
		EC ₅₀	EC ₉₀	SI	PBM	CEM	VERO
	AZT 38	0.016		> 6250	> 100	14.0	29.0
Série 3'-fluoro	164a I ₂	3.1	15.4	13.8	43.0	> 100	82.7
	164b IBr	0.55	16.3	48.7	26.8	31.6	29.5
	164c ICl	4.9	26.1	3.8	18.4	33.1	18.5
	165 I	6.9	20.0	3.7	25.6	15.1	22.9
Série 3'-azido	166a I ₂	3.4	18.9	5.4	18.6	30.7	52.3
	166b IBr	1.1	4.7	23.8	26.2	30.6	27.7
	166c ICl	2.7	16.4	8.8	23.8	48.1	9.0
	167 I	2.3	10.8	8.6	19.7	31.6	14.4
Série 3'-OH (rappel)	139a I ₂	10.3	39.1	1.4	14.7	19.5	19.5
	140a IBr	0.9	6.9	14.8	13.3	0.13	6.6
	141a ICl	2.6	20.3	1.2	3.2	14.8	1.4
	137a I	9.2	34.8	< 1	7.5	15.8	> 100

Tableau 17 : Évaluation de l'activité antivirale contre le VIH-1 en cellules PBM et de la cytotoxicité contre les cellules PBM, CEM et VERO *in vitro*. Les résultats sont exprimés en µM. La toxicité est donnée par la CC₅₀ et l'activité par l'EC₅₀.

IV.3.2. Discussion

Globalement, l'activité des nouveaux composés est maintenue voire légèrement améliorée par rapport aux dérivés de la série 2'-déoxyribosyle. Malheureusement, elle s'accompagne d'une toxicité du même ordre de grandeur. Il est possible de se demander si l'activité ne viendrait pas de la toxicité. La modification structurale effectuée sur les nucléosides en position 3' n'a donc pas induit comme nous le souhaitons une meilleure sélectivité de ces composés pour les enzymes virales par rapport aux enzymes cellulaires.

D'autres tests sont actuellement en cours pour évaluer l'activité de ces composés sur l'inhibition de la réplication du VHC dans un système réplicon. Si ces composés sont actifs, d'autres tests complémentaires seront effectués pour savoir si ces composés sont substrats de la protéase NS3, afin de vérifier l'hypothèse postulée lors de la conception de ces composés.

IV.4. Conclusion

En conclusion, la synthèse de dérivés 5-haloéthynyl- ou 5-(1,2-dihalo)vinylluracile a été réalisée en série 2',3'-didéoxy-3'-fluoro- et 3'-azido-2',3'-didéoxyribofuranosyle. Il paraissait intéressant de considérer ces composés comme pouvant posséder une meilleure activité que leurs analogues de la série 2'-déoxyribosyle. Malheureusement, les évaluations biologiques n'ont pas donné les résultats espérés.

Afin d'améliorer la spécificité des ces composés pour les enzymes virales (par rapport aux enzymes cellulaires), il paraissait judicieux d'effectuer la synthèse de ses dérivés 5-haloéthynyl- ou 5-(1,2-dihalo)vinyluracile en série 2',3'-didéoxyribofuranosyle. Ce travail de synthèse fait l'objet de la partie suivante.

V. Nouveaux dérivés en série 2',3'-didéoxyribosyle

V.1. Introduction

En chimiothérapie antivirale, les terminateurs de chaînes connus ciblent la polymérase de l'ADN viral (dans le cas du VHS par exemple) ou la transcriptase inverse (dans le cas du VHB ou du VIH) : ils appartiennent à la famille des composés 2',3'-didéoxy. En complément des séries 3'-fluoro et 3'-azido, il nous a paru intéressant de synthétiser les dérivés portant une triple liaison mono-halogénée ou une double liaison di-halogénée en position 5 de l'uracile, en série 2',3'-didéoxy (Figure 55). Les dérivés des séries 3'-fluoro- et 3'-azido- se sont révélés très toxiques, d'où la synthèse de ces nouveaux analogues.

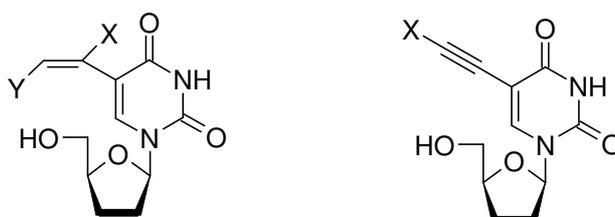
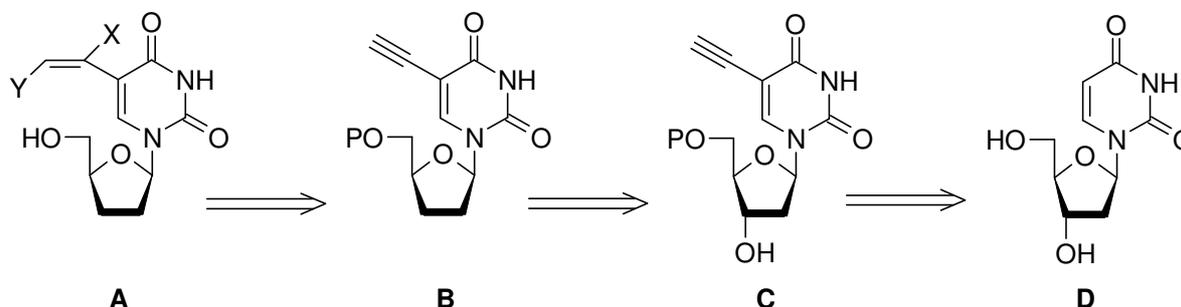


Figure 55 : Formule chimique des nouveaux analogues de nucléosides à synthétiser.

Ces nouveaux analogues de nucléoside pourraient également viser la NS3 NTPase du VHC, enzyme qui intervient dans la réplication du virus. Une meilleure sélectivité pourraient faire de ces nouvelles molécules des terminateurs de chaînes spécifiques de l'ARN viral, ce qui leur permettrait d'agir sur 2 étapes de la réplication du VHC et laisse espérer une certaine activité sur la réplication de ce virus.

Une première rétrosynthèse envisagée pour ce type de composés pourrait être la suivante :



X, Y=halogène

Schéma 49 : Schéma de rétrosynthèse.

Le schéma de rétrosynthèse (Schéma 49) est identique aux deux séries précédentes. La molécule A est obtenue par di-halogénéation (resp. monohalogénéation) s'effectue en dernier

(suivie d'une déprotection) de **B** qui porte un motif 5-éthynyluracile, et une modification en position 3'. Cette modification en 3' s'effectue à partir **C** (du dérivé 3'-OH) qui porte le motif 5-éthynyluracile, ce motif est obtenu *via* l'étape de couplage de Sonogashira, effectuée à partir du dérivé 5-iodouracile protégé en 5', facilement accessible à partir de la 2'déoxyuridine **D**.

V.2. Synthèse chimique

V.2.1. Synthèse du dérivé alcyne *via* une réaction de Sonogashira

Les premières étapes de la synthèse nous permettent d'accéder au composé clef **148**, à partir duquel les séries 3'-fluoro et 3'-azido ont déjà été obtenues. La formation du xanthate **168** s'effectue dans la pyridine à t.a. en présence du composé **148** et de chlorure de phénoxythiocarbonyle pour donner le composé **168** (71 %). Le composé **169** de la famille 2',3'-didéoxy est obtenu par réaction de Barton-McCombie (Schéma 50), à partir d'une solution du xanthate **168** dans le toluène (préalablement dégazé) à reflux en présence d'un initiateur de radicaux (AIBN) et d'un réducteur (Bu_3SnH). Malheureusement, la triple liaison est la cause de la formation de nombreux produits secondaires qui entraîne un rendement médiocre (< 15 %) de la réaction (ces produits secondaires n'apparaissent plus en l'absence de la triple liaison comme nous le verrons un peu plus loin).

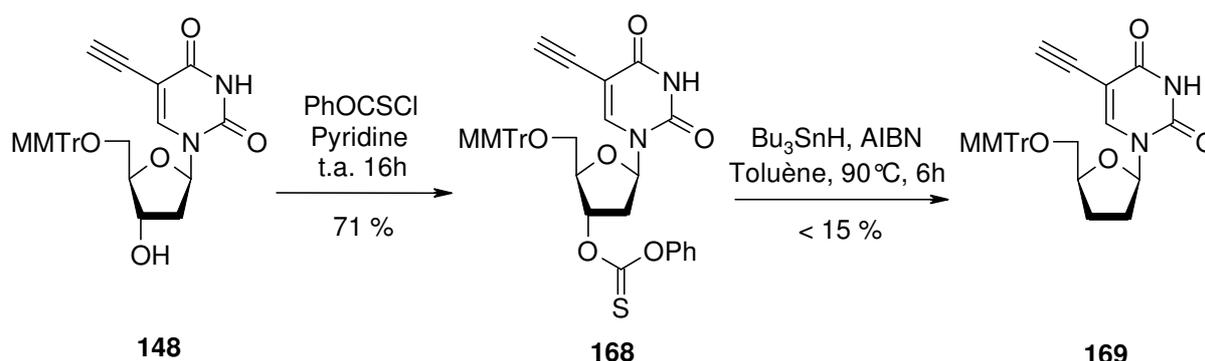


Schéma 50 : Obtention de l'intermédiaire **169**.

Devant ce constat, nous avons décidé de concevoir une rétrosynthèse plus appropriée (Schéma 51) : la différence majeure est le changement de place de la réaction de Barton McCombie, qui se fait désormais avant les réactions permettant l'introduction du groupement 5-éthynyle en position 5 de l'uracile.

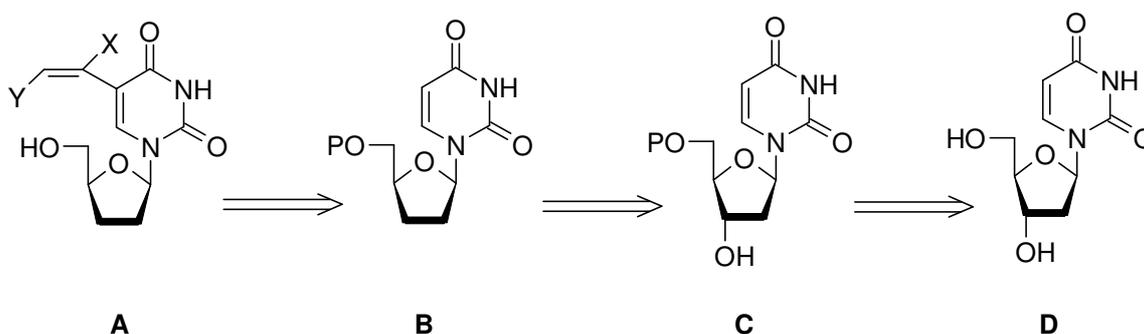


Schéma 51 : Nouvelle rétrosynthèse.

La première étape de la synthèse nous permet d'accéder au composé **145**. Puis, dans une solution de pyridine à t.a., le composé **145** est mis en présence de chlorure de phénoxythiocarbonyle pour donner le composé **170**, avec un bon rendement de 74 % (Schéma 52).

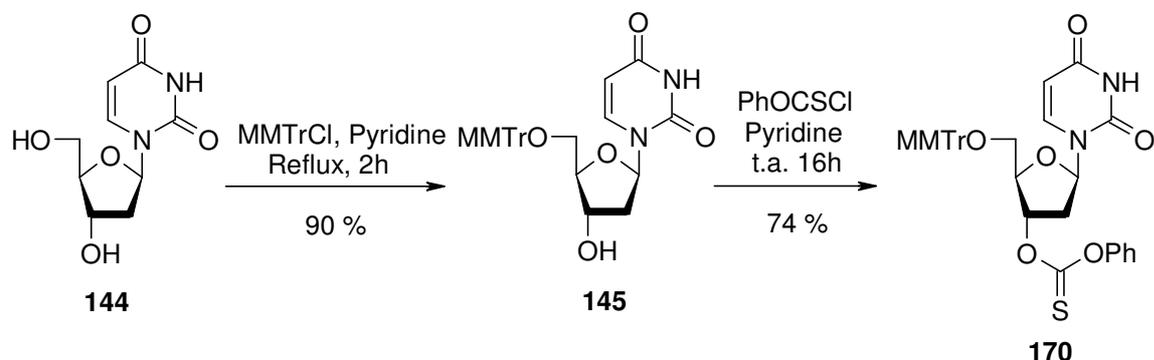


Schéma 52 : Obtention de l'intermédiaire **170**.

Le composé **171** de la famille 2',3'-didéoxy est obtenu par réaction de Barton-McCombie (Schéma 53), à partir d'une solution du xanthate **170** dans le toluène (préalablement dégazé) à reflux en présence d'un initiateur de radicaux (AIBN) et d'un réducteur: alors que le Bu_3SnH ne nous permet pas l'obtention du composé désiré avec un rendement satisfaisant (absence de produit secondaire mais il reste du produit de départ au bout de 6h dans des proportions majoritaires, la cinétique de la réaction est plutôt lente), le remplacement du Bu_3SnH par le TTMSSH permet d'obtenir le dérivé **171** de la famille 2',3'-didéoxy avec un rendement convenable de 55% en 6h.

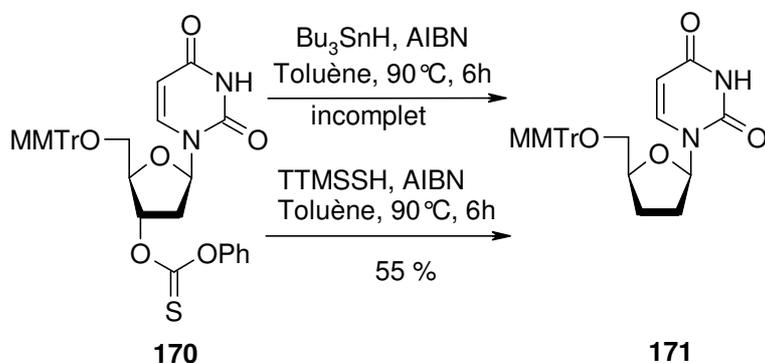
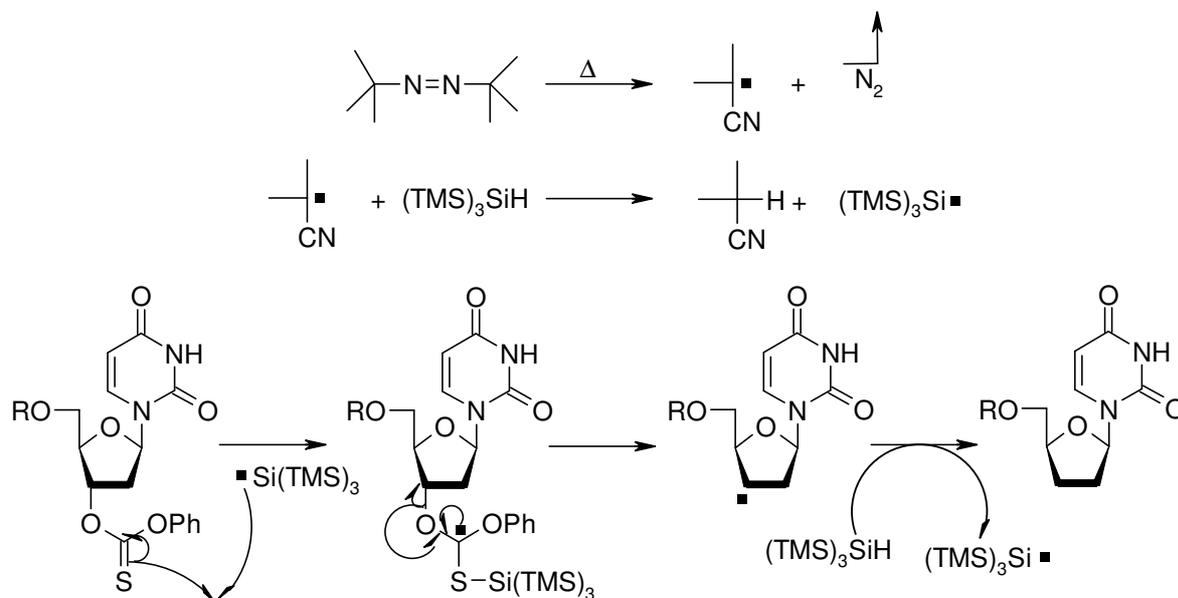


Schéma 53 : Obtention de l'intermédiaire **171**.

Le mécanisme radicalaire de la réaction (Schéma 54) est le suivant :



R = MMTr ou TBDMS

Schéma 54 : Mécanisme de la réaction de Barton McCombie.

L'iodation de **171** n'a pas pu être possible en utilisant les conditions exposées lors des 2 parties précédentes (Schéma 55), et cela pour 2 raisons majeures. La première est la fragilité de la liaison *N*-glycosidique classique en chimie des nucléosides lorsque le sucre appartient à la série 2',3'-dideoxyribosyle. La seconde pourrait être une fragilité due au groupement MMTr. Dans les 2 cas, l'utilisation du CAN peut être mise en cause pour son acidité, il est donc préférable de trouver une méthode d'iodation plus adaptée à notre substrat.

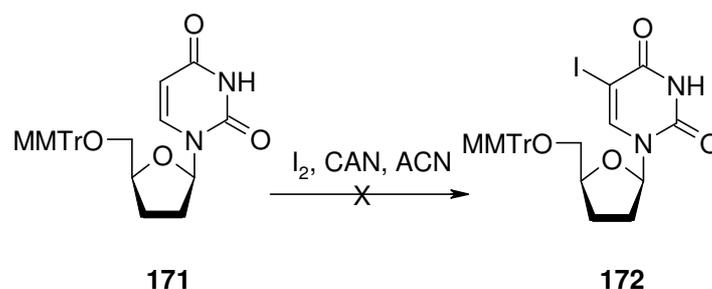


Schéma 55 : Tentative d'iodation.

Nous avons également préféré pour plus de sécurité remplacer l'agent d'iodation et le groupement protecteur du 5'-OH, le MMTr, par un dérivé silylé (TBDMS). Ce dernier présente l'avantage de se cliver simultanément avec le TMS porté par la triple liaison lors de la désilylation ultérieure au TBAF (Schéma 56), ce qui n'était pas souhaité pour les deux séries précédentes (F et N₃) puisque nous avons besoin d'effectuer des modifications ultérieures en position 3' avec l'hydroxyle protégé sélectivement en 5'.

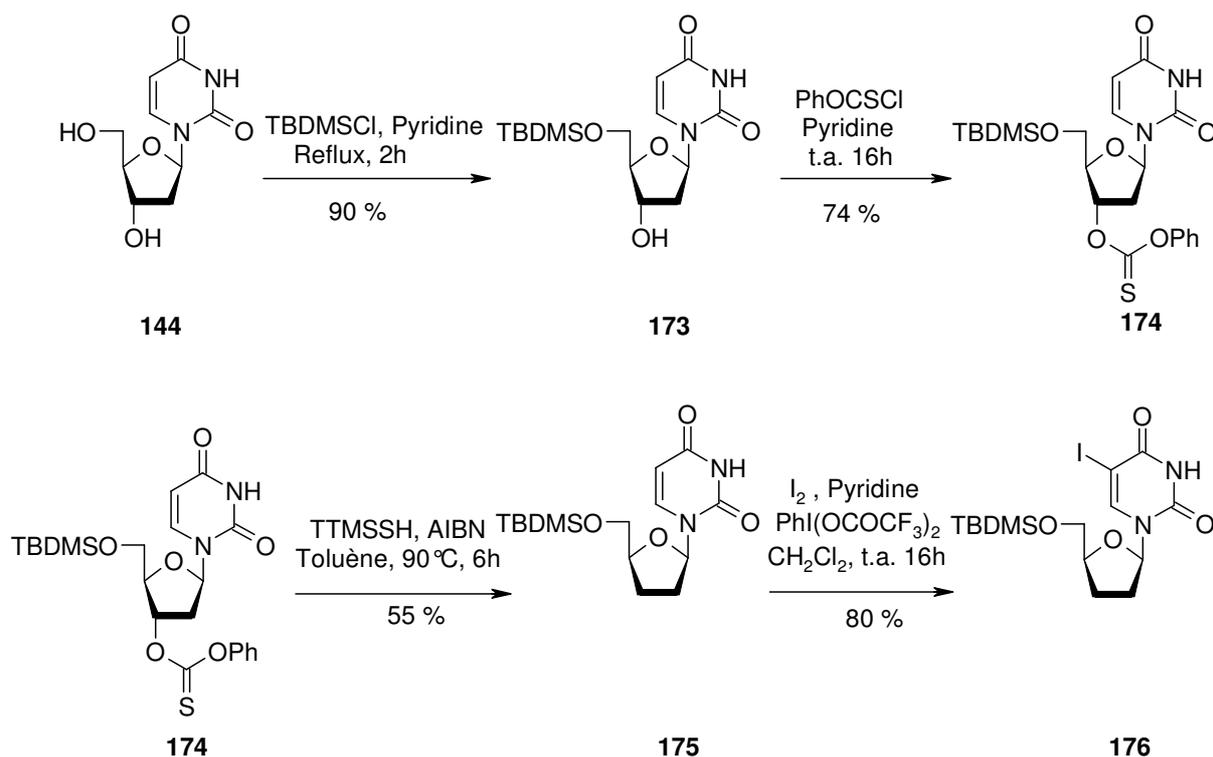


Schéma 56 : Obtention de l'intermédiaire **176**.

Ainsi, la synthèse s'établit comme suit : une solution de 2'-désoxyuridine dans la pyridine à reflux est mise en présence de TBDMSCl pour donner le composé désiré **173**, qui est engagé dans la pyridine en présence de chlorure de phénoxythiocarbonyle pour donner le composé **174** attendu, avec un bon rendement (74 %). La formation du nucléoside **175** s'effectue avec le protocole mis au point pour obtenir **171** : à une solution de **174** dans le toluène distillé et préalablement dégazé sont ajoutés l'AIBN et le TTMSSH pour donner **175** avec un rendement de 55 %. L'iodation de **175** s'effectue en présence d'iode et de $\text{PhI(OCOCF}_3)_2$, et de CH_2Cl_2 dans la pyridine à t.a. 16h : cette méthode²³⁰ permet de générer dans des conditions très douces, sans acidité ni chauffage, l'entité I^+ qui va réagir pour permettre la formation du composé 5-iodouracile **176** avec un excellent rendement, en comparaison avec la méthode au CAN (Schéma 56).

Le composé **177** est obtenu *via* un couplage de Sonogashira sur le composé **176**, dans les mêmes conditions opératoires que les séries précédentes : ainsi, la réaction du dérivé 5-iodouracile **176** avec le triméthylsilylacétylène en présence d' Et_3N , de CuI et de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ dans le DMF à température ambiante conduit à la molécule désirée **177** (80 %). En utilisant le TBAF dans l'ACN comme précédemment, nous avons constaté une désilylation sélective sur le carbone menant au composé **178**, qui placé dans une solution de TBAF dans le THF donne le composé initialement souhaité **179**. Néanmoins, il est possible d'obtenir **179** directement à partir de **177** : pour cela, une solution de **177** dans le THF en présence de TBAF fournit **179** avec un très bon rendement (Schéma 57).

²³⁰ Benhida, R.; Blanchard, P.; Fourrey, J.-L. A mild and effective iodination method using iodine in the presence of Bis-(trifluoroacetoxy)iodobenzene. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6849-6852.

Nous disposons à présent de l'intermédiaire clef **179** pour effectuer les différentes réactions d'halogénéation. Il est à noter que la stratégie de synthèse mise au point pour élaborer ce composé a été pensée pour accéder au composé clef (qui subira les réactions d'halogénéation) présentant son groupement hydroxyle libre en 5', ce qui nous dispense d'une déprotection supplémentaire après chaque halogénéation, ce qui augmentera le rendement global d'obtention de ces composés originaux. De plus, si nous avons gardé le groupement MMTr, la déprotection aurait sûrement été très difficile, car s'effectuant en milieu acide, elle aurait pu certainement engendrer la rupture de la liaison *N*-glycosidique.

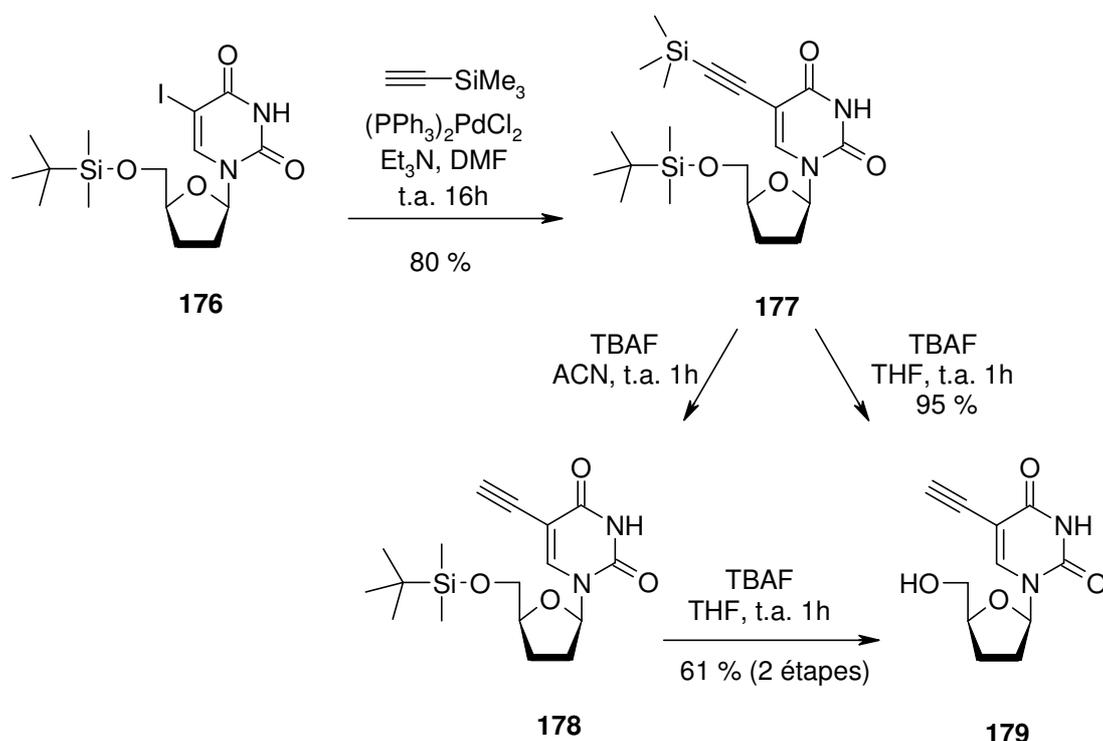


Schéma 57 : Obtention de l'intermédiaire clef **179**.

V.2.2. Etape clef d'halogénéation d'une triple liaison

Pour la dihalogénéation (Schéma 58), plusieurs réactifs (c.-à-d. I_2 , IBr , Br_2 ou ICl) ont été employés pour obtenir les dérivés nucléosidiques dihalogénés correspondants, à $0^\circ C$ en présence de $NaHCO_3$. Dans tous les cas de dihalogénéation, la formation des dérivés 5-(1,2-dihalo)vinyluracile (**180a-d**) s'est produite avec une haute stéréosélectivité *anti* et une unique régiosélectivité et un excellent rendement. Aucun produit secondaire n'a été observé, mais la réaction doit s'effectuer en 5min seulement à $0^\circ C$ en présence de $NaHCO_3$, la variation de l'un de ces paramètres entraîne l'accompagnement de la di-halogénéation de la liaison triple par le clivage de la base, observable par ccm et confirmée par RMN.

La mono-halogénéation du dérivé **179**, en présence d'IDCP a été réalisée dans le CH_3CN anhydre à $0^\circ C$ et s'est montrée très difficile (Schéma 58). Après optimisation, le nucléoside 5-iodoéthynyluracile **181** n'a pu être obtenu qu'avec un rendement très faible de 13 % (Schéma 58). Ce rendement s'explique par deux phénomènes : la formation d'un produit secondaire de Rf très voisin à celui souhaité, qui n'a jamais pu être isolé seul pour une caractérisation ; et le clivage très rapide de la liaison osidique dans les conditions de mono-

halogénéation. Des tentatives de mono-halogénéation ont été effectuées, mais elles ont été accompagnées systématiquement du clivage de la liaison osidique.

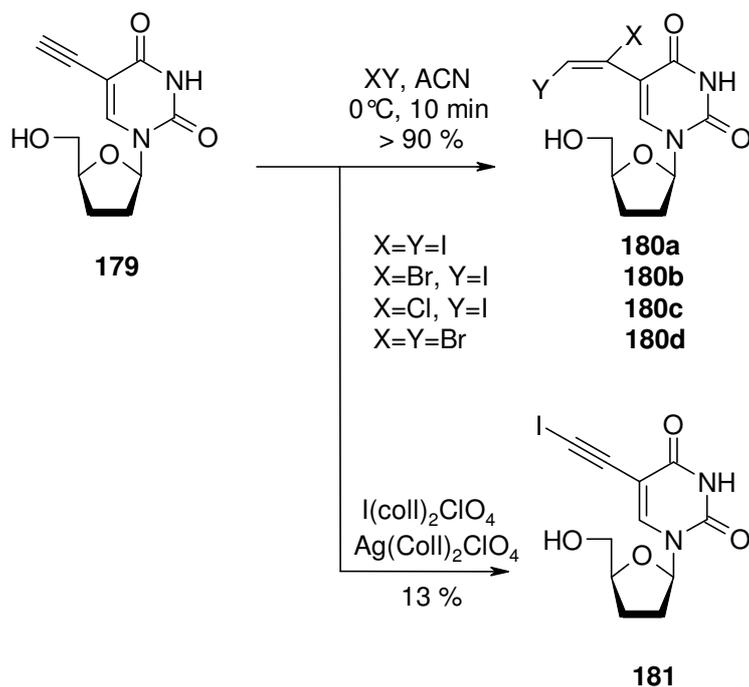


Schéma 58 : Obtention des dérivés **180a-d** et **181**.

V.3. Evaluation biologique

V.3.1. Evaluation anti-VIH-1

Tous les nucléosides 5-dihalovinyluraciles synthétisés (**180a-d**), et l'AZT comme référence, ont été testés pour leurs activités anti-VIH *in vitro*, et les résultats sont rassemblés dans le tableau 18. Des cellules humaines PBM ont été employées pour analyser leur capacité d'inhiber le VIH-1.

	Composé #	Activité Anti-VIH			Cytotoxicité (CC ₅₀)		
		EC ₅₀	EC ₉₀	SI	PBM	CEM	VERO
	AZT 38	0.016		> 6250	> 100	14.0	29.0
Série 2',3'- didésoxy	181 I	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	180a I₂	32.9	82.2	> 3.0	> 100	31.6	> 100
	180b IBr	31.2	60.7	1.6	50.9	20.1	> 100
	180c ICl	29.0	57.6	0.8	22.0	26.9	67.0
	180d Br₂	20.1	73.2	1.6	32.9	36.7	79.7
Série 3'-OH (rappel)	137a I	9.2	34.8	< 1	7.5	15.8	> 100
	139a I₂	10.3	39.1	1.4	14.7	19.5	19.5
	140a IBr	0.9	6.9	14.8	13.3	0.13	6.6
	141a ICl	2.6	20.3	1.2	3.2	14.8	1.4
	142a Br₂	43.2	86.9	> 2.3	> 100	43.9	> 100

Tableau 18 : Évaluation de l'activité antivirale contre le VIH-1 en cellules PBM et de la cytotoxicité contre les cellules PBM, CEM et VERO *in vitro*. Les résultats sont exprimés en μM . La toxicité est donnée par la CC₅₀ et l'activité par l'EC₅₀.

V.3.2. Discussion

Globalement, l'activité des nouveaux composés a légèrement diminuée par rapport aux dérivés de la série 2'-déoxyribosyle. La toxicité est elle aussi moins importante, mais reste du même ordre de grandeur. La modification structurale effectuée sur les nucléosides en position 3' ne montrent ici aucun intérêt en terme d'activité biologique sur l'inhibition du VIH-1.

D'autres tests sont actuellement en cours pour évaluer l'activité de ces composés sur l'inhibition de la réplication du VHC dans un système réplicon. En cas d'activité biologique digne d'intérêt, d'autres tests complémentaires pourront être effectués sur la protéase NS3, afin de vérifier si ces molécules sont substrats de cette enzyme, et ainsi valider l'hypothèse postulée lors de la conception de ces composés.

IV.4. Conclusion

En conclusion, la synthèse de dérivés 5-haloéthynyl- ou 5-(1,2-dihalo)vinyluracile a été effectuée en série 2',3'-didéoxyribosyle. Il paraissait intéressant de considérer ces composés comme pouvant posséder une meilleure activité que leurs analogues de la série 2'-déoxyribosyle. Malheureusement, les évaluations biologiques n'ont pas donné les résultats espérés.

Chapitre III

Synthèse et évaluation biologique de nouveaux dérivés triazoliques de (±)-carbonucléosides

I. Introduction et travaux préliminaires

Un nucléoside carbocyclique est un analogue de nucléoside naturel, dans lequel l'atome d'oxygène du furanose est remplacé par un groupement méthylène. En conséquence, la liaison *N*-glycosidique est résistante aux enzymes spécifiques de nucléosides du type hydrolases et phosphorylases, ce qui rend le nucléoside carbocyclique plus résistant à la dégradation métabolique.²³¹ Il est intéressant de noter que dans certains cas, la substitution d'un sucre par un carbocycle n'affecte pas la reconnaissance du nucléoside par les enzymes telles que les kinases ou les enzymes cibles. Grâce à cela, les nucléosides carbocycliques ont retenu l'attention en tant qu'agents potentiels utilisables en chimiothérapie (Figure 56),²³² tels l'Abacavir **184** ou l'Entecavir **185**.²³³

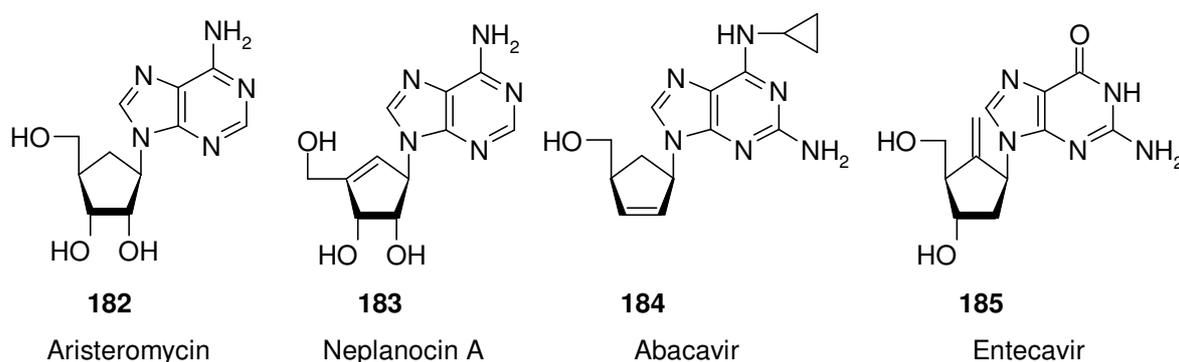


Figure 56 : nucléosides carbocycliques importants en chimiothérapie antivirale

L'importance pharmaceutique du nucléoside carbocyclique a incité la conception et la synthèse de beaucoup d'exemples de ce type de composés montrant une activité contre le VIH, le VHB ou les virus à herpès HSV-1 et HSV-2.²³⁴ Plus récemment, des nucléosides carbocycliques ont été reportés comme présentant des activités antivirales contre des virus orthopox (dont la variole),²³⁵ ou le West Nile virus.²³⁶ Ce dernier faisant partie de la famille *Flaviviridae* comme l'hépatite C, et servant également de modèle pour des tests d'inhibition de la réplication de ce virus,⁵⁷ il paraît intéressant de considérer les carbocycles comme des agents potentiels anti-VHC.

²³¹ Crimmins, M.T. New development in the enantioselective synthesis of cyclopentyl carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9229-9272.

²³² (a) Zhu, X. The latest progress in the synthesis of carbocyclic nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acid* **2000**, *19*, 651-690. (b) Agrofoglio, L. A.; Suhas, E.; Farese, A.; Condom, R.; Challand, S. R.; Earl, R. A.; Guedj, R. Synthesis of carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10611-10670. (c) Borthwick, A.D.; Biggadike, K.; Synthesis of chiral carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 571-623. (d) Ferrero, E.; Gotor, V.; Biocatalytic selective modifications of conventional nucleosides, carbocyclic nucleosides, and C-nucleosides. *Chem. Rev.* **2000**, *1000*, 4319-4347

²³³ Marquez, V.V.; Lim, L.-I. Carbocyclic nucleosides. *Med. Res. Rev.* **1986**, 6-40.

²³⁴ Agrofoglio, L.A.; Challand, S.R. in *Acyclic, Carbocyclic and L-Nucleosides*; Kluwer Academic: Dordrecht, 1998; p 174.

²³⁵ Chu, C.K.; Jin, Y.H.; Baker, R.O.; Huggins, J. Antiviral activity of cyclopentenyl nucleosides against orthopox viruses (Smallpox, monkeypox and cowpox). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 9-12.

²³⁶ Song, G.Y.; Paul, V.; Choo, H.; Morrey, J.; Sidwell, R.W.; Schinazi, R.F.; Chu, C.K. Enantiomeric synthesis of D- and L-cyclopentenyl nucleosides and their antiviral activities against HIV and West Nile virus. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3958-3993.

Comme nous l'avons vu au cours du chapitre I, il n'existe qu'un seul traitement contre le VHC. Il s'agit d'une thérapie combinée d'interféron α et de ribavirine (**26**), un analogue de nucléoside naturel comportant un hétérocycle triazole 1,3,5. Des analogues de ce nucléoside ont été synthétisés au sein du laboratoire, de nature carbocyclique et comportant un hétérocycle de type triazole 1,2,3 (Figure 57).²³⁷

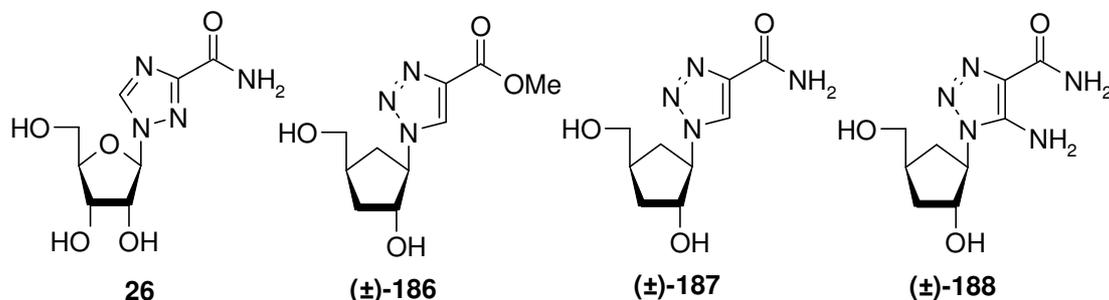


Figure 57 : Ribavirine **26** et ces analogues carbocycliques **186-188** portant un hétérocycle de type triazole

Nous avons choisi d'introduire un tel hétérocycle en raison de l'attention qu'a suscitée cette structure depuis de nombreuses années en terme d'activité biologique²³⁸: certaines molécules possédant ce motif ont en effet montré des activités antivirales,²³⁹ antitumorales,²⁴⁰ antimicrobiennes²⁴¹ ou anti-prolifératives.²⁴²

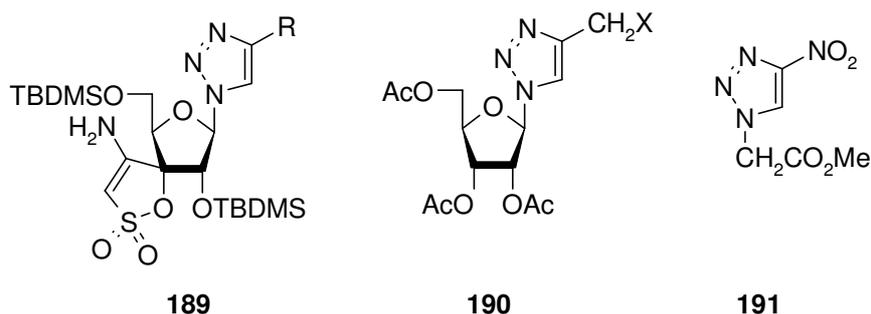


Figure 58 : Structures chimiques de triazoles bioactifs.

²³⁷ Saito, Y.; Escuret, V.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Schinazi, R. F.; Agrofoglio, L. A. Synthesis of 1,2,3-Triazolo-carbanucleoside Analogues of Ribavirin Targeting an HCV in Replicon. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3633-3639.

²³⁸ Fan, W.-Q.; Katritzky, A. R. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, Vol. 4; Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Scriven, C. W. V., Eds.; Elsevier Science: Oxford, **1996**, 1-126.

²³⁹ (a) Velaquez, S.; Alvarez, R.; Perez, C.; Gago, F.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M.-J. Regiospecific synthesis and anti-human immunodeficiency virus activity of novel 5-substituted N-alkylcarbamoyl and N,N-dialkyl carbamoyl 1,2,3-triazole-TSAO analogs. *Antivir. Chem. Chemother.* **1998**, *9*, 481-489. (b) Yokoyama, M.; Nakao, E.; Sujino, K.; Watanabe, S.; Togo, H. Synthesis and antiviral activity of 1,2,3-triazole and 8-azapurine derivatives bearing acyclic sugars. *Heterocycles* **1990**, *31*, 1669-1685.

²⁴⁰ Revues sur les 1,2,3-triazoles: (a) Dehne, H. In *Methoden der Organischen Chemie*; Schumann, E., Ed.; Thieme: Stuttgart, 1994, Vol. 8, p 305 (b) Wamho., H. in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Katritzky, A. R.; Rees, C. W., Eds.; Pergamon: Oxford, 1984; Vol. 5, p 669. (c) Abu-Orabi, S. T.; Atfah, M. A.; Jibril, I.; Mari'I, F. M.; Ali, A. A.-S. Dipolar cycloaddition reactions of organic azides with some acetylenic compounds. *J. Heterocyclic Chem.* **1989**, *26*, 1461.

²⁴¹ Chen, M.D.; Lu, S.J.; Yuag, G.P.; Yang, S.Y.; Du, X.L. *Heterocyclic Comm.* **2000**, *6*, 421-426.

²⁴² S. Manfredini, S.; Vicentini, C.B.; Manfrini, M.; Bianchi, N.; Rutigliano, C.; C. Mischiati, C.; Gambari, R. Pyrazolo-triazoles as light activable DNA cleaving agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2343-2346.

Par exemple, **189** a montré une activité anti-VIH,²⁴³ tandis que **190** possède une activité cytostatique.²⁴⁴ **191** quant à lui est un radio-sensibilisateur²⁴⁵ (Figure 58).

Malheureusement, de tous les composés synthétisés au laboratoire (**186-188**), aucun n'a montré un pouvoir d'inhibition de la réplication du VHC supérieur à celui de la ribavirine dans le système réplicon (cellules Huh-7). De plus un seul d'entre eux (**188**) a montré un pouvoir d'inhibition (EC₅₀) modéré contre le VIH-1 dans les cellules PBM de l'ordre du micromolaire (43,8 µM) sans aucune cytotoxicité vis-à-vis des cellules PBM, CEM, VERO et Huh-7.

Ce manque d'activité peut avoir plusieurs origines. La première serait que ces analogues de nucléosides sont trop polaires pour rentrer dans la cellule. La seconde hypothèse serait une absence de reconnaissance par les kinases. N'étant pas phosphorylés, les nucléosides ne pourraient pas atteindre leur forme active triphosphorylée. Ou alors, et c'est une autre possibilité, bien qu'ils soient triphosphorylés par les kinases, ils ne cibleraient pas la polymérase virale et ne pourraient donc pas viser la réplication du VHC. Plusieurs possibilités s'offrent à nous pour essayer de surmonter ces limitations.

Dans le cadre des travaux effectués au cours de cette thèse, nous avons concentré nos efforts sur les modifications structurales de cette famille de nucléosides, par l'introduction d'un alcyne portant une chaîne alkyle et/ou aryle en position 5, pour augmenter la lipophilie de la molécule. Nous conservons l'hétérocycle triazole pour ses propriétés chimiques et biologiques dignes d'intérêt, et nous conservons le carbocycle pour sa stabilité accrue par rapport au sucre furanose. Nous avons choisi de rester en série 3'-déoxyribofuranosyle dans le but de valoriser la synthèse du composé **188** issue du laboratoire (Schéma 59).

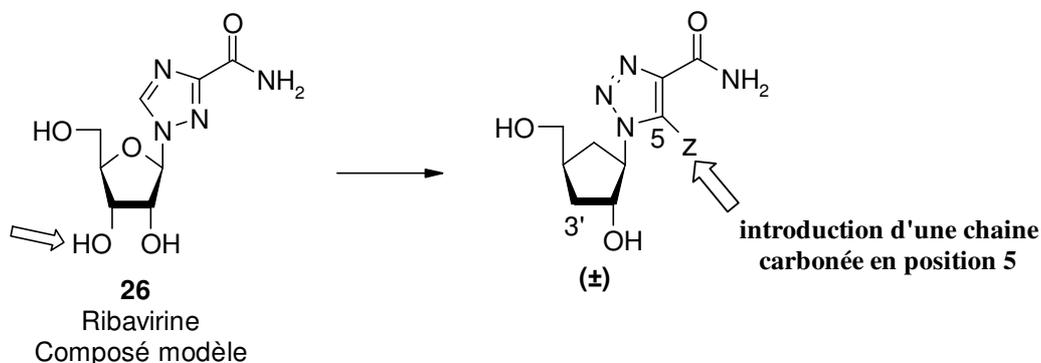


Schéma 59 : Nouveaux analogues à synthétiser.

²⁴³ (a) Alvarez, R.; Velazquez, S.; San-Felix, A.; Aquaro, S.; De Clercq, E. D.; Perno, C. F.; Karlsson, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. 1,2,3-Triazole-[2',5'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole 2'',2''-dioxide) (TSAO) analogues: synthesis and anti-HIV-1 activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4185-4194. (b) San-Felix, A.; Alvarez, R.; Velazquez, S.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. Synthesis and anti-HIV-1 activity of 4- and 5-substituted 1,2,3-triazole-TSAO derivatives. *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 595-598.

²⁴⁴ (a) Alonso, R.; Camarasa, M. J.; Alonso, G.; De las Heras, F. G. Alkylating nucleosides. 5. Synthesis and cytostatic activity of N-ribosyl-halomethyl-1,2,3 triazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **1980**, *15*, 105-109. (b) De la Heras, F.; Alonso, R.; Alonso, G.; Contreras, A.; Sanchez, R. Alkylating nucleosides 1. Synthesis and cytostatic activity of N-glycosyl(halomethyl)-1,2,3-triazoles. A new type of alkylating agent. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 496-501.

²⁴⁵ Kagitani, T.; Minagawa, M.; Nakahara, Y.; Kimura, R.; Tsubakimoto, T.; Oshiumi, R.; Sakano, K. 4-Nitro-1,2,3-triazole derivatives as radiosensitizers. JP 198762039525, 1987.

La rétrosynthèse envisagée pour ces composés est proposée dans le schéma 60.

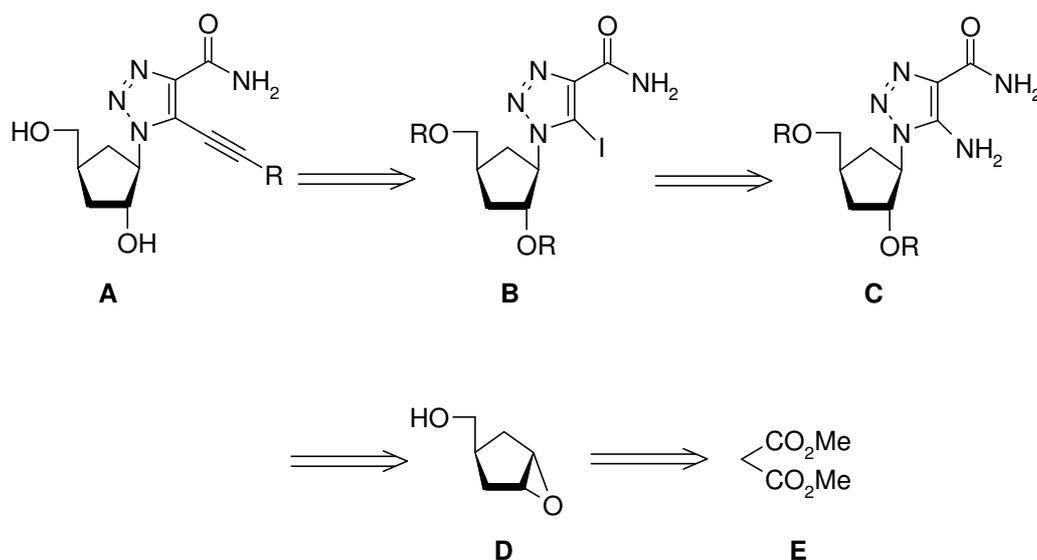


Schéma 60 : Rétrosynthèse envisagée pour l'obtention de nouveaux dérivés triazolo carbocycliques.

L'introduction de la chaîne carbonée pour obtenir le composé **A** se fait en dernier pour permettre une fonctionnalisation variée, *via* une réaction de couplage de Sonogashira catalysée au palladium sur le composé **B**, qui est obtenu par transformation d'une amine en iode sur **C**. L'hétérocycle du composé **C** est introduit *via* une ouverture de l'époxyde **D** et par construction *via* une cycloaddition 1,3-dipolaire. Enfin, l'époxyde **D** proviendrait lui-même d'une synthèse malonique à partir de **E**.

Pour réaliser cette série de molécules, nous avons dans un premier temps repris et optimisé la synthèse du dérivé **188**, intermédiaire pour l'obtention de nos nouveaux dérivés nucléosidiques. Ensuite nous avons modifié l'hétérocycle, par l'introduction d'un iode, dans le but d'effectuer un couplage pallado-catalysé avec diverses chaînes carbonées. Ce couplage a nécessité une longue mise au point pour aboutir à une méthodologie de spécifique au triazole. Finalement, nous avons appliqué deux types de déprotection pour obtenir deux séries de huit molécules chacune. Tous ces travaux font l'objet de ce chapitre.

II. Synthèse de dérivés 1,2,3-triazoles

II.1. Synthèse malonique de l'époxyde alcool

Le premier intermédiaire clef de la synthèse est l'époxyde alcool **198** obtenu par synthèse malonique en 6 étapes (Schéma 61).^{246,247} La première étape est une double substitution nucléophile du malonate de diméthyle **192** sur le 1,4-dichlorobut-2-ène dans le DMF en présence de LiH pour donner le cyclopentène diester **193** avec un rendement quantitatif. Ce diester est saponifié en présence de KOH dans un mélange EtOH / H₂O : 8/2

²⁴⁶ Spurlock, L.; Fayter, R. Nature of the carbonium ion. IX. 2-Oxa-6-norbornyl cation. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 2707-2711.

²⁴⁷ Feeya, D. Synthesis and solvolysis of syn- and anti-(6-oxabicyclo[3.1.0]hex-3-yl)methyl p-bromobenzenesulfonates. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3512-3519.

pour donner le diacide **194** (85 %), qui subit une décarboxylation par chauffage (71 %) pour donner l'acide **195**, purifié par distillation sous vide. Cet acide est estérifié par ajout de chlorure d'oxalyle (formation du chlorure d'acide) dans le dichlorométhane anhydre puis de méthanol, pour donner le composé **196** avec un excellent rendement (95 %). Les époxydes **197a** et **197b** sont formés par ajout de mCPBA sur **196** dans le dichlorométhane et obtenus dans un ratio après séparation par colonne chromatographique sur gel de silice dans un ratio 3/1 respectivement. L'époxyde trans **197a** qui nous intéresse peut être partiellement récupéré à partir de l'époxyde cis **197b**, par épimérisation dans une solution de NaOEt dans EtOH (on forme également l'ester éthylique par trans estérification, ce qui n'est pas gênant pour l'étape suivante). L'ester trans est ensuite réduit par LiAlH₄ dans le THF pour donner l'époxyde alcool **198** avec un rendement de 74 %. Cet étape a nécessité une optimisation : en effet, à -78°C, la réaction ne se fait pas (blocage cinétique). Nous avons aussi constaté, lors de plusieurs essais, qu'au-delà de -30°C des produits secondaires peuvent se former, résultant de l'attaque des ions hydrures sur l'époxyde. Les conditions optimales pour réaliser la réaction (meilleure cinétique et absence de produit secondaire) nécessitent une température de -60°C dans le THF fraîchement distillé. La neutralisation de l'excès de LiAlH₄ se fait aussi à -60°C.

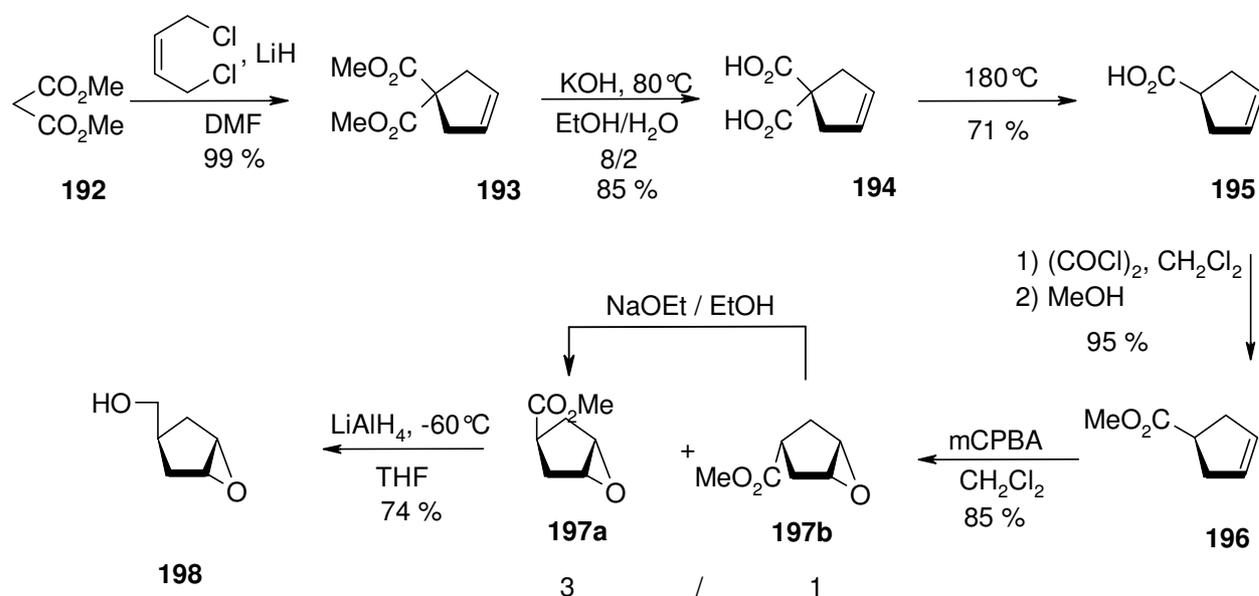


Schéma 61 : Obtention du premier intermédiaire clef: l'époxyde alcool **198**.

II.2. Synthèse de l'hétérocycle triazole *via* une cycloaddition 1,3-dipolaire

II.2.1 Synthèse du dérivé azido diol pour la réaction de cycloaddition

Le second (et le plus important) intermédiaire clef de la synthèse est le dérivé **200** obtenu en 4 étapes à partir de l'époxyde alcool **198**. Le dérivé azido **199** est obtenu *via* une ouverture de l'époxyde **198** par NaN₃ dans un mélange EtOH / H₂O : 8/2 à 80°C (Schéma 62).^{248,249} Ce dérivé azido **199** sera ensuite engagé dans une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire^{250,251} pour donner le dérivé triazolique **188**.

²⁴⁸ Hutchinson, A.; Grim, M.; Chen, J. A short and stereoselective synthesis of (±)-aristeromycin. *J. Heterocyclic Chem.* **1989**, 26, 451-452.

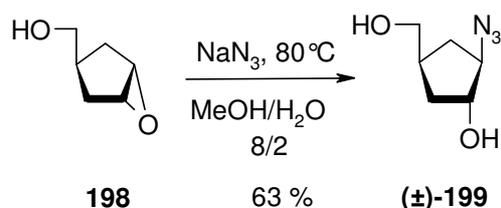


Schéma 62 : Obtention du dérivé 199.

II.2.2 Rappel bibliographique sur la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire

Les composés possédant un motif 1,2,3-triazoles sont utilisés pour leur valeur thérapeutique,²⁵² ou en tant qu'intermédiaires synthétiques dans la préparation de nombreux composés médicinaux,²⁵³ et trouvent de nombreuses applications dans la chimie industrielle.²⁵⁴

La cycloaddition 1,3-dipolaire, qui est une réaction de cycloaddition entre un dipôle 1,3 (azide) et un alcyne (ou un alcène) substitué pour former un cycle à 5 chaînons (Schéma 63), est la meilleure méthode pour la préparation de composés de type 1,2,3-triazoles,^{255,256} D'une part, l'introduction d'un groupement azido dans une molécule organique *via* une substitution nucléophile d'un halogénure ou l'ouverture d'un hétérocycle avec de l'azoture de sodium est aisée (NaN_3 est un excellent nucléophile de part sa petite taille).²⁵⁷ D'autre part, plusieurs partenaires de cycloaddition peuvent être utilisés pour produire une large variété d'hétérocycles. Rolf Huisgen²⁵⁸ a été le premier à entrevoir les perspectives offertes par cette

²⁴⁹ Depres, J.-P.; Greene, A. Improved selectivity in the preparation of some 1,1-difunctionalized 3-cyclopentenones. High yield synthesis of 3-cyclopentenecarboxylic acid. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 928-931.

²⁵⁰ Carruthers, W in *Cycloaddition Reactions in Organic Chemistry*; Pergamon: Oxford, **1990**, pp.269.

²⁵¹ Gothelf, K. V.; Jorgensen, K. A. Asymmetric 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 863-909.

²⁵² Sanghvi, Y. S.; Bhattacharya, B. K.; Kini, G. D.; Matsumoto, S. S.; Larson, S. B.; Jolley, W. B.; Robins, R.K.; Revankar, G.R. Growth inhibition and induction of cellular differentiation of human myeloid leukemia cells in culture by carbamoyl congeners of ribavirin. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 336-344.

²⁵³ Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128-1137.

²⁵⁴ (a) Peto, C.; Batta, G.; Gyorgydeak, Z.; Sztaricskai, F. Glycoside synthesis with anomeric 1-N-glycobiosyl-1,2,3-triazoles. *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*, 465-483. (b) Kume, M.; Kubota, T.; Kimura, Y.; Nakashimizu, H.; Motokawa, K.; Nakano, M. Orally active cephalosporins. II. Synthesis and structure-activity relationships of new 7 beta-[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-hydroxyiminoacetamido]-cephalosporins with 1,2,3-triazole in C-3 side chain. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 177-192. (c) Moltzen, E. K.; Pedersen, H.; Bogeso, K. P.; Meier, E.; Frederiksen, K.; Sanchez, C.; Lembol, H. L. Bioisosteres of arecoline: 1,2,3,6-tetrahydro-5-pyridyl-substituted and 3-piperidyl-substituted derivatives of tetrazoles and 1,2,3-triazoles. Synthesis and muscarinic activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4085-4099. (d) Norris, P.; Horton, D.; Levine, B. R. Cycloaddition of acetylenes with 5-azido-5-deoxy-D-aldopentose derivatives: synthesis of triazole reversed nucleoside analogs. *Heterocycles* **1996**, *43*, 2643-2656.

²⁵⁵ Bigge, C.F.; Bridges, A.J.; Casimiro-Garcia, A.; Fakhoury, S.A.; Lee, H.T.; Reed, J. E.; Schaum, R.P.; Schlosser, K.M.; Sexton, K.E.; Zhou, H. Preparation of azoles as oral antidiabetic agents. WO 2003018553, 2003.

²⁵⁶ Thompson, C.M.; Hergenrother, P.M. Aryl Ethynyl Terminated Imide Oligomers and Their Cured Polymers. *Macromolecules* **2002**, *35*, 5835-5839.

²⁵⁷ Scriven, E. F. V.; Turnbull, K. Azides: their preparation and synthetic uses. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 297-368.

²⁵⁸ (a) Huisgen, R. 1, 3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1963**, *75*, 742. (b) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions – Introduction, Survey, Mechanism. In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*. Padwa, A, Ed.; Wiley: New York, 1984, pp.1-176.

réaction et l'importance que prendrait cette réaction pour la synthèse organique en faisant varier le dipôle 1,3 lors de la mise au point de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen.

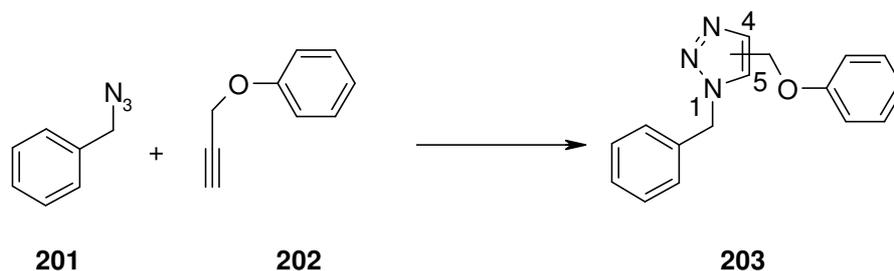


Schéma 63 : Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire.

Dans la réaction ci-dessus (Schéma 63), l'azoture **201** réagit d'une manière ordonnée avec l'alcyne **202** pour donner le triazole **203** sous forme d'un mélange d'un produit d'addition 1.4 et d'un produit d'addition 1.5 à 98°C en 18 heures. La régiosélectivité de la réaction peut être améliorée par ajout de cuivre.²⁵⁹

Les cycloadditions ont un temps de réaction plus faible lorsque l'acétylène porte un groupement électroattracteur, alors que leur présence sur l'azoture produit l'effet inverse. Plusieurs substituants activateurs portés sur l'acétylène ont été utilisés comme l'alkoxycarbonyl²⁶⁰ ou d'autres groupes électroattracteurs tels que les groupements carboxylique, acyle, cyano, arylique, haloalkyle, triméthylsilyle, phénylsulfonyl ou phosphonates fonctionnalisés.²⁶¹ Une fonctionnalisation sur l'acétylène joue un rôle important dans la cinétique des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire ; par exemple, alors que les réactions avec des substituants de type alkoxycarbonyl sont rapides et requièrent une basse température de réaction, les carbamoylacétylènes demandent des températures élevées et des temps de réaction de 24 h à une semaine.²⁶² La basse réactivité des carboxamides acétyléniques envers la cycloaddition 1,3-dipolaire avec des azotures s'est avérée être un problème pour l'accès aux 1,2,3-triazoles importants possédant un substituant de type carbamoyl. La préparation de ces composés a généralement impliqué l'utilisation d'esters,²⁶³

²⁵⁹ Huisgen, R. 1,3-Dipolar cycloadditions. *Angew. Chem.* **1963**, 75, 604-637.

²⁶⁰ (a) Benson, F. R.; Savell, W. L. The chemistry of the vicinal triazoles. *Chem. Rev.* **1950**, 1-68. (b) Boyer, J. H. In *Heterocyclic Compounds*; Elderfield, R. C., Ed.; Wiley: New York, 1961; Vol. 7, Chapter 5, pp 384. (c) Lwowski, W. In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*; Padwa, A., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1984; Vol. 1, pp 559.

²⁶¹ (a) Tamura, Y.; Chun, M. W.; Kwon, S.; Bayomi, S. M.; Okada, T.; Ikeda, M. Reaction of benzo[b]furan and 1-acylindoles with iodine azide. *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, 26, 3515-3520. (b) Abu-Orabi, S. T.; Atfah, M. A.; Jibril, I.; Mari'i, F. M.; Ali, A. A.-S. Dipolar cycloaddition reactions of organic azides with some acetylenic compounds. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, 26, 1461-1468. (c) Lalezari, I.; Gomez, L. A.; Khorshidi, M. Synthesis of 1-aryl-1,2,3-triazole-4,5-dimethanol-4,5-bis(isopropylcarbamates) as potential antineoplastic agents. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, 27, 687-689. (d) Gouault, N.; Cupif, J.-F.; Sauleau, A.; David, M. γ -Methyl-substituted- γ -butyrolactones: solid-phase synthesis employing a cyclisation-cleavage strategy. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 7293-7297.

²⁶² (a) Banert, K. Reactions of unsaturated azides. 5. Cycloaddition reactions of 2,3-diazido-1,3-butadienes. *Chem. Ber.* **1989**, 122, 123-128. (b) Wigerinck, P.; Aerschot, A. V.; Claes, P.; Balzarini, J.; Clercq, E. D.; Herdewijn, P. 3'-(1,2,3-Triazol-1-yl)-2',3'-dideoxythymidine and 3'-(1,2,3-triazol-1-yl)-2',3'-dideoxyuridine. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, 26, 1635-1645. (c) Häbich, D.; Barth, W. Synthesis of 3'-(1,2,3-triazol-1-yl)-3'-deoxythymidines. *Heterocycles* **1989**, 29, 2083-2088. (d) Palacios, F.; Ochoa de Retana, A. M.; Pagalday, J. Synthesis of diethyl 1,2,3-triazolealkylphosphonates through 1,3-dipolar cycloaddition of azides with acetylenes. *Heterocycles* **1994**, 38, 95-102.

²⁶³ Mearman, R. C.; Newall, C. E.; Tonge, A. P. Structure-activity relationships in 1,2,3-triazol-1-yl derivatives of clavulanic acid. *J. Antibiot.* **1984**, 37, 885-891.

d'acides ou d'imines²⁶⁴ de 1,2,3-triazoles comme intermédiaires facilement disponibles, suivie d'une transformation du groupement fonctionnel en amide.

La présence de substituants électroattracteurs sur l'acétylène facilite la cycloaddition 1,3-dipolaire avec des azotures organiques d'après le mécanisme et les énergies des interactions de HOMO-LUMO impliquées dans la formation de l'hétérocycle 1,2,3-triazole.^{265,266} L'alkoxycarbonyl a été le substituant d'alcyne le plus largement utilisé et les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire entre les esters acétyléniques et les azotures organiques se réalisent dans des conditions modérées (50-60°C) pour donner les triazoles correspondants avec de bons à d'excellents rendements.

En raison de la fiabilité et du caractère généralisable de la réaction de cycloaddition d'azide-alcyne pour produire des pharmacophores N-hétérocycliques, c'est tout naturellement que nous nous sommes intéressés à cette réaction pour obtenir de nouveaux dérivés nucléosidiques possédant un motif triazolique.

II.2.3 Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire

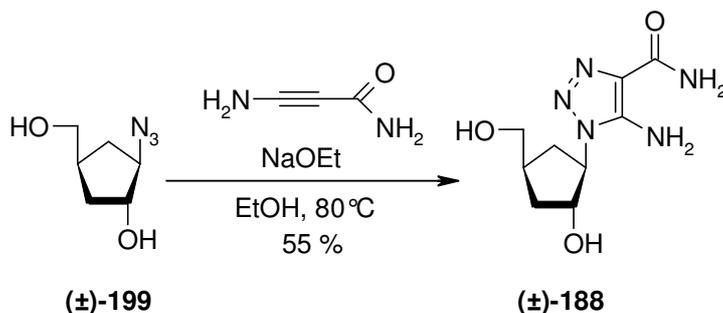


Schéma 64 : Obtention du triazole 188.

Pour effectuer la réaction de cycloaddition entre l'alcyne et le cyanoacétamide,²⁶⁷ nous avons dans un premier temps appliqué les conditions préalablement utilisées au laboratoire : l'azido **199** et le 2-cyanoacétamide en présence de K_2CO_3 sont chauffés dans le DMSO à 100°C pendant 24h. Mais la difficulté à éliminer entièrement le DMSO nous a obligés à trouver un protocole alternatif.²⁶⁸ Cette fois la cycloaddition a lieu dans l'EtOH, en présence de NaOEt (au lieu de K_2CO_3) à 80°C pendant 20h, toujours en présence de cyanoacétamide et

²⁶⁴ Makabe, O.; Suzuki, H.; Umezawa, S. Syntheses of D-arabinofuranosyl and 2'-deoxy-D-ribofuranosyl 1,2,3-triazolocarboxamides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 2689-2693.

²⁶⁵ Crow, W. D.; Leonard, N. J. A synthesis of 3-isothiazolones. *Tetrahedron Lett.* **1964**, 1477-1480.

²⁶⁶ Crow, W. D.; Leonard, N. J. 3-Isouthiazolone-cis-3-Thiocyanoacrylamide Equilibria. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2660-2665.

²⁶⁷ Dornow, A.; Gelberg, J. Syntheses of nitrogen-containing heterocycles. XXIV. Preparation and ortho-condensation of some 4,5-disubstituted 1,2,3-triazoles. *Chem. Ber.* **1960**, *63*, 2001-2010.

²⁶⁸ (a) Biagi, G.; Giorgi, I.; Livi, I.; Scartoni, V.; Velo, S. 1,2,3-Triazolodiazepines. I. Preparation and benzodiazepine receptor binding of 1-benzyl- and 1-phenethyl-1,2,3-triazolo[4,5-b][1,4]diazepines. *J. Heterocyclic Chem.* **1995**, *32*, 169-176. (b) Albert, A. Albert, Adrien. Dimroth rearrangement. XV. Catalysis by methylamine salts. Preparation of 7-methylamino- and 6,7-dihydro-7-imino-v-triazolo[4,5-d]pyrimidines via 4-[(ethoxymethylene)amino]-1,2,3-triazoles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1973**, 2659-2664. (c) Ewing, D. F.; Goethals, G.; Mackenzie, G.; Martin, P.; Ronco, G.; Vanbaelinghem, L.; Villa, P. Synthesis of selected aminodeoxy analogs of globotriosylceramide. *Carbohydrate Research* **1999**, 190-196.

du dérivé azido pour donner **188** (Schéma 64). Bien que n'étant pas catalysée au cuivre, cette cycloaddition 1,3-dipolaire est entièrement régiosélective et ne fournit qu'un seul isomère quel que soit l'alcyne engagé dans la réaction. La structure du dérivé triazolo **188** ainsi obtenu a été confirmée par une expérience de corrélation à longue distance ^1H - ^{13}C en RMN (gHMBC) pour le composé **186** (un analogue de **188**). Sur la figure 59, on observe la corrélation entre le proton H-1' et le carbone C-5 qui confirme la structure annoncée pour la molécule.

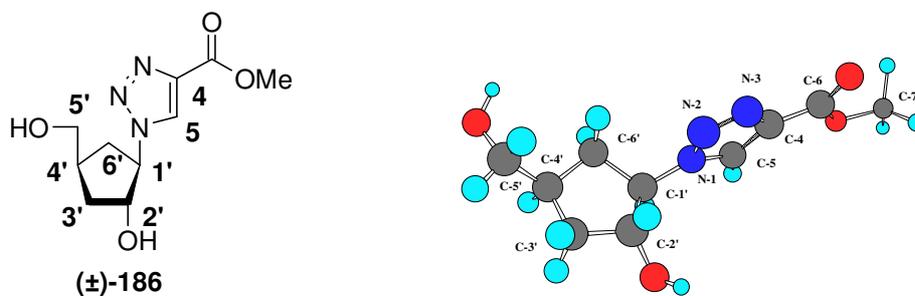
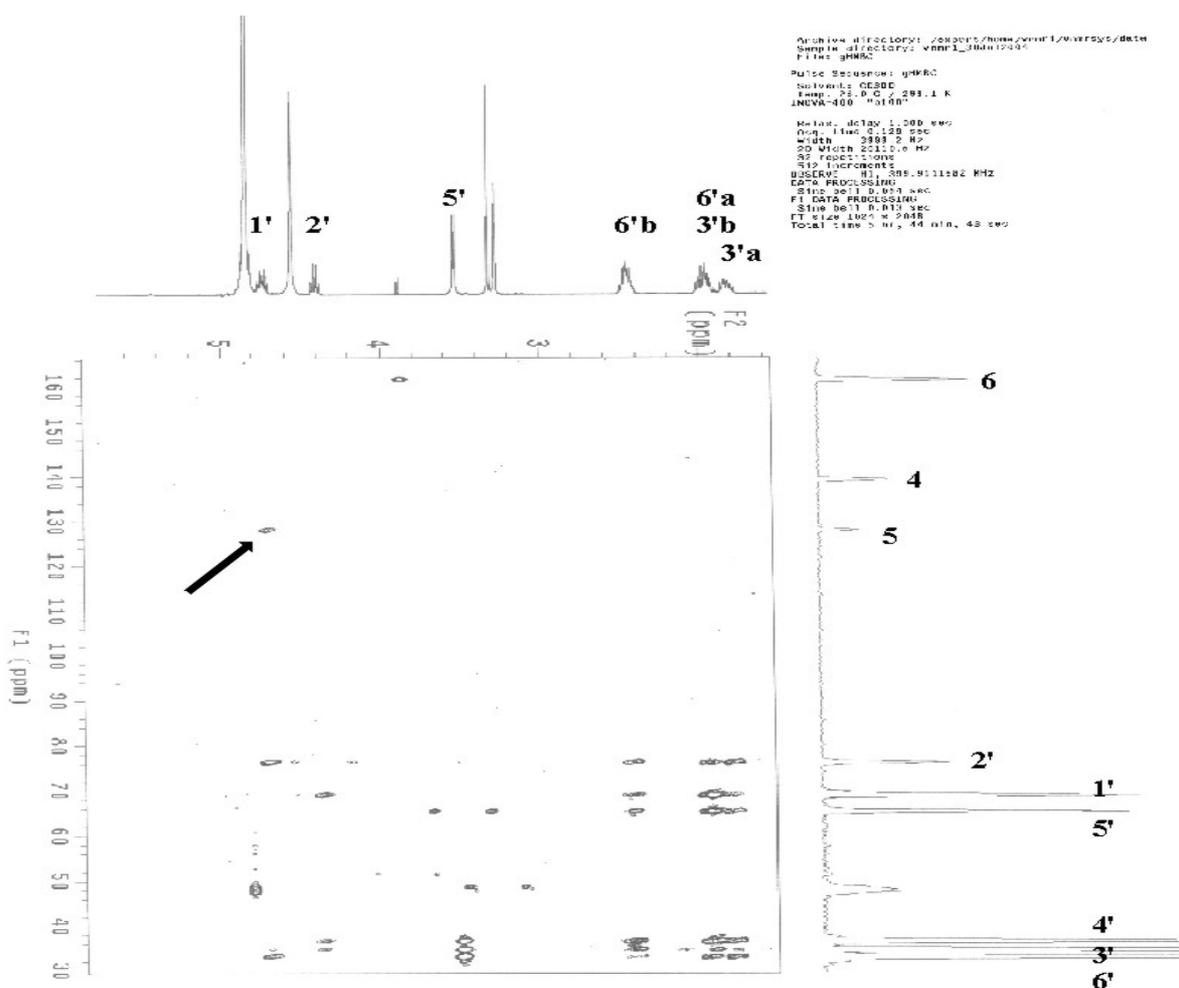


Figure 59 : Spectre gHMBC et conformation optimale pour (±)-186.

II.2.4 Synthèse de l'intermédiaire clef iodé

Le composé **188** étant relativement polaire, nous avons décidé de l'acétyler pour faciliter les purifications en fin de synthèse. Nous avons alors constaté une première différence de réactivité entre l'hétérocycle triazolo et l'imidazole. L'amide en position 4 sur l'imidazole, ou l'amine en position 5, est acétylé en présence d'Ac₂O ou d'AcOH,^{269,270} dans la pyridine. Tandis que l'acétylation de notre molécule, en présence d'Ac₂O dans la pyridine à t.a. pendant 24h, est entièrement régiosélective et ne touche que les oxygènes de la molécule.

Ce phénomène a déjà été décrit par Sutherland *et coll.*²⁷¹ En effet, l'acétylation de l'amine et de l'amide sur un triazole n'est possible qu'en chauffant au reflux de l'anhydride acétique pendant au moins 12 h. On peut supposer que cette différence de réactivité est due à l'atome d'azote supplémentaire en position 2 de l'hétérocycle, ce dernier influe sur la répartition électronique, changeant complètement sa réactivité. Dans notre cas, la réaction fournit le composé **200** avec un rendement de 75 % (Schéma 65).

Dans le but de diversifier l'hétérocycle en appliquant une réaction catalysée au palladium (0) sur la position C-5, nous nous sommes intéressés à deux méthodes. La première consisterait à transformer l'amine en sel de diazonium²⁷² (connu pour être un bon groupement partant en chimie organique), et de procéder au couplage de Sonogashira *in situ*.²⁷³ La seconde méthode, quant à elle, transformerait l'amine en iode²⁷⁴ (de nombreux substrats pour la réaction de Sonogashira portent cet atome). Bien que la première voie de synthèse semble plus attractive, car elle permettrait de modifier l'amine et de procéder de manière monotope au couplage de Sonogashira, sa mise en œuvre a présenté trop de difficultés, et nous a poussé à reporter notre attention sur la seconde voie.

Nous souhaitons alors transformer une amine en iode. Deux possibilités intéressantes s'offrent à nous: la première *via* un sel de diazonium,²⁷⁵ ou la seconde par mécanisme radicalaire. Par comparaison avec les données de la littérature, nous avons choisi la seconde méthode,²⁷⁶ qui nous a semblé plus appropriée pour notre substrat.

²⁶⁹ Birnbaum, G.I.; De Clercq E.; Hatfield, P.W.; Robins, M.J. Synthesis and conformational studies of 4-carbamoyl-1-[(2-hydroxyethoxy)-methyl]-5-(methylamino)imidazole and derivatives as new acyclonucleoside analogues. *Heterocycles* **1987**, 25, 493-506.

²⁷⁰ Baig, G.U.; Stevens, M.F.G. Triazines and related products. Part 22. Synthesis and reactions of imidazo[5,1-c][1,2,4]triazines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, 5, 1424-1435.

²⁷¹ Sutherland, D.R.; Tennant, G. Chemistry of polyazaheterocyclic compounds. VI. Dimroth rearrangements of 4-substituted 5-amino-1-phenyl-1,2,3-triazoles and a synthesis of v-triazolo[4,5-d]pyrimidines. *J. Chem. Soc. (C)* **1971**, 706-713.

²⁷² Curtin, D. Y.; Ursprung, J.A. Reaction of Organometallic Compounds with Diazonium Salts. I Synthesis of Arylazoalkanes. *J. Org. Chem.* **1956**, 21, 1221-1225.

²⁷³ (a) Campagne, J.-M.; Prim, D. in *Les Complexes de Palladium en Chimie Organique*, CNRS éditions, **2001**, pp. 160-161. (b) Saumitra, S.; Sanchita, B. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling of Arenediazonium Salts with Arylboronic Acids. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 3405-3406.

²⁷⁴ Merkushev, E.B. Advances in the synthesis of iodoaromatic compounds. *Synthesis* **1988**, 923-937.

²⁷⁵ Fulmer Shealy, Y.; Allen O'Dell, C. Triazeno-v-triazole-4-carboxamides. Synthesis and antitumor evaluation. *J. Med. Chem.* **1966**, 9, 733-737.

²⁷⁶ (a) Smith, W.B.; Chenpu Ho, O. Application to the isoamyl nitrite – Diiodomethane route to aryl iodides. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 2543-2545. (b) Nair, V.; Richardson, S.G. Modification of Nucleic Acid Bases via Radical Intermediates: Synthesis of Dihalogenated Purine Nucleosides. *Synthesis* **1982**, 670-672. (c) Nair, V.; Richardson, S.G. Utility of puninyl radicals in the synthesis of base-modified nucleosides and alkylpurines: 6-amino group replacement by hydrogen, chlorine, bromine, and iodine. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 3969-3974. (d) Cornforth, J.; Kumar, A.; Stuart A.S. Synthesis of substituted dibenzophospholes. Part 6. Preparation of symmetrical and non-symmetrical quaterphenyl intermediates. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 859-866.

Ainsi cette méthode permet de transformer directement l'amine en iode, par ajout de 2 éq d'isoamyle nitrite dans le diiodométhane pour donner le dérivé iodé **204** avec un rendement de 55 % (Schéma 65). S'il peut paraître modeste, ce rendement est en fait plus que satisfaisant quand on sait que cette réaction est connue pour générer de nombreux produits secondaires, et que cette voie de synthèse est la plus courte et la plus efficace pour aboutir au composé désiré.

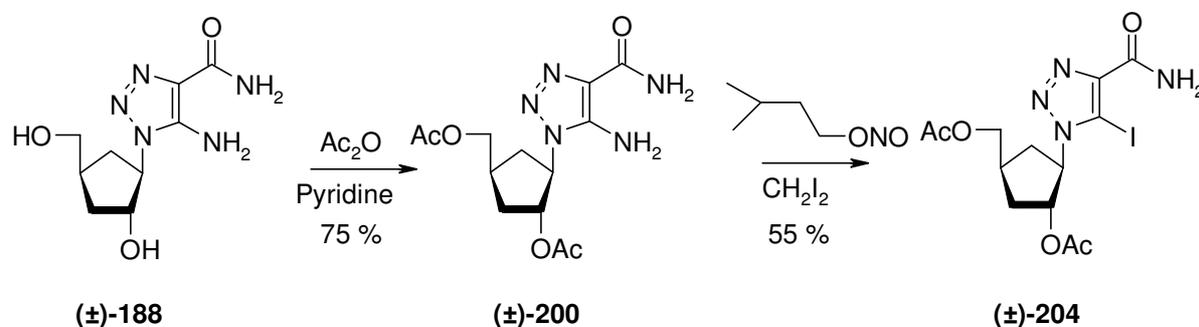


Schéma 65 : Obtention du second intermédiaire clef : le dérivé triazolo carbocyclique **204**.

Le mécanisme de la réaction d'iodation (Schéma 66) est le suivant:

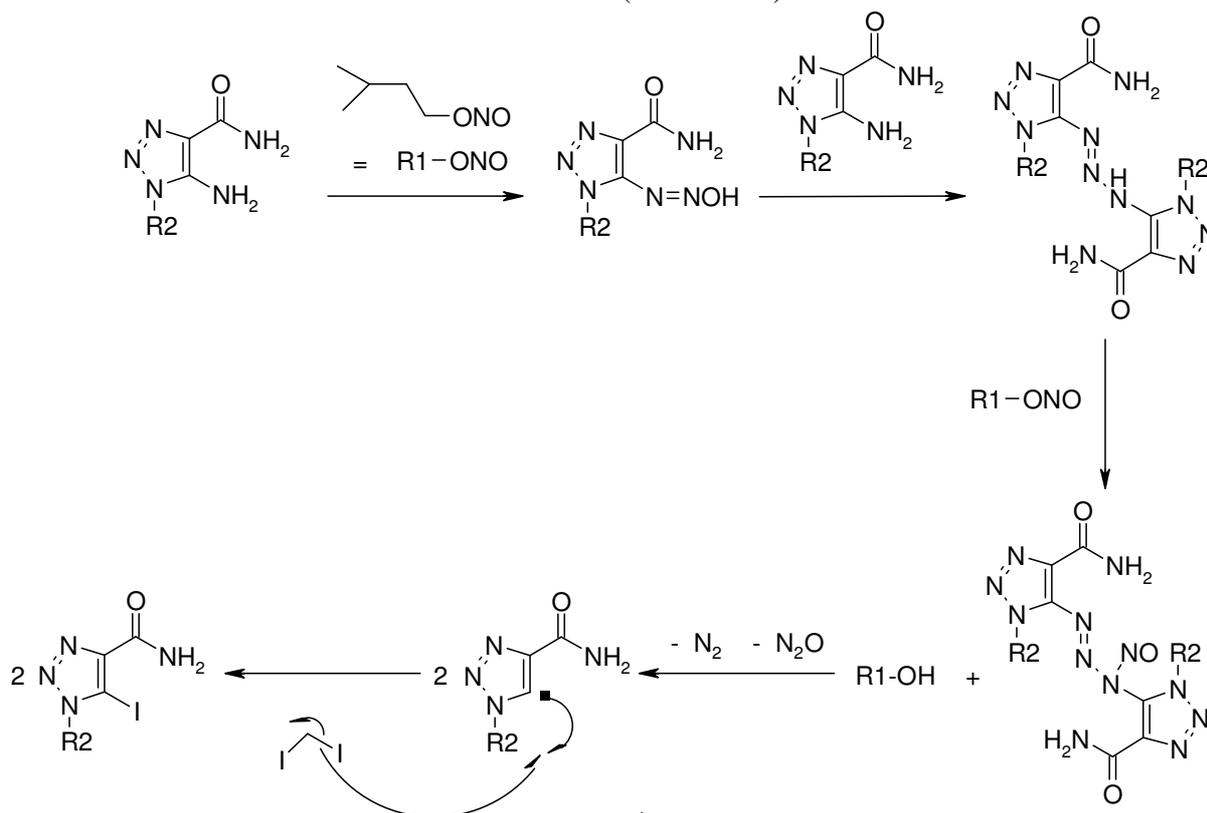


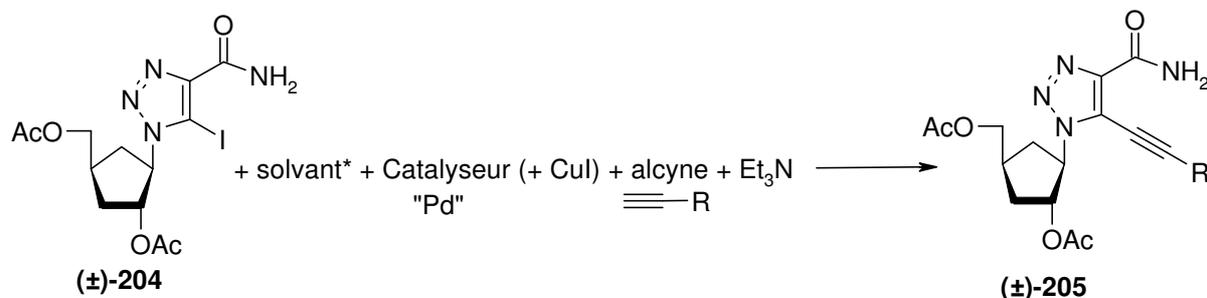
Schéma 66 : Mécanisme de la réaction d'iodation.

A présent, il est possible de diversifier l'hétérocycle triazole en appliquant une réaction de couplage de Sonogashira catalysée au Pd(0) sur le dérivé **204**.

(e) Smith, W.B.; Ho, O.C. Application of the isoamyl nitrite-diiodomethane route to aryl iodides. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 2543-2545.

II.3. Etape clef de couplage *via* une réaction de Sonogashira

Nous nous sommes ensuite intéressés parallèlement au couplage d'un alcyne vrai (Schéma 67) portant une chaîne alkyle (tableau 19) et/ou aryle (tableau 21), en utilisant les conditions classiques du couplage de Sonogashira.^{277,278} Il nous est alors apparu que la réactivité de l'hétérocycle 1,2,3-triazole vis-à-vis du couplage de Sonogashira catalysé au Pd(0) était différente de celle d'un cycle (hétéro)aromatique, d'un imidazole ou d'un 1,2,4-triazole.



* DMF sauf précision

Entrée	Catalyseur(0,1éq)	CuI	Alcyne (+Et ₃ N)	T°C	Temps	Observations	Rdt
1	Pd(PPh ₃) ₄	oui	heptyne (1,2éq)	100°C	8h	réaction incomplète	ND
2	Pd(PPh ₃) ₄		heptyne (1,2éq)	100°C	8h	réaction incomplète	ND
3	Pd(PPh ₃) ₄		heptyne (1,2éq)	155°C	20h	réaction complète mais	25%
4	Pd(OAc) ₂ + PPh ₃		heptyne (1,2éq)	100°C	22h	réaction incomplète	ND
5	(PhCN) ₂ PdCl ₂		heptyne (1,2éq)	100°C	8h	réaction incomplète	ND
6	(PhCN) ₂ PdCl ₂		heptyne (1,2éq)	155°C	20h	réaction complète	50%
7	(PhCN) ₂ PdCl ₂		heptyne (3,0éq)	155°C	4h	réaction complète	62%

Schéma 67 et tableau 19 : Mise au point du couplage de Sonogashira avec un alcyne portant une chaîne alkyle

En effet, pour coupler une chaîne alkyle (tableau 19), l'utilisation du palladium tétrakis Pd(PPh₃)₄ dans le DMF (entrée 1 et 2) à 100°C pendant 8 heures n'a permis d'obtenir qu'un couplage partiel. Des essais identiques menés dans le CH₃CN ou dans le THF n'ont rien donné de mieux.

On peut noter de manière intéressante que dans notre cas, contrairement à ce qu'ont rapporté Sonogashira *et coll.*,²⁷⁹ l'ajout de CuI ne facilite pas le couplage, c'est la raison pour laquelle nous ne l'avons plus utilisé par la suite.

²⁷⁷ Agrofoglio, L.A.; Gillaizeau, I.; Saito, Y. Palladium-Assisted Routes to Nucleosides. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1875-1916.

²⁷⁸ Sonogashira, K. *Comprehensive Organic Synthesis*, Trost/Fleming (Eds), Pergamon Press: New York, 1991, vol 3, p. 521.

²⁷⁹ Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467-4470.

Remplacer le palladium tétrakis par le classique Pd(OAc)₂ (en présence de PPh₃, entrée 4) ou le moins usuel (PhCN)₂PdCl₂ (entrée 5), ou d'autres catalyseurs au palladium, n'apporte aucun bénéfice notable pour la réaction sur une durée identique de 8h.

Par contre, chauffer à 155°C en tube scellé en présence de palladium tétrakis (entrée 3) ou de (PhCN)₂PdCl₂ (entrée 6) conduit à une consommation totale du produit de départ, pour donner le produit de couplage attendu, avec un rendement de 25 % et 50 % respectivement. Le rendement moyen s'explique sûrement par une dégradation due à un temps de réaction trop long. Le catalyseur le plus approprié pour effectuer un couplage sur un hétérocycle triazole semble être le (PhCN)₂PdCl₂, en l'absence du co-catalyseur CuI. C'est également ce qui a été constaté par Minakawa *et coll.* lors des tentatives de couplage sur le dérivé imidazole.²⁸⁰

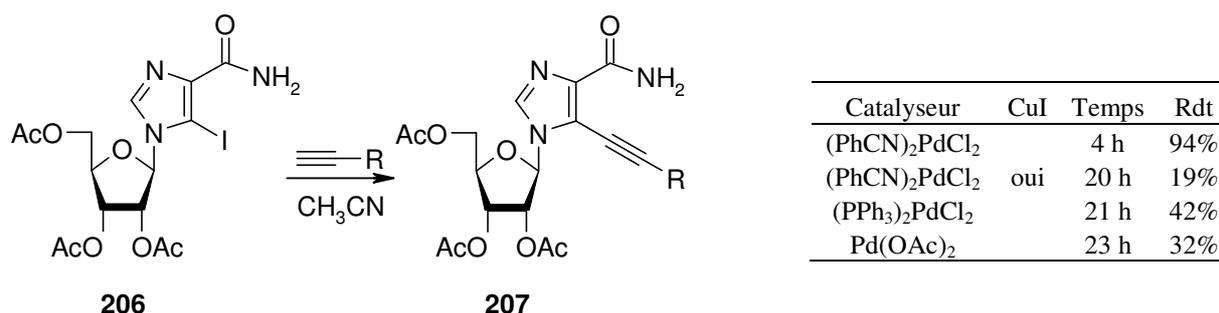


Schéma 68 et tableau 20 : Mise au point du couplage de Sonogashira (d'après Minakawa *et coll.*²⁸⁰) : le dérivé iodé **206** et le catalyseur au palladium (10 % molaire), la Et₃N (1,2 éq) et l'alcyne (1,2 éq) sont placés dans le CH₃CN dans un tube scellé et chauffé à 100°C.

Il reste à déterminer le temps de réaction optimal, temps nécessaire pour que le couplage s'effectue, mais temps minimum pour s'assurer qu'il n'y a pas de dégradation au sein du milieu réactionnel.

Ainsi, pour le couplage d'une chaîne alkyle, le temps de réaction minimum est de 4 heures en tube scellé à 155°C dans le DMF en présence de (PhCN)₂PdCl₂ (entrée 7), et ce temps est suffisamment court pour que la réaction soit propre (une tâche par ccm, sans compter celles liées au catalyseur): le rendement est alors de 62 %. Il est important de noter que ces conditions sont des conditions optimisées, malgré le protocole qui peut sembler un peu « drastique » : la température élevée est un paramètre indispensable pour la réussite de la réaction ; de même, le tube scellé est indispensable pour éviter l'évaporation de certains réactifs à cette température, les alcynes et la Et₃N. Enfin, 4h est la durée nécessaire et suffisante pour permettre au couplage d'avoir lieu.

Passons maintenant à la mise au point du couplage d'une chaîne aryle (tableau 21) sur le 1,2,3-triazole, qui a été mise au point parallèlement au couplage d'une chaîne alkyle.

²⁸⁰ Minakawa, N.; Takeda, T.; Sasaki, T.; Matsuda, A.; Ueda, T. Nucleosides and nucleotides. 96. Synthesis and antitumor activity of ethynyl-1-β-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 778-786.

Entrée	Catalyseur (0,1éq)	CuI	Alcyne (+Et ₃ N)	T°C	Temps	Observations	Rdt
1	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	oui	phénylacétylène(1,2éq)	ta	2h	pas de couplage	ND
2	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	oui	phénylacétylène(1,2éq)	ta	24h	dégradation	ND
3	(PhCN) ₂ PdCl ₂		phénylacétylène(1,2éq)	155°C	5h	réaction complète	53%
4	(PhCN) ₂ PdCl ₂		phénylacétylène(3éq)	155°C	4h	réaction complète	74%
5	(PhCN) ₂ PdCl ₂		éthynylpentylbenzène(1,2éq)	155°C	16h	réaction complète	48%
6	(PhCN) ₂ PdCl ₂		éthynylpentylbenzène(3éq)	155°C	5h30	réaction complète	62%

Tableau 21 : Mise au point du couplage de Sonogashira avec un alcyne portant une chaîne aryle (les rendements sont en produit isolé).

Etant donné que Pd(PPh₃)₄ et Pd(OAc)₂ (en présence de PPh₃) n'ont rien donné de satisfaisant lors de tentatives de couplage de chaînes alkyle, nous avons plutôt utilisé Pd(PPh₃)₂Cl₂ dans le DMF pour coupler une chaîne aryle. En utilisant des conditions classiques pour coupler le phénylacétylène, en présence de CuI, nous n'avons obtenu que dégradation (entrée 2) ou absence de couplage (entrée 1). Nous avons alors envisagé l'utilisation de (PhCN)₂PdCl₂ (entrée 3), en chauffant à 155°C. Comme pour les essais de couplage d'une chaîne alkyle, le couplage a bien lieu, avec un rendement correct de 53 % pour le phénylacétylène. L'application de ce protocole au phénylpentylacétylène (entrée 5) conduit à un couplage avec un rendement de 48 %. Ces rendements semblent pouvoir être améliorés avec un temps de réaction plus court pour éviter toute éventuelle dégradation. En effet, là aussi 4h de réaction semble être une durée nécessaire et suffisante pour le couplage : des rendements de couplage de 74 % et de 62 %, respectivement pour le phénylacétylène (entrée 4) et le phénylpentylacétylène (entrée 6) confirment cette hypothèse.

Nous avons également essayé de coupler le triméthylsilylacétylène en appliquant divers modes opératoires, dans le but d'effectuer divers modifications ultérieures, mais malgré tous nos efforts, nous n'avons jamais réussi à greffer le triméthylsilylacétylène, quelles que soient les conditions appliquées, elles n'ont finalement abouti qu'à une dégradation du produit de départ et une absence de couplage, comme le montre le tableau suivant :

Solvant	Catalyseur (0,1éq)	Alcyne (+Et ₃ N)	T°C	Temps	Observations	Rdt
CH ₃ CN	Pd(OAc) ₂	triméthylsilylacétylène	100°C	14h	dégradation et incomplet	ND
CH ₃ CN	Pd(OAc) ₂	triméthylsilylacétylène	100°C	23h	dégradation	ND
CH ₃ CN	(PhCN) ₂ PdCl ₂	triméthylsilylacétylène	100°C	14h	dégradation et incomplet	ND
DMF	(PhCN) ₂ PdCl ₂	triméthylsilylacétylène	155°C	14h	dégradation	ND
DMF	(PhCN) ₂ PdCl ₂	triméthylsilylacétylène	ta	2h-24h	dégradation	ND

Tableau 22 : Tentatives de couplage de Sonogashira avec le triméthylsilylacétylène

Finalement, nous avons décidé d'appliquer le mode opératoire de couplage commun aux chaînes aryles ou alkyles qui nous a donné les meilleurs résultats (schéma 69) : dans un tube scellé le nucléoside **204** (0.52 mmol) est mis à réagir dans un mélange de DMF (3 mL), de Et₃N (2,6 mmol), et d'heptyne (2,6 mmol) en présence de (PhCN)₂PdCl₂ (0,05

mmol) : le mélange réactionnel est mis à chauffer pendant 4h à 155°C dans le tube scellé sous argon.

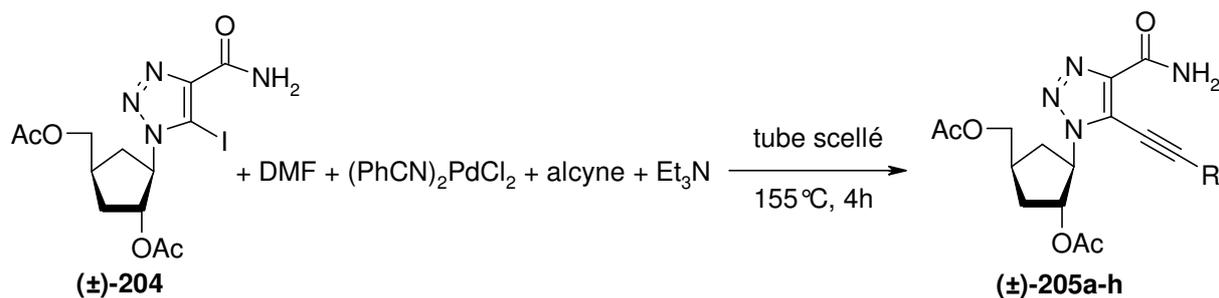


Schéma 69: conditions de couplage de Sonogashira

Ce mode opératoire à été appliqué à une série d'alcynes portant une chaîne alkyle et / ou aryle, et nous a permis d'obtenir 8 nouveaux analogues de nucléosides (figure 60).

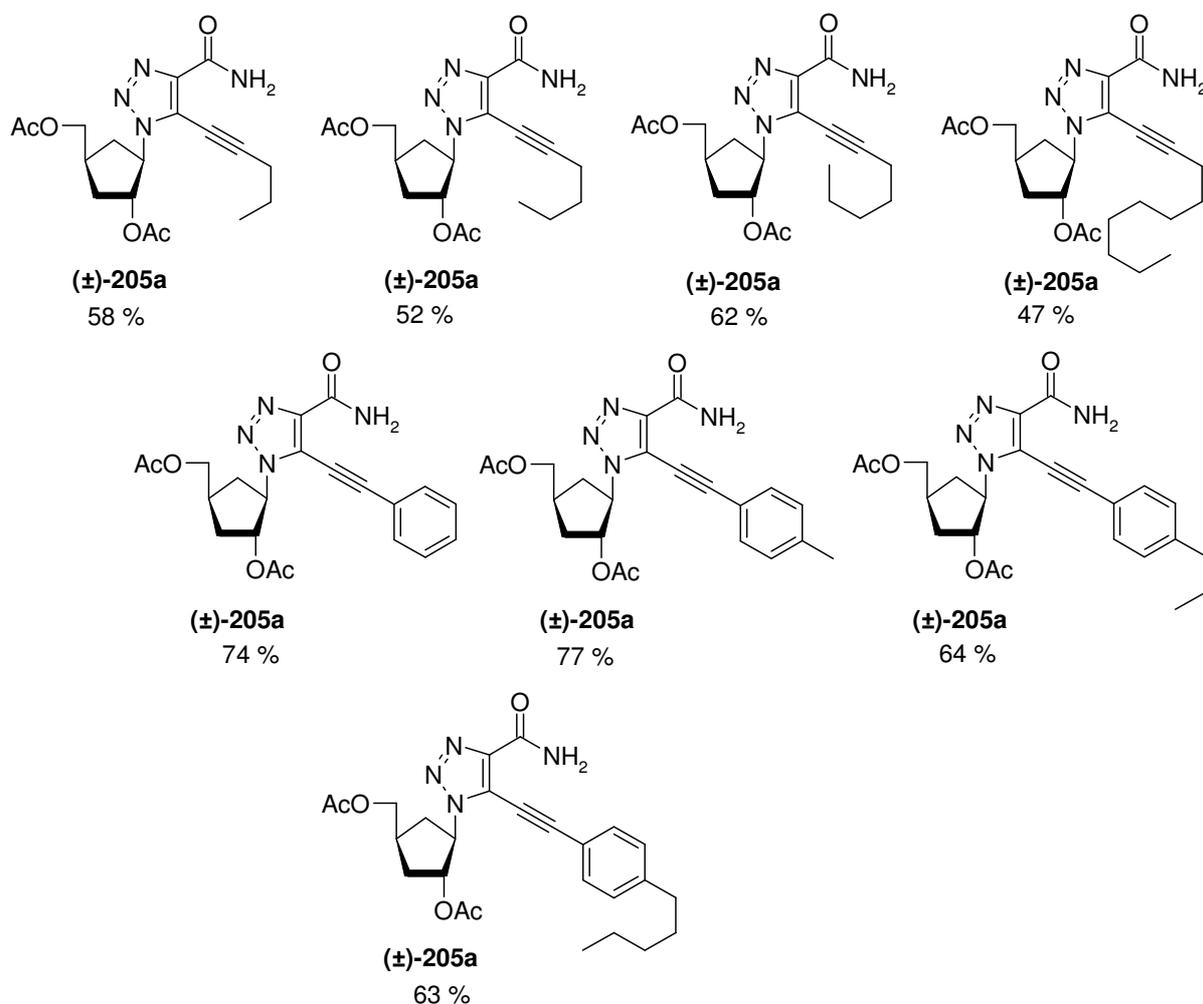


Figure 60 : analogues de nucléosides obtenus par couplage de Sonogashira

Les rendements de cette réaction varient selon la chaîne carbonée que l'on souhaite greffer, et ils s'échelonnent entre 52 % et 77 % (figure 60). Quelques grandes tendances peuvent être dégagées. Tout d'abord, les chaînes carbonées aromatiques se greffent mieux que

les chaînes carbonées aliphatiques, pour des raisons électroniques. Ensuite, on peut remarquer que, quel que soit le caractère de la chaîne carbonée (aliphatique ou aromatique), le rendement de couplage est meilleur lorsque la chaîne carbonée est plus longue ; cependant, pour des raisons stériques, si la chaîne devient trop longue, alors le rendement chute.

A présent, il nous reste à déprotéger les groupements hydroxyles pour accéder aux composés finaux que l'on pourra faire tester.

II.4. Déprotection finale

La déprotection des groupements hydroxyles se fait dans des conditions classiques de désacétylation: le nucléoside acétylé est placé dans une solution d'éthanolate de sodium dans l'éthanol à t.a. pendant 2 à 24h pour donner le nucléoside protégé désiré (schéma 70).

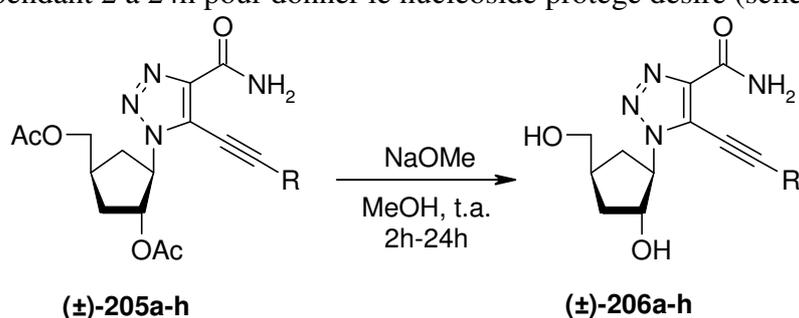


Schéma 70 : conditions de déprotection des groupements hydroxyles

Les rendements de déprotection sont très bons à excellents, ils s'échelonnent entre 90 % et 99 % (figure 61a,b), à l'exception du composé **206h**. On peut noter que plus la chaîne carbonée est courte, plus la déprotection est rapide (moins de 2h de temps de réaction pour **206a**): en effet, si la chaîne carbonée est trop longue, alors elle gêne l'accessibilité au groupement hydroxyle en position 2', retardant ainsi la réaction par encombrement stérique (plus de 24h de temps de réaction pour **206h**).

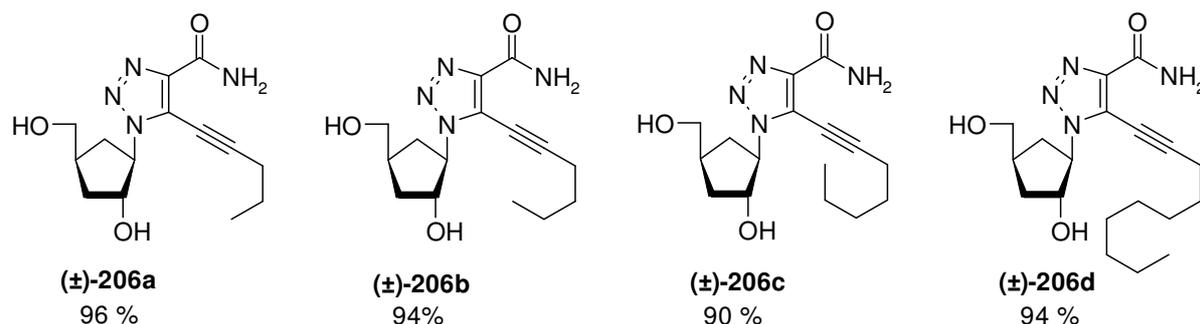


Figure 61a : analogues de nucléosides obtenus par simple désacétylation des groupements hydroxyles

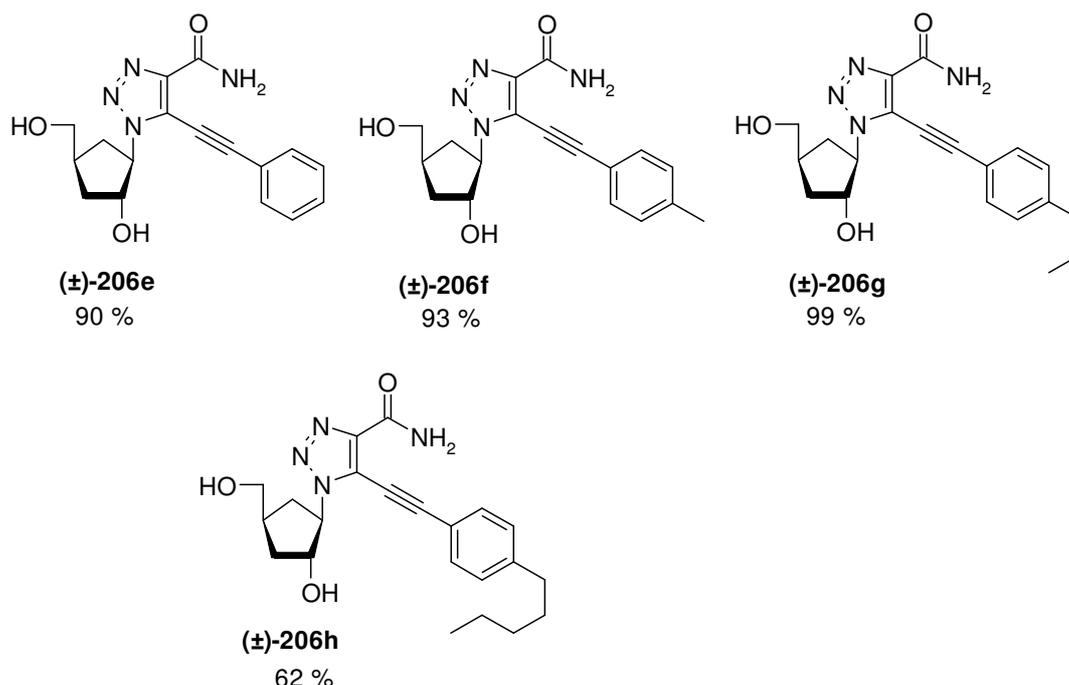


Figure 61b : analogues de nucléosides obtenus par simple désacétylation des groupements hydroxyles

En résumé, nous avons réalisé la synthèse de 8 nouveaux analogues de nucléosides jamais décrits, appartenant à la famille des [1,2,3]-triazolo nucléosides, *via* 2 étapes clefs: la première est une cycloaddition 1,3-dipolaire, la seconde étant le couplage catalysé au palladium (0). Une simple déprotection des groupements hydroxyles en fin de synthèse nous permet l'accès aux composés désirés.

En ce qui concerne l'obtention du composé **206h**, elle n'a pas été possible en utilisant les conditions de désacétylation employées pour les autres composés : en effet, au bout de 36h, la réaction est toujours incomplète. Alors nous avons décidé de chauffer à 60°C pendant 4h. Ces conditions ont conduit à la disparition complète du produit de départ, l'obtention du produit de désacétylation désiré, et l'apparition d'un autre produit (Figure 62), ce qui explique le rendement de seulement 62 % obtenu pour le composé souhaité. Par analyse RMN et IR, nous avons rapidement remarqué que le second composé obtenu est issu d'une cyclisation intramoléculaire et appartient à la famille d'analogues de la 8-aza-3-déazainosine.

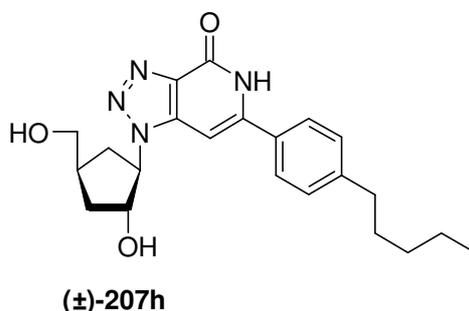


Figure 62 : nouvelle structure nucléosidique obtenue par réaction monotope de désacétylation et de cyclisation.

En effet, par infrarouge on observe la disparition de la bande caractéristique d'une triple liaison, et par RMN, on observe l'apparition d'un pic aux alentours de 7 ppm caractéristique d'un proton éthylénique. Cette structure moléculaire s'apparente à celles de la famille des nucléosides 3-déazapurines, connus pour être des agents potentiels antiviraux,

^{281,282} antitumoraux²⁸³ et antibactériens.²⁸⁴ Il nous a donc paru intéressant de rechercher dans la littérature et d'appliquer une méthodologie capable de nous fournir ce dérivé cyclisé quelle que soit la chaîne que nous avons greffé auparavant par couplage de Sonogashira.

III. Synthèse de dérivés de la famille des 8-aza-3-déazapurines

III.1. Bibliographie sur la cyclisation intramoléculaire pour l'obtention de lactame bicyclique

III.1.1. Cyclisation intramoléculaire entre un alcyne et un amide en présence d'une amine

Une cyclisation intramoléculaire (Schéma 71), en présence d'une amine,²⁸⁵ a été décrite sur un dérivé nucléosidique dont l'hétérocycle est un imidazole, portant un alcyne en position 5 et un amide en position 4, pour conduire à un analogue du type 3-déazapurine (**209**). La réaction de cyclisation a lieu quand R = H ou CH₂OTBS, mais aucune réaction n'est possible lorsque R est un groupement alkyle ou aryle.

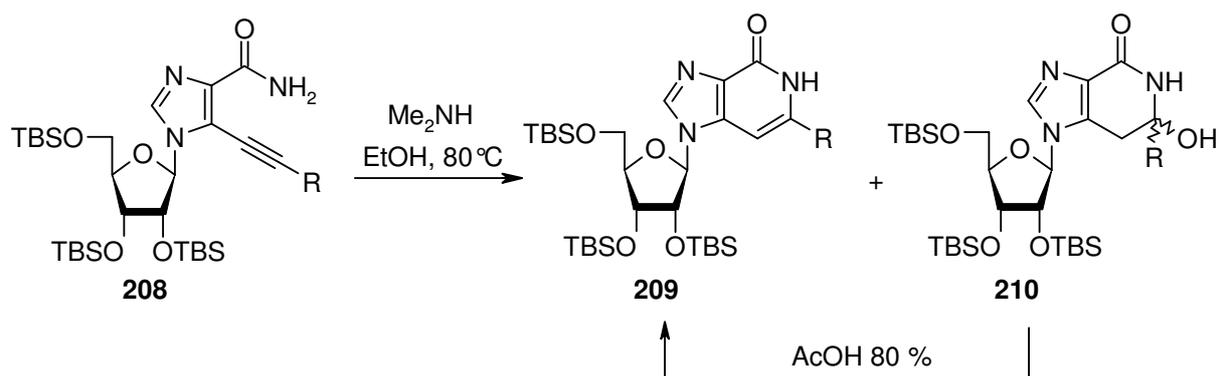


Schéma 71 : Obtention du dérivé lactame bicyclique **209**.

²⁸¹ An, H.; Ding, Y.; Chamakura, V.; Hong, Z. Preparation of deazapurine nucleoside analogs as antiviral agents. WO 2003061576, 2003.

²⁸² Tseng, C.K.; Marquez, V.E.; Fuller, R.W.; Goldstein, B.M.; Haines, D.R.; McPherson, H.; Parsons, J.L.; Shannon, W.M.; Arnett, G.; Hollingshead, M.; Driscoll, J. S. Synthesis of 3-deazaenplanocin A, a powerful inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase with potent and selective in vitro and in vivo antiviral activities. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1442-1446.

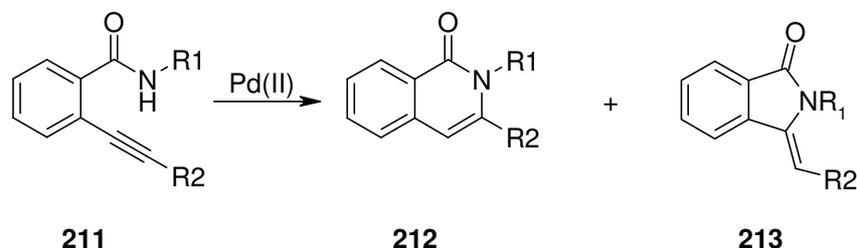
²⁸³ Ramasamy, K.; Imamura, N.; Hanna, N. B.; Finch, R. A. Avery, T. L.; Robins, R. K.; Revankar, G. R. Synthesis and antitumor evaluation in mice of certain 7-deazapurine (pyrrolo[2,3-d]pyrimidine) and 3-deazapurine (imidazo[4,5-c]pyridine) nucleosides structurally related to sulfenosine, sulfinosine, and sulfonosine. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1220-1225.

²⁸⁴ Maddry, J.; Chen, X.; Kwong, C.; Suling, W. Book of abstracts, 219th ACS National Meeting, San Francisco, CA, March 26-30, **2000**.

²⁸⁵ (a) Minakawa, N.; Matsuda, A. Nucleosides and nucleotides. 114. A convenient method for the synthesis of 3-deazapurine nucleosides from AICA-riboside. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 661-664. (b) Minakawa, N.; Matsuda, A. Nucleosides and nucleotides. 116. Convenient syntheses of 3-deazaadenosine 3-deazaguanosine, and 3-deazainosine via ring closure of 5-ethynyl-1-β-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide or -carbonitrile. *Tetrahedron* **1993**, 49, 557-570. (c) Minakawa, N.; Kojima, N. T.; Matsuda, A. Nucleosides and Nucleotides. 184. Synthesis and Conformational Investigation of Anti-Fixed 3-Deaza-3-halopurine Ribonucleosides. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 7158-7172.

III.1.2. Hétéroannulation pallado-catalysée

Le palladium (ou d'autres métaux) peut aussi être utilisé pour l'obtention d'un lactame bicyclique par cyclisation intramoléculaire entre un alcyne et un amide (Schéma 72). En effet, dans la littérature une telle réaction est décrite appliquée à des dérivés phényles, donnant accès à des lactames bicycliques (**212**).²⁸⁶



R1, R2 = chaîne alkyle ou aryle

Schéma 72 : Réaction de cyclisation intra-moléculaire catalysée au Pd (II).

Ce protocole, contrairement au précédent, fonctionne en présence d'une chaîne alkyle ou aryle portée par l'alcyne. Cependant, les rendements sont plus faibles, et le produit désiré est accompagné d'un produit secondaire dans des proportions variables.

Alternativement à cette méthode, une réaction de Heck intramoléculaire (Schéma 73) entre un iode et un alcène porté par l'amine permet également d'obtenir un analogue nucléosidique (**215**), substitué en position 3, de la famille des 3-déazapurines .

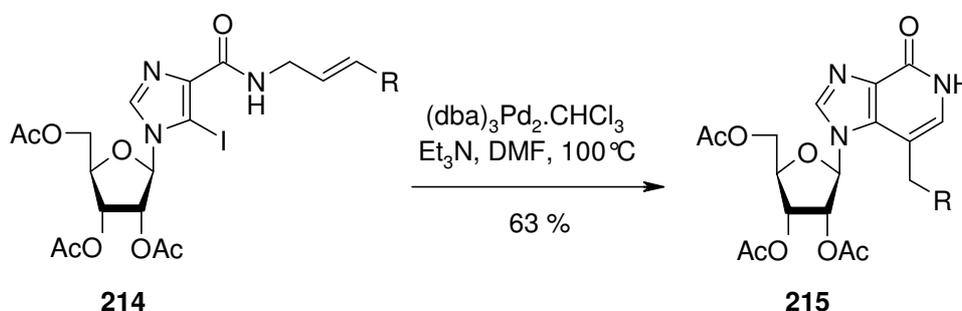


Schéma 73 : Obtention d'un lactame bicyclique par réaction de Heck intramoléculaire.

III.2. Réaction monotope de déprotection et de cyclisation intramoléculaire

Nous avons choisi d'appliquer la procédure décrite par Minakawa *et coll.* basée sur une fermeture de cycle entre un amide et un alcyne en présence d'une solution aqueuse de diméthylamine (Schéma 71). L'avantage de ce protocole de cyclisation intramoléculaire, par rapport à tous ceux qui auraient pu être utilisés, est qu'il permet une réaction monotope de

²⁸⁶ (a) Sashida, H.; Kawanuikai, A. Palladium-catalyzed intramolecular cyclisation of o-ethynylbenzoic acids and o-ethynylbenzamides: Preparation of isocoumarins and isoquinolin-1-ones. *Synthesis* **1999**, 1145-1148. (b) Kundu N.G.; Khan, M.W. Palladium-catalyzed heteroannulation with terminal alkynes: a highly regio- and stereoselective synthesis of (Z)-3-Aryl(aryl)idene isoindolin-1-ones. *Tetrahedron* **2000**, 56, 4777-4792.

cyclisation intramoléculaire accompagnée d'une déprotection des groupes hydroxyles (Schéma 74).

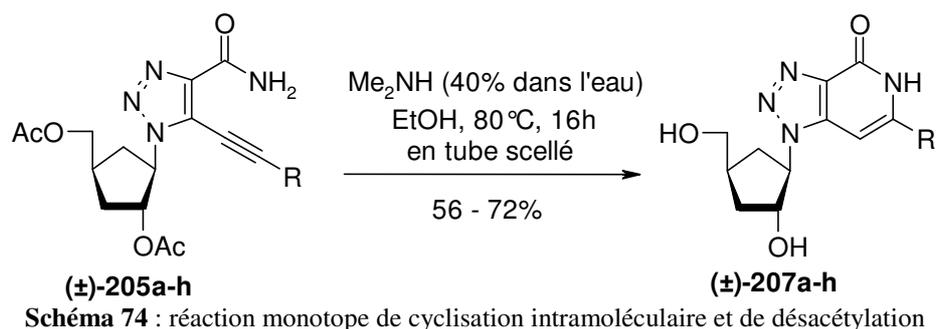


Schéma 74 : réaction monotope de cyclisation intramoléculaire et de désacétylation

Le traitement des nucléosides **(±)-205a-h** par une solution aqueuse de diméthylamine dans l'éthanol à reflux dans un tube scellé pendant 16h nous a permis d'obtenir la fermeture de cycle souhaitée, qui conduit aux nucléosides désirés de la famille 8-aza-3-deazainosine (ou [1,2,3]-triazolo[4,5-c]pyridine-4-one) substitués en position 2 (**(±)-207a-h**, qui ont été isolés respectivement avec un rendement compris entre 56 et 72 % (Figure 63).

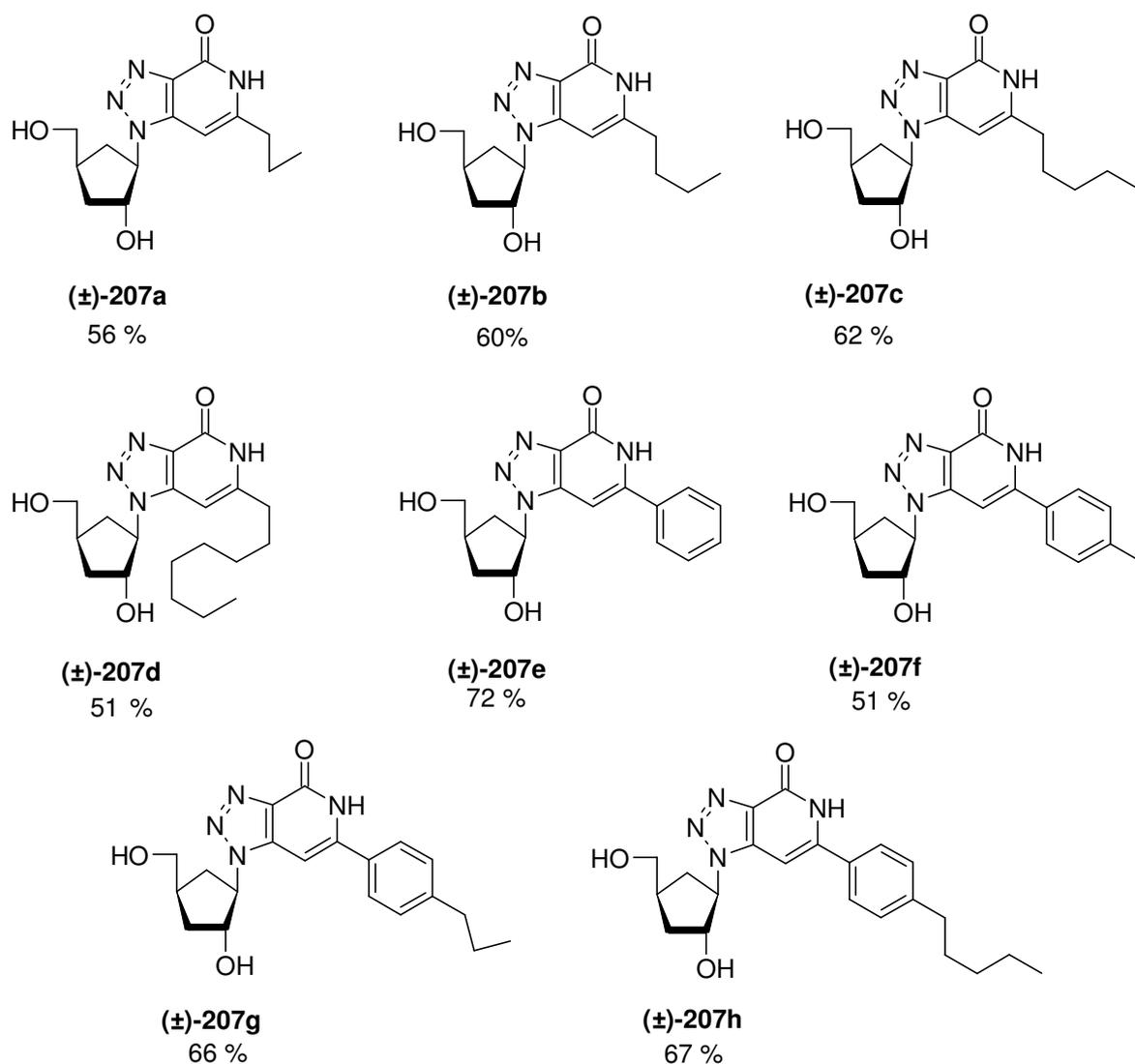


Figure 63 : réaction monotope de cyclisation intramoléculaire et déprotection

Le mécanisme de la réaction (Schéma 75) est le suivant, et a été décrit par Minakawa et Matsuda: le dérivé alcyinique, en présence de diméthylamine auqueuse, forme une énamine qui s'hydrolyse spontanément en cétone. La cétone subit une attaque nucléophile intramoléculaire par l'azote de l'amide, formant ainsi un alcool (cet alcool intermédiaire a pu être isolé par Minakawa et Matsuda, et c'est à partir de la détermination de cette structure que le mécanisme a été postulé). Etant donné que le milieu réactionnel est chauffé à 80°C pendant 16 h, l'alcool se déshydrate spontanément pour donner l'alcène²⁸⁷ et de ce fait le composé désiré.

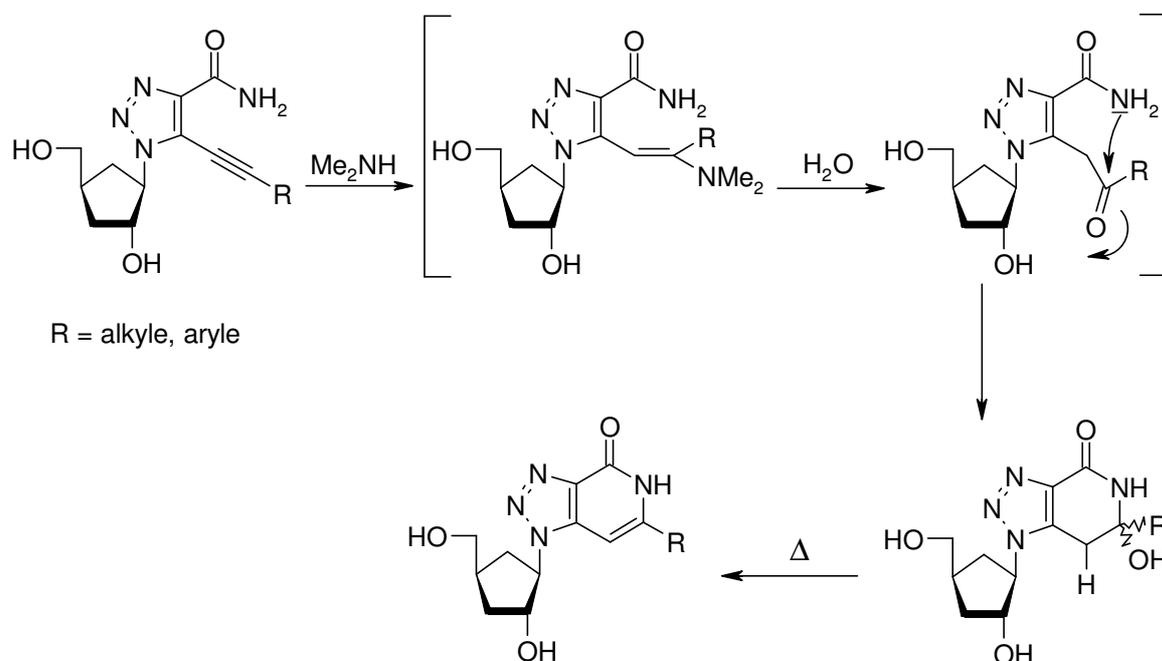


Schéma 75 : Mécanisme de la réaction de cyclisation intramoléculaire en présence d'une amine.

Il est intéressant de noter qu'il s'agit du premier exemple d'hétéroannulation réussie en présence d'une amine sur un analogue de nucléoside portant une chaîne aryle ou alkyle. En effet, quelles que soient les conditions utilisées par Minakawa *et coll.*,²⁸⁵ chaque tentative de cyclisation avec un analogue nucléosidique portant une chaîne alkyle ou aryle a été un échec. Seules les cyclisations avec l'alcyne vrai ou l'alcool propargylique ont mené aux composés désirés (Figure 64).

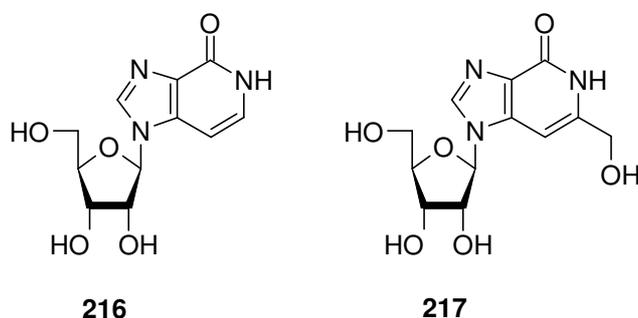


Figure 64 : Structures nucléosidiques obtenues par l'équipe de Minakawa *via* une cyclisation intramoléculaire entre un alcyne et un amide

²⁸⁷ Dans le cadre des travaux de Minakawa et Matsuda, un mélange de l'alcool et de l'alcène a été obtenu. Après évaporation des solvants, le milieu réactionnel est placé dans une solution d'acide acétique dans l'éthanol et laissé sous agitation à température ambiante, jusqu'à disparition de l'alcool, pour aboutir au seul dérivé alcénique souhaité.

Dans la littérature, les seuls exemples de cyclisations réussies faisant intervenir un alcyne portant une chaîne aryle ou une chaîne alkyle ont été reportés sur des dérivés phényles²⁸⁸ **218** ou **219**, ou hétérocycliques (pyrazoliques²⁸⁹ **220** ou pyridiniques²⁹⁰ **221**), mais jamais sur un imidazole ou un triazole à notre connaissance. Ces dérivés n'ont d'ailleurs pas été obtenus en utilisant la diméthylamine mais des dérivés du cuivre, du palladium ou du mercure, respectivement.

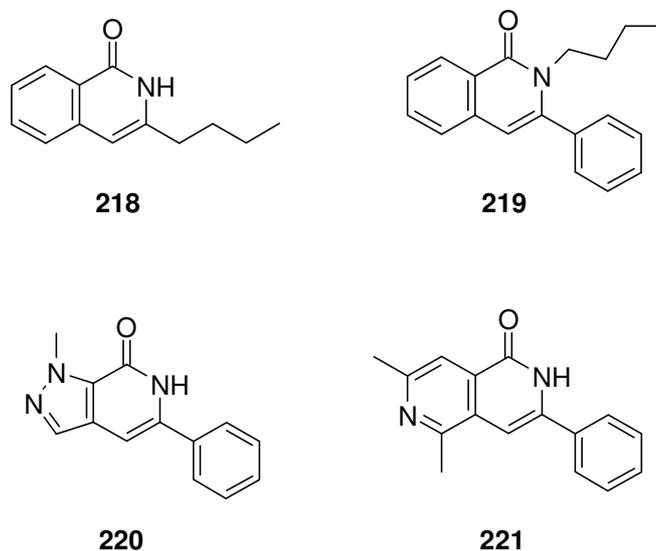


Figure 65 : Structures obtenues par fermeture de cycle entre un amide et un alcyne

En résumé, nous avons réalisé la synthèse de 8 nouveaux analogues de nucléosides, appartenant à la famille des dérivés nucléosidiques de la famille [1,2,3]-triazolo-[4,5c]-pyridin-4-one, *via* 2 étapes clefs: la première est une cycloaddition 1,3-dipolaire, la seconde étant le couplage catalysé au palladium (0). Des conditions optimisées de déprotection permettent une réaction monotope de déprotection et de cyclisation intramoléculaire donnant l'accès aux composés bicycliques souhaités du type 8-aza-3-déazainosine substitués en position 2 de l'hétérocycle.

IV. Evaluation biologique

IV.1. Introduction

Des évaluations biologiques préliminaires ont été effectuées par l'équipe du Pr Zoulim, pour tester le pouvoir d'inhibition de ces nouveaux analogues de nucléosides sur la réplication du VHC. Malheureusement, pas la moindre activité n'a pu être observée. Par

²⁸⁸ Sakamoto, T.; Annaka, M.; Kondo, Y.; Yamanaka, H. Condensed heteroaromatic ring systems. VIII. Synthesis of 3-substituted isocoumarins from o-halobenzoic acid derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2754-2759.

²⁸⁹ Vasilevsky, S.F.; Mshvidobadze, E.V.; Elguero, J. Heterocyclization of vic-substituted hydroxamic acid salts of acetylenylpyrazoles. A new procedure for the preparation of pyrazolo[3,4-c]pyridin-7-ones. *Heterocycles* **2002**, *57*, 2255-2260.

²⁹⁰ Sakamoto, T.; Kondo, Y.; Yamanaka, H. Condensed heteroaromatic ring systems. III. Synthesis of naphthyridine derivatives by cyclization of ethynylpyridinecarboxamides. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 626-633.

conséquent, aucun test plus poussé, pouvant donner l'EC₅₀ ou l'IC₅₀, n'a été effectué à l'aide du système réplicon sur les cellules Huh-7.

Néanmoins, en complément de ces tests, et parce que le laboratoire s'intéresse à plusieurs axes de recherche, dont la conception et la synthèse de nouveaux inhibiteurs de la réplication du VIH, ces composés ont été également testés contre le virus du SIDA.

IV.2. Evaluation anti-VIH-1

Ainsi, tous les composés ont été testés sur des cellules PBM infectées par le virus HIV-1_{LAI}.²⁹¹ La cytotoxicité a également été déterminée sur trois lignées cellulaires : PBM, CEM et VERO.¹⁹³

	Composé #	Activité Anti-VIH		Cytotoxicité (CC ₅₀)		
		EC ₅₀	EC ₉₀	PBM	CEM	VERO
	AZT	0.016		> 100	14.0	29.0
Série 1,2,3-triazole	206a	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
	206b	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
	206c	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
	206d	10.3	62.1	34.5	67.0	> 100
	206e	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
	206f	> 100	> 100	> 100	82	> 100
	206g	> 100	> 100	64.9	> 100	86.5
	206h	41.9	83.1	22.2	14.9	82.5
Série 8-aza-3deazainosine	207a	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
	207b	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
	207c	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
	207d	24.6	> 100	9.3	84.7	> 100
	207e	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
	207f	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
	207g	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
	207h	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

Tableau 22 : Évaluation de l'activité antivirale contre le VIH-1 en cellules PBM et de la cytotoxicité contre les cellules PBM, CEM et VERO *in vitro*. Les résultats sont exprimés en µM. La toxicité est donnée par la CC₅₀ et l'activité par l'EC₅₀.

IV.3. Discussion

La majorité des produits ne présente aucune activité sur la VIH. Seulement 3 produits, **206d**, **206h** et **207d**, présentent une activité très modérée de l'ordre du micromolaire, mais cette activité est accompagnée d'une toxicité du même ordre de grandeur. Ainsi, aucun produit ne présente une sélectivité digne d'intérêt contre le VIH.

²⁹¹ Schinazi, R.F., Sommadossi, J.P., Saalman, V., Cannon, D.L., Xie, M.-W., Hart, G.C., Smith, G.A., Hahn, E.F. Activities of 3'-azido-3'-deoxythymidine nucleotide dimers in primary lymphocytes infected with human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, 34, 1061-1067.

IV.4. Conclusion

Les modifications structurales effectuées sur la Ribavirine n'ont pas apportées une quelconque amélioration des activités biologiques. L'hypothèse de l'absence d'activité causée par une pénétration cellulaire insuffisante n'apparaît pas comme étant la plus pertinente, car l'ajout d'une chaîne lipophile n'a pas apportée d'amélioration de l'activité.

Plusieurs hypothèses peuvent être faites pour expliquer ce résultat:

- l'absence ou l'insuffisance de la conversion de ces analogues dans leur forme 5'-triphosphate active. En effet, il a été prouvé que l'absence d'hydroxyle en 3' défavorise la conversion des analogues nucléosidiques en leur forme active triphosphate.
- leurs concentrations doivent surmonter les concentrations cellulaires élevées de NTP pour l'incorporation dans les chaînes virales d'ARN ou d'ADN.
- l'importance du groupement 3'-hydroxyle pour l'activité antivirale dans des tests cellulaires a été également réaffirmée par Stuyver *et coll.*¹⁹⁷ En effet, la β -D-N4-hydroxycytidine (Figure 33) s'est avérée avoir des activités antivirales intéressantes, mais ses dérivés 3'-déoxy n'étaient pas efficaces pour inhiber le BVDV et le VHC lors de tests cellulaires.¹⁹⁸

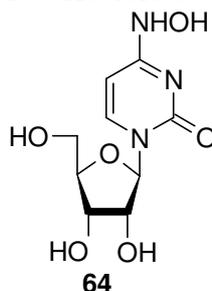


Figure 33 : Formule de la β -D-N4-hydroxycytidine anti-NS5B.

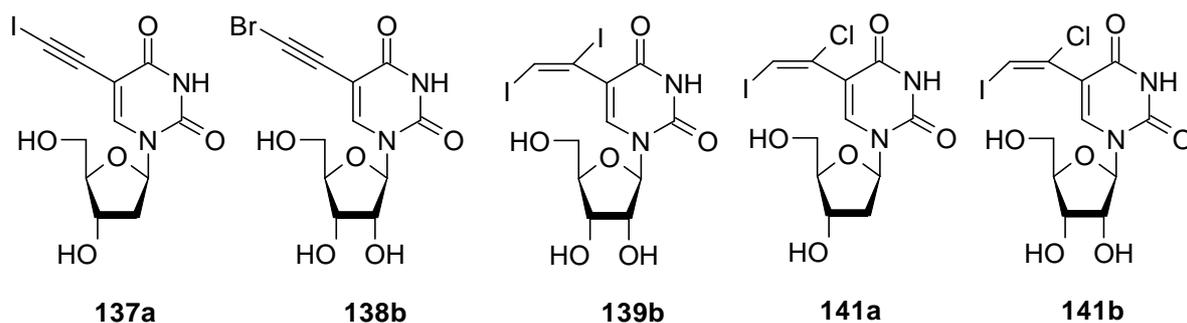
D'autres modifications structurales devront être envisagées pour améliorer l'activité de ces composés.

Conclusion générale

Il existe de nombreux points communs entre le VIH et le VHC. Seul un traitement combiné d'interféron α et de Ribavirine a été approuvé, mais il présente de nombreuses limitations dues à une certaine toxicité, une faible efficacité dépendante du génotype de la personne atteinte et l'apparition de phénomènes de résistance. La résistance du VHC est favorisée par la grande variabilité génétique du VHC (6 génotypes, plus de 50 sous-types), un taux de mutations encore plus élevé que pour le VIH (1/104) et un turn-over viral important (1012 virions/jour). L'étude de la résistance est compliquée par le fait qu'il n'existe pas de système d'infection *in vitro*. Les études *in vitro* reposent donc sur la production de réplicons subgénomiques permettant une réplication autonome dans les lignées cellulaires humaines ou murines, et l'étude de gènes issus d'isolats viraux de différents sous types et génotypes. La résistance concerne les deux gènes codant pour les enzymes impliquées dans la réplication du VHC : la polymérase NS5B et la protéase NS3.

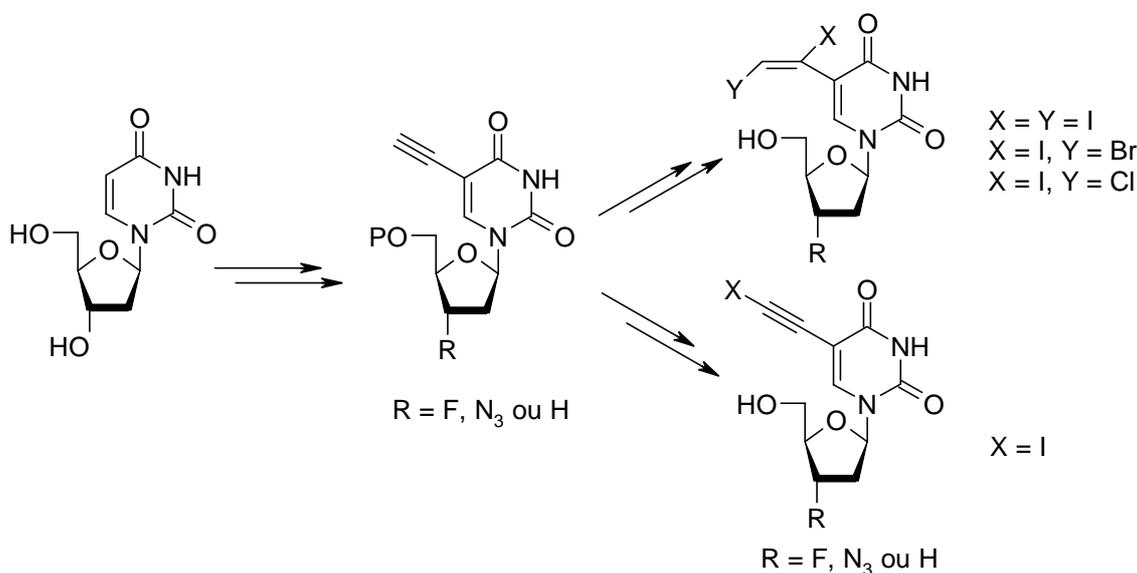
Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la conception et à la synthèse d'analogues de nucléosides visant ces deux enzymes indispensables à la réplication du VHC, et en particulier la polymérase NS5B.

Au cours du chapitre II, des analogues de l'uridine, en série ribosyle, 2'-déoxy- ou 3'-déoxyribosyle, ont ainsi été synthétisés : certains d'entre eux porte une fonction 1,2-dihalovinyle sur la position 5 de l'uracile, obtenus par couplage de Sonogashira et par dihalogénéation d'une triple liaison. La régiosélectivité de la réaction a pu être déterminée par RMN du ^{13}C . Quant à la stéréosélectivité de la réaction, elle est supposée être *anti*. D'autres composés portent un seul halogène sur un groupement éthynyle en position 5 de l'uracile. Concernant l'évaluation biologique de tous ces composés, en résumé, les dérivés 2'-déoxyuridines **137a** et **141a** et les uridines **138b**, **139b** et **141b** ont montré une activité anti-VHC dans le système réplicon du VHC. Finalement, les meilleures activités en terme de SI avec le système réplicon du VHC, mais également en considérant la cytotoxicité sur les lignées cellulaires PBM, CEM et VERO, ont été obtenues pour les composés possédant un groupement (1-chloro,2-iodo)vinyle en position C-5 (**141a** et **141b**) sur leur base hétérocyclique.

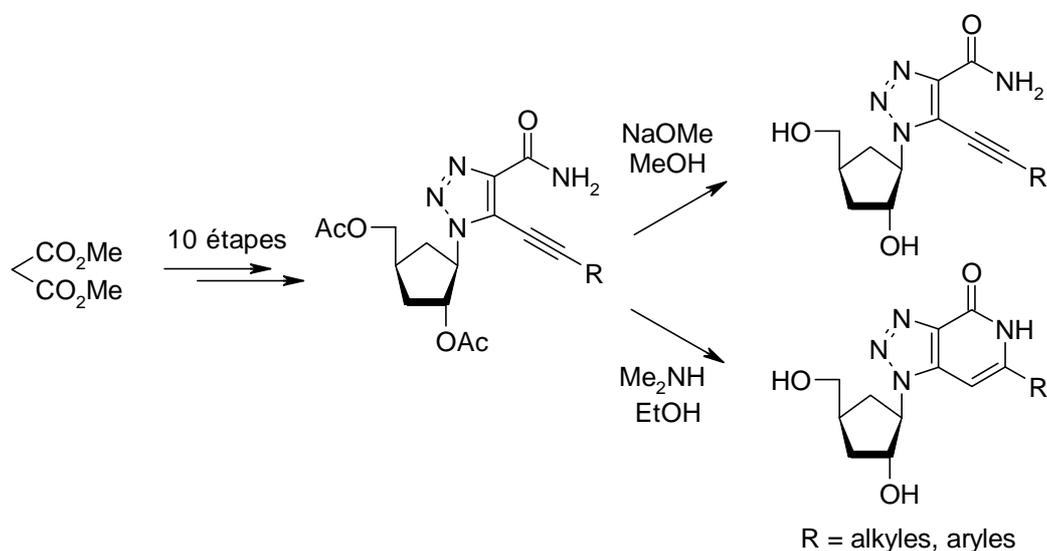


La toxicité importante des composés de la famille des 2'-déoxyuridines est certainement due au fait qu'ils soient substrats d'ADN polymérase cellulaires, leur permettant de s'insérer dans l'ADN en cours d'élongation, induisant ainsi de grandes perturbations dans la cascade métabolique qui suit la synthèse d'ADN dans la cellule. Pour contrer cette limitation, des analogues terminateurs de chaînes de type 2',3'-didéoxynucléoside ont été synthétisés, en série 2',3'-didéoxy-3'-fluoro, 3'-azido-2',3'-didéoxy- et 2',3'-didéoxyribosyle. Globalement, en terme d'activité biologique, l'amélioration apportée par les modifications structurales n'a pas été aussi bénéfique

qu'escomptée : l'activité a été certes maintenue voire améliorée, mais accompagnée d'une toxicité du même ordre de grandeur. Il est alors possible de se demander si l'activité de ces molécules ne proviendrait pas de leur toxicité.



Enfin, au cours du dernier chapitre, la synthèse de dérivés carbocycliques de la Ribavirine a été exposée. Une synthèse malonique, suivie de plusieurs modifications structurales *via* une cycloaddition 1,3-dipolaire et un couplage de Sonogashira, nous a permis d'aboutir à un hétérocycle de la famille 1,2,3-triazole-4-carboxamide substitué en position 5 par un alcyne possédant une chaîne aryle ou alkyle. Au cours de cette synthèse, nous avons pu remarquer les différences de réactivité de l'hétérocycle triazole par rapport à son homologue imidazole, expliquées par la présence de l'atome d'azote supplémentaire au sein du cycle. La dernière étape de la synthèse nous a donné accès, après optimisation, à deux familles de composés suivant les conditions de déprotection appliquées, à savoir des dérivés 1,2,3-triazole par simple déprotection, ou des dérivés 8-aza-3-déazapurine par réaction monotope de déprotection et de cyclisation intramoléculaire. Ces composés n'ont malheureusement présenté aucune activité. Des modifications structurales judicieuses, en accord avec les récentes données de la littérature, pourront être effectuées sur ces molécules pour tenter de leur conférer une activité inhibitrice de la réplication du VHC.



En conclusion, la variabilité génétique du VHC a été considérée comme le déterminant majeur limitant l'efficacité des inhibiteurs du VHC. Par analogie avec les traitements du SIDA, il a été suggéré la possibilité d'utiliser une polythérapie incluant des inhibiteurs ciblant différentes enzymes du cycle de réplication du virus, telles que la NS3 protéase et la NS5B polymérase dans le cas du VHC, en association après un traitement d'induction qui continuerait à comporter de l'interféron. Nul doute que les analogues de nucléosides continueront à jouer un rôle important dans l'amélioration du traitement de la maladie causée par le VHC.

Partie expérimentale

METHODES GENERALES

Les manipulations en milieu anhydre sont effectuées dans de la verrerie flambée ou séchée à l'étuve, avec des solvants anhydres et sous atmosphère inerte (argon). Les solvants sont distillés selon les procédés décrits par D. D. Perrin, W. L. F. Armarego et D. R. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon, Oxford, 1986.

Ainsi le CH_2Cl_2 est distillé sur CaH_2 . Le benzène, le toluène et le THF sont distillés sur sodium / benzophénone. Le DMF, l'acétonitrile sont simplement séchés et conservés sur du tamis moléculaire.

Les contrôles chromatographiques sur couche mince sont réalisés sur des feuilles d'aluminium recouvertes de silice E. Merck 60F₂₅₄ (épaisseur 0.2 mm). La visualisation est effectuée sous une lampe UV à 254 nm et 365 nm suivie (si nécessaire) d'une immersion dans un mélange $\text{EtOH} / \text{H}_2\text{O} / \text{H}_2\text{SO}_4$ puis chauffage au moyen d'un décapeur thermique.

Les séparations chromatographiques flash sont effectuées sur gel de silice E. Merck (0,036-0,063 mm) sous pression d'azote.

Les points de fusion sont mesurés sur un banc de Köfler et ne sont pas corrigés.

Les spectres infra rouge (IR) sont enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer FT PARAGON 1000 PC. Les échantillons sont préparés sous forme de pastille de bromure de potassium pour les solides et sous forme de film entre deux pastilles de chlorure de sodium pour les huiles et les gommes. La longueur d'onde des bandes les plus intenses est exprimée en cm^{-1} .

Les pouvoirs rotatoires optiques sont déterminés à 25°C au moyen d'un polarimètre Perkin-Elmer (modèle 41).

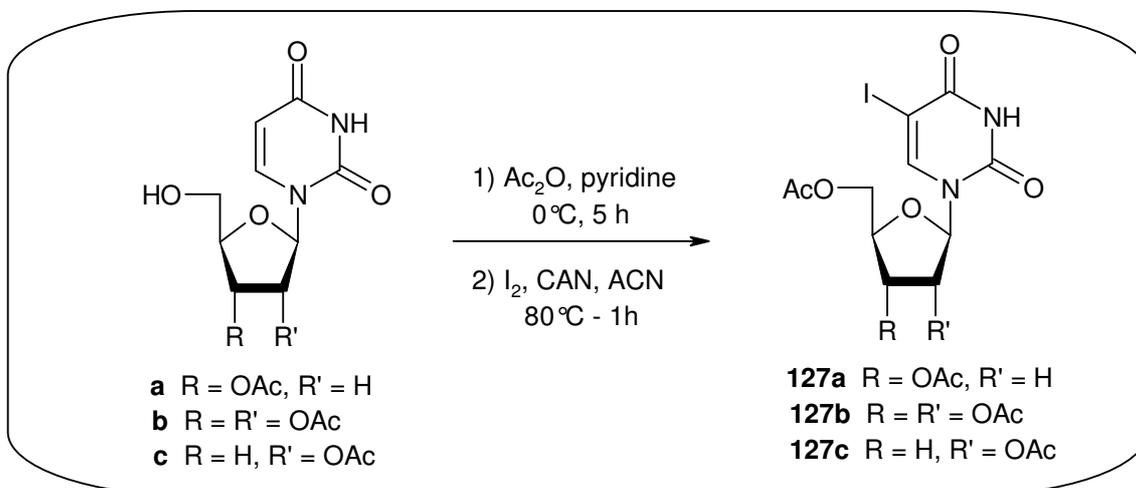
Les spectres de RMN sont enregistrés à 250 MHz pour le proton et à 62,89 MHz pour le carbone à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance DPX 250. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) en utilisant le TMS comme référence interne et les constantes de couplage (J) en Hertz (Hz). La multiplicité est exprimée de la manière suivante : singulet (s), singulet élargi (se), doublet (d), doublet de doublet (dd), triplet (t), quadruplet (q), quintuplet (qt), sextuplet (sxt), septuplet (spt), multiplet (m). La présence de protons échangeables (alcools, amines) est confirmée par ajout de D_2O .

Les spectres ultra-violet (UV) sont enregistrés sur un spectrophotomètre Beckman DU-640.

Les spectres de masses sont réalisés sur un spectromètre Perkin-Elmer SCIEX de type API 3000, les échantillons sont ionisés par des techniques Ionspray® (IS) en mode positif (+). Les spectres de masse haute résolution (HRMS) sont réalisés au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest.

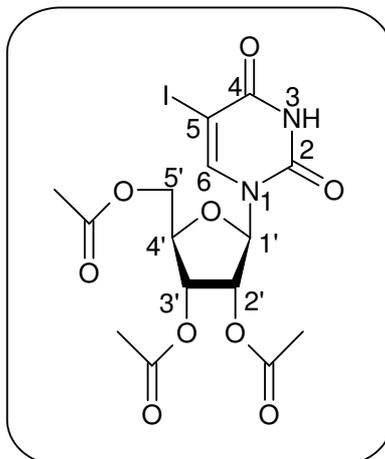
Mode opératoire général N°1 :

Réaction d'iodation en position 5 de l'uracile sur les nucléosides acétylés



Les groupements hydroxyles du nucléoside sont protégés par acétylation dans la pyridine (10 mL par g de produit) à 0°C, en présence d'un large excès d'anhydride acétique (40 éq.), sous agitation pendant 5h. Après ajout de méthanol (40 éq.), la solution est laissée à 0°C sous agitation pendant 4h, puis les solvants sont évaporés sous pression réduite pour donner le nucléoside acétylé pur (rendement quantitatif), qui est utilisé directement sans purification supplémentaire. A une solution du nucléoside acétylé (15 mmol) dans l'acétonitrile sec (150 mL) est ajouté le CAN (4.94 g, 0.6 éq.) et l'iode (2.28 g, 0.6 éq.), puis le mélange réactionnel est porté à reflux pendant une heure. Après retour à ta, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu huileux est dissout dans l'acétate d'éthyle (300 mL) et l'eau (50 mL). La solution basique est refroidie par un bain d'eau glacée et une solution saturée de sodium bisulfite est ajoutée lentement jusqu'à décoloration complète. La phase organique est lavée à l'eau (50 mL x2) et avec une solution saturée de chlorure de sodium (50mL), séchée sur MgSO_4 et filtrée, puis concentrée sous pression réduite pour donner le produit pur iodé.

**Ester méthylique du 3,4-diacétoxy-5-(5-iodo-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-
tétrahydro-furan-2-yl 127b**



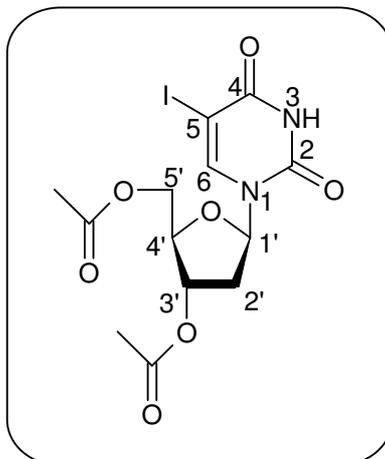
Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°1 (page 161) à l'uridine fournit **127b** (90 %) sous forme de solide jaune.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.06 (s, 3H, OAc), 2.13 (s, 3H, OAc), 2.25 (s, 3H, OAc), 4.40 (m, 3H, H-4',5'), 5.36 (m, 2H, H-2',H-3'), 6.12 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H-1'), 7.97 (s, 1H, H-6), 7.87 (s, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.2 (COCH₃), 20.3 (COCH₃), 20.7 (COCH₃), 62.8 (C-2'), 68.8 (C-5), 69.9 (C-5'), 73.1 (C-3'), 80.1 (C-1'), 82.3 (C-4'), 142.7 (C-6), 149.2 (C-2), 161.0 (C-4), 169.4 (C=O), 169.5 (C=O), 170.0 (C=O).

**Ester méthylique du 3-acétoxy-5-(5-iodo-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-
tétrahydro-furan-2-yl 127a**



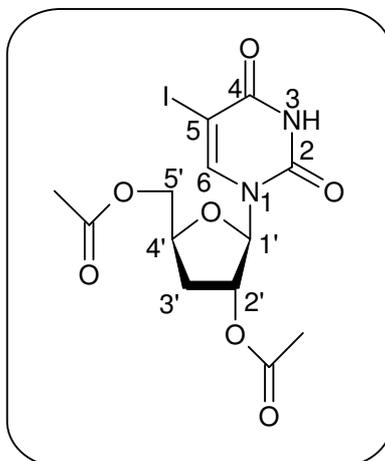
Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°1 (page 161) à la 2'-déoxyuridine fournit **127a** (88 %) sous forme de solide jaune.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.06 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.25 (m, 1H, H-2'b), 2.55 (m, 1H, H-2'a), 4.30-4.45 (m, 3H, H-4',5'), 5.30 (m, 1H, H-3'), 6.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-1'), 8.03 (s, 1H, H-6), 11.72 (se, 1H, NH) ;

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.9 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 38.5 (C-2'), 63.9 (C-5'), 68.7 (C-5), 74.0 (C-3'), 82.4 (C-1'), 85.7 (C-4'), 142.9 (C-6), 149.2 (C-2), 161.1 (C-4), 170.3 (C=O), 170.5 (C=O).

**Ester méthylique du 4-acétoxy-5-(5-iodo-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-
tétrahydro-furan-2-yl 127c**



Mode opératoire :

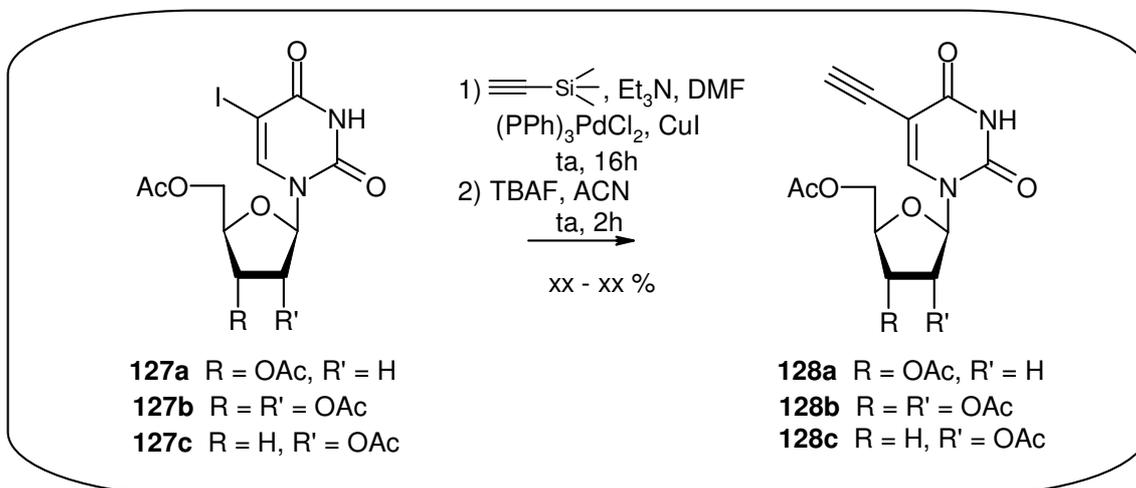
L'application du mode opératoire général N°1 (page 161) à la 3'-déoxyuridine fournit **127c** (89 %) sous forme de solide jaune.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.13 (s, 3H, OAc), 2.23 (s, 3H, OAc), 1.95-2.31 (m, 2H, H-3'), 4.33 (dd, *J* = 12.8, 3.8 Hz, 1H, H-5'b), 4.41 (dd, *J* = 12.8, 2.8 Hz, 1H, H-5'a), 4.55 (m, 1H, H-4'), 5.30 (m, 1H, H-2'), 5.82 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-1'), 7.93 (s, 1H, H-6), 9.53 (se, 1H, NH) ;

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 21.0 (COCH₃), 21.4 (COCH₃), 32.0 (C-3'), 63.9 (C-5'), 68.7 (C-5), (C-2'), 78.5 (C-1'), 91.4 (C-4'), 144.5 (C-6), 149.9 (C-2), 160.1 (C-4), 170.1 (C=O), 170.7 (C=O);

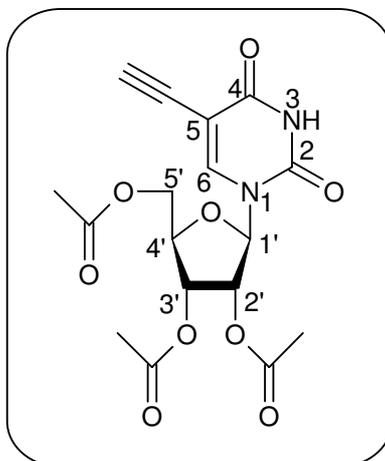
Mode opératoire général N°2 :

Réaction de couplage de Sonogashira et désilylation



Le nucléoside iodé (5.0 mmol) est dissout sous argon dans un mélange de diméthylformamide sec (15 mL), de triéthylamine sèche (2.06 mL, 15.0 mmol), et de triméthylsilylacétylène (2.06 mL, 15.0 mmol). De l'iodure de cuivre (190.0 mg, 1.0 mmol) et du PdCl₂(PPh₃)₂ (350 mg, 0.5 mmol) sont ajoutés et le mélange réactionnel est laissé sous agitation à ta sous argon pendant 16h. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le brut réactionnel est purifié par une première colonne chromatographie sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂ puis CH₂Cl₂ / MeOH : 95/5) pour donner le produit désiré contaminé par des produits secondaires colorés. Le produit pur portant l'alcyne silylé, obtenu après une deuxième colonne chromatographie sur gel de silice (éluant : EP / AE : 7/3 à 5/5), est solubilisé dans l'acétonitrile sec (24.0 mL), puis mis en présence de fluorure de tétrabutyle ammonium (303.4 mg, 1.16 mmol), et le mélange réactionnel est agité à ta pendant 2h. L'acétonitrile est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif, et le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice (éluant : EP / AE : 5/5 puis AE puis AE / MeOH : 98/2) pour donner le nucléoside 5-éthényle pur.

Ester méthylique du 3,4-diacétoxy-5-(5-éthynyl-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-tétrahydro-furan-2-yl 128b



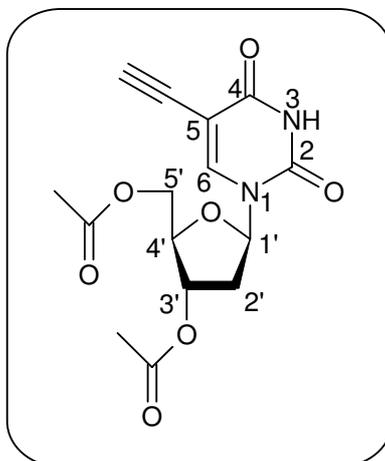
Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°2 (page 165) à **127b** fournit **128b** (80 %) sous forme de solide jaune pâle.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.05 (s, 3H, OAc), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.25 (s, 3H, OAc), 3.23(s, 1H, CH alcyne), 4.40 (m, 3H, H-4',5'), 5.36 (m, 2H, H-2',H-3'), 6.09 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H-1'), 7.31 (s, 1H, H-6), 7.87 (s, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.2 (COCH₃), 20.3 (COCH₃), 20.7 (COCH₃), 62.8 (C-2'), 69.9 (C-5'), 73.1 (C-3'), 74.5 (CH alcyne), 80.1 (C-1'), 82.3 (C-4'), 87.5 (C), 100.0 (C-5), 142.7 (C-6), 149.2 (C-2), 161.0 (C-4), 169.4 (C=O), 169.5 (C=O), 170.0 (C=O).

**Ester méthylique du 3-acétoxy-5-(5-éthynyl-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-
tétrahydro-furan-2-yl 128a**



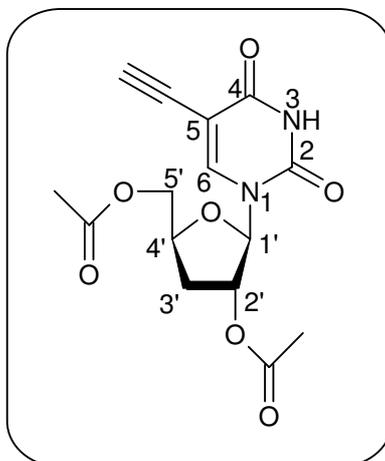
Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°2 (page 165) à **127a** fournit **128a** (74 %) sous forme de solide jaune pâle.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.05 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.25 (m, 1H, H-2'b), 2.55 (m, 1H, H-2'a), 3.21 (s, 1H, CH alcyne), 4.30-4.45 (m, 3H, H-4',5'), 5.25 (m, 1H, H-3'), 6.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-1'), 7.93 (s, 1H, H-6), 9.04 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.9 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 38.5 (C-2'), 63.9 (C-5'), 74.0 (C-3'), 74.6 (CH alcyne), 82.4 (C-1'), 85.7 (C-4'), 99.8 (C-5), 142.9 (C-6), 149.2 (C-2), 161.1 (C-4), 170.3 (C=O), 170.5 (C=O),

**Ester méthylique du 4-acétoxy-5-(5-éthynyl-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-
tétrahydro-furan-2-yl 128c**



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°2 (page 165) à **127c** fournit **128c** (75 %) sous forme de solide jaune pâle.

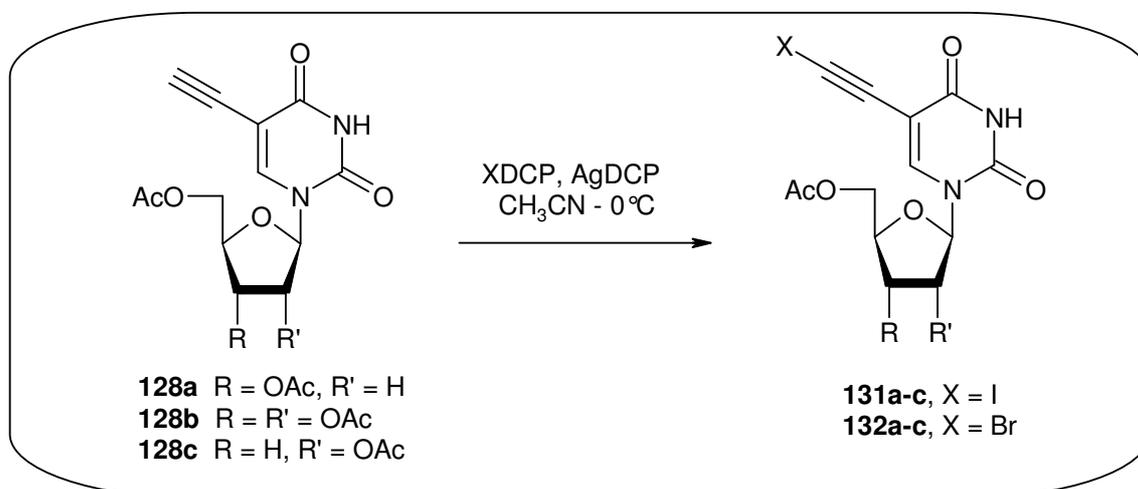
RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.05 (s, 3H, OAc), 2.12 (s, 3H, OAc), 1.95-2.31 (m, 2H, H-3'), 3.1 (s, 1H, CH alcyne), 4.25 (dd, J = 12.5, 3.4 Hz, 1H, H-5'b), 4.35 (dd, J = 12.5, 1.8 Hz, 1H, H-5'a), 4.48 (m, 1H, H-4'), 5.31 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-2'), 5.78 (s, 1H, H-1'), 7.88 (s, 1H, H-6), 9.8 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.8 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 31.6 (C-3'), 63.6 (C-5'), 74.9 (C-2'), 78.6 (CH alcyne), 82.2 (C-1'), 91.1 (C-4'), 98.9 (C-5), 143.4 (C-6), 149.1 (C-2), 161.6 (C-4), 169.9 (C=O), 170.6 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₆N₂O₇Na, calculée m/z 360.2968, observée m/z 360.2971.

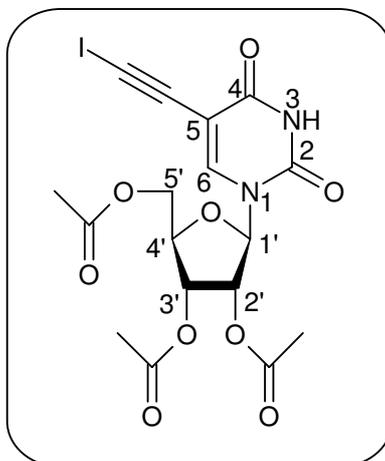
Mode opératoire général N°3 :

Réaction de mono-halogénéation sur le dérivé 5-éthynyle uracile



Le nucléoside de type 5-éthynyle uracile (0.5 mmol) est dissout dans l'acétonitrile sec (5.0 mL), de l'hydrogénocarbonate de sodium (0,5 g) est ajouté et la mélange réactionnel est refroidi à 0°C par un bain d'eau glacé. Une solution du réactif de monohalogénéation (soit IDCP ou BrDCP, 0.7 mmol) et d'AgDCP (0.025 mmol) dans l'acétonitrile sec (1.0 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C et le mélange réactionnel est maintenu sous agitation jusqu'en fin de réaction (typiquement 2h-20h, vérifiée par ccm). Le mélange réactionnel est ensuite quenché à 0°C par une solution saturée de bisulfite de sodium (2 mL) puis extrait à l'acétate d'éthyle (10 mL x3). Les phases organiques sont ensuite réunies, lavées à l'eau (5 mL x2), à l'acide chlorhydrique 1M (5 mL x3), à l'eau (5 mL x2), et avec une solution de chlorure de sodium saturée (10 mL), séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner un résidu, qui est soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP / AE : 8/2 à 3/7) pour donner le nucléoside mono-halogéné désiré.

Ester méthylique du 3,4-diacétoxy-5-(5-iodoéthynyl-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-tétrahydro-furan-2-yl 131b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°3 (page 169) à **128b** (avec IDCP) fournit **131b** (68 %) sous forme de solide jaune pâle.

$[\alpha]_D^{20}$ -71 (c 1.0, CHCl₃);

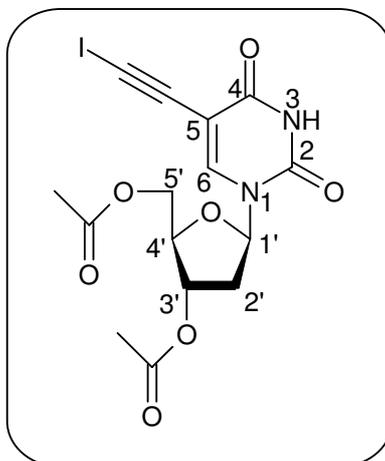
Point de fusion : 100-102°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.12 (s, 3H x2, OAc x2), 2.25 (s, 3H, OAc), 4.38 (m, 3H, H-4',5'), 5.35 (m, 2H, H-2',H-3'), 6.07 (d, J = 4.6 Hz, 1H, H-1'), 7.91 (s, 1H, H-6), 9.41 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.5 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 21.5 (CCI), 62.9 (C-5'), 69.9 (C-3'), 73.4 (C-2'), 80.2 (C-4'), 84.5 (CCI), 87.6 (C-1'), 101.5 (C-5), 143.3 (C-6), 149.2 (C-2), 161.1 (C-4), 169.6 (C=O), 169.7 (C=O), 170.2 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₇H₁₇IN₂O₉Na, calculée m/z 544.2352, observée m/z 544.2349.

Ester méthylique du 3-acetoxy-5-(5-iodoéthynyl-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-tétrahydro-furan-2-yl 131a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°3 (page 169) à **128a** (avec IDCP) fournit **131a** (93 %) sous forme de solide jaune pâle.

$[\alpha]_D^{20}$ -32 (c 0.5, CHCl₃);

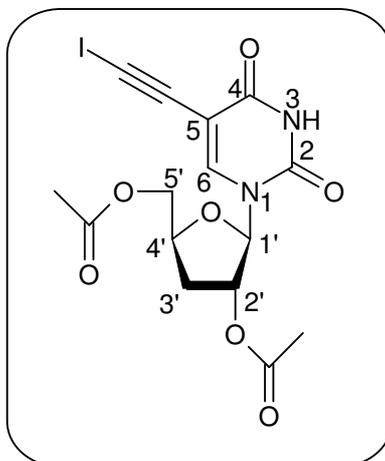
Point de fusion : 175-177°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.05 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.31 (m, 1H, H-2'b), 2.55 (m, 1H, H-2'a), 4.15-4.33 (m, 3H, H-4',5'), 5.20 (m, 1H, H-3'), 6.12 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-1'), 8.02 (s, 1H, H-6), 11.68 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.5 (C-CI), 21.4 (COCH₃), 21.6 (COCH₃), 36.9 (C-2'), 64.4 (C-5'), 74.4 (C-3'), 82.3 (C-4'), 85.1 (C-CI), 85.6 (C-1'), 99.8 (C-5), 145.4 (C-6), 149.2 (C-2), 161.5 (C-4), 170.8 (C=O), 171.1 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₅IN₂O₇Na, calculée m/z 486.1982, observée m/z 486.1986.

Ester méthylique du 4-acétoxy-5-(5-iodoéthynyl-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-tétrahydro-furan-2-yl 131c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°3 (page 169) à **128c** (avec IDCP) fournit **131c** (76 %) sous forme d'huile jaune.

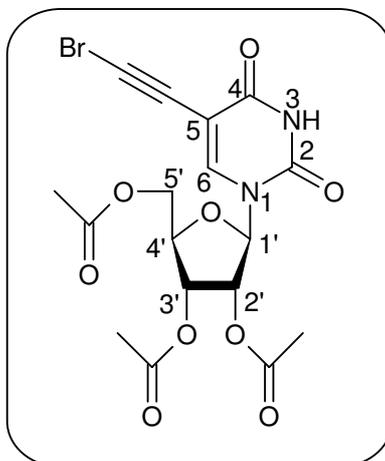
$[\alpha]_D^{20}$ -49 (c 0.8, CHCl₃);

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.05 (s, 3H, OAc), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.31-1.95 (m, 2H, H-3'), 4.28 (se, 2H, H-5'), 4.43 (m, 1H, H-4'), 5.30 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-2'), 5.74 (s, 1H, H-1'), 7.98 (s, 1H, H-6), 11.68 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.4 (C-CI), 20.7 (COCH₃), 20.7 (COCH₃), 31.4 (C-3'), 63.7 (C-5'), 77.2 et 77.9 (C-2' et C-4'), 84.8 (C-CI), 90.4 (C-1'), 99.1 (C-5), 144.7 (C-6), 149.1 (C-2), 161.8 (C-4), 169.6 (C=O), 170.1 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₅IN₂O₇Na, calculée m/z 486.1982, observée m/z 486.1986.

Ester méthylique du 3,4-diacétoxy-5-(5-bromoéthynyl-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-tétrahydro-furan-2-yl 132b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°3 (page 169) à **128b** (avec BrDCP) fournit **132b** (58 %) sous forme d'huile incolore.

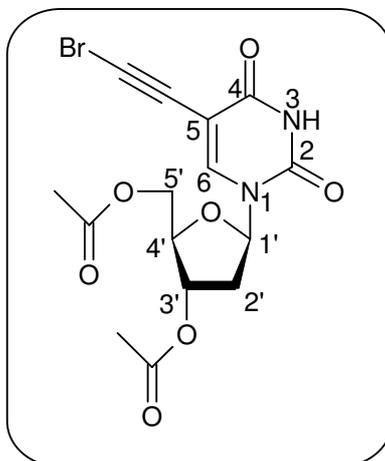
$[\alpha]_D^{20}$ -59 (c 0.4, CHCl₃);

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.12 (s, 3H x2, OAc x2), 2.22 (s, 3H, OAc), 4.37 (m, 3H, H-4',5'), 5.35 (m, 2H, H-2',3'), 6.07 (d, J = 4.4 Hz, 1H, H-1'), 7.92 (s, 1H, H-6), 9.75 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.5 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 20.8 (COCH₃), 55.1 (CCBr), 62.9 (C-5'), 69.9 (C-3'), 71.1 (CCBr), 73.4 (C-2'), 80.1 (C-4'), 87.7 (C-1'), 100.8 (C-5), 142.9 (C-6), 149.2 (C-2), 161.1 (C-4), 169.6 (C=O), 169.7 (C=O), 170.3 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₇H₁₇BrN₂O₉Na, calculée m/z 497.2348, observée m/z 497.2351

Ester méthylique du 3-acétoxy-5-(5-bromoéthynyl-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-tétrahydro-furan-2-yl 132a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°3 (page 169) à **128a** (avec BrDCP) fournit **132a** (21 %) sous forme d'huile jaune.

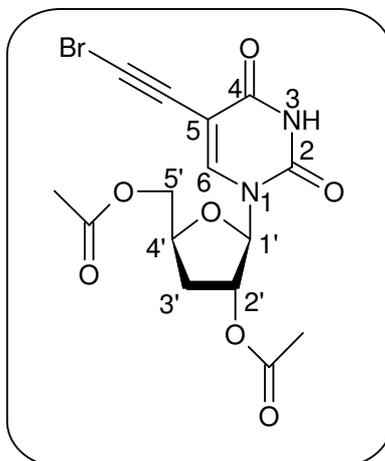
$[\alpha]_D^{20}$ -68 (c 1.0, CHCl₃);

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.12 (s, 3H, OAc), 2.18 (s, 3H, OAc), 2.31 (m, 1H, H-2'b), 2.55 (m, 1H, H-2'a), 4.30-4.38 (m, 3H, H-4',5'), 5.25 (m, 1H, H-3'), 6.31 (dd, *J* = 7.3, 6.4 Hz, 1H, H-1'), 7.95 (s, 1H, H-6), 8.88 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.8 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 38.5 (C-2'), 54.9 (CCBr), 63.8 (C-5'), 71.2 (CCBr), 73.9 (C-3'), 82.8 (C-4'), 85.7 (C-1'), 100.5 (C-5), 142.9 (C-6), 149.0 (C-2), 160.9 (C-4), 170.2 (C=O), 170.5 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₅BrN₂O₇Na, calculée m/z 439.1978, observée m/z 439.1981.

Ester méthylique du 4-acétoxy-5-(5-bromoéthynyl-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-tétrahydro-furan-2-yl 132c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°3 (page 169) à **128c** (avec BrDCP) fournit **132c** (25 %) sous forme d'huile jaune.

$[\alpha]_D^{20}$ -52 (c 0.4, CHCl₃);

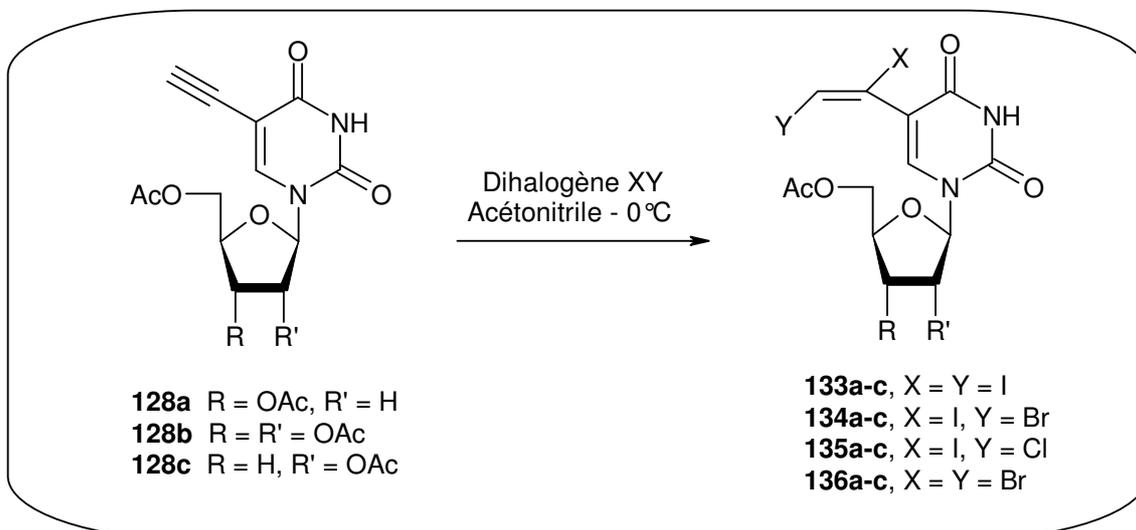
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 2.06 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 1.95-2.31 (m, 2H, H-3'), 4.28 (se, 2H, H-5'), 4.43 (m, 1H, H-4'), 5.31 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-2'), 5.85 (s, 1H, H-1'), 8.07 (s, 1H, H-6), 11.75 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 20.5 (COCH₃), 20.7 (COCH₃), 31.4 (C-3'), 55.1 (C-CBr), 63.7 (C-5'), 72.6 (C-CBr), 77.2 et 78.0 (C-2' et C-4'), 90.4 (C-1'), 97.9 (C-5), 144.7 (C-6), 149.1 (C-2), 161.6 (C-4), 169.6 (C=O), 170.1 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₅BrN₂O₇Na, calculée m/z 439.1978, observée m/z 439.1975.

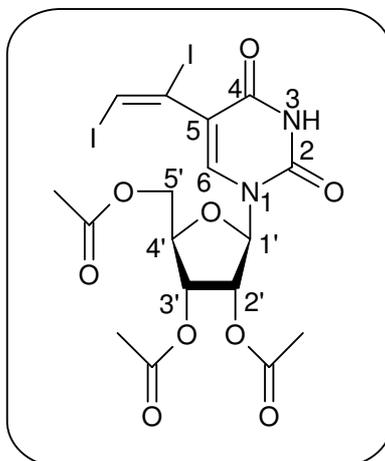
Mode opératoire général N°4 :

Réaction de di-halogénéation sur le dérivé 5-vinyle uracile



Une solution du nucléoside de type 5-éthynyle uracile (0.5 mmol) dans l'acétonitrile sec (5.0 mL) est refroidie à 0°C par un bain d'eau glacé. Une solution du réactif dihalogéné (soit I₂, Br₂, IBr ou ICl; 0.6 mmol) dans l'acétonitrile sec (1.0 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C et le mélange réactionnel est maintenu sous agitation jusqu'en fin de réaction (typiquement 15 minutes à 2 h, vérifiée par ccm). Le mélange réactionnel est ensuite quenché à 0°C par une solution saturée de bisulfite de sodium (2 mL) puis extrait à l'acétate d'éthyle (10 mL x3). Les phases organiques sont ensuite réunies, lavées à l'eau (5 mL x2) et avec une solution de chlorure de sodium saturée (10 mL), séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner un résidu, qui est soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'élution (EP / AE : 8/2 à 3/7) pour donner le nucléoside dihalogéné désiré.

Ester méthylique du 3,4-diacétoxy-5-[5-(1,2-diiodo-vinyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-tétrahydro-furan-2-yl 133b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°4 (page 176) à **128b** (avec I₂) fournit **133b** (98 %) sous forme de solide.

$[\alpha]_D^{20}$ -41 (c 1.0, CHCl₃);

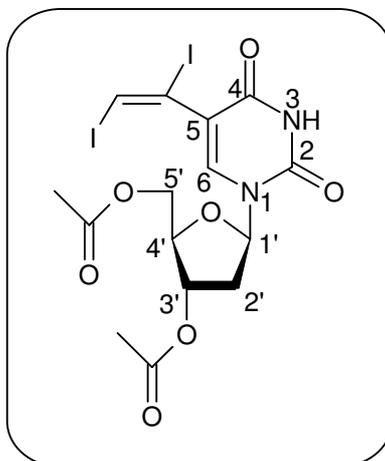
Point de fusion : 83-85°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.11 (s, 3H, OAc), 2.14 (s, 3H, OAc), 2.19 (s, 3H, OAc), 4.38 (se, 3H, H-4',5'), 5.36 (m, 2H, H-2',3'), 6.15 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H-1'), 7.40 (s, 1H, CH alcène), 7.58 (s, 1H, H-6), 9.56 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.5 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 21.2 (COCH₃), 63.2 (C-5'), 70.2 (C-3'), 73.3 (C-2'), 80.2 (C-4'), 85.3 (C=alcène), 87.2 et 87.5 (C-1' et CHI alcène), 118.3 (C-5), 139.2 (C-6), 149.7 (C-2), 159.1 (C-4), 169.7 (C=O), 169.7 (C=O), 170.3 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₇H₁₈I₂N₂O₉Na, calculée m/z 672.1476, observée m/z 672.1480.

Ester méthylique du 3-acétoxy-5-[5-(1,2-diiodo-vinyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-tétrahydro-furan-2-yl 133a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°4 (page 176) à **128a** (avec I₂) fournit **133a** (94 %) sous forme de solide.

$[\alpha]_D^{20}$ -19 (c 0.3, CHCl₃);

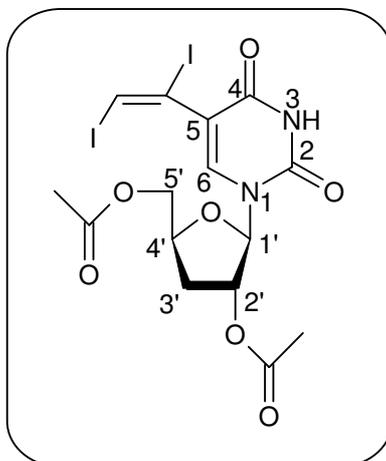
Point de fusion : 76-78°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.08 (s, 3H, OAc), 2.17 (s, 3H, OAc), 2.30 (m, 1H, H-2'b), 2.60 (m, 1H, H-2'a), 4.28-4.50 (m, 3H, H-4',5'), 5.25 (m, 1H, H-3'), 6.36 (dd, $J = 8.1, 5.6$ Hz, 1H, H-1'), 7.45 (s, 1H, CH alcène), 7.67 (s, 1H, H-6), 9.72 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 21.0 (COCH₃), 21.2 (COCH₃), 38.5 (C-2'), 64.0 (C-5'), 74.2 (C-3'), 82.6 (C-4'), 85.5 (C-1'), 85.8 (C), 87.2 (CH alcène), 118.0 (C-5), 139.2 (C-6), 149.7 (C-2), 159.2 (C-4), 170.3 (C=O), 170.5 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₆I₂N₂O₇Na, calculée m/z 614.1106 observée m/z 614.1110.

Ester méthylique du 4-acétoxy-5-[5-(1,2-diiodo-vinyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-tétrahydro-furan-2-yl 133c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°4 (page 176) à **128c** (avec I₂) fournit **133c** (87 %) sous forme de solide.

$[\alpha]_D^{20}$ -23 (c 0.3, CHCl₃);

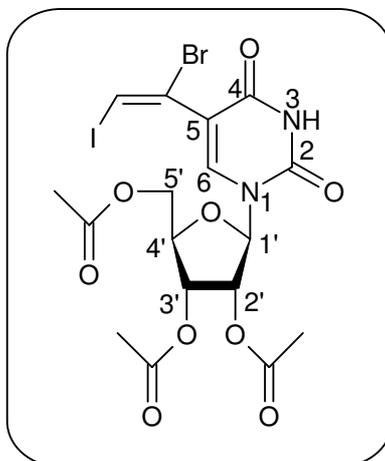
Point de fusion : 75-77°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.12 (s, 3H, OAc), 2.14 (s, 3H, OAc), 1.95-2.31 (m, 2H, H-3'), 4.33 (dd, 1H, H-5'b), 4.44 (dd, $J = 12.5, 4.4$ Hz, 1H, H-5'a), 4.58 (m, 1H, H-2'), 5.38 (m, 1H, H-4'), 5.92 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-1'), 7.39 (s, 1H, CH alcène), 7.64 (s, 1H, H-6), 9.38 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 21.0 (COCH₃), 21.1 (COCH₃), 32.3 (C-3'), 64.1 (C-5'), 77.8 et 78.5 (C-2' et C-4'), 85.9 (C), 87.3 (C-1'), 91.4 (CH alcène), 117.5 (C-5), 139.7 (C-6), 149.3 (C-2), 159.2 (C-4), 170.0 (C=O), 170.6 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₆I₂N₂O₇Na, calculée m/z 567.1106 observée m/z 567.1101.

Ester méthylique du 3,4-diacétoxy-5-[5-(1-bromo-2-iodo-vinyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-tétrahydro-furan-2-yl 134b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°4 (page 176) à **128b** (avec IBr) fournit **134b** (92 %) sous forme de solide.

$[\alpha]_D^{20}$ -39 (c 2.0, CHCl₃);

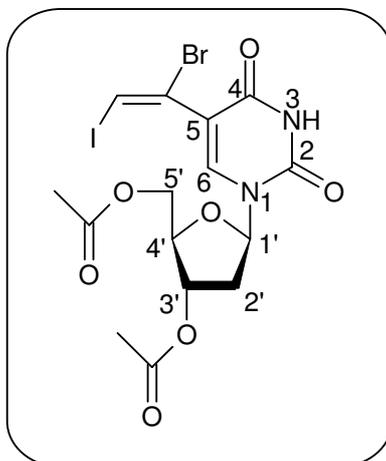
Point de fusion : 86-88°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.13 (s, 3H, OAc), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.18 (s, 3H, OAc), 4.38 (m, 3H, H-4',5'), 5.38 (m, 2H, H-2',3'), 6.15 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-1'), 7.15 (s, 1H, CH alcène), 7.66 (s, 1H, H-6), 9.57 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.5 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 63.2 (C-5'), 70.2 (C-3'), 73.3 (C-2'), 80.3 (C-4'), 82.4 (CH alcène), 87.3 (C-1'), 113.8 (CBr alcène), 115.5 (C-5), 140.8 (C-6), 149.7 (C-2), 158.9 (C-4), 169.7 (C=O), 169.7 (C=O), 170.3 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₇H₁₈BrIN₂O₉Na, calculée m/z 625.1469 observée m/z 625.1473.

Ester méthylique du 3-acétoxy-5-[5-(1-bromo-2-iodo-vinyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-tétrahydro-furan-2-yl 134a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°4 (page 176) à **128a** (avec IBr) fournit **134b** (96 %) sous forme de solide jaune.

$[\alpha]_D^{20}$ -14 (c 4.0, CHCl₃);

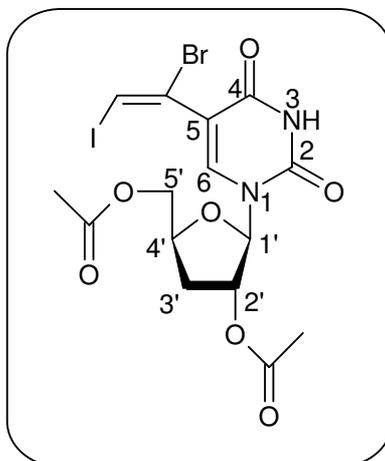
Point de fusion : 82-84°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.96 (s, 3H, OAc), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.20 (m, 1H, H-2'b), 2.58 (m, 1H, H-2'a), 4.05-4.50 (m, 3H, H-4', 5'), 5.28 (m, 1H, H-3'), 6.25 (dd, $J = 8.1, 5.6$ Hz, 1H, H-1'), 7.08 (s, 1H, CH alcène), 7.71 (s, 1H, H-6), 9.78 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 21.0 (COCH₃), 21.2 (COCH₃), 38.5 (C-2'), 64.0 (C-5'), 74.2 (C-3'), 82.6 (C-4'), 85.5 (C-1'), 85.8 (C), 87.2 (CH alcène), 118.0 (C-5), 139.2 (C-6), 149.7 (C-2), 159.2 (C-4), 170.3 (C=O), 170.5 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₆BrIN₂O₇Na, calculée m/z 567.1102 observée m/z 567.1107.

Ester méthylique du 4-acétoxy-5-[5-(1-bromo-2-iodo-vinyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-tétrahydro-furan-2-yl 134c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°4 (page 176) à **128c** (avec IBr) fournit **134c** (89 %) sous forme d'huile jaune.

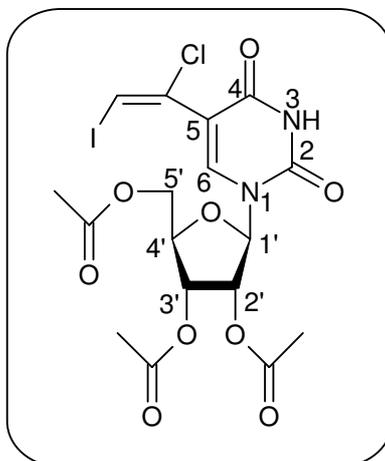
$[\alpha]_D^{20}$ -19 (c 0.5, CHCl₃);

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.14 (s, 3H, OAc), 2.16 (s, 3H, OAc), 1.95-2.31 (m, 2H, H-3'), 4.33 (dd, $J = 12.4, 4.4$ Hz, 1H, H-5'b), 4.44 (dd, $J = 12.4, 2.6$ Hz, 1H, H-5'a), 4.58 (m, 1H, H-2'), 5.38 (m, 1H, H-4'), 5.92 (s, 1H, H-1'), 7.13 (s, 1H, CH alcène), 7.61 (s, 1H, H-6), 9.63 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 21.0 (COCH₃), 21.1 (COCH₃), 32.2 (C-3'), 64.0 (C-5'), 77.8 et 78.5 (C-2' et C-4'), 82.4 (CH alcène), 91.4 (C-1'), 114.3 et 114.6 (C et C-5), 141.2 (C-6), 149.4 (C-2), 159.3 (C-4), 170.0 (C=O), 170.6 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₆I₂N₂O₇Na, calculée m/z 567.1102 observée m/z 567.1105.

Ester méthylique du 3,4-diacétoxy-5-[5-(1-chloro-2-iodo-vinyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-tétrahydro-furan-2-yl 135b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°4 (page 176) à **128b** (avec ICl) fournit **135b** (97 %) sous forme de solide.

$[\alpha]_D^{20}$ -27 (c 0.8, CHCl₃);

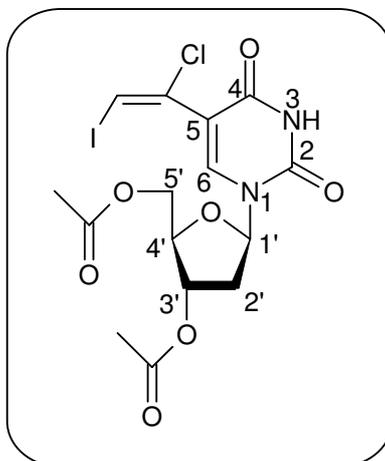
Point de fusion : 85-87°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.12 (s, 3H, OAc), 2.14 (s, 3H, OAc), 2.17 (s, 3H, OAc), 4.38 (m, 3H, H-4',5'), 5.36 (m, 2H, H-2',3'), 6.15 (se, 1H, H-1'), 6.92 (s, 1H, CH alcène), 7.68 (s, 1H, H-6), 9.43 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.5 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 63.2 (C-5'), 70.2 (C-3'), 73.3 (C-2'), 80.3 (C-4'), 80.6 (CHI alcène), 87.3 (C-1'), 114.2 (C=C alcène), 127.4 (C-5), 141.2 (C-6), 149.6 (C-2), 158.9 (C-4), 169.7 (C=O), 169.8 (C=O), 170.2 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₇H₁₈ClIN₂O₉Na, calculée m/z 580.6962 observée m/z 580.6958.

Ester méthylique du 3-acétoxy-5-[5-(1-chloro-2-iodo-vinyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-tétrahydro-furan-2-yl 135a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°4 (page 176) à **128a** (avec ICl) fournit **135a** (91 %) sous forme de solide jaune.

$[\alpha]_D^{20}$ -14 (c 0.7, CHCl₃);

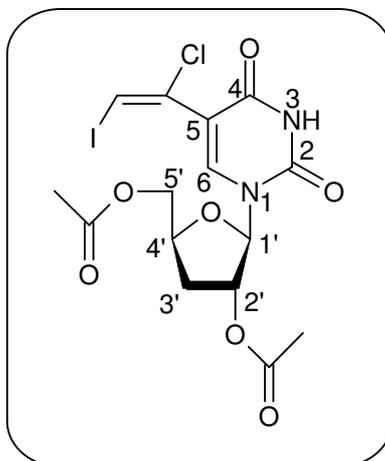
Point de fusion : 81-83°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.13 (s, 2 x 3H, 2 x OAc), 2.18 (m, 1H, H-2'b), 2.75 (m, 1H, H-2'a), 4.50-4.30 (m, 3H, H-4',5'), 5.24 (m, 1H, H-3'), 6.32 (m, 1H, H-1'), 6.91 (s, 1H, CH alcène), 7.75 (s, 1H, H-6), 9.28 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 21.0 (COCH₃), 21.2 (COCH₃), 38.6 (C-2'), 64.0 (C-5'), 74.2 (C-3'), 80.5 (CH alcène), 82.7 (C-4'), 85.6 (C-1'), 113.4 (C-5), 127.6 (C), 141.2 (C-6), 149.6 (C-2), 159.1 (C-4), 170.3 (C=O), 170.5 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₆ClIN₂O₇Na, calculée m/z 522.6592 observée m/z 522.6597.

Ester méthylique du 4-acétoxy-5-[5-(1-chloro-2-iodo-vinyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-tétrahydro-furan-2-yl 135c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°4 (page 176) à **128c** (avec ICl) fournit **135c** (83 %) sous forme d'huile jaune.

$[\alpha]_D^{20}$ -13 (c 1.0, CHCl₃);

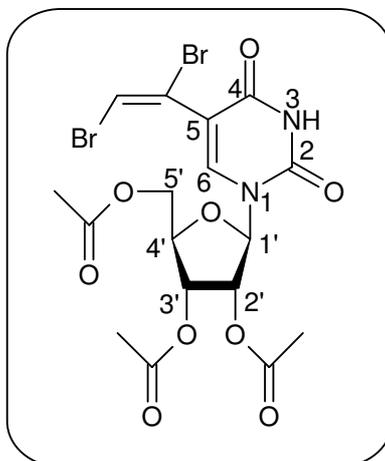
Point de fusion : 87-89°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.14 (s, 3H x2, OAc x2), 1.95-2.31 (m, 2H, H-3'), 4.33 (dd, J = 12.5, 4.1 Hz, 1H, H-5'b), 4.43 (dd, J = 12.5, 2.8 Hz, 1H, H-5'a), 4.58 (m, 1H, H-2'), 5.38 (m, 1H, H-4'), 5.91 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-1'), 6.90 (s, 1H, CH alcène), 7.74 (s, 1H, H-6), 9.75 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.8 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 32.1 (C-3'), 64.0 (C-5'), 77.8 et 78.5 (C-2' et C-4'), 80.5 (C-1'), 91.3 (CH alcène), 113.1 (C-5), 127.7 (C), 141.7 (C-6), 149.4 (C-2), 159.4 (C-4), 170.0 (C=O), 170.6 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₆I₂N₂O₇Na, calculée m/z 522.6592 observée m/z 522.6593.

Ester méthylique du 3,4-diacétoxy-5-[5-(1,2-dibromo-vinyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-tétrahydro-furan-2-yl 136b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°4 (page 176) à **128b** (avec Br₂) fournit **136b** (92 %) sous forme de solide.

$[\alpha]_D^{20}$ -43 (c 0.5, CHCl₃);

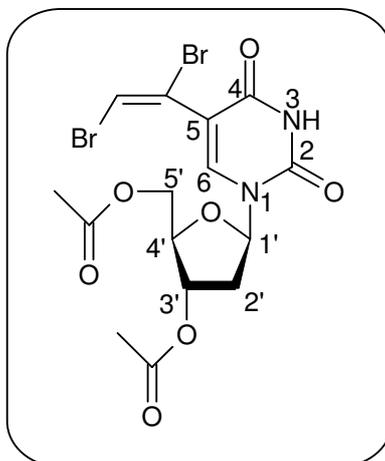
Point de fusion : 83-85°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.12 (s, 3H, OAc), 2.14 (s, 3H, OAc), 2.17 (s, 3H, OAc), 4.38 (m, 3H, H-4',5'), 5.36 (m, 2H, H-2',3'), 6.12 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-1'), 6.90 (s, 1H, CH alcène), 7.66 (s, 1H, H-6), 9.38 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.5 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 63.2 (C-5'), 70.2 (C-3'), 73.3 (C-2'), 80.3 (C-4'), 87.4 (C-1'), 109.4 (CHI alcène), 112.5 et 113.0 (CCI alcène et C-5), 140.7 (C-6), 149.6 (C-2), 159.0 (C-4), 169.7 (C=O), 169.8 (C=O), 170.3 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₇H₁₈Br₂N₂O₉Na, calculée m/z 578.1468 observée m/z 578.1473.

Ester méthylique du 3-acétoxy-5-[5-(1,2-dibromo-vinyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-tétrahydro-furan-2-yl 136a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°4 (page 176) à **128a** (avec Br₂) fournit **136a** (97 %) sous forme de solide jaune.

$[\alpha]_D^{20}$ -14 (c 4.0, CHCl₃);

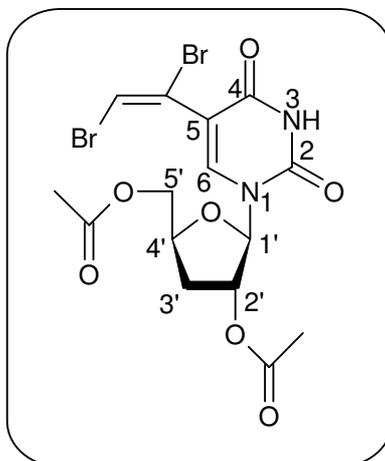
Point de fusion : 79-81°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.14 (s, 3H x2, OAc x2), 2.18 (m, 1H, H-2'b), 2.65 (m, 1H, H-2'a), 4.45-4.25 (m, 3H, H-4',5'), 5.24 (m, 1H, H-3'), 6.33 (dd, $J = 8.1, 5.6$ Hz, 1H, H-1'), 6.89 (s, 1H, CH alcène), 7.75 (s, 1H, H-6), 9.85 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.9 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 38.4 (C-2'), 63.9 (C-5'), 74.2 (C-3'), 82.7 (C-4'), 85.7 (C-1'), 109.0 (CH alcène), 112.5 et 112.7 (C-5 et C), 140.5 (C-6), 149.7 (C-2), 159.3 (C-4), 170.3 (C=O), 170.5 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₆BrIN₂O₇Na, calculée m/z 520.1098 observée m/z 520.1099.

Ester méthylique du 4-acétoxy-5-[5-(1,2-dibromo-vinyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-tétrahydro-furan-2-yl 136c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°4 (page 176) à **128c** (avec Br₂) fournit **136c** (82 %) sous forme de solide jaune.

$[\alpha]_D^{20}$ -16 (c 0.8, CHCl₃);

Point de fusion : 78-80°C;

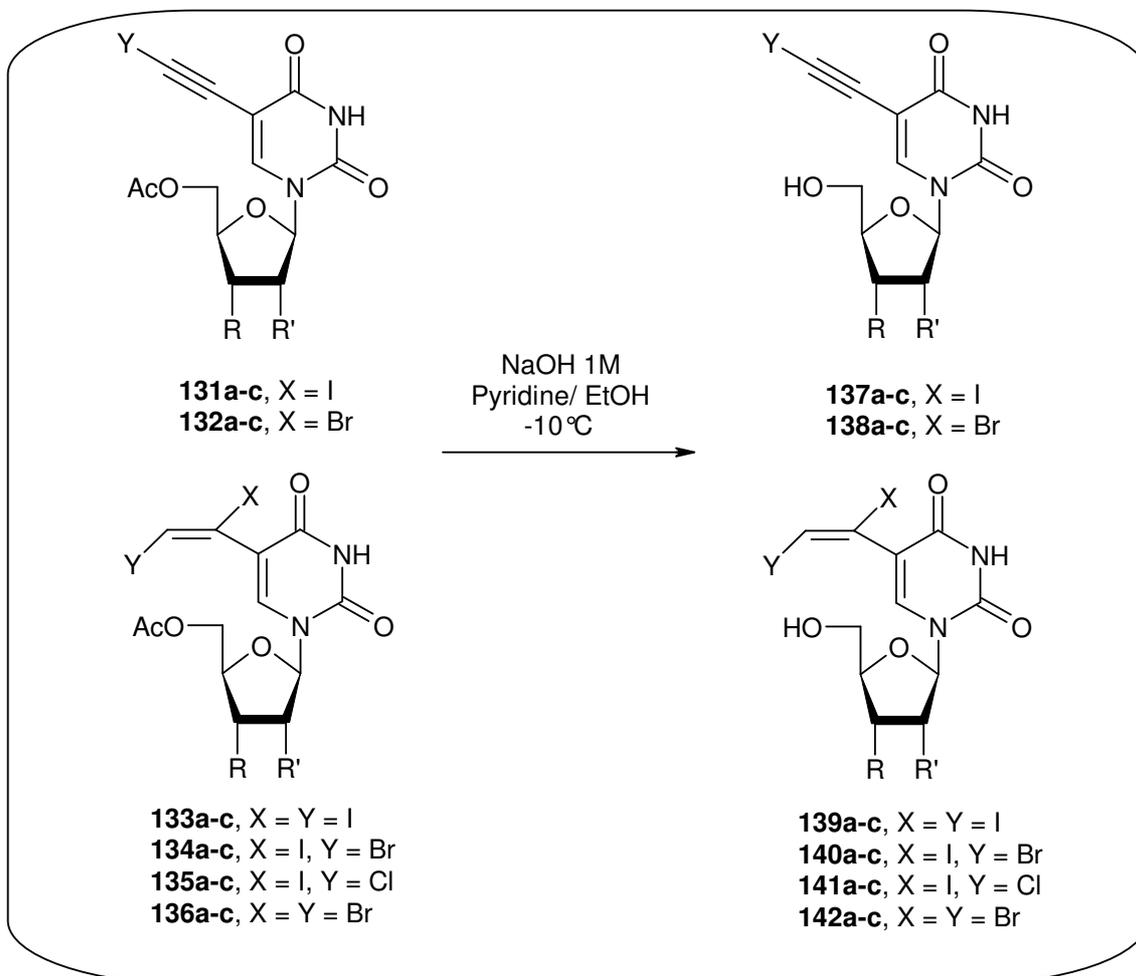
RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.14 (s, 3H, OAc), 2.15 (s, 3H, OAc), 1.95-2.35 (m, 2H, H-3'), 4.33 (dd, *J* = 12.5, 4.1 Hz, 1H, H-5'b), 4.43 (dd, *J* = 12.5, 2.8 Hz, 1H, H-5'a), 4.58 (m, 1H, H-2'), 5.38 (m, 1H, H-4'), 5.88 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-1'), 6.88 (s, 1H, CH alcène), 7.72 (s, 1H, H-6), 9.61 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.9 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 32.2 (C-3'), 64.1 (C-5'), 77.8 et 78.6 (C-2' et C-4'), 91.6 (C-1'), 109.2 (CH alcène), 112.0 et 112.9 (C-5 et C), 141.2 (C-6), 149.3 (C-2), 159.4 (C-4), 170.0 (C=O), 170.6 (C=O),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₁₆I₂N₂O₇Na, calculée m/z 520.1098 observée m/z 520.1103.

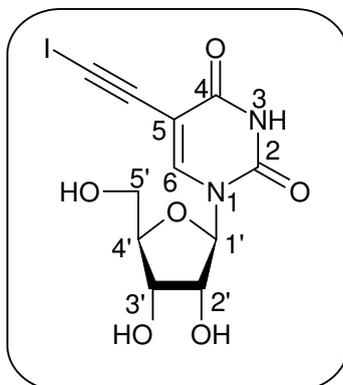
Mode opératoire général N°5 :

Réaction de clivage des groupements protecteurs de type Acétates



Une solution du nucléoside acétylé (1.0 mmol) dans un mélange pyridine / EtOH : 2/1 (15.0 mL) est refroidie à -10°C. Une solution aqueuse de NaOH 1M (1.0 mL) est ajoutée goutte à goutte et le mélange réactionnel est maintenu à -10°C sous agitation jusqu'en fin de réaction (typiquement 1 h - 4 h, vérifiée par ccm). Le mélange réactionnel est ensuite neutralisé à -10°C par une solution saturée de la résine acide de type DOWEX 50X2-200 puis filtré sur verre fritté. Les solvants sont évaporés sous pression réduite pour donner un résidu, qui est soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP / AE : 8/2 à AE / MeOH : 9/1) pour donner le nucléoside déprotégé désiré.

1-(3,4-Dihydroxy-5-hydroxyméthyl-tetrahydro-furan-2-yl)-5-iodoéthynyl-1H-pyrimidine-2,4-dione 137b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **131b** fournit **137b** (70 %) sous forme de solide jaune pâle.

$[\alpha]_D^{20}$ -12 (c 0.2, CH₃OH);

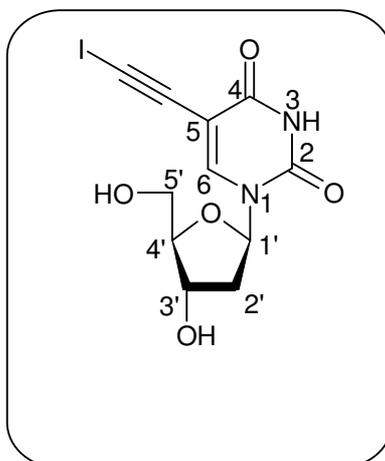
Point de fusion : 135-137°C;

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ : 3.70-3.55 (m, 2H, H-5'), 3.85 (m, 1H, H-4'), 4.05-3.95 (m, 2H, H-2',3'), 5.05-5.12 (3 se, 3 x OH), 5.72 (m, 1H, H-1'), 8.29 (s, 1H, H-6), 11.65 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (DMSO-d₆) δ : 20.6 (C), 61.1 (C-5'), 70.2 (C-3'), 74.7 (C-2'), 85.6 et 85.6 (C-4' et C), 89.2 (C-1'), 99.9 (C-5), 145.6 (C-6), 150.4 (C-2), 162.6 (C-4),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁IN₂O₆Na, calculée m/z 418.1223, observée m/z 418.1219.

1-(4-Hydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-iodoéthynyl-1H-pyrimidine-2,4-dione 137a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **131a** fournit **137a** (68 %) sous forme de solide jaune pâle.

$[\alpha]_D^{20} +14$ (c 0.8, CH₃OH);

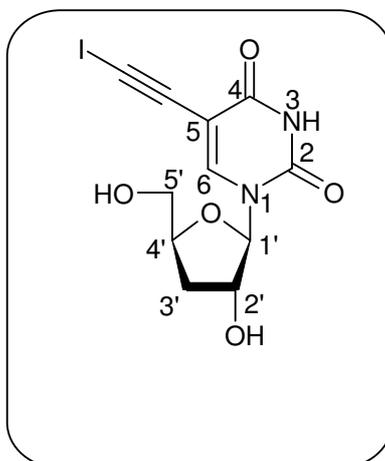
Point de fusion : 135-137°C;

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 2.40-2.12 (m, 2H, H-2'), 3.73 (dd, $J = 12.1, 3.4$ Hz, 1H, H-5'b), 3.83 (dd, $J = 12.1, 3.0$ Hz, 1H, H-5'a), 3.95 (m, 1H, H-4'), 4.41 (m, 1H, H-3'), 6.22 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-1'), 8.32 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 15.5 (C), 41.7 (C-2'), 62.5 (C-5'), 71.9 (C-3'), 85.2 (C), 87.0 (C-1'), 89.0 (C-4'), 101.1 (C-5), 146.2 (C-6), 151.0 (C-2), 164.5 (C-4),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁IN₂O₅Na, calculée m/z 402.1229, observée m/z 402.1231.

1-(3-Hydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-iodoéthynyl-1H-pyrimidine-2,4-dione 137c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **131c** fournit **137c** (66 %) sous forme d'huile jaune pâle.

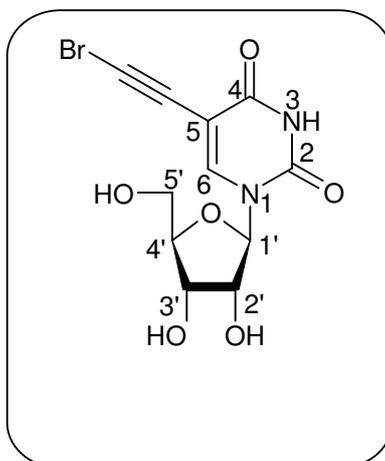
$[\alpha]_D^{20} +6$ (c 1.0, CH₃OH);

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ : 1.76 (m, 1H, H-3'b), 1.98 (m, 1H, H-3'a), 3.52 (m, 1H, H-5'b), 3.75 (m, 1H, H-5'a), 4.21 (m, 1H, H-2'), 4.32 (m, 1H, H-4'), 5.23 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H, OH), 5.54 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, OH), 5.59 (s, 1H, H-1'), 8.48 (s, 1H, H-6), 11.65 (s, 1H, NH);

RMN ¹³C (DMSO-d₆) δ : 20.5 (CCI), 32.3 (C-3'), 61.2 (C-5'), 75.0 (C-2'), 81.4 (C-4'), 84.9 (CCI), 91.9 (C-1'), 97.0 (C-5), 144.8 (C-6), 149.4 (C-2), 161.9 (C-4);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁IN₂O₅Na, calculée m/z 402.1229, observée m/z 402.1233.

5-Bromoéthynyl-1-(3,4-dihydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 138b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **132b** fournit **138b** (74 %) sous forme d'huile jaune pâle.

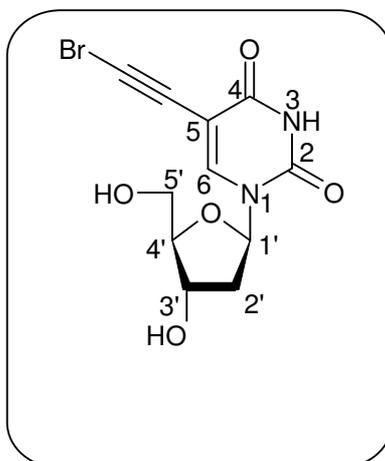
$[\alpha]_D^{20}$ -23 (c 0.5, CH₃OH);

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ : 3.75-3.50 (m, 2H, H-5'), 3.85 (m, 1H, H-4'), 4.10-3.91 (m, 2H, H-2',3'), 5.08 (d, J = 5.3 Hz, OH), 5.24 (t, J = 4.7 Hz, OH), 5.41 (d, J = 5.3 Hz, OH), 5.73 (d, J = 4.7 Hz, 1H, H-1'), 8.39 (s, 1H, H-6), 11.69 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (DMSO-d₆) δ : 54.8 (C), 60.2 (C-5'), 69.3 (C-3'), 72.6 (C), 73.9 (C-2'), 84.7 (C-4'), 88.5 (C-1'), 97.9 (C-5), 144.9 (C-6), 149.6 (C-2), 161.6 (C-4),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁BrN₂O₆Na, calculée m/z 371.1219, observée m/z 371.1224.

5-Bromoéthynyl-1-(4-hydroxy-5-hydroxyméthyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 138a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **132a** fournit **138a** (80 %) sous forme d'huile jaune pâle.

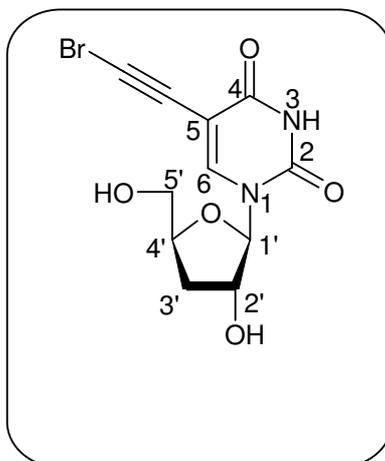
$[\alpha]_D^{20} +3$ (c 0.3, CH₃OH);

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 2.15 (dd, J = 5.6, 5.0 Hz, 2H, H-2'), 3.50-3.65 (m, 2H, H-5'), 3.78 (m, 1H, H-4'), 4.21 (m, 1H, H-3'), 6.05 (t, J = 6.3 Hz, 1H, H-1'), 8.30 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 40.3 (C-2'), 54.9 (C), 60.9 (C-5'), 70.1 (C-3'), 72.8 (C), 85.1 (C-1'), 87.7 (C-4'), 98.1 (C-5), 145.0 (C-6), 149.4 (C-2), 161.8 (C-4),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁BrN₂O₅Na, calculée m/z 355.1225, observée m/z 355.1227.

5-Bromoéthynyl-1-(3-hydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 138c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **132c** fournit **138c** (72 %) sous forme d'huile jaune pâle.

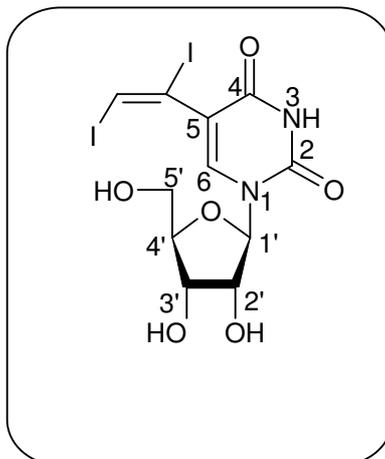
$[\alpha]_D^{20}$ -29 (c 1.0, CH₃OH);

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 1.72 (m, 1H, H-3'b), 1.95 (m, 1H, H-3'a), 3.61 (m, 1H, H-5'b), 3.61 (m, 1H, H-5'a), 3.81 (m, 1H, H-5'a), 4.25 (m, 1H, H-2'), 4.32 (m, 1H, H-4'), 5.26 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, OH), 5.56 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, OH), 5.59 (s, 1H, H-1'), 8.53 (s, 1H, H-6), 11.63 (s, 1H, NH);

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 32.3 (C-3'), 54.2 (C-Br), 60.9 (C-5'), 72.9 (C-Br), 75.0 (C-2'), 81.4 (C-4'), 91.9 (C-1'), 97.0 (C-5), 144.8 (C-6), 149.4 (C-2), 161.9 (C-4),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁BrN₂O₅Na, calculée *m/z* 355.1225, observée *m/z* 355.1223.

1-(3,4-Dihydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-(1,2-diiodo-vinyl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 139b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **133b** fournit **139b** (82 %) sous forme de solide jaune pâle.

$[\alpha]_D^{20} +5$ (c 1.0, CH₃OH);

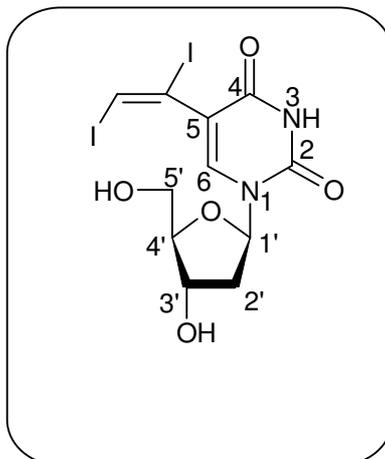
Point de fusion : 107-109°C;

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 3.75-3.55 (m, 2H, H-5'), 3.87 (m, 1H, H-4'), 4.12-3.95 (m, 2H, H-2',3'), 5.50-5.10 (se x3, OH x3), 5.80 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-1'), 7.05 (s, 1H, CH alcène), 8.05 (s, 1H, H-6), 11.65 (se, 1H, NH),

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 60.6 (C-5'), 69.8 (C-3'), 74.5 (C-2'), 85.0 (C-4'), 88.4 et 88.5 (C-1' et CH alcène), 117.2 (C-5 et C), 140.3 (C-6), 150.0 (C-2), 159.4 (C-4),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂I₂N₂O₆Na, calculée m/z 546.0347, observée m/z 546.0351.

5-(1,2-Diiodo-vinyl)-1-(4-hydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 139a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **133a** fournit **139a** (72 %) sous forme de solide jaune pâle.

$[\alpha]_D^{20} +28$ (c 0.3, CH₃OH);

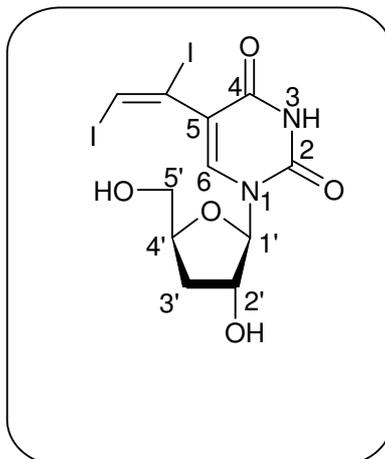
Point de fusion : 103-105°C;

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 2.43-2.12 (m, 2H, H-2'), 3.73 (m, $J = 11.9, 3.4$ Hz, 1H, H-5'b), 3.83 (dd, $J = 11.9, 3.2$ Hz, 1H, H-5'a), 3.97 (m, 1H, H-4'), 4.43 (m, 1H, H-3'), 6.28 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, H-1'), 7.52 (s, 1H, CH alcène), 8.27 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 42.2 (C-2'), 62.7 (C-5'), 72.1 (C-3'), 87.0 (C-1'), 87.5 (C), 88.0 (CH alcène), 89.3 (C-4'), 118.8 (C-5), 142.4 (C-6), 151.5 (C-2), 161.9 (C-4);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂I₂N₂O₅Na, calculée m/z 530.0353, observée m/z 530.0558.

5-(1,2-Diiodo-vinyl)-1-(3-hydroxy-5-hydroxyméthyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 139c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **133c** fournit **139c** (76 %) sous forme d'huile jaune pâle.

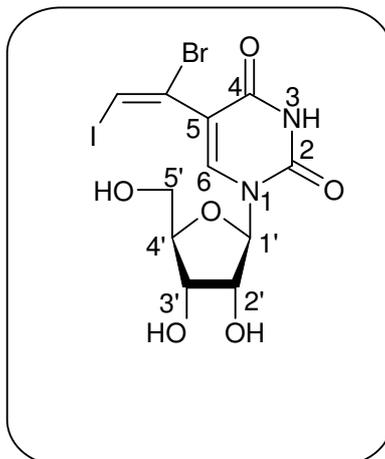
$[\alpha]_D^{20} +1$ (c 0.8, CH₃OH);

RMN ¹H (DMSO-*d*6) δ : 1.74 (m, 1H, H-3'b), 1.97 (m, 1H, H-3'a), 3.52 (m, 1H, H-5'b), 3.81 (m, 1H, H-5'a), 4.25 (m, 1H, H-2'), 4.32 (m, 1H, H-4'), 5.61 (s, 1H, H-1'), 7.55 (s, 1H, CH alcène), 8.21 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (DMSO-*d*6) δ : 33.5 (C-3'), 62.1 (C-5'), 76.0 (C-2'), 82.2 (C-4'), 89.5 (CH alcène), 90.3 (C), 92.6 (C-1'), 117.3 (C-5), 140.8 (C-6), 150.5 (C-2), 160.3 (C-4);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂I₂N₂O₅Na, calculée m/z 530.0553, observée m/z 530.0554.

5-(1-Bromo-2-iodo-vinyl)-1-(3,4-dihydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 140b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **134b** fournit **140b** (76 %) sous forme d'huile jaune pâle.

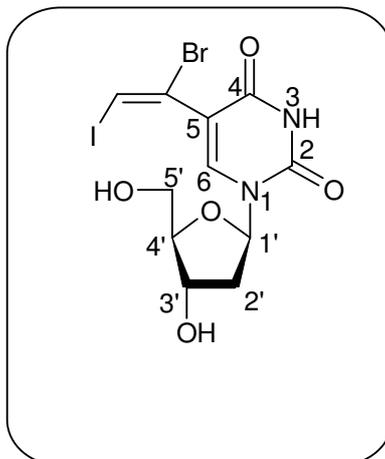
$[\alpha]_D^{20}$ -1 (c 0.3, CH₃OH);

RMN ¹H (D₂O) δ : 3.56 (dd, 1H, H-5'b), 3.67 (dd, J = 11.8, 2.5 Hz, 1H, H-5'a), 3.88 (m, 1H, H-4'), 4.15-3.92 (m, 2H, H-2',3'), 5.79 (d, J = 4.7 Hz, 1H, H-1'), 7.45 (s, 1H, CH alcène), 8.27 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (D₂O) δ : 59.6 (C-5'), 69.7 (C-3'), 74.5 (C-2'), 85.1 et 85.5 (C-4' et CH alcène), 88.5 (C-1'), 114.0 et 114.3 (C-5 et C), 142.2 (C-6), 150.0 (C-2), 159.4 (C-4), à confirmer

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂BrIN₂O₆Na, calculée m/z 499.0343, observée m/z 499.0348.

5-(1-Bromo-2-iodo-vinyl)-1-(4-hydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 140a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **134a** fournit **140a** (78 %) sous forme d'huile jaune pâle.

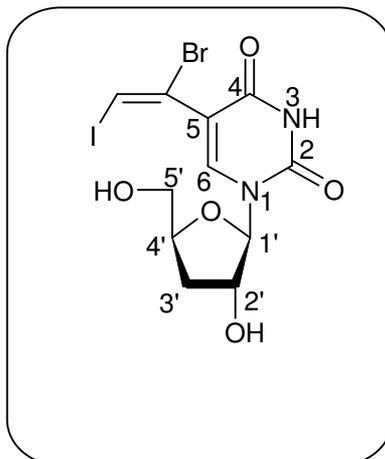
$[\alpha]_D^{20} +26$ (c 2.0, CH₃OH);

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 2.45-2.15 (m, 2H, H-2'), 3.72 (dd, $J = 11.9, 3.4$ Hz, 1H, H-5'b), 3.86 (dd, $J = 11.9, 3.2$ Hz, 1H, H-5'a), 3.94 (m, 1H, H-4'), 4.45 (m, 1H, H-3'), 6.25 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-1'), 7.39 (s, 1H, CH alcène), 8.35 (s, 1H, H-6),

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 42.2 (C-2'), 62.7 (C-5'), 72.1 (C-3'), 87.0 (C-1'), 87.5 (C), 88.0 (CH alcène), 89.3 (C-4'), 118.8 (C-5), 142.4 (C-6), 151.5 (C-2), 161.9 (C-4);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂BrIN₂O₅Na, calculée m/z 483.0349, observée m/z 483.0352.

5-(1-Bromo-2-iodo-vinyl)-1-(3-hydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 140c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **134c** fournit **140c** (68 %) sous forme d'huile jaune pâle.

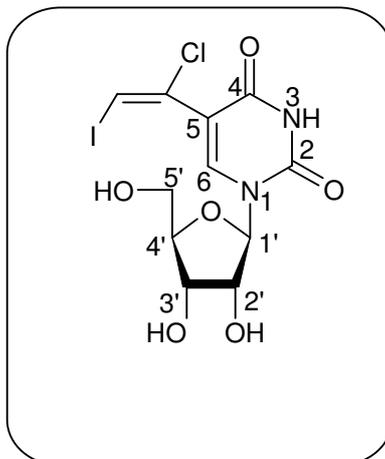
$[\alpha]_D^{20} +3$ (c 1.0, CH₃OH);

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 1.75 (m, 1H, H-3'b), 1.97 (m, 1H, H-3'a), 3.52 (dd, *J* = 12.2, 2.8 Hz, 1H, H-5'b), 3.76 (dd, *J* = 12.2, 2.4 Hz, 1H, H-5'a), 4.25 (m, 1H, H-2'), 4.32 (m, 1H, H-4'), 5.61 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H-1'), 7.39 (s, 1H, CH alcène), 8.35 (s, 1H, H-6),

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 32.6 (C-3'), 61.2 (C-5'), 75.3 (C-2'), 81.4 (C-4'), 85.3 (CH alcène), 91.9 (C-1'), 113.2 (C), 114.6 (C-5), 141.8 (C-6), 149.7 (C-2), 159.5 (C-4);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂BrIN₂O₅Na, calculée *m/z* 483.0349, observée *m/z* 483.0344.

5-(1-Chloro-2-iodo-vinyl)-1-(3,4-dihydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 141b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **135b** fournit **141b** (78 %) sous forme de solide jaune pâle.

$[\alpha]_D^{20} +5$ (c 0.4, CH₃OH);

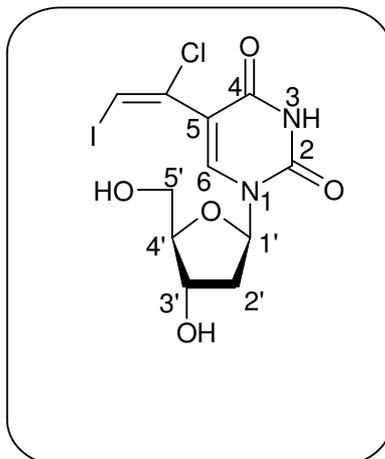
Point de fusion : 109-111°C;

RMN ¹H (D₂O) δ : 3.75 (dd, 1H, H-5'b), 3.85 (dd, $J = 11.5, 2.2$ Hz, 1H, H-5'a), 4.10 (m, 1H, H-4'), 4.30 (se, 2H, H-2',3'), 5.89 (se, 1H, H-1'), 7.05 (s, 1H, CH alcène), 8.45 (s, 1H, H-6),

RMN ¹³C (D₂O) δ : 61.9 (C-5'), 71.1 (C-3'), 76.5 (C-2'), 81.2 (CH alcène), 86.4 (C-4'), 91.0 (C-1'), 114.1 (C-5), 128.9 (C), 144.6 (C-6), 151.7 (C-2), 162.0 (C-4),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂ClIN₂O₆Na, calculée m/z 454.5833, observée m/z 545.5835.

5-(1-Chloro-2-iodo-vinyl)-1-(4-hydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 141a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **135a** fournit **141a** (71 %) sous forme de solide jaune pâle.

$[\alpha]_D^{20} +34$ (c 0.5, CH₃OH);

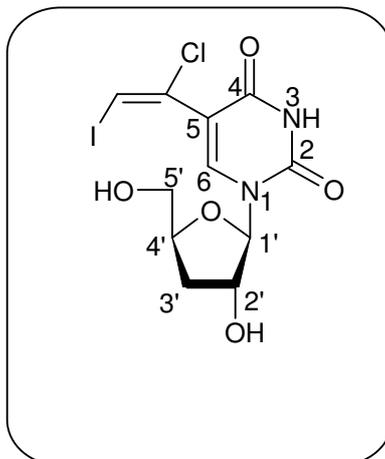
Point de fusion : 109-111°C;

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 2.45-2.10 (m, 2H, H-2'), 3.73 (dd, $J = 11.9, 3.4$ Hz, 1H, H-5'b), 3.83 (dd, $J = 11.9, 3.1$ Hz, 1H, H-5'a), 3.96 (ddd, $J = 3.6, 3.4, 3.0$ Hz, 1H, H-4'), 4.43 (ddd, $J = 6.5, 3.8, 3.6$ Hz, 1H, H-3'), 6.30 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-1'), 7.06 (s, 1H, CH alcène), 8.38 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 42.1 (C-2'), 62.6 (C-5'), 72.1 (C-3'), 81.2 (CH alcène), 87.0 (C-1'), 89.2 (C-4'), 114.1 (C-5), 129.0 (C), 144.5 (C-6), 151.5 (C-2), 162.0 (C-4);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂ClIN₂O₅Na, calculée m/z 438.5839, observée m/z 438.5843.

5-(1-Chloro-2-iodo-vinyl)-1-(3-hydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione **141c**



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **135c** fournit **141c** (70 %) sous forme d'huile jaune.

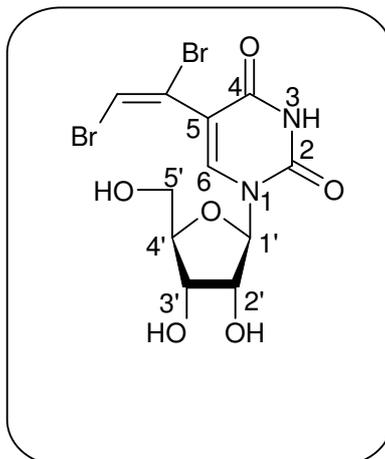
$[\alpha]_D^{20} +2$ (c 2.0, CH₃OH);

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 1.75 (m, 1H, H-3'b), 2.01 (m, 1H, H-3'a), 3.52 (dd, *J* = 12.3, 2.8 Hz, 1H, H-5'b), 3.76 (dd, *J* = 12.3, 2.6 Hz, 1H, H-5'a), 4.25 (m, 1H, H-2'), 4.32 (m, 1H, H-4'), 5.65 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-1'), 7.18 (s, 1H, CH alcène), 8.38 (s, 1H, H-6),

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 32.6 (C-3'), 61.2 (C-5'), 75.2 (C-2'), 81.4 (C-4'), 83.6 (CH alcène), 91.8 (C-1'), 111.6 (C-5), 127.2 (C), 142.3 (C-6), 149.8 (C-2), 159.7 (C-4);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂ClIN₂O₅Na, calculée *m/z* 438.5839 observée *m/z* 438.5837.

5-(1,2-Dibromo-vinyl)-1-(3,4-dihydroxy-5-hydroxyméthyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 142b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **136b** fournit **142b** (72 %) sous forme d'huile jaune pâle.

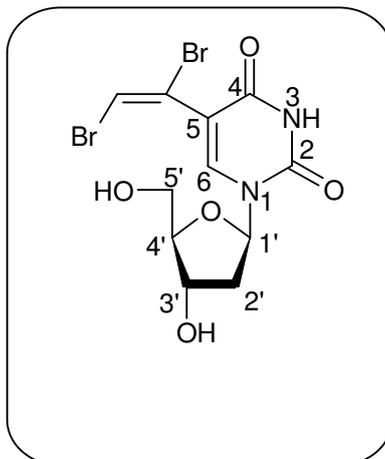
$[\alpha]_D^{20} +14$ (c 0.8, CH₃OH);

RMN ¹H (D₂O) δ : 3.74 (dd, $J = 12.5, 2.8$ Hz, 1H, H-5'b), 3.88 (dd, $J = 12.5, 2.5$ Hz, 1H, H-5'a), 4.05 (m, 1H, H-4'), 4.18 (m, 2H, H-2',3'), 5.93 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-1'), 7.07 (s, 1H, CH alcène), 8.45 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (D₂O) δ : 61.8 (C-5'), 71.1 (C-3'), 76.5 (C-2'), 86.4 (C-4'), 91.1 (C-1'), 110.0 (CH alcène), 112.9 et 114.5 (C-5 et C), 144.1 (C-6), 151.7 (C-2), 162.0 (C-4),

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂Br₂N₂O₆Na, calculée m/z 452.0339, observée m/z 452.0342.

5-(1,2-Dibromo-vinyl)-1-(4-hydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 142a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **136a** fournit **142a** (85 %) sous forme d'huile jaune pâle.

$[\alpha]_D^{20} +26$ (c 0.5, CH₃OH);

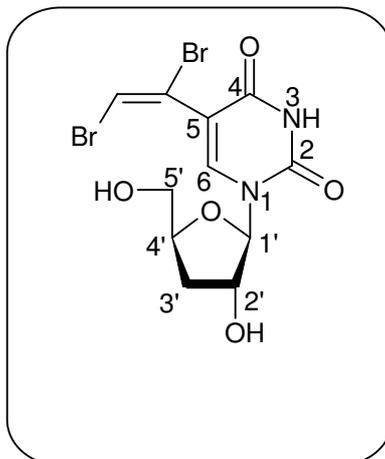
Point de fusion : 135-137°C;

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 2.45-2.10 (m, 2H, H-2'), 3.73 (dd, $J = 11.9, 3.4$ Hz, 1H, H-5'b), 3.82 (dd, $J = 11.9, 2.9$ Hz, 1H, H-5'a), 3.95 (m, 1H, H-4'), 4.41 (m, 1H, H-3'), 6.28 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-1'), 7.06 (s, 1H, CH alcène), 8.39 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 41.1 (C-2'), 61.5 (C-5'), 71.0 (C-3'), 108.9 (CH alcène), 86.1 (C-1'), 88.2 (C-4'), 111.8 et 113.5 (C-5 et C), 143.0 (C-6), 150.4 (C-2), 161.0 (C-4);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂Br₂N₂O₅Na, calculée m/z 436.0345, observée m/z 436.0348.

5-(1,2-Dibromo-vinyl)-1-(3-hydroxy-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 142c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°5 (page 189) à **136c** fournit **142c** (74 %) sous forme d'huile jaune pâle.

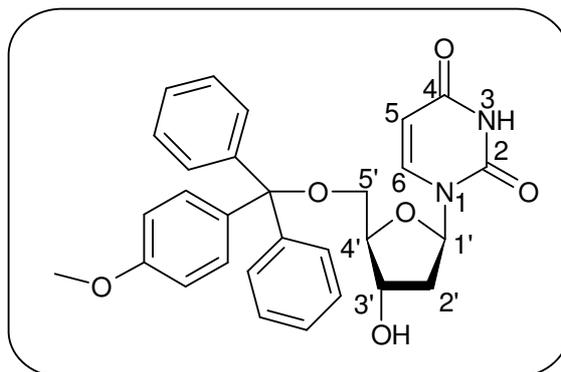
$[\alpha]_D^{20} +5$ (c 1.0, CH₃OH);

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 1.75 (m, 1H, H-3'b), 1.95 (m, 1H, H-3'a), 3.54 (m, H-5'b), 3.78 (m, H-5'a), 4.25 (m, 1H, H-2'), 4.35 (m, 1H, H-4'), 5.64 (se, 1H, H-1'), 7.25 (s, 1H, CH alcène), 8.42 (s, 1H, H-6),

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 32.6 (C-3'), 61.1 (C-5'), 75.2 (C-2'), 81.5 (C-4'), 109.4 (CH alcène), 91.9 (C-1'), 110.2 et 113.9 (C-5 et C), 141.9 (C-6), 149.7 (C-2), 159.7 (C-4);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂Br₂N₂O₅Na, calculée m/z 436.0345, observée m/z 436.0340.

1-(4-Hydroxy-5-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 145



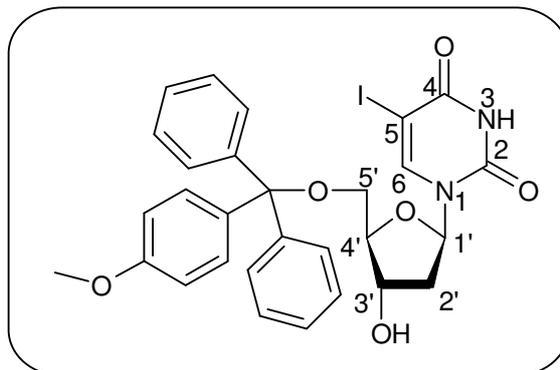
Mode opératoire :

Une solution de 2'-deoxyuridine (10.0 g, 43.9 mmol) et de para-anisylchlorodiphénylméthane (16.3 g, 52.6 mmol) dans la pyridine sèche (235 mL) est portée au reflux pendant 2h. Après retour à ta, la pyridine est évaporée sous pression réduite, puis du dichlorométhane (400 mL) est ajouté et la phase organique est lavée à l'eau (50 mL x3), séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite pour donner un résidu, qui est soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP / AE : 5/5 à AE / MeOH : 9/1) pour donner le nucléoside protégé **145** (21.9g, 99 %) sous forme de solide blanc.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.15-2.32 (m, 1H, H-2'a), 2.37-2.55 (m, 1H, H-2'b), 3.43 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H, H-5'), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 4.00-4.12 (m, 1H, H-4'), 5.23 (td, *J* = 3.8 Hz, 5.8 Hz, 1H, H-3'), 5.37 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-5), 6.31 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, H-1'), 6.75-7.50 (m, 14H, trityle), 7.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 41.2 (C-2'), 55.3 (OCH₃), 63.2 (C-5'), 71.5 (C-3'), 85.2 (C-1'), 86.2 (C-4'), 87.3 (C), 102.3 (C-5), 113.4 (CH), 127.3 (CH), 128.1 (CH), 128.4 (CH), 128.6 (CH), 130.5 (CH), 134.8 (C), 140.4 (C-6), 143.8 (C), 144.0 (C), 150.7 (C-OMe), 158.8 (C=O), 163.9 (C=O)

1-(4-Hydroxy-5-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-iodo-1H-pyrimidine-2,4-dione
146



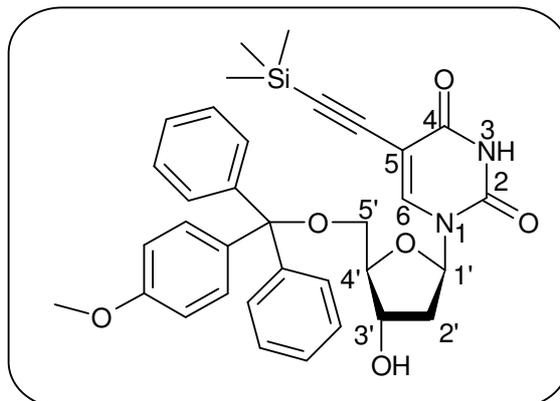
Mode opératoire :

Une solution de **145** (21.9 g, 43.8 mmol), d'iode (17.0 g, 66.9 mmol), de nitrate d'ammonium et de cérium (17.7 g, 32.3 mmol), et d'hydrogénocarbonate de sodium (1.0 g) dans l'acétonitrile (480 mL) est portée au reflux pendant 4 jours. Après retour à ta, une solution saturée de sulfite de sodium (800 mL) et de l'acétate d'éthyle (200 mL) sont ajoutés : la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (300 mL x2), les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution saturée de sulfite de sodium (300 mL), séchées sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite pour donner un résidu, qui est soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP / AE : 6/4 à AE) pour donner le nucléoside iodé pur **146** (12.8 g, 57 %) sous forme de solide blanc.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.20-2.40 (m, 1H, H-2'a), 2.42-2.62 (m, 1H, H-2'b), 3.27-3.48 (m, 2H, H-5'), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 4.02-4.20 (m, 1H, H-4'), 4.49-4.62 (m, 1H, H-3'), 6.33 (dd, *J* = 5.7 Hz, 8.1 Hz, 1H, H-1'), 6.78-7.55 (m, 14H, trityle), 8.14 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 41.5 (C-2'), 55.4 (OCH₃), 63.7 (C-5'), 68.9 (C), 72.9 (C-3'), 85.8 (C-1'), 86.7 (C-4'), 113.4 (CH), 127.3 (CH), 128.2 (CH), 128.4 (C), 130.6 (CH), 135.0 (C), 143.9 (C), 144.0 (C), 144.5 (C-6), 150.3 (C-OMe), 158.8 (C=O), 160.4 (C=O)

1-(4-Hydroxy-5-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-triméthylsilanylethynyl-1H-pyrimidine-2,4-dione **147**



Mode opératoire :

Le nucléoside iodé **146** (5.00 g, 8.0 mmol) est dissout sous argon dans un mélange de diméthylformamide sec (62.5 mL), de triéthylamine sèche (3.3 mL, 24.0 mmol), et de triméthylsilylacétylène (3.4 mL, 24.0 mmol). De l'iodure de cuivre (300.0 mg, 1.6 mmol) et du PdCl₂(PPh₃)₂ (563 mg) sont ajoutés et le mélange réactionnel est laissé sous agitation à ta sous argon pendant 16h. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice (éluant : EP / AE : 5/5 à 2/8) pour donner **147** (4.10 g, 86 %) sous forme de solide jaune pâle.

[α]_D²⁰ 27.5 (c 0.5, CHCl₃);

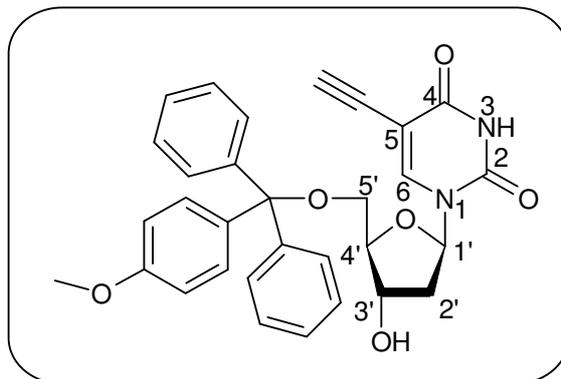
Point de fusion : 104-105°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.08-2.33 (m, 1H, H-2'a), 2.42-2.64 (m, 1H, H-2'b), 3.20-3.52 (m, 2H, H-5'), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 4.05-4.25 (m, 1H, H-4'), 4.40-4.53 (m, 1H, H-3'), 6.31 (dd, J = 5.6 Hz, 8.1 Hz, 1H, H-1'), 6.78-7.55 (m, 14H, trityle), 8.05 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 41.5 (C-2'), 55.3 (OCH₃), 63.7 (C-5'), 72.5 (C-3'), 85.9 (C-1'), 86.6 (C-4'), 87.3 (C), 94.9 (C), 99.9 (C), 100.7 (C), 113.5 (CH), 127.2 (CH), 128.2 (CH), 128.3 (C), 130.5 (CH), 135.1 (C), 142.8 (C-6), 144.0 (C), 144.1 (C), 149.5 (C=O), 158.8 (C), 161.5 (C);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₃₄H₃₆N₂O₆NaSi, calculée m/z 619.2240, observée m/z 619.2245

5-Ethynyl-1-(4-hydroxy-5-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 148



Mode opératoire :

Une solution de **147** (616.3 mg, 1.03mmol) et de fluorure de tétrabutyle ammonium (303.4 mg, 1.16 mmol) dans l'acétonitrile sec (24.0 mL) est agitée à ta pendant 2h. L'acétonitrile est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif, et le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice (éluant : EP / AE : 5/5 à 2/8) pour donner **148** (516.8 mg, 95 %) sous forme d'un solide jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20} +14.5$ (c 1.0, CHCl₃);

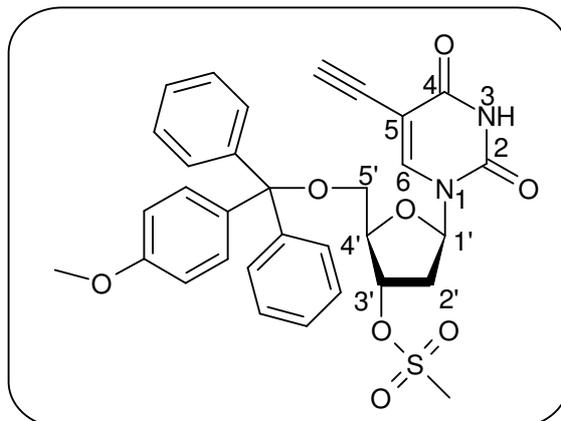
Point de fusion : 110-111°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.22-2.40 (m, 1H, H-2'a), 2.45-2.60 (m, 1H, H-2'b), 2.90 (s, 1H, CH alcyne), 3.41 (t, $J = 3.6$ Hz, 2H, H-5'), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 4.15-4.20 (m, 1H, H-4'), 4.51-4.62 (m, 1H, H-3'), 6.30 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-1'), 6.70-7.50 (m, 14H, trityle), 8.10 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 41.6 (C-2'), 55.4 (OCH₃), 63.7 (C-5'), 72.4 (C-3'), 74.2 (C), 82.2 (C), 85.9 (C-1'), 86.6 (C-4'), 87.5 (C), 99.4 (C), 113.5 (CH), 127.3 (CH), 128.2 (CH), 128.3 (C), 128.4 (C), 130.5 (CH), 135.1 (C), 143.8 (C-6), 143.9 (C), 144.1 (C), 149.4 (C=O), 158.9 (C), 161.7 (C);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₃₁H₂₈N₂O₆Na, calculée m/z 547.1845, observée m/z 547.1844.

Ester de l'acide méthanesulfonic 5-(5-éthynyl-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-2-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-3-yl 154



Mode opératoire :

Une solution de **148** (500.0 mg, 0.95 mmol) et de chlorure de méthanesulfonyle (0.73 mL, 9.50 mmol) dans la pyridine sèche, préparée sous argon à 0°C, est maintenue sous agitation pendant 16h en retournant lentement à ta. Après avoir refroidi le mélange réactionnel à 0°C, de la glace, de l'eau (100 mL) et de l'acétate d'éthyle (100 mL) sont ajoutés, la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (50 mL x3), les phases organiques sont réunies et lavées à l'eau (50 mL x3), séchées sur MgSO₄. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice (éluant : EP / AE : 5/5) pour donner **154** (587.0 mg, 99 %) sous forme de solide orange.

$[\alpha]_D^{20} +28.5$ (c 1.0, CHCl₃);

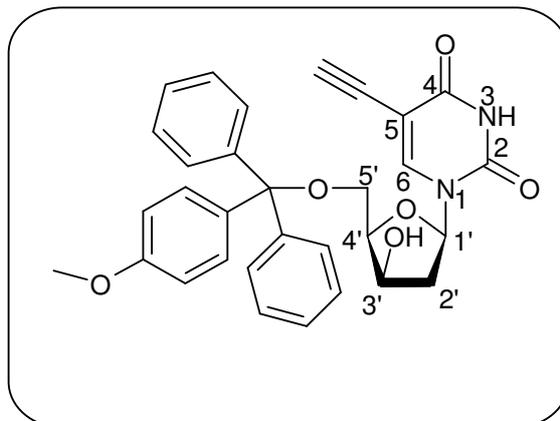
Point de fusion : 99-100°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.30-2.50 (m, 1H, H-2'a), 2.70-2.82 (m, 1H, H-2'b), 2.91 (s, 1H, CH alcyne), 3.02 (s, 3H, SCH₃), 3.33-3.57 (m, 2H, H-5'), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 4.35 (se, 1H, H-4'), 5.31 (se, 1H, H-3'), 6.29 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-1'), 6.75-7.50 (m, 14H, trityle), 8.07 (s, 1H, H-6), 8.58 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 38.8 (SCH₃), 39.3 (C-2'), 55.4 (OCH₃), 63.0 (C-5'), 74.0 (C-3'), 79.8 (C), 82.4 (C), 84.5 (C-1'), 85.4 (C-4'), 88.0 (C), 99.9 (C), 113.6 (CH), 127.5 (CH), 128.3 (CH), 128.3 (CH), 129.2 (C), 130.5 (CH), 134.6 (C), 143.2 (C-6), 143.6 (C), 143.7 (C), 149.2 (C=O), 159.0 (C), 161.2 (C);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₃₂H₃₀N₂O₈NaS, calculée m/z 625.1621, observée m/z 625.1632

5-Ethynyl-1-(4-hydroxy-5-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 155



Mode opératoire :

Une solution de **154** (50.0 mg, 0.08 mmol) dans le dioxanne (2.0 mL) et la soude aqueuse 1M (168 μ L, 0.16 mmol) est portée au reflux pendant 2h. Après retour à ta. les solvants sont éliminés sous pression réduite et le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP / AE : 5/5 à AE) pour donner **155** (41.0 mg, 93 %) sous forme de solide jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20}$ -13.0 (c 1.0, CHCl₃);

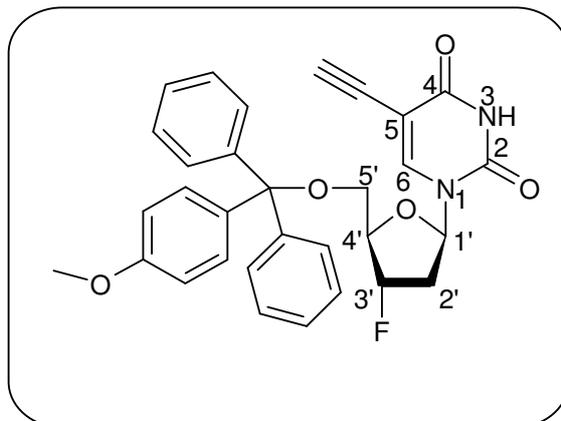
Point de fusion : 124-125 °C ;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.08-2.25 (m, 1H, H-2'a), 2.47-2.66 (m, 1H, H-2'b), 3.07 (s, 1H, CH alcyne), 3.43-3.72 (m, 2H, H-5'), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 4.00-4.12 (m, 1H, H-4'), 4.38-4.50 (m, 1H, H-3'), 6.15 (t, J = 6.1 Hz, 1H, H-1'), 6.80-7.55 (m, 14H, trityle), 8.15 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 41.1 (C-2'), 55.4 (OCH₃), 61.9 (C-5'), 70.9 (C-3'), 75.0 (C), 81.7 (CH alcyne), 83.4 (C-1'), 85.9 (C-4'), 87.5 (C), 98.5 (C), 113.6 (CH), 127.4 (CH), 128.2 (CH), 130.4 (CH), 134.9 (C), 143.8 (C), 143.8 (C), 145.3 (C-6), 149.5 (C=O), 159.0 (C), 161.8 (C);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₃₁H₂₈N₂O₆Na, calculée m/z 547.1845, observée m/z 547.1845

5-Ethynyl-1-(4-fluoro-5-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione
156



Mode opératoire :

A une solution de **155** (1.26 g, 2.4 mmol) dans le dichlorométhane sec (77.0 mL) à 0°C est ajouté lentement le trifluorure de diéthylaminosulfure (0.6mL, 4.8mmol), et le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 15 minutes. Puis une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (50.0 mL) est ajoutée, la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (50 mL x3), les phases organiques sont réunies et lavées à l'eau (50 mL), puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est éliminé sous pression réduite et le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice (éluant : EP / AE : 5/5) pour donner **156** (805.0 mg, 64 %) sous forme de solide jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20} +12.0$ (c 1.0, CHCl₃);

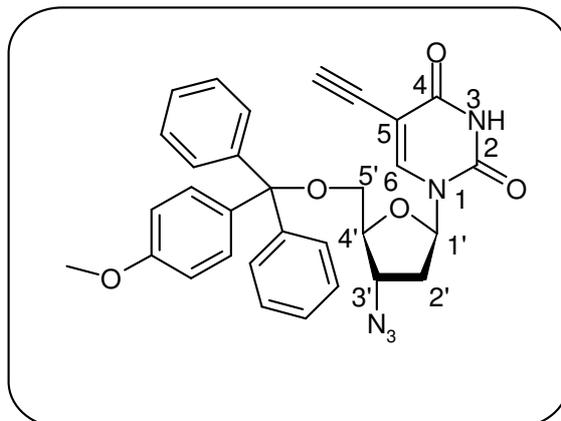
Point de fusion : 54-55°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.12-2.46 (m, 1H, H-2'a), 2.68-2.90 (m, 1H, H-2'b), 2.88 (s, 1H, CH alcyne), 3.35-3.48 (m, 2H, H-5'), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 4.37 (d, *J* = 27.4 Hz, 1H, H-4'), 5.28 (dd, *J* = 4.6 Hz, 53.6 Hz, 1H, H-3'), 6.34 (dd, *J* = 5.3 Hz, 9.0 Hz, 1H, H-1'), 6.80-7.50 (m, 14H, trityle), 8.10 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 39.7 (d, *J* = 21.1 Hz, C-2'), 55.4 (OCH₃), 63.4 (d, *J* = 10.2 Hz, C-5'), 82.2 (CH alcyne), 84.8 (d, *J* = 25.2 Hz, C-4'), 85.7 (C-1'), 87.8 (C), 94.5 (d, *J* = 177.5 Hz, C-3'), 99.7 (C), 113.6 (CH), 127.4 (CH), 128.3 (CH), 128.4 (CH), 130.5 (CH), 134.6 (C), 143.4 (C-6), 143.6 (C), 143.7 (C), 149.2 (C=O), 159.0 (C x2);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₃₁H₂₇N₂O₅FNa, calculée m/z 549.1802, observée m/z 549.1806

1-(4-Azido-5-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-éthynyl-1H-pyrimidine-2,4-dione
160



Mode opératoire :

Une solution de **154** (100.0 mg, 0.16 mmol) et de NaN₃ (35 mg, 0.54 mmol) dans le DMF (5.0 mL) est portée au reflux pendant 16h. Après retour à ta., les solvants sont éliminés sous pression réduite et le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP / AE : 5/5 à AE) pour donner **160** (61.0 mg, 70 %) sous forme de solide jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20} +13.0$ (c 0.8, CH₃OH);

Point de fusion : 109-111°C;

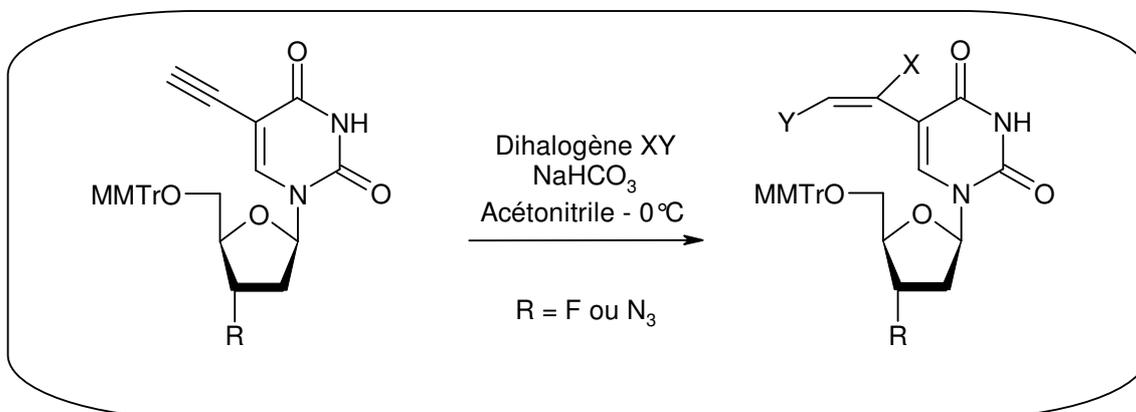
RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.35-2.46 (m, 1H, H-2'a), 2.52-2.62 (m, 1H, H-2'b), 2.89 (s, 1H, CH alcyne), 3.37-3.52 (m, 2H, H-5'), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 4.00-4.04 (m, 1H, H-4'), 4.28-4.34 (m, 1H, H-3'), 6.15 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, H-1'), 6.88 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, trityle), 7.21-7.51 (m, 14H, trityle), 8.08 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 38.6 (C-2'), 55.3 (OCH₃), 60.4 (C-3'), 62.7 (C-5'), 82.3 (CH alcyne), 84.0 (C-4'), 85.5 (C-1'), 87.6 (C), 99.4 (C), 113.6 (CH x2), 127.3 (CH), 128.1 (CH), 128.2 (CH), 130.4 (CH), 134.7 (C), 143.7 (C), 149.2 (C), 158.9 (C), 161.6 (C);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : en cours.

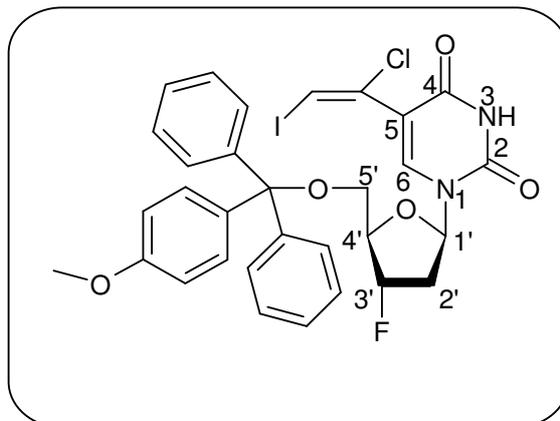
Mode opératoire général N°6 :

Réaction de di-halogénéation sur le dérivé 5-éthynyle uracile 3'-fluoré et 3'-azido



Le nucléoside de type 5-éthynyle uracile (0.5 mmol) est dissout dans l'acétonitrile sec (5.0 mL), de l'hydrogénocarbonate de sodium (0,5 g) est ajouté et la mélange réactionnel est refroidi à 0°C par un bain d'eau glacé. Une solution du réactif dihalogéné (soit I₂, IBr ou ICl; 0.6 mmol) dans l'acétonitrile sec (1.0 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C et le mélange réactionnel est maintenu sous agitation jusqu'en fin de réaction (typiquement 15 minutes à 2 h, vérifiée par ccm). Le mélange réactionnel est ensuite quenché à 0°C par une solution saturée de bisulfite de sodium (2 mL) puis extrait à l'acétate d'éthyle (10 mL x3). Les phases organiques sont ensuite réunies, lavées à l'eau (5 mL x2) et avec une solution de chlorure de sodium saturée (10 mL), séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner un résidu, qui est soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'élution (EP / AE : 8/2 à 3/7) pour donner le nucléoside dihalogéné désiré.

5-(1-Chloro-2-iodo-vinyl)-1-(4-fluoro-5-trityloxy méthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 158c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°6 (page 216) à ICl fournit **158c** (53 %) sous forme de solide jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20} +4.0$ (c 1.0, CHCl₃);

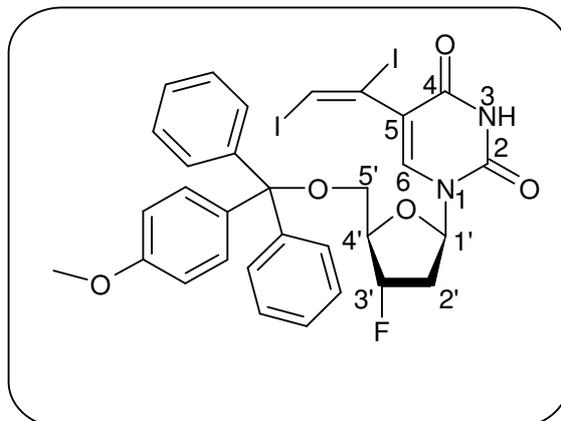
Point de fusion : 91-92°C;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.05-2.35 (m, 1H, H-2'a), 2.65-2.90 (m, 1H, H-2'b), 3.30-3.55 (m, 2H, H-5'), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 4.35 (td, $J = 3.0$ Hz, 27.3 Hz, 1H, H-4'), 5.23 (dd, $J = 4.7$ Hz, 53.7 Hz, 1H, H-3'), 6.34 (dd, $J = 5.3$ Hz, 9.1 Hz, 1H, H-1'), 6.72 (s, 1H, CH alcène), 6.75-7.50 (m, 14H, trityle), 7.78 (s, 1H, H-6), 8.85 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 39.5 (d, $J = 21.1$ Hz, C-2'), 55.4 (OCH₃), 63.1 (d, $J = 10.2$ Hz, C-5'), 80.9 (CH alcène), 84.6 (d, $J = 25.3$ Hz, C-4'), 85.6 (C-1'), 87.6 (C), 94.1 (d, $J = 176.9$ Hz, C-3'), 113.6 (CH), 113.9 (CH), 127.2 (C), 127.4 (CH), 128.3 (CH), 128.4 (CH), 130.5 (CH), 134.7 (C), 141.1 (C-6), 143.7 (C), 143.8 (C), 149.8 (C=O), 164.2 (C x2);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₃₁H₂₇N₂O₅FCIINa, calculée m/z 711.0535, observée m/z 711.0531

5-(1,2-Diiodo-vinyl)-1-(4-fluoro-5-trityloxy méthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 158a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°6 (page 216) à I₂ fournit **158a** (32 %) sous forme de solide orange.

$[\alpha]_D^{20} +4.5$ (c 1.0, CHCl₃);

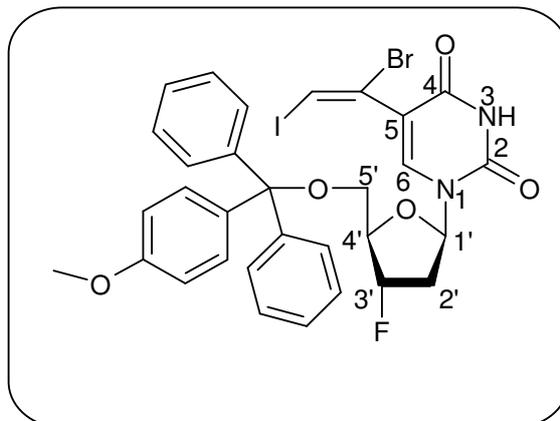
Point de fusion : 58-59 °C;

¹H NMR (CDCl₃) δ : 2.05-2.35 (m, 1H, H-2'a), 2.67-2.86 (m, 1H, H-2'b), 3.43 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H, H-5'), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 4.34 (td, $J = 3.5$ Hz, 27.0 Hz, 1H, H-4'), 5.23 (dd, $J = 4.7$ Hz, 53.7 Hz, 1H, H-3'), 6.33 (dd, $J = 5.0$ Hz, 9.1 Hz, 1H, H-1'), 6.75-7.50 (m, 15H, CH alcène, trityle), 7.63 (s, 1H, H-6), 9.00 (se, 1H, NH);

¹³C NMR (CDCl₃) δ : 39.4 (d, $J = 21.1$ Hz, C-2'), 55.5 (OCH₃), 63.1 (d, $J = 9.6$ Hz, C-5'), 84.5 (d, $J = 25.2$ Hz, C-4'), 85.3 (C), 85.5 (CH alcène), 87.5 (C), 87.7 (C-1'), 94.1 (d, $J = 177.5$ Hz, C-3'), 113.6 (CH), 118.1 (C), 127.4 (CH), 128.3 (CH), 128.4 (CH), 130.5 (CH), 134.8 (C), 139.2 (C-6), 143.7 (C), 143.8 (C), 149.5 (C=O), 158.9 (C), 159.0 (C);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₃₁H₂₇N₂O₅FI₂Na, calculée m/z 802.9891, observée m/z 802.9902

5-(1-Bromo-2-iodo-vinyl)-1-(4-fluoro-5-trityloxy méthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 138b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°6 (page 216) à IBr fournit **138b** (45 %) sous forme d'huile jaune.

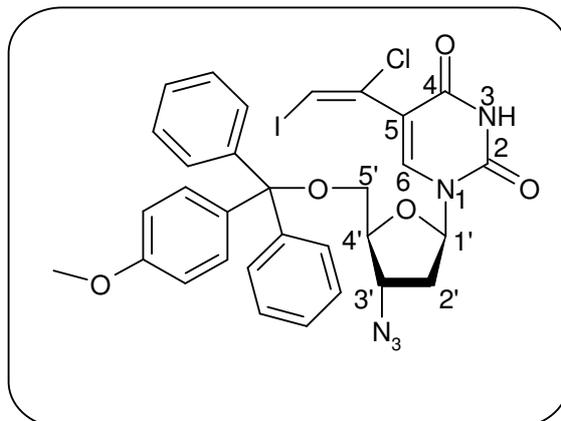
$[\alpha]_D^{20} +13.0$ (c 1.0, CHCl₃);

¹H NMR (CDCl₃) δ : 2.10-2.40 (m, 1H, H-2'a), 2.70-2.92 (m, 1H, H-2'b), 3.35-3.52 (m, 2H, H-5'), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 4.35 (td, $J = 3.2$ Hz, 27.6 Hz, 1H, H-4'), 5.24 (dd, $J = 4.6$ Hz, 53.6 Hz, 1H, H-3'), 6.33 (dd, $J = 5.1$ Hz, 9.2 Hz, 1H, H-1'), 6.96 (s, 1H, CH alcène), 6.80-7.50 (m, 14H, trityle), 7.72 (s, 1H, H-6), 8.68 (se, 1H, NH);

¹³C NMR (CDCl₃) δ : 39.5 (d, $J = 20.5$ Hz, C-2'), 55.4 (OCH₃), 63.1 (d, $J = 10.8$ Hz, C-5'), 82.7 (C-1'), 84.5 (d, $J = 25.3$ Hz, C-4'), 85.6 (CH alcène), 87.4 (C), 87.5 (C), 94.1 (d, $J = 176.9$ Hz, C-3'), 113.6 (CH), 113.7 (CH), 127.3 (C), 127.4 (CH), 128.2 (CH), 128.4 (CH), 130.6 (CH), 134.7 (C), 140.7 (C-6), 143.7 (C), 143.8 (C), 149.6 (C=O), 159.0 (C x2);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₃₁H₂₇N₂O₅FBrINa, calculée m/z 755.0030, observée m/z 755.0004

1-(4-Azido-5-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-(1-Chloro-2-iodo-vinyl)-1H-pyrimidine-2,4-dione **162c**



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°6 (page 216) à ICl fournit **162c** (53 %) sous forme de gomme jaunâtre.

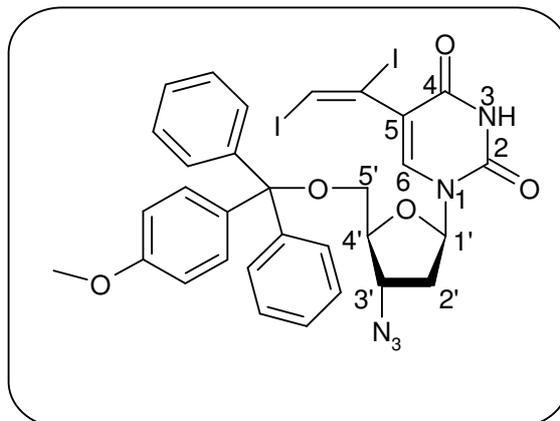
$[\alpha]_D^{20} +11.0$ (c 0.9, CH₃OH);

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.27-2.39 (m, 1H, H-2'a), 2.53-2.63 (m, 1H, H-2'b), 3.36-3.53 (m, 2H, H-5'), 3.98-4.05 (m, 1H, H-4'), 4.18-4.27 (m, 1H, H-3'), 6.20 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-1'), 6.73 (s, 1H, CH alcène), 6.88 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, trityle), 7.25-7.48 (m, 12H, trityle), 7.74 (s, 1H, H-6), 8.94 (s, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 38.5 (C-2'), 55.4 (OCH₃), 60.7 (C-3'), 63.1 (C-5'), 80.7 (CH alkene), 83.9 (C-4'), 85.4 (C-1'), 87.4 (C), 113.6 (CH), 127.2 (CH), 127.3 (CH), 127.9 (CH), 127.97 (CH), 128 (CH), 128.1 (CH), 128.2 (CH), 128.3 (CH), 129.3 (CH), 130.4 (CH), 134.9 (C), 141.2 (C-6), 143.8 (C), 149.4 (C=O), 158.9 (C), 159.1 (C);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁N₅O₄ClNa, calculée m/z 461.9442, observée m/z 461.9453

1-(4-Azido-5-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-(1,2-diiodo-vinyl)-1H-pyrimidine-2,4-dione



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°6 (page 216) à I₂ fournit **168a** (52 %) sous forme de solide orange.

$[\alpha]_D^{20} +16.0$ (c 1.0, CH₃OH);

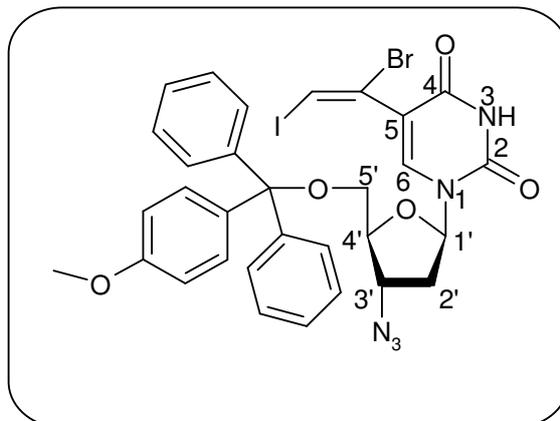
Point de fusion : 138-139 °C;

¹H NMR (CDCl₃) δ : 2.23-2.34 (m, 1H, H-2'a), 2.51-2.61 (m, 1H, H-2'b); 3.36-3.49 (m, 2H, H-5'), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.98-4.05 (m, 1H, H-4'), 4.16-4.26 (m, 1H, H-3'), 6.16 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-1'), 6.87 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, trityle), 7.21-7.43 (m, 13H, trityle, CH alkene), 7.58 (s, 1H, H-6);

¹³C NMR (CDCl₃) δ : 38.1 (C-2'), 55.2 (OCH₃), 60.4 (C-3'), 62.8 (C-5'), 83.5 (C-4'), 85.1 (C-1'), 87.1 (C), 87.2 (CH alcène), 113.3 (CH), 117.6 (C), 127.1 (CH), 128.0 (CH), 128.1 (CH), 130.2 (CH), 135.6 (C), 139.0 (C-6), 143.5 (C), 143.6 (C), 149.1 (C=O), 158.6 (C), 158.7 (C);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁N₅O₄I₂Na, calculée m/z 553.8798, observée m/z 553.8803

1-(4-Azido-5-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-(1-bromo-2-iodo-vinyl)-1H-pyrimidine-2,4-dione



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°6 (page 216) à IBr fournit **162b** (72 %) sous forme solide jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20} +3.0$ (c 0.9, CH₃OH);

Point de fusion : 88-89°C;

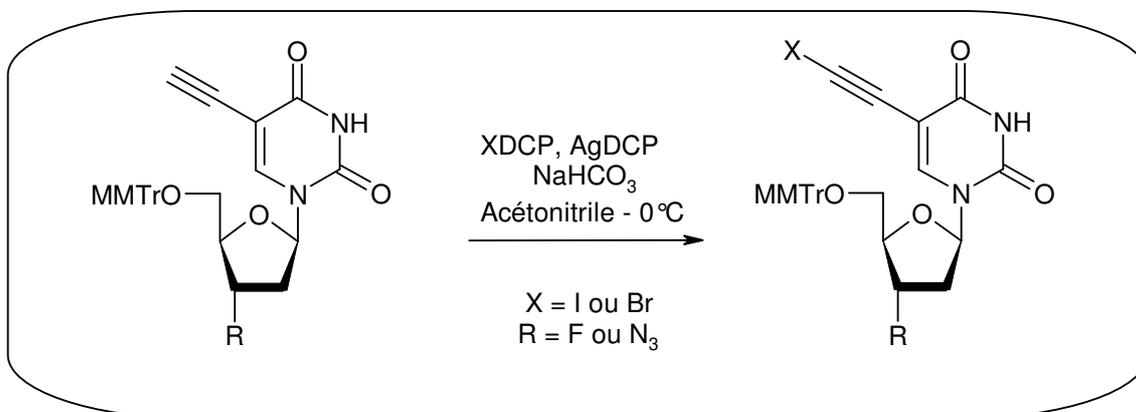
¹H NMR (CDCl₃) δ : 2.25-2.36 (m, 1H, H-2'a), 2.51-2.61 (m, 1H, H-2'b), 3.35-3.50 (m, 2H, H-5'), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.98-4.03 (m, 1H, H-4'), 4.17-4.23 (m, 1H, H-3'), 6.17 (t, $J = 6.3$ Hz, H-1'), 6.86 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, trityle), 6.95 (s, 1H, CH alcène), 7.21-7.42 (m, 12H, trityle), 7.67 (s, 1H, H-6), 8.85 (s, 1H, NH);

¹³C NMR (CDCl₃) δ : 38.5 (C-2'), 55.4 (OCH₃), 60.7 (C-3'), 63.11 (C-5'), 82.5 (CH), 83.9 (CH), 85.6 (CH), 87.4 (C), 113.5 (CH), 113.8 (C), 115.0 (C), 127.4 (CH), 128.3 (CH), 128.4 (CH), 130.5 (CH), 138.9 (C), 140.7 (C-6), 143.8 (C), 149.3 (C=O), 159.8 (C), 159.9 (C);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁N₅O₄BrINa, calculée m/z 505.8937, observée m/z 505.8939

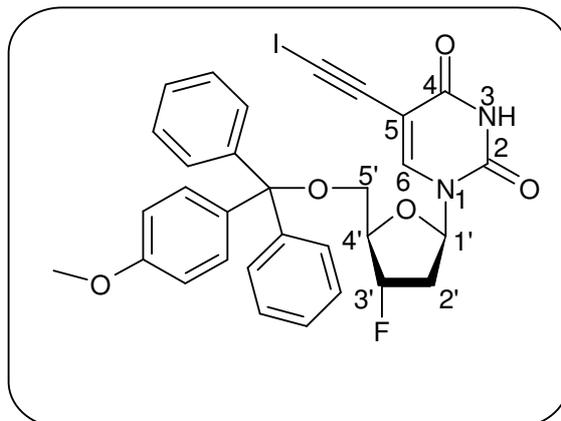
Mode opératoire général N°7 :

Réaction de mono-halogénéation sur le dérivé 5-éthynyle uracile 3'-fluoré et 3'-azido



Le nucléoside de type 5-éthynyle uracile (0.5 mmol) est dissout dans l'acétonitrile sec (5.0 mL), de l'hydrogénocarbonate de sodium (0,5 g) est ajouté et la mélange réactionnel est refroidi à 0°C par un bain d'eau glacé. Une solution du réactif de monohalogénéation (soit IDCP ou BrDCP, 0.7 mmol) et d'AgDCP (0.025 mmol) dans l'acétonitrile sec (1.0 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C et le mélange réactionnel est maintenu sous agitation jusqu'en fin de réaction (typiquement 2h-20h, vérifiée par ccm). Le mélange réactionnel est ensuite neutralisé à 0°C par une solution saturée de bisulfite de sodium (2 mL) puis extrait à l'acétate d'éthyle (10 mL x3). Les phases organiques sont ensuite réunies, lavées à l'eau (5 mL x2), à l'acide chlorhydrique 1M (5 mL x3), à l'eau (5 mL x2), et avec une solution de chlorure de sodium saturée (10 mL), séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner un résidu, qui est soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP / AE : 8/2 à 3/7) pour donner le nucléoside mono-halogénéé désiré.

1-(4-Fluoro-5-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-iodoéthynyl-1H-pyrimidine-2,4-dione 159



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°7 (page 223) à IDCP sur **156** fournit **159** (26 %) sous forme de solide jaune.

$[\alpha]_D^{20} +122.0$ (c 1.0, CHCl₃);

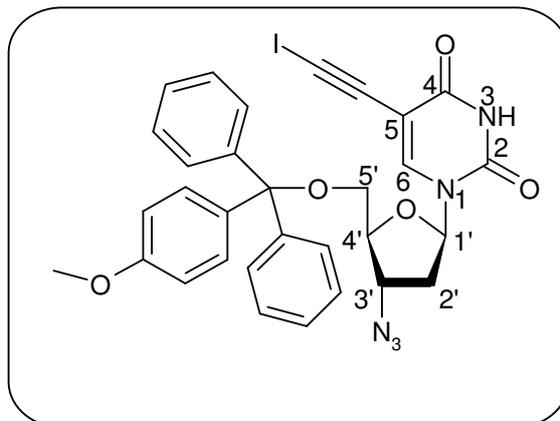
Point de fusion : 73-74 °C;

¹H NMR (CDCl₃) δ : 2.15-2.48 (m, 1H, H-2'a), 2.68-2.93 (m, 1H, H-2'b), 3.30-3.56 (m, 2H, H-5'), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 4.38 (d, $J = 27.0$ Hz, 1H, H-4'), 5.32 (dd, $J = 4.4$ Hz, 53.4 Hz, 1H, H-3'), 6.33 (dd, $J = 5.3$ Hz, 9.1 Hz, 1H, H-1'), 6.75-7.50 (m, 14H, trityle), 8.01 (s, 1H, H-6), 9.20 (se, 1H, NH);

¹³C NMR (CDCl₃) δ : 12.1 (CCI), 39.8 (d, $J = 21.7$ Hz, C-2'), 55.4 (OCH₃), 63.4 (d, $J = 10.2$ Hz, C-5'), 84.2 (C), 84.9 (d, $J = 25.3$ Hz, C-4'), 86.0 (C-1'), 87.8 (C), 94.5 (d, $J = 176.9$ Hz, C-3'), 101.0 (C), 113.6 (CH), 127.5 (CH), 127.9 (C), 128.1 (CH), 128.2 (CH), 130.4 (CH), 134.6 (C), 143.5 (C), 143.7 (C-6), 143.8 (C), 149.2 (C=O), 159.0 (C), 161.6 (C);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₃₁H₂₆N₂O₅FINa, calculée m/z 675.0768, observée m/z 675.0771

1-(4-Azido-5-trityloxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-iodoéthynyl-1H-pyrimidine-2,4-dione 163



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°7 (page 223) à IDCP sur **160** fournit **163** (74 %) sous forme de solide jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20}$ +32.0 (c 1.0, CH₃OH);

Point de fusion : 94-96 °C;

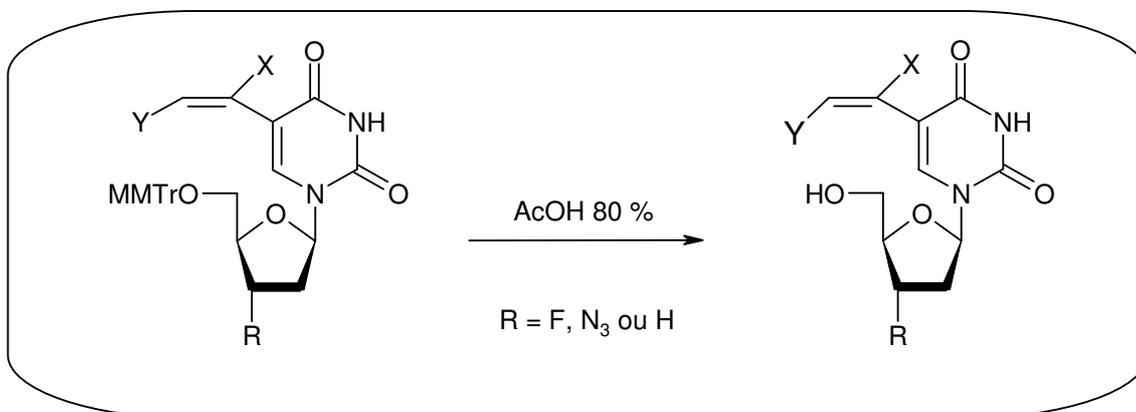
¹H NMR (CDCl₃) δ : 2.37-2.47 (m, 1H, H-2'a), 2.52-2.62 (m, 1H, H-2'b), 3.36-3.48 (m, 2H, H-5'), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 4.01-4.05 (m, 1H, H-4'), 4.28-4.38 (m, 1H, H-3'), 6.15 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, H-1'), 6.85-6.89 (m, 2H, trityle), 7.22-7.47 (m, 12H, trityle), 8.02 (s, 1H, H-6);

¹³C NMR (CDCl₃) δ : 12.9 (C), 39.3 (C-2'), 56.0 (OCH₃), 61.2 (C-3'), 63.5 (C-5'), 84.8 (C-4'), 86.4 (C-1'), 88.2 (C), 101.4 (C), 114.2 (CH), 128.0 (CH), 128.8 (CH), 128.9 (CH), 131.0 (CH), 135.4 (C), 144.3 (C-6), 149.6 (C), 159.5 (C), 162.1 (C);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₃₁H₂₆N₅O₅INa, calculée m/z 698.0876, observée m/z 698.0871

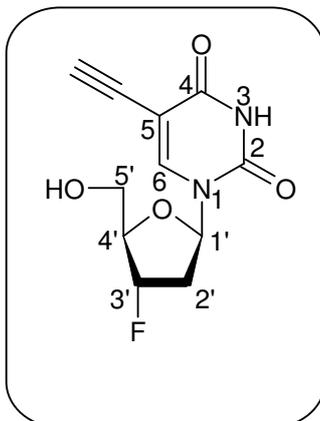
Mode opératoire général N°8 :

Réaction de clivage du groupement protecteur monométhoxytrityle



Une solution du nucléoside protégé (0.3 mmol) dans l'acide acétique 80 % (30 mL) est laissé sous agitation jusqu'à fin de réaction (vérifiée par ccm, typiquement 18h). Le solvant est éliminé sous pression réduite et le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice (éluant : EP / AE : 2/8) pour donner le nucléoside déprotégé désiré.

5-Ethynyl-1-(4-fluoro-5-hydroxyméthyl-tétra hydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 157



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°8 (page 226) à **156** fournit **157** (50 %) sous forme de solide jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20} +0.5$ (c 1.0, CH₃OH);

Point de fusion : 209-210 °C;

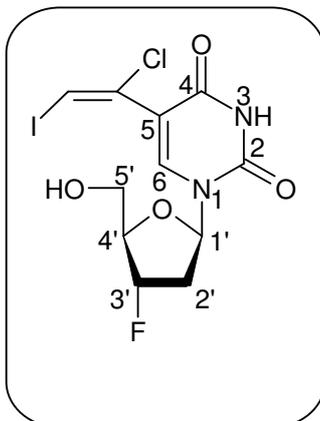
UV (MeOH) λ_{max} 287 nm;

¹H NMR (CD₃OD) δ : 2.13-2.45 (m, 1H, H-2'a), 2.47-2.71 (m, 1H, H-2'b), 3.56 (s, 1H, H alcyne), 3.79 (d, $J = 3.2$ Hz, 2H, H-5'), 4.30 (td, $J = 3.0$ Hz, 27.0 Hz, 1H, H-4'), 5.27 (dd, $J = 4.9$ Hz, 53.8 Hz, 1H, H-3'), 6.29 (dd, $J = 5.5$ Hz, 8.9 Hz, 1H, H-1'), 8.38 (s, 1H, H-6);

¹³C NMR (CD₃OD) δ : 39.8 (d, $J = 21.1$ Hz, C-2'), 62.6 (d, $J = 10.8$ Hz, C-5'), 75.9 (CH alcyne), 82.9 (C), 87.0 (C-1'), 87.4 (d, $J = 24.1$ Hz, C-4'), 96.0 (d, $J = 174.5$ Hz, C-3'), 100.0 (C), 146.0 (C-6), 151.2 (C=O), 164.2 (C=O);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁N₂O₄FNa, calculée m/z 254.2197, observée m/z 254.2198.

5-(1-Chloro-2-iodo-vinyl)-1-(4-fluoro-5-hydroxy méthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 164c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°8 (page 226) à **158c** fournit **164c** (76 %) sous forme de solide orange.

$[\alpha]_D^{20} +17.0$ (c 0.7, CH₃OH);

Point de fusion : 87-88 °C;

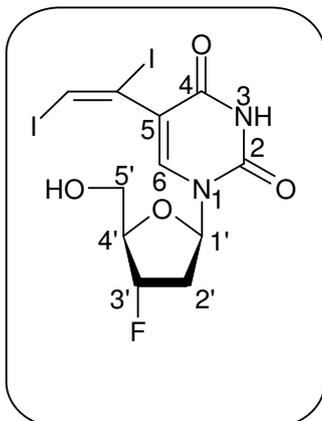
UV (MeOH) λ_{max} 274 nm;

¹H NMR (CD₃OD) δ : 2.13-2.48 (m, 1H, H-2'a), 2.52-2.75 (m, 1H, H-2'b), 3.80 (d, J = 2.8 Hz, 2H, H-5'), 4.30 (td, J = 2.8 Hz, 26.8 Hz, 1H, H-4'), 5.30 (dd, J = 4.6 Hz, 53.5 Hz, 1H, H-3'), 6.37 (dd, J = 5.7 Hz, 8.8 Hz, 1H, H-1'), 7.06 (s, 1H, CH alcène), 8.38 (s, 1H, H-6);

¹³C NMR (CD₃OD) δ : 40.2 (d, J = 21.1 Hz, C-2'), 62.7 (d, J = 10.8 Hz, C-5'), 81.1 (CH alcène), 87.0 (C-1'), 87.4 (d, J = 23.5 Hz, C-4'), 96.2 (d, J = 174.5 Hz, C-3'), 114.5 (C) , 128.9 (C), 146.0 (C-6), 151.2 (C=O), 164.2 (C=O);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁N₂O₄FCIINa, calculée m/z 438.9334, observée m/z 438.9340.

5-(1,2-Diiodo-vinyl)-1-(4-fluoro-5-hydroxy méthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 164a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°8 (page 226) à **158a** fournit **164a** (51 %) sous forme de solide jaune.

$[\alpha]_D^{20} +16.0$ (c 1.0, CH₃OH);

Point de fusion : 112-113 °C;

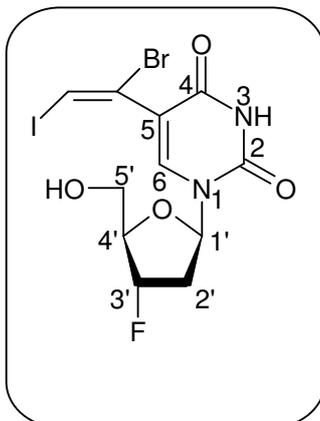
UV (MeOH) λ_{max} 232 nm, 274 nm;

¹H NMR (CD₃OD) δ : 2.13-2.47 (m, 1H, H-2'a), 2.50-2.77 (m, 1H, H-2'b), 3.80 (d, $J = 2.8$ Hz, 2H, H-5'), 4.32 (td, $J = 2.9$ Hz, 27.0 Hz, 1H, H-4'), 5.30 (dd, $J = 4.6$ Hz, 53.7 Hz, 1H, H-3'), 6.36 (dd, $J = 5.6$ Hz, 9.0 Hz, 1H, H-1'), 7.53 (s, 1H, CH alcène), 8.28 (s, 1H, H-6);

¹³C NMR (CD₃OD) δ : 40.3 (d, $J = 20.5$ Hz, C-2'), 62.7 (d, $J = 10.8$ Hz, C-5'), 87.0 (C-1'), 87.3 (d, $J = 24.1$ Hz, C-4'), 87.3 (C), 88.1 (CH alcène), 96.0 (d, $J = 174.5$ Hz, C-3'), 119.2 (C), 142.2 (C-6), 151.5 (C=O), 161.8 (C=O);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁N₂O₄FI₂Na, calculée m/z 530.8690, observée m/z 530.8687.

5-(1-Bromo-2-iodo-vinyl)-1-(4-fluoro-5-hydroxy méthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 164b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°8 (page 226) à **158b** fournit **164b** (52 %) sous forme de solide jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20} +13.0$ (c 0.6, CH₃OH);

Point de fusion : 107 °C;

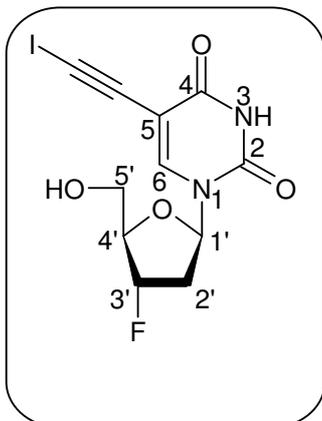
UV (MeOH) λ_{max} 296 nm;

¹H NMR (CD₃OD) δ : 2.14-2.47 (m, 1H, H-2'a), 2.52-2.78 (m, 1H, H-2'b), 3.80 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H, H-5'), 4.31 (td, $J = 2.9$ Hz, 27.0 Hz, 1H, H-4'), 5.30 (dd, $J = 4.7$ Hz, 53.7 Hz, 1H, H-3'), 6.36 (dd, $J = 5.6$ Hz, 9.0 Hz, 1H, H-1'), 7.30 (s, 1H, CH alcène), 8.36 (s, 1H, H-6);

¹³C NMR (CD₃OD) δ : 40.3 (d, $J = 21.1$ Hz, C-2'), 62.7 (d, $J = 10.2$ Hz, C-5'), 83.2 (CH alcène), 87.0 (C-1'), 87.3 (d, $J = 25.2$ Hz, C-4'), 87.3 (C), 96.0 (d, $J = 177.5$ Hz, C-3'), 115.5 (C), 116.0 (C), 143.9 (C-6), 151.5 (C=O), 161.8 (C=O);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁N₂O₄FBrINa, calculée m/z 482.8829, observée m/z 482.8838

1-(4-Fluoro-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-iodoéthynyl-1H-pyrimidine-2,4-dione 165



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°8 (page 226) à **159** fournit **165** (47 %) sous forme de solide jaune.

$[\alpha]_D^{20}$ -1.5 (c 1.0, CH₃OH);

Point de fusion : 140 °C;

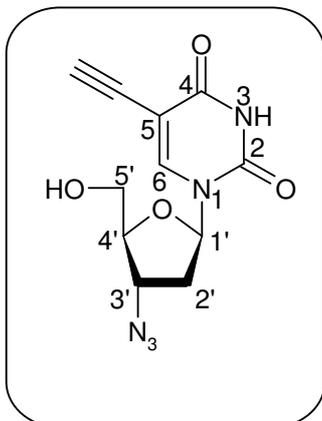
UV (MeOH) λ_{\max} 233 nm, 298 nm;

¹H NMR (CD₃OD) δ : 2.11-2.45 (m, 1H, H-2'a), 2.46-2.75 (m, 1H, H-2'b), 3.79 (d, J = 3.2 Hz, 2H, H-5'), 4.29 (td, J = 2.9 Hz, 27.0 Hz, 1H, H-4'), 5.27 (dd, J = 4.9 Hz, 53.9 Hz, 1H, H-3'), 6.28 (dd, J = 5.5 Hz, 8.9 Hz, 1H, H-1'), 8.30 (s, 1H, H-6);

¹³C NMR (CD₃OD) δ : 15.8 (C-CI), 39.8 (d, J = 20.5 Hz, C-2'), 62.5 (d, J = 10.8 Hz, C-5'), 85.2 (C), 87.0 (C-1'), 87.3 (d, J = 24.1 Hz, C-4'), 96.0 (d, J = 175.1 Hz, C-3'), 101.5 (C), 146.0 (C-6), 151.1 (C=O), 164.4 (C=O);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁N₂O₄FBrINa, calculée m/z 402.9567, observée m/z 402.9571

1-(4-Azido-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-éthynyl-1H-pyrimidine-2,4-dione
161



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°8 (page 226) à **160** fournit **161** (65 %) sous forme de gomme jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20} +0.5$ (c 1.0, CH₃OH);

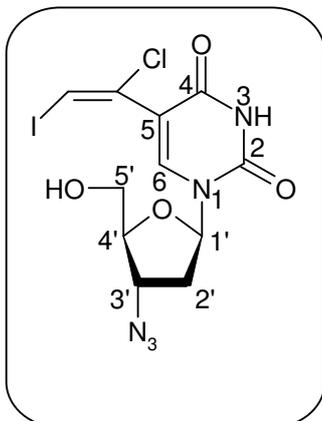
UV (MeOH) λ_{\max} 220, 290 nm;

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 3.36-2.50 (m, 2H, H-2'), 3.53-3.62 (m, 2H, H-5'), 3.79-3.88 (m, 1H, H-4'), 4.32-4.43 (m, 1H, H-3'), 5.33 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, OH), 6.01 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, H-1'), 8.28 (s, 1H, H-6'), 11.65 (se, 1H, NH);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ : 36.9 (C-2'), 59.2 (C-3'), 60.2 (C-5'), 76.4 (CH alcyne), 83.6 (C), 84.5 (C-1', C-4'), 97.6 (C), 144.5 (C-6), 149.4 (C=O), 161.7 (C=O);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : en cours

1-(4-Azido-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-(1-chloro-2-iodo-vinyl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 166c



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°8 (page 226) à **162c** fournit **166c** (57 %) sous forme de gomme jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20} +28.0$ (c 1.0, CH₃OH);

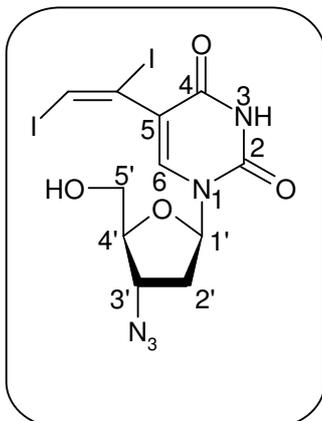
UV (MeOH) λ_{\max} 274 nm;

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 2.33-2.44 (m, 2H, H-2'), 3.33-3.71 (m, 1H, H-5'), 3.86-3.91 (m, 1H, H-4'), 4.35-4.42 (m, 1H, H-3'), 5.28 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, OH), 6.09 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-1'), 7.23 (s, 1H, CH alcène), 8.22 (s, 1H, H-6), 11.73 (s, 1H, NH);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ : 37.7 (C-2'), 60.7 (C-3'), 61.3 (C-5'), 84.5 (CH), 85.2 (CH x2), 113.0 (C), 127.4 (C), 143.1 (C-6), 150.3 (C=O), 160.1 (C=O);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁N₅O₄ClINa, calculée m/z 461.9442, observée m/z 461.9453.

1-(4-Azido-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-(1,2-diiodo-vinyl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 166a



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°8 (page 226) à **162a** fournit **166a** (78 %) sous forme de gomme jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20} +17.0$ (c 1.0, CH₃OH);

Point de fusion : 112-113 °C;

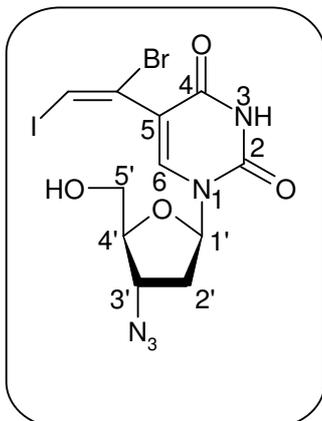
UV (MeOH) λ_{\max} 225 nm, 284 nm;

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 2.34-2.43 (m, 2H, H-2'), 3.56-3.71 (m, 2H, H-5'), 3.85-3.90 (m, 1H, H-4'), 4.35-4.41 (m, 1H, H-3'), 5.26 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, OH), 6.09 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-1'), 7.61 (s, 1H, CH alcène), 8.06 (s, 1H, H-6'), 11.68 (s, 1H, NH);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ : 37.5 (C-2'), 60.4 (C-3'), 61.4 (C-5'), 85.0 (C-1', C-4'), 88.9 (C-I), 90.2 (CH alcène), 117.7 (C-5), 140.5 (C-6), 150.1 (C=O), 159.9 (C=O);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁N₅O₄I₂Na, calculée m/z 553.8798, observée m/z 553.8803

1-(4-Azido-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-(1-bromo-2-iodo-vinyl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 166b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°8 (page 226) à **162b** fournit **166b** (53 %) sous forme de gomme jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20} +11.0$ (c 1.0, CH₃OH);

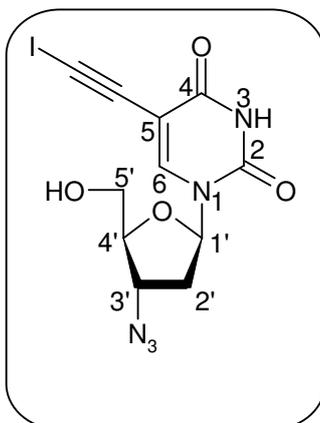
UV (MeOH) λ_{\max} 229-276 nm;

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 2.36-2.43 (m, 2H, H-2'), 3.57-3.69 (m, 2H, H-5'); 3.86-3.91 (m, 1H, H-4'), 4.35-4.42 (m, H-3'), 5.28 (se, 1H, OH), 6.09 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, H-1'), 7.45 (s, 1H, CH alcène), 8.18 (s, 1H, H-6'), 11.7 (s, 1H, NH);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ : 37.0 (C-2'), 60.0 (C-3'), 60.7 (C-5'), 84.6 (C-1', C-4'), 85.6 (CH alcène), 113.9 (C), 114.2 (C), 141.9 (C-6), 149.6 (C=O), 159.4 (C=O);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁N₅O₄BrINa, calculée m/z 505.8937, observée m/z 505.8939

1-(4-Azido-5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-iodoéthynyl-1H-pyrimidine-2,4-dione 167



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°8 (page 226) à **163** fournit **167** (60 %) sous forme de gomme jaunâtre.

$[\alpha]_D^{20} +15.0$ (c 1.0, CH₃OH);

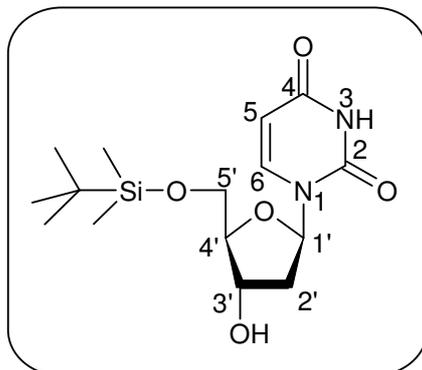
UV (MeOH) λ_{\max} 236 nm, 295 nm;

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 2.24-2.34 (m, 1H, H-2'a), 2.39-2.46 (m, 1H, H-2'b), 3.54-3.72 (m, 2H, H-5'), 3.79-3.84 (m, 1H, H-4'), 4.34-4.41 (m, 1H, H-3'), 5.30 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, OH), 6.01 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-1'), 8.22 (s, 1H, H-6), 11.66 (s, 1H, NH);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ : 19.8 (C), 36.8 (C-2'), 59.2 (C-3'), 60.2 (C-5'), 84.3 (C-1', C-4'), 84.8 (C), 99.0 (C), 144.6 (C-6), 149.3 (C=O), 161.7 (C=O);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₀N₅O₄INa, calculée m/z 425.9682, observée m/z 425.9675

1-[5-(tert-Butyl-diméthyl-silanyloxyméthyl)-4-hydroxy-tétrahydro-furan-2-yl]-1H-pyrimidine-2,4-dione **173**



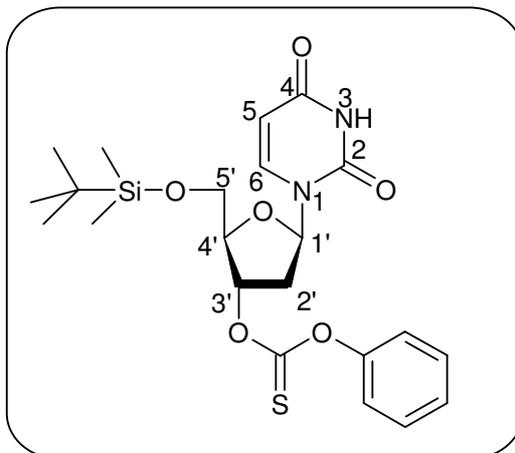
Mode opératoire :

Une solution de 2'-déoxyuridine (4.0 g, 17.53 mmol) et de chlorure de tert-Butyl-diméthyl-silyle (3.17 g, 21.04 mmol) dans la pyridine sèche (40 mL) sous argon est laissée sous agitation pendant 2h. La pyridine est évaporée sous pression réduite, puis du dichlorométhane (100 mL) est ajouté, et la phase organique est lavée à l'eau (30 mL x3), séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite pour donner un résidu, qui est soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP / AE : 8/2 à AE) pour donner le nucléoside protégé **173** (5.70g, 95 %) sous forme de solide blanc.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0.08 (s, 6H, CH₃Si x2), 0.89 (s, 9H, CH₃C x3), 2.00-2.20 (m, 1H, H-2'a), 2.30-2.50 (m, 1H, H-2'b), 3.50 (s, 1H, OH), 3.85 (qd, 2H, H-5'), 4.00-4.15 (m, 1H, H-4'), 4.35-4.55 (m, 1H, H-3'), 5.67 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5), 6.35 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-1'), 7.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-6), 9.65 (s, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : -5.5 (CH₃Si), -5.4 (CH₃Si), 18.4 (C-Si), 26.0 (C(CH₃)₃), 41.6 (C-2'), 63.4 (C-5'), 72.0 (C-3'), 85.6 (C-1'), 87.6 (C-4'), 102.4 (C-5), 140.5 (C-6), 150.8 (C=O), 164.0 (C=O)

Ester de l'acide thiocarbonique O-[2-(tert-butyl-diméthyl-silanyloxyméthyl)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-tétrahydro-furan-3-yl] ester O-phényle 174



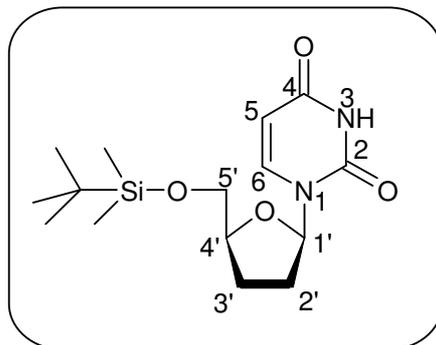
Mode opératoire :

Une solution de **173** (2.835 g, 8.28 mmol) et de chlorure de phénoxythiocarbonyle (4.29 g, 3.43 mL, 24.84 mmol) dans la pyridine sèche (83 mL) sous argon est laissée sous agitation pendant 17h. La pyridine est évaporée sous pression réduite, puis le résidu est directement soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP à AE) pour donner le nucléoside protégé **174** (3.09 g, 78 %) sous forme d'huile rouge.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0.13 (s, 6H, CH₃Si x2), 0.93 (s, 9H, CH₃C x3), 2.15-2.40 (m, 1H, H-2'a), 2.75-2.85 (m, 1H, H-2'b), 3.85-4.10 (m, 2H, H-5'), 4.43 (s, 1H, H-4'), 5.65-5.90 (m, 2H, H-3', H-5), 6.35 (dd, J = 5.6 Hz, J = 18.5 Hz, 1H, H-1'), 7.00-7.50 (m, 5H, Ph), 7.94 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-6), 10.30 (s, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ -5.6 (CH₃Si), -5.6 (CH₃Si), 18.2 (C-Si), 25.8 (C(CH₃)₃), 38.4 (C-2'), 64.0 (C-5'), 84.5 (C-3'), 85.1 (C-4'), 85.2 (C-1'), 102.7 (C-5), 121.7 (CH x2), 129.4 (CH), 129.6 (CH x2), 139.7 (C-6), 150.6 (C=O), 153.2 (C, Ph), 163.8 (C=O), 194.1 (C=S)

1-[5-(tert-Butyl-dimethyl-silyloxy)méthyl]-tétrahydro-furan-2-yl]-1H-pyrimidine-2,4-dione **175**



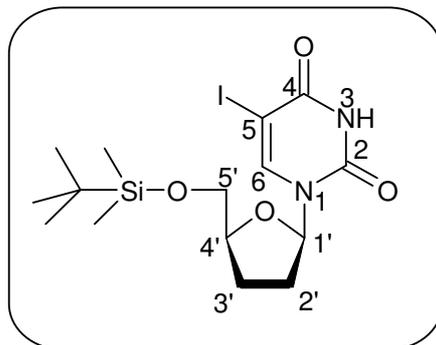
Mode opératoire :

Une solution de **174** (651.6 mg, 1.36 mmol) dans le toluène distillé (16.5 mL) est dégazée par bullage d'argon dans la solution pendant 1h. Puis l'AIBN (223,7 mg, 1.36 mmol) et le tris-triméthylsilylsilane (630 μ L, 680.4 mg, 2.34 mmol) sont ajoutés et le mélange réactionnel est chauffé au reflux sous argon et est laissé sous agitation pendant 16h. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu est soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP / AE : 9/1 à EP / AE : 4/6) pour donner le nucléoside protégé **175** (244.4 mg, 55 %) sous forme de solide blanc.

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0.08 (s, 6H, CH_3Si x2), 0.90 (s, 9H, CH_3C x3), 1.80-2.10 (m, 3H, H-2'a, H-3), 2.25-2.50 (m, 1H, H-2'b), 3.85 (dd, $J = 11.7$ Hz, $J = 90.5$ Hz, 2H, H-5'), 4.05-4.25 (m, 1H, H-4'), 5.64 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-5), 6.06 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-1'), 8.08 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-6), 9.48 (s, 1H, NH);

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : -5.6 (CH_3Si), -5.5 (CH_3Si), 18.4 (C-Si), 24.3 (C-3'), 25.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 33.5 (C-2'), 63.5 (C-5'), 82.0 (C-4'), 86.2 (C-1'), 101.4 (C-5), 140.6 (C-6), 150.7 (C=O), 164.2 (C=O)

1-[5-(tert-Butyl-diméthyl-silanyloxyméthyl)-tétrahydro-furan-2-yl]-5-iodo-1H-pyrimidine-2,4-dione **176**



Mode opératoire :

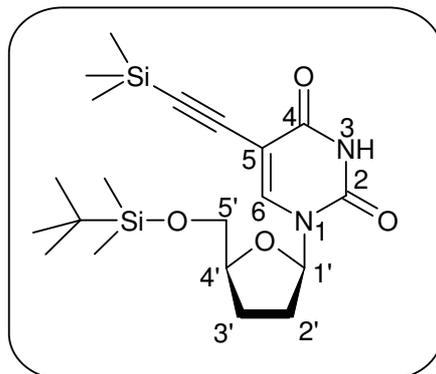
A une solution de **175** (235 mg, 0.72 mmol) dans le dichlorométhane (5,7 mL) sous argon sont ajoutés à ta successivement l'iode (109 mg, 0.432 mmol), le $\text{PhI}(\text{OCOCF}_3)_2$ (186 mg, 0.432 mmol), et la pyridine (69.5 mg, 71.7 μL , 0.864 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 16h. De l'acétate d'éthyle (20 mL) et une solution de bisulfite de sodium saturée (15 mL) sont ajoutées, la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (20 mL x2), les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner un résidu, qui est soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP à AE) pour donner le nucléoside iodé pur **176** (260 mg, 80 %) sous forme de solide blanc.

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0.14 (s, 6H, CH_3Si x2), 0.94 (s, 9H, CH_3C x3), 1.85-2.10 (m, 3H, H-2'a, H-3), 2.25-2.50 (m, 1H, H-2'b), 3.84 (ddd, $J = 2.7$ Hz, $J = 11.5$ Hz, $J = 75.3$ Hz, 2H, H-5'), 4.10-4.25 (m, 1H, H-4'), 5.95-6.10 (m, 1H, H-1'), 8.17 (s, 1H, H-6), 8.93 (s, 1H, NH);

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : -4.9 (CH_3Si), -4.9 (CH_3Si), 18.7 (C-Si), 25.3 (C-3'), 26.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 33.2 (C-2'), 64.7 (C-5'), 67.9 (C-5), 81.7 (C-4'), 87.0 (C-1'), 144.7 (C-6), 150.3 (C=O), 160.4 (C=O)

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4\text{INaSi}$, calculée m/z 475.0526, observée m/z 475.0524

**1-[5-(tert-Butyl-diméthyl-silanyloxyméthyl)-tétrahydro-furan-2-yl]
-5-triméthylsilanyléthynyl-1H-pyrimidine-2,4-dione **177****



Mode opératoire :

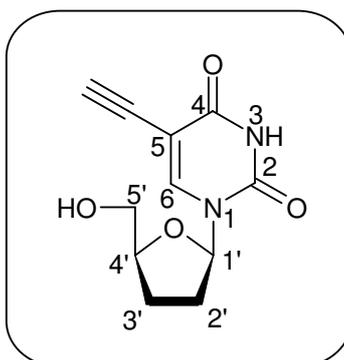
Le nucléoside iodé **176** (860 mg, 1.9 mmol) est dissout sous argon dans un mélange de diméthylformamide sec (25.6 mL), de triéthylamine sèche (1.34 mL, 9.5 mmol), et de triméthylsilylacétylène (1.35 mL, 9.5 mmol). De l'iodure de cuivre (72.9 mg, 0.2 mmol) et du PdCl₂(PPh₃)₂ (133.2 mg, 0.4 mmol) sont ajoutés et le mélange réactionnel est laissé sous agitation à ta sous argon pendant 16h. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP à EP / AE : 5/5) pour donner **177** (807 mg, 80 %) sous forme de solide marron.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0.05-0.25 (m, 15H, CH₃Si x5), 0.94 (s, 9H, CH₃C x3), 1.90-2.12 (m, 3H, H-2'a, H-3), 2.30-2.50 (m, 1H, H-2'b), 3.80 (ddd, *J* = 2.5 Hz, *J* = 11.5 Hz, *J* = 80.1 Hz, 2H, H-5'), 4.12-4.27 (m, 1H, H-4'), 5.95-6.10 (m, 1H, H-1'), 8.05 (s, 1H, H-6), 8.55 (s, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : -5.2 (CH₃Si), -4.9 (CH₃Si), 0.03 (CH₃Si), 18.7 (C-Si), 25.3 (C-3'), 26.2 (C(CH₃)₃), 33.3 (C-2'), 64.5 (C-5'), 81.8 (C-4'), 87.1 (C-1'), 95.7 (C-5), 99.6 (C), 99.9 (C), 143.2 (C-6), 149.4 (C=O), 161.5 (C=O)

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₂₀H₃₄N₂O₄INaSi₂, calculée m/z 445.1955, observée m/z 445.1955

5-Ethynyl-1-(5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione **179**



Mode opératoire :

Une solution de **177** (865.0 mg, 2.05 mmol) et de fluorure de tétrabutyle ammonium (1.207 g, 5.00 mmol) dans le tétrahydrofurane sec (39.0 mL) est agitée a ta pendant 2h. L'acétonitrile est éliminée à l'aide d'un évaporateur rotatif, et le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice (éluant : EP / AE : 9/1 à AE / MeOH 9/1) pour donner **179** (483.0 mg, 99 %) sous forme d'une gomme marron.

$[\alpha]_D^{20} +21$ (c 0.7, CH₃OH);

UV (MeOH) λ_{max} 289 nm;

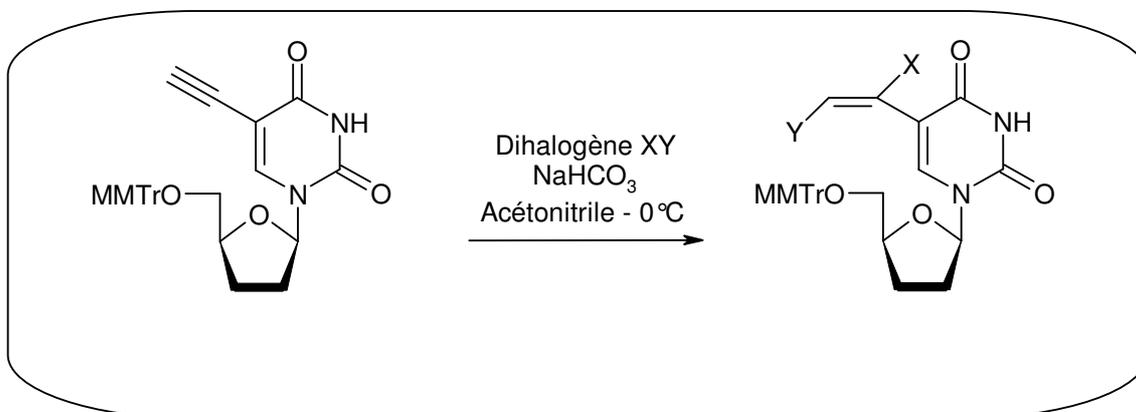
RMN ¹H (CD₃OD) δ : 1.85-2.25 (m, 3H, H-2'a, H-3), 2.30-2.52 (m, 1H, H-2'b), 3.80 (ddd, $J = 2.5$ Hz, $J = 12.2$ Hz, $J = 59.2$ Hz, 2H, H-5'), 4.05-4.37 (m, 1H, H-4'), 6.01 (dd, $J = 2.8$ Hz, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-1'), 8.54 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 25.3 (C-3'), 34.0 (C-2'), 63.1 (C-5'), 76.2 (C-5), 82.6 (CCH), 84.0 (C-4'), 88.3 (C-1'), 98.8 (CCH), 146.4 (C-6), 151.2 (C=O), 164.6 (C=O)

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂N₂O₄Na, calculée m/z 259.0695, observée m/z 259.0702

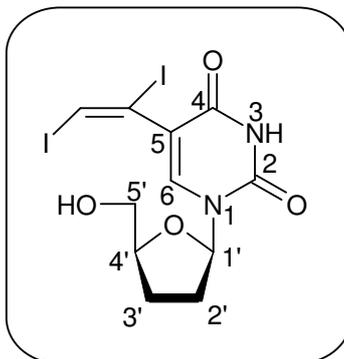
Mode opératoire général N°9 :

Réaction de di-halogénéation sur le dérivé 5-éthynyle uracile 2',3'-didéoxyribosyle



Une solution du nucléoside de type 5-éthynyle uracile (0.5 mmol) **179** dans l'acétonitrile sec (5.0 mL), en présence d'hydrogénocarbonate de sodium (0,5 g), est refroidie à 0°C par un bain d'eau glacé. Une solution du réactif dihalogéné (soit I₂, IBr ou ICl; 0.6 mmol) dans l'acétonitrile sec (1.0 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C et le mélange réactionnel est maintenu sous agitation 5 minutes, puis est ensuite quenché à 0°C par une solution saturée de bisulfite de sodium (2 mL) puis extrait à l'acétate d'éthyle (10 mL x3). Les phases organiques sont ensuite réunies, lavées à l'eau (5 mL x2) et avec une solution de chlorure de sodium saturée (10 mL), séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner un résidu, qui est soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP / AE : 8/2 à AE) pour donner le nucléoside dihalogéné désiré.

5-(1,2-Diiodo-vinyl)-1-(5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione **180a**



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°9 (page 243) à I₂ fournit **180a** (93 %) sous forme d'huile jaune.

$[\alpha]_D^{20} +25$ (c 0.9, CH₃OH);

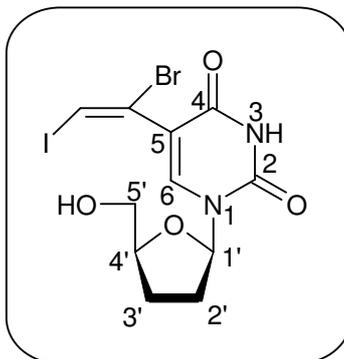
UV (MeOH) λ_{max} 283 nm;

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 1.90-2.25 (m, 3H, H-2'a, H-3), 2.32-2.52 (m, 1H, H-2'b), 3.81 (ddd, $J = 3.3$ Hz, $J = 12.1$ Hz, $J = 52.2$ Hz, 2H, H-5'), 4.10-4.30 (m, 1H, H-4'), 6.05 (dd, $J = 2.8$ Hz, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-1'), 7.51 (s, 1H, H alcène), 8.34 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 25.5 (C-3'), 34.3 (C-2'), 63.4 (C-5'), 84.2 (CH alcène), 87.8 (C-5), 88.0 (C-4'), 88.3 (C-1'), 118.1 (C), 142.4 (C-6), 151.5 (C=O), 162.0 (C=O)

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂N₂O₄I₂Na, calculée m/z 512.8784, observée m/z 512.8784

5-(1-Bromo-2-iodo-vinyl)-1-(5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione 180b



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°9 (page 243) à IBr fournit **180b** (92 %) sous forme de gomme jaune.

$[\alpha]_D^{20} +36$ (c 1.0, CH₃OH);

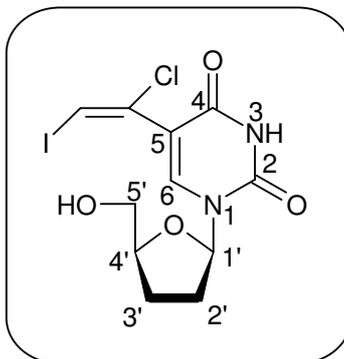
UV (MeOH) λ_{\max} 279 nm;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.90-2.25 (m, 3H, H-2'a, H-3), 2.30-2.60 (m, 1H, H-2'b), 3.92 (dd, $J = 12.1$ Hz, $J = 65.7$ Hz, 2H, H-5'), 4.15-4.35 (m, 1H, H-4'), 6.11 (dd, $J = 2.8$ Hz, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-1'), 7.06 (s, 1H, H alcène), 8.16 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 24.7 (C-3'), 33.4 (C-2'), 63.2 (C-5'), 81.7 (CH alcène), 82.4 (C-4'), 87.2 (C-1'), 113.8 (C), 114.8 (C), 142.4 (C-6), 149.8 (C=O), 159.5 (C=O)

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂N₂O₄BrINa, calculée m/z 464.8923, observée m/z 464.8919

5-(1-Chloro-2-iodo-vinyl)-1-(5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione **180c**



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°9 (page 243) à ICl fournit **180c** (93 %) sous forme de gomme jaune.

$[\alpha]_D^{20} +32$ (c 0.5, CH₃OH);

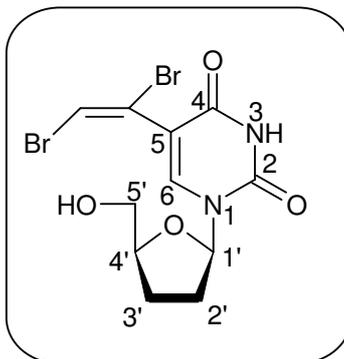
UV (MeOH) λ_{\max} 275 nm;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.90-2.30 (m, 3H, H-2'a, H-3), 2.35-2.60 (m, 1H, H-2'b), 3.92 (dd, $J = 12.1$ Hz, $J = 68.3$ Hz, 2H, H-5'), 4.20-4.35 (m, 1H, H-4'), 6.12 (dd, $J = 3.1$ Hz, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-1'), 6.84 (s, 1H, H alcène), 8.19 (s, 1H, H-6), 8.62 (s, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 24.7 (C-3'), 33.4 (C-2'), 63.3 (C-5'), 79.8 (CH alcène), 82.3 (C-4'), 87.1 (C-1'), 112.4 (C), 128.2 (C), 142.8 (C-6), 149.6 (C=O), 159.3 (C=O)

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂N₂O₄ClINa, calculée m/z 420.9428, observée m/z 420.9425

5-(1,2-Dibromo-vinyl)-1-(5-hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dione **180d**



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°9 (page 243) à Br₂ fournit **180d** (53 %) sous forme de gomme jaune.

$[\alpha]_D^{20} +24$ (c 1.0, CH₃OH);

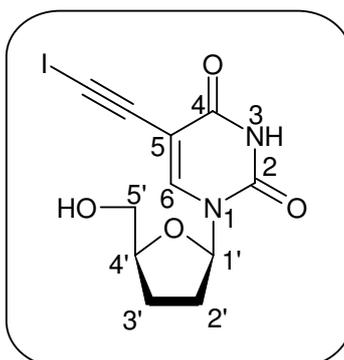
UV (MeOH) λ_{\max} 280 nm;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.90-2.25 (m, 3H, H-2'a, H-3), 2.30-2.60 (m, 1H, H-2'b), 3.80 (ddd, $J = 3.2$ Hz, $J = 12.3$ Hz, $J = 56.9$ Hz, 2H, H-5'), 4.10-4.25 (m, 1H, H-4'), 6.05 (dd, $J = 2.7$ Hz, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-1'), 7.05 (s, 1H, H alcène), 8.47 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 25.3 (C-3'), 34.3 (C-2'), 63.2 (C-5'), 84.3 (C-4'), 88.4 (C-1'), 109.8 (CH alcène), 112.0 (C), 114.8 (C), 144.0 (C-6), 151.5 (C=O), 162.2 (C=O)

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₂N₂O₄Br₂Na, calculée m/z 416.9062, observée m/z 416.9063

1-(5-Hydroxyméthyl-tétrahydro-furan-2-yl)-5-iodoéthynyl-1H-pyrimidine-2,4-dione **181**



Mode opératoire :

Le nucléoside **179** (50.0 mg, 0.21 mmol) est dissout dans l'acétonitrile sec (2.0 mL), de l'hydrogénocarbonate de sodium (0,5 g) est ajouté et la mélange réactionnel est refroidi à 0°C par un bain d'eau glacé, avant l'ajout des réactifs de monohalogenation (IDCP 138.5 mg et AgDCP 4.8 mg). Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation 5min, puis est ensuite quenché à 0°C par une solution saturée de bisulfite de sodium (2 mL) puis extrait à l'acétate d'éthyle (10 mL x3). Les phases organiques sont ensuite réunies, lavées à l'eau (5 mL x2), à l'acide chlorhydrique 1M (5 mL x3), à l'eau (5 mL x2), et avec une solution de chlorure de sodium saturée (10 mL), séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner un résidu, qui est soumis à une purification par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluion (EP / AE : 8/2 à 3/7) pour **181** (10.0 mg, 13 %) sous forme de gomme jaune.

$[\alpha]_D^{20}$ +8 (c 0.6, CH₃OH);

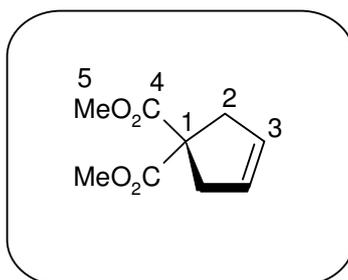
UV (MeOH) λ_{\max} 288 nm;

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.85-2.25 (m, 3H, H-2'a, H-3), 2.30-2.50 (m, 1H, H-2'b), 3.80 (ddd, J = 2.8 Hz, J = 12.2 Hz, J = 59.3 Hz, 2H, H-5'), 4.10-4.25 (m, 1H, H-4'), 6.00 (dd, J = 2.9 Hz, J = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 8.47 (s, 1H, H-6);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.6 (C-3'), 34.3 (C-2'), 61.3 (C-5'), 84.3 (C-4'), 84.9 (C-1'), 88.4 (C-1'), 112.0 (C), 114.8 (C), 144.0 (C-6), 151.5 (C=O), 162.2 (C=O)

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₁H₁₁N₂O₄INa, calculée m/z 384.96613, observée m/z 384.9659

Ester diméthylque de l'acide cyclopent-3-ène-1,1-dicarboxylique **193**.



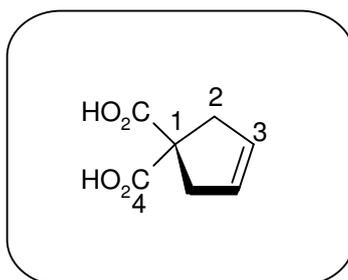
Mode opératoire :

A une solution de LiH (4.0 g, 0.5 mol) dans le DMF (300 mL) à 0°C est ajouté le malonate de diméthyle (22.8 mL, 0.2 mol): le mélange réactionnel est maintenu à 0°C sous agitation pendant 4 h. Puis le 1,4-dichlorobut-2-ène (21.0 mL, 0.2 mol) est ajouté, et le milieu retourne lentement à t.a., et est laissé sous agitation pendant 72 h. Après retour à 0°C, le milieu réactionnel est dilué par ajout d'une solution Et₂O/éther : 2/8 (200 mL) puis neutralisé par ajout d'eau froide (100 mL). Les phases sont séparées : la phase aqueuse est extraite avec une solution Et₂O / éther : 2/8 (4x 100 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution de NaHCO₃ saturée (3x 100 mL), séchées sur MgSO₄ puis filtrées et concentrées. Le résidu huileux est coévaporé au pentane (3x 50 mL) pour donner le composé **193** (99 %, 36.4 g) sous la forme d'un solide blanc, qui est engagé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.89 (s, 4H, H-2), 3.74 (s, 6H, CH₃ x2), 5.52 (s, 2H, CH alcène);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 29.9 (C-2), 51.9 (C-5), 57.3 (C-1), 127.7 (C alcène), 170.5 (C-4).

Acide cyclopent-3-ène-1,1-dicarboxylique **194**.



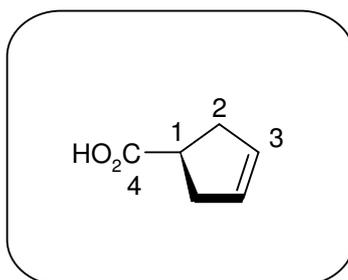
Mode opératoire :

A une solution de **193** (10.0 g, 54.3 mmol) dans un mélange EtOH / H₂O : 8/2 (150 mL) est ajouté le KOH (9.12 g, 163.0 mmol), puis le mélange réactionnel est porté au reflux pendant 14 h (65°C). Après retour à t.a., l'éthanol est chassé à l'évaporateur rotatif, puis 50 mL d'eau sont ajoutés et la phase aqueuse est extraite avec une solution Et₂O / éther : 2/8 (3x 25 mL). La phase aqueuse est placée dans un ballon, puis est refroidie par un bain d'eau glacé à 0°C avant ajout d'une solution concentrée de H₂SO₄ jusqu'à pH=1. Après filtration de K₂SO₄, la phase aqueuse est extraite à l'AcOEt (3x 50 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄ et concentrées pour donner le diacide **194** (85 %, 7.2 g) sous forme de solide blanc, qui sera engagé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 2.82 (s, 4H, H-2), 5.98 (s, 2H, CH alcène);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 29.9 (C-2), 55.8 (C-1), 131.3 (C alcène), 171.3 (C-4).

Acide cyclopent-3-ène-carboxylique **195**.



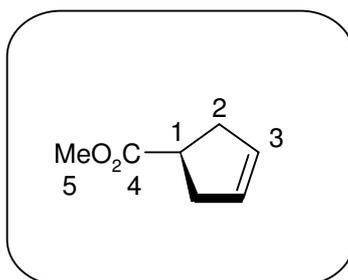
Mode opératoire :

Le diacide **184** (21.0 g, 134 mmol) est chauffé à 180°C jusqu'à l'arrêt du dégagement de CO₂ (classiquement 1 h). L'huile jaune ainsi obtenue est ensuite purifiée par distillation sous pression réduite (80°C sous 5 mm Hg) pour donner l'acide **195** pur (72 %, 10.8 g) sous forme d'huile incolore.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 2.50 (s, 4H, H-2), 3.02 (s, 1H, H-1); 5.73 (s, 2H, CH alcène); 11,58 (se, 1H, H-4)

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 29.1 (C-2), 43.5 (C-1), 129.2 (C alcène), 177.1 (C-4).

Ester méthylique de l'acide cyclopent-3-ène-carboxylique **196**.



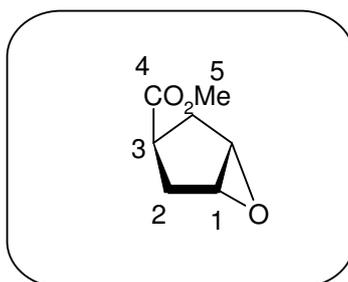
Mode opératoire :

Dans un ballon muni d'une garde au CaCl_2 , à une solution de $(\text{COCl})_2$ (1.25 g, 9.9 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (12.5 mL) sous argon à 0°C sont ajoutés goutte à goutte du DMF anhydre (0.9 mL) puis une solution de l'acide **195** (1.00 g, 8.9 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (2.0 mL). Un quart d'heure plus tard est ajouté le méthanol (5.4 mL), puis le mélange réactionnel est laissé sous agitation après retour à t.a. Les solvants sont éliminés à l'évaporateur rotatif (l'eau du bain ne doit pas excéder 20°C car l'ester **196** est très volatil), le milieu réactionnel est dilué par ajout de 50 mL d'AcOEt, puis une solution de NaHCO_3 saturée est ajoutée lentement (fort dégazage) jusqu'à l'arrêt du dégazage (classiquement 30 mL). Les phases sont séparées : la phase aqueuse est extraite à l'AcOEt (4x 10 mL) ; puis les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution de NaHCO_3 saturée (10 mL), séchées sur MgSO_4 et concentrées à l'évaporateur rotatif (l'eau du bain ne doit pas excéder 20°C car l'ester **196** est très volatil) pour donner l'ester **196** (95 %, 1.17 g), qui sera utilisé sans purification supplémentaire dans l'étape suivante.

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 2.10-3.00 (m, 4H, H-2), 2.75 (s, 1H, H-1); 3.60 (s, 3H, H-5), 5.60 (s, 2H, CH alcène);

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 29.1 (C-2), 44.1 (C-1), 51.3 (C-5), 127.4 (C alcène), 173.0 (C-4).

Ester méthylique de l'acide 6-Oxa-bicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylique **197a**.



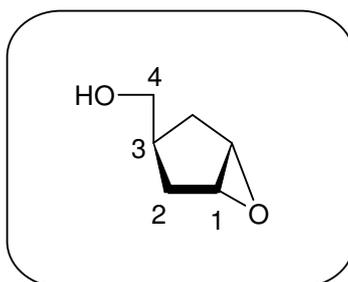
Mode opératoire :

A une solution de **196** (650 mg, 5.2 mmol) dans le CH_2Cl_2 (15.0 mL) à 0°C est ajouté le mCPBA à 77 % (1.28 g, 5.7 mmol), et le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 16 h. Après dilution par ajout de CH_2Cl_2 (15.0 mL) puis neutralisation du mCPBA par ajout d'une solution saturée de Na_2SO_3 (30 mL), les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite au CH_2Cl_2 (4x 18.0 mL), puis les phases organiques sont réunies et lavées par une solution de saturée de Na_2SO_3 (4x 18.0 mL), puis une solution de saturée de NaHCO_3 (1x 20 mL) : l'absence de mCPBA dans le milieu est vérifiée par ccm (absence de produit révélaire à l'UV). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO_4 et concentrées pour donner un mélange des époxydes ester trans **197a** et cis **197b** (85 %). Ces derniers sont séparables par chromatographie colonne sur gel de silice qui permet d'obtenir l'ester trans **197a** pur souhaité sous forme d'huile incolore (63 %, 461 mg).

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1.82 (s, 4H, H-2), 2.55 (s, 1H, H-3); 2.72 (s, 2H, H-1), 3.60 (s, 3H, H-5);

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 34.0 (C-2), 41.2 (C-3), 51.4 (C-5), 56.7 (C-1), 173.6 (C-4).

(6-Oxa-bicyclo[3.1.0]hex-3-yl)-méthanol **198.**



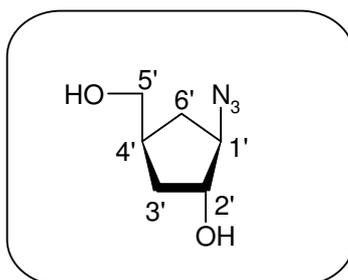
Mode opératoire :

A une solution de LiAlH_4 (146.0 mg, 3.84 mmol) à -60°C dans le THF anhydre (5 mL) sous argon est ajoutée une solution de l'ester **197a** (146.0 mg, 3.84 mmol) dans le THF anhydre (2 mL). Le milieu réactionnel est maintenu pendant 40 min à -60°C sous agitation, puis est neutralisé à -60°C par ajout successif de 0.5 mL d'eau, 1.0 mL d'une solution de NaOH 3N, et 2 mL d'eau. Après retour à t.a., le milieu réactionnel est filtré sur une couche de cellite, qui est rincée plusieurs fois à l'AcOEt chaud (5x 10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée pour donner l'époxyde alcool **198** souhaité (74 %, 154 mg) qui est engagé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

RMN ^1H (CD_3OD) δ : 2.10 (s, 4H, H-2), 2.35 (s, 1H, H-3); 2.64 (s, 2H, H-1), 3.31 (s, 2H, H-4);

RMN ^{13}C (CD_3OD) δ : 35.1 (C-2), 37.9 (C-3), 51.4 (C-4), 57.2 (C-1), 65.0 (C-4).

2-Azido-4-hydroxyméthyl-cyclopentanol **199**.



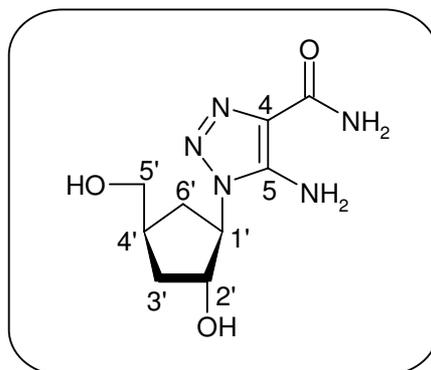
Mode opératoire :

A une solution de **198** (500 mg, 4.39 mmol) dans un mélange MeOH / H₂O : 8/2 (100 mL) est ajouté NaN₃ (9.12 g, 163.0 mmol), et le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 24h. Après retour à t.a. et évaporation des solvants (pas tout à fait à sec pour éviter les risques d'explosion), le résidu est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH : 19/1 puis 9/1) pour donner **199** (63 %, 434 mg) sous forme d'huile incolore.

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 1.35-1.42 (m, 1H, H-3'a), 1.62-1.70 (m, 2H, H-6'), 2.25-2.34 (m, 2H, H-3'b, H-4'), 3.44 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H, H-5'), 3.67 (dd, $J = 5.4$ Hz, 12.5 Hz, 1H, H-2'), 3.95 (dd, $J = 5.4$ Hz, 12.5 Hz, 1H, H-1'),

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 31.9 (C-3'), 34.9 (C-6'), 37.0 (C-4'), 66.1 (C-5'), 68.6 (C-2'), 76.5 (C-1'),

5-Amino-1-(2-hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide 188.



Mode opératoire :

A une solution de **199** (10.0 mg, 0.64 mmol) dans l'éthanol (1 mL) est ajoutée sous argon à température ambiante une solution fraîchement préparée d'éthanolate de sodium (130.7 mg, 1.9 mmol) dans l'éthanol (3 mL), puis le cyanoacétamide (58.9 mg, 0.70 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 50°C pendant 20 h. Après retour à ta et évaporation des solvants, le résidu est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH : 19/1) pour donner **188** (52 %, 80.0 mg) sous forme de solide blanc.

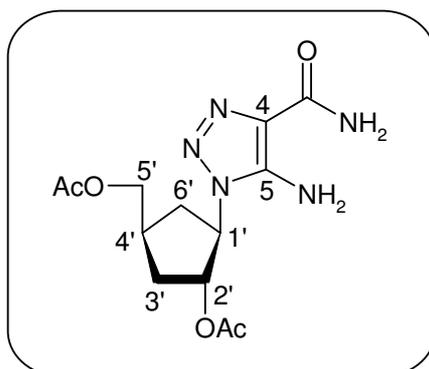
Point de fusion :

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 1.70-2.17 (m, 3H, H-3'a, H-6'), 2.25-2.62 (m, 2H, H-3'b, H-4'), 3.55 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-5'), 4.30-4.67 (m, 2H, H-1', H-2');

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 32.7 (C-3'), 35.9 (C-6'), 37.8 (C-4'), 65.4 (C-2'), 66.4 (C-5'), 77.5 (C-1'), 122.8 (C), 146.6 (C), 166.7 (CONH₂);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₉H₁₅N₅O₃Na, calculée *m/z* 264.2397, observée *m/z* 264.2399

Ester du 3-acétoxy-4-(5-amino-4-carbamoyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-cyclopentylméthyle 200



Mode opératoire :

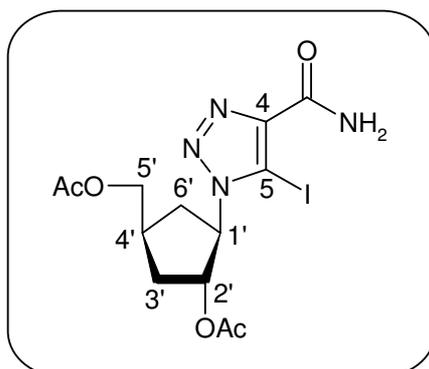
A une solution de **188** (228.0 mg, 0.95 mmol) dans la pyridine (20 mL) à 0°C est ajouté l'anhydride acétique (4 mL) en large excès. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 48h à ta. Puis, du méthanol est ajouté (4 mL) à 0°C puis l'agitation est maintenue à ta pendant 4h. Après évaporation des solvants, le résidu est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19/1) pour donner **200** (75 %, 229.0 mg) sous forme d'huile jaune.

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 1.85-2.25 (m, 9H, H-3'a, H-6', COCH₃x2), 3.35-2.80 (m, 2H, H-3'b, H-4'), 4.14 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-5'), 4.60-4.90 (m, 1H, H-1', water), 5.20-5.45 (m, 1H, H-2');

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 20.8 (CH₃CO), 20.9 (CH₃CO), 33.8 (C-3'), 34.7 (C-6'), 36.9 (C-4'), 62.6 (C-2'), 68.0 (C-5'), 80.2 (C-1'), 123.1 (C), 146.6 (C), 166.9 (CONH₂), 172.5 (COCH₃), 172.9 (COCH₃);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₃H₁₉N₅O₅Na, calculée m/z 348.3143 observée m/z 348.3144

Ester du 3-acétoxy-4-(4-carbamoyl-5-iodo-[1,2,3]triazol-1-yl)-cyclopentylméthyle 204.



Mode opératoire :

A une solution de **200** (205.0 mg, 0.63 mmol) dans le diiodométhane (2 mL, 6.65 mmol) est ajouté à ta l'isoamyl nitrite (254 μ L, 1.89 mmol) sous atmosphère d'argon. Le mélange réactionnel est chauffé à 100°C et laissé sous agitation pendant 2h. Après retour à ta, le brut est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 100/1) pour donner **204** (55 %, 158.7 mg) sous forme d'huile jaune.

RMN ^1H (CD_3OD) δ : 1.90-2.33 (m, 9H, H-3'a, H-6', $\text{COCH}_3 \times 2$), 2.45-2.85 (m, 2H, H-3'b, H-4'), 4.15 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, H-5'), 5.01-5.25 (m, 1H, H-1'), 5.45-5.78 (m, 1H, H-2');

RMN ^{13}C (CD_3OD) δ : 20.8 ($\text{CH}_3\text{CO} \times 2$), 34.8 (C-3'), 35.6 (C-6'), 36.7 (C-4'), 67.5 (C-1'), 67.8 (C-5'), 80.1 (C-2'), 86.1 (C), 144.0 (C), 164.1 (CONH_2), 171.9 (COCH_3), 172.8 (COCH_3);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{IN}_4\text{O}_5\text{Na}$, calculée m/z 459.1962 observée m/z 459.1964

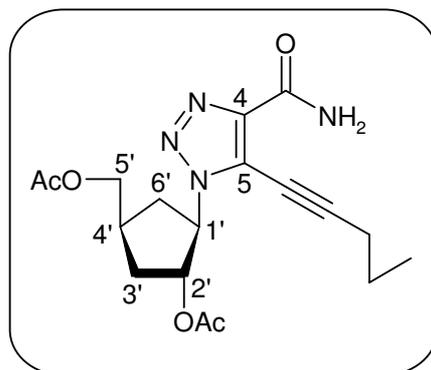
Mode opératoire général N°10 :

Réaction de couplage de Sonogashira catalysée au palladium (0)



Le nucléoside iodé **204** (0.52 mmol) est dissout sous argon dans un mélange de diméthylformamide sec (3 mL), de triéthylamine sèche (370 μ L, 2.6 mmol) et d'alkyne (2.6 mmol). Puis le catalyseur (PhCN)₂PdCl₂ (19.9 mg, 0.05mmol) est ajouté, le tube est scellé sous argon et le mélange réactionnel est chauffé à 155°C pendant 4 h. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice (EP puis EP / AE : 5/5) pour obtenir le composé pur portant l'alkyne.

**Ester du 3-acétoxy-4-(4-carbamoyl-5-pent-1-ynyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-cyclopentylméthyle
205a.**



Mode opératoire :

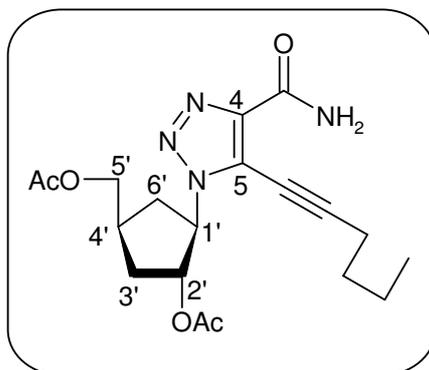
L'application du mode opératoire général N°10 (page 252) au pentyne fournit **205a** (58 %) sous forme d'huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.09 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.61-1.83 (m, 2H, CH₂), 1.88-2.30 (m, 9H, H-3', H-6'a, COCH₃x2), 2.40-2.76 (m, 4H, H-6'b, CH₂, H-4'), 4.12 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-5'), 5.01 (m, 1H, H-1'), 5.50 (td, *J* = 4.4 Hz, 7.4 Hz, 1H, H-2'), 5.78 (se, 1H, NH), 6.96 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 13.6 (CH₃), 21.0 (CH₃COx2), 21.7 (CH₂), 22.1 (CH₂), 34.3, 34.4 (C-6', C-3'), 35.6 (C-4'), 64.6 (C-1'), 65.5 (C), 66.7 (C-5'), 78.5 (C-2'), 106.8, 123.6 (C-C alcyne), 141.8 (C), 161.5 (CONH₂), 170.0 (COCH₃), 171.1 (COCH₃);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₈H₂₄N₄O₅Na, calculée m/z 399.1644, observée m/z 399.1647

**Ester du 3-acétoxy-4-(4-carbamoyl-5-hex-1-ynyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-cyclopentylméthyle
205b.**



Mode opératoire :

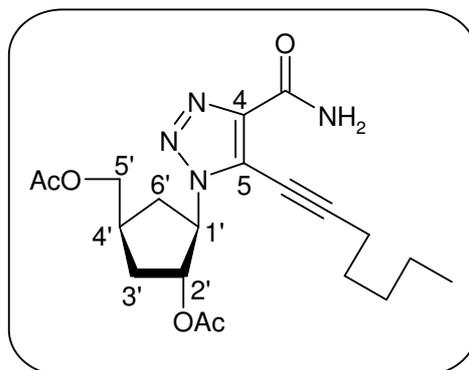
L'application du mode opératoire général N°10 (page 252) à l'hexyne fournit **250b** (52 %) sous forme d'huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 1.40-1.82 (m, 4H, CH₂x2), 1.85-2.28 (m, 9H, H-3', H-6'a, COCH₃x2), 2.35-2.77 (m, 4H, H-6'b, CH₂, H-4'), 4.12 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-5'), 5.00 (ddd, *J* = 5.2 Hz, 7.8 Hz, 9.6 Hz, 1H, H-1'), 5.50 (td, *J* = 5.0 Hz, 7.5 Hz, 1H, H-2'), 5.81 (se, 1H, NH), 6.96 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 13.7 (CH₃), 19.8 (CH₂), 21.0 (CH₃COx2), 22.1 (CH₂), 30.2 (CH₂), 34.3 (C-3'), 34.4 (C-6'), 35.6 (C-4'), 64.6 (C-1'), 65.4 (C), 66.8 (C-5'), 78.5 (C-2'), 107.0, 123.6 (C-C alcyne), 141.7 (C), 161.5 (CONH₂), 170.0 (COCH₃), 171.1 (COCH₃);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₉H₂₆N₄O₅Na, calculée m/z 413.1801, observée m/z 413.1798

**Ester du 3-acétoxy-4-(4-carbamoyl-5-hept-1-ynyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-cyclopentylméthyle
205c.**



Mode opératoire :

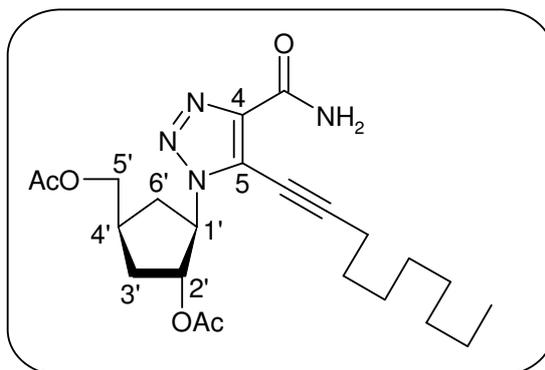
L'application du mode opératoire général N°10 (page 252) à l'heptyne fournit **205c** (62 %) sous forme d'huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.21-1.53 (m, 4H, CH₂x2), 1.55-1.77 (m, 2H, CH₂), 1.78-2.30 (m, 9H, H-3', H-6'a, COCH₃x2), 2.35-2.77 (m, 4H, H-6'b, CH₂, H-4'), 4.11 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-5'), 4.99 (ddd, *J* = 5.2 Hz, 8.0 Hz, 9.5 Hz, 1H, H-1'), 5.50 (td, *J* = 4.4 Hz, 7.5 Hz, 1H, H-2'), 5.96 (se, 1H, NH), 6.98 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 14.1 (CH₃), 20.1 (CH₂), 21.0 (CH₃COx2), 22.3 (CH₂), 27.9 (CH₂), 31.2 (CH₂), 34.3 (C-3'), 34.5 (C-6'), 35.6 (C-4'), 64.6 (C-1'), 65.4 (C), 66.8 (C-5'), 78.5 (C-2'), 107.2, 123.5 (C-C alcyne), 158.3 (C), 161.4 (CONH₂), 170.0 (COCH₃), 171.1 (COCH₃);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₂₀H₂₈N₄O₅Na, calculée m/z 427.1957, observée m/z 427.1957

**Ester du 3-acétoxy-4-(4-carbamoyl-5-déc-1-ynyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-cyclopentylméthyle
205d.**



Mode opératoire :

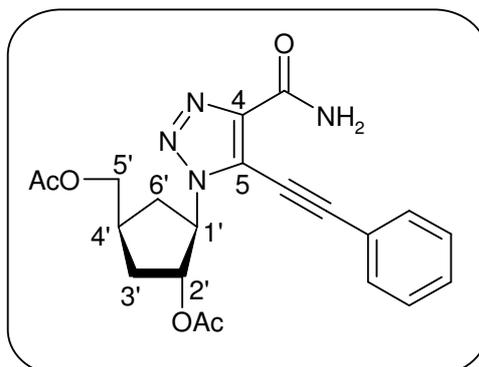
L'application du mode opératoire général N°10 (page 252) au décyne fournit **205d** (47 %) sous forme d'huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.12-1.39 (m, 8H, CH₂x4), 1.40-1.55 (m, 2H, CH₂), 1.56-1.77 (m, 2H, CH₂), 1.89-2.29 (m, 9H, H-3', H-6'a, COCH₃x2), 2.35-2.75 (m, 4H, H-6'b, CH₂, H-4'), 4.13 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, H-5'), 5.01 (ddd, *J* = 5.2 Hz, 8.3 Hz, 9.6 Hz, 1H, H-1'), 5.52 (td, *J* = 4.6 Hz, 7.3 Hz, 1H, H-2'), 5.58 (se, 1H, NH), 6.93 (se, 1H, NH);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 14.2 (CH₃), 20.1 (CH₂), 21.0 (CH₃COx2), 22.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.2 (CH₂), 31.9 (CH₂), 34.3 (CH₂), 34.4 (C-3',C-6'), 35.6 (C-4'), 64.6 (C-1'), 65.4 (C), 66.8 (C-5'), 78.5 (C-2'), 107.0, 123.6 (C-C alcyne), 141.7 (C), 161.5 (CONH₂), 170.0 (COCH₃), 171.1 (COCH₃);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₂₃H₃₄N₄O₅Na, calculée m/z 469.2427, observée m/z 469.2427

Ester du 3-acétoxy-4-(4-carbamoyl-5-phényléthynyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-cyclopentylméthyle 205e.



Mode opératoire :

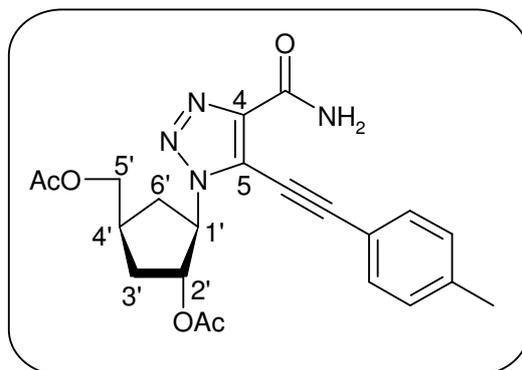
L'application du mode opératoire général N°10 (page 252) au phénylacétylène fournit **205e** (74 %) sous forme d'huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.92-2.12 (m, 7H, H-3'a, COCH₃x2), 2.13-2.34 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.46-2.08 (m, 2H, H-4', H-6'b), 4.20 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-5'), 5.11 (ddd, *J* = 5.2 Hz, 8.0 Hz, 9.6 Hz, 1H, H-1'), 5.55 (td, *J* = 4.2 Hz, 7.5 Hz, 1H, H-2'), 5.86 (se, 1H, NH), 7.02 (se, 1H, NH), 7.52 (m, CHx5);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 21.0 (CH₃COx2), 34.3 (C-3',C-6'), 35.6 (C-4'), 65.1 (C-1'), 66.6 (C-5'), 73.4 (C-5), 78.6 (C-2'), 104.4, 121.0 (C-C alkyne), 123.2 (C), 128.7 (CHx2), 132.0 (CHx2), 142.3 (C), 145.4 (C), 161.3 (CONH₂), 170.0 (COCH₃), 171.1 (COCH₃);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₂₁H₂₂N₄O₅Na, calculée m/z 433.1488, observée m/z 433.1487

Ester du 3-acétoxy-4-(4-carbamoyl-5-p-tolyléthynyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-cyclopentylméthyle 205f.



Mode opératoire :

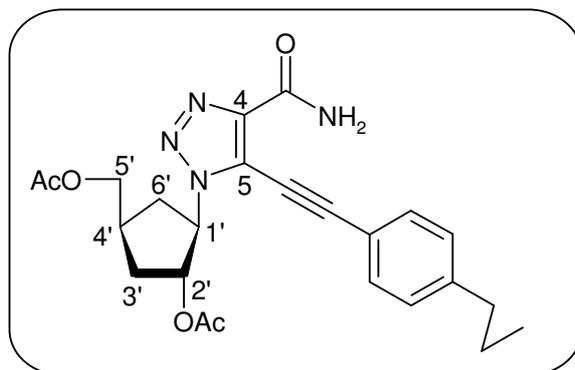
L'application du mode opératoire général N°10 (page 252) au phénylméthylacétylène fournit **205f** (77 %) sous forme d'huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.93-2.11 (m, 7H, H-3'a, COCH₃x2), 2.12-2.33 (m, 2H, H-3'b, H-6'a), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.47-2.79 (m, 4H, CH₂, H-4, H-6'b), 4.13-4.24 (m, 2H, H-5'), 5.11 (ddd, *J* = 5.0 Hz, 7.9 Hz, 9.7 Hz, 1H, H-1'), 5.55 (td, *J* = 4.4 Hz, 7.9 Hz, 1H, H-2'), 5.70 (se, 1H, NH), 6.99 (se, 1H, NH), 7.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 21.0 (CH₃), 21.8 (CH₃COx2), 34.3 (C-3',C-6'), 35.6 (C-4'), 65.0 (C-1'), 66.7 (C-5'), 73.0 (C-5), 78.5 (C-2'), 104.4, 118.0 (C-C alcyne), 123.4 (C), 125.6 (C), 129.5 (CHx2), 132.1 (CHx2), 140.8 (C), 142.1 (C), 161.3 (CONH₂), 170.1 (COCH₃), 171.1 (COCH₃);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₂₂H₂₄N₄O₅Na, calculée m/z 447.1644, observée m/z 447.1640

Ester du 3-acétoxy-4-[4-carbamoyl-5-(4-propyl-phényléthynyl)-[1,2,3]triazol-1-yl]-cyclopentylméthyle 205g.



Mode opératoire :

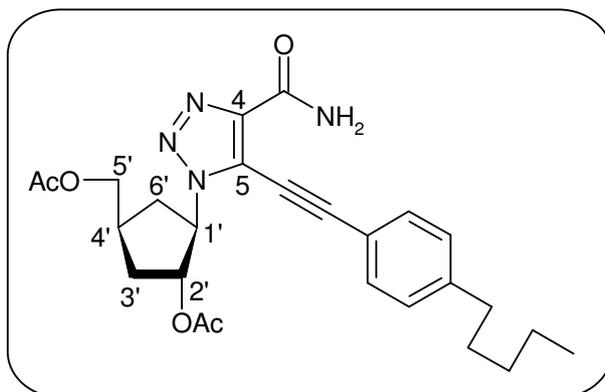
L'application du mode opératoire général N°10 (page 252) au phénylpropylacétylène fournit **205g** (64 %) sous forme d'huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0.91 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.64 (sxt, J = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.90-2.09 (m, 7H, H-3'a, COCH₃x2), 2.10-2.30 (m, 3H, H-3'b, H-6'a), 2.20-2.79 (m, 4H, CH₂, H-4', H-6'b), 4.12 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H-5'), 5.10 (ddd, J = 5.3 Hz, 7.8 Hz, 9.7 Hz, 1H, H-1'), 5.54 (td, J = 4.5 Hz, 7.8 Hz, 1H, H-2'), 6.15 (se, 1H, NH), 7.05 (se, 1H, NH), 7.22 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 8.2 Hz, 2H);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 13.8 (CH₃), 20.9 (CH₃CO), 21.0 (CH₃CO), 24.3 (CH₂), 34.3 (C-3', C-6'), 35.6 (C-4'), 38.1 (CH₂), 65.0 (C-1'), 66.6 (C-5'), 72.9 (C-5), 78.5 (C-2'), 104.4, 118.2 (C-C alkyne), 123.3 (C), 128.8 (C), 132.0(C), 142.2(C), 145.4 (C), 161.5 (CONH₂), 170.0 (COCH₃), 171.1 (COCH₃);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₂₄H₂₈N₄O₅Na, calculée m/z 475.1957, observée m/z 475.1961

Ester du 3-acétoxy-4-[4-carbamoyl-5-(4-pentyl-phényléthynyl)-[1,2,3]triazol-1-yl]-cyclopentylméthyle 205h.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°10 (page 252) au phénylpentylacétylène fournit **205h** (63 %) sous forme d'huile jaune.

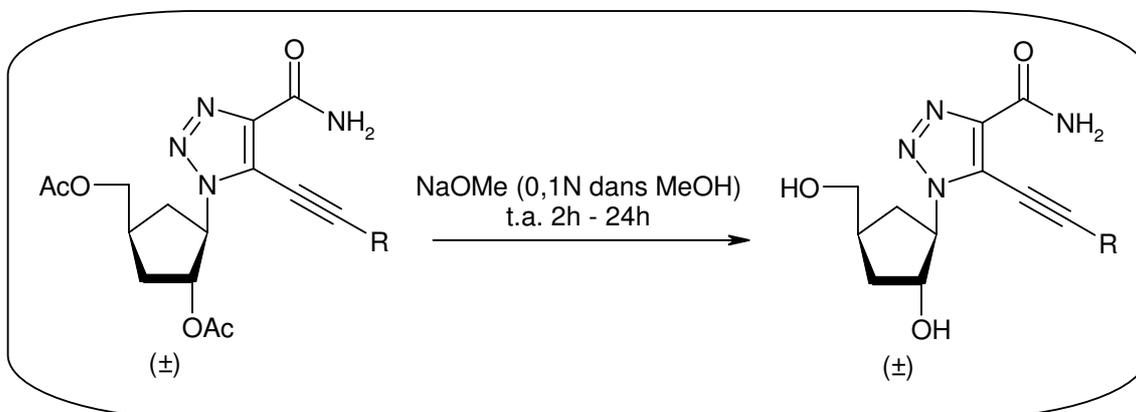
RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0.89 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.21-1.43 (m, 4H, CH₂x2), 1.52-1.69 (m, 2H, CH₂), 1.93-2.11 (m, 8H, H-3'a, H-6'a, COCH₃x2), 2.12-2.33 (m, 2H, H-3'b, H-6'a), 2.46-2.79 (m, 4H, CH₂, H-4', H-6'b), 4.14 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-5'), 5.11 (ddd, *J* = 4.0 Hz, 5.4 Hz, 9.3 Hz, 1H, H-1'), 5.56 (td, *J* = 4.8 Hz, 7.4 Hz, 1H, H-2'), 5.62 (se, 1H, NH), 6.97 (se, 1H, NH), 7.21 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H);

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 14.4 (CH₃), 20.7 (CH₃CO), 20.8 (CH₃CO), 23.5 (CH₂x2), 32.0 (CH₂), 32.5 (CH₂), 34.7 (CH₂), 34.8 (C-3', CH₂), 36.6 (C-4'), 36.9 (C-6'), 66.5 (C-1'), 67.8 (C-5'), 73.9 (C), 79.8 (C-2'), 105.2, 119.5 (C-C alkyne), 124.3 (C), 130.0 (CHx2), 133.0 (CHx2), 143.4(C), 147.0 (C), 163.8 (CONH₂), 171.9 (COCH₃), 172.7 (COCH₃);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₂₆H₃₂N₄O₅Na, calculée m/z 503.2270, observée m/z 503.2270

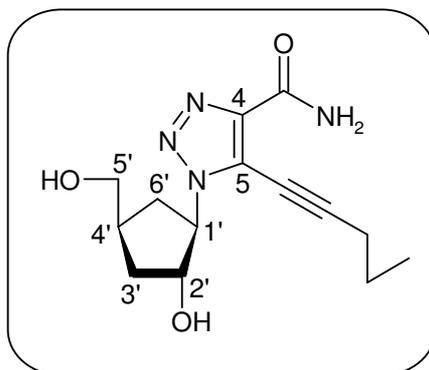
Mode opératoire général N°11:

Clivage des groupements protecteurs de type acétate



Le nucléoside acétylé (0.15 mmol) est dissout dans une solution de méthanolate de sodium 0.1N dans le méthanol (3 mL, 0.3 mmol) et le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante jusqu'à fin de réaction (entre 2h et 24h, vérifié par ccm). Le mélange réactionnel est ensuite neutralisé par ajout d'une résine acide de type DOWEX 50X2-200, puis filtré sur verre fritté. L'évaporation du méthanol conduit au nucléoside déprotégé pur.

1-(2-Hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-5-pent-1-ynyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide 206a.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°11 (page 261) à **205a** fournit **206a** (96 %) sous forme de solide jaunâtre.

UV (MeOH) λ_{\max} 250 nm;

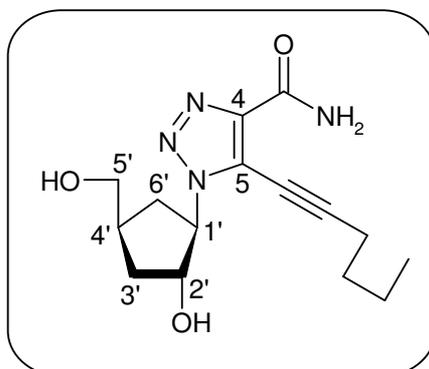
Point de fusion : 124-125°C;

RMN ^1H (CD₃OD) δ : 1.10 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₃), 1.62-2.15 (m, 5H, CH₂, H-3', H-6'a), 2.33-2.73 (m, 4H, H-6'b, CH₂, H-4'), 3.57 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, H-5'), 4.67 (q, 2H, $J = 6.6$ Hz, H-2'), 4.77-5.01 (m, H-1', eau);

RMN ^{13}C (CD₃OD) δ : 13.9 (CH₃), 22.5 (CH₂), 22.6 (CH₂), 34.6 (C-6'), 36.2 (C-3'), 38.5 (C-4'), 66.5 (C), 66.6 (C-5'), 69.0 (C-1'), 76.9 (C-2'), 107.7 (C), 124.6 (C), 143.0 (C), 164.1 (CONH₂);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₄H₂₀N₄O₃Na, calculée m/z 315.1433, observée m/z 315.1429

5-Hex-1-ynyl-1-(2-hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide 206b.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°11 (page 261) à **205b** fournit **206b** (96 %) sous forme d'huile jaunâtre.

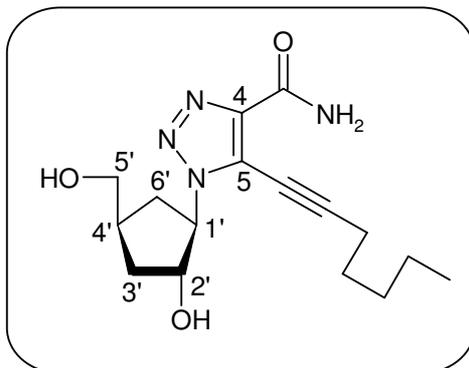
UV (MeOH) λ_{\max} 251 nm;

RMN ^1H (CD_3OD) δ : 0.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.46-1.77 (m, 4H, $\text{CH}_2 \times 2$), 1.79-2.12 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.32-2.72 (m, 4H, H-6'b, CH_2 , H-4'), 3.57 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, H-5'), 4.67 (q, 2H, $J = 6.6$ Hz, H-2'), 4.75-5.00 (m, H-1', eau);

RMN ^{13}C (CD_3OD) δ : 13.9 (CH_3), 20.2 (CH_2), 23.1 (CH_2), 31.2 (CH_2), 34.6 (C-6'), 36.3 (C-3'), 38.5 (C-4'), 66.3 (C), 66.6 (C-5'), 69.0 (C-1'), 76.8 (C-2'), 107.9 (C), 124.6 (C), 143.0 (C), 164.1 ($\underline{\text{CONH}_2}$);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$, calculée m/z 329.1590, observée m/z 329.1594

5-Hept-1-ynyl-1-(2-hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide 206c.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°11 (page 261) à **205c** fournit **206c** (90 %) sous forme d'huile jaunâtre.

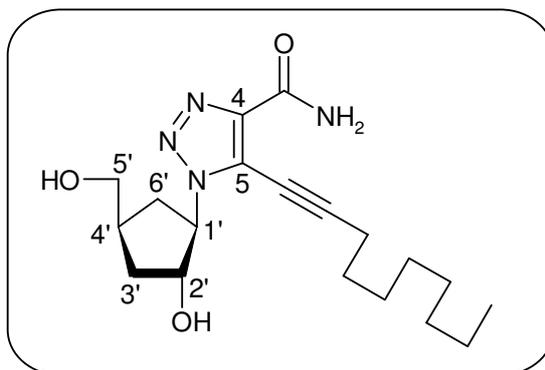
UV (MeOH) λ_{\max} 251 nm;

RMN ^1H (CD₃OD) δ : 0.95 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.26-1.58 (m, 4H, CH₂ \times 2), 1.60-1.78 (m, 2H, CH₂), 1.79-2.12 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.32-2.72 (m, 4H, H-6'b, CH₂, H-4'), 3.56 (d, J = 6.2 Hz, 2H, H-5'), 4.67 (q, 2H, J = 6.4 Hz, H-2'), 4.75-5.00 (m, H-1', eau);

RMN ^{13}C (CD₃OD) δ : 14.3 (CH₃), 20.5 (CH₂), 23.3 (CH₂), 28.8 (CH₂), 32.2 (CH₂), 34.6 (C-6'), 36.3 (C-3'), 38.5 (C-4'), 66.4 (C), 66.6 (C-5'), 69.0 (C-1'), 76.8 (C-2'), 107.9 (C), 124.6 (C), 143.0 (C), 164.1 (CONH₂);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₆H₂₄N₄O₃Na, calculée m/z 343.1746, observée m/z 343.1731

5-Dec-1-ynyl-1-(2-hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide 206d.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°11 (page 261) à **205d** fournit **206d** (94 %) sous forme de solide jaunâtre.

UV (MeOH) λ_{\max} 292 nm;

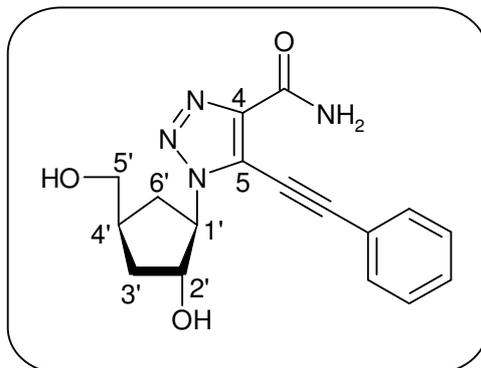
Point de fusion : 74-75°C;

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 0.80-1.00 (m, 3H, CH₃), 1.18-1.58 (m, 10H, CH₂x5), 1.60-1.79 (m, 2H, CH₂), 1.80-2.12 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.32-2.72 (m, 4H, H-6'b, CH₂, H-4'), 3.56 (d, J = 6.2 Hz, 2H, H-5'), 4.67 (q, 2H, J = 6.6 Hz, H-2'), 4.75-5.00 (m, H-1', eau);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 14.4 (CH₃), 20.5 (CH₂), 23.7 (CH₂), 29.1 (CH₂), 30.1 (CH₂), 30.2 (CH₂), 30.4 (CH₂), 33.0 (CH₂), 34.6 (C-6'), 36.3 (C-3'), 38.5 (C-4'), 66.4 (C), 66.6 (C-5'), 69.0 (C-1'), 76.8 (C-2'), 107.9 (C), 124.6 (C), 143.0 (C), 164.1 (CONH₂);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₉H₃₀N₄O₃Na, calculée m/z 385.2216, observée m/z 385.2215

1-(2-Hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-5-phényléthynyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide 206e.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°11 (page 261) à **205e** fournit **206e** (94 %) sous forme de solide jaunâtre.

UV (MeOH) λ_{\max} 289 nm;

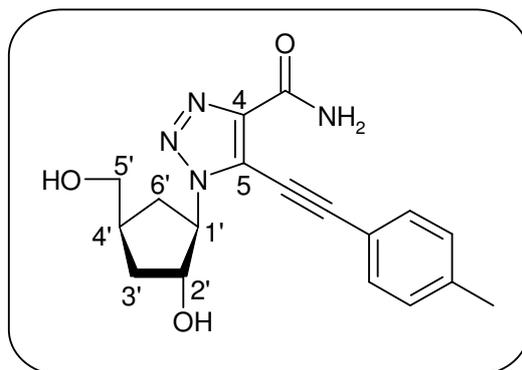
Point de fusion : 143-144°C;

RMN ^1H (CD₃OD) δ : 1.83-2.20 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.41-2.65 (m, 2H, H-4', H-6'b), 3.58 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H-5'), 4.71 (q, 2H, $J = 6.4$ Hz, H-2'), 4.80-5.08 (m, H-1', eau), 7.35-7.80 (m, CHx5);

RMN ^{13}C (CD₃OD) δ : 34.5 (C-6'), 36.3 (C-3'), 38.5 (C-4'), 66.5 (C-5'), 69.4 (C-1'), 74.5 (C), 77.1 (C-2'), 104.6 (C), 122.4 (C), 124.2 (C), 129.8 (CHx2), 131.2 (CH), 133.0 (CHx2), 143.5 (C), 164.0 (CONH2);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₇H₁₈N₄O₃Na, calculée m/z 349.1277, observée m/z 349.1278

1-(2-Hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-5-p-tolyléthynyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide 206f.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°11 (page 261) à **205f** fournit **206f** (93 %) sous forme de solide jaunâtre.

UV (MeOH) λ_{\max} 292 nm;

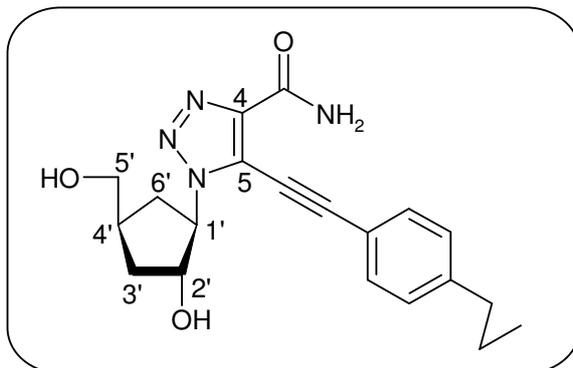
Point de fusion : 153-154°C;

RMN ^1H (CD₃OD) δ : 1.80-2.20 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.27-2.67 (m, 5H, CH₃, H-4', H-6'b), 3.58 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H-5'), 4.71 (q, 2H, J = 6.6 Hz, H-2'), 4.80-5.08 (m, H-1', eau), 7.27 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.2 Hz, 2H);

RMN ^{13}C (CD₃OD) δ : 21.6 (CH₃), 34.5 (C-6'), 36.3 (C-3'), 38.5 (C-4'), 66.5 (C-5'), 69.3 (C-1'), 74.0 (C), 77.0 (C-2'), 105.0 (C), 119.4 (C), 124.3 (C), 130.4 (CH_x2), 133.0 (CH_x2), 141.9 (C), 143.3 (C), 164.0 (CONH₂);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₈H₂₀N₄O₃Na, calculée m/z 363.1433, observée m/z 363.1425

1-(2-Hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-5-(4-propylphényléthynyl)-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide 206g.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°11 (page 261) à **205g** fournit **206g** (99 %) sous forme de solide jaune.

UV (MeOH) λ_{\max} 295 nm;

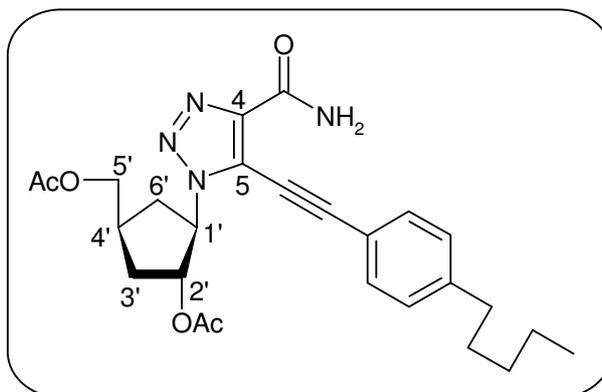
Point de fusion : 127-128°C;

RMN ^1H (CD_3OD) δ : 0.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH₃), 1.66 (sxt, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH₂), 1.82-2.20 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.37-2.75 (m, 4H, CH₂, H-4', H-6'b), 3.58 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, H-5'), 4.71 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz, H-2'), 4.80-5.08 (m, H-1', eau), 7.26 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H);

RMN ^{13}C (CD_3OD) δ : 14.0 (CH₃), 25.4 (CH₂), 34.5 (C-6'), 36.3 (C-3'), 38.5 (C-4'), 39.0 (CH₂), 66.6 (C-5'), 69.3 (C-1'), 74.0 (C), 77.0 (C-2'), 105.0 (C), 119.7 (C), 124.3 (C), 129.9 (CHx₂), 133.0 (CHx₂), 143.3 (C), 146.6 (C), 164.1 (CONH₂);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₂₀H₂₄N₄O₃Na, calculée m/z 391.1746, observée m/z 391.1749

1-(2-Hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-5-(4-pentyl-phényléthynyl)-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide **206h.**



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°11 (page 261) à **205h** fournit **206h** (62 %) sous forme de solide blanc.

UV (MeOH) λ_{\max} 283 nm;

Point de fusion : 117-118°C;

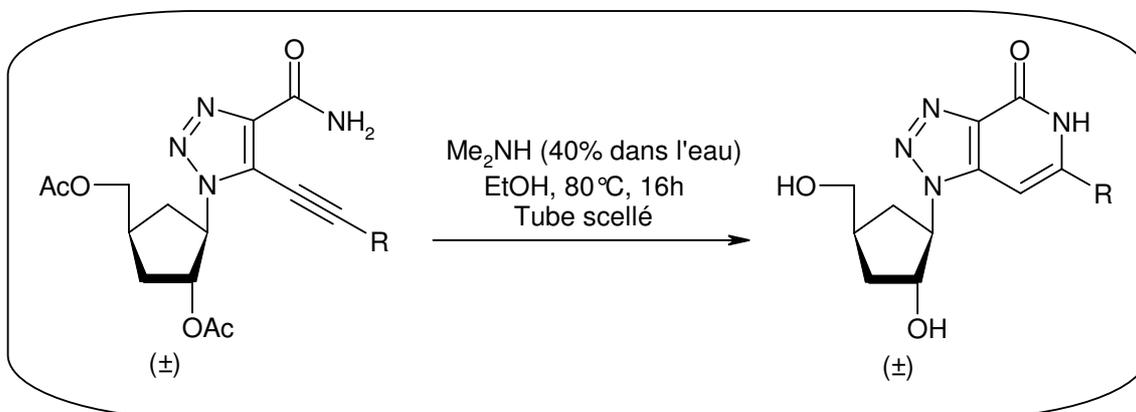
RMN ¹H (CD₃OD) δ : 0.91 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH₃), 1.22-1.50 (m, 4H, CH₂x2), 1.55-1.75 (m, 2H, CH₂), 1.82-2.17 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.40-2.60 (m, 2H, H-4', H-6'b), 2.67 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 3.58 (d, J = 6.2 Hz, 2H, H-5'), 4.71 (q, 2H, J = 6.6 Hz, H-2'), 4.81-5.05 (m, H-1', eau), 7.27 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.2 Hz, 2H);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 14.3 (CH₃), 23.5 (CH₂), 32.1 (CH₂), 32.5 (CH₂), 34.5 (C-6'), 36.3 (C-3'), 36.7 (CH₂), 38.5 (C-4'), 66.6 (C-5'), 69.3 (C-1'), 74.0 (C), 77.0 (C-2'), 105.0 (C), 119.7 (C), 124.3 (C), 129.9 (CHx2), 133.0 (CHx2), 143.3 (C), 146.9 (C), 164.1 (CONH₂);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₂₂H₂₈N₄O₃Na, calculée m/z 419.2059, observée m/z 419.2053

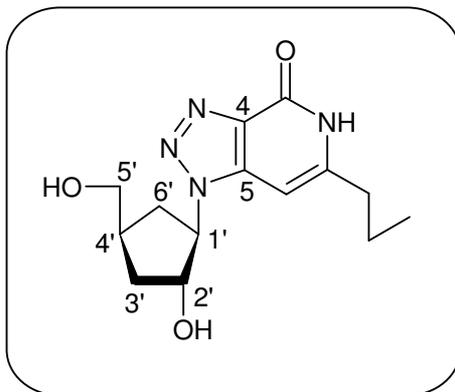
Mode opératoire général N°12 :

Réaction monotopie de cyclisation et de clivage des acétates



Le nucléoside protégé (0.32 mmol) est dissout sous argon dans un mélange d'éthanol et d'une solution de diméthylamine dans l'eau à 40% (0.02 mmol, 2.4 mL) : le tube est scellé et le mélange réactionnel est chauffé à 80°C pendant 16h (la fin de réaction est vérifiée par ccm). Après évaporation des solvants, le brut réactionnel est purifié par colonne chromatographie sur gel de silice, en utilisant un gradient d'élution (typiquement EP / AE : 5/5 à AE pur) pour fournir le nucléoside pur bicyclique déprotégé.

1-(2-Hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-6-propyl-1,5-dihydro-[1,2,3]triazolo[4,5-c]pyridin-4-one 207a.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°12 (page 270) à **205a** fournit **207a** (56 %) sous forme d'huile jaune.

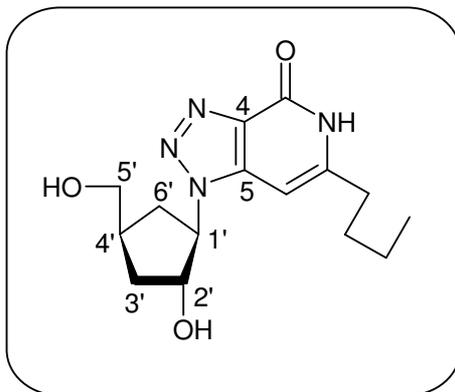
UV (MeOH) λ_{\max} 274 nm;

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 1.00 (t, J = 7.6 Hz, 3H, CH₃), 1.73 (sxt, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 1.82-2.29 (m, H-3', H-6'a), 2.38-2.70 (m, H-6'b, H-4', CH₂), 3.60 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H-5'), 4.56 (q, 2H, J = 7.0 Hz, H-2'), 4.75-5.00 (m, H-1', eau), 6.61 (s, CH alcène);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 13.8 (CH₃), 23.3 (CH₂), 33.6 (C-6'), 36.1, 36.2 (CH₂, C-3'), 38.0 (C-4'), 66.7 (C-5'), 68.2 (C-1'), 77.3 (C-2'), 91.2 (CH alcène), 136.2 (C), 141.9 (C), 149.2 (C), 159.5 (CONH);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₄H₂₀N₄O₃Na, calculée m/z 315.1433, observée m/z 315.1429

6-Butyl-1-(2-hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-1,5-dihydro-[1,2,3]triazolo[4,5-c]pyridin-4-one 207b.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°12 (page 270) à **205b** fournit **207b** (60 %) sous forme d'huile jaune.

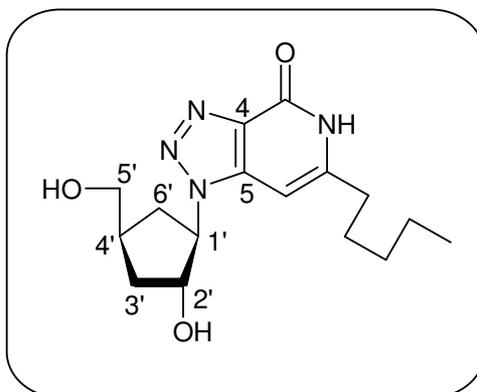
UV (MeOH) λ_{\max} 275 nm;

RMN ^1H (CD₃OD) δ : 0.98 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.42 (sxt, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 1.60-1.79 (m, 2H, CH₂), 1.80-2.29 (m, 2H, H-3', H-6'a), 2.35-2.57 (m, 2H, H-6'b H-4'), 2.64 (t, J = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 3.60 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H-5'), 4.57 (q, 2H, J = 7.3 Hz, H-2'), 4.72-4.96 (m, H-1', eau), 6.60 (s, CH alcène);

RMN ^{13}C (CD₃OD) δ : 14.1 (CH₃), 23.2 (CH₂), 32.1 (CH₂), 33.6 (C-6'), 34.0 (CH₂), 36.1 (C-3'), 38.0 (C-4'), 66.7 (C-5'), 68.2 (C-1'), 77.3 (C-2'), 91.1 (CH alcène), 136.2 (C), 141.9 (C), 149.4 (C), 159.5 (CONH);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₅H₂₂N₄O₃Na, calculée m/z 329.1590, observée m/z 329.1579

1-(2-Hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-6-pentyl-1,5-dihydro-[1,2,3]triazolo[4,5-c]pyridin-4-one 207c.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°12 (page 270) à **205c** fournit **207c** (62 %) sous forme d'huile jaune.

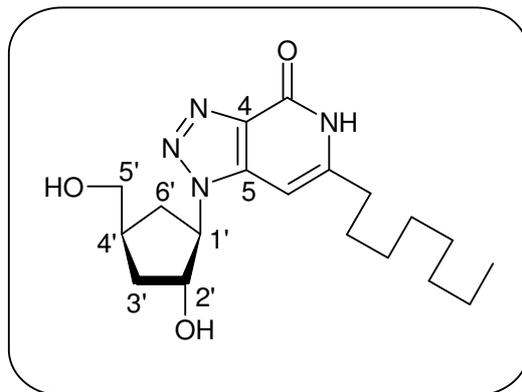
UV (MeOH) λ_{\max} 274 nm;

RMN ^1H (CD₃OD) δ : 0.80-1.15 (m, 3H, CH₃), 1.24-1.50 (m, 4H, CH₂x2), 1.55-1.79 (m, 2H, CH₂), 1.80-2.29 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.35-2.74 (m, 4H, H-6'b, CH₂, H-4'), 3.60 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H-5'), 4.56 (q, 2H, J = 6.9 Hz, H-2'), 4.72-4.96 (m, H-1', eau), 6.60 (s, CH alcène);

RMN ^{13}C (CD₃OD) δ : 14.3 (CH₃), 23.4 (CH₂), 29.7 (CH₂), 32.4 (CH₂), 33.6 (C-6'), 34.3 (CH₂), 36.1 (C-3'), 38.0 (C-4'), 66.7 (C-5'), 68.2 (C-1'), 77.3 (C-2'), 91.1 (CH alcène), 136.2 (C), 141.9 (C), 149.4 (C), 159.5 (CONH);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₆H₂₄N₄O₃Na, calculée m/z 343.1746, observée m/z 343.1737

1-(2-Hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-6-octyl-1,5-dihydro-[1,2,3]triazolo[4,5-c]pyridin-4-one 207d.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°12 (page 270) à **205d** fournit **207d** (51 %) sous forme de solide blanc.

UV (MeOH) λ_{\max} 275 nm;

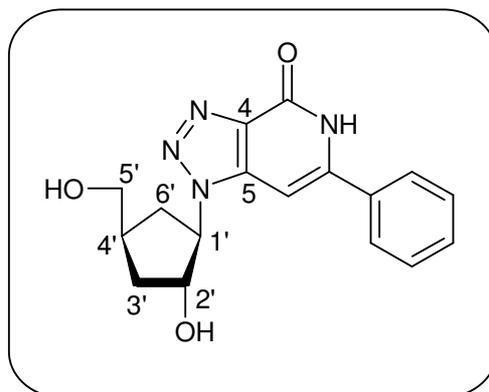
Point de fusion : 150-151°C;

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 0.80-1.00 (m, 3H, CH₃), 1.18-1.50 (m, 10H, CH₂x5), 1.60-1.79 (m, 2H, CH₂), 1.80-2.29 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.35-2.74 (m, 4H, H-6'b, CH₂, H-4'), 3.60 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H-5'), 4.55 (m, 2H, H-2'), 4.72-4.96 (m, H-1', eau), 6.60 (s, CH alcène) ;

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 14.4 (CH₃), 23.7 (CH₂), 30.0 (CH₂), 30.1 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.4 (CH₂), 32.9 (CH₂), 33.5 (C-6'), 34.3 (CH₂), 36.1 (C-3'), 38.0 (C-4'), 66.7 (C-5'), 68.2 (C-1'), 77.3 (C-2'), 91.1 (CH alcène), 136.2 (C), 141.9 (C), 149.4 (C), 159.5 (CONH);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₉H₃₀N₄O₃Na, calculée m/z 391.1746, observée m/z 391.1744

1-(2-Hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-6-phenyl-1,5-dihydro-[1,2,3]triazolo[4,5-c]pyridin-4-one 207e.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°12 (page 270) à **205e** fournit **207e** (72 %) sous forme de solide blanc.

UV (MeOH) λ_{\max} 298 nm;

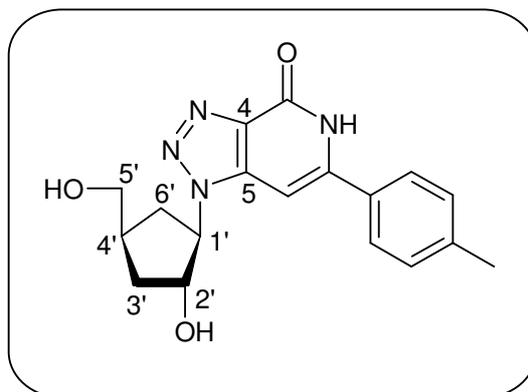
Point de fusion : 229-230°C;

RMN ^1H (DMSO-*d*6) δ : 1.63-2.17 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.23-2.45 (m, 2H, H-4', H-6'b), 2.35-3.55 (m, H-5', eau), 4.37-4.45 (m, 1H, H-2'), 4.72 (se, 1H, OH), 4.91 (td, $J = 7.4$ Hz, 9.8 Hz, 1H, H-1'), 5.15-5.25 (m, 1H, OH), 7.06 (s, CH alcène), 7.35-7.85 (m, CH_x5);

RMN ^{13}C (DMSO-*d*6) δ : 32.1 (C-6'), 35.1 (C-3'), 36.4 (C-4'), 64.8 (C-5'), 66.4 (C-1'), 75.4 (C-2'), 89.8 (CH alcène), 125.4 (CHx2), 128.8 (CHx2), 129.9 (CH), 133.4 (C), 135.4 (C), 139.8 (C), 144.5 (C), 156.9 ($\underline{\text{CONH}}$);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$, calculée m/z 349.1277, observée m/z 349.1275

1-(2-Hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-6-p-tolyl-1,5-dihydro-[1,2,3]triazolo[4,5-c]pyridin-4-one 207f.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°12 (page 270) à **205f** fournit **207f** (51 %) sous forme de solide jaunâtre.

UV (MeOH) λ_{\max} 297 nm;

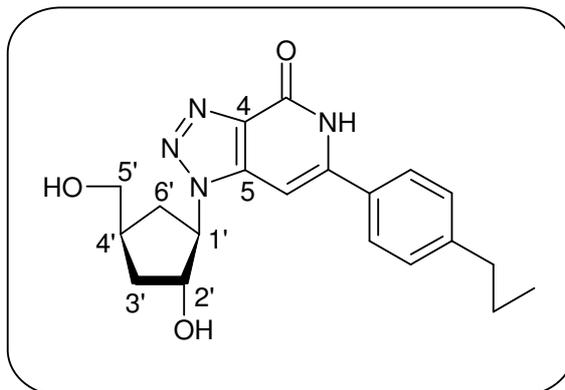
Point de fusion : 251-252°C;

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 1.63-2.75 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.23-2.45 (m, 5H, CH₃, H-4', H-6'b), 3.20-3.60 (m, H-5', eau), 4.39 (quad, 2H, *J* = 6.9 Hz, H-2'), 4.74 (se, 1H, OH), 4.83-5.02 (m, H-1'), 5.28 (se, 1H, OH), 7.04 (s, CH alcène), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 11.30-11.90 (se, NH) ;

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 20.8 (CH₃), 32.1 (C-6'), 35.1 (C-3'), 36.4 (C-4'), 54.9 (C), 64.8 (C-5'), 66.3 (C-1'), 75.4 (C-2'), 89.2 (CH alcène), 127.2 (CH_x2), 129.3 (CH_x2), 130.5 (C), 135.3 (C), 139.7 (C), 139.9 (C), 144.5 (C), 147.0 (CONH);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₁₈H₂₀N₄O₃Na, calculée m/z 363.1433, observée m/z 363.1430

1-(2-Hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-6-(4-propyl-phényl)-1,5-dihydro-[1,2,3]triazolo[4,5-c]pyridin-4-one 207g.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°12 (page 270) à **205g** fournit **207g** (66 %) sous forme de solide jaunâtre.

UV (MeOH) λ_{\max} 297 nm;

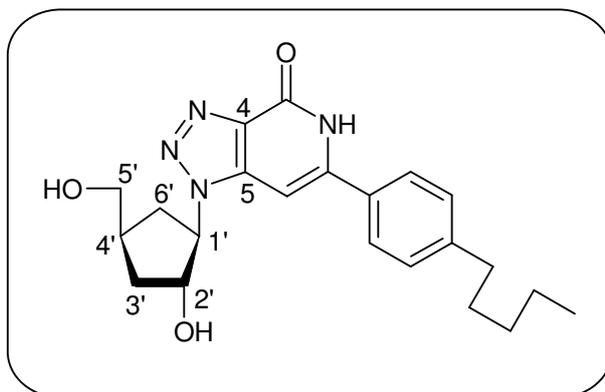
Point de fusion : 184-185°C;

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.68 (sxt, J = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.81-2.32 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.36-2.73 (m, 4H, CH₂, H-4', H-6'b), 3.61 (d, J = 5.6 Hz, 2H, H-5'), 4.59 (q, 2H, J = 7.4 Hz, H-2'), 4.70-5.02 (m, H-1', eau), 6.98 (s, CH alcène), 7.33 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 8.2 Hz, 2H);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 14.0 (CH₃), 25.5 (CH₂), 33.5 (C-6'), 36.1 (C-3'), 38.0 (CH₂), 38.7 (C-4'), 66.7 (C-5'), 68.3 (C-1'), 77.4 (C-2'), 91.1 (CH alcène), 128.2 (CH_x2), 130.2 (CH_x2), 132.5 (C), 136.5 (C), 141.8 (C), 146.5 (C), 146.9 (C), 159.5 (CONH);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₂₀H₂₄N₄O₃Na, calculée m/z 391.1746, observée m/z 391.1744

1-(2-Hydroxy-4-hydroxyméthyl-cyclopentyl)-6-(4-pentyl-phényl)-1,5-dihydro-[1,2,3]triazolo[4,5-c]pyridin-4-one 207h.



Mode opératoire :

L'application du mode opératoire général N°12 (page 270) à **205h** fournit **207h** (67 %) sous forme de solide blanc.

UV (MeOH) λ_{\max} 298 nm;

Point de fusion : 178-179°C;

RMN ¹H (CD₃OD) δ : 0.91 (t, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.25-1.47 (m, 4H, CH₂x2), 1.57-1.75 (m, 2H, CH₂), 1.83-2.35 (m, 3H, H-3', H-6'a), 2.42-2.61 (m, 2H, H-4', H-6'b), 2.69 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂), 3.61 (d, J = 6.8 Hz, 2H, H-5'), 4.59 (q, 2H, J = 7.2 Hz, H-2'), 4.80-5.00 (m, H-1', eau), 6.99 (s, CH alcène), 7.35 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 2H);

RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 14.4 (CH₃), 23.6 (CH₂), 32.2 (CH₂), 32.6 (CH₂), 33.5 (C-6'), 36.1 (CH₂), 36.6 (C-3'), 38.3 (C-4'), 66.7 (C-5'), 68.3 (C-1'), 77.4 (C-2'), 91.1 (CH alcène), 128.3 (CHx2), 130.2 (CHx2), 132.5 (C), 136.6 (C), 141.8 (C), 146.8 (C), 146.9 (C), 159.5 (CONH);

Spectrométrie de Masse Haute Résolution ESI : C₂₂H₂₈N₄O₃Na, calculée m/z 419.2059, observée m/z 419.2058

**Notes
et
références bibliographiques**

- 1 Challand, R.; Young, R. J. *Antiviral chemotherapy*. Spektrum Akademischer Verlag, **1997**.
- 2 La nature de ce génome permet de faire une première classification de ces virus entre virus à ADN (Adénovirus) et virus à ARN (Rétrovirus): Hsiung, G.D. Use of ultrafiltration for animal virus grouping. *Bacteriol. Rev.* **1965**, *29*, 477-486.
- 3 (a) Lwoff, A. The concept of virus. *J. Gen. Microbiol.* **1957**, *17*, 239-253. (b) Lwoff, A.; Horne, R.; Tournier, P. A system of viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1962**, *27*, 51-55. (c) Lwoff, A.; Horne, R.; Tournier, P. A virus system. *C. R. Acad. Sci., Paris* **1962**, *254*, 4225-4227. (d) Lwoff, A.; Anderson, T.F.; Jacob, F. Remarks on the characteristics of the infectious viral particles. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **1959**, *97*, 281-289.
- 4 (a) Schlichting, I.; Reinstein, J. Structures of active conformations of UMP kinase from *Dictyostelium discoideum* suggest phosphoryl transfer is associative. *Biochemistry* **1997**, *36*, 9290-9296. (b) Rudolph MG, Veit TJ, Reinstein J. The novel fluorescent CDP-analogue (Pbeta)MABA-CDP is a specific probe for the NMP binding site of UMP/CMP kinase. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2697-2704. (c) Segura-Pena, D.; Sekulic, N.; Ort, S.; Konrad, M.; Lavie, A. Substrate-induced conformational changes in human UMP/CMP kinase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33882-33889.
- 5 (a) Lavie, A.; Vetter, I.R.; Konrad, M.; Goody, R.S.; Reinstein, J.; Schlichting, I. Structure of thymidylate kinase reveals the cause behind the limiting step in AZT activation. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 595-597. (b) Muller, H.C.; Meier, C.; Balzarini, J.; Reinstein, J. Novel nucleotide analogues as potential substrates for TMPK, a key enzyme in the metabolism of AZT. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **2003**, *22*, 821-823. (c) Pasti, C.; Gallois-Montbrun, S.; Munier-Lehmann, H.; Veron, M.; Gilles, A.M.; Deville-Bonne, D. Reaction of human UMP-CMP kinase with natural and analog substrates. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1784-1790.
- 6 Il est important de noter que la forme active est souvent le triphosphate. Cependant, cette forme, tétrachargée à pH physiologique, ne peut franchir les membranes lipidiques des cellules. Le nucléoside est transformé par la machinerie cellulaire en son analogue triphosphorylé. Il en résulte donc une absence ou une réelle difficulté à établir des relations structure-activité entre les NTP et les cibles virales.
- 7 Spadari, S.; Maga, G.; Focher, F.; Cianocchi, G.; Manservigi, R.; Arcomone, F.; Capobianco, M. Carcuro, A.; Colonna, F.; Iotti, S. Garbesi, A. L-Thymidine is phosphorylated by herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and inhibits viral growth. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4214-4220.
- 8 (a) Il existe au moins 4 types distincts de polymérase à ADN, désignées, par ordre de découverte par les lettres α , β , γ , δ . L' α , le β et le δ sont situées dans le noyau tandis que le γ se trouve dans les mitochondries. (b) De Clercq, E. New perspectives for the treatment of HIV infection. *Collectz. Czech. Chem. Commun.* **1998**, *63*, 449-479. (c) De Francesco, R.; Tomei, L.; Altamura, S.; Summa, V.; Migliaccio, G. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* **2003**, *58*, 1-16.
- 9 Magasanik, B., Moyed, H.S. and Gehring, L.B. Enzymes essential for the biosynthesis of nucleic acid guanine; inosine 5'-phosphate dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 339-350.
- 10 Turner, J.F. and King, J.E. Inosine 5-phosphate dehydrogenase of pea seeds. *Biochem. J.* **1961**, *79*, 147-151.
- 11 Zhou, S.; Liu, R.; Baroudy, B.M.; Malcolm, B.A.; Reyes, G.R. The effect of ribavirin and *IMPDH* inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* **2003**, *310*, 333-342.
- 12 Baker, R.O.; Bray M.; Huggins, J.W. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. *Antiviral Res.* **2003**, *57*, 13-23.
- 13 Neyts, J.; De Clercq, E. Therapy and short-term prophylaxis of poxvirus infections: historical background and perspectives. *Antiviral Res.* **2003**, *57*, 25-33.
- 14 Prussof, W. H. Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochem. Biophys. Acta* **1959**, *32*, 295-296.
- 15 (a) De Miranda, P.; Elion, G.; Bauer, D. J.; Collins, P.; Schaeffer, J. H.; Beauchamp, L. 9-(2-hydroxyethoxyméthyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* **1978**, *272*, 583-585. (b) Elion, G. B.; Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; De Miranda, P.; Beauchamp, L.; Schaeffer, H. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxyméthyl)guanine. *J. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **1977**, *74*, 5716-5220. (c) Furman, P. A.; St. Clair, M. H.; Fyfe, J. A.; Rideout, J. L.; Keller, P. M.; Elion, G. B. Inhibition of herpes simplex virus-induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by 9-(2-hydroxyethoxyméthyl)guanine and its triphosphate. *J. Virol.* **1979**, *32*, 72-77.

16 (a) Brodfuehrer, P.; Brundige, S.; Howell, J.; Howell, H.; Sapino, C.; Tann, C. Fluorocarbohydrates in synthesis. An efficient synthesis of 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil (β -FIAU) and 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)thymine (β -FMAU). *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3644-3647. (b) Fox, J.; Schinazi, R.; Su, T.-L.; Watanabe, K. Synthesis and antiviral effects of several 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-5-alkyluracils. Some structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 151-154. (c) Beningni, D.; Brodfuehrer, P.; Brundige, S.; Howell, H.; Sapino, C. Antiviral nucleosides. A stereospecific, total synthesis of 2'-fluoro-2'-deoxy- β -D-arabinofuranosyl nucleosides. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 85-88.

17 (a) Furman, P. A.; Fyle, J. A.; St. Clair, M. H.; Weinhold, K.; Rideout, J. L.; Freeman, G. A.; Nusinoff-Lehrmann, S.; Bolognesi, D. P.; Broder, S.; Mitsuya, H.; Barry, D. W. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 8333-8337. (b) Collier, A. C.; Bozzette, S.; Combs, R. W. A pilot of low dose zidovudine in human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **1990**, *323*, 1015-1021. (c) Yarchoan, R.; Thomas, R. V.; Allain, J.-P.; McAtee, N.; Duminski, R.; Mitsuya, H.; Lawley, T. J.; Safai, B.; Myers, C. E.; Perno, C. F.; Keecker, R. W.; Wills, R. J.; Fischl, M. A.; MacNeely, M. C.; Pluda, J. M.; Leuther, M.; Collins, J. M.; Broder, S. Phase I studies of 2',3'-dideoxycytidine in severe human immunodeficiency virus infection as a single agent and alternating with zidovudine (AZT). *Lancet* **1988**, *1*, 76-81. (d) Lin, T.-S.; Schinazi, R. F.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 2713. (e) De Clercq, E. Chemotherapeutic approaches to the treatment of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1561-1569.

18 Ichikawa, E.; Kato, K.; Sugar-modified nucleosides in past 10 years, a review. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 385-423.

19 (a) Meier, C. Pro-Nucleotides-recent advances in the design of efficient tools for the delivery of biologically active nucleoside monophosphates. *Synlett* **1998**, 233-242. (b) Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417-451.

20 (a) Siddiqui, A.; McGuigan, C.; Ballatore, C.; Zuccotto, F.; Gilbert, I.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Design and synthesis of lipophilic phosphoramidate d4T-MP prodrugs expressing high potency against VIH in cell culture: Structural determinants for in vitro activity and QSAR. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4122-4128. (b) Saboulard, D.; Naesens, L.; Cahard, D.; Salgado, A.; Pathirana, R.; Velazquez, S.; McGuigan, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Characterization of the activation pathway of phosphoramidate triester prodrugs of stavudine and zidovudine. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 693-704.

21 (a) Cretton, E.; Schinazi, R.-F.; McClure, H.; Anderson, D.; Sommadossi, J.-P. Pharmacokinetics of 3'-azido-3'-deoxythymidine and its catabolites and interactions with probenecid in rhesus monkeys. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 801-807. (b) Les neuropathies périphériques se manifestent sous la forme de fourmillements des extrémités, des sensations de brûlure et des crampes. (c) Chen, C. H.; Cheng, Y. S. Delayed cytotoxicity and selective loss of mitochondrial DNA in cells treated with the anti-human immunodeficiency virus compound 2',3'-dideoxycytidine. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11934-11937. (d) Starnes, M. C.; Cheng, Y. C. Cellular metabolism of 2',3'-dideoxycytidine, a compound active against human immunodeficiency virus in vitro. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 988-991.

22 Choo, Q.L.; Kuo, G.; Weiner, A.J.; Overby, L.R.; Bradley, D.W.; Houghton, M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **1989**, *244*, 359-362.

23 Houghton, M. Hepatitis C viruses. In : *Fields*, B.N., Knipe, David M., Howley, Peter M. (Eds.), *Virology*, vol. 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 1996; pp. 1035-1058.

24 Knipe, D.M.; Howley, P.M. In *Fields Virology, fourth Ed., vol. 1*, 2001, p. 1147.

25 Une cirrhose est une affection dans laquelle les cellules du foie sont endommagées ou détruites et remplacées par du tissu cicatriciel. La formation étendue de tissu cicatriciel entrave la circulation sanguine dans le foie, ce qui détruit davantage de cellules et entraîne la perte de la fonction hépatique. Une cirrhose est dite compensée dans le cas où le foie est profondément cicatrisé mais encore capable d'accomplir la plupart des fonctions ; les personnes atteintes de cirrhose compensée présentent peu ou pas de symptômes. Si le foie est profondément cicatrisé et incapable de fonctionner, on parle de cirrhose décompensée. Les personnes atteintes de cirrhose décompensée présentent souvent des complications telles que des varices (vaisseaux sanguins étirés et affaiblis) dans l'œsophage et dans l'estomac, des saignements internes, des ascites (accumulations de liquide) et d'autres états menaçant potentiellement la vie. Ces personnes peuvent également subir une confusion mentale réversible.

26 (a) Takahashi, M.; Yamada, G.; Miyamoto, R.; Doi, T.; Endo, H.; Tsuji, T. Natural course of Hepatitis C, *Am. J. Gastroenterol.* **1993**, *88*, 240-243. (b) Tong, M.J.; El-Farra, N.S.; Reikes, A.R.; Co, R.L. Clinical outcomes

after transfusion-associated hepatitis C, *N. Engl. J. Med.* **1995**, *332*, 1463-1466. (c) Le cancer du foie est généralement présent aux stades tardifs de l'infection au VHC, et typiquement après 25 à 30 ans. Le type de cancer associé au VHC s'appelle carcinome hépatocellulaire (CHC) primitif.

27 Cependant, d'autres présentent des symptômes grippaux légers. Certaines personnes présentent des symptômes grippaux plus prononcés ainsi qu'une jaunisse (jaunissement de la peau et du blanc des yeux).

28 Plusieurs affections différentes ont été liées au VHC. Certaines sont des maladies auto-immunes dans lesquelles le système immunitaire s'attaque aux tissus du corps. Les affections qui sont parfois présentes chez les porteurs chroniques du VHC incluent : le syndrome de Sjögren (sècheresse des yeux et de la bouche), des affections rénales telles que la glomérulonéphrite, des troubles cardiaques et circulatoires tels qu'une thrombose (caillots sanguins), et des affections cutanées comme le lichen plan (caractérisé par des lésions ou des papules blanches) et la porphyrie cutanée tardive (caractérisé par un érythème sensible au soleil). D'autres affections associées incluent certains types d'arthrite (inflammation des articulations), l'arthralgie (douleurs articulaires), les maladies thyroïdiennes, la vascularite (lésions des vaisseaux sanguins) et la cryoglobulinémie (niveau élevé d'une protéine du sang qui se dépose dans les reins, la peau et les extrémités nerveuses). La plupart des affections graves sont associées à l'hépatite C au stade avancé, lorsque le foie est endommagé et ne fonctionne plus normalement. Beaucoup de personnes atteintes par le VHC ne présentent jamais ces affections.

29 La co-infection signifie l'infection à deux ou plusieurs agents responsables de maladie.

30 J Bukh, J.; Purcell, R.H.; Miller, R.H. Sequence Analysis of the Core Gene of 14 Hepatitis C Virus Genotypes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 8239-8243.

31 Fried, M.W.; Shiffman, M.L.; Reddy, K.R.; Smith, C.; Marinos, G.; Goncales, F.L.; Haunssinger, D.; Diago, M.; Carosi, G.; Dhumeaux, D.; Craxi, A.; Lin, A.; Hoffman, J.; Yu, J., 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 975-982.

32 il existe actuellement deux différentes combinaisons d'interféron pégylé/ribavirine qui ont été approuvées par la FDA : Peg-Intron de Scheringet ribavirine de la marque Rebetol, et Pegasys de Roche et ribavirine de la marque Copegus.

33 PEG signifie polyéthylène glycol de formule générale $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$

34 Tan, S.L.; Pause, A. Shi, Y.; Sonenberg, N. Hepatitis C therapeutics : current status and emerging therapies. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2002**, *1*, 867-881.

35 McHutchinson, J.C.; Patel, K. Future therapy of hepatitis C. *Hepatology* **2002**, *36*, S245-S252.

36 Lau, J.Y.; Tam, R.C.; Liang, T.J.; Hong, Z. Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology* **2002**, *35*, 1002-1009.

37 Maag, D.; Castro, C.; Hong, Z.; Cameron, C.E. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 46094-46098.

38 Crotty, S.; Maag, D.; Arnold, J.J.; Zhong, W.; Lau, J.Y.; Andino, R.; Cameron, C.E. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA mutagen. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1375-1379.

39 Les personnes qui reçoivent un traitement anti-VHC doivent être testées à intervalles réguliers pour surveiller les effets secondaires et assurer leur réponse au traitement. Si aucune réponse n'est détectée après trois mois de traitement, il est peu probable qu'un traitement supplémentaire élimine le virus. Beaucoup de médecins conseillent alors d'arrêter la prise des médicaments. Certaines preuves suggèrent cependant que l'interféron peut atténuer la cicatrisation et l'inflammation et améliorer l'état du foie, même s'il n'élimine pas le virus.

40 (a) Le traitement perturbe le métabolisme cellulaire normal et induit une cytotoxicité. (b) Au cours de l'infection virale, les signes cliniques apparaissent après que le virus se soit multiplié dans les cellules et que les lésions se soient constituées. (c) Il n'y a pas de réponse satisfaisante pour 40% des cas traités.

41 Aora, S.; Xu, C.; Teng, A.; Peterson, J.; Yeh, L.T.; Gish, R.; Lau, D.; Rossi, S.; Lin, C.C. Ascending multiple-dose pharmacokinetics of viramidine, a prodrug of ribavirin, in adult subjects with compensated hepatitis C infection. *J. Clin. Pharmacol.* **2005**, *45*, 275-285.

42 Lin, C.C.; Phillips, L.; Xu, C.; Yeh, L.T. Pharmacokinetics and safety of viramidine, a prodrug of ribavirin, in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **2004**, *44*, 265-275.

43 (a) Osborn, B.L.; Olsen, H.S.; Nardelli B.; Murray J.H.; Zhou J.X.; Garcia A.; Moody G.; Zaritskaya L.S.; Sung C. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *303*, 540-548. (b) Sung, C.; Nardelli, B.; LaFleur, D.W.; Blatter, E.; Corcoran, M.; Olsen, H.S.; Birse, C.E.; Pickeral, O.K.; Zhang, J.; Shah, D.; Moody,

- G.; Gentz, S.; Beebe, L.; Moore, P.A. An IFN-beta-albumin fusion protein that displays improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in nonhuman primates. *J. Interferon Cytokine Res.* **2003**, *23*, 25-36.
- 44 Rosenberg, S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C Virus. *J. Mol. Biol.* **2002**, *313*, 451-464.
- 45 Ogata, N.; Alter, H.J.; Miller, R.H.; Purcell, R.H. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 3392-3396.
- 46 Gordon, C.P.; Keller, P.A. Control of hepatitis C: a medicinal chemistry perspective. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1-20.
- 47 Lundin, M.; Monne, M.; Widell, A.; Von Heijne, G.; Persson, M.A. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J. Virol.* **2003**, *77*, 5428-5438.
- 48 Durantel, D.; Escuret, V.; Zoulim, F. Current and emerging therapeutic approaches for hepatitis C infection. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* **2003**, *1*, 441-454.
- 49 Moriishi, K.; Matsuura, Y. Mechanisms of hepatitis C virus infection. *Antivir. Chem. Chemother.* **2003**, *14*, 285-297.
- 50 (a) Blight, K.J.; Kolykhalov, A.A.; Rice, C.M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **2000**, *290*, 1972-1974. (b) Lohmann, V.; Korner, F.; Koch, J.; Herian, U.; Theilmann, L.; Bartenschlager, R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **1999**, *285*, 100-113.
- 51 Larkin, J.; Jin, L.; Farnen, M.; Venable, D.; Huang, Y.; Tan, S.L.; Glass, J.I. Synergistic antiviral activity of human interferon combinations in the hepatitis C virus replicon system. *J. Interferon Cytokine Res.* **2003**, *23*, 247-257.
- 52 Yanagida, K.; Baba, C.; Baba, M. Inhibition of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by mizoribine : synergistic effect of combination with interferon- α . *Antiviral Res.* **2004**, *64*, 195-201.
- 53 Buckwold, V.E.; Beer, B.E.; Donis, R.O. Bovine viral diarrhoea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. *Antiviral Res.* **2003**, *60*, 1-15.
- 54 Ouzounov, S.; Mehta, A.; Dwek, R.A.; Block, T.M.; Jordan, R. The combination of interferon- α -2b and n-butyl-deoxyjirimycin has a greater than additive antiviral effect upon the production of infectious bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in vitro: implications for hepatitis C virus (HCV) therapy. *Antiviral Res.* **2002**, *55*, 425-435.
- 55 Durantel, D.; Carroue-Durantel, S.; Branza-Nichita, N.; Dwek, R.A.; Zitzmann, N., 2004. Effects of interferon, ribavirin, and iminosugar derivatives on cells persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 497-504.
- 56 Tanabe, Y.; Sakamoto, N.; Enomoto, N.; Kurosaki, M.; Ueda, E.; Maekawa, S.; Yamashiro, T.; Nakagawa, M.; Chen, C.H.; Kanazawa, N.; Kakinuma, S.; Watanabe, M. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- α . *J. Infect. Dis.* **2004**, *189*, 1129-1139.
- 57 (a) Buckwold, V.E.; Wei, J.; Wenzel-Mathers, M.; Russell, J. Synergistic In Vitro Interactions between Alpha Interferon and Ribavirin against Bovine Viral Diarrhoea Virus and Yellow Fever Virus as Surrogate Models of Hepatitis C Virus Replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2293-2298. (b) Malet, I.; Wychowski, C.; Huriaux, J.M. Agut, H.; Cahour, A. Yellow fever 5' noncoding region as a potential element to improve hepatitis C virus production through modification of translational control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *253*, 257-264.
- 58 Peter, K.; Gambertoglio, J.G. Intracellular phosphorylation of zidovudine (ZDV) and other nucleoside reverse transcriptase inhibitors (RTI) used for human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 819-825.
- 59 Carroll, S.S., Tomassini, J.E., Bosserman, M., Getty, K., Stahlhut, M.W., Eldrup, A.B., Bhat, B., Hall, D., Simcoe, A.L., LaFemina, R., Rutkowski, C.A., Wolanski, B., Yang, Z., Migliaccio, G., De Francesco, R., Kuo, L.C., MacCoss, M., Olsen, D.B. Inhibition of Hepatitis C Virus RNA Replication by 2'-Modified Nucleoside Analogs. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11979-11984.

- 60 Zuck, P.; Murray, E.M.; Stec, E.; Grobler, J.A.; Simon, A.J.; Strulovici ; Inglese, J.; Flores, O.A.; Ferrer, M. A cell-based β -lactamase reporter gene assay for the identification of inhibitors of hepatitis C virus replication. *Anal. Biochem.* **2004**, *334*, 344-355.
- 61 Kato, N.; Sugiyama, K.; Namba, K.; Dansako, H.; Nakamura, T.; Takami, M.; Naka, K.; Nozaki, A.; Shimotohno, K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *306*, 756-766.
- 62 Ikeda, M.; Abe, K.; Dansako, H.; Nakamura, T.; Takami, M.; Naka, K.; Kato, N. Eft replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a *luciferase* reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *329*, 1350-1359.
- 63 (a) Zhong, J.; Gastaminza, P.; Cheng, G.; Kapadia, S.; Kato, T.; Burton, B.R.; Wieland, S.F.; Uprichard, S.L.; Wakita, T.; Chisari, F.V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 9294-9299. (b) Wakita, T.; Pietschmann, T.; Kato, T.; Date, T. Miyamoto, M. Zhao, Z.; Murthy, K. Habermann, A.; Kräusslich, H.-G.; Mizokami, M.; Bartenschlager, R. Liang, T.J. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* **2005**, *11*, 791-796. (c) Lindenbach, B.D.; Evans, M.J.; Syder, A.J. Wölk, B.; Tellinghuisen, T.L.; Liu, C.C. Maruyama, T.; Hynes, R.O.; Burton, D.R.; McKeating, J.A.; Rice, C.M. Complete Replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **2005**, *309*, 623-626.
- 64 Ito, T.; Tahara, S.M.; Lai, M.M. The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J. Virol.* **1998**, *72*, 8789-8796.
- 65 Kamoshita, N.; Tsukiyama-Kohara, K.; Kohara, M.; Nomoto, A. Genetic analysis of internal ribosomal entry site on hepatitis C virus RNA: implication for involvement of the highly ordered structure and cell type-specific transacting factors. *Virology* **1997**, *233*, 9-18.
- 66 Zhao, W. Genetic analysis of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. Ph.D. Dissertation, State University of New York, Stony Brook, NY, 2001 (AN 2002:594323).
- 67 (a) Klinck, R.; Westhof, E.; Walker, S.; Afshar, M.; Collier, A.; Aboul-Ela, F. A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *RNA* **2000**, *6*, 1423-1431. (b) Rando, R.; Welch, E. Methods for identifying small molecules that bind specific RNA structural motifs and uses highthroughput screening of combinatorial libraries. WO 2002083953, 2002. (c) Le, S.-Y.; Zhang, K.; Maizel, J. V., Jr. RNA molecules with structure dependent functions are uniquely folded. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3574-3582. strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 837-847.
- 68 (a) Kikuchi, K.; Fukuda, K.; Umehara, T.; Hwang, J.; Kuno, A.; Hasegawa, T.; Nishikawa, S. In vitro selection of RNA aptamers that bind to domain II of HCV IRES. *Nucleic Acids Res., Suppl.* **2002**, 267-268. (b) Kikuchi, K.; Umehara, T.; Fukuda, K.; Hwang, J.; Kuno, A.; Hasegawa, T.; Nishikawa, S. Structure-inhibition analysis of RNA aptamers that bind to HCV IRES. *Nucleic Acids Res., Suppl.* **2003**, 291-292. (c) Kikuchi, K.; Umehara, T.; Fukuda, K.; Hwang, J.; Kuno, A.; Hasegawa, T.; Nishikawa, S. RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. *J. Biochem.* **2003**, *133*, 263-270.
- 69 Ryu, K.-J.; Lee, S.-W. Identification of the most accessible sites to ribozymes on the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *36*, 538-544.
- 70 Witherell, G. W. ISIS-14803 (Isis Pharmaceuticals). *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2001**, *2*, 1523-1529.
- 71 (Pas d'auteur listé) Heptazyme. *Drug News Perspect.* **2000**, *13*, 112-112.
- 72 Selby, M.J.; Glazer, E.; Masiarz, F.; Houghton, M. Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology* **1994**, *204*, 114-122.
- 73 Lin, C.; Lindenbach, B.D.; Pragai, B.M.; McCourt, D.W.; Rice, C.M. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J. Virol.* **1994**, *68*, 5063-5073.
- 74 Griffin, S.D.C.; Beales, L.P.; Clarke, D.S.; Worsfold, O.; Evans, S.D.; Jaeger, J.; Harris, M. P.G.; Rowlands, D.J. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* **2003**, *535*, 34-38. et citations incluses.
- 75 Lohmann, V.; Korner, F.; Koch, J.; Herain, U.; Theilmann, L.; Bartenschlager, R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **1999**, *285*, 110-113.
- 76 Sakai, A.; St. Claire, M.; Faulk, K.; Govindarajan, S.; Emerson, S.U.; Purcell, R.H., Bukh, J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 11646-11651.

- 77 Blight, K.J.; Kolykhalov, A.A.; Rice, C.M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **2000**, *290*, 1972-1974.
- 78 Harada, T.; Tautz, N.; Thiel, H.J. E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J. Virol.* **2000**, *74*, 9498-9506.
- 79 Hay, A.J.; Wolstenholme, A.J.; Skehel, J.J.; Smith, M.H. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.* **1985**, *4*, 3021-3024.
- 80 Duff, K.C.; Ashley, R.H. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *Virology* **1992**, *190*, 485-489.
- 81 Bergeron, J.J.; Brenner, M.B.; Thomas, D.Y.; Williams, D.W. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 124-128.
- 82 Peterson, J.R.; Ora, A.; Van, P.N.; Helenius, A. Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Mol. Biol. Cell* **1995**, *6*, 1173-1184
- 83 Branza-Nichita, N.; Durantel, D.; Carrouee-Durantel, S.; Dwek, R.A.; Zitzmann, N. Antiviral Effect of N-Butyldeoxyjirimycin against Bovine Viral Diarrhea Virus Correlates with Misfolding of E2 Envelope Proteins and Impairment of Their Association into E1-E2 Heterodimers. *J. Virol.* **2001**, *75*, 3527-3536
- 84 Chouki, A.; Ung, S.; Wychowski, C.; Dubuisson, J. Molecular virology of hepatitis C virus. *J. Virol.* **1998**, *72*, 3851-3858.
- 85 Durantel, D.; Branza-Nichita, N.; Carrouee-Durantel, S.; Butters, T.D.; Dwek, R.A.; Zitzmann, N. Study of the mechanism of antiviral action of iminosugar derivatives against bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* **2001**, *75*, 8987-8998.
- 86 Pavlovic, D.; Neuville, D.C.A.; Argaud, O.; Blumberg, B.; Dwek, R.A.; Fisher, W.B.; Zitzmann, R. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 6104-6108
- 87 (a) Bartenschlager, R.; Lohmann, V.; Wilkinson, T.; J.O. Complex formation between the NS3 serine type-proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J. Virol.* **1995**, *29*, 7519-7528. (b) Butkiewicz, N.J.; Wendel, M.; Zhang, R.; Jubin, R.; Pichardo, J.; Smiyh, E.B. et al. Enhancement of hepatitis C virus NS3 proteinase activity by association with NS4A-specific synthetic peptides : identification of sequence and critical residues of NS4A for the cofactor activity. *Virology* **1996**, *225*, 328-338. (c) Kwong, A.D.; Kim, J.L.; Rao, G.; Lipovsek, D.; Raybuck, S.A. Hepatitis C virus NS3/4A protease. *Antiviral Res.* **1999**, *41*, 67-84.
- 88 Reed, K.E.; Rice, C.M. Expression and characterization of the HCV NS2 protease. *Method Mol. Med.* **1998**, *19*, 331-342.
- 89 Pallaoro, M.; Lahm, A.; Biasol, G.; Brunetti, M.; Nardella, C.; Orsatti, L.; Bonelli, F.; Orru, S.; Narjes, F.; Steinkulher, C. Characterisation of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *J. Virol.* **2001**, *75*, 9939-9946.
- 90 Tai, C.L.; Chi, W.K.; Chen, D.S.; Hwang, L.H. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J. Virol.* **1996**, *70*, 8477-8484.
- 91 Tackett, A.J.; Wei, L.; Cameron, C.E.; Raney, K.D. Unwinding of nucleic acids by HCV NS3 helicase is sensitive to the structure of duplex. *Nucl. Acids Res.* **2001**, *29*, 565-572.
- 92 Locatelli, G.A.; Gosselin, G.; Spadari, S.; Maga, G. Hepatitis C virus NS3 NTPase/Helicase : Different stereoselectivity in nucleoside triphosphate utilisation suggests that NTPase and helicase activities are coupled by a nucleotide-dependent rate limiting step. *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 683-694.
- 93 Lohman, T.M.; Bjornson, K.P. Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 169-214.
- 94 Gwak, Y.; Kim, D.W.; Han, J.H.; Choe, J. DNA helicase activity of the hepatitis C virus non-structural protein 3. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 47-54.
- 95 Lemon, S.M.; Yi, M.; Li, K. "Strong reasons make strong actions"- The antiviral efficacy of NS3/4A protease inhibitors. *Hepatology* **2005**, *41*, 671-674.

- 96 Narjes, F.; Brunetti, M.; Colarusso, S.; Gerlach, B.; Koch, U.; Biasiol, G.; Fattori, D.; De Francesco, R.; Matassa, V.G.; Steinkuehler, V. A-Ketoacids are potent slow binding inhibitors of the hepatitis C Virus (HCV) NS3 protease. *Biochemistry* **2000**, *39*, 1849-1861.
- 97 Barbato, G.; Cicero, D.O.; Nardi, M.C.; Steinkuehler, C.; Cortese, R.; De Francesco, R.; Bazzo, R. The solution structure of the N-terminal proteinase domain of the hepatitis C virus (HCV) NS3 protein provides new insights into its activation and its catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* **1999**, *289*, 371-384.
- 98 Barbato, G.; Cicero, D.O.; Cordier, F.; Narjes, F.; Gerlach, B.; Sambucini, S.; Grzesiek, S.; Matassa, V.G.; De Francesco, R.; Bazzo, R. Inhibitor binding induces active site stabilization of the HCV NS3 protein serine protease domain. *EMBO J.* **2000**, *6*, 1195-1206.
- 99 Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- 100 (a) Walker, M.A.; Hepatitis C virus : an overview of current approaches and progress. *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 518-529. (b) Zhang, R.; Mui, P.W.; Weber, P.C. Synthetic inhibitors of hepatitis C virus NS3 protease. WO 1997043310, 1997.
- 101 Kumar, P.K.R.; Machida, K.; Urvil, P.T. Kakuichi, N.; Vishnuvardhan, D.; Shimothono, K.; Taira, K.; Nishikawa, S. Inhibition of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA. *Virology* **1997**, *237*, 270-282.
- 102 Nishikawa, F.; Kakiuchi, N.; Funaji, K.; Fukuda, K.; Sekiya, S.; Nishikawa, S. Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 1935-1943.
- 103 Pause, A.; Kukulj, G.; Bailey, M.; Brault, M.; Do, F.; Halmos, T.; Lagace, L.; Maurice, M.; Marquis, M.; McKercher, G.; Pellerin, C.; Pilote, L.; thibeault, D.; Lamarre, D. An NS3 serine protease inhibitor abrogates replication of subgenomic hepatitis C virus RNA. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20374-20380.
- 104 Lamarre, D.; Anderson, P. C.; Bailey, M.; Beaulieu, P.; Bolger, G.; Bonneau, P.; Boes, M.; Cameron, D.R.; Cartier, M.; Cordingley, M.G.; Faucher, A.-M.; Goudreau, N.; Kawai, S.H.; Kukulj, G.; Lagace, L.; LaPlante, S.R.; Narjes, H.; Poupard, M.-A.; Rancourt, J.; Sentjens, R.E.; St. George, R.; Simoneau, B.; Steinmann, G.; Thibeault, D.; Tsantrizos, Y.S.; Weldon, S.M.; Yong, C.-L.; Llinas-Brunet, M. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* **2003**, *426*, 186-189.
- 105 Lin, C.; Lin, K.; Luong, Y. P.; Rao, B. G.; Wei, Y. Y.; Brennan, D.L.; Fulghum, J.R.; Hsiao H.M.; Ma, S.; Maxwell, J.P.; Cotrell, K.M.; Perni, R.B.; Gates, C.A.; Kwong, A.D. In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17508-17514.
- 106 Lu, L.; Pilot-Matias, T. J.; Stewart, K. D.; Randolph, J. T.; Pithawalla, R.; He, W.; Huang, P.P.; Klein, L.L.; Mo, H.; Molla, A. Mutations conferring resistance to a potent hepatitis C virus serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2004**, *48*, 2260-2266.
- 107 Hinrichsen, H.; Benhamou, Y.; Wedemeyer, H.; Reiser, M.; Sentjens, R.E.; Calleja, J.L.; Forns, X.; Erhardt, A.; Cronlein, J.; Chaves, R.L.; Yong, C.L.; Nehmiz, G.; Steinmann, G.G. Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology* **2004**, *127*, 1347-1355.
- 108 Reiser, M.; Hinrichsen, H.; Benhamou, Y.; Reesink, H.W.; Wedemeyer, H.; Avendano, C.; Riba, N.; Yong, C.L.; Nehmiz, G.; Steinmann, G.G. Antiviral efficacy of NS3-serine protease inhibitor BILN-2061 in patients with chronic genotype 2 and 3 hepatitis C. *Hepatology* **2005**, *41*, 832-835.
- 109 Maga, G.; Gemma, S.; Fattorusso, C.; Locatelli, G.A.; Butini, S.; Persico, M.; Kukrega, G.; Romano, M.P.; Chiasserini, L.; Savini, L.; Novellino, E. Nacci, V.; Spadari, S.; Campiani, G. Specific targeting of hepatitis C Virus NS3 RNA helicase. Discovery of the potent and selective competitive Nucleotide-mimicking inhibitor QU663. *Biochemistry* **2005**, *44*, 9637-9644.
- 110 Migliaccio, G.; Tomassini, J.E.; Carroll, S.S.; Tomei, L.; Altamura, S.; Bhat, B.; Bartholomew, L.; Bosserman, M.R.; Ceccacci, A.; Colwell, L.F.; Cortese, R.; De Francesco, R.; Eldrup, A.B.; Getty, K.L.; Hou, X.S.; LaFemina, R.L.; Ludmerer, S.W.; MacCoss, M.; McMasters, D.R.; Stahlhut, M.W.; Olsen, D.B.; Hazuda, D.J.; Flores, O.A. Characterization of Resistance to Non-obligate Chain-terminating Ribonucleoside Analogs That Inhibit Hepatitis C Virus Replication in Vitro. *J.Biol.Chem.* **2003**, *278*, 49164-49170.
- 111 Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F.A., De Francesco, R. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J. Virol.* **2002**, *76*, 3482-3492.

- 112 De Francesco, R.; Tomei, L.; Altamura, S.; Summa, V.; Migliaccio, G. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* **2003**, *58*, 1-16.
- 113 Tan, S. L.; Pause, A.; Shi, Y.; Sonenberg, N. Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 867-881.
- 114 (a) Luo, G.; Hamatake, R.K.; Mathis, D.M.; Racela, J.; Rigat, K.L.; Lemm, J.; Colonna, R.J. De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J. Virol.* **2000**, *74*, 851-863. (b) Shim, J.H.; Larson, G.; Wu, J.Z.; Hong, Z. Selection 3'-template bases and initiating nucleotides by hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **2002**, *76*, 7030-7039. (c) Zhong, W.; Uss, A.S.; Ferrari, E.; Lau, J.Y.; Hong, Z. De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J. Virol.* **2002**, *74*, 2017-2022.
- 115 Behrens, S.E.; Tomei, L.; De Francesco, R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* **1996**, *15*, 12-22.
- 116 Lohmann, V.; Korner, F.; Herian, U.; Bartenschlager, R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J. Virol.* **1997**, *71*, 8416-8428.
- 117 Butcher, S.J.; Grimes, J.M.; Makeyev, E.V.; Bamford, D.H.; Stuart, D.I. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* **2001**, *410*, 235-240.
- 118 De Clercq, E. ASPET Otto Krayer Award lecture. Molecular targets for antiviral agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *297*, 1-10.
- 119 De Clercq, E. Antiviral drugs : current state of the art. *J. Clin. Virol.* **2001**, *22*, 73-89.
- 120 Durantel, D.; Escuret V.; Zoulim, F. Current and emerging therapeutic approaches to hepatitis C infection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2003**, *1*, 441-454.
- 121 (a) Beaulieu, P.-L.; Llinas-Brunet, M. Therapies for hepatitis C infection : targeting the non-structural proteins of HCV. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *1*, 163-176. (b) Beaulieu, P.-L.; Fazal, G.; Gillard, J.; Kukulj, G.; Austel, V. Preparation of benzimidazolecarboxylates and related compounds as viral polymerase inhibitors. WO 2002004425, 2002. (c) Hashimoto, H.; Mizutani, K.; Yoshida, A. Preparation of heterocyclic compounds as remedies for hepatitis C. WO 200147883, 2001.
- 122 Dhanak, D.; Kaura, A.; Shaw, A. Preparation of 3-(1,1-dioxo-2H-benzo-1,2,4,-thiadiazin-3-yl)-2-quinolones as novel anti-infectives. WO 2001085172, 2001.
- 123 Altamura, S.; Tomei, L.; Koch, J.O.; Neuner, P.J.S.; Summa, V. Diketoacid-derivatives as inhibitors of viral polymerases. WO 2000006529, 2000.
- 124 Gardelli, C.; Giuliano, C.; Harper, S.; Koch, U.; Narjes, F.; Ontoria, J. M.; Poma, M.; Ponzi, S.; Stansfield, I.; Summa, V. Dihydroxypyrimidine carboxylic acids as viral polymerase inhibitors. WO 2002006426, 2002.
- 125 Bretner, M. Existing and future therapeutic options for hepatitis C virus infection. *Acta Biochim. Pol.* **2005**, *52*, 57-70.
- 126 Chan, L.; Reddy, T.J.; Proulx, M.; Das, S.K.; Pereira, O.; Wang, W.; Siddiqui, A.; Yannopoulos, C.G.; Poisson, C.; Turcotte, N.; Drouin, A.; Alaoui-Ismaili, M.H.; Bethell, R.; Hamel, M.; L'Heureux, L.; Bilimoria, D.; Nguyen-Ba, N. Identification of N,N-Disubstituted Phenylalanines as a novel class of inhibitors of hepatitis C NS5B polymerase. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1283-1285.
- 127 Gopalsamy, A.; Lim, K.; Ciszewski, G.; Park, K.; Ellingboe, J.W.; Bloom, J.; Insaf, S.; Upeslasis, J.; Mansour, T.S.; Krishnamurthy, G.; Damarla, M.; Pyatski, Y.; Ho, D.; Howe, A.Y.M.; Orłowski, M.; Feld, B.; O'Connell, J. Discovery of Pyrano[3,4b]indoles as potent and selective HCV NS5B polymerase inhibitor. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6603-6608.
- 128 (a) Carroll, S.S.; Tomassini, J.E.; Bosserman, M.; Getty, K.; Stahlhut, M.W.; Eldrup, A.B.; Bhat, B.; Hall, D.; Simcoe, A.L.; LaFemina, R.; Rutkowski, C.A.; Wolanski, B.; Yang, Z.; Migliaccio, G.; De Francesco, R.; Kuo, L.C.; MacCoss, M.; Olsen, D.B. Inhibition of Hepatitis C Virus RNA Replication by 2'-Modified Nucleoside Analogs. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11979-11984. (b) Shim, J.; Larson, G.; Lai, V.; Naim, S.; Wu, J.Z. Canonical 3'-deoxyribonucleotides as a chain terminator for HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* **2003**, *58*, 243-251. (c) Migliaccio, G.; Tomassini, J.E.; Carroll, S.S.; Tomei, L.; Altamura, S.; Bhat, B.; Bartholomew, L.; Bosserman, M.R.; Ceccacci, A.; Colwell, L.F.; Cortese, R.; De Francesco, R.; Eldrup, A.B.; Getty, K.L.; Hou, X.S.; LaFemina, R.L.; Ludmerer, S.W.; MacCoss, M.; McMasters, D.R.;

Stahlhut, M.W.; Olsen, D.B.; Hazuda, D.J.; Flores, O.A. Characterization of Resistance to Non-obligate Chain-terminating Ribonucleoside Analogs That Inhibit Hepatitis C Virus Replication in Vitro. *J.Biol.Chem.* **2003**, *278*, 49164-49170.

129 Stuyver, L.J.; Whitaker, T.; McBrayer, T.R.; Hernandez-Santiago, B.I.; Lostia, S.; Tharnish, P.M.; Ramesh, M.; Chu, C.K.; Jordan, R.; Shi, J.; Rachakonda, S.; Watanabe, K.A.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F. Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine diarrhea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 244-254.

130 Sommadossi, J.P.; Lacolla, P. Methods and compositions for treating flaviviruses and pestiviruses. WO 2001092282, 2001.

131 Eldrup, A.B.; Allerson, C.R.; Bennett, C.; Bera, S.; Bhat, B.; Bhat, N.; Bosserman, M.R.; Brooks, J.; Burlein, C.; Carroll, S.S.; Cook, P.D.; Getty, K. L.; MacCoss, M.; McMasters, D.R.; Olsen, D.B.; Prakash, T.P.; Prhvac, M.; Song, Q.; Tomassini, J.E.; Xia, J. Structure-Activity Relationship of Purine Ribonucleosides for Inhibition of Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2283-2295.

132 Eldrup, A.B.; Prhvac, M.; Brooks, J.; Bhat, B.; Prakash, T.P.; Song, Q.; Bera, S.; Bhat, N.; Dande, P.; Cook, D.P.; Bennett, C.F.; Carroll, S.S.; Ball, R.G.; Bosserman, M.; Burlein, C.; Colwell, L.F.; Fay, J.F.; Flores, O.A.; Getty, K.; LaFemina, R.L.; Leone, J.; MacCoss, M.; McMasters, D.R.; Tomassini, J.E.; Von Langen, D.; Wolanski, B.; Olsen, D.B. Structure-Activity Relationship of heterobase-modified 2'-C-methyl ribonucleosides as inhibitors of hepatitis C virus RNA replication. *J.Med.Chem.* **2004**, *47*, 5284-5297.

133 Carroll, S.S., Lafemina, R.L., Hall, Dawn L., Himmelberger, A.L., Kuo, L.C., Maccoss, M., Olsen, D.B., Rutkowski, C.A., Tomassini, J.E., An, H., Bhat, B., Bhat, N., Cook, P.D., Eldrup, A.B., Guinosso, C.J., Prhvac, M., Prakash, T.P. Preparation of nucleoside derivatives as inhibitors of RNA-dependent RNA viral polymerase. WO 20020057425, 2002.

134 Carroll, S.S., Maccoss, M., Olsen, D.B., Bhat, B., Bhat, N., Cook, P.D., Eldrup, A.B., Prakash, T.P., Prhvac, M., Song, Q. Preparation of nucleoside derivatives as inhibitors of RNA-dependent RNA viral polymerase. WO 20020057287, 2002.

135 Hernandez-Santiago, B.I.; Thierry Beltran, T.; , Lieven Stuyver, L.; Chung K. Chu, C.K.; Schinazi, R.F. Metabolism of the Anti-Hepatitis C Virus Nucleoside β -N4-Hydroxycytidine in Different Liver Cells *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 4636-4642.

136 Naka, K.; Ikeda, M.; Abe, K.; Dansako, H.; Kato, N. Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication : effect of a combination with interferon- α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330*, 871-879.

137 Shi, J.; Du, J.; Ma, T.; Pankiewicz, K.W.; Patterson, S.E.; Tharnish, P.M.; McBrayer, T.R.; Stuyver, L.J.; Otto, M.J.; Chu, C.K.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A. Synthesis and anti-viral activity of a series of D- and L-2'-deoxy-2'-fluororibonucleosides in the subgenomic HCV replicon system. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1641-1652.

138 Clark, J.L.; Hollecker, L.; Mason, J.C.; Stuyver, L.J.; Tharnish, P.M.; Lostia, S.; McBrayer, T.R.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A.; Otto, M.J.; Furman, P.A.; Stec, W.J.; Patterson, S.E.; Pankiewicz, K.W. Design, Synthesis, and Antiviral Activity of 2'-Deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine, a Potent Inhibitor of Hepatitis C Virus Replication. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5504-5508.

139 Saito, Y., Escuret, V.; Durantel, D., Zoulim, F., Schinazi, R.F., Agrofoglio, L.A. Synthesis of 1,2,3-triazolo-carbanucleoside analogues of ribavirin targeting an HCV in replicon. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3633-3639.

140 Holy, A. Phosphonmethoxyalkyl analogues of nucleotides. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2567-2592.

141 Koh, Y.-H.; Shim, J.H.; Wu, J.Z.; Zhong, W.; Hong, Z. Girardet, J.-L. Design, synthesis, and antiviral activity of adenosine 5'-phosphonate analogues as chain terminators against hepatitis C virus. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2867-2875.

142 Parang, K.; Wiebe, L.I.; Knaus, E.E. Novel approaches for designing 5'-O-ester prodrugs of 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (AZT). *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 995-1039.

143 Peyrottes, S.; Egron, D.; Lefebvre, I.; Gosselin, G.; Imbach, J.L.; Perigaud, C. SATE pronucleotide approaches: an overview. *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 395-408.

144 Périgaud, C.; Gosselin, G.; Lefebvre, I.; Girardet, J.L.; Benzaria, S.; Barber, I.; Imbach, J.L. Rational design for cytosolic delivery of nucleoside monophosphates : SATE and DTE as enzyme-labile transient phosphate protecting groups. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2521-2526.

- 145 (a) Pompon, A.; Lefebvre, I.; Imbach, J.L. Kahn, S.; Farquhar, D. Decomposition pathway of the mono- and bis(pivaloyloxymethyl) esters of azidothymidine 5'-monophosphate in cell extract and in tissue culture medium : an application of the "online ISRP-cleaning" HPLC technique. *Antivir. Chem. Chemother.* **1994**, *5*, 91-98. (b) Girardet, J.L.; Périgaud, C.; Aubertin, A.-M.; Gosselin, G.; Kirn, A.; Imbach, J.L. Increase of the anti-VIH activity of d4T in human T-cell culture by the use of the sate pronucleotide approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2981-2984. (c) Périgaud, C.; Aubertin, A.-M.; Benzaria, S.; Pelicano, H.; Girardet, J.L.; Kirn, A.; Gosselin, G.; Imbach, J.L. Equal inhibition of the replication of the human immunodeficiency virus in human T-cell culture by ddA bis(SATE)phosphotriester and 3'azido-2',3'-dideoxythymidine. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 11-14.
- 146 Prakash, T.P.; Prhac, M.; Eldrup, A.B.; Cook, P.D.; Carroll, S.S.; Olsen, D.B.; Stahlhut, M.W.; Tomassini, J.E.; MacCoss, M. Galloway, S.M.; Hilliard, C.; Bhat, B. Synthesis and evaluation of S-acyl-2-thioethyl esters of modified nucleoside 5'-monophosphates as inhibitors of hepatitis C virus RNA replication. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1199-1210.
- 147 Sako, M.; Saito, T.; Kameyama, K.; Hirota, K.; Maki, Y. A facile synthesis of 5'-O,6-Cyclo-5,5-dihalogeno-5,6-dihydropyrimidine nucleoside. *Synthesis* **1987**, 829-831.
- 148 Wang, P.; Hollecker, L.; Pankiewicz, K.W.; Patterson, S.E.; Whitaker, T.; McBrayer, T.R.; Tharnish, P.M.; Sidwell, R.W.; Stuyver, L.J.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A. Synthesis of N3,5'-Cyclo-4-(β -D-ribofuranosyl)-vic-triazolo[4,5-b]pyridin-5-one, a Novel Compound with Anti-Hepatitis C Virus Activity. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6100-6103.
- 149 Chung, B.-K.; Wang, P.; Hassan, A.; Du, J.; Tharnish, P.M.; Stuyver, L.J.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A. Synthesis of 5',9-anhydro-3- β -D-ribofuranosyl)xanthine, and 3,5'-anhydro-xanthosine as potential anti-hepatitis C virus agents. *Tet. Lett.* **2005**, *46*, 2825-2827.
- 150 (a) Dhanak, D.; Duffy, K.J.; Johnston, V.K.; Lin-Goerke, J.; Darcy, M.; Shaw, A.N.; Gu, B.; Silverman, C.; Gates, A.T.; Nonnemacher, M.R.; Earnshaw, D.L.; Casper, D.J.; Kaura, A.; Baker, A.; Greenwood, C.; Gutshall, L.L.; Maley, D.; DelVecchio, A.; Macarron, R.; Hofmann, G.A.; Alnoah, Z.; Cheng, H.-Y.; Chan, G.; Khandekar, S.; Keenan, R.M.; Sarisky, R.T. Identification and biological characterization of heterocyclic inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 38322-38327. (b) Chan, L.; Reddy, T. J.; Proulx, M.; Das, S. K.; Pereira, O.Z.; Wang, W.; Siddiqui, A.; Turcotte, N.; Drouin, A.; Yannopoulos, C.; Poisson, C.; Alaoui, H.M.A.; Bethell, R.; Hamel, M.; Bilimoria, D.; Nguyen-Ba, N.P.; L'Heureux, L. Identification of *N,N*-disubstituted phenylalanines as a novel class of inhibitors of hepatitis C NS5B polymerase. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1283-1285. (c) Wang, M.; Ng, K. K.; Cherney, M. M.; Chan, L.; Yannopoulos, C. G.; Bedard, J.; Morin, N.; Nguyen-Ba, N.; Alaoui-Ismaili, M.H.; Berhell, R.C.; James, M.N. Non-nucleoside analogue inhibitors bind to an allosteric site on HCV NS5B polymerase. Crystal structures and mechanism of inhibition. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9489-9495.
- 151 (a) Carroll, S. S.; Tomassini, J. E.; Bosserman, M.; Getty, K.; Stahlhut, M. W.; Eldrup, A.B.; Bhat, B.; Hall, D.; Simcoe, A.L.; LaFemina, R.; Rutkowski, C.A.; Wolanski, B.; Yang, Z.; Migliaccio, G.; De Francesco, R.; Kuo, L.C.; MacCoss, M.; Olsen, D.B. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by 2'-modified nucleoside analogs. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11979-11984. (b) Stuyver, L. J.; Whitaker, T.; McBrayer, T. R.; Hernandez-Santiago, B. I.; Lostia, S.; Tharnish, P.M.; Ramesh, M.; Chu, C.K.; Jordan, R.; Shi, J.; Rachakonda, S.; Watanabe, K.A.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F. Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 244-254. (c) Eldrup, A. B.; Allerson, C. R.; Bennett, C. F.; Bera, S.; Bhat, B.; Bhat, N.; Bosserman, M.R.; Brooks, J.; Burlein, C.; Carroll, S.S.; Cook, P.D.; Getty, K.L.; MacCoss, M.; McMasters, D.R.; Olsen, D.B.; Prakash, T.P.; Prhac, M.; Song, Q.; Tomassini, J.E.; Xia, J. Structure-activity relationship of purine ribonucleosides for inhibition of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2283-2295.
- 152 (a) Nguyen, T. T.; Gates, A. T.; Gutshall, L. L.; Johnston, V. K.; Gu, B.; Duffy, K.J.; Sarisky, R.T. Resistance profile of a hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase benzothiadiazine inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3525-3530. (b) Migliaccio, G.; Tomassini, J. E.; Carroll, S. S.; Tomei, L.; Altamura, S.; Bhat, B.; Bartholomew, L.; Bosserman, M.R.; Ceccacci, A.; Colwell, L.F.; Cortese, R.; De Francesco, R.; Eldrup, A.B.; Getty, K.L.; Hou, X.S.; LaFemina, R.L.; Ludmerer, S.W.; MacCoss, M.; McMasters, D.R.; Stahlhut, M.W.; Olsen, D.B.; Hazuda, D.J.; Flores, O.A. Characterization of resistance to non-obligate chain-terminating ribonucleoside analogs that inhibit hepatitis C virus replication in vitro. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 49164-49170. (c) Young, K. C.; Lindsay, K. L.; Lee, K. J.; Liu, W. C.; He, J. W.; Milstein, S.L.; Lai, M.M.C. Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology* **2003**, *38*, 869-878. (d) Sommadossi, J.-P.; La Colla, P. Methods and compositions for treating flaviviruses and pestiviruses. *Int. Pat. Appl. WO 200192282*, 2001.

- 153 Agrofoglio, L. A.; Joubert, N.; Escuret V.; Durantel, D.; Zoulim F. The use of hcv replicon system for evaluation of new nucleoside analogs. In "Framing the Knowledge of Viral Hepatitis", RF Schinazi Ed. **2005** sous presse.
- 154 De Clercq, E.; Descamps, J.; Verhelst, G.; Walker, R. T.; Jones, A. S.; Torrence, F.; Shugar, D. Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus. *J. Infect. Dis.* **1980**, *141*, 563-574.
- 155 De Clercq, E. Biochemical aspects of the selective antiherpes activity of nucleoside analogues. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 2159-2169.
- 156 Goodchild, J.; Porter, R. A.; Raper, R. H.; Sim, I. S.; Upton, R. M.; Viney, J.; Wadsworth, H. J. Structural requirements of olefinic 5-substituted deoxyuridines for antiherpes activity. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1252-1257.
- 157 Guo, J. T.; Bichko, V. V.; Seeger, C. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J. Virol.* **2001**, *75*, 8516-8523.
- 158 Campagne, J.-M.; Prim, D. *Les complexes de palladium en synthèse organique*. Edition CNRS, **2001**.
- 159 Chodkiewicz, W.; Cadiot, P. New synthesis of symmetrical and asymmetrical conjugated polyacetylenes. *C.R. Hebd. Seances. Acad. Sci.* **1955**, *241*, 1055-1057.
- 160 Siemsen, P.; Livingston, R.C.; Diedrich, F. Acetylenic coupling: a powerful tool in molecular construction. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 2632-2657.
- 161 Castro, C.E.; Stephens, R.D. Substitutions by ligands of low valent transition metals. A preparation of tolanes and heterocyclics from aryl iodides and cuprous acetylides. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2163-2163.
- 162 Stephens, R.D.; Castro, C.E. The substitution of aryl iodides with cuprous acetylides. A synthesis of tolanes and heterocyclics. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3313-3315.
- 163 Casalnuovo, A.L.; Calabrese, J.C. Palladium-catalyzed alkylations in aqueous media. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4324-4330.
- 164 Amatore, C.; Blart, E.; Genêt, J.-P.; Jutand, A.; Lemaire-Audoire, S.; Savignac, M. New synthetic applications of water-soluble acetate Pd/TPPTS catalyst generated in Situ. evidence for a true Pd(0) species intermediate. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6829-6839.
- 165 Revue: Agrofoglio, L. A.; Gillaizeau, I.; Saito, Y. Palladium-Assisted Routes to Nucleosides. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1875-1916.
- 166 Tanaka, H.; Baba, M.; Hayakawa, H.; Sakamaki, T.; Miyasaka, T.; Ubasawa, M.; Takashima, H.; Sekiya, K.; Nitta, I.; Shigeta, S.; Walker, R. T.; Balzarini, J.; De Clercq, E. A new class of VIH-1 specific 6-substituted acycloauridine derivatives: synthesis and anti-VIH-1 activity of 5- or 6-substituted analogs of 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT). *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 349-357.
- 167 De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P.; Barr, P. J.; Jones, A. S.; Walker, R. T. (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, *76*, 2947-2951.
- 168 Crisp, G.; Flynn, B. L. Palladium-catalyzed coupling of terminal alkynes with 5-(trifluoromethane sulfonyloxy)pyrimidine nucleosides *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6614-6619.
- 169 McGuigan, C.; Yarnold, C. J.; Jones, G.; Velasquez, S.; Barucki, H.; Brancale, A.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E. Potent and selective inhibition of varicella-zoster virus (VZV) by nucleoside analogues with an unusual bicyclic base. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4479-4484.
- 170 Robins, M. J.; Barr, P. J. Nucleic acid related compounds. Efficient conversion of 5-iodo to 5-alkynyl and derived 5-substituted uracil bases and nucleoside. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1854-1862.
- 171 Aucagne, V.; Amblard, F.; Agrofoglio, L.A. Highly Efficient AgNO₃-Catalyzed Preparation of Substituted Furanopyrimidine Nucleosides. *Synlett* **2004**, 2406-2408.
- 172 Hocek, M.; Votruba, I. Covalent analogues of DNA base-pairs and triplets. Part 2: Synthesis and cytostatic activity of Bis(purin-6-yl)acetylenes, -diacetylenes and related compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1055-1058.
- 173 Revue: Muller, C.E. Adenosine receptor ligands-recent developments part I. Agonists. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1269-1288.
- 174 (a) Jacobs, T.L.; Searles, S. Acetylenic Ethers. IV.1 Hydration. *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 686-689. (b) Drenth, W.; Hogeveen, H. Mechanism of reactions of unsaturated ethers and thio ethers. I. Acid catalyzed

- addition of water to acetylenic thio ethers. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1960**, *59*, 1002-1011. (c) Stamhuis, E.J. Drenth, W. Mechanism of reactions of unsaturated ethers and thio-ethers. III. Acid-catalyzed addition of water to ethynyl ethers. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1961**, *66*, 797-809. (d) Hogeveen, H.; Drenth, W. Mechanism of reactions of unsaturated ethers and thioethers. VII. Linear free energy relationships and inverse secondary deuterium isotope effect in the addition of water to 1-alkynyl thioethers. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1963**, *82*, 375-384. (e) Stamhuis, E.J. Drenth, W. Mechanism of reactions of unsaturated ethers and thioethers. IX. Acidcatalyzed alkyl-oxygen fission of alkyl ethynyl ethers. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1963**, *82*, 394-404. (f) Bott, R.W.; Eaborn, C.; Walton, D.R.M. Substituent effects in the acid-catalyzed hydration of phenylacetylenes. *J. Chem. Soc.* **1965**, 384-388. (g) Noyce, D.S.; Schiavelli, M.D. Acid-catalyzed hydration of phenylacetylene. Evidence for the vinyl cation intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1020-1022. (h) Noyce, D.S.; Schiavelli, M.D. Isotope effects in the acid-catalyzed hydration of phenylacetylene. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1023-1026.
- 175 Marcuzzi J.; Meloni, G. Electrophilic additions to acetylenes. V. Stereochemistry of the electrophilic addition of alkyl halides and hydrogen halides to phenyl-substituted acetylenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *98*, 3295-3300.
- 176 Schmid, G.H.; Garratt, D.G.; in *The Chemistry of doubly-bonded functional groups*; Patai, S., Ed.; Wiley: New York, 1977; Part 2, pp 799-801.
- 177 (a) McClelland, C.W. in *Synthetic reagents*; Pizey, J.S., Ed.; Wiley: New York, 1983; Vol. 5, pp 85-164. (b) Schmid, G.H.; Garratt, D.G.; in *The Chemistry of doubly-bonded functional groups*; Patai, S., Ed.; Wiley: New York, 1977; Part 2, pp 796-799.
- 178 Ingold, C.K.; Smith, H.G. Mode of addition to conjugated unsaturated systems. VI. Addition of halogens and hydrogen halides to conjugated unsaturated carboxylic acids and esters. *J. Chem. Soc.* **1931**, 79-86.
- 179 Bellina, F.; Colzi, F.; Mannina, L.; Rossi, R.; Viel, S. Reaction of alkynes with iodine monochloride revisited. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 10175-10177.
- 180 Stothers, J.B. *Carbon-13 NMR Spectroscopy*; Academic Press: New York, 1972; pp 71 et 184.
- 181 Uemura, S.; Okasaki, H.; Onoe, A.; Okano, M. Chlorination and chloriodination of acetylenes with copper(II) chloride. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 676-680.
- 182 Heasley, V.L.; Buczala, D.M.; Chappell, A.E.; Hill, D.J.; Whisenand, J.M.; Shellhamer, D.F. Addition of Bromine Chloride and Iodine Monochloride to Carbonyl-Conjugated, Acetylenic Ketones: Synthesis and Mechanisms. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2183-2187.
- 183 Pour chaque produit, de nombreuses expériences de RMN 1H et 13C ont été pratiquées, et l'attribution de la stéréochimie unique (*E*) a pu être faite sans équivoque par l'utilisation combinée de plusieurs expériences de RMN à deux dimensions, incluant 1H-1H COSY, 1H-13C COSY, et 1H-13C HMBC (corrélation hétéronucléaire à longue distance).
- 184 Friebolin, H. *Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy*; VHC Publisher: New York, 1991; p 56.
- 185 Robins, M.J.; Barr, P.J.; Giziewicz, J. Nucleic acid related compounds. 38. Smooth and high-yield iodination and chlorination at C-5 of uracil bases and p-tolyl-protected nucleosides. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 554-557
- 186 Lin, T. S.; Chen, M.S.; McLaren, C.; Gao, Y.S.; Ghazzouli, I.; Prusoff, W.H. Synthesis and antiviral activity of various 3'-azido, 3'-amino, 2',3'-unsaturated, and 2',3'-dideoxy analogs of pyrimidine deoxyribonucleosides against retroviruses. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 440-444.
- 187 Beres, J.; Bentrude, W.G.; Kalman, A.; Parkanyi, L.; Balzarini, J.; De Clercq, E. Synthesis, structure, and antitumor and antiviral activities of a series of 5-halouridine cyclic 3',5'-monophosphates. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 488-493.
- 188 Classon, B.; Samuelsson, B. Synthesis of 5-iodo-1-(sodium 2-deoxy- β -D-ribofuranosyluronate)uracil and 5-iodo-1-(sodium β -D-ribofuranosyluronate)uracil. *Acta Chemica Scandinavica, Series B: Organic Chemistry and Biochemistry* **1985**, *B39*, 501-504.
- 189 (a) Asakura, J.; Robins, M.J. Cerium(IV) catalyzed iodination at C5 of uracil nucleosides. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2855-2858. (b) Asakura, J.-I.; Robins, M. J. Cerium(IV)-mediated halogenation at C-5 of uracil derivatives. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4928-4933.
- 190 (a) Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. Convenient synthesis of acetylenes. Catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromo alkenes, iodo arenes, and bromopyridines. *Tetrahedron Lett* **1975**, *16*, 4467-4470. (b) Sonogashira, K. *Comprehensive Organic Synthesis*; Pergamon Press: New York, 1991; pp 521. (c)

- Ratovelomana, V.; Linstrumelle, G. New synthesis of the sex pheromone of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Synth. Commun.* **1981**, *11*, 917-923. (d) Takahashi, S.; Kuroyama, Y.; Sonogashira, K.; Hagihara, N. A convenient synthesis of ethynylarenes and diethynylarenes. *Synthesis* **1980**, 627-630.
- 191 Bleackley, R. C.; Jones, A. S.; Walker, R. T. Incorporation of 5-substituted uracil derivatives into nucleic acids - III : Synthesis of 5-substituted uracils derived from 5-acetyluracil. *Tetrahedron* **1976**, *32*, 2795-2797.
- 192 Eger, K.; Jalalian, M.; Schmidt, M. Synthesis of a potential antiviral compound: 5-bromoethynyl-2'-deoxyuridine. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *50*, 8371-8380.
- 193 Stuyver, L. J.; Lostia, S.; Adams, M.; Mathew, J. S.; Pai, B. S.; Grier, J.; Tharnish, P.M.; Choi, Y.; Chong, Y.; Choo, H.; Chu, C.K.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F. Antiviral activities and cellular toxicities of modified 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrocytidine analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3854-3860.
- 194 Stuyver, L. J.; McBrayer, T. R.; Tharnish, P. M.; Hassan, A. E. A.; Chu, C. K.; Pankiewicz, K. W.; Watanabe, K. A.; Schinazi, R. F.; Otto, M. J. Dynamics of subgenomic hepatitis C virus replicon RNA levels in Huh-7 cells after exposure to nucleoside antimetabolites. *J. Virol.* **2003**, *77*, 10689-10694.
- 195 Traut, T. W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell. Biochem.* **1994**, *140*, 1-22.
- 196 Dans les cellules saines, la concentration de CTP est la plus faible des concentrations de NTPs, donc la plus facile à atteindre ou à concurrencer pour un analogue de nucléoside à visée antivirale.
- 197 Stuyver, L. J.; Whitaker, T.; McBrayer, T. R.; Hernandez-Santiago, B. I.; Lostia, S. Tharnish, P.M.; Ramesh, M.; Chu, C.K.; Jordan, R.; Shi, J.; Rachakonda, S.; Watanabe, K.A.; Otto, M.J.; Schinazi, R.F. Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhoea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 244-254.
- 198 Hollecker, L.; Choo, H.; Chong, Y.; Chu, C. K.; Lostia, S.; McBrayer, T.R.; Stuyver, L.J.; Mason, J.C.; Du, J.; Rachakonda, S.; Shi, J.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A. Synthesis of beta-enantiomers of *N4*-hydroxy-3'-deoxypyrimidine nucleosides and their evaluation against bovine viral diarrhoea virus and hepatitis C virus in cell culture. *Antivir. Chem. Chemother.* **2004**, *15*, 43-55.
- 199 Stuyver, L. J.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Tharnish, P. M.; Ramesh, M. Lostia, S.; Cartee, L.; Shi, J.; Hobbs, A.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A.; Otto, M.J. Inhibition of the subgenomic hepatitis C virus replicon in huh-7 cells by 2'-deoxy-2'-fluorocytidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 651-654.
- 200 Pietschmann, T.; Lohmann, V.; Rutter, G.; Kurpanek, K.; Bartenschlager, R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J. Virol.* **2001**, *75*, 1252-1264.
- 201 Stuyver, L. J.; McBrayer, T. R.; Tharnish, P. M.; Hassan, A. E. A.; Chu, C. K.; Pankiewicz, K. W.; Watanabe, K. A.; Schinazi, R. F.; Otto, M. J. Dynamics of subgenomic hepatitis C virus replicon RNA levels in Huh-7 cells after exposure to nucleoside antimetabolites. *J. Virol.* **2003**, *77*, 10689-10694.
- 202 Gallois-Montbrun, S.; Chen, Y.; Dutartre, H.; Sophys, M.; Morera, S.; Guerreiro, C.; Schneider, B.; Mulard, L.; Janin, J.; Veron, M.; Deville-Bonne, D.; Canard, B. Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by NDP kinase: comparison with other ribavirin targets. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 538-546.
- 203 Revues: (a) Pankiewicz, K.W. Fluorinated nucleosides. *Carbohydr. Res.* **2000**, *327*, 87-105. (b) Tsuchiya, T. Chemistry and developments of fluorinated carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*, 91-277.
- 204 (a) Owen, G.R.; Verheyden, J.P.; Moffatt, J.G. 4'-substituted nucleosides. 3. Synthesis of some 4'-fluorouridine derivatives. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3010-3017. (b) Marquez, V.E.; Tseng, C.K.; Mitsuya, H.; Aoki, S.; Kelley, J.A.; Ford, H. Jr; Roth, J.S.; Broder, S.; Johns, D.G.; Driscoll, J.S. Acid-stable 2'-fluoro purine dideoxynucleosides as active agents against HIV. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 978-985. (c) Balakrishna Pai, S.; Liu, S.H.; Zhu, Y.L.; Chu, C.K.; Cheng, Y.C. Inhibition of hepatitis B virus by a novel L-nucleoside, 2'-fluoro-5-methyl-beta-L-arabinofuranosyl uracil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 380-386. (d) Chun, B.K.; Schinazi, R.F.; Cheng, Y.C.; Chu, C.K. Synthesis of 2',3'-dideoxy-3'-fluoro-L-ribonucleosides as potential antiviral agents from D-sorbitol. *Carbohydr. Res.* **2000**, *328*, 49-59.
- 205 Schinazi, R.F.; Mellors, J.; Bazmi, H.; Diamond, S.; Garber, S.; Gallagher, K.; Geleziunas, R.; Klabe, R.; Pierce, M.; Rayner, M.; Wu, J.T.; Zhang, H.; Hammond, J.; Bacheler, L.; Manion, D.J.; Otto, M.J.; Stuyver, L.; Trainor, G.; Liotta, D.C., Erickson-Viitanen S. DPC 817: a cytidine nucleoside analog with activity against zidovudine- and lamivudine-resistant viral variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1394-1401.
- 206 Lin, T.-S.; Luo, M.Z.; Liu, M.C.; Zhu, Y.L.; Gullen, E.; Dutschman, G.E.; Cheng, Y.C. Design and synthesis of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-beta-L-cytidine (beta-L-d4C) and 2',3'-dideoxy 2',3'-didehydro-beta-L-

- 5-fluorocytidine (beta-L-Fd4C), two exceptionally potent inhibitors of human hepatitis B virus (HBV) and potent inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1757-1759.
- 207 Etzold, G.; Hintsche, R.; Kowollik, G. Langen, P. Nucleoside von Fluorzucker-VI. Synthese und Reaktivitaet von 3-Fluor-und 3-Chlor-3-Desoxythymidin. *Tetrahedron* **1971**, *27*, 2463-2472.
- 208 Ajmera, S.; Bapat, A.R.; Danenberg, K.; Danenberg, P.V. Synthesis and biological activity of 5-fluoro-2',3'-dideoxy-3'-fluorouridine and its 5'-phosphate. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 11-14.
- 209 Zhang, N.; Chen, H.-M.; Koch, V.; Schmitz, H.; Liao, C.-L.; Bretner, M.; Bhadti, V.S.; Fattom, A.I.; Naso, R.B.; Hosmane, R.S.; Borowski, P. Ring-expanded ("Fat") nucleoside and nucleotide analogues exhibit potent in vitro activity against *Flaviviridae* NTPases/helicases, including those of the west Nile virus, hepatitis C virus and Japanese encephalitis virus. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4149-4164.
- 210 (a) Richman, D.D. Resistance of clinical isolates of human immunodeficiency virus to antiretroviral agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 1207-1213. (b) Schinazi, R.F. Competitive inhibitors of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Persp. Drug. Des.* **1993**, *1*, 151. (c) De Clercq, E. HIV resistance to reverse transcriptase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 155-169. (d) Tisdale, M.; Alnadaf, T.; Coursens, D. Combination of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase required for resistance to the carbocyclic nucleoside 1592U89. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1094-1098. (e) Tantillo, C.; Ding, J.; Jacobo-Molina, A.; Nanni, R.G.; Boyer, P.L.; Hughs, S.H. Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase: implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J. Mol. Biol.* **1994**, *243*, 369-387.
- 211 Furman, P.A.; Fyfe, J.A.; St. Clair, M.H.; Weinhold, K.; Rideout, J.L.; Freeman, G.A.; Lehrman, S.N.; Bolognesi, D.P.; Broder, S.; Mitsuya, H. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 8333-8337.
- 212 Lin, T.S.; Schinazi, R.F.; Prusoff, W.H. Potent and selective in vitro activity of 3'-deoxythymidin-2'-ene (3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine) against human immunodeficiency virus. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 2713-2718.
- 213 Yarchoan, R.; Perno, C.F.; Thomas, R.V.; Klecker, R.W.; Allain, J.P.; Wills, R.J.; McAtee, N.; Fischl, M.A.; Dubinsky, R.; McNeely, M.C. Phase I studies of 2',3'-dideoxycytidine in severe human immunodeficiency virus infection as a single agent and alternating with zidovudine (AZT). *Lancet* **1988**, *1*, 76-80.
- 214 Kong, X.B.; Zhu, Q.Y.; Vidal, P.M.; Watanabe, K.A.; Polsky, B.; Armstrong, D.; Ostrander, M.; Lang, S.A. Jr.; Muchmore, E.; Chou, T.C. Comparisons of anti-human immunodeficiency virus activities, cellular transport, and plasma and intracellular pharmacokinetics of 3'-fluor-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 808-818.
- 215 Lin, T.S.; Mancini, W.R. Synthesis and antineoplastic activity of 3'-azido and 3'-amino analogues of pyrimidine deoxyribonucleoside. *J. Med. Chem.* **1983**, 544-548.
- 216 Barton, D.H.R.; McCombie, S.W. A new method for the deoxygenation of secondary alcohols. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **1975**, 1574-1585.
- 217 Haragushi, K.; Tanaka, H.; Maeda, H.; Itoh, Y.; Saito, S.; Miyusaka, T. Selenoxide elimination for the synthesis of unsaturated-sugar uracil nucleosides. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5401-5408.
- 218 (a) Middleton, W. New fluorinating reagents. Dialkylaminosulfur fluorides. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 574-578. (b) Markovskij, L.N.; Pashinnik, V.E.; Kirsanov, A.V. Application of Dialkylaminosulfur Trifluorides in the Synthesis of Fluoroorganic Compounds. *Synthesis* **1973**, 787-789.
- 219 (a) Ikehara, M.; Kaneyasu, T.; Matsugi, J.; Uesugi, S. Uesugi, Seiichi; Kaneyasu, Toshinori; Matsugi, Jitsuhiro; Ikehara, Morio. Improved synthesis of 2'-fluoro-2'-deoxyadenosine and synthesis and carbon-13 NMR spectrum of its 3',5'-cyclic phosphate derivative. *Nucleosides Nucleotides* **1983**, *2*, 373-385. (b) Fox, J.J.; Schinazi, R.F.; Su, T.-L.; Watanabe, K. Nucleosides. 136. Synthesis and antiviral effects of several 1-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)-5-alkyluracils. Some structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 151-154. (d) Benigni, D.; Brodfuehrer, P.; Brundidge, S.; Howell, H.; Sapino, C. Antiviral nucleosides. A stereospecific, total synthesis of 2'-fluoro-2'-deoxy-.beta.-D-arabinofuranosyl nucleosides. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 85-88.
- 220 Agyei-Aye, K.; Yan, S.; Hebbler, A.K.; Baber, D.C. Preparation of 2,3'-anhydropyrimidine nucleosides using diethylaminosulfur trifluoride (DAST). *Nucleosides Nucleotides* **1989**, *8*, 327-337.

- 221 Cox, D.P.; Terpinski, J.; Lawrynowicz, W. "Anhydrous" tetrabutylammonium fluoride: A mild but highly efficient source of nucleophilic fluorine ion. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3216-3219.
- 222 Hrebabecky, H.; Holy, A.; De Clercq, E. Synthesis of 3'-azido-2',3'-dideoxy-6-methyluridine, 2',3'-dideoxy-6-methyluridine and 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-6-methyluridine. *Collectz. Czech. Chem. Comm.* **1990**, *55*, 1801-1811.
- 223 Kvrno, L.; Wightman, R.H.; Wengel, J. Synthesis of a novel bicyclic nucleoside restricted to an S-type conformation and initial evaluation of its hybridization properties when incorporated into oligodeoxynucleotides. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5106-5112
- 224 Huang, J.-T.; Chen, L.-C.; Wang, L.; Kim, M.-H.; Warshaw, J.A.; Armstrong, D.; Zhu, Q.-Y.; Chou, T.C.; Watanabe, K.A.; Matulic-Adamic, J.; Su, T.-L.; Fox, J.J.; Polsky, B.; Baron, A.B.; Gold, J.W.M.; Hardy, W.D.; Zuckerman, E. Fluorinated sugar analogues of potential anti-HIV-1 nucleosides. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1640-1646.
- 225 Lin, T.-S.; Mancini, W.R. Synthesis and antineoplastic activity of 3'-azido and 3'-amino analogues of pyrimidine deoxyribonucleoside. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 544-548.
- 226 (a) Matulic-Adamic, J.; Takahashi, K.; Chou, T.C.; Gadler, H.; Price, R.W.; Venugopala Reddy, A.R.; Kalman, T.I.; Watanabe, K.A. Nucleosides. 150. Synthesis and some biological properties of 5-monofluoromethyl, 5-difluoromethyl, and 5-trifluoromethyl derivatives of 2'-deoxyuridine and 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyluracil. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1642-1647. (b) von Janta-Lipinski, M.; Costisella, B.; Ochs, H.; Hübscher, U.; Hafkemeyer, P.; Matthes, E. Newly synthesized L-enantiomers of 3'-fluoro-modified β -2'-deoxyribonucleoside 5'-triphosphates inhibit hepatitis B DNA polymerases but not the five cellular DNA polymerases α , β , γ , δ , and ϵ nor HIV-1 reverse transcriptase. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2040-2046.
- 227 Matsuda, A.; Watanabe, K.A.; Fox, J.J. Nucleosides. 115. Reaction of 3'-O-Mesylylthymidine. Formation of 1-(3-azido-2,3-dideoxy- β -D-threo-pentofuranosyl)thymidine and its conversion into 6,3'-imino-1-(2,3-dideoxy- β -D-threo-pentofuranosyl)thymidine. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3274-3278.
- 228 Sekine, M.; Hata, T. 3-(Imidazol-1-ylmethyl)-4',4"-dimethoxytrityl: a new functionalized 5'-hydroxyl protecting group capable of rapid internucleotidic bond formation in the phosphorothio ester approach. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 946-948.
- 229 Smith, M.; Rammler, D.H.; Goldberg, I.H.; Khorana, H.G. Polynucleotides. XIV. Specific synthesis of the C3'-C5' internucleotide linkage. Synthesis of uridylyl(3' \rightarrow 5')-uridine and uridylyl-(3' \rightarrow 5')-adenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430-440.
- 230 Benhida, R.; Blanchard, P.; Fourrey, J.-L. A mild and effective iodination method using iodine in the presence of Bis-(trifluoroacetoxy)iodobenzene. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6849-6852.
- 231 Crimmins, M.T. New development in the enantioselective synthesis of cyclopentyl carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9229-9272.
- 232 (a) Zhu, X. The latest progress in the synthesis of carbocyclic nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acid* **2000**, *19*, 651-690. (b) Agrofoglio, L. A.; Suhas, E.; Farese, A.; Condom, R.; Challand, S. R.; Earl, R. A.; Guedj, R. Synthesis of carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10611-10670. (c) Borthwick, A.D.; Biggadike, K.; Synthesis of chiral carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 571-623. (d) Ferrero, E.; Gotor, V.; Biocatalytic selective modifications of conventional nucleosides, carbocyclic nucleosides, and C-nucleosides. *Chem. Rev.* **2000**, *1000*, 4319-4347
- 233 Marquez, V.V.; Lim, L.-I. Carbocyclic nucleosides. *Med. Res. Rev.* **1986**, 6-40.
- 234 Agrofoglio, L.A.; Challand, S.R. in *Acyclic, Carbocyclic and L-Nucleosides*; Kluwer Academic: Dordrecht, 1998; p 174.
- 235 Chu, C.K.; Jin, Y.H.; Baker, R.O.; Huggins, J. Antiviral activity of cyclopentenyl nucleosides against orthopox viruses (Smallpox, monkeypox and cowpox). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 9-12.
- 236 Song, G.Y.; Paul, V.; Choo, H.; Morrey, J.; Sidwell, R.W.; Schinazi, R.F.; Chu, C.K. Enantiomeric synthesis of D- and L-cyclopentenyl nucleosides and their antiviral activities against HIV and West Nile virus. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3958-3993.
- 237 Saito, Y.; Escuret, V.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Schinazi, R. F.; Agrofoglio, L. A. Synthesis of 1,2,3-Triazolo-carbanucleoside Analogues of Ribavirin Targeting an HCV in Replicon. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3633-3639.

- 238 Fan, W.-Q.; Katritzky, A. R. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, Vol. 4; Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Scriven, C. W. V., Eds.; Elsevier Science: Oxford, **1996**, 1-126.
- 239 (a) Velaquez, S.; Alvarez, R.; Perez, C.; Gago, F.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M.-J. Regiospecific synthesis and anti-human immunodeficiency virus activity of novel 5-substituted N-alkylcarbamoyl and N,N-dialkyl carbamoyl 1,2,3-triazole-TSAO analogs. *Antivir. Chem. Chemother.* **1998**, *9*, 481-489. (b) Yokoyama, M.; Nakao, E.; Sujino, K.; Watanabe, S.; Togo, H. Synthesis and antiviral activity of 1,2,3-triazole and 8-azapurine derivatives bearing acyclic sugars. *Heterocycles* **1990**, *31*, 1669-1685.
- 240 Revues sur les 1,2,3-triazoles: (a) Dehne, H. In *Methoden der Organischen Chemie*; Schumann, E., Ed.; Thieme: Stuttgart, 1994, Vol. 8, p 305 (b) Wamho., H. in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Katritzky, A. R.; Rees, C. W., Eds.; Pergamon: Oxford, 1984; Vol. 5, p 669. (c) Abu-Orabi, S. T.; Atfah, M. A.; Jibril, I.; Mari'I, F. M.; Ali, A. A.-S. Dipolar cycloaddition reactions of organic azides with some acetylenic compounds. *J. Heterocyclic Chem.* **1989**, *26*, 1461.
- 241 Chen, M.D.; Lu, S.J.; Yuag, G.P.; Yang, S.Y.; Du, X.L. *Heterocyclic Comm.* **2000**, *6*, 421-426.
- 242 S. Manfredini, S.; Vicentini, C.B.; Manfrini, M.; Bianchi, N.; Rutigliano, C.; C. Mischiati, C.; Gambari, R. Pyrazolo-triazoles as light activable DNA cleaving agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2343-2346.
- 243 (a) Alvarez, R.; Velazquez, S.; San-Felix, A.; Aquaro, S.; De Clercq, E. D.; Perno, C. F.; Karlsson, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. 1,2,3-Triazole-[2',5'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole 2'',2''-dioxide) (TSAO) analogues: synthesis and anti-HIV-1 activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4185-4194. (b) San-Felix, A.; Alvarez, R.; Velazquez, S.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. Synthesis and anti-HIV-1 activity of 4- and 5-substituted 1,2,3-triazole-TSAO derivatives. *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 595-598.
- 244 (a) Alonso, R.; Camarasa, M. J.; Alonso, G.; De las Heras, F. G. Alkylating nucleosides. 5. Synthesis and cytostatic activity of N-ribosyl-halomethyl-1,2,3 triazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **1980**, *15*, 105-109. (b) De la Heras, F.; Alonso, R.; Alonso, G.; Contreras, A.; Sanchez, R. Alkylating nucleosides 1. Synthesis and cytostatic activity of N-glycosyl(halomethyl)-1,2,3-triazoles. A new type of alkylating agent. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 496-501.
- 245 Kagitani, T.; Minagawa, M.; Nakahara, Y.; Kimura, R.; Tsubakimoto, T.; Oshiumi, R.; Sakano, K. 4-Nitro-1,2,3-triazole derivatives as radiosensitizers. JP 198762039525, 1987.
- 246 Spurlock, L.; Fayter, R. Nature of the carbonium ion. IX. 2-Oxa-6-norbornyl cation. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 2707-2711.
- 247 Feeya, D. Synthesis and solvolysis of syn- and anti-(6-oxabicyclo[3.1.0]hex-3-yl)methyl p-bromobenzenesulfonates. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3512-3519.
- 248 Hutchinson, A.; Grim, M.; Chen, J. A short and stereoselective synthesis of (\pm)-aristeromycin. *J. Heterocyclic Chem.* **1989**, *26*, 451-452.
- 249 Depres, J.-P.; Greene, A. Improved selectivity in the preparation of some 1,1-difunctionalized 3-cyclopentenes. High yield synthesis of 3-cyclopentenecarboxylic acid. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 928-931.
- 250 Carruthers, W in *Cycloaddition Reactions in Organic Chemistry*; Pergamon: Oxford, **1990**, pp.269.
- 251 Gothelf, K. V.; Jorgensen, K. A. Asymmetric 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 863-909.
- 252 Sanghvi, Y. S.; Bhattacharya, B. K.; Kini, G. D.; Matsumoto, S. S.; Larson, S. B.; Jolley, W. B.; Robins, R.K.; Revankar, G.R. Growth inhibition and induction of cellular differentiation of human myeloid leukemia cells in culture by carbamoyl congeners of ribavirin. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 336-344.
- 253 Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128-1137.
- 254 (a) Peto, C.; Batta, G.; Gyorgydeak, Z.; Sztaricskai, F. Glycoside synthesis with anomeric 1-N-glycobiosyl-1,2,3-triazoles. *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*, 465-483. (b) Kume, M.; Kubota, T.; Kimura, Y.; Nakashimizu, H.; Motokawa, K.; Nakano, M. Orally active cephalosporins. II. Synthesis and structure-activity relationships of new 7 beta-[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-hydroxyiminoacetamido]-cephalosporins with 1,2,3-triazole in C-3 side chain. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 177-192. (c) Moltzen, E. K.; Pedersen, H.; Bogeso, K. P.; Meier, E.; Frederiksen, K.; Sanchez, C.; Lembol, H. L. Bioisosteres of arecoline: 1,2,3,6-tetrahydro-5-pyridyl-substituted and 3-piperidyl-substituted derivatives of tetrazoles and 1,2,3-triazoles. Synthesis and muscarinic activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4085-4099. (d) Norris, P.; Horton, D.; Levine, B. R. Cycloaddition of acetylenes with 5-

- azido-5-deoxy-D-aldopentose derivatives: synthesis of triazole reversed nucleoside analogs. *Heterocycles* **1996**, *43*, 2643-2656.
- 255 Bigge, C.F.; Bridges, A.J.; Casimiro-Garcia, A.; Fakhoury, S.A.; Lee, H.T.; Reed, J. E.; Schaum, R.P.; Schlosser, K.M.; Sexton, K.E.; Zhou, H. Preparation of azoles as oral antidiabetic agents. WO 2003018553, 2003.
- 256 Thompson, C.M.; Hergenrother, P.M. Aryl Ethynyl Terminated Imide Oligomers and Their Cured Polymers. *Macromolecules* **2002**, *35*, 5835-5839.
- 257 Scriven, E. F. V.; Turnbull, K. Azides: their preparation and synthetic uses. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 297-368.
- 258 (a) Huisgen, R. 1, 3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1963**, *75*, 742. (b) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions – Introduction, Survey, Mechanism. In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*. Padwa, A, Ed.; Wiley: New York, 1984, pp.1-176.
- 259 Huisgen, R. 1,3-Dipolar cycloadditions. *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604-637.
- 260 (a) Benson, F. R.; Savell, W. L. The chemistry of the vicinal triazoles. *Chem. Rev.* **1950**, 1-68. (b) Boyer, J. H. In *Heterocyclic Compounds*; Elderfield, R. C., Ed.; Wiley: New York, 1961; Vol. 7, Chapter 5, pp 384. (c) Lwowski, W. In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*; Padwa, A., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1984; Vol. 1, pp 559.
- 261 (a) Tamura, Y.; Chun, M. W.; Kwon, S.; Bayomi, S. M.; Okada, T.; Ikeda, M. Reaction of benzo[b]furan and 1-acylindoles with iodine azide. *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, *26*, 3515-3520. (b) Abu-Orabi, S. T.; Atfah, M. A.; Jibril, I.; Mari'i, F. M.; Ali, A. A.-S. Dipolar cycloaddition reactions of organic azides with some acetylenic compounds. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, *26*, 1461-1468. (c) Lalezari, I.; Gomez, L. A.; Khorshidi, M. Synthesis of 1-aryl-1,2,3-triazole-4,5-dimethanol-4,5-bis(isopropylcarbamates) as potential antineoplastic agents. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 687-689. (d) Gouault, N.; Cupif, J.-F.; Sauleau, A.; David, M. γ -Methyl-substituted- γ -butyrolactones: solid-phase synthesis employing a cyclisation–cleavage strategy. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7293-7297.
- 262 (a) Banert, K. Reactions of unsaturated azides. 5. Cycloaddition reactions of 2,3-diazido-1,3-butadienes. *Chem. Ber.* **1989**, *122*, 123-128. (b) Wigerinck, P.; Aerschot, A. V.; Claes, P.; Balzarini, J.; Clercq, E. D.; Herdewijn, P. 3'-(1,2,3-Triazol-1-yl)-2',3'-dideoxythymidine and 3'-(1,2,3-triazol-1-yl)-2',3'-dideoxyuridine. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, *26*, 1635-1645. (c) Häbich, D.; Barth, W. Synthesis of 3'-(1,2,3-triazol-1-yl)-3'-deoxythymidines. *Heterocycles* **1989**, *29*, 2083-2088. (d) Palacios, F.; Ochoa de Retana, A. M.; Pagalday, J. Synthesis of diethyl 1,2,3-triazolealkylphosphonates through 1,3-dipolar cycloaddition of azides with acetylenes. *Heterocycles* **1994**, *38*, 95-102.
- 263 Mearman, R. C.; Newall, C. E.; Tonge, A. P. Structure-activity relationships in 1,2,3-triazol-1-yl derivatives of clavulanic acid. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 885-891.
- 264 Makabe, O.; Suzuki, H.; Umezawa, S. Syntheses of D-arabinofuranosyl and 2'-deoxy-D-ribofuranosyl 1,2,3-triazolecarboxamides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 2689-2693.
- 265 Crow, W. D.; Leonard, N. J. A synthesis of 3-isothiazolones. *Tetrahedron Lett.* **1964**, 1477-1480.
- 266 Crow, W. D.; Leonard, N. J. 3-Isothiazolone-cis-3-Thiocyanoacrylamide Equilibria. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2660-2665.
- 267 Dornow, A.; Gelberg, J. Syntheses of nitrogen-containing heterocycles. XXIV. Preparation and ortho-condensation of some 4,5-disubstituted 1,2,3-triazoles. *Chem. Ber.* **1960**, *63*, 2001-2010.
- 268 (a) Biagi, G.; Giorgi, I.; Livi, I.; Scartoni, V.; Velo, S. 1,2,3-Triazolodiazepines. I. Preparation and benzodiazepine receptor binding of 1-benzyl- and 1-phenethyl-1,2,3-triazolo[4,5-b][1,4]diazepines. *J. Heterocyclic. Chem.* **1995**, *32*, 169-176. (b) Albert, A. Albert, Adrien. Dimroth rearrangement. XV. Catalysis by methylamine salts. Preparation of 7-methylamino- and 6,7-dihydro-7-imino-v-triazolo[4,5-d]pyrimidines via 4-[(ethoxymethylene)amino]-1,2,3-triazoles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1973**, 2659-2664. (c) Ewing, D. F.; Goethals, G.; Mackenzie, G.; Martin, P.; Ronco, G.; Vanbaelinghem, L.; Villa, P. Synthesis of selected aminodeoxy analogs of globotriosylceramide. *Carbohydrate Research* **1999**, 190-196.
- 269 Birnbaum, G.I.; De Clercq E.; Hatfield, P.W.; Robins, M.J. Synthesis and conformational studies of 4-carbamoyl-1-[(2-hydroxyethoxy)-methyl]-5-(methylamino)imidazole and derivatives as new acyclonucleoside analogues. *Heterocycles* **1987**, *25*, 493-506.
- 270 Baig, G.U.; Stevens, M.F.G. Triazines and related products. Part 22. Synthesis and reactions of imidazo[5,1-c][1,2,4]triazines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, *5*, 1424-1435.

- 271 Sutherland, D.R.; Tennant, G. Chemistry of polyazaheterocyclic compounds. VI. Dimroth rearrangements of 4-substituted 5-amino-1-phenyl-1,2,3-triazoles and a synthesis of v-triazolo[4,5-d]pyrimidines. *J. Chem. Soc. (C)* **1971**, 706-713.
- 272 Curtin, D. Y.; Ursprung, J.A. Reaction of Organometallic Compounds with Diazonium Salts. I Synthesis of Arylazoalkanes. *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 1221-1225.
- 273 (a) Campagne, J.-M.; Prim, D. in *Les Complexes de Palladium en Chimie Organique*, CNRS editions, **2001**, pp. 160-161. (b) Saumitra, S.; Sanchita, B. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling of Arenediazonium Salts with Arylboronic Acids. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3405.
- 274 Merkushev, E.B. Advances in the synthesis of iodoaromatic compounds. *Synthesis* **1988**, 923-937.
- 275 Fulmer Shealy, Y.; Allen O'Dell, C. Triazeno-v-triazole-4-carboxamides. Synthesis and antitumor evaluation. *J. Med. Chem.* **1966**, *9*, 733-737.
- 276 (a) Smith, W.B.; Chenpu Ho, O. Application to the isoamyl nitrite – Diiodomethane route to aryl iodides. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2543-2545. (b) Nair, V.; Richardson, S.G. Modification of Nucleic Acid Bases via Radical Intermediates: Synthesis of Dihalogenated Purine Nucleosides. *Synthesis* **1982**, 670-672. (c) Nair, V.; Richardson, S.G. Utility of puninyl radicals in the synthesis of base-modified nucleosides and alkylpurines: 6-amino group replacement by hydrogen, chlorine, bromine, and iodine. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3969-3974. (d) Cornforth, J.; Kumar, A.; Stuart A.S. Synthesis of substituted dibenzophospholes. Part 6. Preparation of symmetrical and non-symmetrical quaterphenyl intermediates. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 859-866. (e) Smith, W.B.; Ho, O.C. Application of the isoamyl nitrite-diiodomethane route to aryl iodides. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2543-2545.
- 277 Agrofoglio, L.A.; Gillaizeau, I.; Saito, Y. Palladium-Assisted Routes to Nucleosides. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1875-1916.
- 278 Sonogashira, K. *Comprehensive Organic Synthesis*, Trost/Fleming (Eds), Pergamon Press: New York, 1991, vol 3, p. 521.
- 279 Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467-4470.
- 280 Minakawa, N.; Takeda, T.; Sasaki, T.; Matsuda, A.; Ueda, T. Nucleosides and nucleotides. 96. Synthesis and antitumor activity of ethynyl-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 778-786.
- 281 An, H.; Ding, Y.; Chamakura, V.; Hong, Z. Preparation of deazapurine nucleoside analogs as antiviral agents. WO 2003061576, 2003.
- 282 Tseng, C.K.; Marquez, V.E.; Fuller, R.W.; Goldstein, B.M.; Haines, D.R.; McPherson, H.; Parsons, J.L.; Shannon, W.M.; Arnett, G.; Hollingshead, M.; Driscoll, J. S. Synthesis of 3-deazaneplanocin A, a powerful inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase with potent and selective in vitro and in vivo antiviral activities. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1442-1446.
- 283 Ramasamy, K.; Imamura, N.; Hanna, N. B.; Finch, R. A. Avery, T. L.; Robins, R. K.; Revankar, G. R. Synthesis and antitumor evaluation in mice of certain 7-deazapurine (pyrrolo[2,3-d]pyrimidine) and 3-deazapurine (imidazo[4,5-c]pyridine) nucleosides structurally related to sulfenosine, sulfinosine, and sulfonosine. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1220-1225.
- 284 Maddry, J.; Chen, X.; Kwong, C.; Suling, W. Book of abstracts, 219th ACS National Meeting, San Francisco, CA, March 26-30, **2000**.
- 285 (a) Minakawa, N.; Matsuda, A. Nucleosides and nucleotides. 114. A convenient method for the synthesis of 3-deazapurine nucleosides from AICA-riboside. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 661-664. (b) Minakawa, N.; Matsuda, A. Nucleosides and nucleotides. 116. Convenient syntheses of 3-deazaadenosine 3-deazaguanosine, and 3-deazainosine via ring closure of 5-ethynyl-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide or -carbonitrile. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 557-570. (c) Minakawa, N.; Kojima, N. T.; Matsuda, A. Nucleosides and Nucleotides. 184. Synthesis and Conformational Investigation of Anti-Fixed 3-Deaza-3-halopurine Ribonucleosides. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7158-7172.
- 286 (a) Sashida, H.; Kawanuikai, A. Palladium-catalyzed intramolecular cyclisation of o-ethynylbenzoic acids and o-ethynylbenzamides : Preparation of isocoumarins and isoquinolin-1-ones. *Synthesis* **1999**, 1145-1148. (b)

Kundu N.G.; Khan, M.W. Palladium-catalyzed heteroannulation with terminal alkynes: a highly regio- and stereoselective synthesis of (Z)-3-Aryl(aryl)idene isoindolin-1-ones. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 4777-4792.

287 Dans le cadre des travaux de Minakawa et Matsuda, un mélange de l'alcool et de l'alcène a été obtenu. Après évaporation des solvants, le milieu réactionnel est placé dans une solution d'acide acétique dans l'éthanol et laissé sous agitation à température ambiante, jusqu'à disparition de l'alcool, pour aboutir au seul dérivé alcénique souhaité.

288 Sakamoto, T.; Annaka, M.; Kondo, Y.; Yamanaka, H. Condensed heteroaromatic ring systems. VIII. Synthesis of 3-substituted isocoumarins from o-halobenzoic acid derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2754-2759.

289 Vasilevsky, S.F.; Mshvidobadze, E.V.; Elguero, J. Heterocyclization of vic-substituted hydroxamic acid salts of acetylenylpyrazoles. A new procedure for the preparation of pyrazolo[3,4-c]pyridin-7-ones. *Heterocycles* **2002**, *57*, 2255-2260.

290 Sakamoto, T.; Kondo, Y.; Yamanaka, H. Condensed heteroaromatic ring systems. III. Synthesis of naphthyridine derivatives by cyclization of ethynylpyridinecarboxamides. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 626-633.

291 Schinazi, R.F., Sommadossi, J.P., Saalman, V., Cannon, D.L., Xie, M.-W., Hart, G.C., Smith, G.A., Hahn, E.F. Activities of 3'-azido-3'-deoxythymidine nucleotide dimers in primary lymphocytes infected with human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 1061-1067.

Articles et communications par l'auteur sur le sujet

PUBLICATIONS

1- Agrofoglio L.A.*; Aucagne V.; Amblard F.; Joubert N.; Zoulim F.; Escuret V.; Durantel D.; Trepo C. "Uridine Derivatives as Antiviral Drugs against a Flaviviridae, especially HCV" Ask patent filling EU 04356207.3 (24th December 2004).

2- Agrofoglio .L.A.*, Joubert N., Escuret V., Durantel D., Zoulim F. "The use of hcv replicon system for evaluation of new nucleoside analogs" in Framing the Knowledge of Viral Hepatitis. RF Schinazi, Eds., ihl Press, Arlington MA, US (2005).

3- Escuret V., Aucagne V., Joubert N., Durantel D., Rapp K. L., Schinazi R.F., Zoulim F., Agrofoglio L.A.* "Synthesis of 5-Haloethynyl- and 5-(1,2-Dihalo)vinyluracil Nucleosides: antiviral activity and cellular toxicity" *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6015-6024.

4- Joubert, N.; Schinazi, R.F.; Agrofoglio, L.A.* "Efficient Pd(0)-catalyzed Synthesis of 1,2,3-Triazolo-3'-deoxycarbanucleosides and their Analogues" *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11744-11750.

COMMUNICATIONS ORALES

Fête de la Science 2005 – Café des sciences, Orléans, Octobre 2005.

"Recherche d'un nouveau traitement contre l'hépatite C: contribution du chimiste organicien."

Joubert N.

Sciences en Sologne 2005, Orléans, Mai 2005.

"Contribution du chimiste organicien dans l'élaboration d'un nouveau médicament: application au traitement de l'hépatite C."

Joubert N.

SECO 42 (Semaine d'Etude en Chimie Organique), Urrugne, Mai 2005 (Récompense : meilleure communication orale)

"Synthèse et évaluation biologique de dérivés nucléosidiques de type 5-haloéthynyl- et 5-(1,2-dihalo)éthényluracile."

Joubert N., Escuret V., Aucagne V., Durantel D., Rapp K. L., Schinazi R.F., Zoulim F., Agrofoglio L.A.*

Sycocal III, Nouan le Fuzelier, Novembre 2004

"Synthèse de 1,2,3-triazolo-nucléosides et analogues par réaction de couplage de Sonogashira."

Joubert N., Escuret V., Zoulim F., Agrofoglio L.A.*

Sciences en Sologne 2004, Orléans, Mai 2004.

“Contribution du chimiste organicien dans l’élaboration d’une nouvelle thérapie pour le traitement de l’hépatite C.”

Joubert N.

XVI International Round Table Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Applications; Minneapolis USA, September 2004.

“Metathesis and Pd(0) reactions: useful tools for the synthesis of new nucleosides.”

Agrofoglio L.A.*, Amblard F., Aucagne V., Berteina-Raboin S., Joubert N., Nolan S.P., Schinazi R.F.

PRESENTATIONS POSTER

Sciences en Sologne 2005, Orléans, Mai 2005. (Prix du meilleur poster vulgarisé)

“Chimie organique et hépatite C : premiers pas vers un nouveau traitement de la maladie.”

Joubert N., L.A. Agrofoglio

1st International Symposium of Bio-molecules and Related Compounds; Montpellier, France, March 2005.

“Synthesis and Biological Evaluation of 5-haloethynyl- and 5-(1,2-dihalo)ethynyluracil nucleosides.”

Joubert N., Escuret V., Aucagne V., Durantel D., Rapp K.L., Schinazi R.F., Zoulim F., Agrofoglio L.A.*

Journées de Chimie Organique (JCO 2004), Palaiseau, Septembre 2004.

“Synthèse organopalladée de 1,2,3-triazolo-nucléosides et analogues.”

Joubert N., Escuret V., Zoulim F., Schinazi R.F., Agrofoglio L.A.*

Sciences en Sologne 2004, Orléans, Mai 2004.

“Vers de nouvelles thérapies pour le traitement de l’infection par le virus de l’hépatite C.”

Joubert N., Escuret V., Zoulim F., Schinazi R.F., Agrofoglio L.A.*

11ème Journée Jeunes Chercheurs; Paris, Janvier 2004.

“1,2,3-Triazolo-carbanucleosides and analogs targeting the HCV in a replicon system.”

Joubert N., Aucagne V., Escuret V., Durantel D., Zoulim F., Schinazi R.F., Agrofoglio L.A.*

XVI International Round Table Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Applications; Minneapolis USA. Septembre 2004.

“Antiviral activities of ribavirin derivatives in the HCV replicon system.”

Agrofoglio L.A.*, Aucagne V., Escuret V., Joubert N., Amblard F., Durantel D., Trépo C., Zoulim F

16ème Colloque Biotechnocentre, Seillac, Novembre 2003.

“Design of non-classical nucleosides including 1,2,3-triazolo-carbanucleosides targeting the hepatitis C virus (HCV) in a replicon system.”

Saito Y., Joubert N., Aucagne V., Escuret V., Durantel D., Zoulim F., Schinazi R.F., Agrofoglio L.A.*

Résumé :

Le virus de l'hépatite C est un problème de santé publique majeur, puisque 180 millions de personnes sont chroniquement infectées dans le monde, et sont susceptibles de présenter une cirrhose ou un cancer du foie. Un seul traitement a été approuvé, à base de Ribavirine et d'interféron alpha, mais il permet de traiter moins de 50 % des personnes infectées, et présente de nombreux effets secondaires. Devant ce constat, il paraît urgent d'aboutir à une polythérapie plus adaptée. En dépit du succès des nucléosides en chimie antivirale, visant plusieurs enzymes clés intervenant dans la réplication virale, peu d'entre eux ont été conçus pour viser l'ARN polymérase ARN dépendante nécessaire au VHC. Dans cette optique, de nouveaux dérivés carbocycliques de la Ribavirine, et des dérivés nucléosidiques du type 5-haloéthynyl- ou 5-(1,2-dihalo)vinyluracile, ont été synthétisés en utilisant deux méthodes : la réaction de Sonogashira et la cyclisation 1,3-dipolaire. Ce sont des outils puissants de la chimie organique qui permettent l'accès à de nouvelles structures nucléosidiques et la réalisation de modifications chimiques ultérieures. Les nouveaux composés ainsi préparés ont été testés pour leur activité antivirale.

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF NEW NUCLEOSIDES TARGETING HCV IN A REPLICON SYSTEM

Abstract :

Hepatitis C virus is a major health problem, which chronically infects 180 millions people around the world, and can lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Only one treatment based on a combination therapy of ribavirin and interferon alpha has been approved, but 50 % of the patients are non-responders to the treatment, which is associated with toxic side effects. Therefore, there is an urgent need for improved therapies against chronic HCV infection. Beside the success of analogues of nucleosides targeting key enzymes involved in the viral replication, only few of them were designed to target ARN dependent ARN polymerase. To achieve this goal, the synthesis of new carbocyclic analogues of ribavirin, and 5-haloethynyl- or 5-(1,2-dihalo)vinyluracile nucleoside analogues, was performed in this thesis, using the Sonogashira reaction or the 1,3-dipolar cycloaddition, two powerful tools of the organic chemistry useful to build new structures and bring further interesting modifications. All derivatives were evaluated for their antiviral activities.

Discipline : Conception, Synthèse, Analyse et Structure des Composés d'Intérêt Biologique

Mots-Clés : Analogues de nucléosides, hépatite C, VHC, réplicon, antiviraux, ribavirine, palladium, cycloaddition 1,3-dipolaire, carbocycle, 1,2,3-triazole, uridine, VIH.

Laboratoire : Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), UFR Sciences, Université d'Orléans.