HAL open science

Synthèse et évaluation de modulateurs de la protéine CFTR

Benjamin Boucherle

To cite this version:

Benjamin Boucherle. Synthèse et évaluation de modulateurs de la protéine CFTR. Chimie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00347412

HAL Id: tel-00347412

https://theses.hal.science/tel-00347412

Submitted on 15 Dec 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.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I

Thèse présentée par

Benjamin BOUCHERLE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

Spécialité :

Sciences du Médicament

Synthèse et évaluation de modulateurs de la protéine CFTR

Soutenue le 9 décembre 2008

Composition du jury

Pr. Frédéric BECQ	Examinateur
Pr. Marc CHANSON	Rapporteur
Dr Martine DEMEUNYNCK	Examinateur
Dr Gilles GOSSELIN	Rapporteur
Pr. Jean-Luc DECOUT	Directeur de thèse
Pr. Denis WOUESSIDJEWE	Examinateur

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Département de Pharmacochimie Moléculaire sous la direction de Jean-Luc Décout. Je lui adresse mes plus vifs remerciements pour l'accueil au sein du laboratoire dès ma 5ème année de Pharmacie puis au cours du Master et de la thèse. Malgré ses responsabilités administratives et d'enseignement, il a toujours été très disponible pour tous les problèmes rencontrés au cours d'une thèse. Merci également pour ses connaissances et son enthousiasme pour la recherche qu'il a su me transmettre et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir notamment sur la pédagogie et les études de Pharmacie.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury : Marc Chanson (Pr Hôpitaux Universitaires de Genève) et Gilles Gosselin (DR CNRS/Idenix) qui ont accepté la responsabilité de rapporteurs ainsi que Frédéric Becq (Pr Université de Poitiers), Martine Demeunynck (DR CNRS/Université Joseph Fourier) et Denis Wouessidjewe (Pr Université Joseph Fourier) qui examinent ce travail de thèse.

Ma plus vive gratitude va à l'association « Vaincre La Mucoviscidose » qui, par son financement, m'a permis de réaliser ces travaux.

Je remercie également le Professeur Frédéric Becq et tous les membres de son équipe qui ont travaillé en collaboration avec nous sur ce sujet : Caroline Norez, Patricia Melin et Johanna Bertrand.

Je tiens ensuite à remercier les collègues au côté desquels j'ai travaillé durant cette thèse avec une mention spéciale pour certains d'entre eux. Tout d'abord un grand merci à :

Jérôme pour les conseils techniques mais surtout pour le coté humain. Je lui souhaite de trouver à Poitiers des collègues aussi sympa que ce qu'il a pu l'être pour moi au cours de ces cinq années.

Marie-Carmen qui a travaillé avec moi sur la thématique des modulateurs de CFTR et avec qui j'ai partagé « la longueur des purif' des P1/P2 et les difficultés de synthèse des B1 et des Bx ».

Merci également à :

Christel dont les travaux sur la réaction MG-α-aminoazahétérocycles ont précédé les miens.

Et à Cécile (grand merci pour la relecture), Isa, François (« pour son aide précieuse en RMN »), Indragit (qui m'a permis de pratiquer mon anglais et d'essayer de lui apprendre trois mots de français) Antoine, Olivier, Sylvie, et JB (qui ont apporté beaucoup de dynamisme et de bonne humeur au labo), Marine, Sophie, Yung (notamment pour sa connaissance qu'il nous fait partager par les PMR), Ahcène, Madeleine, Flo (bon courage pour les études ! et puis va falloir arrêter de fumer…), Luc (tu vas pouvoir reconstituer le stock de pâté, le prochain canyon n'est pas prévu pour tout de suite !) et à tout le personnel du DPM.

Merci aussi à tous ceux pour qui j'ai eu moins de temps ces derniers mois : les amis de toujours Anne-Claire, Pascal, Dam's, Guig, Oliv' et leurs conjoints et enfants ; les potes du lycée et assimilés qui se reconnaîtront ; les « pharmas » (avec un plus pour Dr Norman pour la thèse d'exercice) ; et le GUC rugby lieu de décontraction post-travail particulièrement efficace.

A la mémoire d'Arnaud et de Romain.

Mes remerciements vont également à la « tribu Boucherle » : grand-mères, parents, sœurs, frère, belles-sœurs, beaux-frères, oncles, tantes, cousin(e)s, nièce(s ?), neveu(x ?) et assimilés ; tous ceux qui ont fait que je suis comme je suis et qui forment ce noyau rempli d'affection et de tendresse au sein duquel on se sent bien.

Et enfin un merci tout spécial à Marie qui partage ma vie et qui endure au quotidien les difficultés et les incertitudes de la vie d'un étudiant chercheur notamment sa faible disponibilité et son humeur inégale pendant la rédaction de la thèse.

Table des matières

Index des Figures 1
Index des Tableaux 4
Index des Schémas 6
Abréviations : 8
Introduction 11
1. Contexte de la recherche 12
1.1. Le MG 12
1.1.1. En synthèse 12
1.1.2. En biologie (Thornalley, 1996 ; Kalapos, 1999) 12
1.2. Travaux antérieurs 15
1.2.1. Réaction MG/α-aminoazahétérocycles (Routaboul, 2003) 15
1.2.2. Réactivité des adduits formés 17
2. Propriétés biologiques des adduits formés 18
3. La protéine CFTR (Sheppard, 1999 ; Riordan, 2008) 20
3.1. Description 20
3.2. Biosynthèse, maturation (Vankeerberghen, 2002 ; Riordan, 2005) 21
3.3. Localisation 23
3.4. Les mutations de CFTR 23
3.4.1. La mutation ΔF508 23
3.5. Fonction 25
3.5.1. Canal ionique (Sheppard, 1999) 25
3.5.2. Régulations d'autres canaux transmembranaires (Schwiebert, 1999 ; Vankeerberghen, 2002) 25
3.5.3. Autres fonctions 27
3.6. Mode d'action du canal chlorure 28
3.7. Régulation (Sheppard, 1999) 28
4. La Mucoviscidose 30
4.1. Historique (Roussey, 2000) 30
4.2. Les différentes classes de mucoviscidose 31

4.2.1. Classification de Welsh et Smith 31
4.2.2. Nouvelle classification (Vankeerberghen, 2002) 32
4.3. Symptômes cliniques (Roussey, 2000) 34
4.3.1. Manifestations respiratoires 34
4.3.2. Manifestations digestives 35
4.3.3. Manifestations hépatiques 35
4.3.4. Manifestations génitales 36
4.3.5. Causes de décès 36
4.4. Corrélations génotype/phénotype (Vankeerberghen, 2002 ; Rowntree, 2003) 37
4.5. Traitements actuels 37
4.5.1. Traitement de l'inflammation 37
4.5.2. Produits agissant sur la viscosité du mucus 38
4.5.3. Traitements antibiotiques 38
4.5.4. Bronchodilatateurs 38
4.5.5. Kinésithérapie respiratoire 38
4.5.6. La transplantation 39
4.5.7. Extraits pancréatiques 39
4.5.8. Mucoviscidose et diabète 39
4.6. Perspectives thérapeutiques 39
4.6.1. Amélioration des traitements symptomatiques (Cystic-Fibrosis-Foundation) 40
4.6.2. Thérapie génique 40
4.6.3. Activation d'autres transporteurs ABC 41
4.6.4. Modulation d'autres canaux ioniques (Amaral, 2007) 41
4.6.5. Thérapie protéique 42
4.6.6. Conclusion sur les perspectives thérapeutiques 46
5. Diarrhées sécrétoires 48
6. Modulateurs de CFTR 49
6.1. Modulateur du système de régulation de CFTR (Cai, 2003) 50
6.2. Modulation par liaison directe (Cai, 2004) 50
6.2.1. Activateurs/Potentiateurs (Cai, 2003 ; Becq, 2006 ; Amaral, 2007) 51
6.2.2. Inhibiteurs agissant par liaison directe (Cai, 2003) 62
6.3. Activité biologique des composés synthétisés au laboratoire 76
6.3.1. GPact-11a : Potentiateur de CFTR 76
6.3.2. GPinh-5a : Inhibiteur de CFTR 77

7. Objectifs du travail 79
7.1. Recherche du pharmacophore 79
7.2. Pharmacomodulation des composés actifs 79
7.3. Synthèses, propriétés physico-chimiques et biologiques des composés formés 80
Chapitre 1 : Recherche du pharmacophore 81
1. Bétaïne et dérivés 82
2. Adduits de l'éthylglyoxal sur des α-aminoazahétérocycles 86
2.1. Synthèses décrites de l'éthylglyoxal 86
2.2. Synthèses réalisées 88
2.3. Nouveaux adduits 90
2.4. Conclusion sur la réaction entre l'EG et les α-aminoazahétérocycles 95
3. Modification des adduits 96
3.1. Accès à la Famille II 96
3.1.1. Généralisation de la réaction 97
3.1.2. Conclusions sur les composés de la famille II 100
3.2. Autres essais de transformation des produits de la famille I 101
3.3. Obtention de nouveaux produits – Accès à la famille III 102
3.3.1. Identification 102
3.3.2. Réactivité des produits de la famille III 107
3.3.3. Stéréochimie 107
3.3.4. Mécanisme de la réaction 109
3.3.5. Conclusions sur la famille III 112
4. Conclusions du chapitre 114
Chapitre 2 : Pharmacomodulations des potentiateurs et inhibiteurs mis en évidence 116
1. Problèmes de purification des adduits du MG 117
2. Modifications de l'adénine 119
2.1. Adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en position 9 120
2.1.1. Synthèses des dérivés de l'adénine modifiée en position 9 120
2.1.2. Synthèses des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en position 9 125
2.2. Adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en position 7 127
2.2.1. Synthèses des dérivés de l'adénine modifiée en position 7 127
2.2.2. Synthèses des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en position 7 128
2.3. Adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en positions 8 et/ou 9 129
2.3.1. Synthèses des dérivés de l'adénine modifiée en positions 8 et 9 129

2.3.2. Synthèses des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en positions 8 et/ou 9 . 134
2.4. Adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en positions 2 et 9 137
2.4.1. Synthèses des dérivés de l'adénine modifiée en positions 2 et 9 137
2.4.2. Synthèses des adduits du MG sur des dérivés de l'adénine modifiée en positions 2 et 9 140
3. Conclusions du chapitre 143
Chapitre 3 : Evaluation des composés préparés 145
1. Synthèses et propriétés physico-chimiques 146
1.1. Synthèses à grande échelle 146
1.2. Solubilité 147
1.3. Stabilité 148
1.3.1. Dans l'eau 148
1.3.2. En présence de DTT (Dithiothréitol) 149
2. Evaluations biologiques complémentaires des composés précédemment synthétisés (notamment GPact-11a et GPinh-5a) 150
2.1. Tests cellulaires (in vitro) 150
2.1.1. Evaluation par le test d'efflux d'ions iodures 150
2.1.2. Tests ADMET 158
2.1.3. Evaluation par la technique de « patch-clamp » 161
2.1.4. Evaluation par un test de fluorescence 163
2.2. Test tissulaire (ex vivo) 164
2.2.1. Molécules inhibitrices 164
2.2.2. Molécule potentiatrice 165
2.3. Test sur souris (in vivo) 166
2.3.1. Molécule potentiatrice 166
2.3.2. Molécules inhibitrices 167
2.3.3. Compétition entre inhibiteurs et potentiateurs/activateurs 167
2.4. Conclusions sur les nouvelles évaluations biologiques des composés précédemment synthétisés 169
3. Activités des nouveaux composés 170
3.1. Recherche sur le pharmacophore 170
3.1.1. Bétaïne et dérivés 170
3.1.2. Influence du remplacement des groupes méthyles par des groupements éthyles dû au changement d'α-oxoaldéhyde (MG/EG) dans la réaction de synthèse 172

3.1.3. Evaluation des composés de la famille II 174
3.1.4. Evaluation des composés de la famille III 175
3.1.5. Conclusions sur la recherche du pharmacophore 176
3.2. Influence des modifications de l'adénine 178
3.2.1. Modifications en position 9 178
3.2.2. Modifications en position 8 et/ou 9 181
3.2.3. Modifications en positions 2 et 9 182
3.2.4. Conclusions sur les modifications de l'adénine 182
4. Discussion sur le mode d'action des composés potentiateurs/activateurs et inhibiteurs 184
4.1. Effet direct ou indirect 184
4.2. Site(s) d'action 185
4.3. Hypothèses 186
Conclusion et Perspectives 188
Partie expérimentale 195
1. Généralités 195
1.1. Chromatographies 195
1.2. Points de fusion 195
1.3. Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) 195
1.4. Spectrométrie de masse basse résolution 196
1.5. Spectrométrie de masse haute résolution et analyse élémentaire 196
1.6. Solvants 196
2. Chapitre 1 197
3. Chapitre 2 209
Bibliographie 267

Index des Figures

Figure 1 : Structures des dérivés de l'adénine modifiée en position 9 **3**, de la 2-aminopyridine **4** et de la 1-aminoisoquinoléine **5** 15
Figure 2 : Schéma de structure de la protéine CFTR (Sheppard, 1999) 21
Figure 3 : Biosynthèse de la protéine CFTR sauvage (Vankeerberghen, 2002) 22
Figure 4 : Rôle de CFTR dans la régulation d'autres canaux ioniques 26
Figure 5 : Régulation de la protéine CFTR 29
Figure 6 : Classification des mutations du gène CF d'après Welsh et Smith 31
Figure 7 : Classification de la mucoviscidose en six classes 33
Figure 8 : Les différentes manifestations de la mucoviscidose 34
Figure 9 : Structure de la généticine **7**, de la gentamicine **8** et de PTC124 43
Figure 10 : Structure du miglustat **9** 44
Figure 11 : Structures des principales xanthines activant CFTR 51
Figure 12 : Structures de trois benzo[*c*]quinoliziniums (MPB) 52
Figure 13 : Structures de la génistéine, de l'apigénine, du kaempferol, de la quercitine et de deux dérivés synthétiques de flavonoïdes agissant sur CFTR 53
Figure 14 : Structures des principaux dérivés benzimidazolones activant CFTR 54
Figure 15 : Structure de la chlorzoxazone 54
Figure 16 : Structure de la 1,10-phénantroline, du 7,8-bensoquinoéline et de CBIQ 55
Figure 17 : Structures de la phloxine B et du rose Bengale 56
Figure 18 : Structure de type tétrahydrobenzoaminothiophène 56
Figure 19 : Structure du Curcumin 57
Figure 20 : Structure de la capsaïcine 57
Figure 21 : Structure des 1,4-dihydropyridines utilisés comme potentiateur de CFTR 58
Figure 22 : Structures de deux pyrrolo[2,3-*b*]pyrazines activant CFTR : RP107 et RP108 58
Figure 23 : Structures des dérivés de 3-(2-benzyloxyphenyl)isoxazoles et isoxazolines 59
Figure 24 : Structures de la dictamine et de la magnoline 59
Figure 25 : Structure générale des ginsénosides 60
Figure 26 : Structure de NPPB-AM et NPPB 60
Figure 27 : Structures de SF-03 et de PG-01 60
Figure 28 : Structure de type pyrazole substitué brevetée pour la modulation de transporteurs ABC 61
Figure 29 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de CFTR (Partie centrale : fonctionnement de CFTR en l'absence d'inhibiteur ; Partie gauche : un inhibiteur allostérique (G) ici placé à l'interface entre les deux NBD va entraîner la fermeture du canal ; Partie droite : un bloqueur du canal ouvert (A^-) est placé à l'intérieur du canal empêchant le passage des ions chlorures (adapté d'après (Cai, 2004)). 63
Figure 30 : Structures des acides carboxyliques aromatiques inhibant CFTR de façon non sélective 64
Figure 31 : Structures de NPPB et de NPPB-AM 64
Figure 32 : Structures du méglitinide et du mitiglinide 65
Figure 33 : Structures des acides sulfoniques inhibant CFTR de façon non sélective 65
Figure 34 : Structure du glibenclamide et du tolbutamide 66
Figure 35 : Structure de la phlorétine 66
Figure 36 : Structures du sulfinpyrazone, du probenecide et de la benzbromarone 67

Figure 37 : Structure de GlyH-101 et mécanisme d'inhibition supposé de CFTR par GlyH-101 (noté A^-)..... 68
Figure 38 : Structures des dérivés de glycine-hydrazides ou de malonates conjugués ou non 69
Figure 39 : Structures du furosémide, du bumétanide et de l'ibuprofène 70
Figure 40 : Structure du DIAO..... 71
Figure 41 : Structure de la suramine 71
Figure 42 : Structure du stéviol 72
Figure 43 : Structure de $CFTR_{inh}$-172 73
Figure 44 : Structure des composés INH1 et INH2 74
Figure 45 : Structure de **GPact-11a**..... 76
Figure 46 : Structure de **GPinh-5a** 77
Figure 47 : Motif structural minimum du pharmacophore supposé..... 79
Figure 48 : Structures des composés de la famille I et du composé de la famille II **6**..... 82
Figure 49 : Motif structural minimum du pharmacophore supposé..... 82
Figure 50 : Structures de la bétaïne **10** et de certains de ses dérivés..... 83
Figure 51 : Structures de la L-*N*-méthylproline **16**, de la L-*N*,*N*-diméthylproline **17** et de l'acide 2-amino-2-norboranenecarboxylique **18** (représentés sous forme zwitterionique)..... 83
Figure 52 : Structures de la cispentacine **19** et de la taurine **20** 84
Figure 53 : Structures d'analogues aromatiques de la bétaïne 84
Figure 54 : Structure de la 7-méthylguanosine **25** 84
Figure 55 : Structures de la 1-éthylacroléine **32** et de la 2-éthylacroléine **33**..... 89
Figure 56 : Structures des composés obtenus par monoaddition du MG sur la 2-aminopyridine **40**, du phénylglyoxal sur la 2-aminopyridine **41** et du phénylglyoxal sur l'adénine **42** 92
Figure 57 : Spectre de RMN ^{1}H à 400 MHz dans D_2O à 21 °C des adduits **27a**. 94
Figure 58 : Spectre de RMN ^{1}H à 400 MHz dans CD_3OD à 21 °C du composé **48**..... 99
Figure 59 : Spectre de RMN ^{1}H à 400 MHz dans $CDCl_3$ à 21 °C du composé **51** 102
Figure 60 : Enchaînement d'atomes au sein du composé **51** (les flèches représentent les couplages observés en RMN COSY 2D ^{1}H/^{1}H ; R, R' et R'' sont liés par des atomes de carbone quaternaires ou par des hétéroatomes)..... 103
Figure 61 : Structures de **GPact-11a**, de **GPinh-5a** et de l'adénine **55**..... 119
Figure 62 : Structures comparées de **GPinh-5a**, de **63** et de **GPact-11a** 123
Figure 63 : Spectres de RMN ^{1}H de **GPact-11a** à 100 mM dans D_2O/H_2O (1/9) (400 MHz à 21 °C) enregistrés lors de cycle de congélation/décongélation..... 149
Figure 64 : Structure du DTT..... 149
Figure 65 : Structure de la forskoline (fsk) 150
Figure 66 : Structures des principaux inhibiteurs de la famille I 151
Figure 67 : Structure de **GPact-11a**..... 153
Figure 68 : Activité de **GPact-11a** sur les mutations de CFTR G551D, G1349D et 2GD.... 153
Figure 69 : Structures des composés évalués en tant qu'inhibiteur de la protéine MRP1 155
Figure 70 : Structures des composés évalués en tant que modulateurs des canaux potassiques, sodiques et calciques 156
Figure 71 : Rapport des constantes de vitesse de sortie des ions iodures en présence de **GPinh-5a** à 1 µM (noté 5a), d'une solution hypotonique (hypo) ou de l'ionophore calcique A23187 157
Figure 72 : Structures des composés évalués en tant que correcteur de la protéine delF508-CFTR..... 157
Figure 73 : Structures des composés évalués par des tests ADMET 158
Figure 74 : Principe du « patch clamp » sur cellule entière. 161

Figure 75 : Mesure par la technique de « patch clamp » de l'effet des composés **GPinh-5a** (noté 5a) et **GPinh-8ab** (noté 8a,b) sur la variation de l'intensité associé au canal CFTR du courant en fonction du temps après activation par la fsk 162
Figure 76 : Inhibition de CFTR par **GPinh-5a** (noté 5a), après stimulation par la fsk (notée FK), mesurée par la technique de « patch clamp » sur cellules rénales de souris..... 162
Figure 77 : Pourcentage d'inhibition de sortie d'ions halogénures de la cellule par **GPinh-5a** après stimulation par la fsk sur cellules issues de la lignée 16HBE14o- 163
Figure 78 : Effet inhibiteur de **GPinh-5a** (noté 5a) sur l'intensité du courant transépithélial mesuré à travers le colon de souris (**GPinh-5a** étant préincubé des deux côtés de la membrane)..... 164
Figure 79 : Courbe dose-effet de **GPact-11a** sur l'augmentation du courant transépithélial (sur colon de souris) avec préstimulation de CFTR par la fsk (1 µM) (symboles carrés) ou sans préstimulation de CFTR par la fsk (symboles ronds) 165
Figure 80 : Sécrétion salivaire en fonction du temps après stimulation par l'isoprénaline (notée Iso)..... 166
Figure 81 : Courbe dose-effet de **GPact-11a** sur la sécrétion salivaire après stimulation de CFTR par l'isoprénaline (10 µM) 167
Figure 82 : Masse totale de salive collectée pendant toute la durée de l'expérience (Isoprénaline notée Iso)..... 167
Figure 83 : Sécrétion salivaire en fonction du temps (isoprénaline notée Iso) 168
Figure 84: Classement par lipophilie croissante des adduits MG et EG sur la 2-aminopyridine et sur la 1-aminoisoquinoléine 173
Figure 85 : Structure du composé de la famille II **47** issu de la benzamidine..... 175
Figure 86 : Evolution de la constante de vitesse de sortie des ions iodures en présence de fsk et de différentes concentrations en **GPact-11a** (Cellules CHO-wt)..... 180
Figure 87 : Evolution de la constante de vitesse de sortie des ions iodures en présence de fsk et de différentes concentrations en **74a** (Cellules CHO-wt)..... 180
Figure 88 : Structures de **GPact-11a**, du potentiateur mis en évidence **98a** et de **114a**..... 183
Figure 89 : Hypothèse de modulation de CFTR par les inhibiteurs et activateurs/potentiateurs mis en évidence 187
Figure 90 : Structures de deux modulateurs de la protéine CFTR mis en évidence : l'inhibiteur **GPinh-5a** et le potentiateur/activateur **GPact-11a**..... 188
Figure 91 : Structure du pharmacophore..... 188
Figure 92 : Structures des quatre composés de la famille II 189
Figure 93 : Structure du composé de la famille III **53** issu de l'activateur **GPact-11a** 189
Figure 94 : Structures de la 7-méthylguanosine **25** et de **GPinh-5a**..... 190
Figure 95 : Structures des activateurs **GPact-11a**, **74a** et **99a**..... 191

Index des Tableaux

Tableau 1 : Principales molécules inhibitrices et molécule potentiatrice de la protéine CFTR mises en évidence 19
Tableau 2 : Principales mutations du gène CF (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr) (juin 2008) 23
Tableau 3 : Cause de décès des patients atteints de mucoviscidose en France en 2001 (ONM) 36
Tableau 4 : IC_{50} de **GPinh-5a** et de $CFTR_{inh}$-172 déterminées par le test d'efflux. Cellules : CHO-wt, CHO G551D (exprimant la mutation G551D), CF15 : cellules épithéliales humaines d'origine nasale exprimant la protéine mutée ΔF508 corrigée par la température, Cos-7 transfectées transitoirement par GFP-G1349D-CFTR 77
Tableau 5: Déplacements chimiques des protons des mélanges majoritaires **a** des adduits l'EG et du MG sur différents α-aminoazahétérocycles et rendements des réactions d'obtention correspondantes 93
Tableau 6 : Déplacements chimiques des protons des produits de la famille II et rendements des réactions d'obtention correspondantes 99
Tableau 7 : Essais de transformation de produits de la famille I en famille II en utilisant différentes conditions 101
Tableau 8 : Déplacements chimiques des protons du mélange d'isomères des produits de la famille III et rendements des réactions d'obtention correspondantes 106
Tableau 9 : Configurations absolues des trois atomes de carbone asymétriques des composés de la famille III obtenues selon la deuxième hypothèse de mécanisme 112
Tableau 10 : Déplacements chimiques des protons des dérivés de l'adénine modifiée en position 9 et rendements de la réaction d'alkylation correspondante 124
Tableau 11 : Déplacements chimiques des protons des adduits du MG sur des dérivés de l'adénine modifiée en position 9 et rendements de la réaction d'obtention correspondante . 126
Tableau 12 : Déplacements chimiques des dérivés de l'adénine modifiée en position 7 et rendements de la réaction d'alkylation correspondante 128
Tableau 13 : Déplacements chimiques des protons des dérivés de l'adénine modifiée en positions 8 et 9 et rendements de la réaction d'obtention correspondante 133
Tableau 14 : Déplacements chimiques du proton des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en positions 8 et/ou 9 et rendements de la réaction d'obtention correspondante 136
Tableau 15 : Déplacements chimiques du proton des dérivés de l'adénine modifiée en positions 2 et 9 et rendements de la réaction d'obtention correspondante 140
Tableau 16 : Déplacements chimiques du proton des adduits du MG sur des dérivés de l'adénine modifiée en positions 2 et 9 et rendements de la réaction d'obtention correspondante 142
Tableau 17 : IC_{50} des principaux inhibiteurs de la famille I et des inhibiteurs $CFTR_{inh}$-172 et glibenclamide, déterminées par le test d'efflux des ions iodures sur différentes mutations de CFTR 151
Tableau 18 : IC_{50} des principaux inhibiteurs de la famille I déterminées par le test d'efflux d'iodures sur cellules CHO-wt en présence de fsk 1 µM 154
Tableau 19 : Activités sur CFTR des analogues de la bétaïne (mesurées par le test d'efflux d'ions iodures sur cellules CHO-wt) 171
Tableau 20 : Activité sur CFTR des adduits du MG ou de l'EG sur la 2-aminopyridine ou sur la 1-aminoisoquinoléine 173

Tableau 21 : Activité des produits de la famille II 174
Tableau 22 : Activité des produits de la famille III 175
Tableau 23 : Activité des adduits du MG sur des dérivés de l'adénine modifiée en position 9 178
Tableau 24 : Activité des adduits du MG sur des dérivés de l'adénine modifiée en position 8 et/ou 9 181

Index des Schémas

Schéma 1: Réaction entre le MG **1** et un α-aminoazahétérocycle **2** et structures des différents isomères formés 15
Schéma 2 : Mécanisme proposé pour la réaction entre le MG et un α-aminoazahétérocycle.. 16
Schéma 3 : Réactivité en milieu basique des adduits du MG sur la 2-aminopyridine **5** 17
Schéma 4 : Modulations envisagées sur l'adénine avant réaction avec le MG 80
Schéma 5 : Réaction entre la 2-aminopyridine **4** et l'éthylglyoxal (EG) **26** aboutissant au composé **27** 86
Schéma 6 : Synthèse de l'EG décrite par (Verhe, 1982) 87
Schéma 7 : Synthèses de l'EG **26** par oxydation au dioxyde de sélénium du butanal **28** et de la butanone **31** 88
Schéma 8 : Réaction entre la 2-aminopyridine **4** et l'EG **26** aboutissant aux adduits majoritaires **27a** et minoritaires **27b** 90
Schéma 9 : Réaction de l'EG **26** sur la 1-aminoisoquinoléine **34** conduisant aux adduits **35a** 90
Schéma 10 : Réaction de l'EG **26** sur la 2'-désoxyadénosine **36** et adduits attendus **37** 91
Schéma 11 : Monoadduit **39** de l'EG **26** sur la 9-propyladénine **38** 92
Schéma 12 : Réaction de l'EG **26** sur la 9-propyladénine **38** et adduits attendus **43** 92
Schéma 13 : Formation du produit de la famille II **6** à partir des adduits du MG sur la 2-aminopyridine **5** 96
Schéma 14 : Mécanisme proposé pour la formation du composé **6** de la famille II 97
Schéma 15 : Formation du produit de la famille II **45** à partir des adduits MG-1-aminoisoquinoléine **45** 98
Schéma 16 : Formation du produit de la famille II **47** à partir des adduits MG-benzamidine **47** 98
Schéma 17 : Formation du produit de la famille II **48** à partir des adduits EG-2-aminopyridine **27** 98
Schéma 18 : Formation du mélange d'isomères du produit de la famille III **51** à partir des adduits MG-2-aminobenzothiazole **49** 103
Schéma 19 : Formation du mélange d'isomères du produit de la famille III **52** à partir des adduits du MG sur la 9-butyladénine **51** 104
Schéma 20 : Formation du mélange d'isomères du produit de la famille III **53** à partir des adduits du MG sur la 9-propyladénine **GPact-11a** 105
Schéma 21 : Formation du mélange d'isomères du produit de la famille III **54** à partir des adduits du MG sur la 2-aminopyridine **5** 105
Schéma 22 : Relations supposées entre les différents isomères des produits de la famille III 108
Schéma 23 : Première hypothèse de mécanisme de la réaction menant à la famille III 109
Schéma 24 : Cas n° 1, Stéréochimie conservée (réaction à partir du mélange majoritaire **a** de la famille I) 109
Schéma 25 : Cas n° 2, Stéréochimie non conservée (réaction à partir du mélange majoritaire **a** de la famille I) 110
Schéma 26: Deuxième hypothèse de mécanisme de la réaction menant à la famille III 111
Schéma 27 : Voie d'accès à des pyrimidines substituées 114
Schéma 28 : Réactivité en milieu basique des produits de la famille I 115
Schéma 29 : Modifications de l'adénine **55** en position 7 ou 9 et/ou 8 et/ou 2 119
Schéma 30 : Voie de synthèse de dérivés de l'adénine modifiée en position 9 **3** 120

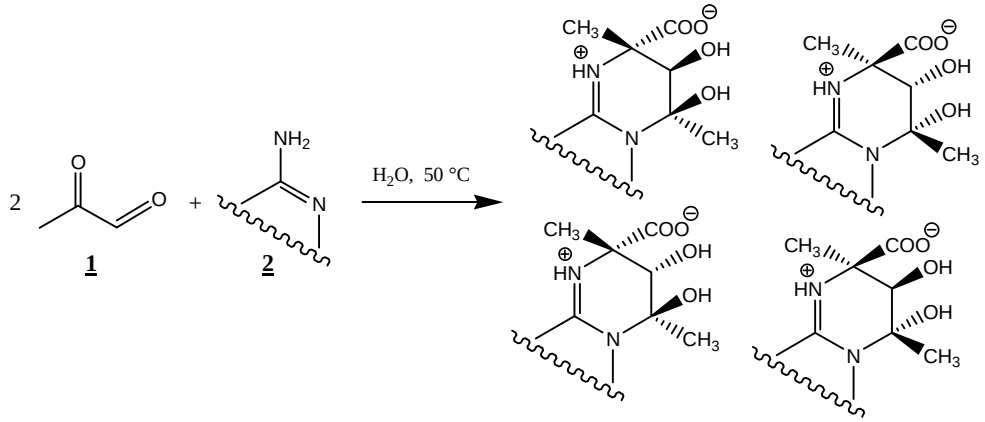
Schéma 31 : Synthèse de la Z+E 9-(prop-1-enyl)adénine **57**..... 122
Schéma 32 : Synthèse de la 9-(3-hydroxypropyl)adénine **58** 122
Schéma 33 : Réaction du MG sur les dérivés de l'adénine modifiée en position 9 **3**..... 125
Schéma 34 : Voie d'accès aux dérivés de l'adénine modifiée en position 7 127
Schéma 35 : Réaction du MG avec les dérivés de l'adénine modifiée en position 7..... 129
Schéma 36 : Synthèse de la 8-bromo-2'-désoxyadénosine **84**..... 130
Schéma 37 : Synthèse de la 8-bromo-9-propyladénine **86**..... 130
Schéma 38 : Voie de préparation de dérivés de l'adénine modifiée en position 8 et 9..... 131
Schéma 39 : Synthèse de la 8-éthylthio-2'-désoxyadénosine **88** par alkylation de la 8-mercapto-2'-désoxyadénosine **87** avec l'iodure d'éthyle..... 132
Schéma 40 : Synthèse de la 8-hydroxy-9-propyladénine **89** par hydrolyse acide de la 8-bromo-9-propyladénine **86**..... 132
Schéma 41 : Préparation des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en positions 8 et/ou 9 134
Schéma 42 : Voies de synthèse de l'adénine modifiée en positions 2 et 9 138
Schéma 43 : Synthèse de la 2-méthoxy-9-propyladénine **110** 139
Schéma 44 : Ensemble des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée..... 144
Schéma 45 : Réaction du MG sur la 2-aminopyridine **4** aboutissant aux adduits **5ab** 146
Schéma 46 : Conversion du MTT en formazan par les déshydrogénases cellulaires 159
Schéma 47 : Réactions mises en évidence menant aux composés des trois familles..... 190
Schéma 48 : Modulations chimiques de **GPinh-5a** et **GPact-11a** par réaction du méthylglyoxal avec des dérivés de l'adénine modifiée en position 9 ou 7 et/ou 8 et/ou 2 191
Schéma 49 : Voie d'accès à des analogues des composés actifs 193

Abréviations :

ABC :	ATP Binding Cassettes
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADP :	Adénosine DiPhosphate
AGE :	Advanced Glycation End-Product
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
AMP :	Adénosine MonoPhosphate
AMPc :	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm :	Acide RiboNucléique messager
ATP :	Adénosine TriPhosphate
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
CF :	Cystic Fibrosis : Mucoviscidose
CFTR :	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHO :	Chinese Hamster Ovary : (cellules d') ovaires de hamster chinois
ΔF508 ou delF508 :	Mutation de CFTR entraînant la délétion de la phénylalanine 508
DCM :	Dichlorométhane
DMF :	*N*,*N*-diméthylformamide
DMSO :	DiMéthylSulfOxide
DTT :	Dithiotréitol
EC_{50} :	Concentration nécessaire pour augmenter de 50% l'activité
EG :	Ethylglyoxal
fsk :	forskoline
GMPc :	Guanosine MonoPhosphate cyclique
Hsp :	Heat Shock Protein
IC_{50} :	Concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité
iPrOH :	Isopropanol = propan-2-ol
kb :	kilo base
kDa :	kilo Dalton 1 kDa = 1000 uma

MeOH :	Méthanol
MG :	Méthylglyoxal
MSD :	Membrane-Spanning Domain : Domaine transmembranaire
MRP :	Multidrug Resistance-associated Protein
NaH :	hydrure de sodium
NBD :	Nucleotides Binding Domains
ONM :	Observatoire National de la Mucoviscidose
PDE :	PhosphoDiEsterase
PKA :	Protéine Kinases A
PKC :	Protéine Kinases C
P-gP :	glycoProtéine P
PP2A :	Protéine Phosphatase 2 A
R :	Domaine Régulateur
RE :	Réticulum Endoplasmique = ER : Endoplasmic Reticulum
SUR :	Récepteurs aux sulfonylurées
*t*BuOK :	tertiobutanolate de potassium (1,1-diméthyléthanolate de potassium)
TA :	Température ambiante
THF :	Tétrahydrofurane
TR :	Temps de Réaction
wt :	wild type : gène sauvage = non muté

La mise en évidence, au sein du laboratoire, d'une nouvelle réaction entre le méthylglyoxal (MG) **1** et un α-aminoazahétérocycle **2** a permis l'accès à une nouvelle famille d'hétérocycles très fonctionnalisés.



Certains des adduits formés ont présenté des activités biologiques en temps que modulateurs de la protéine CFTR. L'objectif de cette thèse a été de comprendre et d'améliorer ces effets au travers de travaux de pharmacochimie et de pharmacologie en vue d'applications thérapeutiques.

Dans l'introduction du sujet, nous nous intéresserons à l'utilisation du MG en synthèse organique et nous présenterons son rôle complexe et son implication dans divers processus biologiques. Nous décrirons ensuite les travaux antérieurs menés sur les réactions MG α-aminoazahétérocycle pour ensuite aborder les propriétés biologiques des adduits formés.

Après avoir présenté la protéine CFTR dans sa structure et sa fonction, nous décrirons les maladies entraînées par un dysfonctionnement de cette protéine: la mucoviscidose et les diarrhées sécrétoires. Enfin, nous détaillerons les différents modulateurs des canaux CFTR connus et nous discuterons du potentiel thérapeutique de ce type de composés.

Le premier chapitre de ce travail sera consacré à la recherche du pharmacophore présent sur les composés actifs au travers de modifications de la structure de ces molécules.

Dans un deuxième chapitre, nous aborderons la pharcomodulation des modulateurs précédemment mis en évidence.

Le troisième chapitre sera, quant à lui, consacré à l'évaluation biologique des composés préparés en tant que modulateurs de la protéine CFTR.

Nous terminerons ce travail en récapitulant les résultats et en proposant des perspectives de recherches tant sur le plan de la pharmacochimie que de la pharmacologie.

Introduction

Au cours de cette introduction, nous situons le contexte général des recherches présentées dans ce travail.

Tout d'abord, nous présentons brièvement les implications du point de vue biologique et chimique du composé de départ de ces travaux : le méthylglyoxal.

Nous décrivons ensuite les travaux antérieurs effectués au laboratoire sur cette thématique, ainsi que les propriétés biologiques des adduits précédemment synthétisés.

Ces composés étant actifs sur la protéine CFTR, nous examinons ensuite les caractéristiques de cette protéine, les conséquences de son dysfonctionnement et les problèmes thérapeutiques qui y sont associés notamment concernant la mucoviscidose et les diarrhées sécrétoires.

Puis nous détaillons la structure et les effets des modulateurs connus de cette protéine.

Les objectifs de ce travail sont ensuite présentés.

1. Contexte de la recherche

1.1. Le MG

1.1.1. En synthèse

Le méthylglyoxal (MG) **1** ou aldéhyde pyruvique, ou pyruvaldéhyde ou 2-oxo-propanal, est un composé α-dicarbonylé très réactif. Il est notamment utilisé en synthèse pour former des hétérocycles par réaction avec des diamines ou avec des aminoazahétérocycles (Devillers, 2001 ; Garnier, 2003). De plus, le MG peut réagir par auto condensation ou avec d'autres aldéhydes pour former des composés dicarbonylés. Des réactions de divers réactifs α-dicarbonylés avec des composés insaturés (double ou triple liaisons) ont également été décrites (Jang, 2003;2004 ; Yang, 2006). Ce type de réactions permet de créer des liaisons carbone-carbone au sein de composés très fonctionnalisés.

Le MG est disponible commercialement sous forme d'une solution à 40 % dans l'eau. En milieu aqueux, il est principalement présent sous forme monohydrate au niveau de la fonction aldéhyde et, en proportion moindre sous forme dihydrate impliquant l'hydratation des deux fonctions carbonyles, la forme dicarbonylée étant peu présente (Nemet, 2004).

1.1.2. En biologie (Thornalley, 1996 ; Kalapos, 1999)

1.1.2.1. Formation du MG *in vivo*

In vivo, la formation du MG peut être catalysée par trois types d'enzymes : la méthylglyoxal synthétase (à partir de phosphate de dihydroxyacétone), les isozymes du cytochrome P450 IIE1 (lors de la dégradation de l'acétone) et les amines oxydases (lors du métabolisme des acides aminés) (Cf Intro 1.1.2.4).

Cependant, la source majeure de méthylglyoxal *in vivo* est la fragmentation non-enzymatique des phosphates de trioses (phosphoglycéraldéhyde et phosphodihydroxyacétone). En effet, le taux de formation de méthylglyoxal est estimé à 0,1 % du flux de triose dans des conditions normales de glycémie. La formation de méthylglyoxal peut donc avoir lieu dans toutes les cellules de tous les organismes.

1.1.2.2. Dégradation du MG *in vivo*

La quantité de MG produite in vivo est faible. Toutefois, celui-ci étant très réactif, cette faible quantité peut avoir des conséquences importantes sur la modification des protéines et des acides nucléiques. La dégradation enzymatique du MG doit donc être efficace. Le système enzymatique mis en jeu est le système glyoxalase qui comprend deux enzymes : les glyoxalases I et II. Elles agissent l'une à la suite de l'autre et nécessitent la présence catalytique de glutathion réduit pour transformer le MG en lactate.

1.1.2.3. Réaction du MG avec les biomolécules

Des réactions du MG avec les bases nucléiques sont décrites depuis plusieurs décennies. Ces réactions ont principalement lieu avec la désoxyguanosine pour former des produits de mono- ou bi-addition du MG. La désoxyadénosine, la désoxythymidine et la désoxycytidine sont beaucoup moins réactives vis-à-vis du MG en conditions physiologiques (Li, 2008). Ces réactions qui modifient l'ADN confèrent une activité mutagène au MG (Thornalley, 1996).

Le MG est également connu pour réagir avec les acides aminés des protéines. Les résidus arginine, lysine et cystéine sont les plus touchés (Thornalley, 1996 ; Oya, 1999). Les composés issus des réactions du MG avec les protéines sont appelés Advanced Glycation End-Product (AGE).

1.1.2.4. Effets physiopathologiques du MG

Chez les patients souffrant de diabète, les hyperglycémies sont fréquentes et entraînent une hausse de la concentration cellulaire en MG lors de la dégradation non-enzymatique du glucose. Cette augmentation va majorer la production d'AGE qui pourraient être impliqués dans les complications liées au diabète telles que la cécité, les neuropathies et les maladies vasculaires (Brownlee, 2001).

D'autres études ont suggéré que le MG serait impliqué dans le phénomène d'apoptose. En effet, des acides nucléiques et des protéines modifiés par le MG ont été identifiés dans le déclenchement de l'apoptose (Van Herreweghe, 2002).

Du fait de ses réactions avec les bases nucléiques, et en particulier la guanine, le MG est mutagène. Paradoxalement, certaines études suggèrent qu'il pourrait être utilisé comme agent anticancéreux (Ghosh, 2006).

1.2. Travaux antérieurs

1.2.1. Réaction MG/α-aminoazahétérocycles (Routaboul, 2003)

Dans le but d'étudier la réactivité de l'adénine avec le MG, des travaux avaient été entrepris au sein de notre laboratoire afin d'isoler et de caractériser d'éventuels produits de la réaction entre ces deux composés.

En effet, des adduits du MG sur la guanine étaient décrits, mais aucune structure n'était disponible concernant la réaction entre le MG et l'adénine. L'étude de cette réaction a permis la mise en évidence de la formation d'adduits cycliques. Par la suite, cette réaction de l'adénine a été généralisée à des dérivés de l'adénine substituée en position 9 **3**, en particulier les nucléosides correspondants, et à d'autres hétérocycles azotés tels que la 2-aminopyridine **4** et le 1-aminoisoquinoléine **5** (Figure 1).

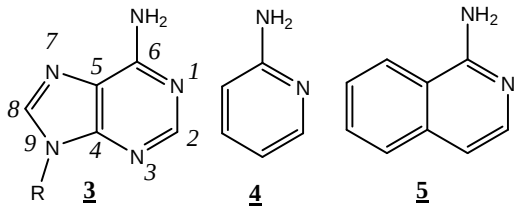


Figure 1 : Structures des dérivés de l'adénine modifiée en position 9 **3**, de la 2-aminopyridine **4** et de la 1-aminoisoquinoléine **5**

Les adduits formés résultent de la condensation de deux molécules de MG **1** sur une molécule de type α-aminoazahétérocycle **2** aboutissant à une nouvelle famille d'hétérocycles à caractère zwitterionique à pH 7 (appelée par la suite famille I) (Routaboul, 2002) (Schéma 1).

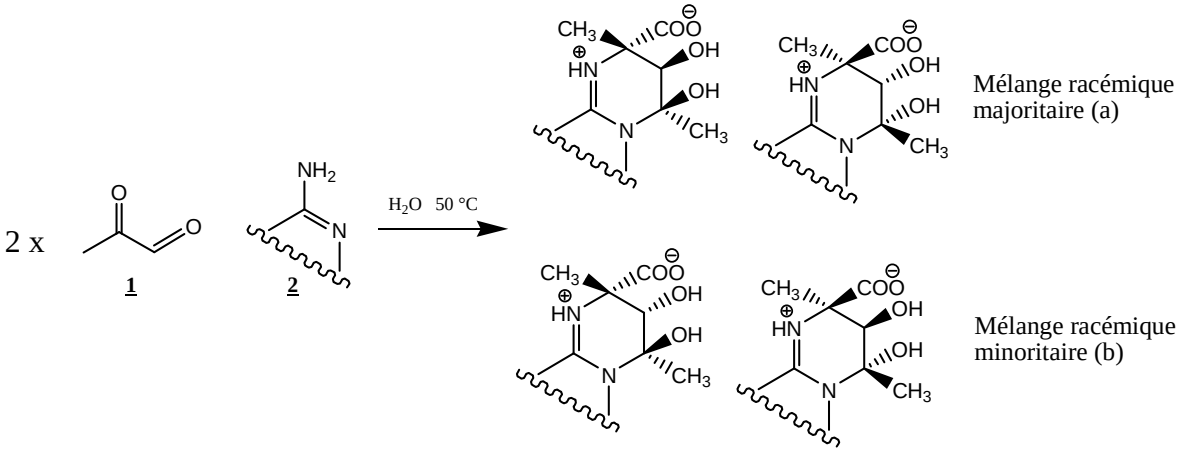


Schéma 1: Réaction entre le MG **1** et un α-aminoazahétérocycle **2** et structures des différents isomères formés

Cette réaction s'effectue en solution aqueuse, le MG étant en fort excès par rapport à l'α-aminoazahétérocycle. On observe ainsi la formation d'adduits cycliques portant un groupement carboxyle, deux groupements hydroxyles et deux groupements méthyles. Cette réaction est régiosélective car, malgré le grand nombre de sites réactifs un seul type d'adduits est obtenu. De plus, ces composés comportent trois atomes de carbone asymétriques or, parmi les huit stéréoisomères attendus pour chaque adduit, seuls quatre sont formés et séparables sous forme de deux mélanges racémiques **a** (majoritaire) et **b** (minoritaire). Cette réaction est donc stéréosélective.

Dans la suite de ce travail, un seul énantiomère du mélange racémique sera représenté.

Par analogie avec un mécanisme décrit pour la réaction du MG avec l'arginine (Oya, 1999), un mécanisme a été proposé pour expliquer la formation de ces adduits (Schéma 2) (Routaboul, 2003).

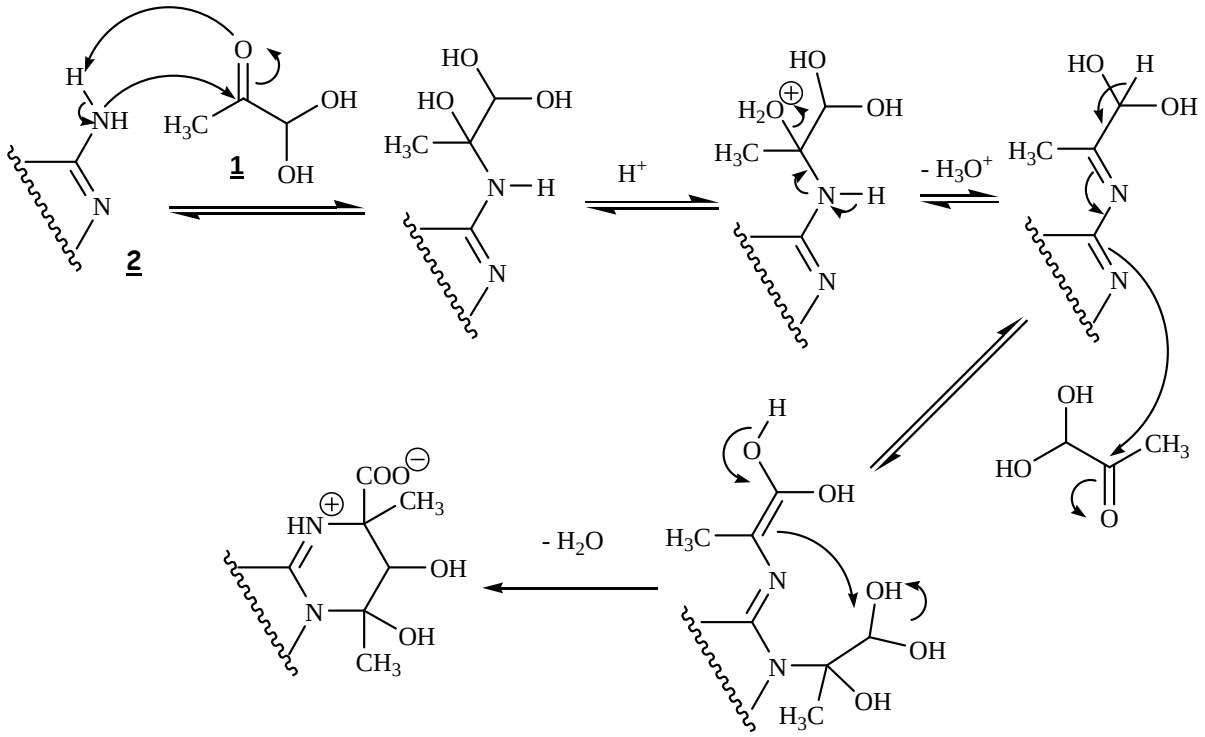


Schéma 2 : Mécanisme proposé pour la réaction entre le MG et un α-aminoazahétérocycle

La réaction commence par une addition nucléophile de l'amine extracyclique sur l'atome de carbone de la fonction cétone du MG qui aboutit à la formation d'une imine. Puis une addition nucléophile de l'atome d'azote intracyclique sur l'atome de carbone de la

fonction cétone d'une deuxième molécule de MG se produit. Enfin, une liaison carbone – carbone est formée en raison de la proximité de sites réactifs aboutissant à la création d'un cycle à 6 atomes. C'est au cours de cette étape que s'établit la stéréosélectivité de la réaction conduisant à un zwitterion dont la structure a été observée lors d'études de cristallographie aux rayons X pour certains adduits (Routaboul, 2002).

1.2.2. Réactivité des adduits formés

La réactivité des adduits formés a aussi été étudiée. Ils présentent une grande stabilité en milieu acide. Par contre, en milieu basique les adduits du MG sur la 2-aminopyridine **5** possèdent une réactivité particulière. En présence d'une solution aqueuse concentrée de NaOH, en plus de la 2-aminopyridine **4**, il se forme un produit **6** issu de trois réactions successives (décarboxylation, déshydratation et oxydation) (Schéma 3).

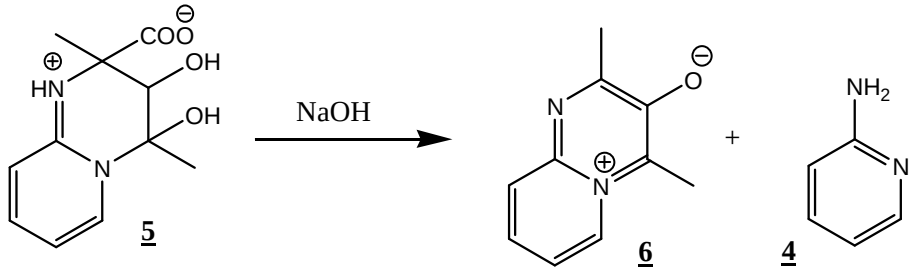


Schéma 3 : Réactivité en milieu basique des adduits du MG sur la 2-aminopyridine **5**

Ce composé **6** fait partie d'une deuxième famille de composés que nous appellerons famille II et qui fera l'objet d'une partie de notre travail.

2. Propriétés biologiques des adduits formés

Le composé de la famille II **6** présente une parenté structurale avec une famille d'activateur des canaux ioniques CFTR. Les composés des familles I et II ont donc été évalués en tant que modulateurs de cette protéine par l'équipe du Professeur Frédéric Becq au sein de l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaire (Université de Poitiers/CNRS UMR 6187).

L'ensemble des produits synthétisés a été criblé grâce à un test cellulaire basé sur la technique des efflux d'ions iodures radioactifs $^{125}I^-$ incorporés dans le milieu intracellulaire. La protéine CFTR est un canal qui permet la sortie des ions chlorures des cellules. Il a été montré que les deux radiotraceurs $^{125}I^-$ et $^{36}Cl^-$ pouvaient être considérés comme équivalents pour la mesure de l'activité d'un canal chlorure (Venglarik, 1990).

Le test d'efflux est réalisé comme suit : les cellules sont incubées dans un milieu contenant les ions iodures radioactifs $^{125}I^-$, la constante de vitesse de sortie de la cellule des $^{125}I^-$ en présence d'un activateur connu de CFTR est mesurée, puis les molécules à tester sont ajoutées. On observe ainsi la variation de la constante de vitesse. Si cette constante augmente, il s'agit d'un potentiateur, si elle diminue, il s'agit d'un inhibiteur.

Les cellules utilisées pour réaliser ces tests étaient de type CHO-wt (Chinese Hamster Ovary surexprimant le gène sauvage). Cette évaluation par le test d'efflux d'ions iodures radioactifs a permis la mise en évidence d'une molécule potentiatrice et de plusieurs molécules inhibant la protéine CFTR dont certaines sont représentées dans le Tableau 1.

	IC_{50} (Cellules CHO-wt)			EC_{50} (Cellules CHO-wt)
Composés (ratios a/b déterminés par RMN)	**GPinh-5a**	**GPinh-4a,b** (60/40)	**GPinh-12**	**GPact-11a**
	71 ± 1 pM	5,7 ± 1,3 µM	5,1 ± 1,4 nM	2,1 ± 1,3 µM

Tableau 1 : Principales molécules inhibitrices et molécule potentiatrice de la protéine CFTR mises en évidence

Les valeurs, déterminées par le test d'efflux, correspondent aux IC_{50} (Concentrations nécessaires pour inhiber 50% de l'activité) ou EC_{50} (Concentration nécessaire pour augmenter de 50% l'activité).

3. La protéine CFTR (Sheppard, 1999 ; Riordan, 2008)

Cette protéine est impliquée dans de nombreuses pathologies notamment dans la mucoviscidose. A l'origine de cette maladie, diverses mutations génétiques conduisent à une faible activité ou à une absence d'activité de la fonction d'efflux d'ions chlorures par le canal CFTR. Des activateurs de cette protéine pourraient donc être envisagés dans le traitement de la mucoviscidose. Inversement, dans le cas de diarrhées à agents infectieux (comme le choléra), responsable d'une forte mortalité dans les pays en voie de développement, la protéine CFTR est suractivée. Des molécules pouvant inhiber le fonctionnement de cette protéine permettraient de diminuer la perte de sel et d'eau due à cette suractivation.

3.1. Description

Le gène CF (CF pour Cystic Fibrosis) a été découvert en 1989 (Riordan, 1989). Il contient 27 exons s'étendant sur 250 kb du chromosome 7, en 7q31, et code pour un ARNm (Acide RiboNucléique messager) de 6,5 kb (van der Deen, 2005). La protéine traduite à partir de cet ARNm est nommée CFTR et fait partie de la super famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassettes) (ATP : Adénosine 5'-TriPhosphate).

Ces transporteurs sont retrouvés chez de nombreuses espèces tant procaryotes qu'eucaryotes. Chez l'homme, on dénombre 48 transporteurs ABC dont, outre CFTR, la P-gP (glycoprotéine P), la MRP (multidrug resistance-associated protein) et le récepteur aux sulfonylurées (SUR) (Linton, 2007). Ainsi la protéine CFTR est aussi appelée ABCC7.

La plupart de ces transporteurs assurent le passage par transport actif à travers la membrane cellulaire d'une large variété de substrats. Une des caractéristiques de cette famille est la présence au sein de la protéine de domaines dits NBD (Nucleotides Binding Domains). Ces domaines de fixation aux nucléotides permettent la liaison de l'ATP dont l'hydrolyse va fournir l'énergie nécessaire au transport transmembranaire. Au sein de cette famille, la protéine CFTR est atypique puisqu'elle n'exerce pas une fonction de transporteur mais une fonction canal chlorure.

La protéine CFTR est composée de 1480 acides aminés répartis en deux séquences homologues, comportant chacune six domaines trans-membranaires et un domaine de fixation des nucléotides (NBD-1 et -2) (Figure 2)

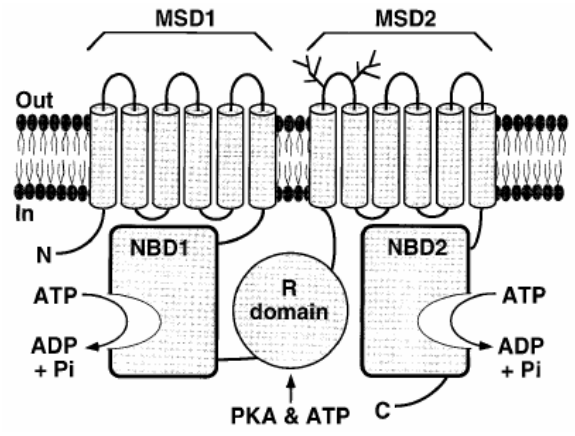


Figure 2 : Schéma de structure de la protéine CFTR (Sheppard, 1999)

Ces deux séquences sont reliées entre elles par un domaine régulateur R. Les douze domaines transmembranaires (MSD) délimitent un canal ionique dont l'activité est déterminée par la phosphorylation du domaine R. Les régions N et C terminales de la protéine sont cytoplasmiques. Le domaine R est très spécifique du canal CFTR puisque les autres protéines de la famille ABC ne possèdent pas de domaine régulateur. Les NBD comprennent trois séquences très conservées qui sont impliquées dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP lié à un contre-ion magnésium : les motifs Walker A et B et le motif LSGGQ.

3.2. Biosynthèse, maturation (Vankeerberghen, 2002 ; Riordan, 2005)

Après sa traduction, la protéine CFTR est *N*-glycosylée au sein du réticulum endoplasmique (RE). Puis des protéines chaperonnes, telles Hsp70 (Heat Shock Protein) et la calnexine, permettent son repliement correct et son passage vers l'appareil de Golgi. Dans ce compartiment, les résidus glysosyles sont ajoutés ce qui permet à la protéine CFTR mature d'être adressée à la membrane cytoplasmique dans laquelle elle s'insère (Figure 3).

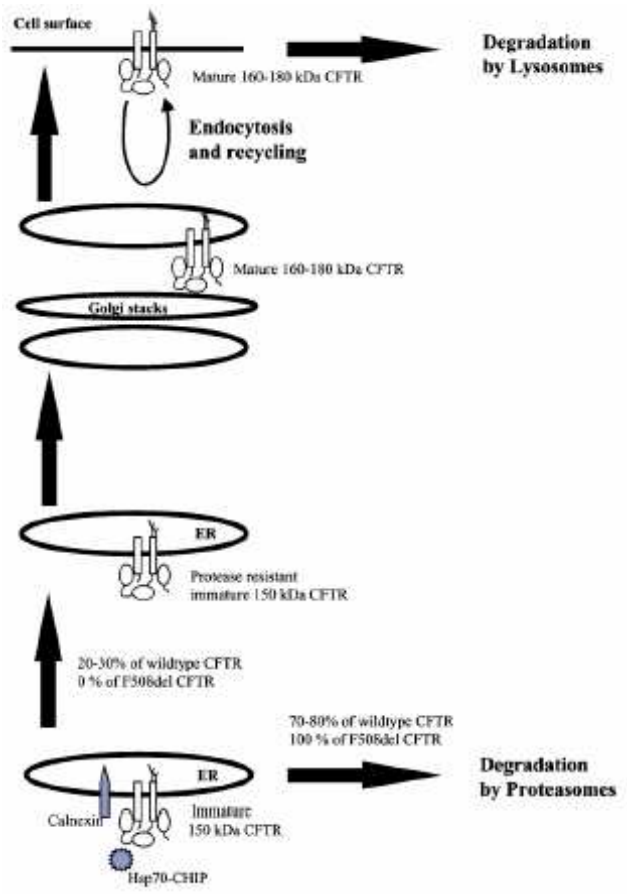


Figure 3 : Biosynthèse de la protéine CFTR sauvage (Vankeerberghen, 2002)

Du fait de l'enchaînement complexe de séquences hydrophiles et hydrophobes, la maturation de la protéine CFTR sauvage est peu efficace. Seulement 20 à 50 % des précurseurs nouvellement synthétisés seront transformés en molécules matures. Les précurseurs mutés dont le repliement est incorrect sont rapidement dégradés par le protéasome avant d'atteindre l'appareil de Golgi (demi-vie de 20 à 40 minutes). Le faible taux de maturation de la protéine CFTR n'est pas une caractéristique des transporteurs ABC puisque certains atteignent un degré de maturation de près de 100 %.

3.3. Localisation

La protéine CFTR mature est principalement localisée dans la membrane apicale des cellules épithéliales polarisées. Le rôle de l'épithélium est de former une barrière continue et asymétrique séparant deux milieux distincts. Soit l'épithélium sépare le compartiment externe du milieu interne, soit il délimite un espace spécialisé (glande exocrine). Les cellules épithéliales présentent une organisation polarisée selon un axe baso-latéral apical, la face apicale étant en contact avec le compartiment muqueux et la face basale reposant sur un tissu de soutien (lame basale). Ainsi la protéine CFTR est principalement retrouvée au niveau intestinal, pulmonaire, pancréatique et dans les glandes sudoripares (Sheppard, 1999).

3.4. Les mutations de CFTR

En juin 2008, 1568 mutations étaient répertoriées sur le site du Consortium International d'Analyse Génétique de la Mucoviscidose (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr). La majorité des mutations sont des mutations ponctuelles, cependant quelques grandes délétions sont également reportées. Les principales mutations et leur fréquence au niveau mondial sont représentées dans le tableau 2.

Nom de la mutation	Fréquence (%)
DelF508	**66,0**
G542X	2,4
G551D	1,6
N1303K	1,3
W1282X	1,2
R553X	0,7
621+1G->T	0,7
1717-1G->A	0,3
R117H	0,3
R1162X	0,3
R347P	0,2
3849+10kbC->T	0,2
DelI507	0,2

Tableau 2 : Principales mutations du gène CF (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr) (juin 2008)

3.4.1. La mutation ΔF508

La mutation la plus fréquente est une délétion de trois nucléotides aboutissant à l'élimination d'une phénylalanine en position 508 (ΔF508 ou delF508) entraînant la traduction d'une protéine modifiée qui n'atteint pas la membrane cellulaire par suite d'un défaut de maturation. Cette mutation, située sur NBD1, perturbe le repliement de CFTR lors du processus de maturation aboutissant à une glycosylation incomplète. La protéine mutée est retenue dans le RE par Hsp70 et par la calnexine où elle est dégradée par le protéasome et d'autres complexes protéolytiques (Sheppard, 1999).

In vitro, il est possible de restaurer un adressage correct à la membrane cellulaire de la protéine CFTR/ΔF508 par diminution de la température de culture des cellules à 27°C (Denning, 1992). Ceci serait dû à la diminution de la force de l'interaction entre CFTR/ΔF508 et les Hsp, permettant ainsi la maturation de CFTR mutée. Une fois insérée dans la membrane, la protéine ΔF508/CFTR présente une activité canal chlorure dépendante de l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) (Frizzell et al, 1995). Toutefois, cette activité est inférieure à celle de la protéine sauvage.

Dans la population française, cette mutation représente approximativement 65-70 % des chromosomes CF, avec de fortes variations régionales allant de 64 % en Languedoc-Roussillon à 81 % en Bretagne occidentale (Observatoire National de la Mucoviscidose (ONM), 2001). L'analyse de marqueurs intra-géniques associés à ΔF508 suggère qu'un seul événement mutationnel est à l'origine de la maladie (Morral, 1994).

Pour expliquer la fréquence élevée de la mutation dans les populations européennes, l'hypothèse d'un avantage sélectif des hétérozygotes a été avancée (Rowntree, 2003).

En effet, les hétérozygotes semblent mieux protégés de la déperdition hydrique et saline induite au cours des diarrhées dues à des entérotoxines, comme *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae* (Hogenauer, 2000). Les toxines produites par ces bactéries augmentent la concentration d'AMPc ou de GMPc (Guanosine MonoPhosphate cyclique) dans les entérocytes et entraînent une augmentation de la sécrétion d'ions chlorures. Il a été montré dans des modèles murins que les hétérozygotes présentent une réduction de 50 % de l'activité globale de la protéine CFTR. Leur sécrétion d'ions chlorures en réponse aux toxines bactériennes sera donc moins élevée que celle des sujets non transmetteurs : la déperdition hydrique sera donc moins importante et la survie prolongée (Gabriel, 1994).

En outre, il a été rapporté que la première boucle extracellulaire de la protéine CFTR sauvage est nécessaire à l'internalisation de *Salmonella typhi* dans les cellules épithéliales intestinales (Pier, 1998). La protéine ΔF508, qui est faiblement présente à la surface des

épithéliums, diminuerait ainsi l'entrée du pathogène dans les cellules de l'épithélium intestinal assurant une protection vis-à-vis de l'infection.

Cependant, les auteurs d'une étude de modélisation épidémiologique suggèrent que ni les épidémies de choléra ni celles de fièvre typhoïde n'ont pu présenter une pression de sélection suffisante pour expliquer la prévalence de la mutation ΔF508 (Poolman, 2007). Ces auteurs considèrent par contre, que la tuberculose présenterait les caractéristiques historiques et géographiques suffisantes pour exercer cette pression de sélection.

3.5. Fonction

3.5.1. Canal ionique (Sheppard, 1999)

La protéine CFTR est un canal à spécificité anionique. Les ions Cl^- sont 10 à 30 fois plus perméants que les ions Na^+. Cette spécificité résulte notamment de la présence de deux résidus lysines K95 et K335. La perméance est supérieure pour les ions qui possèdent une sphère d'hydratation de faible diamètre. La séquence de perméabilité pour les halogénures est la suivante : $Br^- > Cl^- > I^- > F^-$. La partie du pore la plus resserrée a un diamètre d'environ 5,3 Å. CFTR est un canal à faible intensité de courant (7-10 pS) avec une relation courant-potentiel linéaire.

3.5.2. Régulations d'autres canaux transmembranaires (Schwiebert, 1999 ; Vankeerberghen, 2002)

La protéine CFTR n'est pas seulement un canal ionique, mais également, comme son nom l'indique, un puissant régulateur du fonctionnement de nombreux canaux et transporteurs influant sur la conductance membranaire (Figure 4).

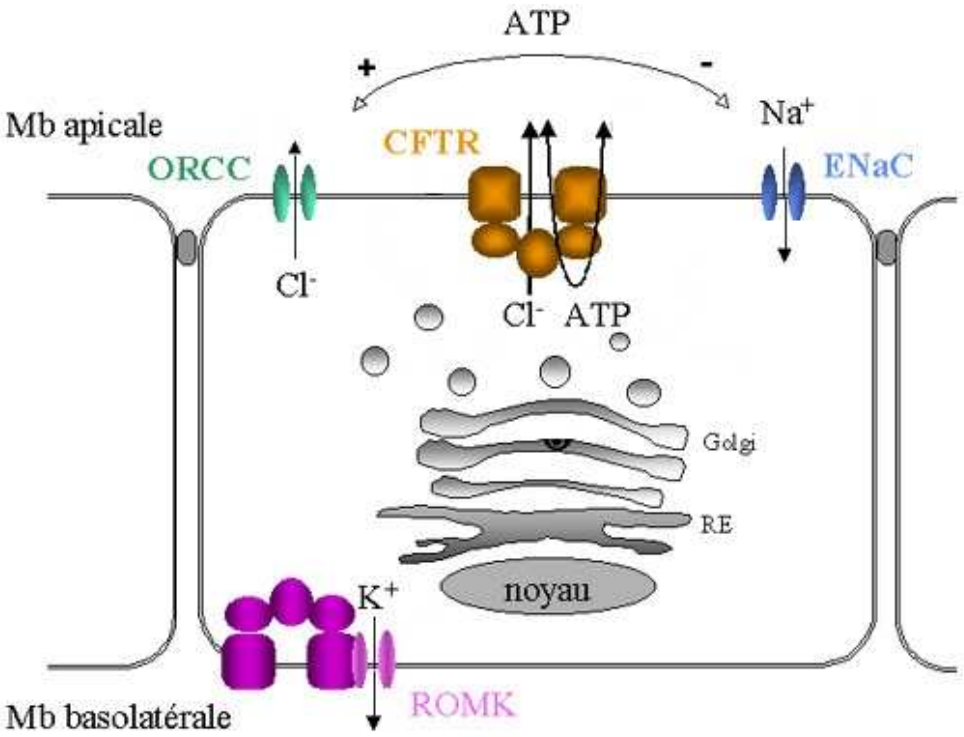


Figure 4 : Rôle de CFTR dans la régulation d'autres canaux ioniques

3.5.2.1. Régulation du canal ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel)

Le canal chlorure rectifiant sortant (ORCC) est une protéine dont on a longtemps pensé qu'elle était impliquée dans le défaut de conductance membranaire retrouvé dans la mucoviscidose. Des études d'interactions ont montré que la présence de CFTR fonctionnelle était indispensable à l'activation du canal ORCC par la Protéine Kinase A, probablement par un mécanisme autocrine.

3.5.2.2. Régulation du canal ENaC (Epithelium Sodium Channel)

Ce canal de transport des ions Na^+, aussi appelé canal sodique sensible à l'amiloride, est responsable de l'influx d'ions sodium au pôle apical de la cellule épithéliale. L'absorption accrue de sodium, dans les épithéliums respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, démontre un contrôle négatif de la protéine CFTR normale sur le canal ENaC (Mall, 1998).

3.5.2.3. Interaction avec ROMK

Dans certaines cellules, il a été démontré que la présence du canal CFTR influence l'activation par l'AMPc des canaux potassium épithéliaux (Loussouarn, 1996). Un canal potassium a été identifié sur la membrane apicale des cellules épithéliales des voies respiratoires : ROMK1. La protéine CFTR pourrait être couplée avec ROMK dans la membrane cellulaire, procurant à ces canaux une sensibilité à différents stimuli (Konstas, 2002). CFTR serait ainsi capable de transférer les effets d'agonistes et d'antagonistes sur d'autres protéines avec lesquelles elle est liée, modulant de ce fait leur activité.

3.5.2.4. Régulation d'autres canaux chlorures

La protéine CFTR activerait également les canaux chlorures calcium-dépendants et volume-dépendants. Ceci provoque une sécrétion d'ions chlorures supplémentaires.

3.5.2.5. Régulation d'un canal à ATP

Des informations contradictoires existent concernant le transport ou non d'ATP par le canal CFTR. Des données récentes, indiquent qu'une perméance à l'ATP liée au fonctionnement de CFTR est retrouvée dans certaines cellules. Cela indiquerait l'existence d'un canal ATP différent de la protéine CFTR mais régulé par cette dernière (Vankeerberghen, 2002).

3.5.3. Autres fonctions

La physiopathologie de la mucoviscidose qui dépasse les simples désordres des mouvements ioniques, ainsi que le faible taux d'expression de CFTR au niveau pulmonaire ont conduit à penser que cette protéine possède d'autres fonctions. Ainsi, la protéine CFTR est supposée être impliquée dans la sécrétion des constituants du mucus, les processus de recyclage des membranes cellulaires ou la composition ionique du compartiment intracellulaire (Vankeerberghen, 2002).

3.6. Mode d'action du canal chlorure

De nombreux modèles ont été proposés pour expliquer le mode d'action du canal CFTR. Ces modèles font tous appel à différents états, ouverts ou fermés, de CFTR et accordent un rôle différent à NBD1 et à NBD2. Pour la plupart des auteurs, la liaison de l'ATP aux deux NBD, suivie de l'hydrolyse de l'ATP au niveau de NBD1, permet l'association de ces deux domaines entraînant l'ouverture du canal ionique. Inversement, l'hydrolyse de l'ATP sur NBD2 entraîne sa fermeture (Sheppard, 1999).

Une autre hypothèse de fonctionnement a été proposée par Hanrahan et al (Hanrahan, 2004). D'après ces auteurs, le canal CFTR pourrait s'ouvrir de deux façons différentes. La première décrite précédemment est dépendante de l'ATP et nécessite la présence d'ions magnésium. Le deuxième mode, appelé ouverture non hydrolytique (non hydrolytic gating), ne fait pas intervenir l'hydrolyse de l'ATP. En effet, la fixation d'une seule molécule d'ATP sur le domaine NBD1 pourrait entraîner l'interaction de NBD1 avec le domaine NBD2 et permettre le maintien d'une conformation ouverte du canal CFTR.

3.7. Régulation (Sheppard, 1999)

La phosphorylation du domaine R conditionne la probabilité d'ouverture du canal CFTR. En effet, une phosphorylation importante favorise le maintien d'une conformation ouverte. Cette phosphorylation est réalisée par la PKA (Protéine Kinase A) et la PKC (Protéine Kinase C). À l'inverse, la Protéine Phosphatase 2A (PP2A) déphosphoryle le domaine R (Figure 5).

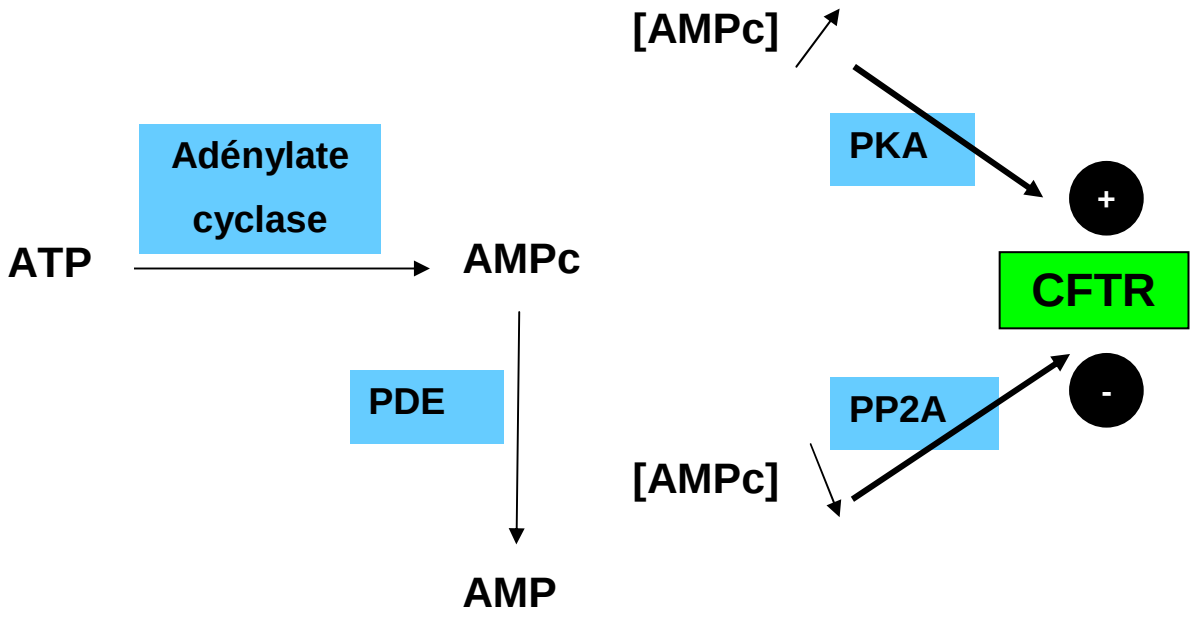


Figure 5 : Régulation de la protéine CFTR

L'activité des protéines kinases est sous le contrôle du taux d'AMPc : plus ce taux est élevé, plus leur activité est importante. L'AMPc est produite par l'adénylate cyclase et sera dégradée par les phosphodiestérases, régulant de ce fait sa concentration.

Lorsque le canal est ouvert, le transport de Cl^- est sous la dépendance de l'ATP, dont l'hydrolyse au niveau des NBD fournit l'énergie nécessaire à ce transport. La concentration intracellulaire en ATP, ainsi que le rapport des concentrations en ATP, ADP (Adénosine DiPhosphate) et AMP (Adénosine MonoPhosphate) régulent le transport d'ions chlorures via CFTR. L'AMP et l'ADP sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP puisqu'ils peuvent se lier au niveau des NBD, sur le même site de fixation, mais ne permettent pas, par leur hydrolyse, l'apport d'énergie nécessaire au transport (Schultz, 1995).

4. La Mucoviscidose

4.1. Historique (Roussey, 2000)

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques létales dans les populations d'origine caucasienne. Cette maladie serait apparue il y a plusieurs milliers d'années, avant de se répandre sur l'ensemble des continents. Dès le XVIIème siècle, la littérature fait mention de cette maladie, mais c'est en 1936 que la première description clinique est réalisée par le professeur Guido Fanconi. Elle est basée sur l'association d'une fibrose kystique congénitale du pancréas et d'une bronchectasie. Il lui donne le nom de mucoviscidose en référence aux mots mucus et visqueux. La dénomination anglaise « Cystic Fibrosis » est basée sur l'autre manifestation principale de la maladie : la fibrose kystique du pancréas.

Il faut attendre 1953 pour que soit proposé le premier diagnostic spécifique de cette maladie par le professeur Di Sant Agnese par l'intermédiaire du test de la sueur. Ce test est basé sur l'observation d'un excès de chlorure de sodium dans la sueur des enfants atteints. Cette anomalie fut précisée dans les années 1980 : elle correspond à un défaut de perméabilité aux ions chlorures des cellules épithéliales.

Le caractère héréditaire de la maladie étant supposé, la recherche s'est orientée vers l'identification du locus du gène impliqué. Cela fut réalisé en 1985 par clonage positionnel : le locus est situé sur le bras long du chromosome 7.

Quatre ans plus tard, une étape importante est franchie lorsque l'équipe du professeur Lap Chee Tsui découvre l'anomalie génétique qui est à l'origine de la maladie. Il s'agit d'une mutation en 7q31, au niveau du gène qui sera appelé gène CF codant pour une protéine nommée « Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator » (Riordan, 1989).

La mucoviscidose est une maladie polymorphe ; en effet, les différentes mutations entraînent de nombreuses manifestations cliniques très différentes. C'est une maladie autosomique récessive qui s'exprime uniquement pour les sujets homozygotes présentant une même mutation et les hétérozygotes composites à deux mutations.

4.2. Les différentes classes de mucoviscidose

4.2.1. Classification de Welsh et Smith

Il existe un grand nombre de mutations qui ont été classées en fonction de leurs conséquences au niveau biochimique. Elles ont tout d'abord été divisées en quatre classes différentes (Welsh, 1993) (Figure 6).

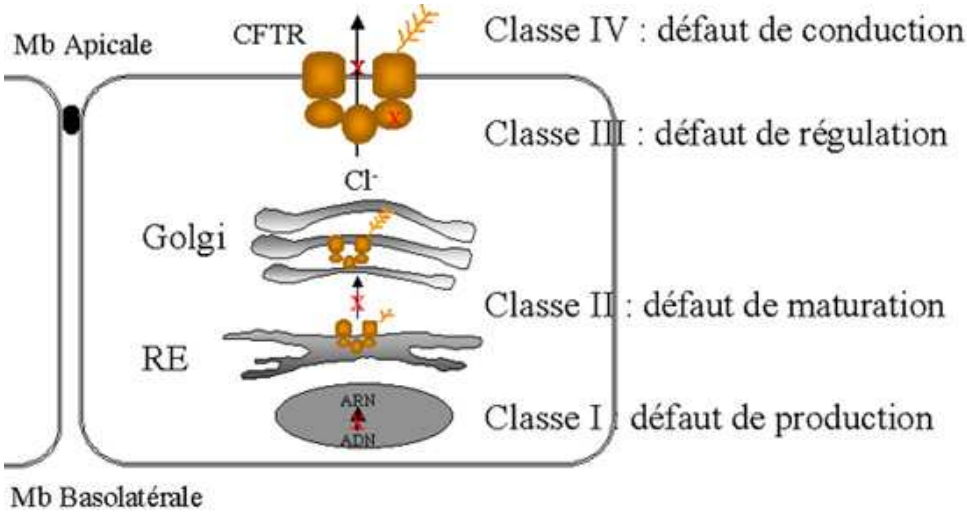


Figure 6 : Classification des mutations du gène CF d'après Welsh et Smith

4.2.1.1. Classe I : Défaut de production de la protéine

Ce type de mutation entraîne une absence totale ou partielle de la protéine. Ceci inclut les mutations non-sens et les mutations produisant un codon stop prématuré, ainsi que les mutations entraînant un ARNm muté instable. Exemple : R553X (Remplacement d'une arginine en position 553 par un autre acide aminé).

4.2.1.2. Classe II : Défaut de maturation

La protéine issue de l'ARNm muté subit, en raison de sa structure modifiée, une maturation incorrecte et/ou un défaut d'adressage. Ce type de mutation entraîne un déficit qualitatif et/ou quantitatif de protéines insérées dans la membrane apicale. Exemple : ΔF508 (Délétion d'une phénylalanine en position 508).

4.2.1.3. Classe III : Défaut de régulation du canal Cl^-

La protéine est située dans la membrane, mais ne peut être activée du fait, soit d'une mutation sur le domaine R empêchant les phosphorylations nécessaires à son activation, soit d'une mutation située sur les domaines NBD ne permettant pas la fixation ou l'hydrolyse de l'ATP. Exemple : G551D (Remplacement d'une glycine en position 551 par l'acide aspartique).

4.2.1.4. Classe IV : Défaut de conductance

La protéine est correctement située dans la membrane, elle peut être activée et régulée, cependant le canal transmembranaire définissant le pore ionique est anormal. Ceci entraîne un défaut de conductance ionique par diminution du flux d'ions ou par modification de la sélectivité. Exemples : R117H (Remplacement d'une arginine en position 117 par l'histidine), R334W (Remplacement d'une arginine en position 334 par le tryptophane).

4.2.2. Nouvelle classification (Vankeerberghen, 2002)

D'autres auteurs ont par la suite proposé une classification selon six critères. La classe I a ainsi été subdivisée en classe I et en classe V, cette dernière comprenant des mutations altérant la stabilité de l'ARNm de CFTR et la classe VI a été ajoutée (Figure 7).

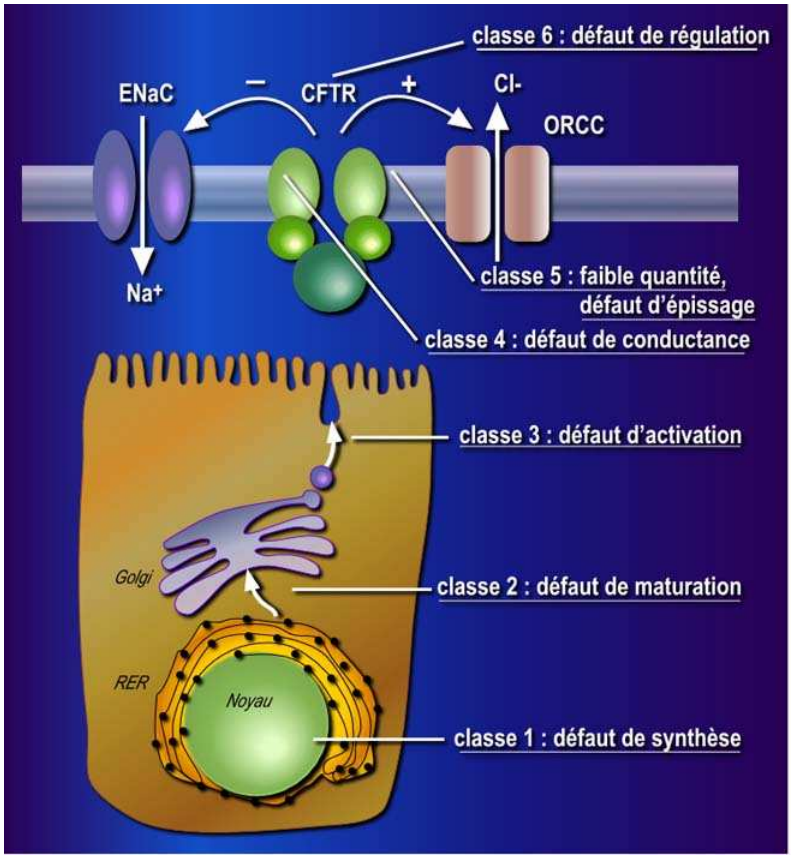


Figure 7 : Classification de la mucoviscidose en six classes

4.2.2.1. Classe I (redéfinie) : Défaut de synthèse

La mutation entraîne une absence de l'ARNm ou la synthèse d'un ARNm instable. Cette classe comprend donc les mutations non-sens et les mutations produisant un codon stop prématuré (décalage du cadre de lecture ou ARNm tronqué).

4.2.2.2. Classe V : Défaut d'épissage et quantité d'ARNm

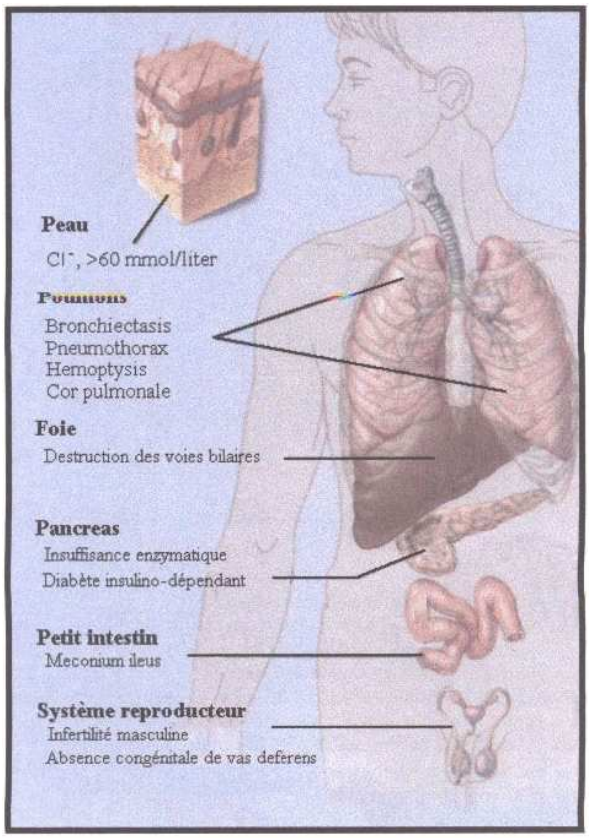
La mutation se situe au niveau du promoteur entraînant une protéine fonctionnelle, mais dont la quantité est anormalement faible, ou alors la mutation perturbe l'épissage alternatif aboutissant à une protéine non fonctionnelle. Exemple : 3849 + 10 kb C/T.

4.2.2.3. Classe VI : Défaut de régulation

Ce type de mutations provoque un défaut de régulation des autres canaux ioniques par la protéine CFTR. Cette classe n'est pas utilisée par tous les auteurs.

4.3. Symptômes cliniques (Roussey, 2000)

L'âge d'apparition des premiers symptômes est très variable. Les poumons sont généralement normaux à la naissance, alors que les lésions pancréatiques et les anomalies du mucus intestinal sont fréquemment présentes dès la phase fœtale (Figure 8).



D'après Ackerman et Clapham, 1997.

Figure 8 : Les différentes manifestations de la mucoviscidose

4.3.1. Manifestations respiratoires

Ces manifestations sont liées à l'obstruction des bronches, plus précisément des bronchioles, par un mucus épais et visqueux qui favorise la croissance des microorganismes et engendre des détresses respiratoires. Les signes respiratoires et les infections des voies aériennes sont, d'une manière générale, les plus fréquents. Ils conditionnent le pronostic vital et la qualité de vie.

Les infections bronchiques sont attribuables à trois principaux germes pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza*, et surtout *Pseudomonas aeruginosa*. Ce

dernier constitue le principal souci infectieux et marque le plus souvent un tournant évolutif péjoratif de la maladie. Les conséquences de ces infections chroniques sont l'apparition de kystes et d'abcès pulmonaires. La fibrose post-inflammatoire aboutit à une insuffisance respiratoire majeure. En effet, le système immunitaire détecte ces bactéries et envoie des cellules dans le but de les détruire. Ces cellules sont par la suite engluées au sein du mucus. En tentant de détruire les bactéries, les cellules immunitaires endommagent également le tissu pulmonaire, par l'intermédiaire d'un syndrome inflammatoire sévère.

Les poumons sont donc triplement touchés : ils sont la cible d'infections bactériennes récidivantes, les bronches sont obstruées par le mucus et les tissus pulmonaires sont attaqués par le système immunitaire avec inflammation et apparition de lésions.

4.3.2. Manifestations digestives

L'iléus méconial est dans 10 % des cas la manifestation initiale de la maladie. C'est une occlusion néonatale aiguë due à une insuffisance de sécrétion protéolytique par le pancréas et les glandes intestinales au cours de la vie foetale.

L'insuffisance pancréatique est présente dans 90 % des cas et entraîne une maldigestion. Cette mauvaise digestion sera responsable d'une carence secondaire en vitamines liposolubles (A, D, E et K) et en oligoéléments conduisant à un retard de croissance staturale et pondérale.

De plus, l'accumulation d'enzymes pancréatiques peut aboutir à un processus d'autodigestion exposant les patients à des pancréatites aiguës. Les lésions pancréatiques se manifestent par une obstruction des canaux proximaux par des sécrétions visqueuses, des acini peu développés, voire détruits, une fibrose et progressivement la destruction du tissu pancréatique.

La fibrose pancréatique peut s'étendre aux îlots de Langherans et, dans 5 à 10 % des cas, induire à l'adolescence un diabète insulinodépendant.

4.3.3. Manifestations hépatiques

Un ictère rétentionnel dû à une bile trop épaisse peut être révélateur en période néonatale. En effet, l'atteinte hépatobiliaire est fréquente, mais ne conduit à la cirrhose que dans 5 à 10 % des cas. On notera aussi une vésicule biliaire souvent atrophiée chez les

malades, avec un risque de lithiase important, augmentant avec l'âge. On retrouve également une hépatomégalie dans 30 % des cas et une insuffisance hépatique dans 9 % des cas. Ces éléments sont liés à l'obstruction des voies biliaires intra-hépatiques. Une obstruction des voies biliaires extra-hépatiques par compression au niveau du pancréas est également fréquemment retrouvée.

4.3.4. Manifestations génitales

Les hommes atteints sont généralement stériles par atrésie des canaux déférents entraînant une azoospermie ou une oligospermie sévère. On retrouve fréquemment des lésions de la prostate et des vésicules séminales. Chez les femmes, il existe une hypofertilité par modification de la glaire cervicale. Cette modification de la glaire peut provoquer la formation d'un bouchon de mucus qui empêche la pénétration du spermatozoïde dans l'utérus. On notera que, parmi les patients souffrant de mucoviscidose, 98 % des hommes sont stériles, alors que 80 % des femmes sont fertiles.

4.3.5. Causes de décès

En accord avec la physiopathologie de cette maladie, l'atteinte pulmonaire est de loin la plus fréquente des causes de mortalité, représentant à elle seule les trois quarts des décès (Tableau 3).

	Nombre de décès	%
Cause respiratoire	40	75,5
Cause cardiaque	2	3,8
Cause hépatique	1	1,9
Cause traumatique	1	1,9
Suicide	2	3,8
Autres causes	4	7,5
Non documenté	3	5,7

Tableau 3 : Cause de décès des patients atteints de mucoviscidose en France en 2001 (ONM)

4.4. Corrélations génotype/phénotype (Vankeerberghen, 2002 ; Rowntree, 2003)

De manière générale, la connaissance du génotype d'un individu ne permet pas de prévoir la symptomatologie et l'évolution de la maladie. En effet, l'atteinte pulmonaire, l'âge des premières manifestations de la maladie ainsi que le taux de chlorure sudoral ne peuvent être reliés à un génotype particulier.

Toutefois, l'état de la fonction pancréatique est fortement corrélé au génotype de CFTR et les individus portant certaines mutations présentent une symptomatologie similaire. La mutation A455E est, par exemple, fortement associée à une bonne fonction pulmonaire. Des études ont montré que les sujets hétérozygotes ΔF508 / A455E possédaient une fonction pulmonaire améliorée ainsi qu'un taux de colonisation par le bacille pyocyanique (*Pseudomonas aeruginosa*) inférieur aux sujets homozygotes ΔF508 de la même population. L'analyse génotypique est parfois compliquée du fait d'une deuxième mutation en *cis* sur le même allèle influençant le phénotype.

4.5. Traitements actuels

Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement curatif de la mucoviscidose. L'arsenal thérapeutique se compose donc uniquement de traitements symptomatiques et préventifs administrés aux patients dans le but de freiner l'évolution de la maladie et/ou d'améliorer leur qualité de vie. L'ensemble de ces traitements a permis une augmentation considérable de l'espérance de vie des patients au cours des ces dernières décennies.

4.5.1. Traitement de l'inflammation

Le processus inflammatoire est un moyen essentiel de protection de l'appareil respiratoire face aux agents bactériens. Cependant, l'inflammation chronique est également responsable de la dégradation pulmonaire (Cf Intro 3.2.3.1). Il semble nécessaire de privilégier un traitement anti-inflammatoire précoce afin de retarder la progression de l'atteinte, soit par des anti-inflammatoires non stéroïdiens, le plus couramment utilisé est l'ibuprofène, soit par les corticoïdes. Ces derniers sont très efficaces sur l'inflammation mais

de nombreux effets indésirables en découlent. Les corticoïdes inhalés en aérosols doseurs semblent plus intéressants.

4.5.2. Produits agissant sur la viscosité du mucus

Ces molécules agissent en cassant les liaisons covalentes qui permettent à la mucine de former de longues chaînes de polymère. La *N*-acétylcystéine est l'agent mucolytique le plus largement utilisé par voie orale. Le Pulmozyme®, ou Dornase α, a pour principe actif une désoxyribonucléase recombinante humaine. Dans les sécrétions pulmonaires, les concentrations en ADN extracellulaire sont très élevées. La Dornase α hydrolyse l'ADN du mucus et diminue la viscosité des expectorations.

4.5.3. Traitements antibiotiques

La surinfection broncho-pulmonaire est le problème majeur auquel sont confrontés les patients. Les germes prédominant sont *S. aureus* et *P. aeruginosa*. D'autres germes sont aussi retrouvés, avec notamment *H. influenzae*, et *Burkholderia cepacia*.

Les antibiotiques utilisés appartiennent essentiellement à trois familles : les β-lactamines, les aminosides, les fluoroquinolones et sont utilisés par voie orale, intraveineuse ou par aérosol.

4.5.4. Bronchodilatateurs

La classe thérapeutique utilisée est celle des ß-2-mimétiques. Trois situations peuvent justifier l'utilisation des ß-2-mimétiques : au long cours en période stable, avant le début de la séance de kinésithérapie ou pendant les périodes d'exacerbation.

4.5.5. Kinésithérapie respiratoire

Les séances de kinésithérapie sont réalisées par un kinésithérapeute, par l'un des parents ou par le patient lui-même. Ces séances consistent à évacuer le mucus contenu dans les poumons afin d'améliorer la respiration. Malgré les grandes avancées des traitements

médicamenteux, la kinésithérapie reste le seul moyen d'évacuer de manière efficace le mucus qui ne parvient pas à être expulsé de manière naturelle par la toux.

4.5.6. La transplantation

La greffe pulmonaire peut apparaître comme l'ultime recours lorsque la qualité de vie est sérieusement détériorée par l'évolutivité et la gravité de la maladie. L'insuffisance respiratoire se soldant par une dépendance au traitement maximaliste (antibiothérapie intensive répétée, assistance nutritionnelle, oxygénothérapie…). Cependant cette option thérapeutique présente des risques immédiats mais également à plus long terme, avec les risques de rejet du greffon et les effets indésirables des immunosuppresseurs.

4.5.7. Extraits pancréatiques

La fibrose kystique du pancréas est la cause de l'insuffisance pancréatique exocrine observée chez les patients atteints de mucoviscidose. Il est donc nécessaire, afin de permettre au patient d'avoir une alimentation libre, d'ajouter une supplémentation en extraits pancréatiques comme la Pancréatine (Créon®).

4.5.8. Mucoviscidose et diabète

La fibrose pancréatique peut s'étendre et entraîner une destruction des îlots de Langerhans touchant de ce fait la sécrétion endocrine. La carence en insuline qui en résulte est responsable du développement progressif d'une intolérance au glucose puis d'un diabète.
Le patient développant un diabète de la mucoviscidose sera traité par insulinothérapie du fait de l'insulinopénie résultante.

4.6. Perspectives thérapeutiques

Les traitements actuels ont permis une forte augmentation de l'espérance de vie des patients. Toutefois, ils ne permettent pas de « guérir » la maladie mais se limitent à freiner l'apparition des symptômes. La recherche de nouvelles stratégies permettant d'abolir

l'ensemble des perturbations biochimiques de la mucoviscidose est donc cruciale pour aboutir à un traitement satisfaisant.

4.6.1. Amélioration des traitements symptomatiques (Cystic-Fibrosis-Foundation)

Les traitements symptomatiques sont actuellement le seul mode de thérapie utilisé en pratique clinique dans le cas de la mucoviscidose. Ils nécessitent des améliorations de manière à optimiser leur efficacité notamment pour le contrôle de l'inflammation et des infections. Des recherches sont menées afin de disposer de nouveaux antibiotiques agissant sur les souches résistantes aux traitements classiques et pour développer d'autres molécules ou d'autres modes d'administration des anti-inflammatoires déjà existants afin de limiter leurs effets délétères. Plusieurs essais cliniques concernant cette amélioration des traitements sont actuellement en cours.

4.6.2. Thérapie génique

La thérapie génique consiste à introduire dans toutes les cellules de l'organisme ou dans une catégorie de cellules dites cellules cibles, un gène d'intérêt thérapeutique afin qu'il permette la production d'une protéine manquante (cellule déficiente) ou d'un signal qui conduira à la mort cellulaire (cellule infectée ou cancéreuse). Le gène apporté à la cellule est appelé transgène. Dans le cas de la mucoviscidose, il s'agit du gène CF. Celui-ci pourrait être apporté soit de façon systémique soit localement, par exemple au niveau des poumons ou de l'épithélium digestif.

Après des débuts prometteurs, la thérapie génique a connu plusieurs accidents qui ont freiné son développement clinique. Actuellement, seul un essai clinique de thérapie génique de la mucoviscidose est en cours (Cystic-Fibrosis-Foundation). Le traitement par thérapie génique notamment de la mucoviscidose, est lié au développement d'un vecteur :

- capable de cibler les cellules produisant la protéine CFTR (cela inclut les cellules ciliées de l'épithélium pulmonaire, mais également les cellules d'autres épithéliums notamment digestif) ;

- permettant d'assurer une transfection stable dans le temps ou autorisant des administrations répétées ;

- ne présentant pas d'effets indésirables notoires ;

- et enfin, pouvant être produit en quantité suffisante, facilement et selon des pratiques de fabrication compatibles avec les exigences des autorités délivrant les autorisations de mise sur le marché (AMM).

4.6.3. Activation d'autres transporteurs ABC

Cette perspective thérapeutique a été envisagée suite à la découverte par Lallemand et al. d'une nette amélioration des fonctions respiratoires chez un patient atteint de mucoviscidose et traité par chimiothérapie anticancéreuse pour un fibrosarcome (Lallemand, 1997).

Des études ont montré que la chimiothérapie entraîne une activation d'autres transporteurs ABC, notamment les protéines P-gP et MRP. Ainsi, lorsqu'une protéine ABC est mutée, le déficit fonctionnel qui en résulte peut être pallié par la surexpression d'une autre protéine ABC. Cela nécessite toutefois une analogie structurale et fonctionnelle entre les deux protéines, ce qui est le cas ici entre CFTR et MRP et, à un moindre degré, entre CFTR et la P-gP.

Pour appliquer cette stratégie thérapeutique à la mucoviscidose, il est nécessaire de développer des médicaments moins toxiques que les agents anti-cancéreux activant d'autres transporteurs ABC. La colchicine, qui est un inducteur de ces protéines, pourrait donc être utilisée dans ce but. En effet, cette molécule utilisée notamment dans le traitement de la goutte, possède également un effet anti-inflammatoire, ce qui la rend intéressante à deux points de vue pour le traitement de la mucoviscidose. Elle a donc été étudiée lors d'un essai de traitement de la mucoviscidose (Sermet-Gaudelus, 1999). Cet essai réalisé pendant six mois sur un petit nombre de patients a montré une action favorable sur l'état clinique général des patients, ainsi que sur leur fonction respiratoire. Les résultats de cet essai déjà ancien, n'ont toujours pas été confortés par une étude sur un plus grand nombre de patients.

4.6.4. Modulation d'autres canaux ioniques (Amaral, 2007)

La mutation de la protéine CFTR entraînant une altération de la conductance chlorure, l'activation de canaux ioniques autres que CFTR s'est avérée être une perspective

thérapeutique intéressante. En effet, les agents qui provoquent ou facilitent la sécrétion d'électrolytes au sein du mucus ont un intérêt dans la mucoviscidose.

Parmi les canaux chlorures, les canaux ClC 2 ont pu être activés (Cuppoletti, 2001). Les canaux ENaC sont également considérés comme des cibles pour le traitement de la mucoviscidose. L'activation de canaux potassiques a également été explorée. En effet, la sécrétion transépithéliale de chlorure provoque, par couplage électrique et osmotique, la sortie de sodium dans la lumière ; cela nécessite donc l'activation du canal potassique basolatéral afin d'hyper-polariser les cellules et de maintenir le flux d'ions chlorures.

4.6.5. Thérapie protéique

Dans ce cas, la stratégie thérapeutique ne consiste pas à transfecter un gène capable de produire la protéine CFTR sauvage, mais à restaurer l'activité de la protéine mutée. La thérapie protéique est donc « classe dépendante ». En effet, une mutation de classe I entraînant une absence de synthèse de CFTR ne pourra pas être corrigée de la même façon qu'une mutation de classe IV concernant un défaut de conductance.

4.6.5.1. Classe I (défaut de synthèse)

Les aminosides (ou aminoglycosides) sont des antibiotiques utilisés dans le traitement d'infections. Par ailleurs, ils sont connus depuis deux décennies comme autorisant la poursuite de la lecture de l'ARNm avec lequel ils sont complexés, au niveau d'un codon stop au sein du ribosome, permettant à la traduction de se poursuivre (through-reading) (Burke, 1985). Leur utilisation peut donc concerner les mutations de classe I avec apparition de codon stop.

Dès 1997, Bedwell et al, rapportent que la gentamicine et la généticine, ou G418, (Figure 9) sont capables de restaurer l'expression de deux lignées cellulaires portant chacune une mutation stop différente pour la protéine CFTR (Bedwell, 1997).

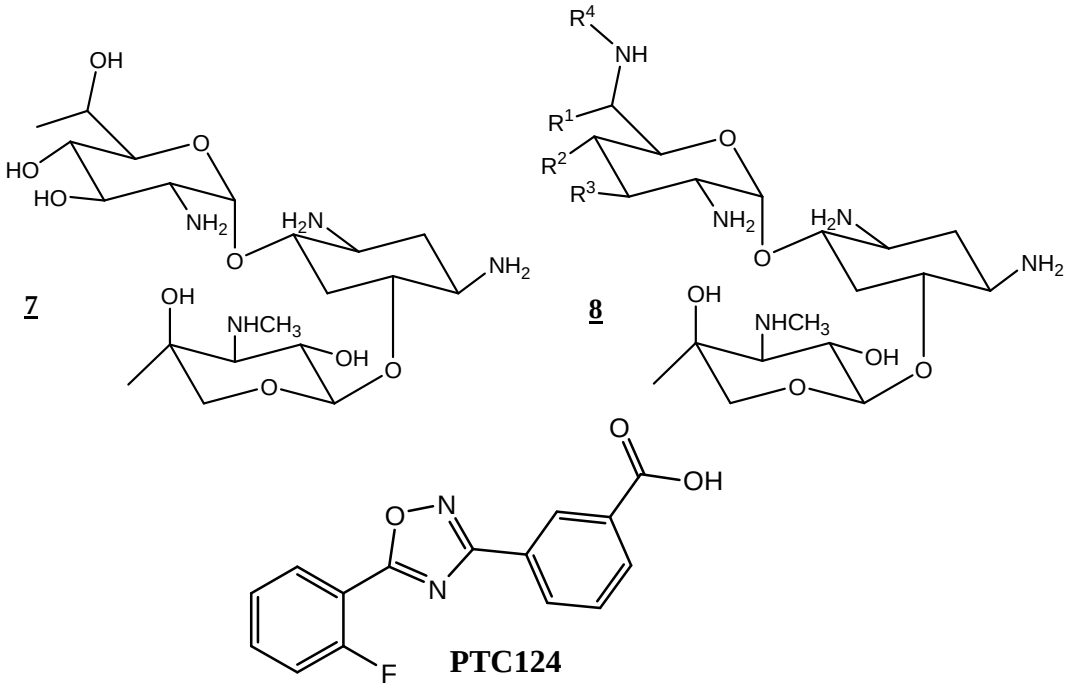


Figure 9 : Structure de la généticine **7**, de la gentamicine **8** et de PTC124

Des essais cliniques ont donc été réalisés de manière à utiliser cette propriété dans les cas où la mucoviscidose est due à une mutation stop. Ces études ont montré un effet bénéfique de la gentamicine tant sur les patients portant deux mutations stop que sur les hétérozygotes portant une seule mutation stop (Clancy, 2001 ; Wilschanski, 2003).

Cependant, le développement de ces aminosides dans cette indication apparaissait difficile à plusieurs points de vue. Tout d'abord, la biodisponibilité orale de ces molécules est très faible et ne permet pas leur administration *per os*. De plus, l'utilisation de ces produits comme suppresseurs de codons stop sous-tendait une prise fréquente et à doses relativement élevées, or les aminosides possèdent une ototoxicité et une néphrotoxicité importantes.

Ces toxicités étant dose dépendantes, il était donc nécessaire de trouver d'autres molécules possédant un effet thérapeutique identique ou supérieur, mais sans présenter le même type d'effets indésirables.

Dans ce but, une nouvelle molécule appelée PTC124 a été développée. Cette molécule aurait une efficacité supérieure à la gentamicine sans avoir les mêmes effets indésirables. PTC124 est entré en essai clinique de phase I en juin 2004 et a montré une bonne biodisponibilité par voie orale, un profil de tolérance satisfaisant permettant d'atteindre des concentrations plasmatiques en accord avec l'activité souhaitée. PTC 124 fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase II aux Etats-Unis et en Israël (Cystic-Fibrosis-Foundation).

Cependant, la poursuite de la traduction à travers un codon stop ne va pas nécessairement résoudre les problèmes biochimiques. En effet, la liaison de la molécule active au codon stop va permettre la poursuite de la traduction en incorporant un acide aminé aléatoire ce qui peut donc correspondre à une conversion d'une mutation de classe I vers une mutation de classe II à VI (Kerem, 2006).

4.6.5.2. Classe II (défaut de maturation/adressage) (Amaral, 2007)

La mutation la plus fréquente du gène CF, ΔF508, est responsable de la production d'une protéine non adressée à la membrane mais qui présente une faible activité canal chlorure lorsque elle y est intégrée. Aussi, des recherches ont été menées afin de découvrir des molécules capables de restaurer l'adressage de la protéine CFTR/ΔF508. Ces composés sont appelés correcteurs. Il en existe trois types : les chaperonnes chimiques (composés qui miment les effets des chaperonnes moléculaires naturelles), les pharmacochaperonnes (identiques aux précédents composés mais spécifiques d'une cible) et les composés qui ciblent les chaperonnes moléculaires naturelles en modifiant leurs niveaux d'expression ou leurs capacités d'interaction avec la protéine déficiente (Amaral, 2007).

Parmi les chaperonnes chimiques, on peut citer le glycérol, le myo-inositol, le diméthylsulfoxide (DMSO), la taurine et la bétaïne. Ces composés ne sont pas spécifiques et nécessitent de fortes doses pour exercer leur action, ce qui empêche leur utilisation comme médicament.

Les composés ciblant les chaperonnes moléculaires comprennent notamment le butanoate de sodium (ou butyrate de sodium), le 4-phényl-butanoate de sodium (ou 4-phényl-butyrate de sodium), et le miglustat (Figure 10).

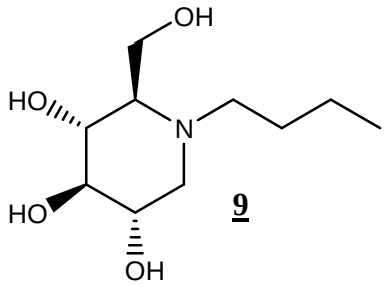


Figure 10 : Structure du miglustat **9**

Ce dernier composé également appelé *N*-butyldéoxynojirimycine ou *N*B-DNJ, qui est un inhibiteur des 1,2-glucosidases, permet de restaurer l'adressage de la protéine CFTR/ΔF508 (Norez, 2006). Cette molécule fait partie des traitements prescrits dans les cas de maladie de Gaucher et est actuellement testée lors d'essais cliniques de phase II pour le traitement de la mucoviscidose.

Plusieurs autres composés ont été identifiés comme pharmacochaperonnes. Il s'agit notamment du sildénafil, du curcumin, des dérivés de benzo[c]quinolizinium ou de quinazoline. Un certain nombre de ces composés sont aussi des potentiateurs de CFTR qui exercent leur effet correcteur par une liaison directe avec CFTR. Ces molécules seront décrites dans le paragraphe « 6. Modulateurs de CFTR ».

4.6.5.3. Classe III (Défaut d'activation), IV (Défaut de conductance) et V (Faible quantité par défaut d'épissage)

Il s'agit dans ce cas de restaurer la fonction canal chlorure qui est déficiente. Parmi les molécules capables de restaurer ou d'augmenter la fonction canal chlorure de CFTR, on en différencie deux types : les potentiateurs qui sont actifs sur le canal CFTR préactivé par le système AMPc dépendant, et les activateurs qui sont capables de stimuler CFTR de façon autonome (Kerem, 2006).

L'activation chimique de la protéine CFTR est une perspective pour laquelle beaucoup de résultats *in vitro* ont été obtenus. Cependant, ce type de thérapie ne pourra pas être généralisé à tous les patients. En effet, il est nécessaire que la protéine soit présente sur la membrane, ce qui exclue les malades souffrant de mucoviscidose de classes I et II. Toutefois, on peut envisager d'associer : un correcteur de l'adressage de CFTR à un activateur/potentiateur dans les mutations de type II, ou un suppresseur de codon stop et un activateur/potentiateur dans les mutations de type I. Cependant, il est probable que les activateurs ne seront pas actifs sur toutes les mutations, ce traitement se fera donc au cas par cas en fonction du génotype du patient.

Les différentes molécules actives mises en évidence seront présentées en détail dans le paragraphe « 6. Modulateurs de CFTR ».

Pour les mutations de type IV, une autre approche envisageable consiste à maintenir dans la cellule un taux élevé d'AMPc (Zeitlin, 1999) et donc un taux de phosphorylation élevé du domaine R.

Pour les mutations de type V, on peut ajouter un autre mode d'action : la modulation de facteurs d'épissage. En effet, des études ont montré que la transgénèse de facteurs d'épissage aboutissait à l'augmentation du niveau d'expression de la protéine CFTR normale, alors que la lignée cellulaire contient un gène portant une mutation d'épissage (Nissim-Rafinia, 2004).

4.6.5.4. Classe VI (Défaut de régulation d'autres canaux ioniques)

Pour ce type de mutations, la thérapie protéique de CFTR n'est pas une perspective thérapeutique majeure. En effet, la fonction canal chlorure est conservée, l'action directe sur d'autres canaux est donc à privilégier.

4.6.6. Conclusion sur les perspectives thérapeutiques

Les perspectives de thérapies de la mucoviscidose sont nombreuses et variées. Cependant, quelques unes apparaissent plus prometteuses. La thérapie génique ne peut pas être considérée comme une solution à court terme. Son utilisation en pratique clinique pour le traitement de la mucoviscidose est suspendue à des améliorations techniques dont la découverte conditionne son développement futur.

La poursuite de la traduction à travers un codon stop grâce à un agent chimique est une thérapie qui concerne environ 10 % des patients atteints de mucoviscidose de classe I. Cette technique est prometteuse puisqu'elle pourrait permettre la production de CFTR. Toutefois, il n'est pas certain que la protéine traduite soit fonctionnelle.

La restauration de la maturation et de l'adressage est une des perspectives les plus porteuses d'espoir. En effet, le miglustat est extrêmement prometteur. D'une part, car il pourrait permettre de traiter les patients atteints de la mutation la plus fréquente : ΔF508. Et d'autre part, car étant déjà utilisé pour le traitement d'une autre maladie, il pourrait être mis sur le marché rapidement s'il s'avère efficace durant l'évaluation clinique de phase II en cours.

L'activation de transporteurs ABC différents de CFTR est un axe de traitement dont l'évaluation est difficile du fait du faible nombre de données et d'essais cliniques sur cette perspective. On peut tout de même supposer que la restauration du transport chlorure par cette

méthode ne sera pas complète. En outre, certaines fonctions de CFTR, comme la régulation du fonctionnement d'autres canaux ioniques, ne seront sans doute pas rétablies, aboutissant à la persistance de certains symptômes. De plus, un certain nombre d'effets indésirables est à prévoir. Les transporteurs ABC assurant l'efflux de substances biologiques et de xénobiotiques des cellules, des perturbations biochimiques ainsi que des résistances à d'autres traitements médicamenteux pourraient apparaître au cours de leur activation.

La recherche de modulateurs d'autres canaux ioniques (canaux chlorures autres que CFTR, canaux sodiques ou canaux potassiques) est plus avancée. Cependant, cette thérapie présente un certain nombre d'aspects négatifs, notamment concernant la persistance éventuelle de certains symptômes dus au fait que ces composés agissent uniquement sur un canal donné.

La stimulation de CFTR apparaît donc comme une perspective thérapeutique particulièrement intéressante. En effet, cette thérapie pourrait concerner toutes les classes de mutations (en association avec un suppresseur de codon stop pour la classe I ou un correcteur de l'adressage pour la classe II).

5. Diarrhées sécrétoires

Les diarrhées sécrétoires sont une des premières causes de mortalité infantile dans les pays en voie de développement. Elles peuvent être causées par différents stimuli tels que des toxines bactériennes, des médiateurs de l'inflammation ou encore des hormones dans certains cancers.

Ce type de diarrhées se caractérise par une forte déperdition hydrique accompagnée d'une perte ionique importante, notamment en ions bicarbonates et potassium. Lorsque la cause est infectieuse, les agents impliqués sont majoritairement *Vibrio cholerae*, responsable du choléra, et *Toxigenic Escherichia coli* responsable de la plupart des « turista » ou diarrhées du voyageur. Ces deux microorganismes sécrètent des toxines qui, après leur pénétration dans les cellules de l'épithélium digestif, entraînent une forte hausse de la concentration en AMPc. Cette augmentation aboutit à une importante stimulation de CFTR responsable d'une hyper-excrétion d'ions chlorures accompagnés de sodium et d'eau.

Le traitement actuel des diarrhées sécrétoires est principalement symptomatique et est basé sur une réhydratation par voie orale à l'aide de solutions contenant du glucose et des sels minéraux. Dans les cas de choléra, une antibiothérapie est fréquemment associée de manière à diminuer la sévérité de la maladie (Thiagarajah, 2005). Les anti-diarrhéiques sont inefficaces dans les cas de choléra et doivent être utilisés avec précaution dans les diarrhées d'origine infectieuse du fait du risque de diminution de l'évacuation du pathogène par les selles (Field, 2003).

Des inhibiteurs de CFTR diminuant la perte hydrique et saline pourraient donc être développés en tant que traitement des diarrhées sécrétoires.

6. Modulateurs de CFTR

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, la modulation de CFTR présente un fort intérêt thérapeutique. Les activateurs (qui sont capables de stimuler CFTR de façon autonome) et les potentiateurs (qui sont actifs sur le canal CFTR préactivé par le système AMPc dépendant) pourraient être utilisés pour le traitement de la mucoviscidose. Les inhibiteurs quant à eux offrent une perspective thérapeutique envisageable dans le traitement des diarrhées sécrétoires. De plus, ils pourraient être utilisés comme outils pharmacologiques pour permettre des études fondamentales sur la protéine CFTR ou pour la découverte d'autres modulateurs de cette dernière.

La pharmacologie des canaux CFTR est très riche. En effet, depuis la caractérisation biochimique de la protéine CFTR (Riordan, 1989), sa pharmacologie est apparue d'une grande importance. Ainsi, aux premières découvertes de modulateurs principalement basée sur des hypothèses de similarités de structure et d'action se sont ajoutées de nombreuses classes chimiques issues de criblage à haut débit de chimiothèques de plusieurs dizaines de milliers de composés.

Après avoir abordé les différents mécanismes de modulation de CFTR, nous présentons ci-aprés le plus exhaustivement possible les différents modulateurs de CFTR connus en discutant de leur mode d'action, avant de détailler les résultats obtenus avec un inhibiteur et un potentiateur mis en évidence au laboratoire.

Les évaluations effectuées sur les modulateurs présentés ci après sont généralement réalisées par des tests cellulaires (tests d'efflux d'ions, tests de « patch clamp » par différentes techniques) ou plus rarement par des tests tissulaires (Chambre de Ussing) en utilisant des lignées cellulaires très variées. Cette multiplicité de techniques et de systèmes d'expression cellulaires rend difficile la comparaison entre les valeurs obtenues pour les modulateurs par des tests différents.

Il est possible de moduler CFTR de deux manières : soit en agissant sur son système de régulation, soit par fixation directe de modulateurs sur la protéine (Becq, 2006).

6.1. Modulateur du système de régulation de CFTR (Cai, 2003)

Le fonctionnement de CFTR est lié à régulation de son domaine R géré par le système protéines kinases/protéines phosphatases lui-même sous la dépendance du système AMPc (Cf Intro 3.1.7).

Ainsi les kinases, comme la PKA et la PKC, sont des activateurs de CFTR. Les inhibiteurs des phosphatases tels les ions fluorures et la calyculine A l'activent également tout comme le bromotétramizole et le lévamisole, mais ces composés ne sont pas sélectifs de CFTR.

Des analogues de l'AMPc insensibles aux PDE tel la CPT-AMPc (8-(4-chlorophénylthio)-adénosine monophosphate-3',5'-cyclique) ou des activateurs de l'adénylate cyclase comme la forskoline (fsk) sont connus pour activer CFTR.

On retrouve également des inhibiteurs des PDE comme l'amrinone et la milrinone ou l'IBMX qui est un dérivé xanthique. Ce dernier est également un potentiateur de CFTR (Cf Intro 6.2.1.2).

Les molécules actives citées précédemment, notamment la fsk, sont surtout utilisées comme outils pharmacologiques. En effet, pour le développement de modulateurs dans un but thérapeutique, la sélectivité est une qualité importante, aussi, on privilégiera des modulateurs se fixant directement sur la protéine CFTR pour s'affranchir d'éventuels effets secondaires (Becq, 2006).

6.2. Modulation par liaison directe (Cai, 2004)

Les activateurs ou potentiateurs de CFTR agissant par liaison directe se fixent directement à la protéine CFTR et exercent leur activité par effet compétitif ou allostérique. Ils sont généralement liés aux NBD où ils interagissent avec le site de fixation de l'ATP. Cependant, certains se fixent sur le domaine R alors que, pour d'autres, le site de liaison n'est pas connu.

6.2.1. Activateurs/Potentiateurs (Cai, 2003 ; Becq, 2006 ; Amaral, 2007)

6.2.1.1. Les analogues de l'ATP

Il a été montré que le 2'-désoxy-ATP et le 3'-désoxy-ATP activent CFTR en augmentant le temps d'ouverture du canal. Cette action est due à une plus forte affinité de ces deux composés pour les NBD par rapport à l'ATP (Cai, 2003).

6.2.1.2. Les xanthines

Le premier activateur de CFTR décrit est l'IBMX (Figure 11). Son mode d'action est resté longtemps controversé car il est connu comme un inhibiteur des PDE. Toutefois, de nombreuses études ont prouvé qu'il stimule CFTR par une voie indépendante du système AMPc à des concentrations de l'ordre de 100 µM. Il agit en augmentant la fréquence et la durée d'ouverture du canal. A forte dose, l'IBMX est inhibiteur de CFTR.

D'autres dérivés xanthiques ont été synthétisés et des relations structure-activité ont été établies. Les xanthines les plus intéressantes sont X-33, CPX et DAX. X-33 possède une activité comparable à l'IBMX mais ne nécessite pas de préactivation du système AMPc. Par contre, X-33 est sans effet sur les autres canaux chlorures et n'est pas inhibiteur des PDE. CPX et DAX agissent sur la protéine sauvage et mutée CFTR/ΔF508 dans une gamme de concentration de 0,02 à 10 µM suivant les tests effectués (Amaral, 2007).

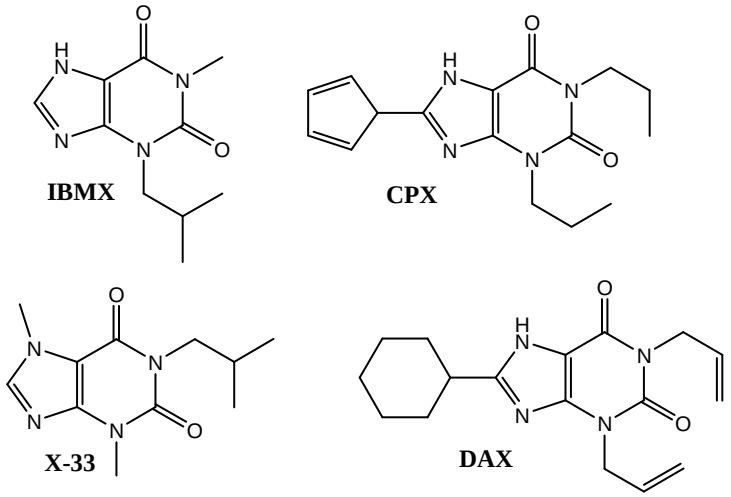


Figure 11 : Structures des principales xanthines activant CFTR

6.2.1.3. Les benzo[*c*]quinoliziniums (Becq, 2006)

Ces composés ont été mis en évidence en tant qu'activateurs de CFTR en 1999, suite au criblage d'une petite chimiothèque de composés hétérocycliques (Becq, 1999). La première molécule identifiée fut le MPB07 (Figure 12) qui présente une EC_{50} d'environ 100 µM sur CFTR-wt. Le composé MPB91, qui diffère du précédent par une chaîne butyle, a quant à lui, montré des activités sur la protéine sauvage et mutée G551D et ΔF508 (EC_{50} par le test d'efflux de 85 µM, 85 µM et 250 µM respectivement).

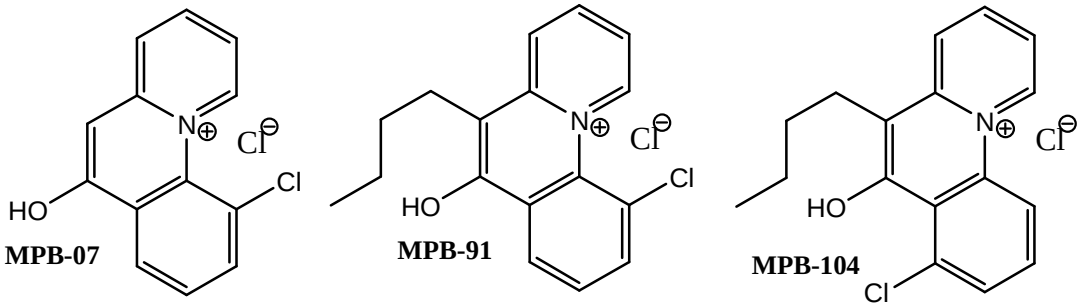


Figure 12 : Structures de trois benzo[*c*]quinoliziniums (MPB)

MPB91 est le composé le plus étudié de cette classe. Il s'agit d'un activateur et non d'un potentiateur puisqu'il ne nécessite pas de préactivation par le système AMPc pour stimuler CFTR. Il n'a pas montré d'activité ni sur d'autres canaux chlorures, ni sur la concentration en AMPc, ni sur l'activité ATPase de NBD1 et 2.

Son mode d'action reste mal élucidé et son site de liaison n'a pas été identifié. MPB91 et d'autres composés de cette classe ont également présenté une activité correctrice de l'adressage de la protéine CFTR/ΔF508 en inhibant sa dégradation et en permettant son insertion dans la membrane. Le composé le plus actif de cette classe est MPB-104 qui possède une EC_{50} de 1,7 et de 0,8 µM respectivement sur protéine sauvage et mutée G551D (Marivingt-Mounir, 2004).

Les benzoquinoliziniums sont donc de bons candidats pour l'activation pharmacologique de CFTR. Cependant, aucun essai clinique n'a été rapporté avec ces composés.

6.2.1.4. Les flavonoïdes

La génistéine est une isoflavone dérivée du soja qui possède une activité tyrosine kinase (Figure 13). Elle agit sur CFTR par un mécanisme allostérique entraînant une forte

réduction du temps de fermeture du canal. Elle montre un « effet cloche » dans la relation de l'activité en fonction de la concentration : potentiatrice pour des concentrations inférieures à 50 µM, elle devient inhibitrice pour des concentrations plus élevées. Il semblerait qu'à concentration faible, elle se lie préférentiellement à NBD2 à proximité de la glycine 1349 stimulant CFTR, par contre à forte concentration elle se lie aussi à NBD1 à proximité de la glycine 551 et exercerait dans ce cas une activité inhibitrice.

La génistéine est active sur la protéine sauvage et sur les mutations ΔF508 et G551D, mais n'est pas spécifique des canaux chlorures CFTR.

D'autres flavonoïdes naturels, comme l'apigénine, le kaempferol et la quercitine, ont également montré des activités comparables et un mode d'action similaire à la génistéine (Figure 13).

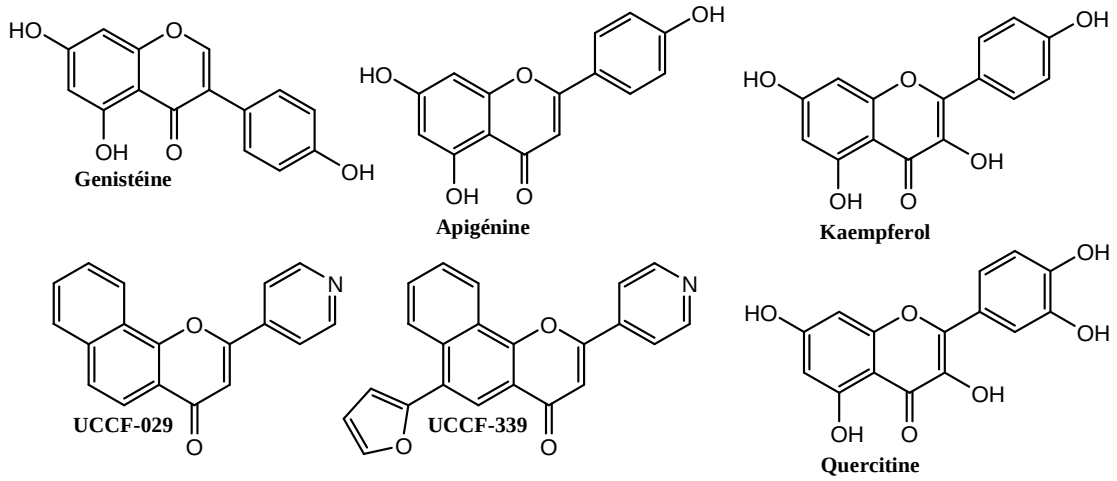


Figure 13 : Structures de la génistéine, de l'apigénine, du kaempferol, de la quercitine et de deux dérivés synthétiques de flavonoïdes agissant sur CFTR

Un criblage haut débit d'une chimiothèque de dérivés de flavonoïdes a permis la mise en évidence du composé UCCF-029. Suite à une optimisation de ce « lead », le composé UCCF-339 a été synthétisé et a montré un Kd de 1,7 µM sur CFTR (Figure 13). Toutefois ce composé, qui agit de la même manière que la génistéine, n'a pas montré d'activité sur les protéines mutées (Becq, 2006).

La génistéine n'est pas spécifique de CFTR et est active à des concentrations micromolaires, ce n'est donc pas un bon candidat pour un développement thérapeutique. Quant à ses dérivés, le plus actif d'entre eux n'agissant pas sur les principales mutations, ils sont donc plus à considérer comme des outils pharmacologiques. De plus, ces composés manquent de selectivité vis-à-vis de CFTR.

6.2.1.5. Les benzimidazolones et la chlorzoxazone

Le composé NS004, qui possède une structure benzimidazolone (Figure 14) et qui avait été développé en tant qu'activateur de canaux potassiques, a montré une activité sur CFTR. Ce composé peut agir sur la protéine non phosphorylée, mais il est plus actif sur la forme phosphorylée. Il possède une EC_{50} faible, de l'ordre de la centaine de nanomolaire et est actif sur un grand nombre de mutations dont ΔF508 et G551D.

Ce composé s'est par contre révélé incapable de stimuler CFTR lors de tests sur tissu contrairement à un autre benzimidazolone : 1-EBIO. Toutefois les concentrations nécessaires pour obtenir cette activation étaient beaucoup plus élevées (0,6 à 1 mM).

D'autres dérivés de benzimidazolone ont donc été synthétisés et évalués. Parmi ceux-ci, les composés DCEBIO et UCCF-853 se sont avérés être de bons activateurs de CFTR (EC_{50} de l'ordre de la dizaine de micromolaire) et beaucoup plus sélectifs que NS004 (Caci, 2003).

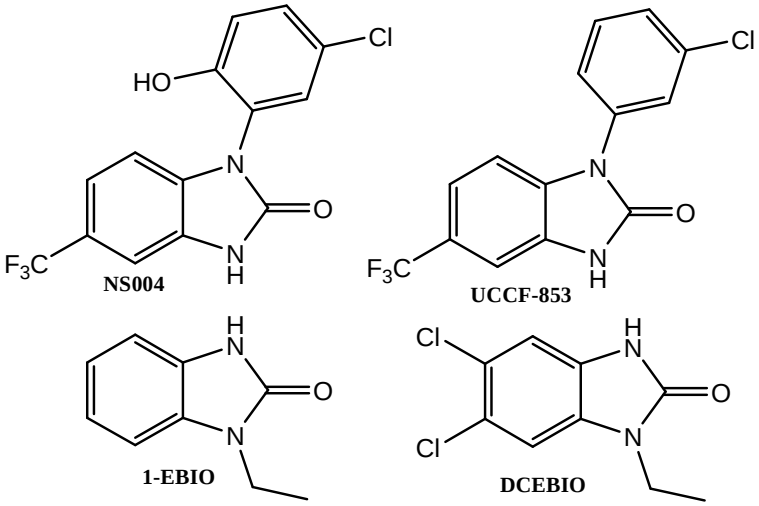


Figure 14 : Structures des principaux dérivés benzimidazolones activant CFTR

Une molécule voisine des précédentes a présenté une activité potentiatrice de CFTR par le même mécanisme (Singh, 2000). Il s'agit de la chlorzoxazone de structure benzoxazolone (Figure 15).

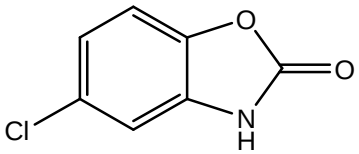


Figure 15 : Structure de la chlorzoxazone

6.2.1.6. Les phénantrolines et les benzoquinoléines

Du fait de leur parenté structurale avec les MPB, un grand nombre de phénantrolines (Figure 16) ont été évaluées comme activateur de CFTR. Le composé le plus actif est la 1,10-phénantroline qui possède une EC_{50} de 650 µM. Des composés voisins, les benzoquinoléines, ont présenté des activités sur CFTR. Le meilleur d'entre eux, la 5,6-benzoquinoline a une EC_{50} de 34 µM. Par la suite un autre composé, dérivé d'isoquinoléine, a été développé : CBIQ (EC_{50} de 4 µM).

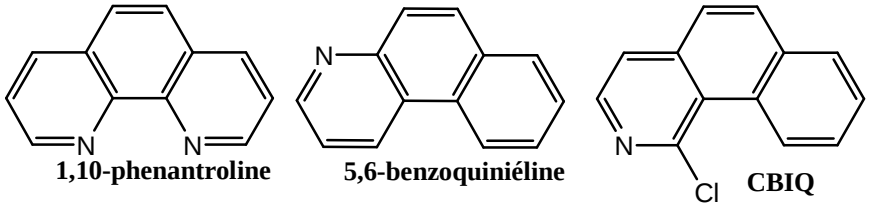


Figure 16 : Structure de la 1,10-phénantroline, du 7,8-bensoquinoéline et de CBIQ

Ces composés sont faiblement inhibiteurs des PDE et agissent en tant que modulateurs allostériques avec un « effet cloche » en fonction de la concentration. Ils sont efficaces sur la protéine sauvage et sur la protéine mutée ΔF508. CBIQ a également montré une activité activatrice sur les canaux KCNN4 (Szkotak, 2004).

Il est toutefois difficile d'envisager un développement clinique des ces composés. En effet, ces molécules polycycliques présentent des propriétés intercalantes dans l'ADN et complexantes vis-à-vis de certains métaux.

6.2.1.7. La phloxine B et le rose Bengale

La phloxine B et le rose Bengale (Figure 17) sont des dérivés de la fluorescéine de couleur rose. Ce sont des bloqueurs de canaux ATP. Leur évaluation sur CFTR a révélé un effet similaire à celui de la génistéine (effet cloche, inhibiteur à forte dose, activateur allostérique) avec des EC_{50} de l'ordre de la centaine de nanomolaire.

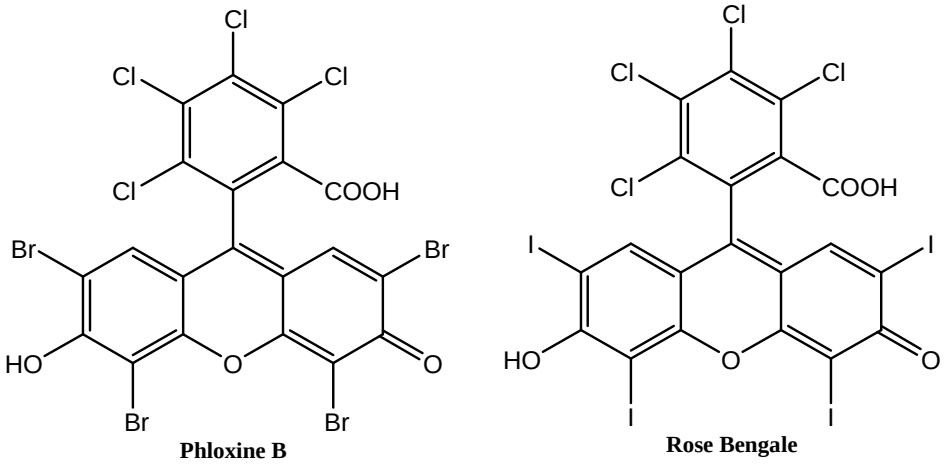


Figure 17 : Structures de la phloxine B et du rose Bengale

Du fait notamment des risques de coloration et de leur manque de spécificité, la phloxine B et le rose Bengale restent des outils pharmacologiques.

6.2.1.8. Les tétrahydrobenzoaminothiophènes (Yang, 2003)

Les tétrahydrobenzoaminothiophènes (Figure 18) ont été identifiés par criblage à haut débit de plus de cent mille petites molécules sur cellules exprimant la protéine CFTR/ΔF508 préalablement adressée à la membrane par culture des cellules à 27 °C.

Parmi les six classes chimiques identifiées par ce criblage, les tétrahydrobenzoaminothiophènes sont les plus intéressants car ils sont non toxiques, ne requièrent que de faibles concentrations en AMPc et possèdent un K_d inférieur à 100 nM.

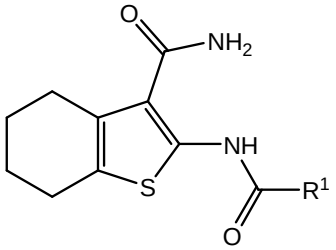


Figure 18 : Structure de type tétrahydrobenzoaminothiophène

6.2.1.9. Le curcumin et la capsaïcine

Le curcumin (Figure 19) est un produit naturel extrait d'une plante herbacée utilisée comme épice notamment dans le curry. Des résultats contradictoires ont été décrits concernant son effet correcteur (Davis, 2004). Un essai clinique a été effectué pour évaluer son effet correcteur et n'a pas montré de résultats satisfaisant. Un autre essai est en cours en utilisant le curcumin à des doses supérieures (Cystic-Fibrosis-Foundation).

Par contre, il a été montré par plusieurs équipes que le curcumin est un potentiateur efficace des canaux CFTR sauvage ou muté. Son mécanisme d'action, qui nécessite une phosphorylation du domaine R, ne requiert ni la dimérisation des NBD, ni leur liaison à l'ATP, permettant une action sur les mutations de classe III comme G551D (Berger, 2005 ; Wang, 2007 ; Hao, 2008).

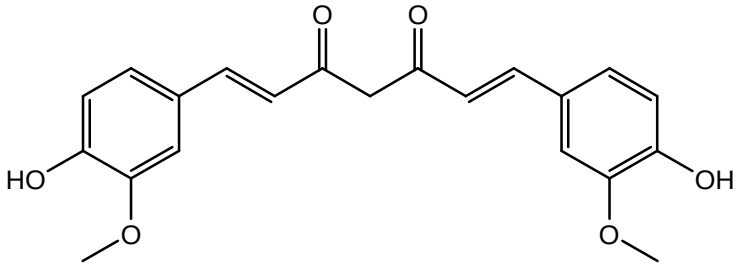


Figure 19 : Structure du Curcumin

Le curcumin est une molécule très réactive. En effet, ce composé peut réagir avec les nucléophiles cellulaires en addition de Michaël et ceci sur plusieurs sites. De plus, du fait de sa structure phénolique conjuguée il est sensible à l'oxydation.

Un autre composé présent dans les épices a présenté une activité sur CFTR. En effet, la capsaïcine (Figure 20), composant actif du piment, est également potentiatrice de CFTR sauvage, G551D et ΔF508 (EC_{50} de 48 µM) (Ai, 2004).

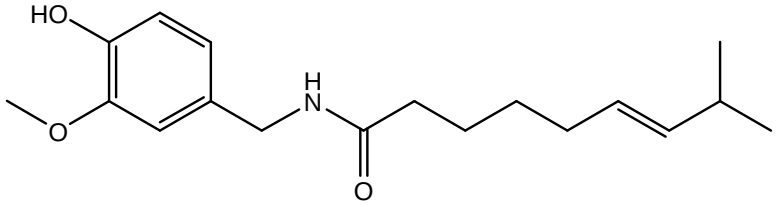


Figure 20 : Structure de la capsaïcine

6.2.1.10. Les 1,4-dihydropyridines

Les 1,4-dihydropyridines (Figure 21) ont été mises en évidence en tant que potentiateur de CFTR suite au criblage d'une chimiothèque contenant des médicaments commercialisés (Pedemonte, 2005).

Ces composés, utilisés comme agents antihypertenseur, agissent sur les canaux calciques. Une étude de structure-activité a ensuite été entreprise de manière à augmenter l'activité sur CFTR et à diminuer l'effet sur les canaux calciques (Pedemonte, 2007). Les composés issus de cette étude sont actifs sur la protéine sauvage et sur les mutations ΔF508 et G551D avec des Ka de l'ordre du micromolaire.

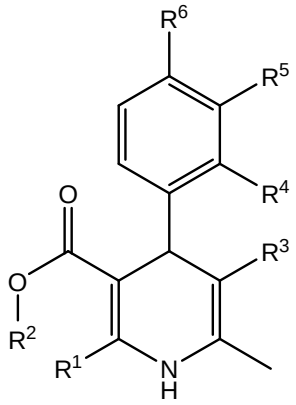


Figure 21 : Structure des 1,4-dihydropyridines utilisés comme potentiateur de CFTR

6.2.1.11. Les pyrrolo[2,3-*b*]pyrazines

Une petite librairie de pyrrolo[2,3-*b*]pyrazines (Figure 22) a été évaluée vis-à-vis de l'activation de CFTR (Noel, 2006). Le composé RP107 est activateur de CFTR sauvage et mutée (G551D et ΔF508). Ce composé ainsi qu'un analogue (RP108) ont été évalués par un test de courant de court-circuit et ont montrés des EC_{50} relativement élevées (de l'ordre de la centaine de micromolaire).

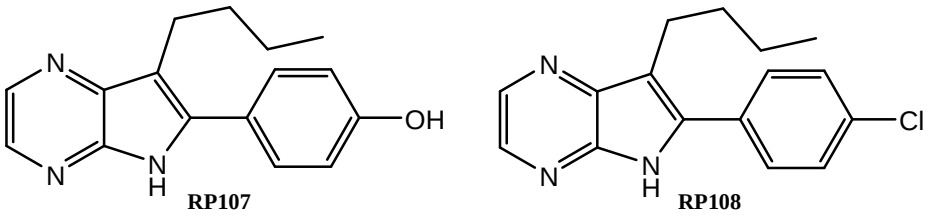


Figure 22 : Structures de deux pyrrolo[2,3-*b*]pyrazines activant CFTR : RP107 et RP108

6.2.1.12. Dérivés d'isoxazoles (Sammelson, 2003)

Une classe de dérivés de 3-(2-benzyloxyphenyl)isoxazoles et isoxazolines (Figure 23) a été mise en évidence par Sammelson et al. (Sammelson, 2003). Les meilleurs composés présentent des EC_{50} de 20 à 50 µM.

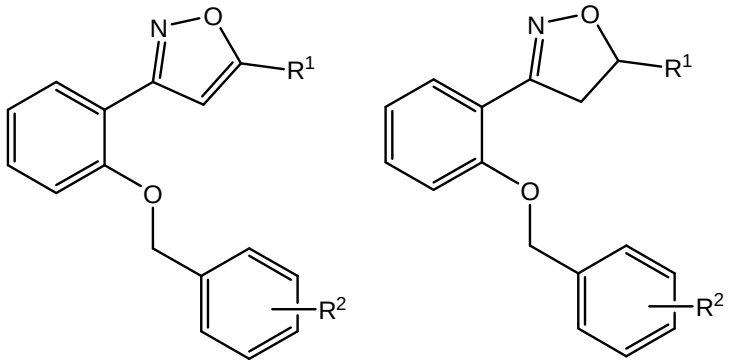


Figure 23 : Structures des dérivés de 3-(2-benzyloxyphenyl)isoxazoles et isoxazolines

6.2.1.13. Autres molécules activatrices/potentiatrices

Une équipe chinoise a mis en évidence plusieurs classes de potentiateurs de CFTR (Liu, 2007 ; Jin, 2008). Il s'agit la plupart du temps de composés naturels identifiés grâce à un criblage de chimiothèque. Parmi eux, la magnoline et la dictamine (Figure 24) ont permis une potentialisation de CFTR par un mécanisme probable de liaison directe.

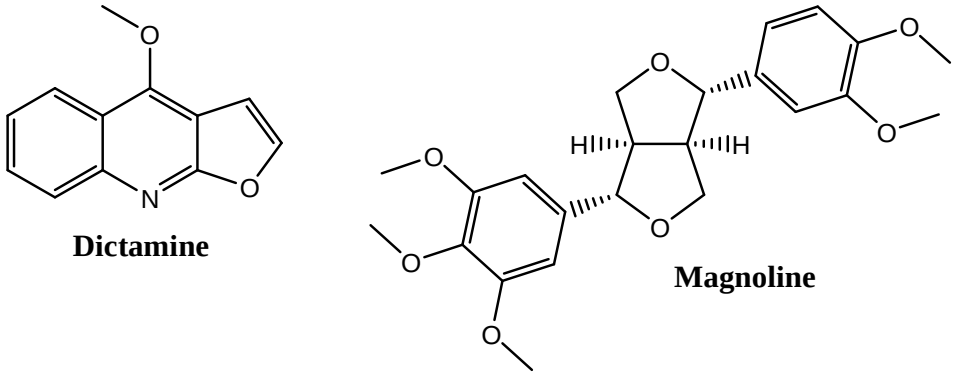


Figure 24 : Structures de la dictamine et de la magnoline

Un autre composé, de type bicyclooctane, a également été identifié comme activateur sélectif de la protéine CFTR/G551D (He, 2004).

Par ailleurs, des dérivés de ginsénosides (Figure 25) (Amaral, 2007 ; Liu, 2008) et un composé de structure limonoïde (deCarvalho, 2002) ont montré une activité potentiatrice sur CFTR sauvage et mutée.

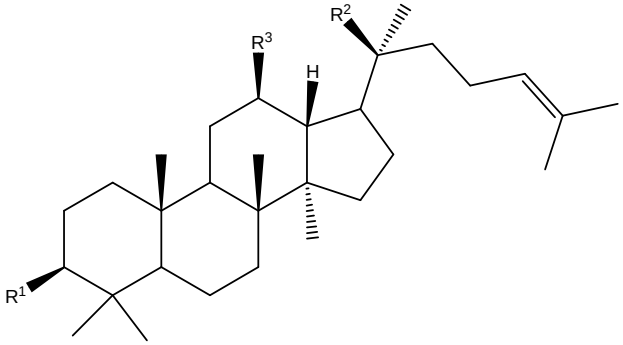


Figure 25 : Structure générale des ginsénosides

Le composé NPPB-AM et des analogues ont également été décrits comme potentiateur de CFTR (Wang, 2005). Cette molécule est dérivée du NPPB qui est un agoniste mixte. En effet, ce dernier est capable de stimuler le transport à travers le canal mais aussi d'inhiber CFTR par un mécanisme de blocage du pore (Cf 6.2.2.1.2).

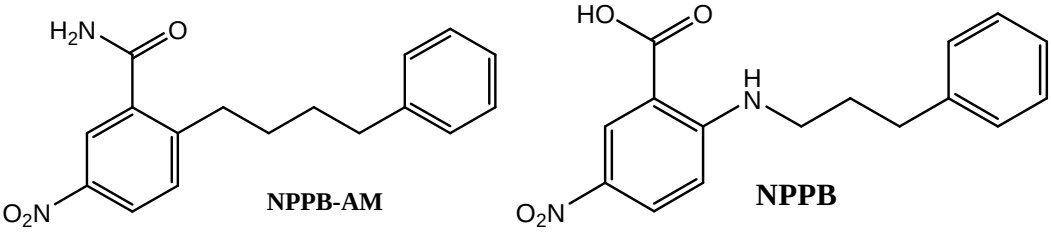


Figure 26 : Structure de NPPB-AM et NPPB

D'autres criblages ont mis en évidence différentes classes de molécules. Parmi celle-ci, on peut noter un dérivé sulfamoylé (SF-03) et une phénylglycine substituée (PG-01) (Figure 27) qui présentent une activité sur CFTR/ΔF508 (Pedemonte, 2005) avec des K_a de 20 nM et de 70 nM respectivement.

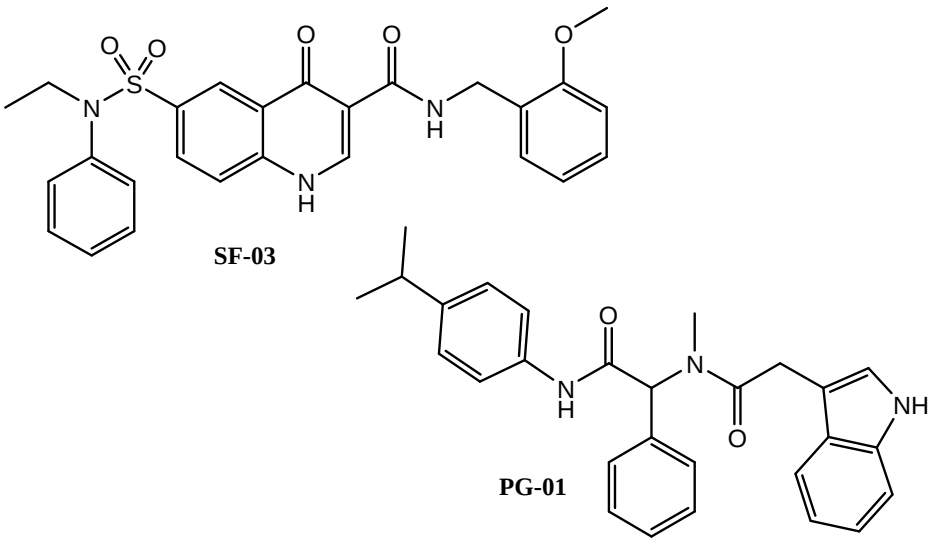


Figure 27 : Structures de SF-03 et de PG-01

Au cours d'un autre criblage, des dérivés d'hydroxycoumarine, de thiazolidine et de tétrahydrocarbazole ont présenté une activité potentiatrice avec des K_d inférieur à 200 nM (Ma, 2002).

Des anesthésiques généraux tel que l'octanol et d'autres n-alcools ont également montré des propriétés potentiatrices sur CFTR sauvage et ΔF508 (Marcet, 2004). Cette action n'est pas due à une augmentation de la concentration en AMPc et nécessite une préphosphorylation. Toutefois les concentrations nécessaires à cette action sont élevées : EC_{50} d'environ 600 µM.

Des dérivés d'anthracène sont aussi connus comme activateurs de CFTR (Ai, 2004).

6.2.1.14. Le composé VX-770 (Cystic-Fibrosis-Foundation)

Ce composé développé par la société Vertex Pharmaceuticals est actuellement en essai clinique de phase II. Cet essai inclut des patients portant la mutation G551D. Les résultats de la phase IIa montrent une amélioration de la fonction pulmonaire et des normalisations des valeurs cliniques de plusieurs tests d'évaluation de l'activité de CFTR (test de la sueur, différence de potentiel nasal) chez les patients traités par VX-770.

La structure de ce composé n'est pas disponible. Toutefois, il est possible que ce composé soit de type pyrazole substitué (Figure 28) puisqu'un brevet déposé par la même société protège ce type de structure très large pour une application thérapeutique dans le cadre du traitement de la mucoviscidose (Vangoor, 2004).

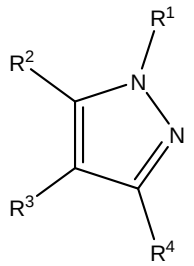


Figure 28 : Structure de type pyrazole substitué brevetée pour la modulation de transporteurs ABC

6.2.1.15. Conclusion sur les activateurs/potentiateurs

Comme nous venons de le voir, la pharmacologie des activateurs/potentiateurs de CFTR est très riche et comporte de nombreuses classes chimiques différentes, notamment grâce à l'apport des techniques de criblages. Cette diversité chimique reflète la complexité de la protéine CFTR avec des voies de régulation et d'activation modulables.

Les modes d'action pouvant aboutir à une activation du canal ionique sont donc très nombreux, tout comme les sites de liaison possibles (dans les cas de liaison directe). De plus, le spectre très large des mutations connues de CFTR, complique la recherche d'activateurs/potentiateurs.

La recherche de composés chimiques activant CFTR est très active avec de nombreuses équipes impliquées. L'essai clinique en cours sur VX-770 tend à montrer que le criblage peut conduire à des résultats applicables en pratique clinique et que l'activation de CFTR est une perspective thérapeutique prometteuse.

Parallèlement à l'avancée des connaissances fondamentales sur la protéine CFTR, il semble probable que de nouvelles classes chimiques d'activateurs seront découvertes. Et réciproquement, le développement de nouveaux activateurs de la protéine CFTR pourra faire progresser l'étude fondamentale de cette protéine.

6.2.2. Inhibiteurs agissant par liaison directe (Cai, 2003)

Il existe deux types différents d'inhibiteurs agissant par liaison directe à CFTR (Figure 29). Certains sont des inhibiteurs allostériques qui vont entraîner une fermeture du canal. D'autres sont appelés « open-channel blockers ». Ce sont généralement de gros anions qui vont pénétrer dans le canal CFTR lorsque celui-ci est en position ouverte et une fois placés à l'intérieur vont empêcher le passage des ions chlorures.

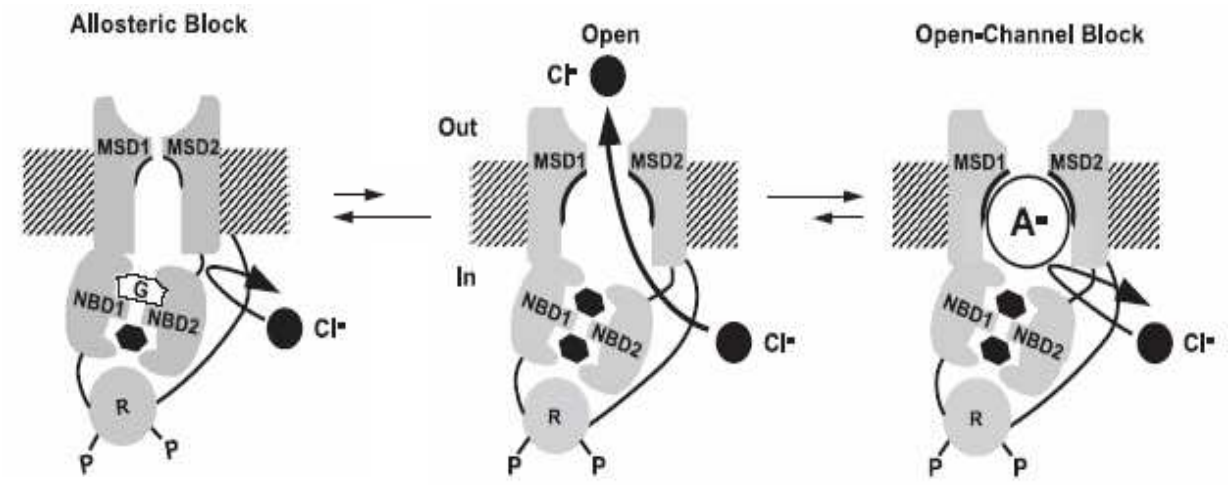


Figure 29 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de CFTR (Partie centrale : fonctionnement de CFTR en l'absence d'inhibiteur ; Partie gauche : un inhibiteur allostérique (G) ici placé à l'interface entre les deux NBD va entraîner la fermeture du canal ; Partie droite : un bloqueur du canal ouvert (A^-) est placé à l'intérieur du canal empêchant le passage des ions chlorures (adapté d'après (Cai, 2004)).

6.2.2.1. Les bloqueurs du canal ouvert

6.2.2.1.1. La phloxine B

Comme nous l'avons vu précédemment la phloxine B et le rose Bengale sont, à fortes doses, des inhibiteurs de CFTR de type bloqueurs de canal ouvert probablement en raison de leur caractère anionique à pH physiologique.

6.2.2.1.2. Les acides organiques (Cai, 2003)

La plupart des bloqueurs du canal ouvert sont des acides organiques ionisés à pH physiologiques qui agissent de manière non spécifique sur CFTR. Parmi eux, on retrouve des acides gras comme les acides butanoïque, 4-phénylbutanoïque, arachidonique, linoléique, oléique ou palmitique (Linsdell, 2000).

Des acides carboxyliques aromatiques comme les acides niflumique et flufénamique (Figure 30) qui sont des anti-inflammatoires non stéroïdiens, l'acide *N*-phénylanthranilique (DPC) ou encore comme la lonidamine (qui est un inhibiteur des hexokinases) et un de ses analogues (AF2785) (Gong, 2002) inhibent également CFTR.

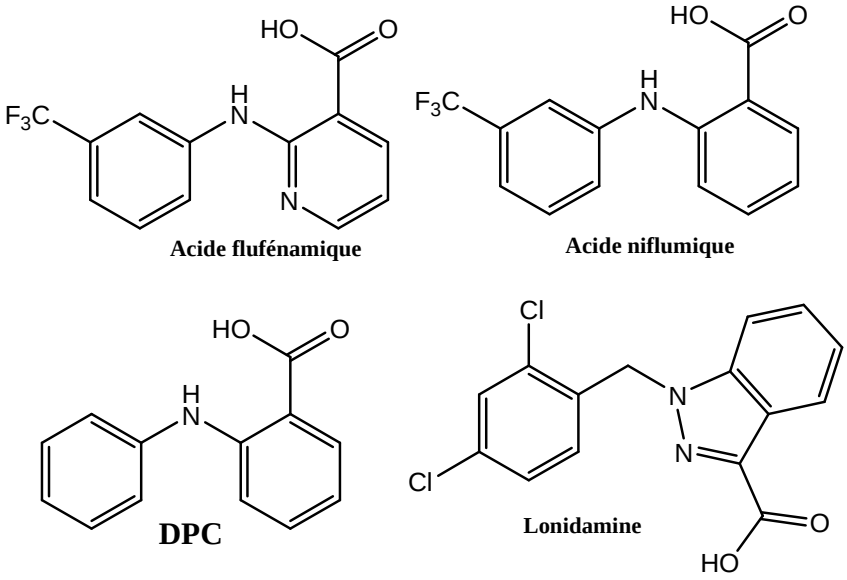


Figure 30 : Structures des acides carboxyliques aromatiques inhibant CFTR de façon non sélective

L'acide 5-nitro-2-(3-phénylpropylamino)-benzoïque (NPPB) (Figure 31) est un agoniste mixte capable de stimuler le transport à travers le canal mais aussi d'inhiber CFTR par un mécanisme de blocage du pore (Cf 6.2.1.13). NPPB possède une charge négative à pH physiologique car la fonction acide carboxylique est ionisée. Son analogue non ionisé, NPPB-AM est quant à lui un potentiateur pur. On peut remarquer que la transformation de la fonction acide carboxylique portée par NPPB en amide sur NPPB-AM, entraînant la perte de la charge, permet d'abolir la capacité à bloquer le canal CFTR.

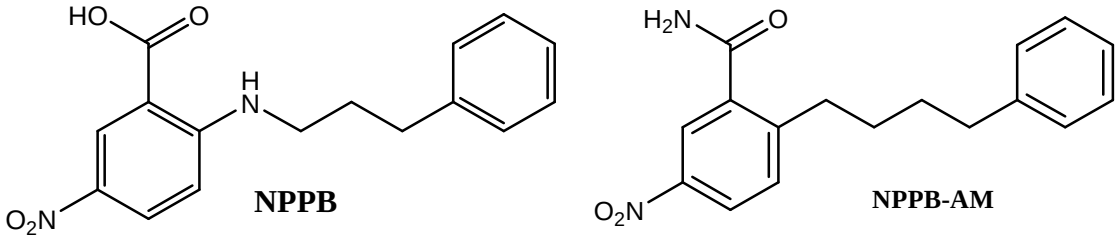


Figure 31 : Structures de NPPB et de NPPB-AM

Deux antidiabétiques portant une fonction acide carboxylique ont également montré une activité inhibitrice de CFTR. Il s'agit du méglitinide et du mitiglinide (K_d de 180 et 270 µM respectivement) (Figure 32). Ces deux composés ne sont pas sélectifs de CFTR puisqu'ils sont également inhibiteurs des canaux K_{ATP}.

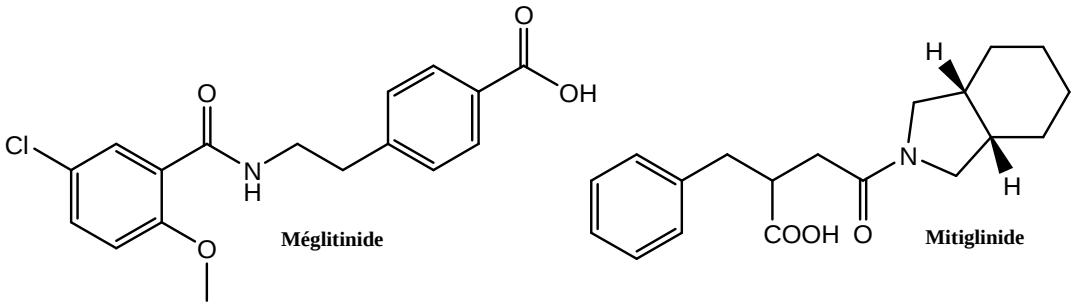


Figure 32 : Structures du méglitinide et du mitiglinide

Des acides sulfoniques sont également inhibiteurs de CFTR. Il s'agit de l'acide 3-(*N*-morpholino)propanesulfonique (MOPS), de l'acide 4,4'-diisothiocyanostilbène-2,2'-disulfonique (DIDS) et de l'acide 4,4'-dinitrostilbène-2,2'-disulfonique (DNDS).

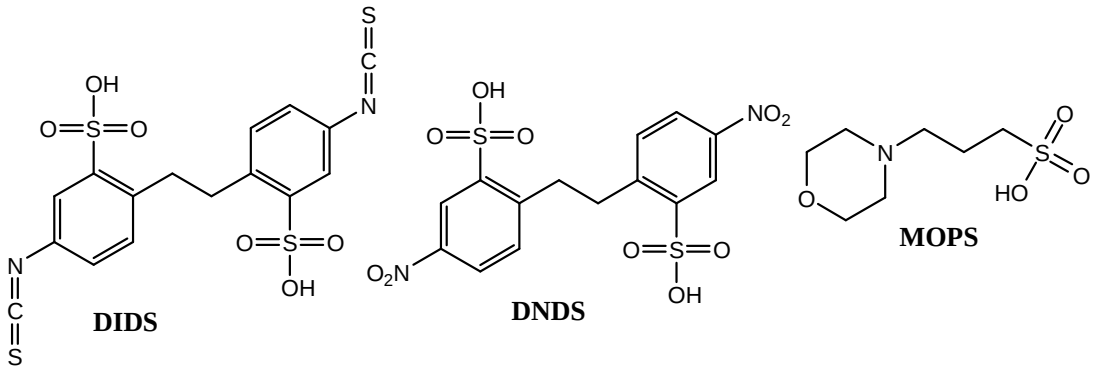


Figure 33 : Structures des acides sulfoniques inhibant CFTR de façon non sélective

Les molécules décrites précédemment portent toutes une fonction acide carboxylique ou acide sulfonique ionisées à pH physiologique. Cette charge négative est probablement importante dans le mécanisme d'inhibition. En effet, CFTR étant un canal anionique, la charge portée par ces composés va permettre une approche aisée vers le pore du canal entraînant par la suite son blocage. Ces molécules ne sont pas sélectives de CFTR et nécessitent généralement de fortes doses pour l'inhiber.

6.2.2.1.3. Les anions organiques

Des anions organiques comme le gluconate, le glutamate et le glutathion sont inhibiteurs de CFTR lorsqu'ils sont présents sur la face intracellulaire de la membrane.

6.2.2.1.4. Les sulfonylurées

Le glibenclamide et le tolbutamide (Figure 3'), deux sulfonylurées hypoglycémiantes utilisées comme antidiabétiques, sont inhibiteurs de CFTR. Ces composés sont assez efficaces (IC_{50} de 40 et 400 µM) mais ne sont pas spécifiques et sont donc utilisés uniquement comme outils pharmacologiques.

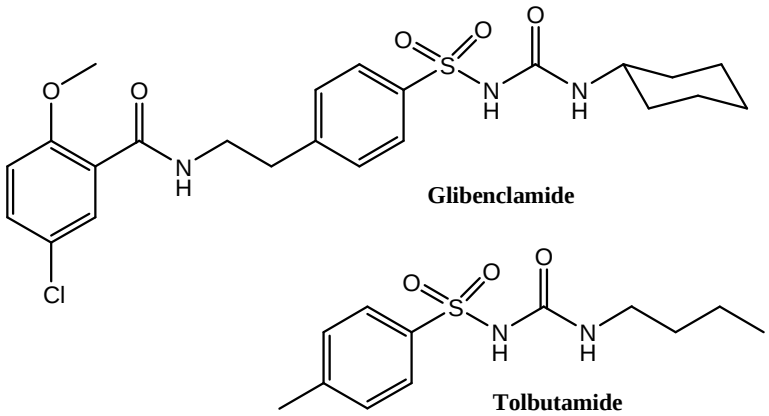


Figure 34 : Structure du glibenclamide et du tolbutamide

Il a également été rapporté que deux sulfonylurées aromatiques, DASU-02 et LY-295501, inhibent CFTR de façon réversible et efficace (IC_{50} de 10 et 150 µM) mais très peu de données sont disponibles, concernant ces deux composés (Cai, 2003).

6.2.2.1.5. La phlorétine

Un dérivé polyphénolique, la phlorétine, est un inhibiteur non sélectif de CFTR, actif uniquement après administration sur la face externe de la membrane (IC_{50} de 200 µM).

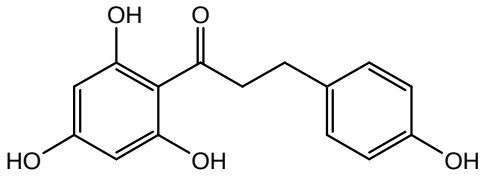


Figure 35 : Structure de la phlorétine

Cette molécule, du fait de sa structure polyphénolique, doit être ionisée à pH physiologique et est sensible à l'oxydation. Cette dernière caractéristique, ajoutée à son manque de sélectivité et à son IC_{50} élevée, diminue son intérêt en tant qu'inhibiteur de CFTR.

6.2.2.1.6. Les substrats de la MRP

Deux composés de structure stéroïdienne, TLCS (3-sulfate-taurolithocholate) et $E_2$17βG (β-estradiol-17-(β-D-glucuronide), connus comme substrats de la MRP, ont montré une activité inhibitrice de CFTR. Ces composés ne sont donc pas sélectifs.

Plus récemment, une autre étude a mis en évidence trois autres composés qui inhibent à la fois MRP et CFTR (Diena, 2007). Ces molécules sont le sulfinpyrazone, le probénécide et la benzbromarone (K_i sur CFTR respectivement de 191 µM, 1 mM et inférieur à 3 mM) (Figure 36).

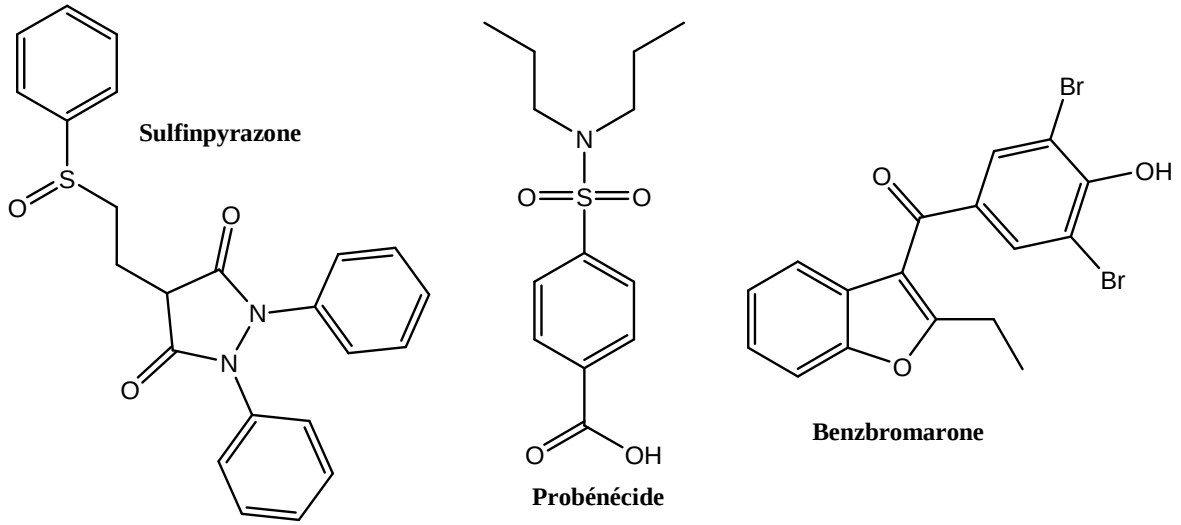


Figure 36 : Structures du sulfinpyrazone, du probenecide et de la benzbromarone

Cette activité croisée entre CFTR et un autre transporteur ABC peut présenter un certains nombre d'effets indésirables (Cf Intro 4.6.3).

6.2.2.1.7. Les glycine-hydrazides et leurs dérivés

Le criblage d'une chimiothèque de 100 000 molécules a permis la mise en évidence de quatre classes d'inhibiteurs de CFTR (Muanprasat, 2004). Parmi elles, la classe des glycine-hydrazides comprend de nombreux analogues actifs. Des études de relations structure-activité ont été entreprises sur ce type de composés et ont permis l'identification de la molécule GlyH-101 (Figure 37) qui possède un K_i de l'ordre du micromolaire. GlyH-101 est capable de diminuer la sécrétion de fluide induite par la toxine du choléra de manière rapide et réversible. Le mécanisme d'action proposé pour cette molécule, qui se trouve sous forme de monoanion

à pH physiologique, est une occlusion du pore du canal CFTR par fixation sur le coté externe de la membrane (Figure 37) (Sheppard, 2004).

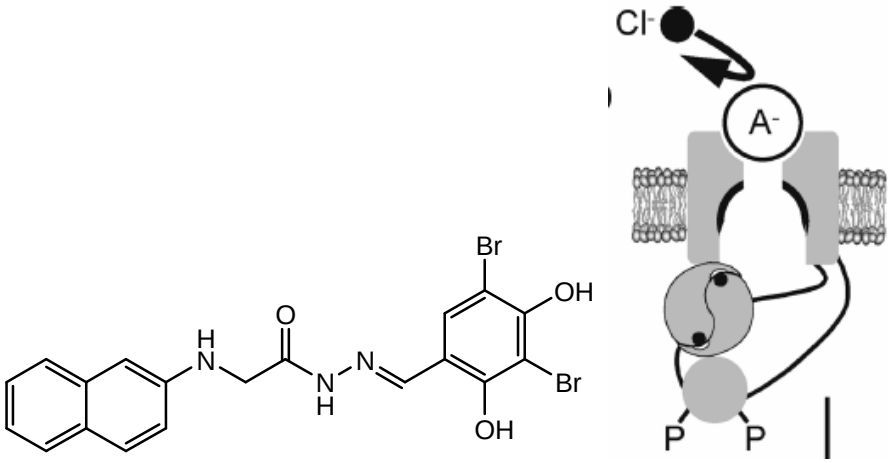


Figure 37 : Structure de GlyH-101 et mécanisme d'inhibition supposé de CFTR par GlyH-101 (noté A^-)

Ce mode d'action est particulièrement intéressant pour le traitement des diarrhées. En effet, il n'est pas nécessaire pour une molécule qui agit à l'extérieur des cellules de l'épithélium digestif de traverser les membranes. Elle peut exercer son effet sans être absorbée, ce qui simplifie ses caractéristiques pharmacologiques. De plus, cela diminue le risque d'effets indésirables, dans le cas de CFTR notamment au niveau pulmonaire.

Dans cette optique, des dérivés de GlyH-101 ont été synthétisés (Sonawane, 2005 ; Sonawane, 2007). Ces composés conservent leur forte capacité à inhiber CFTR et ne sont pas absorbables par le tractus digestif. Chimiquement, ces molécules sont des dérivés de glycine-hydrazides ou de malonates conjugués ou non à des polymères ou à des lectines (Figure 38). La conjugaison à des polymères comme le polyéthylène glycol (PEG) permet de diminuer l'absorption. La conjugaison à des lectines permet, quant à elle, d'augmenter l'interaction avec l'épithélium digestif, favorisant la rétention des composés et de ce fait potentialise l'inhibition de CFTR (IC_{50} de 50 nM).

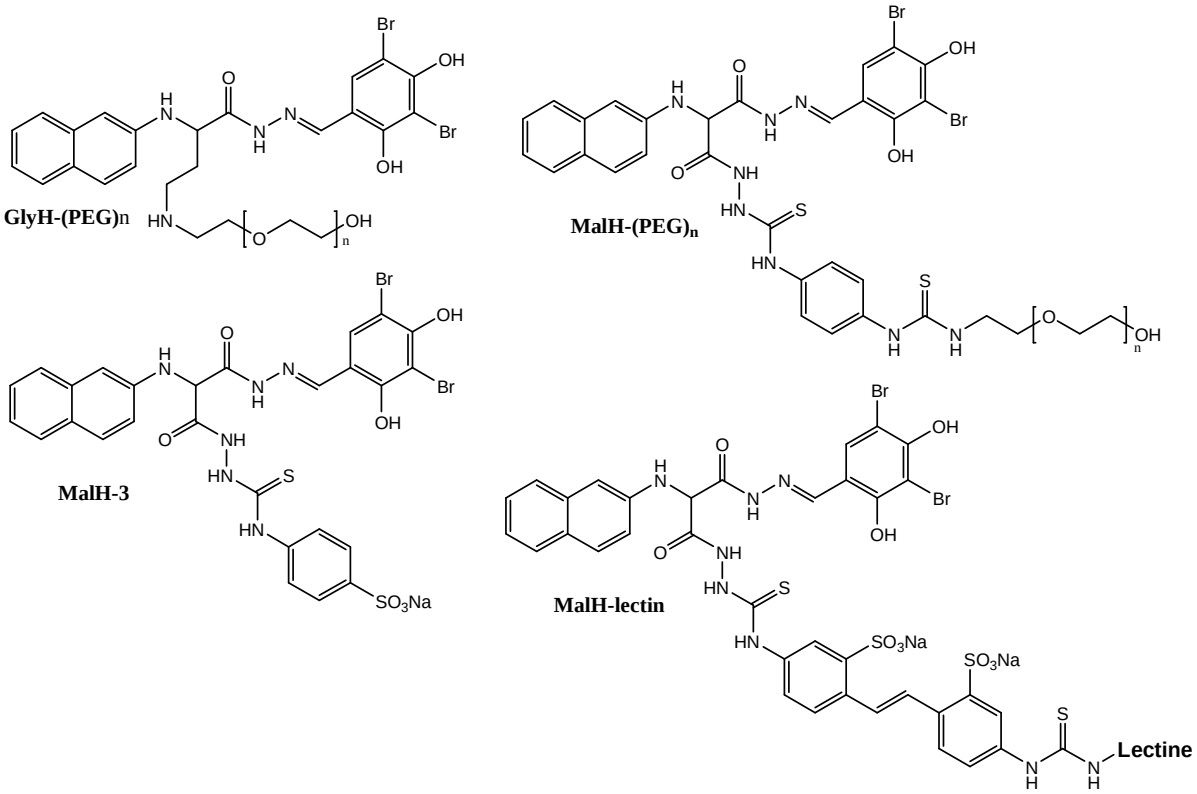


Figure 38 : Structures des dérivés de glycine-hydrazides ou de malonates conjugués ou non

Une fois encore on remarque que ces composés sont sous forme anionique à pH physiologique.

6.2.2.2. Les inhibiteurs allostériques

La plupart des inhibiteurs allostériques sont compétitifs vis-à-vis de l'ATP, ce qui laisse envisager un site d'action commun ou proche. Parmi ces composés, on trouve l'ADP, l'AMP, l'ion pyrophosphate et l'ion $Au(CN)_2^-$. Il est à noter que ces espèces sont également des anions. Comme nous l'avons vu précédemment, la génistéine et les autres dérivés de flavonoïdes sont également inhibiteurs de CFTR à fortes doses par effet allostérique.

6.2.2.2.1. La toxine peptidique GaTx1 (Fuller, 2007)

La toxine peptidique GaTx1 a été isolée par fractionnement bioguidé d'un venin de scorpion. GaTx1, de poids moléculaire 3,7 kDa, s'est avéré être un inhibiteur puissant et réversible de CFTR. De plus, ce peptide est spécifique puisqu'il n'a montré aucune action sur

différents canaux ioniques et transporteurs ABC. Son mode d'action supposé est une inhibition allostérique à proximité des sites de liaison à l'ATP.

6.2.2.3. Les inhibiteurs dont le mode d'action est incertain ou inconnu (Cai, 2003)

La majeure partie des inhibiteurs de CFTR se situe dans ce groupe car leur mécanisme d'inhibition n'a pas encore pu être déterminé. Toutefois, certains sont supposés être des bloqueurs du canal ouvert mais d'autres évaluations sont nécessaires pour les classer définitivement dans cette catégorie.

6.2.2.3.1. Les médicaments utilisés en clinique pouvant inhiber CFTR

Plusieurs principes actifs de médicaments ont montré une inhibition de CFTR. Ces molécules commercialisées pour une indication indépendante de CFTR ne sont donc pas sélectives de cette dernière.

Le furosémide et le bumétanide (Figure 39), deux diurétiques de l'anse, en plus d'inhiber le cotransporteur NaK/2Cl, bloque CFTR (Ki d'environ 50 µM). La fluoxétine, molécule utilisée dans le traitement de la dépression, est capable d'inhiber CFTR avec un Ki d'environ 30 µM tout comme l'ibuprofène un anti-inflammatoire non stéroïdien.

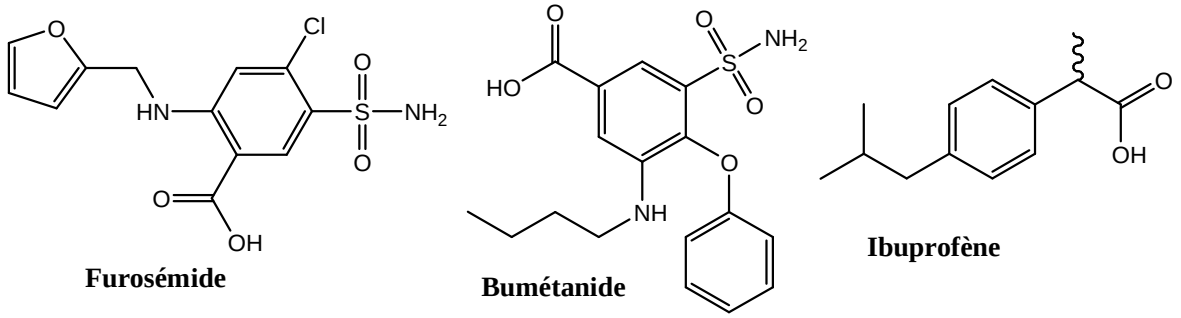


Figure 39 : Structures du furosémide, du bumétanide et de l'ibuprofène

On peut remarquer que ces trois molécules comportent une fonction acide carboxylique comme la plupart des bloqueurs du canal ouvert.

6.2.2.3.2. Le DIAO

L'acide dihydroindenyloxyalkaonique (DIAO) (Figure 40), qui est un inhibiteur connu du cotransporteur K/Cl, est également inhibiteur de CFTR (Ito, 2001).

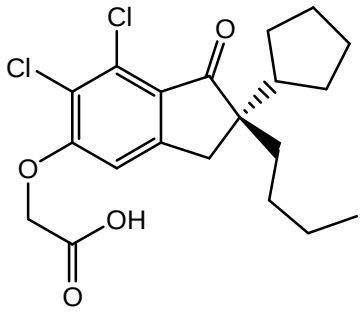


Figure 40 : Structure du DIAO

Il est à noter que le DIAO comporte également une fonction acide carboxylique.

6.2.2.3.3. La suramine (Bachmann, 1999)

La suramine (Figure 41), composé qui présente des propriétés antiparasitaires, est également un inhibiteur réversible de CFTR. Ce composé qui a été évalué pour différentes propriétés, présente de nombreux effets indésirables lorsqu'il est administré chez l'homme probablement en raison de sa taille et de son grand nombre de sites d'interactions possibles.

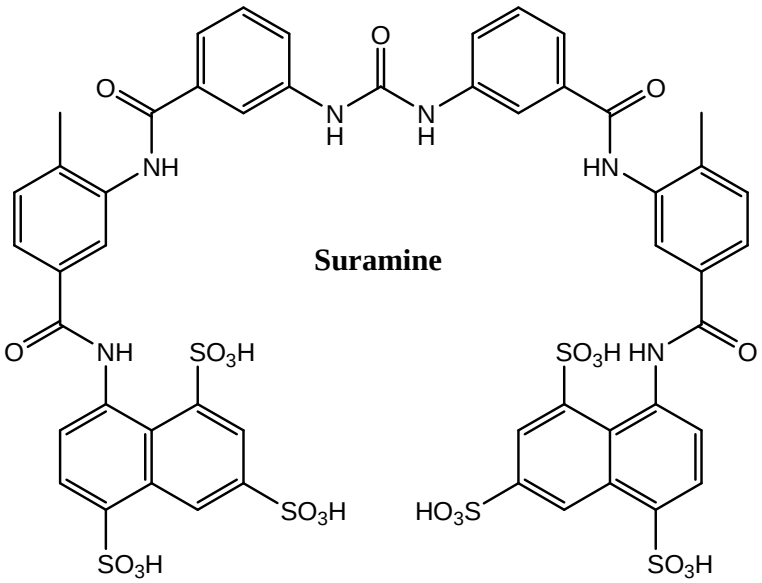


Figure 41 : Structure de la suramine

La suramine possèdent elle aussi des fonctions acides ionisées à pH physiologique, il s'agit ici des fonctions acides sulfoniques.

6.2.2.3.4. Les extraits de Croton lechleri (Gabriel, 1999 ; Fischer, 2004)

Croton lechleri est une plante sud américaine utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des diarrhées. Des extraits de cette plante, SP-303 et SP-300 qui diffèrent par le mode d'extraction, ont été évalués en tant qu'inhibiteur de CFTR. Les deux extraits n'ont pas montré de différence significatives d'activité et ont été capables d'inhiber CFTR après stimulation par la fsk. Les composés actifs sont des proanthocyanidines oligomériques, qui sont des dérivés de flavonoïdes, de poids moyen de 2,1 kDa (Wyde, 1993). L'extrait SP-303 possède également des propriétés antivirales.

6.2.2.3.5. Le stéviol et ses analogues

Le stéviol (Figure 42) est un dérivé du stévioside, un produit naturel obtenu par extraction à partir de la plante S*tevia rebaudiani*. Le stéviol, qui comporte encore une fois une fonction acide carboxylique, possède des propriétés édulcorantes ainsi que des activités antihypertensives. Il est capable d'inhiber CFTR indépendamment de la concentration en AMPc intracellulaire (Pariwat, 2008). Des analogues de cette molécule sont également inhibiteurs de CFTR avec des IC_{50} de 10 à 100 µM.

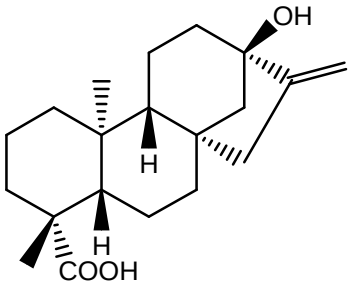


Figure 42 : Structure du stéviol

6.2.2.3.6. Les thiazolidines

A la suite d'un criblage à haut débit, une nouvelle classe d'inhibiteurs de CFTR a été mise en évidence : les 2-thioxo-4-thiazolidinones (Ma, 2002). Le composé le plus actif,

nommé $CFTR_{inh}$-172 (Figure 43), a montré une inhibition indépendante de la concentration en AMPc pour des concentrations d'environ 300 nM. Il ne possède pas d'effet sur les canaux chlorures autres que CFTR, est inactif vis-à-vis des canaux K_{ATP} et n'interagit pas avec divers autres transporteurs ABC. De plus, il est capable de diminuer la sécrétion de fluide induite par la toxine du choléra.

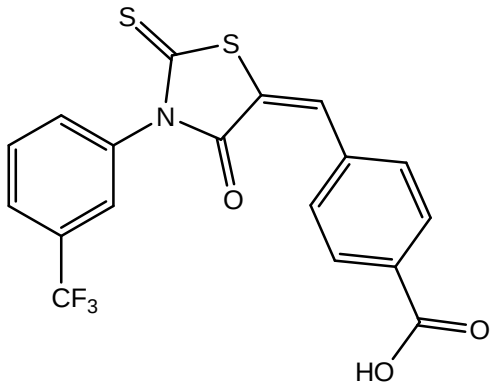


Figure 43 : Structure de $CFTR_{inh}$-172

Ce composé qui présente de nombreuses caractéristiques très intéressantes est très utilisé comme outil pharmacologique pour l'étude de CFTR. Toutefois il possède deux inconvénients : il a une efficacité réduite sur tissus et est peu soluble dans l'eau (Sheppard, 2004).

Là encore on peut noter la présence d'une fonction acide carboxylique sur ce composé.

6.2.2.3.7. Autres inhibiteurs

Plusieurs composés se sont révélés inhibiteurs de CFTR sans que leur mécanisme d'action soit connu. Leurs effets sont complexes et ne sont donc pas faciles à élucider. Ils inhibent CFTR à des concentrations de 1 à 100 µM. Ces composés sont issus de classes chimiques très différentes avec la présence de deux oestrogènes (diéthylstilbesterol et 17-β-estradiol), d'acide anthracène-9-carboxylique, de chromanol 293B et de rouge phénol.

Récemment deux autres composés (INH1 et INH2 (Figure 44)) ont été mis en évidence par criblage (Muanprasat, 2007) avec des K_i de l'ordre du micromolaire lors de tests cellulaires.

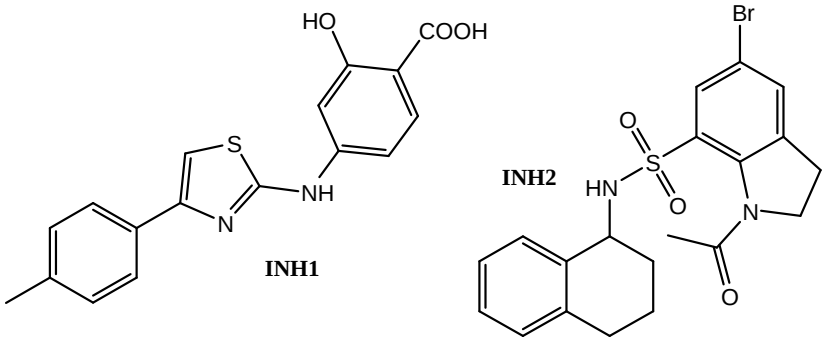


Figure 44 : Structure des composés INH1 et INH2

Des études in vivo ont montré la capacité d'INH1, à l'inverse d'INH2, à réduire la sécrétion de fluide induite par la toxine du choléra. Toutefois, INH1 n'est pas spécifique de CFTR puisqu'il est capable d'inhiber les canaux chlorures calcium activés. Une fois encore on peut remarquer que INH1 possède une fonction acide carboxylique.

6.2.2.4. Conclusions sur les inhibiteurs de CFTR

La plupart des bloqueurs du canal ouvert sont donc des composés non sélectifs de CFTR, qui l'inhibent à des concentrations moyennes (de l'ordre de la dizaine de µM). La majorité de ces composés comporte une fonction ionisée à pH physiologique (acide carboxylique ou sulfonique, ou phénol). Cette particularité chimique, qui peut expliquer leur activité sur CFTR, peut être aussi liée à un manque de sélectivité avec des effets sur d'autres canaux ioniques.

Certains d'entre eux sont très utilisés comme outils pharmacologiques, notamment le glibenclamide. Parmi ces bloqueurs, les dérivés de glycine-hydrazides ou de malonates conjugués sont susceptibles d'être utilisés en thérapie des diarrhées sécrétoires. En effet, ils présentent des caractéristiques extrêmement prometteuses, notamment du point de vue du mode d'action et de la puissance de l'inhibition.

Le seul inhibiteur allostérique sélectif est la toxine GaTx1. Ce composé peut être un outil intéressant pour l'étude de CFTR mais sa structure peptidique lui confère de nombreux désavantages pour une utilisation en tant qu'anti-diarrhéique.

Parmi les inhibiteurs dont le mode d'action n'est pas connu, $CFTR_{inh}$-172 apparaît comme le seul agent sélectif de CFTR. Malheureusement, sa faible solubilité et son manque d'activité sur tissu sont deux freins à son utilisation.

Un grand nombre de ces composés possèdent un fonction acide carboxylique ou sulfonique tout comme les bloqueurs du canal ouvert. Cette caractéristique structurale ne suffit pas à elle seule à les considérer comme des inhibiteurs de ce type. Toutefois, on peut supposer que la présence commune au sein de ces molécules de cette charge négative à pH physiologique, reflète des similitudes dans le mode d'action.

On peut remarquer qu'à l'exception du composé GlyH-101 et de ses dérivés, il n'existe pas d'inhibiteur puissant et sélectif de CFTR. Cependant, seul le composé conjugué à une lectine est très actif, or cette association complique sa synthèse et son éventuel développement thérapeutique.

Il n'existe donc pas à l'heure actuelle d'inhibiteurs de CFTR présentant les caractéristiques nécessaires à un usage thérapeutique.

6.3. Activité biologique des composés synthétisés au laboratoire

Malgré la mise en évidence de nombreux modulateurs de CFTR de classes chimiques et de modes d'action variés, il n'existe pas à l'heure actuelle de composé présentant toutes les caractéristiques nécessaires à un développement thérapeutique. Tant au niveau des activateurs/potentiateurs que des inhibiteurs, la découverte de composés sélectifs et actifs à faible concentration reste donc un défi à relever pour les équipes engagées dans ces thématiques de recherche.

Dans cette optique, les composés mis en évidence dans notre laboratoire, dans le cadre de l'étude de la réactivité du MG avec des bases nucléiques, peuvent être considérés comme des composés chefs de files (« lead ») pouvant permettre le développement d'une nouvelle classe d'activateurs/potentiateurs et d'une nouvelle classe d'inhibiteurs. En effet, ces molécules sont particulièrement intéressantes puisqu'elles n'ont pas présentées de toxicité lors de tests cellulaires.

6.3.1. GPact-11a : Potentiateur de CFTR

Le composé **GPact-11a** (Figure 45) est issu de la réaction entre le MG et la 9-propyladénine. Sa dénomination rappelle la collaboration entre le laboratoire d'accueil à Grenoble (G) pour la partie synthèse et une équipe de l'Université de Poitiers pour l'évaluation biologique (P), son action activatrice de CFTR (act) et aussi qu'il s'agit du mélange racémique majoritaire (**a**).

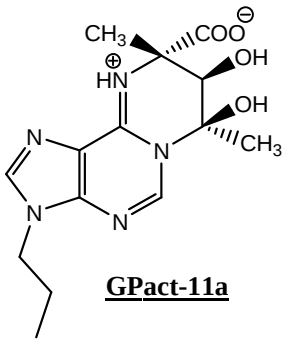


Figure 45 : Structure de **GPact-11a**

GPact-11a présente lui aussi, comme de nombreux modulateurs de CFTR, une fonction acide carboxylique. Cependant, il n'est pas chargé à pH physiologique car il possède une fonction amine protonée. In vivo, ce composé est donc présent sous forme zwitterionique.

GPact-11a a été évalué par le test des efflux d'ions iodures radioactifs et a présenté une EC_{50} de 2,1 µM sur cellules CHO-wt suite à une pré-activation des canaux par la forskoline. **GPact-11a** a par la suite été évalué par le test des efflux sur cellules Calu3, qui sont des cellules humaines de l'épithélium pulmonaire, montrant une EC_{50} de 1,8 µM.

6.3.2. GPinh-5a : Inhibiteur de CFTR

Le composé **GPinh-5a** (Figure 46) est quant à lui issu de la réaction entre le MG et la 2'-désoxyadénosine.

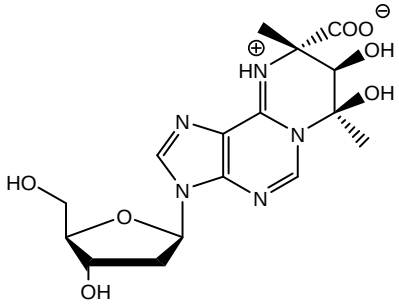


Figure 46 : Structure de **GPinh-5a**

Lors de son évaluation par le test des efflux d'ions iodures radioactifs, il a présenté les IC_{50} récapitulées dans le tableau 4.

Types cellulaires	CHO-wt	Calu3	CHO-G551D	Cos7 G1349D	JME/CF15
IC_{50} **GPinh-5a**	71 pM	93 pM	43 nM	72 pM	68 pM
IC_{50} $CFTR_{inh}$-172	1,2 µM				

Tableau 4 : IC_{50} de **GPinh-5a** et de $CFTR_{inh}$-172 déterminées par le test d'efflux. Cellules : CHO-wt, CHO G551D (exprimant la mutation G551D), CF15 : cellules épithéliales humaines d'origine nasale exprimant la protéine mutée ΔF508 corrigée par la température, Cos-7 transfectées transitoirement par GFP-G1349D-CFTR

Comme **GPact-11a**, **GPinh-5a** possède une fonction acide carboxylique et est présent sous forme zwitterionique à pH physiologique.

GPinh-5a, en plus d'être actif à des concentrations très faibles, est sélectif des canaux chlorures de type CFTR puisqu'il n'a pas présenté d'activité sur les canaux chlorures calcium- et volume-activés. Sa structure est très proche de celle de **GPact-11a**. En effet, ils sont tout deux issus de dérivés de l'adénine modifiée en position 9 et ne diffèrent que par ce substituant : propyle pour **GPact-11a** et 2'-désoxyribose pour **GPinh-5a**.

7. Objectifs du travail

7.1. Recherche du pharmacophore

Les différentes molécules précédemment synthétisées au laboratoire et possédant une activité sur la protéine CFTR sont de plusieurs types. En effet, en plus des composés de la famille I, on note la présence du composé de la famille II **6**.

Les composés des familles I et II possèdent tous le motif structural représenté sur la figure 47 c'est à dire un atome d'oxygène chargé négativement à pH physiologique, séparé d'un atome d'azote chargé positivement à pH physiologique par deux atomes de carbone. Cette charge positive peut être délocalisée sur plusieurs atomes d'azote. Nous nous sommes donc attachés à confirmer et à préciser le pharmacophore, c'est-à-dire la plus petite unité structurale conduisant à l'activité biologique, en proposant des variations chimiques autour de ce motif minimum.

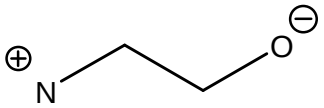


Figure 47 : Motif structural minimum du pharmacophore supposé

7.2. Pharmacomodulation des composés actifs

La présence parmi ces molécules à la fois de potentiateurs et d'inhibiteurs de CFTR laissait présager un mode d'action commun aux deux types de composés. Nous avons donc voulu évaluer l'influence de diverses modifications chimiques sur les modulateurs les plus actifs. Ces substitutions avaient pour but :

- d'identifier les motifs porteur de l'activité potentiatrice et ceux responsable de l'activité inhibitrice,
- d'augmenter l'activité par rapport aux composés « chef de file »,
- et enfin de disposer d'une gamme de produits actifs permettant de réaliser des études de relations structure-activité et ainsi de rationaliser les synthèses ultérieures.

Les modulateurs les plus efficaces sont issus de la réaction du MG et de dérivés de l'adénine, c'est donc sur cet hétérocycle que les premières modifications ont été effectuées.

D'autre part, des essais préliminaires avaient montré que la réaction entre la 2-aminopyridine **4** et l'éthylglyoxal aboutissait à des adduits du même type que ceux mis en évidence avec le MG. Des hétérocycles différents de la 2-aminopyridine ont également été mis à réagir avec cet α-oxoaldéhyde afin d'étendre la réaction et d'évaluer l'influence de ce motif sur l'activité de ces composés.

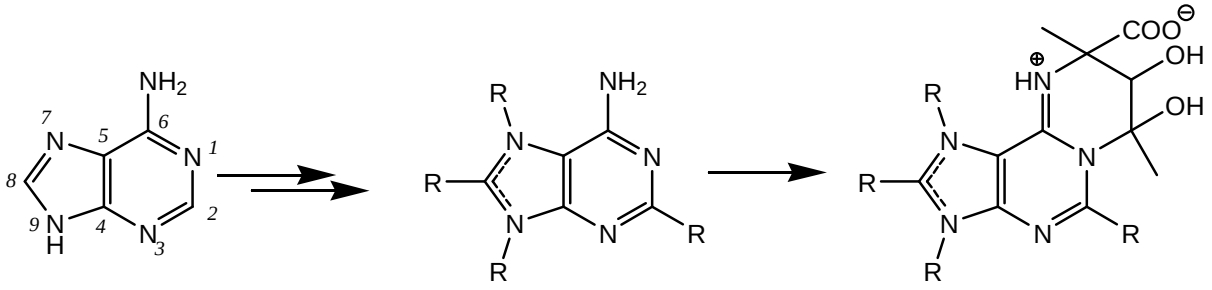


Schéma 4 : Modulations envisagées sur l'adénine avant réaction avec le MG

7.3. Synthèses, propriétés physico-chimiques et biologiques des composés formés

Les composés actifs précédemment mis en évidence, **GPinh-5a** et GPinh-11a, ont été synthétisés à plus grande échelle afin de disposer de quantité importante permettant des tests sur modèle tissulaire ou sur animaux.

Les molécules synthétisées étant évaluées biologiquement, il était important de connaître leurs caractéristiques dans les milieux utilisés pour leurs évaluations. C'est pourquoi leur solubilité en milieu aqueux ainsi que leur stabilité ont été étudiées pour les plus actives d'entre elles.

Les composés synthétisés ont été évalués en tant que modulateurs de la protéine CFTR par l'équipe partenaire.

Chapitre 1 : Recherche du pharmacophore

Après la mise en évidence de premiers composés actifs sur les canaux CFTR, dans le cadre d'une collaboration entre notre laboratoire à Grenoble et un laboratoire à Poitiers, nous avons cherché à confirmer la structure du pharmacophore supposé. Les différents travaux effectués dans ce but sont présentés dans ce chapitre.

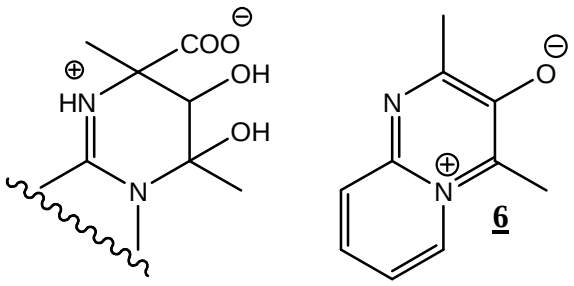
Nous avons tout d'abord synthétisé ou obtenu commercialement des molécules n'appartenant pas aux familles mises en évidence au laboratoire, mais dont l'évaluation sur la protéine CFTR est intéressante du point de vue de la relation structure-activité.

De nouveaux adduits sur des α-aminoazahétérocycles ont également été préparés en utilisant un autre α-oxoaldéhyde : l'éthylglyoxal.

D'autre part, les différents adduits d'α-oxoaldéhyde sur des α-aminoazahétérocycles ont été modifiés pour éliminer des groupements proches du pharmacophore proposé afin d'établir le rôle de ces derniers dans les effets biologiques.

1. Bétaïne et dérivés

Parmi les composés précédemment synthétisés au laboratoire et actifs sur la protéine CFTR, on note, en plus des composés de la famille I, la présence du composé de la famille II **6** (Figure 48).



Famille I **Famille II**

Figure 48 : Structures des composés de la famille I et du composé de la famille II **6**

Ces deux types de molécules possèdent en commun le motif structural représenté sur la figure 49, c'est-à-dire, à pH physiologique, un atome d'oxygène chargé négativement séparé par deux atomes de carbone d'un atome d'azote chargé positivement. Les composés des familles I et II sont donc zwitterioniques à pH voisin de 7.

Au sein des composés actifs, les électrons correspondant à ces charges peuvent être répartis sur plusieurs sites.

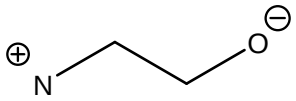


Figure 49 : Motif structural minimum du pharmacophore supposé

Dans le but d'identifier le pharmacophore, c'est-à-dire la plus petite unité structurale portant l'activité biologique, des variations chimiques autour de ce motif minimum ont été recherchées. Pour cela, nous avons identifié parmi les composés commerciaux, ou dont la synthèse est aisée, un certain nombre de molécules portant le pharmacophore supposé.

La molécule commerciale la plus simple qui comporte ce motif est la bétaïne **10** (Figure 50). Ce composé est constitué d'une fonction acide en α d'un groupement ammonium quaternaire triméthylé. La bétaïne, qui est connue comme étant un correcteur de CFTR (Cf

Intro 4.6.5.2), est utilisée en thérapeutique, sous forme de citrate, pour le traitement des troubles digestifs.

Des analogues déméthylés sur la fonction amine (**11** et **12**), diméthylés en α de la fonction acide carboxylique **13**, portant des groupements éthyles sur l'ammonium quaternaire **14** ou encore possédant un groupement phosphate à la place de la fonction carboxylate **15**, ont également été évalués en tant que modulateurs de la protéine CFTR (Figure 50).

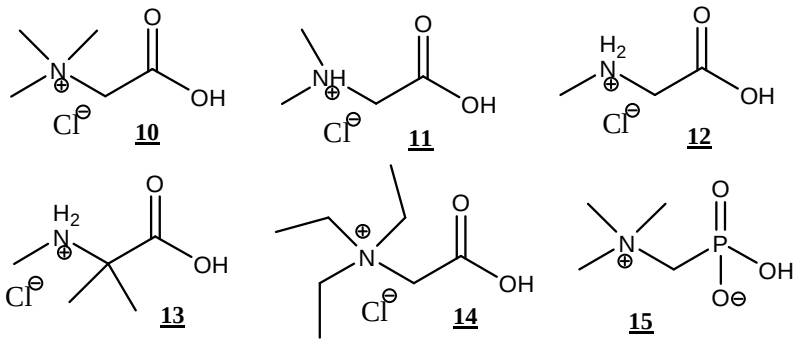


Figure 50 : Structures de la bétaïne **10** et de certains de ses dérivés

D'autres acides aminés ont été évalués comme la L-*N*-méthylproline **16**, la L-*N*,*N*-diméthylproline **17** ou encore l'acide 2-amino-2-norboranenecarboxylique **18** (Figure 51).

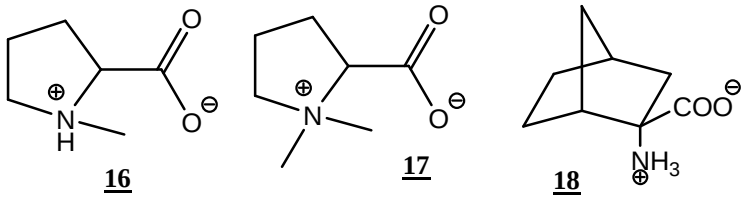


Figure 51 : Structures de la L-*N*-méthylproline **16**, de la L-*N*,*N*-diméthylproline **17** et de l'acide 2-amino-2-norboranenecarboxylique **18** (représentés sous forme zwitterionique)

Dans le but d'étudier l'influence de la distance entre les charges, des composés dans lesquels les hétéroatomes chargés sont séparés par trois atomes ont également été étudiés. Il s'agit de la cispentacine **19**, qui possèdent trois atomes de carbone entre un atome d'oxygène chargé négativement et un atome d'azote chargé positivement à pH physiologique, et de la taurine **20** qui porte une fonction sulfonate (Figure 52).

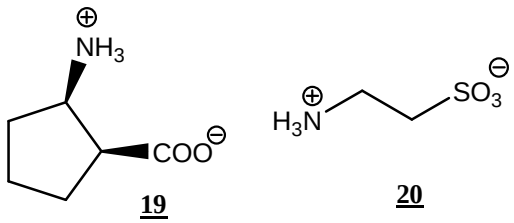


Figure 52 : Structures de la cispentacine **19** et de la taurine **20**

D'autres analogues de la bétaïne dans lesquels l'atome d'azote est inclus dans un cycle aromatique ont également été évalués. Il s'agit du bromure de 1-(2-carboxyéthyl)pyridinium **21**, du bromure de 1-éthyl-3-hydroxypyridinium **22**, du bromure de 1-(2-carboxyéthyl)quinolinium **23** ou encore du bromure de 2-(2-carboxyéthyl)isoquinolinium **24** (Figure 53).

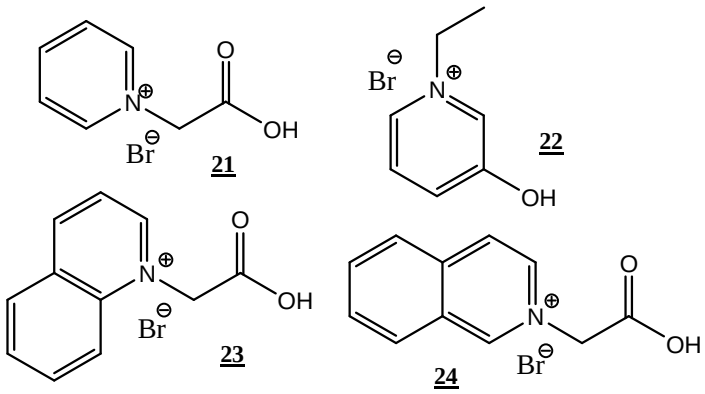


Figure 53 : Structures d'analogues aromatiques de la bétaïne

Enfin, un dérivé de nucléoside incluant une base purique comme les modulateurs **GPact-11a** et **GPinh-5a** a été testé sur la protéine CFTR. Il s'agit de la 7-méthylguanosine **25** (Figure 54). Ce composé, qui est impliqué dans la structure-coiffe de l'extrémité des ARN messagers, se présente en partie sous forme zwitterionique à pH physiologique.

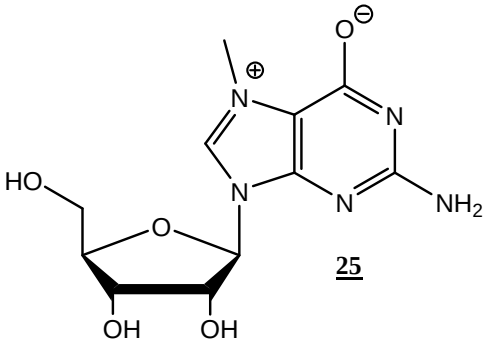


Figure 54 : Structure de la 7-méthylguanosine **25**

Parmi ces molécules, seul le composé **24** n'est pas disponible commercialement. Sa synthèse a été réalisée par alkylation de l'isoquinoléine avec le 2-bromoéthanoate d'éthyle, puis hydrolyse de la fonction ester éthylique.

Cet ensemble de composés présente une diversité chimique importante autour du pharmacophore. En effet, ces molécules permettent d'évaluer l'influence :

- de la longueur de la chaîne entre les hétéroatomes chargés,
- de la lipophilie,
- des contraintes stériques,
- et de la nature de l'atome lié à l'atome d'oxygène chargé négativement.

Ainsi, après évaluation de leur activité sur la protéine CFTR, ces composés devaient permettre de préciser la structure du pharmacophore.

2. Adduits de l'éthylglyoxal sur des α-aminoazahétérocycles

Le 2-oxobutanal ou éthylglyoxal (EG) **26** est l'homologue à quatre atomes de carbone du MG. Dans le but d'étudier l'influence de la nature de l'α-oxoaldéhyde de départ sur l'activité biologique des composés, nous avons envisagé la synthèse des adduits EG correspondant aux modulateurs les plus efficaces de CFTR. L'EG est intéressant puisqu'il est peu modifié par rapport au MG précédemment utilisé (remplacement de CH_3 par CH_2-CH_3).

La réaction entre l'EG et la 2-aminopyridine **4** a été mise en évidence lors de travaux préliminaires au sein du laboratoire (Routaboul, 2003) (Schéma 5).

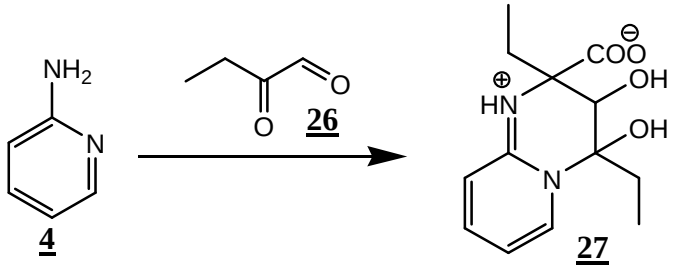


Schéma 5 : Réaction entre la 2-aminopyridine **4** et l'éthylglyoxal (EG) **26** aboutissant au composé **27**

Lors de l'étude préliminaire de cette réaction, seul l'adduit majoritaire a été isolé avec un rendement très faible de 3 %, probablement en raison d'une mauvaise qualité de l'EG préalablement synthétisé par oxydation du butanal **28** avec le dioxyde de sélénium (Routaboul, 2003)).

2.1. Synthèses décrites de l'éthylglyoxal

L'EG n'est pas commercialisé par les fournisseurs classiques de composés chimiques et nous n'avons pas pu nous le procurer. Nous nous sommes donc attachés à le synthétiser au laboratoire par une voie de synthèse rapide.

Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature. L'une d'entre elles, assez longue, consiste en une chloration du butanal **28** aboutissant au 2,2-dichlorobutanal **29**. Ce dernier est ensuite mis à réagir avec du méthanolate de sodium conduisant au 1,1,2,2-tétraméthoxybutane **30** dont l'hydrolyse acide devait permettre d'obtenir l'EG **26** (Verhe, 1982) (Schéma 6).

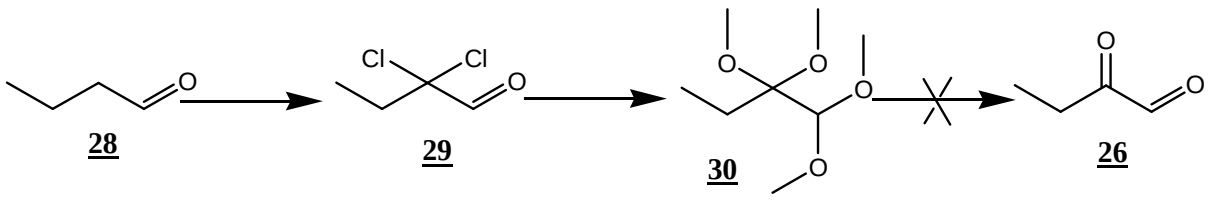


Schéma 6 : Synthèse de l'EG décrite par (Verhe, 1982)

Cependant, au cours de travaux réalisés au sein du laboratoire (Routaboul, 2003) ou par d'autres auteurs (Meade, 2003), l'EG n'a pas pu être obtenu par cette méthode en raison d'une décomposition rencontrée au cours de la dernière étape.

Une autre voie de synthèse faisant appel à une oxydation du butan-1,2-diol par le dioxygène en présence d'argent n'est pas facile à mettre en œuvre au laboratoire (Xu, 2005). En effet, cette réaction doit être réalisée en phase gazeuse à très haute température.

Une oxydation du butanal par le chlorochromate d'ammonium (CrO_3ClNH_4) décrit l'obtention d'EG avec un rendement de 60 % (Liu, 1992). Cependant au cours de la réaction, la butan-2,3-dione se forme également avec un rendement de 23 %. Ces deux produits étant difficile à séparer notamment par chromatographie (polarité voisine) et par distillation (température d'ébullition de 88 °C pour la butanone et de 89-91 °C pour l'EG (Verhe, 1982)) nous n'avons donc pas retenu cette méthode de synthèse.

Une autre publication décrit l'obtention de l'EG, mais en tant que produit secondaire par hydrolyse de divers amides (Zav'yalov, 1979).

L'EG peut également être obtenu par oxydation au dioxyde de sélénium de la butan-2-one (Gi, 1995) ou du butanal selon la méthode précédemment utilisée au laboratoire.

2.2. Synthèses réalisées

Parmi les différentes synthèses décrites, les méthodes d'oxydation par le dioxyde de sélénium du butanal **28** et de la butanone **31** (Schéma 7) sont celles qui sont les plus simples à mettre en œuvre au laboratoire. Les composés carbonylés ont donc été mis à réagir avec un équivalent de dioxyde de sélénium (Gi, 1995).

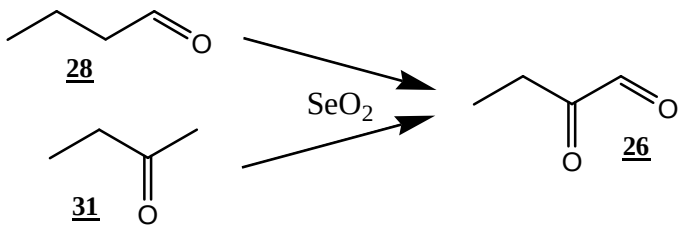


Schéma 7 : Synthèses de l'EG **26** par oxydation au dioxyde de sélénium du butanal **28** et de la butanone **31**

Des essais de suivi de la réaction par chromatographie sur couche mince (CCM) ont été réalisés avec différents révélateurs (*p*-anisaldéhyde, iode, dimolybdate d'ammonium et de Cérium, 2,4-dinitrophénylhydrazide) et différents systèmes d'élution et n'ont pas conduit à des résultats satisfaisants. La réaction est donc poursuivie jusqu'à disparition de la suspension de dioxyde de sélénium et apparition d'un précipité noir de sélénium réduit. Après élimination de ce précipité par filtration, l'EG est obtenu par distillation sous pression réduite du filtrat.

Les analyses qualitatives et quantitatives de ces composés sont difficiles. En effet, l'analyse par spectrométrie de RMN des fractions contenant l'EG montre la présence de nombreux signaux correspondant soit à des formes hydratées de l'EG soit à des produits secondaires.

Dans les réactions de condensation avec les α-aminoazahétérocycles, les fractions de distillation d'EG obtenues par oxydation du butanal **28** donnent de meilleurs résultats que celles obtenues par oxydation de la butanone **31**. Ceci est peut-être dû, dans le cas de la réaction à partir de la cétone, à une suroxydation en acide de la fonction aldéhyde formée.

Des essais de coupure oxydative de composés insaturés par l'ozone (O_3) ou par le tétroxyde d'osmium (OsO_4) ont été effectués à partir de la 1-éthylacroléine **32** et de la 2-éthylacroléine **33** (Figure 55).

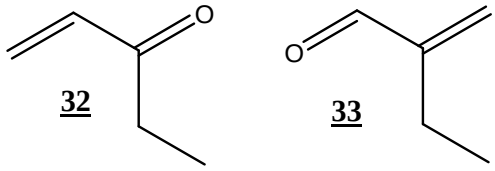


Figure 55 : Structures de la 1-éthylacroléine **32** et de la 2-éthylacroléine **33**

Ces méthodes n'ont pas donné de résultats satisfaisants du fait d'une suroxydation de la fonction aldéhyde au cours de la réaction. Toutefois, des essais complémentaires d'ozonolyse pourraient être réalisés en maîtrisant la suroxydation possible par le dioxygène ambiant.

La méthode de synthèse de l'EG par oxydation du butanal au dioxyde de sélénium est donc la plus efficace parmi celles qui sont décrites et faciles à mettre en œuvre au laboratoire. De plus, elle est rapide puisqu'elle est effectuée en une seule étape. Cependant, elle présente de nombreux inconvénients, notamment une purification difficile, l'utilisation de grosses quantités de dioxyde de sélénium et la formation de sélénium. Or, le sélénium et ses oxydes sont des composés très toxiques. Par ailleurs, cette méthode présente une mauvaise reproductibilité. En effet, l'EG n'est pas toujours obtenu même en utilisant des conditions similaires à des synthèses précédentes qui avaient fonctionné. Cela est peut être dû à la qualité des réactifs (butanal et dioxyde de sélénium).

2.3. Nouveaux adduits

La réaction préliminaire entre l'EG et la 2-aminopyridine, mise en évidence précédemment (Routaboul, 2003), a été réalisée en utilisant de l'EG purifié (Schéma 8). Ceci a permis d'obtenir aussi l'adduit minoritaire (rendement de 15 %), d'améliorer fortement le rendement de 3 % à 23 % pour l'adduit majoritaire et d'achever la description des adduits formés.

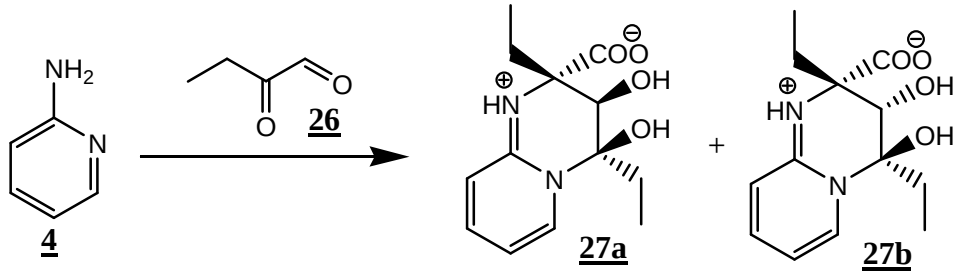


Schéma 8 : Réaction entre la 2-aminopyridine **4** et l'EG **26** aboutissant aux adduits majoritaires **27a** et minoritaires **27b**

La stéréochimie de ces composés n'a pas pu être déterminée du fait de l'absence de cristaux utilisables en cristallographie aux rayons X. Les configurations absolues des atomes de carbone asymétriques qui sont représentées sur le schéma 8 sont probablement similaires à celles des adduits MG-2-aminopyridine.

L'adduit du MG sur la 1-aminoisoquinoléine s'étant révélé être un inhibiteur puissant de CFTR, l'EG a été mis à réagir avec la 1-aminoisoquinoléine **34** (schéma 9).

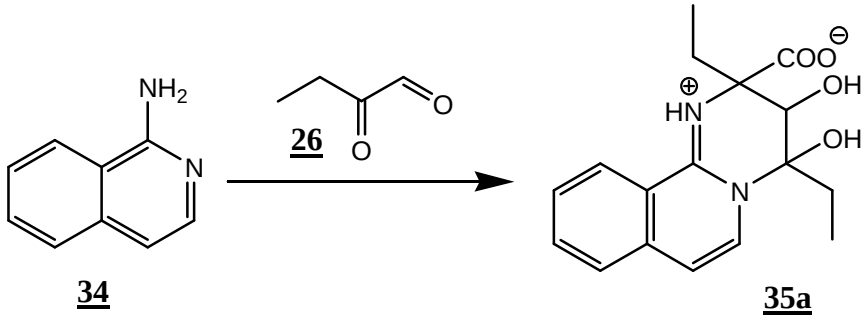


Schéma 9 : Réaction de l'EG **26** sur la 1-aminoisoquinoléine **34** conduisant aux adduits **35a**

On obtient ainsi les adduits attendus dont le mélange majoritaire **35a** est isolé avec un rendement de 21 %. Les déplacements chimiques observés par spectrométrie de RMN sont similaires à ceux observés pour les adduits de l'EG sur la 2-aminopyridine (à l'exception des

signaux des protons aromatiques issus de la 1-aminoisoquinoléine). On observe, comme pour les adduits **27a**, une anisotropie des protons d'un groupe méthylène d'un des deux groupements éthyles.

L'inhibiteur de CFTR le plus puissant mis en évidence au laboratoire est l'adduit du MG sur la 2'-désoxyadénosine. L'EG **26** a donc été mis à réagir avec la 2'-désoxyadénosine **36** (schéma 10).

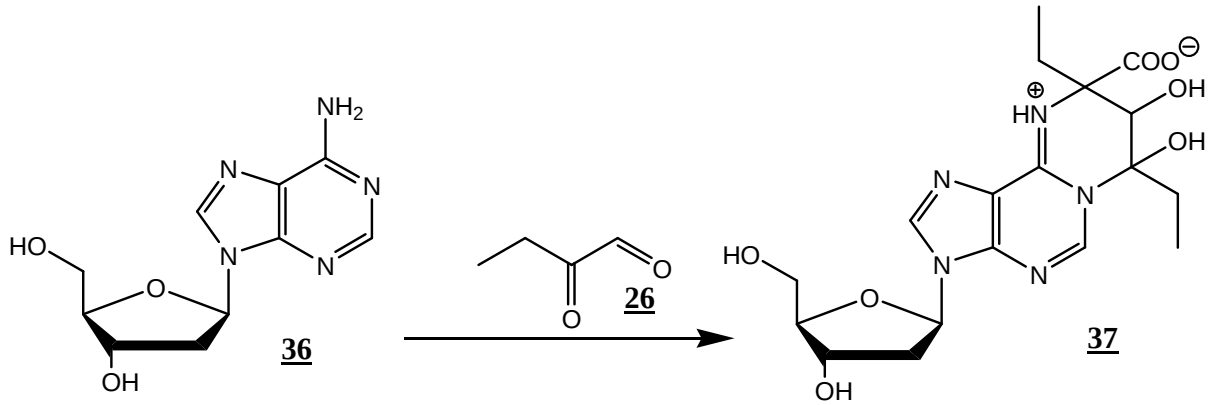


Schéma 10 : Réaction de l'EG **26** sur la 2'-désoxyadénosine **36** et adduits attendus **37**

Le composé attendu **37** n'a pas pu être obtenu probablement en raison d'une mauvaise qualité de l'EG utilisé. Il sera donc nécessaire de réaliser à nouveau cette synthèse en contrôlant mieux la qualité du réactif.

Le potentiateur de CFTR mis en évidence au laboratoire est l'adduit du MG sur la 9-propyladénine avec laquelle l'EG a donc été mis à réagir.

Lors d'essais préliminaires, une fraction de distillation contenant l'EG impur a été mise à réagir avec la 9-propyladénine **38**. Du fait de la présence d'impuretés, le nombre d'équivalent d'EG par rapport à la 9-propyladénine a été sous évalué. A la fin de la réaction, on isole un composé majoritaire qui possède une polarité très différente et plus faible que celle des adduits du MG sur la 9-propyladénine. La spectrométrie de masse montre un pic pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z égal à 246. Cette masse correspond à la masse d'un monoadduit de l'EG sur la 9-propyladénine. L'analyse par spectrométrie de RMN permet d'identifier un nouveau produit **39** (Schéma 11).

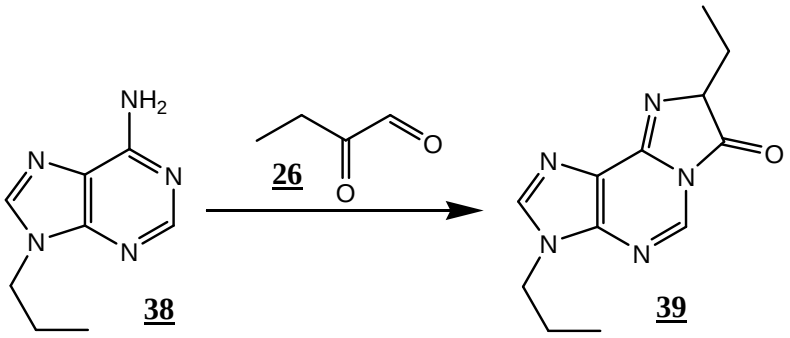


Schéma 11 : Monoadduit **39** de l'EG **26** sur la 9-propyladénine **38**

Ce composé est un analogue d'adduits déjà décrits obtenus par addition d'autres α-oxoaldéhydes sur des α-aminoazahétérocycles. En effet, des composés de monoaddition du MG sur la 2-aminopyridine **40**, du phénylglyoxal sur la 2-aminopyridine **41** (Ohba, 2000) et du phénylglyoxal sur l'adénine **42** (Kuroda 1993) ont été décrits (Figure 56).

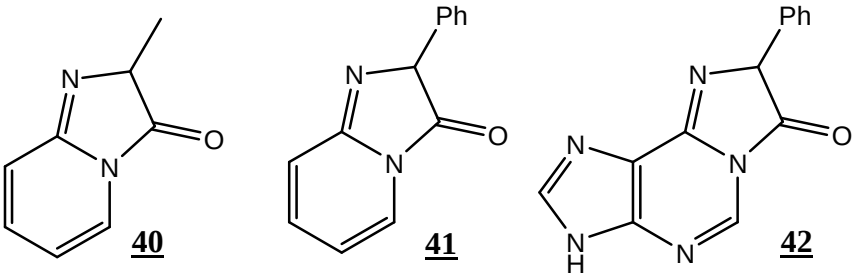


Figure 56 : Structures des composés obtenus par monoaddition du MG sur la 2-aminopyridine **40**, du phénylglyoxal sur la 2-aminopyridine **41** et du phénylglyoxal sur l'adénine **42**

A notre connaissance, aucun monoadduit de l'EG sur des α-aminoazahétérocycles n'a été décrit dans la littérature.

Par la suite, une fraction contenant de l'EG purifié a été mise à réagir avec la 9-propyladénine **38** de manière à obtenir le composé attendu **43** (Schéma 12).

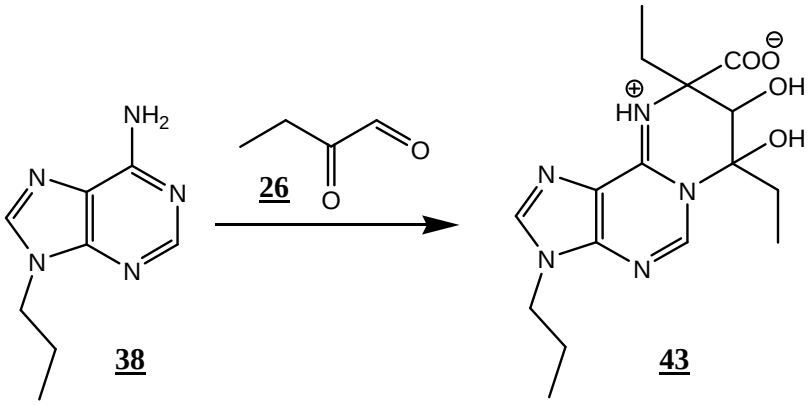


Schéma 12 : Réaction de l'EG **26** sur la 9-propyladénine **38** et adduits attendus **43**

Comme dans le cas de la réaction de l'EG **26** sur la 2'-désoxyadénosine **36,** le composé attendu **43** n'a pas été obtenu en raison de la mauvaise qualité de l'EG utilisé.

Les déplacements chimiques des protons des adduits de l'EG et du MG sur différents α-aminoazahétérocycles sont représentés dans le tableau 5.

Adduits	**Composé**	Rdt (%)	Déplacements chimiques en ppm (RMN ^{1}H à 400 MHz dans D_2O à 21 °C)				
			CHOH	CH_2		CH_3	
EG-2-aminopyridine	**27a**	23	4,55	1,95 (1H)	1,82 (3H)	0,97	0,91
	27b	7	4,20	1,95 (1H)	1,82 (3H)	0,95	
MG-2-aminopyridine	**5a**	32	4,29	--	--	1,43	1,38
	5b	26	3,93	--	--	1,53	1,49
EG-1-aminoisoquinoléine	**35a**	21	*	2,38	2,26-1,86	0,85	0,77
	35b	10	4,50	2,38	2,26-1,86	1,00-0,65	
MG-1-aminoisoquinoléine	**44a**	50	4,44	--	--	1,71	1,63
	44b	32	4,11	--	--	1,71	1,62

* Signal masqué par le pic du solvant

Tableau 5: Déplacements chimiques des protons des mélanges majoritaires **a** des adduits l'EG et du MG sur différents α-aminoazahétérocycles et rendements des réactions d'obtention correspondantes

Les spectres de RMN obtenus sont très proches de ceux des adduits du MG sur les mêmes α-aminoazahétérocycles. On observe également la présence du signal singulet correspondant à CHOH dans une zone allant de 4,2 à 4,8 ppm (Figure 57). Par contre, les signaux des groupes méthyles ne se présentent plus sous forme de singulets car ils sont couplés avec un groupement méthylène. Ils sont par ailleurs légèrement plus blindés que ceux des adduits analogues du MG. On note également l'apparition des signaux correspondant aux CH_2 des groupes éthyles. Un de ces deux groupes présente une anisotropie des protons qui peut expliquer la largeur du signal correspondant d'un des deux groupements méthyles dans les adduits du MG sur les α-aminoazahétérocycles.

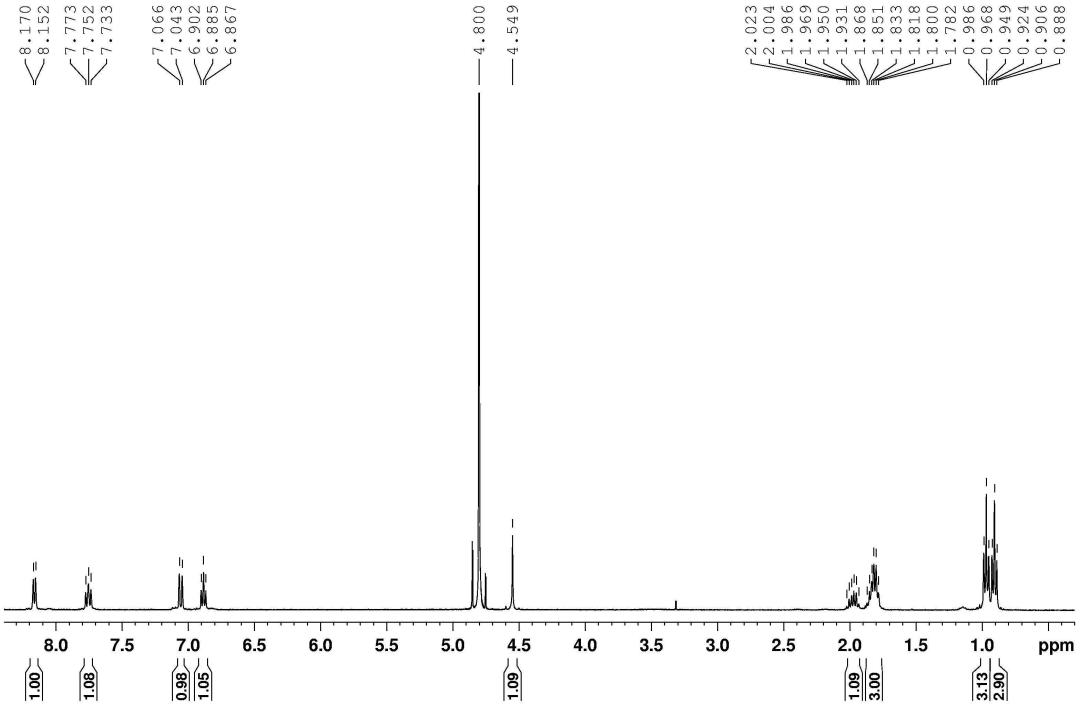


Figure 57 : Spectre de RMN ^{1}H à 400 MHz dans D_2O à 21 °C des adduits **27a**.

Les rendements obtenus, de l'ordre de 20 %, sont plus faibles que ceux obtenus pour les adduits du MG. Cette baisse de rendement est probablement due à la qualité médiocre de l'EG utilisé.

2.4. Conclusion sur la réaction entre l'EG et les α-aminoazahétérocycles

La réaction précédemment mise en évidence entre le méthylglyoxal et un α-aminoazahétérocycle a donc été généralisée à un autre α-oxoaldéhyde : l'éthylglyoxal. L'ajout d'un atome de carbone en passant du MG à l'EG ne change pas les caractéristiques de la réaction. On obtient le même type d'adduits que ceux du MG dans lesquels les groupements méthyles du nouveau cycle formé sont remplacés par des groupements éthyles. Les produits de la réaction se présentent également sous forme de deux mélanges majoritaire **a** et minoritaire **b** dans des proportions proches de celles observées avec le MG.

Comme pour le MG, la formation des adduits cycliques résultant de l'addition de deux molécules d'α-oxoaldéhyde sur un α-aminoazahétérocycle nécessite un fort excès de composé dicarbonylé. En effet, lorsque les deux réactifs sont présents dans des proportions voisines, il se forme essentiellement dans le cas de l'EG, le produit de monoaddition comme dans le cas d'autres α-oxoaldéhydes.

La synthèse de l'EG est délicate et ne permet pas d'obtenir de grandes quantités de produit pur. La mise au point d'une autre méthode d'obtention pourrait permettre de disposer de plus grandes quantités d'EG et ainsi de synthétiser de nombreux analogues de produits actifs de la famille I.

Les nouveaux composés synthétisés, après étude de leur activité sur la protéine CFTR, pourront permettre d'évaluer l'influence du remplacement des groupements méthyles par des groupements éthyles. En effet, cette modification va augmenter la lipophilie des composés. De plus, ce changement de substituant se situant à proximité des hétéroatomes chargés qui constituent le pharmacophore supposé, il risque d'influencer l'activité de ces composés par l'encombrement stérique apporté.

3. Modification des adduits

3.1. Accès à la Famille II

Au cours de précédents travaux (Routaboul, 2003), le mélange d'adduits du MG sur la 2-aminopyridine **5** a conduit, après traitement basique, à un nouveau produit **6** dit de la famille II avec un rendement de 81 % (Schéma 13).

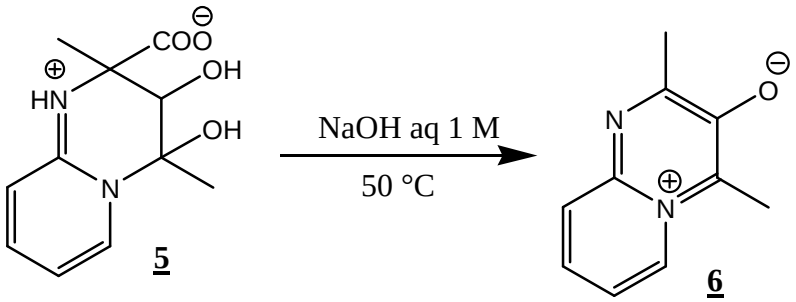


Schéma 13 : Formation du produit de la famille II **6** à partir des adduits du MG sur la 2-aminopyridine **5**

Les études réalisées lors de la mise en évidence de cette transformation ont montré la nécessité de l'emploi d'un solvant protique (eau ou alcools), d'une base forte concentrée (soude ou alcoolates primaires) et d'une température élevée (50 °C).

Des analyses par spectrométrie d'absorption UV-visible ont permis de déterminer un pK_a aux alentours de 4 pour ce composé qui se présente donc sous forme zwitterionique à pH physiologique (Routaboul, 2003).

Au cours de la formation de ce produit à partir du composé de la famille I, trois réactions se déroulent en une seule étape : une déshydratation, une décarboxylation et une oxydation. Un mécanisme a été proposé pour la formation de ce composé (Routaboul, 2003) (Schéma 14).

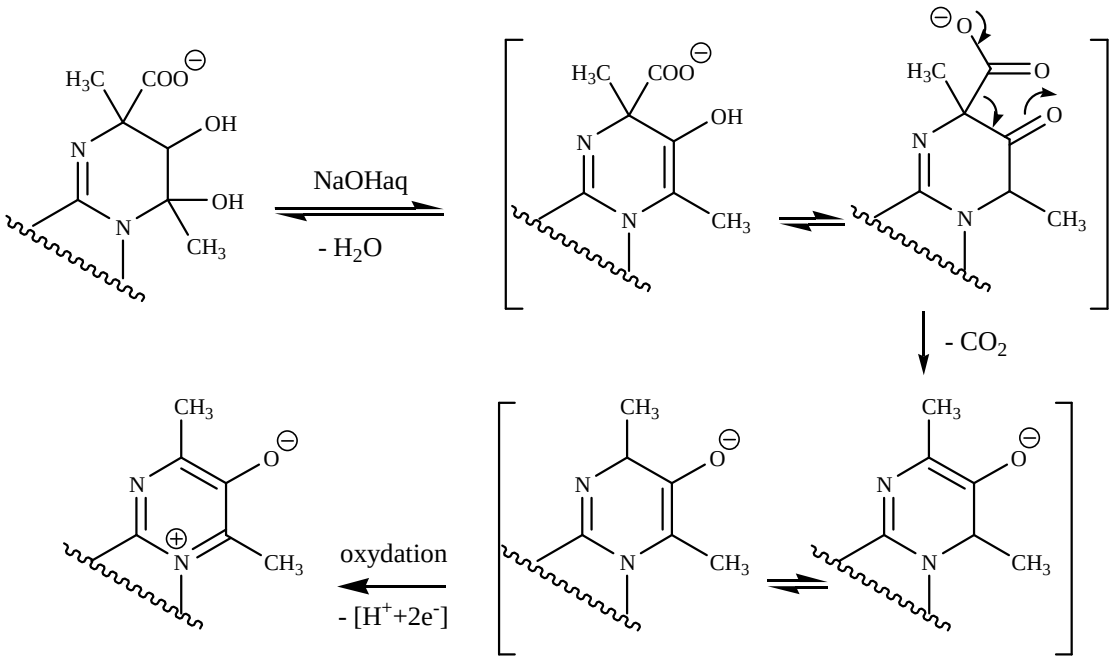


Schéma 14 : Mécanisme proposé pour la formation du composé **6** de la famille II

Nous nous sommes attachés à généraliser cette réaction à d'autres adduits de la famille I. En effet, le composé de la famille II présente le pharmacophore supposé comme dans la famille I et s'est avéré actif sur la protéine CFTR. Des analogues de ce composé peuvent donc avoir un intérêt biologique.

3.1.1. Généralisation de la réaction

Le mélange d'adduits de la famille I issu de la réaction entre le MG et la 1-aminoisoquinoléine **44** a été traité par NaOH en milieu aqueux.

En présence de soude à 1 M à 50 °C, on observe principalement la formation de la 1-aminoisoquinoléine. L'augmentation de la concentration en NaOH à de 1 à 2 M a permis d'observer, en plus de la formation de la 1-aminoisoquinoléine, un nouveau composé qui a présenté, lors de l'analyse par CCM, une polarité compatible avec celle du produit attendu.

Après isolement, l'étude par spectrométrie de masse et de RMN de ce composé a permis d'identifier sa structure. Il s'agit bien du produit de la famille II **45** qui est obtenu avec un rendement de 10 % (Schéma 15).

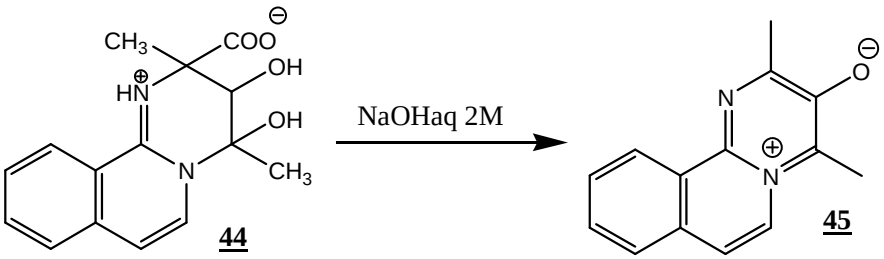


Schéma 15 : Formation du produit de la famille II **45** à partir des adduits MG-1-aminoisoquinoléine **45**

Les adduits du MG sur la benzamidine **46** (synthétisés au cours de travaux antérieurs (Routaboul, 2003)) ont été mis à raégir dans NaOHaq (1M) conduisant au produit attendu **47** avec un rendement de 39 % (Schéma 16).

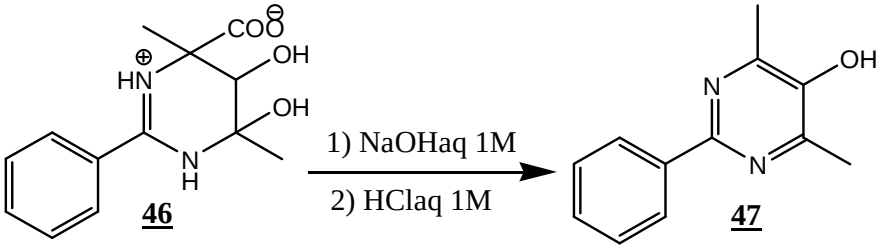


Schéma 16 : Formation du produit de la famille II **47** à partir des adduits MG-benzamidine **47**

Contrairement aux autres composés de la famille II, cette dernière molécule n'est probablement pas zwitterionique à pH physiologique. En effet, aucun atome d'azote quaternaire chargé n'est présent, ce qui ne permet sans doute qu'une ionisation partielle de la fonction phénol à pH 7.

Les adduits de l'EG sur la 2-aminopyridine **27** ont présenté la même réactivité en milieu basique que leurs analogues MG conduisant également au produit de la famille II **48** avec un rendement de 55 % (Schéma 17).

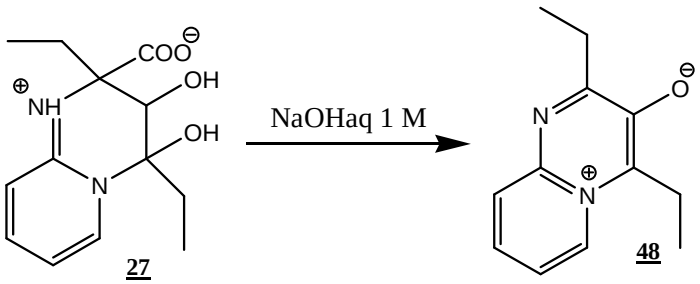


Schéma 17 : Formation du produit de la famille II **48** à partir des adduits EG-2-aminopyridine **27**

Les déplacements chimiques des protons observés par spectrométrie de RMN ^{1}H des composés de la famille II sont présentés dans le tableau 6.

α-aminoaza hétérocycle initial	**Composé**	Rdt (%)	Solvant	RMN ^{1}H (Déplacements chimiques en ppm à 400 MHz à 21 °C)			
				CH_3		CH_2	
2-aminopyridine	**6**	81	D_2O	2,89	2,81	--	
1-aminoisoquinoléine	**45**	10	CD_3OD	2,67	2,63		
benzamidine	**47**	39	$CDCl_3$	2,50			
EG 2-aminopyridine	**48**	55	CD_3OD	3,08	3,38	1,31	1,39

Tableau 6 : Déplacements chimiques des protons des produits de la famille II et rendements des réactions d'obtention correspondantes

Dans les spectres de RMN de ces composés, on observe notamment la disparition du signal du proton lié à l'atome de carbone portant la fonction hydroxyle secondaire. La spectrométrie de RMN ^{13}C montre également la disparition du signal correspondant à la fonction acide carboxylique. On peut noter la persistance des signaux correspondant aux groupements méthyles. Par ailleurs, on ne note plus d'anisotropie pour les protons des groupes éthyles du composé **48** (Figure 58).

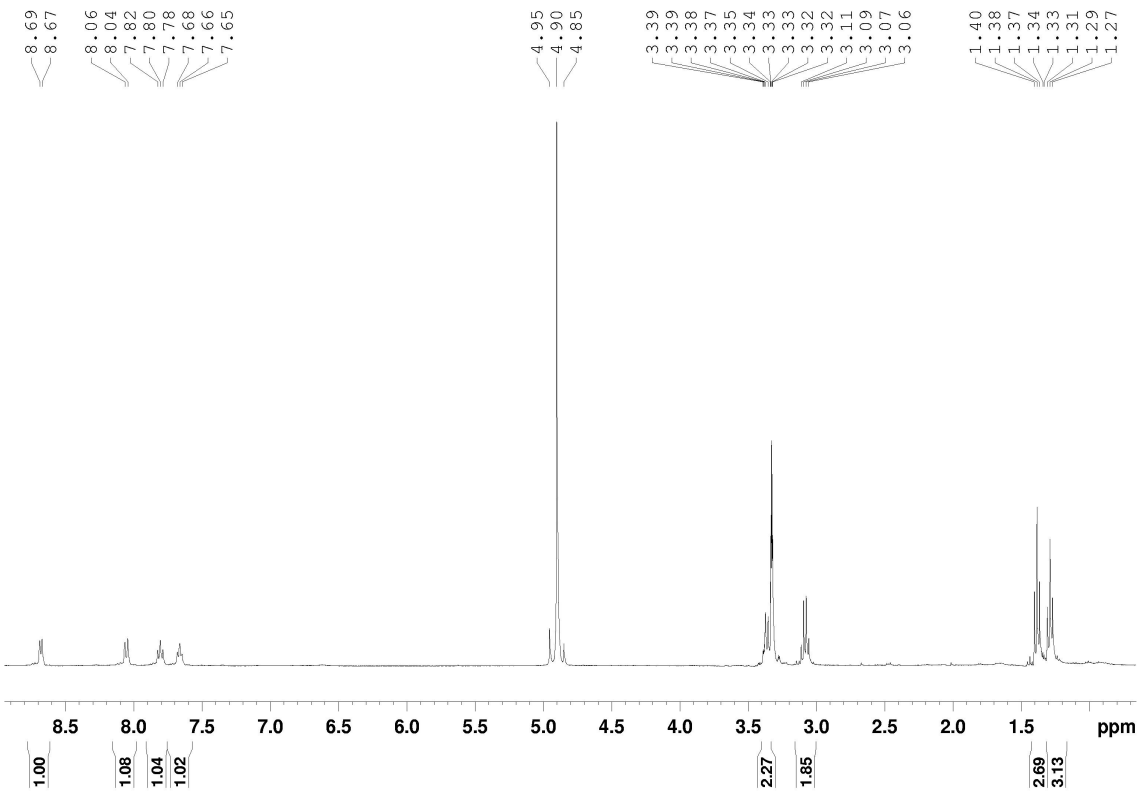


Figure 58 : Spectre de RMN ^{1}H à 400 MHz dans CD_3OD à 21 °C du composé **48**

Dans le spectre du composé **48** (Figure 58), on peut noter la présence des quatre signaux correspondant aux protons aromatiques dans la zone allant de 7,6 à 8,7 ppm, des signaux correspondant aux deux groupes CH_2 (à 3,3 et 3,1 ppm) et enfin des deux signaux correspondant aux groupements CH_3 (à 1,31 et 1,38 ppm).

Les rendements des transformations famille I - famille II sont variables. Pour le composé **6** issu des adduits MG-2-aminopyridine le rendement est bon (81 %), il est moyen pour les composés **47** issu des adduits MG-benzamidine (39 %) et **48** issu des adduits EG-2-aminopyridine (55 %) et il est faible pour le composé **45** issu des adduits MG-1-aminoisoquinoléine (10 %). Dans ce dernier cas, la formation concomitante et préférentielle de la 1-aminoisoquinoléine au cours de la transformation peut expliquer la difficulté d'obtention de ce composé.

D'autres essais sur des produits de la famille I, notamment sur des composés issus de dérivés de l'adénine (**GPact-11a**, **GPinh5-a**, adduits du MG sur le 2-aminobenzothiazole, …) ou sur les adduits EG-1-aminoisoquinoléine **35**, ont été menés sans aboutir aux composés attendus. Le principal produit présent en fin de réaction est l'α-aminoazahétérocycle initial.

3.1.2. Conclusions sur les composés de la famille II

La transformation des adduits MG-2-aminopyridine **5** en produit de la famille II a donc été étendue à d'autres hétérocycles et à un adduit de l'EG. Cependant, elle n'est pas généralisable à tous les adduits α-oxoaldéhydes/α-aminoazahétérocycles puisque plusieurs d'entre eux ne conduisent pas aux produits attendus dans les mêmes conditions de réaction. C'est la formation de l'α-aminoazahétérocycle initial qui est alors prépondérante.

Des essais de conversion de produits de la famille I en composés de la famille II ont donc été envisagés en utilisant d'autres méthodes. En effet, la transformation souhaitée est difficile car elle implique trois réactions en un pot (décarboxylation, déshydratation et oxydation).

La nouvelle transformation famille I – famille II mise en évidence constitue une nouvelle voie d'accès à des pyrimidines substituées. En effet, le composé de la famille II issu

de la benzamidine comporte un cycle pyrimidine substitué. La réaction du MG sur d'autres amidines et guanidines suivie du traitement en milieu basique devrait permettre de préparer des pyrimidines substituées portant différents groupements à la place du groupe benzyle.

3.2. Autres essais de transformation des produits de la famille I

Ces premiers essais ont été menés sur des composés de la famille I dont la transformation en produits de la famille II n'avait pas pu être réalisée : les adduits du MG sur le 2-aminobenzothiazole **49** (synthèse décrite au cours de travaux antérieurs (Routaboul, 2003)) et sur la 9-butyladénine **50** (synthèse présentée dans le chapitre 2). Ces composés ont été mis à réagir dans différentes conditions (Tableau 7).

α-aminoazahétérocycle initial	Base	Solvant	Résultats obtenus (analyse par CCM)
2-aminobenzothiazole	$Cu(OH)_2$	Ethanol absolu	α-aminoazahétérocycle initial
	$Ca(OH)_2$	Ethanol absolu	Nouveau produit minoritaire **51** + α-aminoazahétérocycle initial
	*t*BuOK	THF	Nouveau produit **51** + α-aminoazahétérocycle initial
9-butyladénine	$Cu(OH)_2$	Ethanol absolu	α-aminoazahétérocycle initial
	$Ca(OH)_2$	Ethanol absolu	Nouveau produit minoritaire **52** + α-aminoazahétérocycle initial
	*t*BuOK	THF	Nouveau produit **52** + α-aminoazahétérocycle initial

THF : Tétrahydrofurane ; *t*BuOK : 1,1-diméthyléthanolate de potassium ou *tertio*-butylate de potassium

Tableau 7 : Essais de transformation de produits de la famille I en famille II en utilisant différentes conditions

Les réactions des produits de la famille I dans l'éthanol absolu en présence de $Ca(OH)_2$ ou de *tertio*-butylate de potassium (*t*BuOK) ont abouti à un produit identique. En

utilisant *t*BuOK, la quantité du nouveau produit est apparue plus importante, ce sont donc ces conditions qui ont été retenues pour la suite des essais.

3.3. Obtention de nouveaux produits – Accès à la famille III

3.3.1. Identification

Le produit **51** issu de la réaction des adduits MG-2-aminobenzothiazole **49** avec *t*BuOK a été analysé par spectrométrie de masse. Le spectre de masse présente un pic pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z égal à 251. Cela correspond à une masse molaire égale à la masse du produit de la famille I moins 44, c'est-à-dire à la perte d'un groupe CO_2, ce qui suggère donc une décarboxylation.

Le solide isolé est probablement constitué d'un mélange de deux isomères présents dans une proportion 60:40. En effet, le spectre de RMN ^{1}H présente pour chaque signal principal, un signal similaire situé à proximité et d'intensité plus faible (rapport de 60:40) (Figure 59).

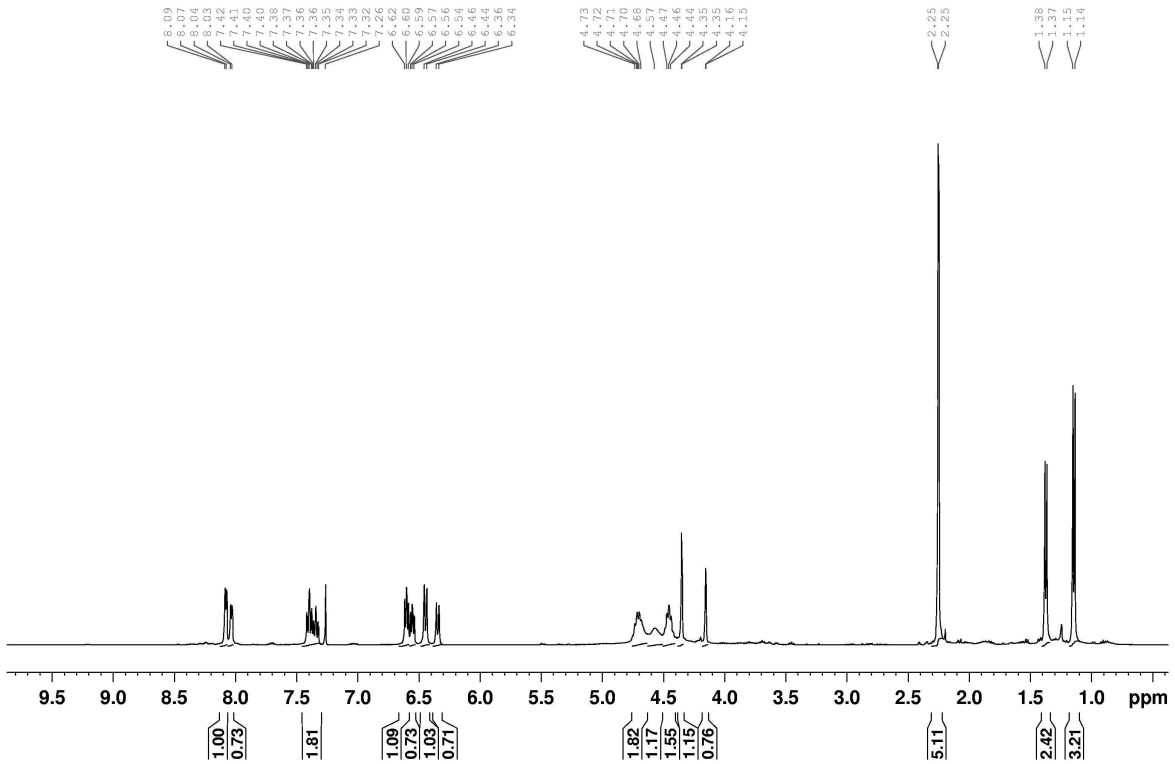


Figure 59 : Spectre de RMN ^{1}H à 400 MHz dans $CDCl_3$ à 21 °C du composé **51**

Dans la zone des protons aromatiques, on observe des signaux analogues à ceux du composé de départ de la famille I montrant l'absence de modification du cycle aromatique. La modification chimique a donc eu lieu sur le cycle à 6 atomes formé lors de l'addition des molécules de MG.

Le spectre de RMN ^{1}H montre, pour chaque isomère, deux signaux dont l'intensité correspond à 3 protons pouvant correspondre à un groupement CH_3. L'un de ces signaux est présent sous forme de doublet. On note également la présence de deux autres signaux intégrant pour un proton, l'un sous forme de doublet, l'autre sous forme de multiplet.

L'analyse du spectre de corrélation COSY 2D $^{1}H/^{1}H$ montre un couplage entre le signal d'un proton de type CH et deux autres signaux : le signal de protons de type CH_3 et l'autre signal d'un proton de type CH. On peut donc identifier l'enchaînement d'atomes représenté sur la figure 60.

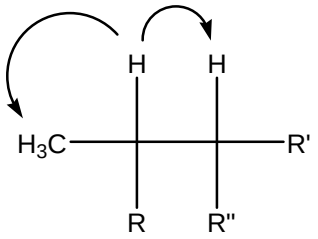


Figure 60 : Enchaînement d'atomes au sein du composé **51** (les flèches représentent les couplages observés en RMN COSY 2D $^{1}H/^{1}H$; R, R' et R'' sont liés par des atomes de carbone quaternaires ou par des hétéroatomes)

Ces informations, complétées par l'analyse du spectre de RMN ^{13}C qui montre la disparition du signal correspondant à la fonction carboxylate, permettent de préciser la structure du mélange d'isomères du composé **51** obtenu avec un rendement de 17 % (Schéma 18).

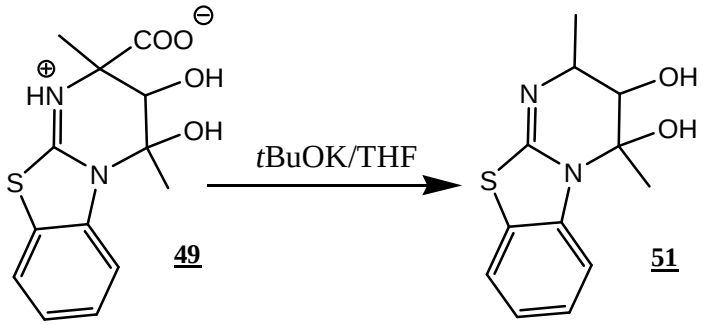


Schéma 18 : Formation du mélange d'isomères du produit de la famille III **51** à partir des adduits MG-2-aminobenzothiazole **49**

La réaction qui s'est produite est donc une décarboxylation au cours de laquelle le groupement CO_2 a été remplacé par H. Cette réaction semble conduire à au moins deux isomères.

Les adduits MG-9-butyladénine **50** ont été mis à réagir dans les mêmes conditions que les adduits MG-2-aminobenzothiazole **49**. Le mélange d'isomères du produit attendu **52** est ainsi obtenu avec un rendement de 14 %. L'analyse des spectres de masse et de RMN permet d'identifier un composé de structure analogue à celle du composé **51** (Schéma 19).

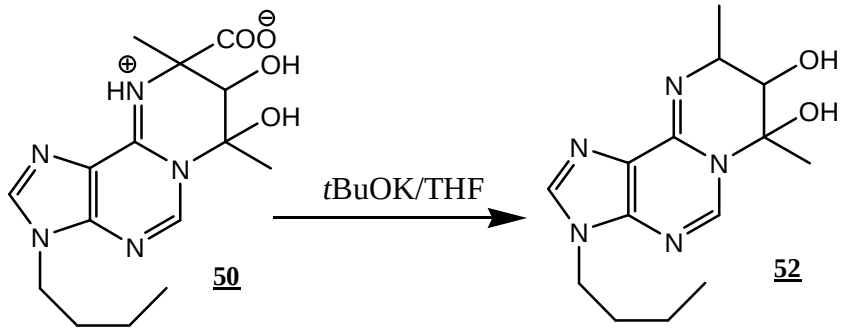


Schéma 19 : Formation du mélange d'isomères du produit de la famille III **52** à partir des adduits du MG sur la 9-butyladénine **51**

Ces deux exemples permettent de définir une nouvelle famille de composés que nous appellerons famille III.

Les composés de la famille III sont donc des analogues décarboxylés des produits de la famille I. Ils ne possèdent pas de fonction présente sous forme anionique à pH physiologique. Ainsi ils ne sont pas zwitterioniques dans ces conditions et ne contiennent donc pas le pharmacophore supposé. Nous avons donc réalisé la synthèse du composé de la famille III correspondant au potentiateur **GPact-11a** (Schéma 20) pour vérifier, notre hypothèse de structure minimale conduisant à l'activité.

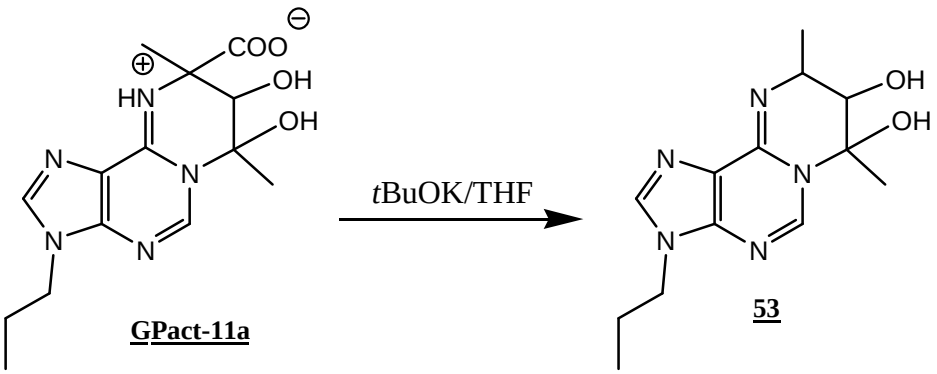


Schéma 20 : Formation du mélange d'isomères du produit de la famille III **53** à partir des adduits du MG sur la 9-propyladénine **GPact-11a**

Le mélange d'isomères du produit attendu a été obtenu avec un rendement de 37 %.

Le composé de la famille III issu de l'inhibiteur **GPinh-5a** (adduit du MG sur la 2'-désoxyadénosine) est intéressant du point de vue de son éventuel activité biologique, malheureusement il n'a pas pu être obtenu par cette voie de synthèse malgré différentes tentatives.

Nous avons par la suite essayé de décarboxyler d'autres adduits de la famille I dont la transformation en famille II est possible. Les adduits MG-2-aminopyridine **5** et MG-1-aminoisoquinoléine **44** ont donc été mis à réagir avec *t*BuOK. Le composé **44** issu de la 1-aminoisoquinoléine, dans ces conditions de réaction, conduit principalement à l'α-aminoazahétérocycle de départ.

Par contre, le mélange d'isomères du composé de la famille III **54** a pu être obtenu à partir des adduits du MG sur la 2-aminopyridine **5** (Schéma 21).

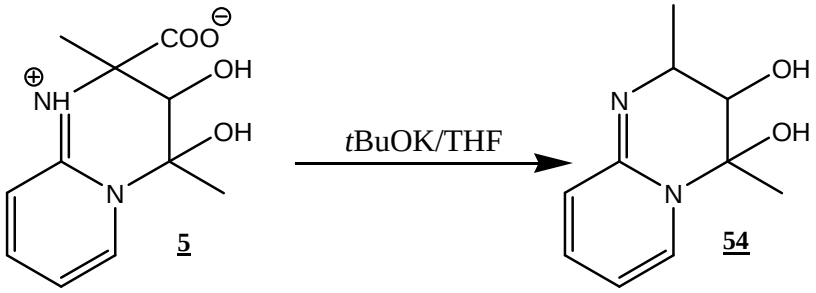


Schéma 21 : Formation du mélange d'isomères du produit de la famille III **54** à partir des adduits du MG sur la 2-aminopyridine **5**

Il est à noter que les isomères du produit de la famille III se forme rapidement et sont obtenus avec un faible rendement de 7 %. Si on laisse la réaction se poursuivre, on obtient alors le produit de la famille II **6** et l'α-aminoazahétérocycle de départ : la 2-aminopyridine **4**.

Les déplacements chimiques des protons caractéristiques des quatre mélanges d'isomères de la famille III obtenus sont représentés dans le tableau 8.

α-aminoaza hétérocycle initial	**Composé**	Rdt (%)	Déplacements chimiques en ppm (RMN ^{1}H à 400 MHz dans $CDCl_3$ à 21 °C)							
			CH-C<u>H</u>$_3$ majo	CH-C<u>H</u>$_3$ mino	CH_3 majo	CH_3 mino	C<u>H</u>OH majo	C<u>H</u>OH mino	C<u>H</u>-CH_3 majo	C<u>H</u>-CH_3 mino
2-amino benzothiazole	**51**	17	1,15	1,38	2,25	2,25	4,35	4,16	4,70	4,47
9-butyl adénine	**52**	14	1,49	1,19	2,34	2,36	4,27	4,57	5,64	5,32
9-propyl adénine	**53**	37	1,46	1,15	2,30	2,32	4,26	4,59	5,14	4,96
2-amino pyridine	**54**	7	1,15	1,38	2,26	2,25	4,35	4,15	4,73	4,47

Tableau 8 : Déplacements chimiques des protons du mélange d'isomères des produits de la famille III et rendements des réactions d'obtention correspondantes

Par rapport aux composés de la famille I, on observe plusieurs modifications du spectre de RMN qui confirment la structure. Un des deux signaux correspondant aux groupes méthyles se présente sous la forme d'un doublet (CH-C<u>H</u>$_3$). Le signal du proton lié à l'atome de carbone portant la fonction hydroxyle secondaire est lui aussi sous forme de doublet (C<u>H</u>OH). Et enfin, on note l'apparition d'un signal supplémentaire sous forme de multiplet correspondant au proton introduit à la place de la fonction carboxylate (C<u>H</u>-CH_3).

Les rendements obtenus pour les réactions menant au mélange d'isomères des produits de la famille III sont moyens en raison d'un problème de solubilité et d'une réaction incomplète car elle est arrêtée de manière à éviter les réactions secondaires. Le composé de la famille III issu de la 2-aminopyridine **54** est obtenu avec un rendement plus faible. Cela est dû

à la formation du produit de la famille II **6** au cours de la réaction aboutissant au mélange d'isomères de la famille III. A l'inverse, le rendement de la réaction aboutissant au composé de la famille III issu de la 9-propyladénine **53** est plus élevé car il a été optimisé. En effet, il était nécessaire de disposer de quantité importante de cette molécule pour différentes évaluations biologiques.

3.3.2. Réactivité des produits de la famille III

La réactivité des produits de la nouvelle famille mise en évidence a été étudiée.

En milieu acide, ces composés se dégradent en plusieurs produits dont l'α-aminoazahétérocycle initial.

Des essais préliminaires de réactivité des produits de la famille III en milieu basique ont donc été menés dans le but de les transformer en produits de la famille II.

Ces composés, mis à réagir avec plusieurs bases (différentes de $Ca(OH)_2$ et de *t*BuOK), conduisent principalement à l'α-aminoazahétérocycle de départ.

Les produits de la famille III ont également été mis en solution dans la soude. Dans ces conditions, ils se dégradent et conduisent à l'α-aminoazahétérocycle initial à l'exception du composé **54** issu de la 2-aminopyridine. En milieu NaOH aqueux, ainsi qu'en présence *t*BuOK, **54** conduit au produit de la famille II **6**.

Ces essais doivent être poursuivis en étudiant les réactions des composés de la famille III en présence d'agent déshydratant et/ou d'oxydant. En effet, une déshydratation et une oxydation sont nécessaires pour obtenir les produits de la famille II à partir de la famille III.

3.3.3. Stéréochimie

La structure et la stéréochimie des produits n'ont pas pu être déterminées par cristallographie aux rayons X. En effet, il n'a pas été possible d'obtenir des cristaux permettant cette analyse.

La réaction conduisant au mélange d'isomères du produit de la famille III **54** a été réalisée à partir des mélanges racémiques majoritaire et minoritaire de la famille I **5ab** mais également à partir du mélange racémique majoritaire seul **5a**. Dans les deux cas, on obtient le même mélange de stéréoisomères.

Les composés de départ étant présents sous forme de deux couples d'énantiomères, il est fort probable que les produits de la famille III soient également constitués de deux couples d'énantiomères. On obtiendrait donc un mélange de quatre stéréoisomères que l'on observe par spectrométrie de RMN sous forme de deux mélanges racémiques d'énantiomères (Schéma 22).

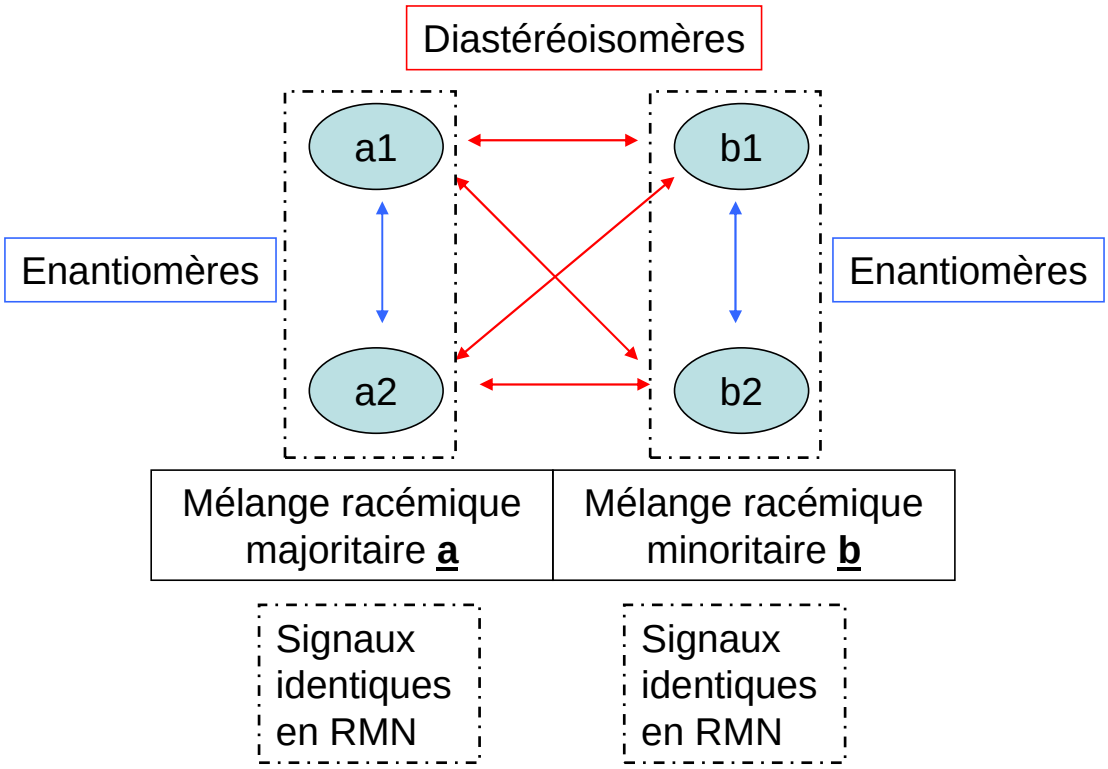


Schéma 22 : Relations supposées entre les différents isomères des produits de la famille III

Cependant, on ne peut exclure un isolement préférentiel au cours de la purification des isomères caractérisés. D'autres isomères pourraient être également formés. Toutefois, ceci est peu probable car leur polarité serait alors proche de celle du mélange d'isomères obtenus et ils seraient alors isolés lors de la chromatographie sur colonne de silice.

3.3.4. Mécanisme de la réaction

3.3.4.1. Première hypothèse

La première étape de la réaction de transformation des produits de la famille I en famille II est une déshydratation. Dans le cas de la réaction menant à la famille III, cette déshydratation n'est pas observée. On peut supposer que cela est dû à une déprotonation d'une fonction hydroxyle.

Une première hypothèse de mécanisme est représentée sur le schéma 23.

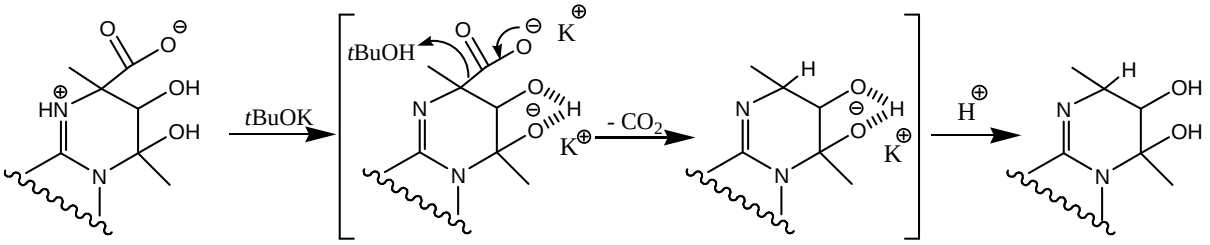


Schéma 23 : Première hypothèse de mécanisme de la réaction menant à la famille III

Le composé de la famille I mis en solution dans le THF en présence de *t*BuOK va donc être déprotoné sur la fonction imine intracyclique et sur une fonction hydroxyle. Puis le groupement carboxylate va être éliminé, entraînant la fixation d'un proton. Lors de la neutralisation de la solution, la fonction hydroxylate va se reprotoner aboutissant au composé de la famille III.

Cette hypothèse de mécanisme fait donc intervenir uniquement un centre réactif : l'atome de carbone portant la fonction carboxylate. Lors de l'élimination du groupement carboxylate, deux cas de figure sont envisageables :

Cas n°1 : la stéréochimie est conservée du fait d'un mécanisme concerté (la configuration absolue sera inchangée après le remplacement de CO_2 par H) (Schéma 24).

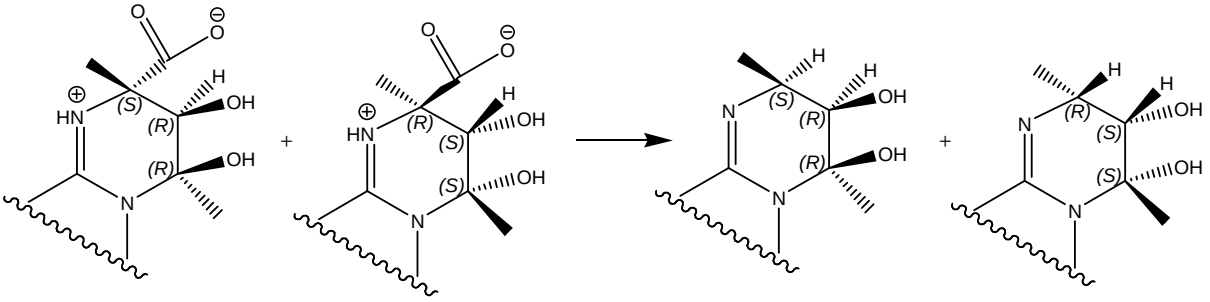


Schéma 24 : Cas n° 1, Stéréochimie conservée (réaction à partir du mélange majoritaire **a** de la famille I)

Pour une réaction à partir du mélange majoritaire **a** : dans le cas n°1, on obtiendrait donc un seul couple d'énantiomères. Les configurations SRR et RSS des composés de la famille I restant identiques pour les composés de la famille III (Schéma 24).

Or, on observe la présence de deux isomères dans les spectres de RMN. Ce mécanisme n'est donc pas compatible avec la stéréochimie des composés de la famille III. Il n'y a donc pas rétention de configuration selon cette hypothèse.

Cas n°2 : la stéréochimie de l'atome de carbone portant la fonction carboxylate n'est pas conservée, aboutissant à une configuration absolue R + S au niveau de cet atome (Schéma 25).

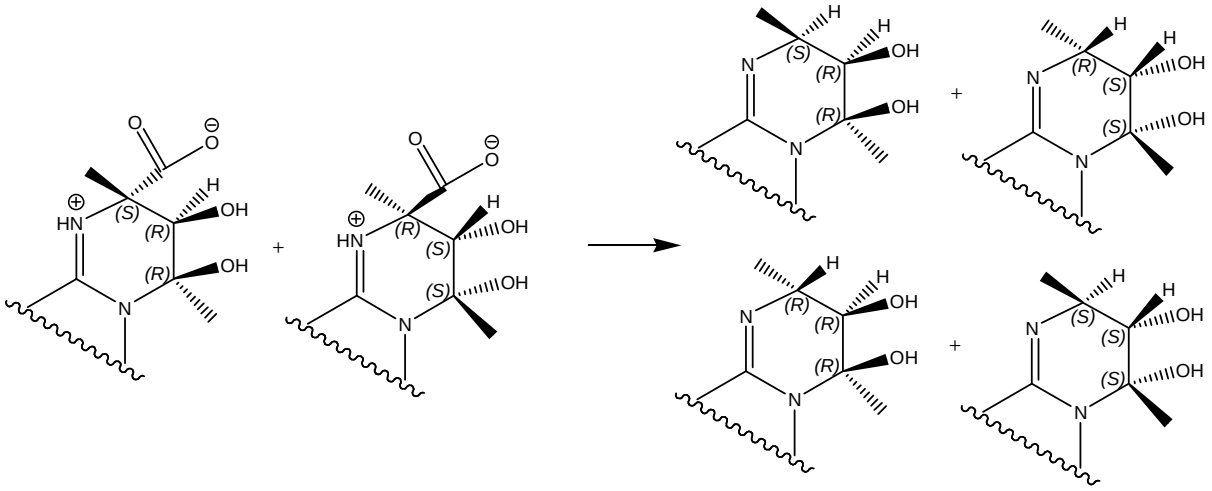


Schéma 25 : Cas n° 2, Stéréochimie non conservée (réaction à partir du mélange majoritaire **a** de la famille I)

Dans le cas n°2, pour une réaction à partir du mélange majoritaire **a** on obtiendrait donc quatre stéréoisomères, sous forme de deux couples d'énantiomères, de configurations absolues SRR, RSS, RRR et SSS (Schéma 25), ce qui est compatible avec les résultats observés.

Cependant, pour une réaction à partir des mélanges majoritaire **a** et minoritaire **b**, comprenant les isomères de configurations absolues SRR, RSS, SSR et RRS, les huit stéréoisomères possibles pour ce composé à trois atomes de carbone asymétriques seraient formés et observables par spectrométrie de RMN sous la forme de quatre couples d'énantiomères.

Cette hypothèse de mécanisme n'est donc probablement pas celle qui est impliquée dans la réaction de décarboxylation conduisant aux produits de la famille III. En effet, dans le cas n°1 comme dans le cas n°2, la stéréochimie des composés formés prévue par cette hypothèse n'est pas compatible avec les observations expérimentales.

3.3.4.2. Deuxième hypothèse

Un autre mécanisme proposé pour la réaction menant à la famille III est représenté sur le schéma 26.

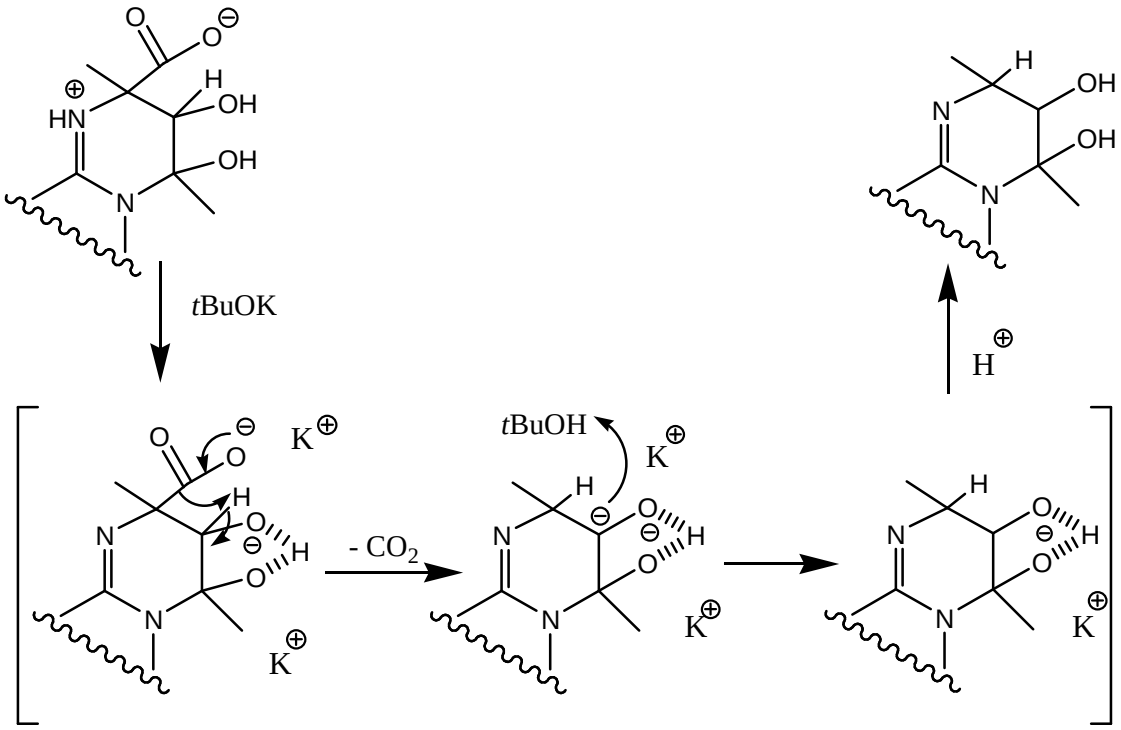


Schéma 26: Deuxième hypothèse de mécanisme de la réaction menant à la famille III

Après déprotonation de la fonction imine intracyclique et d'une fonction hydroxyle, le groupement carboxylate va être éliminé entraînant l'arrachement concerté du proton en α situé sur l'atome de carbone qui porte la fonction alcoolate secondaire. Le carbanion formé va ensuite capter un proton. Puis, lors de la neutralisation de la solution, la fonction alcoolate va se reprotoner aboutissant aux isomères de la famille III.

Les étapes de décarboxylation et d'arrachement du proton doivent être concomitantes et concertées de manière à conserver la stéréochimie de l'atome de carbone portant la fonction

carboxylate. Par contre, la formation d'un carbanion sur l'atome de carbone portant la fonction hydroxyle secondaire entraîne une perte de la stéréochimie sur cet atome.

Cette perte de stéréochimie sur cet atome aboutit à la formation de deux couples d'énantiomères, que la réaction ait lieu à partir du mélange majoritaire **a** ou des mélanges **a** et **b** des composés de la famille I (Tableau 9).

Mélange d'énantiomères	Majoritaire (**a**)		Minoritaire (**b**)	
Enantiomère	a1	a2	b1	b2
Configuration : famille I	SRR	RSS	SSR	RRS
Configuration des isomères de la famille III (perte de la stéréochimie de l'atome de carbone asymétrique central aboutissant au mélange R +S sur cet atome)	SRR	RSS	SSR	RRS
	SSR	RRS	SRR	RSS

Tableau 9 : Configurations absolues des trois atomes de carbone asymétriques des composés de la famille III obtenues selon la deuxième hypothèse de mécanisme

On obtiendrait donc bien des produits ayant quatre configurations absolues différentes (SRR, RSS, SSR et RRS) correspondant à deux couples d'énantiomères.

Cette hypothèse de mécanisme permet d'expliquer la nature et le nombre des composés isolés et caractérisés. Cependant, cette hypothèse n'est valable que si tous les isomères formés ont bien été isolés après les étapes de purification.

Une étude plus complète est donc nécessaire pour conclure sur le mécanisme de formation des composés de la famille III.

3.3.5. Conclusions sur la famille III

Une nouvelle réaction de décarboxylation des produits de la famille I a été mise en évidence conduisant à une nouvelle famille de molécules. Cette réaction est possible sur des composés pour lesquels la transformation en famille II n'a pas été possible. Les adduits MG-2-aminopyridine quant à eux, peuvent conduire soit à la famille II soit à la famille III suivant les conditions utilisées. La décarboxylation à l'origine des composés de la famille III produit

probablement quatre isomères, présents sous forme de deux couples d'énantiomères, qu'il n'a pas été possible de séparer et dont la stéréochimie n'a pas été déterminée.

Des essais de transformation des composés de la famille III doivent être poursuivis de manière à évaluer si, comme pour le composé en série 2-aminopyridine **54**, ces derniers peuvent être des intermédiaires entre les familles I et II.

Les composés de la famille III issus de produits de la famille I qui sont actifs sur la protéine CFTR présentent un intérêt biologique. En effet, leur évaluation en tant que modulateurs des canaux CFTR pourra apporter des informations sur la nature du pharmacophore supposé.

4. Conclusions du chapitre

Nous avons tout d'abord fait un choix de composés commerciaux contenant le pharmacophore proposé. Grâce à ces molécules, nous pouvons explorer des variations chimiques intéressantes en nombre et en nature. L'évaluation biologique de ces composés devrait permettre d'obtenir des informations pour préciser notre hypothèse de pharmacophore.

Dans le but d'obtenir d'autres informations sur la nature du pharmacophore, nous avons montré qu'il est possible de généraliser la réaction des α-aminoazahétérocycles à un autre α-oxoaldéhyde : l'éthylglyoxal. Toutefois, la difficulté de synthèse de l'EG nous a empêchés de généraliser cette réaction à de nombreux exemples.

La réaction avec les α-aminoazahétérocycles est probablement possible pour d'autres α-oxoaldéhydes différents du MG et de l'EG.

Nous avons aussi étendu la réaction menant à la famille II à d'autres composés en série MG mais également à un adduit de l'EG (Schéma 28).

Par ailleurs la transformation famille I - famille II a également permis de mettre en évidence une nouvelle voie d'accès à des pyrimidines substituées (Schéma 27). En effet, le composé de la famille II issu de la benzamidine comporte un cycle pyrimidine substitué.

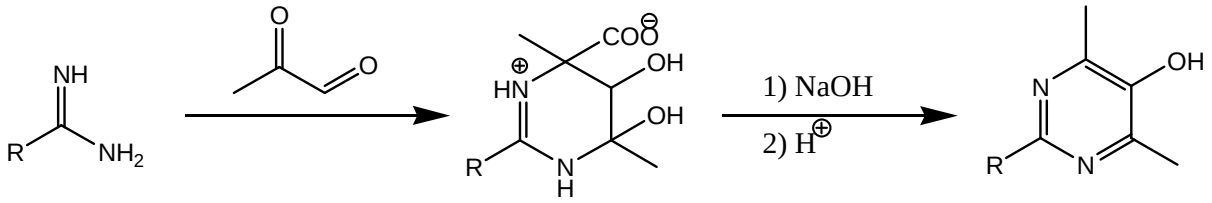
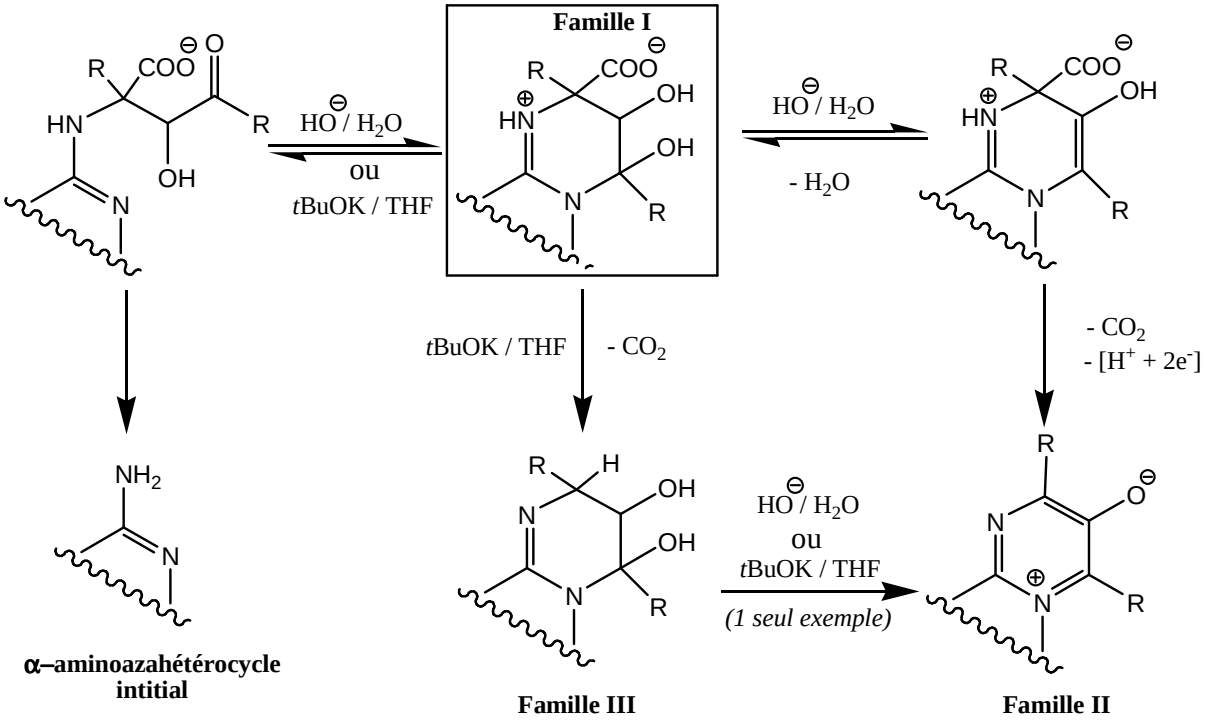


Schéma 27 : Voie d'accès à des pyrimidines substituées

Une nouvelle famille de composés, la famille III, a également été mise en évidence. Ces composés sont obtenus par décarboxylation des produits de la famille I (Schéma 28). De nombreuses études restent à effectuer sur ces composés. En effet, ces derniers s'avèrent particulièrement intéressants car ils sont susceptibles d'être des intermédiaires entre les familles I et II. De plus, leur évaluation biologique pourra permettre d'obtenir des informations sur la structure du pharmacophore.

Cependant, tous les composés de la famille I ne réagissent pas de la même manière dans les mêmes conditions et ne conduisent pas tous aux produits attendus. En milieu basique, les composés de la famille I réagissent de trois manières différentes (Schéma 28).

On peut supposer que la première étape de réaction conditionne les suivantes et donc le produit final. Ainsi, si le cycle formé par les deux molécules de MG est ouvert, la réaction conduira à l'α-aminoazahétérocycle initial, si la première étape est une déshydratation, on obtiendra les produits de la famille II et enfin si la réaction commence par une décarboxylation, on aboutira aux produits de la famille III.



R = CH_3 ou CH_2-CH_3

Schéma 28 : Réactivité en milieu basique des produits de la famille I

Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes qui régissent ces différentes réactions. De plus, dans la famille III dernièrement mise en évidence, d'autres investigations sont nécessaires pour déterminer la stéréochimie des isomères isolés et pour préciser la réactivité des produits qui la composent.

Chapitre 2 : Pharmacomodulations des potentiateurs et inhibiteurs mis en évidence

La réaction du MG sur des α-aminoazahétérocycles a permis la mise en évidence de deux modulateurs du fonctionnement des canaux CFTR.

Au cours de ce chapitre, nous présentons les problèmes rencontrés lors de la purification de ce type d'adduits.

Les différentes modifications proposées autour des structures de base du potentiateur **GPact-11a** et de l'inhibiteur le plus actif **GPinh-5a** sont ensuite décrites.

1. Problèmes de purification des adduits du MG

A la fin de la réaction entre le MG et les α-aminoazahétérocycles, le milieu réactionnel est constitué d'un mélange de différents composés. Ce mélange se trouve sous forme d'une solution visqueuse très peu miscible aux solvants apolaires.

En outre, la solution aqueuse commerciale de MG contient de nombreux contaminants, notamment du formaldéhyde et en quantité plus faible les acides pyruvique, lactique et formique (Kalapos, 1999). Ces composés peuvent réagir transitoirement avec les α-aminoazahétérocycles de départ perturbant la formation des produits attendus. De plus, le MG est utilisé en fort excès (8 équivalents). En fin de réaction, il en reste donc sous forme monomérique et/ou sous forme polymérique.

Les polymères provenant de l'excès de MG et les produits secondaires résultant de la présence d'impuretés dans la solution de MG sont très polaires, tout comme les adduits attendus. Tous ces composés ont donc tendance à être élués par des solvants (ou mélange de solvants) de polarités similaires.

Les trois paramètres, excès de MG, présence d'impuretés dans la solution de MG et polarité des composés, rendent la purification des adduits du MG difficile.

Après la réaction et l'évaporation sous pression réduite du milieu réactionnel, la séparation de ces produits se fait par chromatographie sur phase inverse. La phase inverse utilisée lors de la mise en évidence de la réaction entre le MG et les α-aminoazahétérocycles était une silice greffée en totalité par des chaînes à 18 atomes de carbone (C_{18} end-capped).

Les résultas obtenus avec ce type de phase stationnaire n'étaient pas complètement satisfaisants. En effet, les adduits du MG sont élués très rapidement et les fractions dans lesquelles ils sont présents contiennent aussi le MG et ses dérivés. L'augmentation de volume de la phase stationnaire de manière à éviter de saturer les sites d'interaction n'a pas entraîné d'amélioration de la purification.

Deux autres phases inverses ont donc été évaluées : une silice greffée non totalement par des chaînes à 18 atomes de carbone (C_{18} non end-capped) et une silice greffée en totalité

par des chaînes à 8 atomes de carbone (C_8 end-capped). L'utilisation de cette dernière a permis une amélioration de la purification. En effet, les adduits du MG sont toujours élués très vite et se trouvent parmi les fractions de tête, mais le MG et ses dérivés sont davantage retenus. Malgré cette amélioration, certains adduits ont nécessité plusieurs chromatographies sur phase inverse successives.

De manière à obtenir le mélange racémique majoritaire, les fractions de chromatographie sur phase inverse contenant les mélanges **a** et **b** sont ensuite soumises à une chromatographie sur silice et parfois à une cristallisation dans l'isopropanol. Le choix de purifier le mélange racémique majoritaire vient de notre volonté de tester les adduits sous forme racémique et non sous forme de mélange de quatre diastéréoisomères.

Lorsque l'α-aminoazahétérocycle de départ est très lipophile, on observe une précipitation des adduits attendus dans le milieu réactionnel, ce qui simplifie leur isolement.

Ces difficultés de purification ont une incidence sur le rendement des réactions. En effet, les nombreuses étapes de séparation conjuguées à la mauvaise qualité de la solution de MG entraînent une baisse du rendement.

Il est possible d'obtenir le MG avec une plus grande pureté en le synthétisant par hydrolyse acide de la 1,1-diméthoxypropanone suivie d'une distillation. Dans ce cas, la réaction avec la 2-aminopyridine aboutit aux adduits attendus avec un rendement de 84 %, plus élevé que lorsque la solution commerciale de MG est utilisée (rendement de 58 %) (Routaboul, 2003).

Toutefois cette technique est plus longue, plus coûteuse et entraîne une manipulation prolongée de MG qui est toxique. Au cours de ce travail, l'intérêt des composés résidant dans leurs éventuelles activités biologiques, les rendements de réaction et les purifications n'ont donc pas été optimisés et la solution commerciale de MG a été utilisée.

2. Modifications de l'adénine

Le meilleur inhibiteur, **GPinh-5a**, et le potentiateur, **GPact-11a**, étant issus de dérivés de l'adénine **55** (Figure 61), des modifications sur cet hétérocycle ont tout d'abord été réalisées.

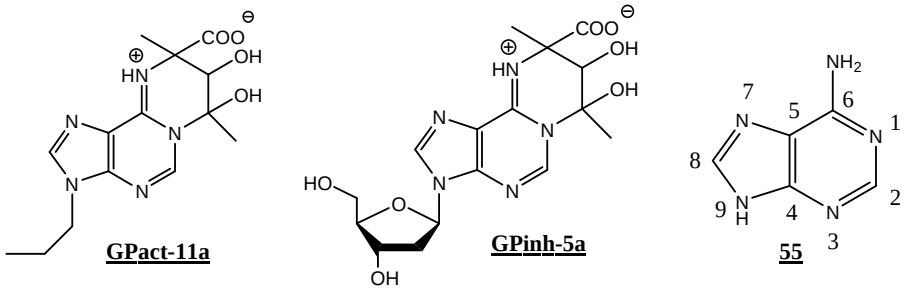


Figure 61 : Structures de **GPact-11a**, de **GPinh-5a** et de l'adénine **55**

GPinh-5a et **GPact-11a** ne diffèrent que par le groupement porté par la position 9 de la purine (Figure 61), les premières modifications réalisées ont donc consisté à introduire différents groupements sur l'atome d'azote 9.

D'autres dérivés de l'adénine modifiée en position 9 ou 7 et/ou 8 et/ou 2 ont également été synthétisés (Schéma 29).

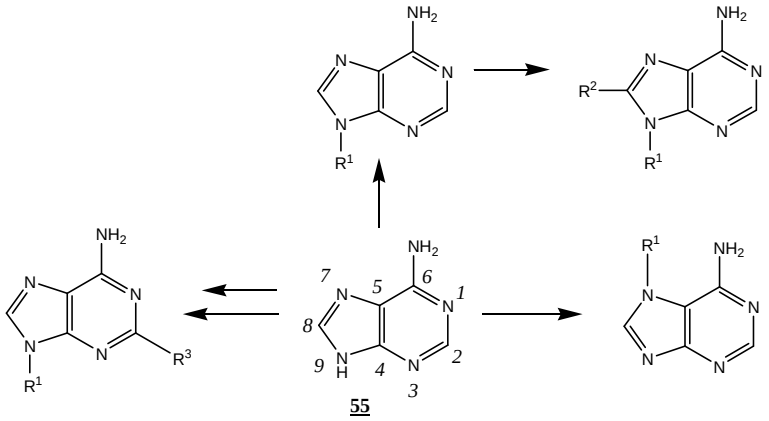


Schéma 29 : Modifications de l'adénine **55** en position 7 ou 9 et/ou 8 et/ou 2

On peut accéder aux dérivés de l'adénine modifiée en position 7 ou 9 en une seule étape à partir de l'adénine qui est commercialisée et peu coûteuse.

La fonction NH située en position 9 présente dans l'adénine un pK_a voisin de 10 (*N9*H/*N9*$^-$). Ce proton est donc facilement arraché en milieu basique fort. Dans ces conditions,

les agents alkylants réagissent préférentiellement sur l'atome d'azote en position 9 de l'adénine, de façon moindre sur l'atome d'azote en position 7 et encore plus faiblement sur les atomes d'azote en positions 3 et 1 (Kotian, 2006 ; Lambertucci, 2007).

L'introduction de substituants sur les positions 2 et 8 de l'adénine est plus longue car plusieurs étapes de synthèse sont nécessaires pour y parvenir.

Chacun des nouveaux hétérocycles formés a ensuite été mis à réagir avec le MG et le mélange racémique majoritaire d'adduits MG-α-aminoazahétérocycle **a** a été isolé.

2.1. Adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en position 9

2.1.1. Synthèses des dérivés de l'adénine modifiée en position 9

Un certain nombre de dérivés de l'adénine portant un substituant en position 9 sont disponibles commercialement. Lorsque les composés cibles ne sont pas commerciaux, ou trop coûteux, leur synthèse a été réalisée en déprotonant l'adénine **55** par une base forte. La base employée au cours de ce travail est NaH dans le DMF mais d'autres bases comme K_2CO_3 sont aussi utilisables. A la solution ainsi formée d'adénylate de sodium dans le DMF est ajouté un halogénure d'alkyle. On obtient ainsi les dérivés de l'adénine alkylée en position 9 (Schéma 30).

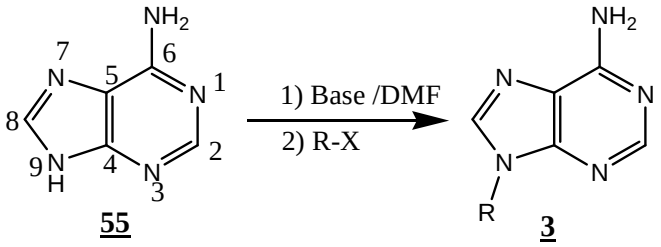


Schéma 30 : Voie de synthèse de dérivés de l'adénine modifiée en position 9 **3**

Cette réaction n'est pas totale et il reste toujours de l'adénine en fin de réaction. En effet pour maintenir une bonne régiosélectivité d'alkylation et éviter une bis-alkylation, il n'est pas possible d'utiliser un fort excès d'agent alkylant.

Au cours de cette étape, il se forme en majorité l'isomère alkylé sur la position 9 mais également l'isomère alkylé sur la position 7. Ce mélange est relativement complexe à purifier car l'adénine est très peu soluble dans les solvants organiques et les composés alkylés y sont généralement moyennement solubles. Il est donc difficile de réaliser une chromatographie sur le résidu obtenu après neutralisation du milieu réactionnel et évaporation du DMF.

Ce résidu a donc été dissout dans le minimum de NaOH en solution aqueuse 1 M, de manière à séparer l'adénine de ses dérivés alkylés. En effet l'adénine va être déprotonée, ce qui va augmenter sa solubilité en phase aqueuse alors que ses dérivés alkylés y sont faiblement solubles. Ces derniers sont ensuite extraits de cette solution par lavage de celle-ci avec du dichlorométhane (DCM). Puis la phase organique est évaporée et le résidu d'évaporation est soumis à une chromatographie sur colonne de silice.

Le potentiateur précédemment mis en évidence, **GPact-11a**, porte une chaîne propyle en position 9. Les différentes modifications effectuées ont donc concerné cette chaîne. Tout d'abord la longueur du substituant a été modifiée, depuis H (adduits du MG sur l'adénine synthétisés précédemment (Routaboul, 2003)) jusqu'à des chaînes aliphatiques à quatre atomes de carbone ou constituant un groupement 3-phénylpropyle. Ces substitutions permettent d'étudier l'influence de l'encombrement stérique et de la lipophilie sur cette position.

Des variations autour du groupement propyle, en conservant trois atomes de carbones comme le composé parent, ont également été réalisées avec l'introduction d'une ramification (isopropyle), d'insaturations (double ou triple liaison) ou d'un hétéroatome en bout de chaîne (3-hydroxypropyle).

Deux composés parmi l'ensemble des dérivés de l'adénine modifiée en position 9 ont été obtenus après une première alkylation de l'adénine.

Le composé **57** est obtenu par isomérisation de la double liaison de la 9-allyladénine **56** (obtenue par la méthode décrite précédemment) en présence de *t*BuOK dans le DMSO (Schéma 31) (Price, 1962).

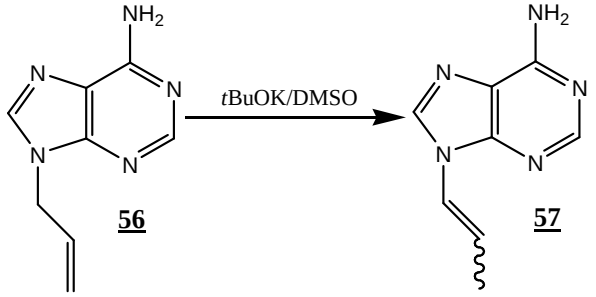
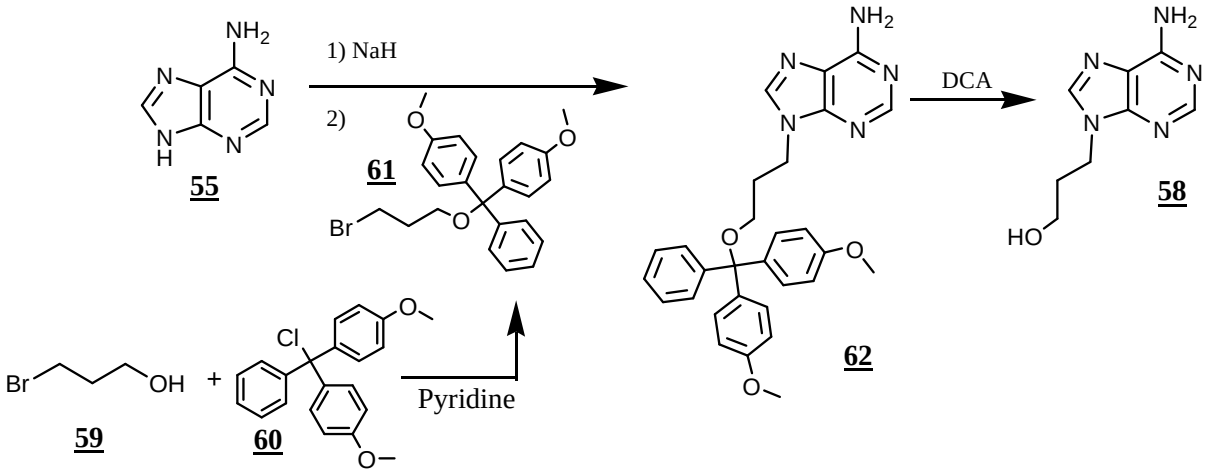


Schéma 31 : Synthèse de la Z+E 9-(prop-1-enyl)adénine **57**

Les isomères E et Z sont formés de façon concomitante dans une proportion E/Z de 75/25. Il n'a pas été possible de séparer ces deux isomères au cours de la purification.

La molécule **58** est quant à elle obtenue par alkylation de l'adénine **55** avec du 3-bromopropanol **59** préalablement protégé sur la fonction hydroxyle par un groupement diméthoxytrityle **60** suivie d'une déprotection de cette fonction (Schéma 32). Le rendement pour les trois étapes est de 35 %.



DCA : Acide 2,2-dichloroéthanoïque

Schéma 32 : Synthèse de la 9-(3-hydroxypropyl)adénine **58**

Des essais d'alkylation directe de l'adénine **55** avec le 3-bromopropanol **59** ont aussi été menés. Ces réactions conduisent à un mélange de produits. En effet, en milieu basique fort la fonction hydroxyle du 3-bromopropanol est déprotonée et peut ainsi conduire à des polycondensations du réactif et du produit attendu.

Nous avons donc décidé de protéger la fonction hydroxyle du 3-bromopropanol. Le groupement protecteur devait être capable de résister aux conditions basiques utilisées pour l'alkylation. Nous avons choisi le groupement diméthoxytrityle qui est acido-labile et qui présente deux autres intérêts pour cette réaction. En effet, il comporte des groupements qui absorbent dans l'UV permettant une révélation aisée des CCM de suivi de la réaction. De plus, sa taille importante permet d'obtenir le 3-bromopropanol protégé sous forme solide à pression et température ambiante ce qui facilite sa préparation.

Ce composé **58** a été préparé car les adduits du MG correspondants **63** présentent un intérêt particulier. En effet, le groupement 3-hydroxypropyle peut être considéré comme un mime structural partiel du 2'-désoxyribose. Or **GPinh-5a** et **GPact-11a** présentent respectivement un groupe 2'-désoxyribose et un groupe propyle sur la même position. **63** possède donc une structure à la fois proche du potentiateur et de l'inhibiteur (Figure 62).

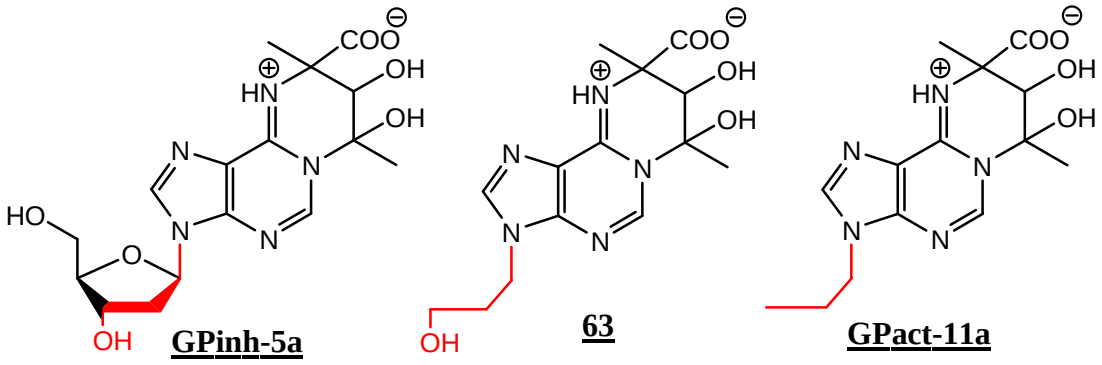
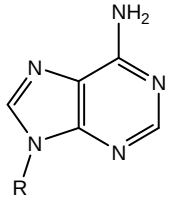


Figure 62 : Structures comparées de **GPinh-5a**, de **63** et de **GPact-11a**

Les dérivés de l'adénine modifiée en position 9 qui ont par la suite été mis à régir avec le MG sont présentés dans le tableau 10.

R =			Déplacements chimiques en ppm : RMN ^{1}H à 400 MHz dans $CDCl_3$ à 21 °C (sauf **57** dans CD_3OD)		
	Composé	Rdt (%)	*N9*-CH_x	CH_{Ar}	
CH_3	**64**	Commercialisé	3,86	8,40	7,79
CH_2-CH_3	**65**	Commercialisé	4,26	8,37	7,83
CH-$(CH_3)_2$	**66**	26	4,90-4,80	8,37	7,88
CH_2-CH=CH_2	**56**	63	4,81	8,36	7,80
CH=CH_2-CH_3	**57**	21 *	7,06/6,83 (Z/E)	8,31	8,23
CH_2-C≡CH	**67**	67	4,99	8,40	8,03
CH_2-CH_2-CH_2-OH	**58**	35 **	4,39	8,36	7,81
CH_2-CH_2-CH_2-CH_3	**68**	64	4,20	8,37	7,80
CH_2-Ph	**69**	Commercialisé	5,39	8,42	7,78
CH_2-CH_2-CH_2-Ph	**70**	57	4,23	8,39	7,76

*2 étapes, **3 étapes

Tableau 10 : Déplacements chimiques des protons des dérivés de l'adénine modifiée en position 9 et rendements de la réaction d'alkylation correspondante

Les spectres de RMN de ces composés présentent deux signaux correspondant aux protons aromatiques H*2* et H*8* de l'adénine. Les déplacements chimiques de ces signaux sont situés dans la même zone, quelle que soit la nature du groupement alkylé présent sur la position 9. Ils varient, dans $CDCl_3$, de 8,36 à 8,42 ppm et de 7,76 à 8,03 ppm. Le déplacement chimique du signal correspondant au(x) proton(s) porté(s) par l'atome de carbone du substituant lié à l'atome d'azote 9, est quant à lui variable en fonction du type de groupement. Les groupements dont la structure est proche présentent un signal situé dans la même zone de déplacements chimiques.

Les rendements en composés alkylés en position 9 sont moyens (entre 26 et 67 %). Cela reflètent notamment le caractère partiel de la réaction. En effet, dans les conditions réactionnelles utilisées, il reste de l'adénine non alkylée en fin de réaction. Si l'agent alkylant

est utilisé en fort excès, on obtient des plus grandes proportions d'isomères minoritaires et également des composés alkylés sur plusieurs positions de l'adénine (polyalkylation).

2.1.2. Synthèses des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en position 9

Les dérivés de l'adénine alkylée en position 9 ont ensuite été mis à réagir avec le MG, conduisant aux adduits attendus dont le mélange majoritaire qui a été isolé (Schéma 33 et Tableau 11).

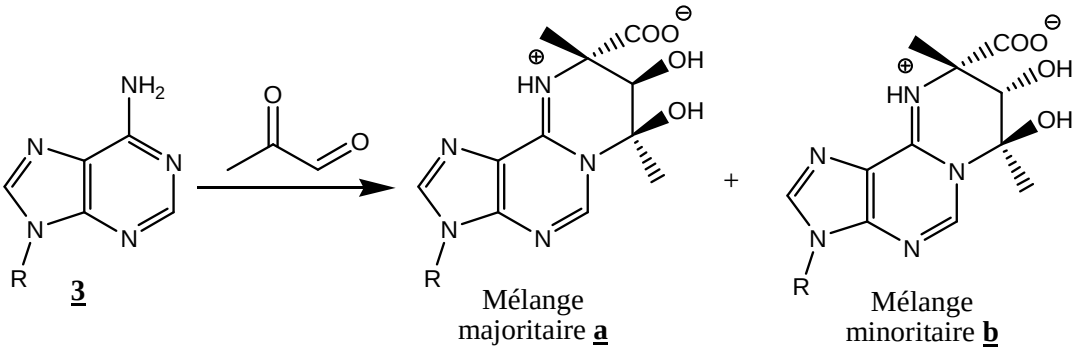
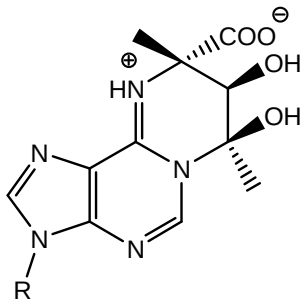


Schéma 33 : Réaction du MG sur les dérivés de l'adénine modifiée en position 9 **3**

R =	 Mélange majoritaire **a**		Déplacements chimiques en ppm (RMN ^{1}H à 400 MHz dans D_2O à 21 °C)					
	Composé	Rdt (%)	CH_{Ar}		C<u>H</u>OH	*N9*-CH_x	CH_3	
CH_3	**71a**	28	8,31	8,00	*	3,73	1,99	1,52
CH_2-CH_3	**72a**	33	8,75	8,11	4,42	4,14	1,63	1,56
CH-$(CH_3)_2$	**73a**	25	8,77	8,28	4,44	4,78	1,61	1,58
CH_2-CH=CH_2	**74a**	43	8,76	8,17	4,42	4,81	1,59	1,57
CH=CH_2-CH_3 (Z + E)	**75a**	15	8,26	8,12	4,88	6,75/ 6,62	2,02	1,54
CH_2-C≡CH	**76a**	27	8,76	8,23	4,40	4,98	1,60	1,55
CH_2-CH_2-CH_2-OH	**63a**	65	8,58	8,14	4,72	4,34	2,05	1,72
CH_2-CH_2-CH_2-CH_3	**77a**	10	8,84	8,21	4,53	4,25	1,74	1,67
CH_2-Ph	**78a**	14	8,24	8,10	4,89	5,36	2,03	1,53
CH_2-CH_2-CH_2-Ph	**79a**	25	8,11	7,76	*	4,62	2,00	1,46

*Signal masqué par le pic du solvant

Tableau 11 : Déplacements chimiques des protons des adduits du MG sur des dérivés de l'adénine modifiée en position 9 et rendements de la réaction d'obtention correspondante

Les spectres de RMN de ces composés comportent toujours les signaux correspondant aux protons aromatiques. Le signal du proton lié au carbone qui porte la fonction hydroxyle secondaire est caractéristique de ces composés par rapport aux molécules de départ. Les déplacements chimiques de ces protons se situent entre 4,42 et 4,89 ppm. Ces signaux sont parfois masqués par le pic du solvant, nécessitant une analyse par spectrométrie de RMN à une température plus élevée pour vérifier leur présence. On observe également l'apparition des signaux correspondant aux groupes méthyles (de 1,59 à 2,05 ppm et de 1,52 à 1,72 ppm).

Les analyses élémentaires de ces adduits font apparaître, pour certains d'entre eux, une obtention à l'état solide sous la forme de sel de sodium. Ceci est probablement dû à la qualité de l'eau utilisée lors de la préparation des échantillons.

Les rendements en mélange majoritaire sont généralement de 20 à 30 %. La faible valeur obtenue pour **77a** est liée à la mauvaise qualité du MG utilisé pour cette réaction. Quant à celle de **75a**, elle est due à la difficulté de purification du fait de la présence des isomères Z et E. Le rendement élevé obtenu pour **63a** est probablement lié à la modification de la méthode de purification en passant d'une chromatographie sur cartouche de phase inverse C_{18} à une phase inverse C_8.

Cet ensemble de composés permettra, après évaluation biologique, d'établir des relations structure-activité concernant l'influence de la nature du groupement introduit en position 9 de l'adénine.

2.2. Adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en position 7

2.2.1. Synthèses des dérivés de l'adénine modifiée en position 7

Au cours des réactions d'alkylation de l'adénine en position 9, un produit secondaire est formé. Il s'agit d'un isomère de position du précédent, portant le groupement alkyle en position 7 (Schéma 34).

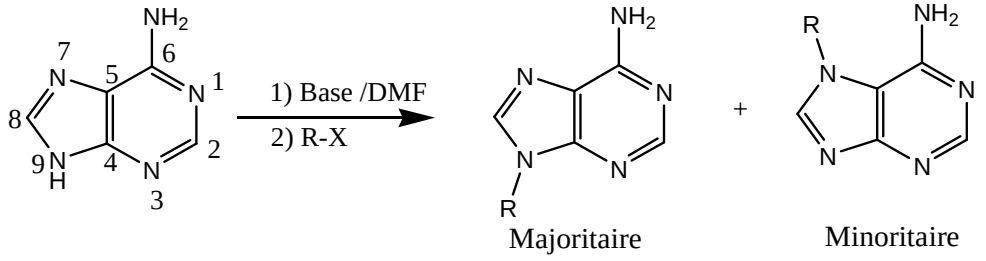


Schéma 34 : Voie d'accès aux dérivés de l'adénine modifiée en position 7

Ces composés sont isolés de la même manière que leurs isomères en position 9, desquels ils sont séparés au cours d'une chromatographie sur colonne de silice. Ils présentent

une polarité et des déplacements chimiques différents de leurs isomères alkylés en position 9 (Tableau 12).

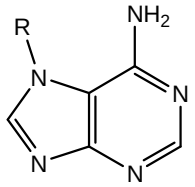
R =			Déplacements chimiques en ppm (RMN ^{1}H à 400 MHz dans $CDCl_3$ à 21 °C)		
	Composé	Rdt (%)	CH_{Ar}		*N*9-CH_x
CH_3	**80**	Commercialisé	8,24	7,98	4,04
CH_2-CH_2-CH_3	**81**	11	8,03	8,00	4,35
CH_2-CH=CH_2	**82**	10	8,07	8,03	5,04

Tableau 12 : Déplacements chimiques des dérivés de l'adénine modifiée en position 7 et rendements de la réaction d'alkylation correspondante

Les spectres de RMN de ces composés présentent les deux signaux correspondant aux protons aromatiques de l'adénine. Ces deux signaux sont beaucoup plus proches l'un de l'autre que ceux des isomères en position 9. Le signal correspondant aux protons portés par l'atome de carbone du groupe alkyle lié à l'atome d'azote 7 est quant à lui plus déblindé que celui des isomères en postion 9. La spectrométrie de masse de ces composés montre une masse identique à celle du composé alkylé en position 9. Le maximum d'absorption relevé dans le spectre UV est différent : λ_{max} = 249 nm pour la 9-propyladénine alors que λ_{max} =273 nm pour la 7-propyladénine.

Ces composés étant des produits secondaires de la réaction d'alkylation, ils ont été obtenus avec des rendements faibles.

2.2.2. Synthèses des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en position 7

Les dérivés de l'adénine alkylée en position 7 présentent un intérêt pour l'étude des relations structure-activité concernant l'introduction de groupements en diverses positions de l'adénine. La 7-propyladénine **81** et la 7-allyladénine **82** ont donc été mises à réagir avec le MG (Schéma 35).

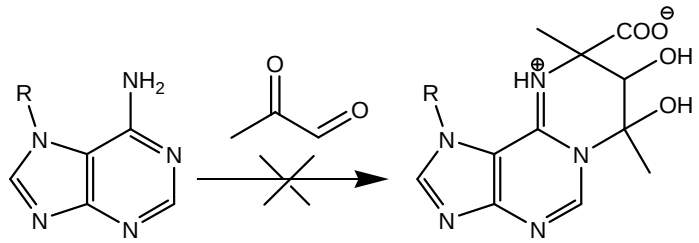


Schéma 35 : Réaction du MG avec les dérivés de l'adénine modifiée en position 7

Malheureusement, lors de la réaction avec le MG nous n'observons pas la formation des adduits attendus et pas de réaction. De manière à évaluer l'influence de l'encombrement stérique sur la position 7, la 7-méthyladénine **80** (composé commercialisé) a également été mise à réagir avec le MG. Dans ce cas là non plus, les adduits attendus n'ont pas été observés. Malgré une température plus élevée et des temps de réaction beaucoup plus longs, la réaction ne se produit pas.

Dans ces conditions de réaction, il n'est donc pas possible de former les adduits attendus à partir de dérivés de l'adénine alkylée en position 7.

2.3. Adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en positions 8 et/ou 9

2.3.1. Synthèses des dérivés de l'adénine modifiée en positions 8 et 9

Des modifications ont ensuite été entreprises sur la position 8 de l'adénine. A partir de dérivés de l'adénine alkylée en position 9, un atome de brome, qui pourra facilement être substitué par la suite, a été introduit en position 8.

Ces modifications ont concerné deux dérivés de l'adénine substituée en position 9 : la 9-propyladénine et la 2'-désoxyadénosine correspondant à la structure hétérocyclique de base du potentiateur **GPact-11a** et de l'inhibiteur **GPinh-5a**.

La 8-bromo-2'-désoxyadénosine **84** a été obtenue avec un bon rendement (75 %) par bromation de la 2'-désoxyadénosine **83** dans une solution aqueuse de dibrome (Laayoun, 1992) (Schéma 36).

A la fin de la réaction, l'excès de dibrome est éliminé par ajout d'une solution aqueuse saturée de thiosulfate de sodium. Le dérivé bromé précipite lors de la neutralisation par ajout de soude.

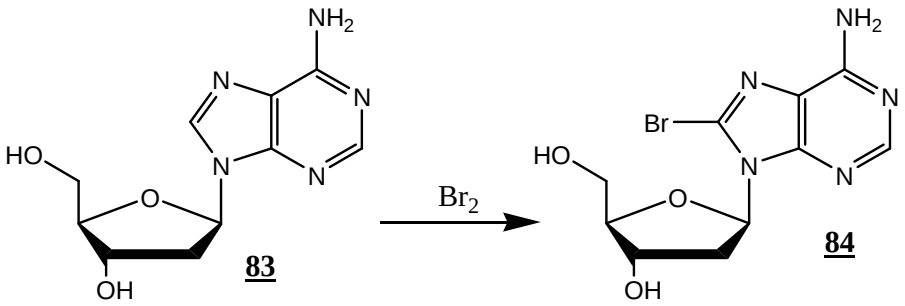


Schéma 36 : Synthèse de la 8-bromo-2'-désoxyadénosine **84**

La 8-bromo-9-propyladénine **86** a quant à elle été obtenue par bromation de la 9-propyladénine **38** dans le méthanol, en utilisant un excès de dibrome en présence de 2,6-lutidine **85** (Schéma 37).

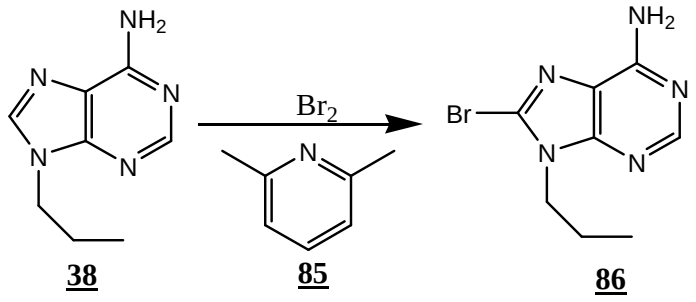


Schéma 37 : Synthèse de la 8-bromo-9-propyladénine **86**

La 2,6-lutidine **85** est une base utilisée pour éviter la diminution de pH qui se produit au cours de la réaction. En effet, la 8-bromo-9-propyladénine **86** est instable en milieu acide, il est donc nécessaire de garder des conditions neutres ou basiques tout au long de la réaction. De plus, la 2,6-lutidine **85** est faiblement nucléophile, il y a donc peu de risque qu'elle réagisse au cours de la réaction en substitution nucléophile de l'atome de brome du composé **87** formé.

Le produit attendu **86** est obtenu avec un rendement de 66 % après une purification par précipitation dans l'eau. Cette méthode de purification permet d'éviter de recourir à une chromatographie sur colonne de silice au cours de laquelle la séparation entre la 9-propyladénine **38** et la 8-bromo-9-propyladénine **86** est délicate.

L'atome de brome présent en position 8 dans les deux composés obtenus (la 8-bromo-9-propyladénine **86** et la 8-bromo-2'-désoxyadénosine **84**) a ensuite été substitué par différents groupements (Schéma 38).

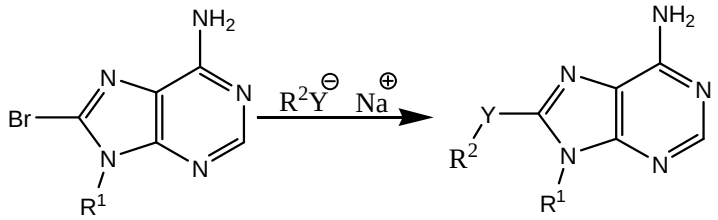


Schéma 38 : Voie de préparation de dérivés de l'adénine modifiée en position 8 et 9

Pour réaliser la substitution en position 8, nous avons sélectionné un ensemble de groupements qui présente une certaine variété chimique tout en étant de petites tailles et possédant une liphophilie faible de manière à ne pas trop perturber la biodisponibilité et les interactions au niveau du site de reconnaissance de CFTR. Les substituants choisis comportent un hétéroatome pouvant réaliser une attaque nucléophile sur l'atome de carbone portant l'atome de brome.

Une série de dérivés de l'adénine modifiée en positions 8 et 9 a ainsi été préparée. Deux composés de cette série ont été obtenus par une voie de synthèse différente.

Le composé **88** est obtenu à partir de **87** après déprotonation de la fonction thiol puis alkylation du thiolate formé avec l'iodure d'éthyle (Schéma 39).

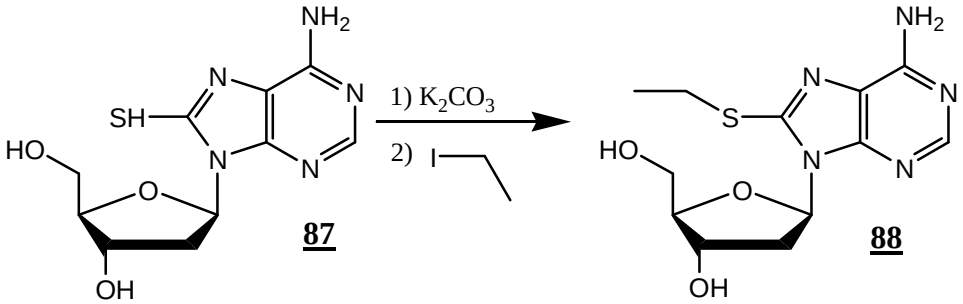


Schéma 39 : Synthèse de la 8-éthylthio-2'-désoxyadénosine **88** par alkylation de la 8-mercapto-2'-désoxyadénosine **87** avec l'iodure d'éthyle

Le composé **89** a, quant à lui, été synthétisé par hydrolyse acide (HCl aqueux) de la 8-bromo-9-propyladénine **86** (Schéma 40).

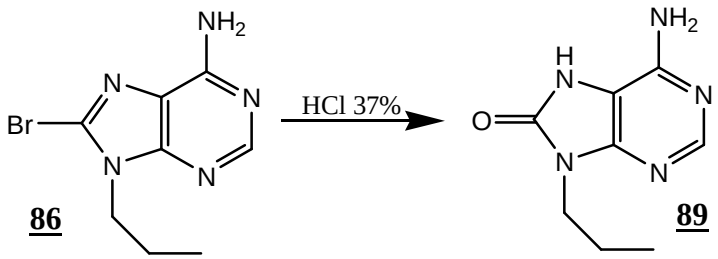
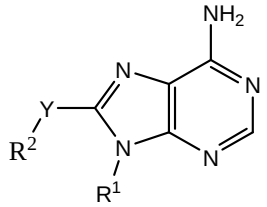


Schéma 40 : Synthèse de la 8-hydroxy-9-propyladénine **89** par hydrolyse acide de la 8-bromo-9-propyladénine **86**

Les déplacements chimiques des protons des dérivés de l'adénine modifiée en positions 8 et 9 sont représentés dans le tableau 13.

R^1 =	R^2-Y =			Déplacements chimiques en ppm (RMN ^{1}H à 400 MHz dans CD_3OD à 21 °C)		
		Composé	Rdt (%)	H*2*	*N9*-C<u>H</u>$_x$	*C8*-Y-C<u>H</u>$_x$
2'-désoxy ribose	Br	**84**	75	8,13	6,49	--
	SH	**87**	84	8,10	6,99	--
	CH_3-CH_2-S	**88**	96 *	8,08	6,37	3,29
	CH_3-CH_2-O	**90**	40	8,07	6,37	4,60
CH_2-CH_2-CH_3	Br	**86**	66	8,19	4,22	--
	OH	**89**	qtf**	7,96	3,83	--
	CH_3-S	**91**	54	8,11	4,09	2,77
	CH_3-O	**92**	50	8,08	3,98	4,18

* obtenu à partir de **87** par alkylation avec l'iodure d'éthyle

** obtenu à partir de **86** par hydrolyse en milieu acide ; rendement quantitatif

Tableau 13 : Déplacements chimiques des protons des dérivés de l'adénine modifiée en positions 8 et 9 et rendements de la réaction d'obtention correspondante

Par rapport aux composés alkylés en position 9 uniquement, on note la disparition d'un des deux signaux correspondant aux protons aromatiques. Les déplacements chimiques correspondant au(x) proton(s) porté(s) par l'atome de carbone de la fonction liée à l'atome d'azote 9 varient en fonction du type de groupement fixé sur la position 8.

Les rendements des réactions de substitution de l'atome de brome en position 8 sont moyens malgré l'utilisation d'excès de réactifs. D'autre part, les produits obtenus ont souvent une polarité voisine de celle du composé de départ, ce qui rend leur purification délicate. De plus, certains d'entre eux (notamment les dérivés de la 2'-désoxyadénosine) sont peu solubles dans les solvants organiques.

2.3.2. Synthèses des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en positions 8 et/ou 9

Les dérivés de l'adénine modifiée en positions 8 et 9 ont ensuite été mis à réagir avec le MG.

Les dérivés de la 2'-désoxyadénosine portant un substituant en position 8 se sont avérés instables dans les conditions de la réaction. Pour ces dérivés, on observe la formation d'autres adduits, en plus des adduits attendus **a** et **b**. L'un des mélanges isolés correspond aux adduits attendus, alors que l'autre contient des adduits ne présentant plus le 2'-désoxyribose en position 9 (Schéma 41).

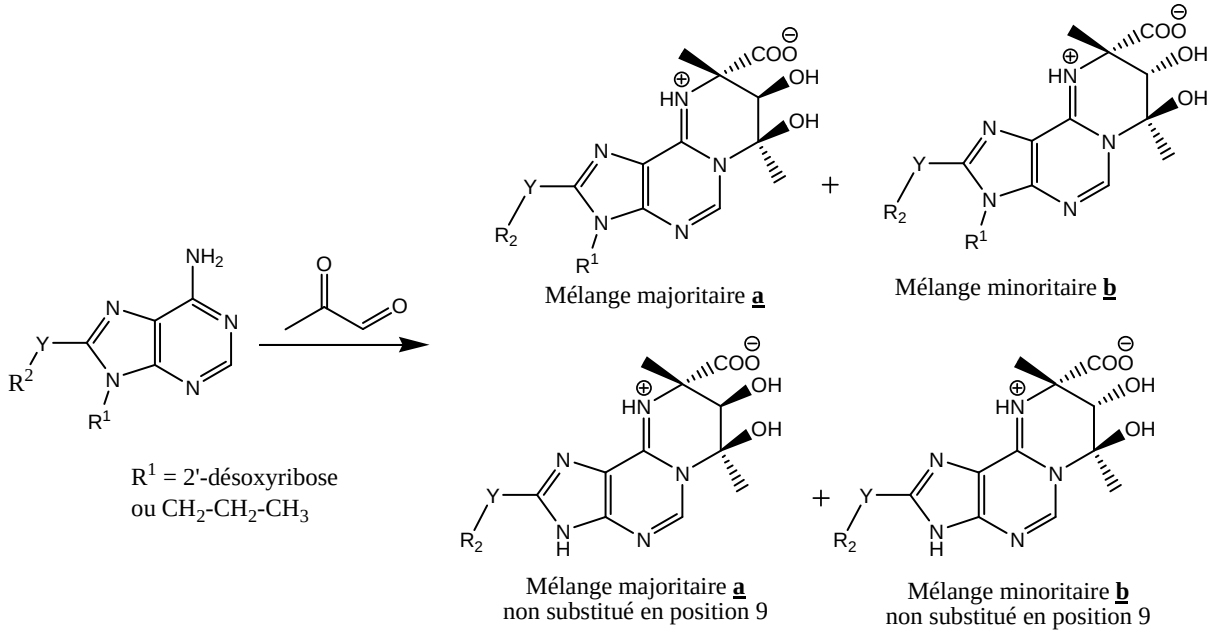


Schéma 41 : Préparation des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en positions 8 et/ou 9

La solution de MG est acide (pH aux alentours de 3) or, la liaison entre l'adénine et le 2'-désoxyribose est hydrolysable en milieu acide. De plus, la substitution sur la position 8 par un hétéroatome possédant un doublet libre favorise la coupure de cette liaison observée dans le milieu réactionnel ou même en condition neutre par simple chauffage (Laayoun, 1994).

Cette réaction secondaire est intéressante puisqu'elle permet d'accéder à des dérivés de l'adénine modifiée uniquement sur la position 8. Cependant, la présence simultanée de

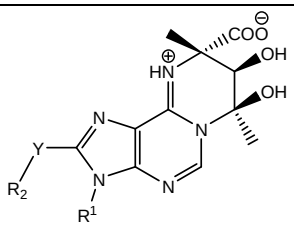
quatre mélanges racémiques de polarités voisines complique énormément la purification de ces produits si l'on cherche à obtenir les adduits en série 2'-désoxyribose.

Nous avons donc essayé de nouvelles conditions de réactions de manière à éviter cette réaction de coupure du 2'-désoxyribose. En augmentant le pH de la solution aqueuse de MG par ajout d'acétate de sodium (pH aux environs de 6), les adduits ne portant pas le 2'-désoxyribose sont formés en quantité plus faible. Toutefois, cette hausse du pH ralentit la réaction entraînant une plus forte dégradation de l'excès de MG ce qui perturbe la purification.

La 8-bromo-9-propyladénine **86** est, elle aussi, instable dans les conditions de la réaction. En effet, il se produit probablement des réactions secondaires résultant de la substitution facile de l'atome de brome. La réaction avec le MG aboutissant à un mélange complexe de produits, dont il n'a pas été possible de réaliser l'isolement des adduits attendus.

Ce comportement n'a pas été retrouvé pour la 8-bromo-2'-désoxyadénosine **84**, pour laquelle des adduits du MG ont été isolés.

Les déplacements chimiques des protons des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée positions 8 et/ou 9 sont récapitulés dans le tableau 14.

R^1 =	R^2-Y =	 Mélange majoritaire **a**		Déplacements chimiques en ppm (RMN ^{1}H à 400 MHz dans D_2O à 21 °C)					
		Composé	Rdt (%)	H*2*	C<u>H</u>OH	*N9*-CH_x	*C8*-Y-C<u>H</u>$_x$	CH_3	
dRib	Br	**93**	Non isolé	--	--	--	--	--	--
	SH	**94ab****	6	8,08/ 8,06	4,97/*	6,84	--	2,06	1,61/ 1,57
	CH_3-CH_2-S	**95**	15	8,34	4,91	6,45	3,24	1,98	1,60
	CH_3-CH_2-O	**96**	12	8,18	4,85	6,32	4,53	2,04	1,55
H	Br	**97**	19	8,54	4,50	--	--	1,86	1,63
	SH	**98**	5	8,16	5,13	--	--	2,31	1,86
	CH_3-CH_2-S	**99**	13	8,40	*	--	3,17	1,95	1,62
	CH_3-CH_2-O	**100**	Non isolé	--	--	--	--	--	--
CH_2-CH_2-CH_3	OH	**101**	16	8,23	4,94	3,41	--	1,63	1,56
	CH_3-S	**102**	12	8,68	4,06	3,94	2,73	1,94-1,50	
	CH_3-O	**103**	36	8,59	4,70	3,96	4,19	1,89	1,66

* Signal masqué par le pic du solvant, ** le mélange majoritaire **a** n'a pas pu être obtenu seul sans le mélange minoritaire **b**, dRib : 2'-désoxyribose

Tableau 14 : Déplacements chimiques du proton des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en positions 8 et/ou 9 et rendements de la réaction d'obtention correspondante

Les spectres de RMN présentent les signaux caractéristiques des composés de la famille I. On note en effet la présence du signal correspondant au C<u>H</u>OH pour des déplacements chimiques de 4,06 à 5,13 ppm et les signaux des deux groupements méthyles de 1,63 à 2,13 ppm et de 1,50 à 1,86 ppm.

Les rendements en adduits du MG-dérivé de l'adénine modifiée en positions 8 et 9 sont généralement assez faibles. Cela est surtout le cas pour les adduits issus de la 2'-désoxyadénosine modifiée en position 8. En effet, malgré l'augmentation de pH du milieu

réactionnel, on observe toujours la formation des adduits de l'adénine issus de la coupure du 2'-désoxyribose.

La synthèse d'adduits du MG portant une chaîne propyle en 9 et un autre substituant en 8 permet de disposer d'analogues du potentiateur **GPact-11a**. Les adduits du MG sur la 2'-désoxyadénosine modifiée en 8 correspondent quant à eux à des analogues de l'inhibiteur **GPinh-5a**. Les adduits **99** et **100** du MG sur l'adénine modifiée uniquement en position 8 sont voisins de **GPact-11a** puisqu'ils possèdent une chaîne à trois atomes fixée sur une position voisine.

Grâce à ces modifications, nous allons pouvoir établir de nouvelles relations structure-activité des adduits MG-dérivé de l'adénine sur la protéine CFTR.

2.4. Adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en positions 2 et 9

2.4.1. Synthèses des dérivés de l'adénine modifiée en positions 2 et 9

La position 2 de l'adénine a également été modifiée pour obtenir une nouvelle série de composés de la famille I portant une chaîne propyle en 9, comme **GPact-11a**, et un substituant en position 2.

Ces composés ont été préparés à partir de la 2,6-dichloropurine **104** comme composé commercialisé de départ. Les deux atomes de chlore situés sur cette molécule ont une réactivité différente. En effet, il est possible de substituer la position 6 de manière sélective. Pour aboutir à la 2-chloroadénine, dont l'atome de chlore pourra être substitué par la suite, il est donc nécessaire d'introduire une fonction amine sur la position 6. Ce composé pourra ensuite être substitué en position 9 par un groupement propyle grâce à une alkylation similaire à celle permettant l'obtention de la 9-propyladénine.

Une méthode de synthèse permettant d'introduire directement un groupement NH_2 à la place de l'atome de chlore situé sur la position 6 de la 2,6-dichloropurine est décrite. Mais, cette synthèse se fait à haute température en phase gazeuse et est donc difficile à réaliser au laboratoire (Maruyama, 2000).

Nous avons donc choisi d'utiliser une autre méthode basée sur une substitution de l'atome de chlore en position 6 de la 2,6-dichloropurine **104** par l'amine de la 4-méthoxybenzylamine **105** (Schéma 42) (Alarcon, 2001). On obtient ainsi le composé **106** qui peut conduire au composé recherché par deux voies de synthèse différentes.

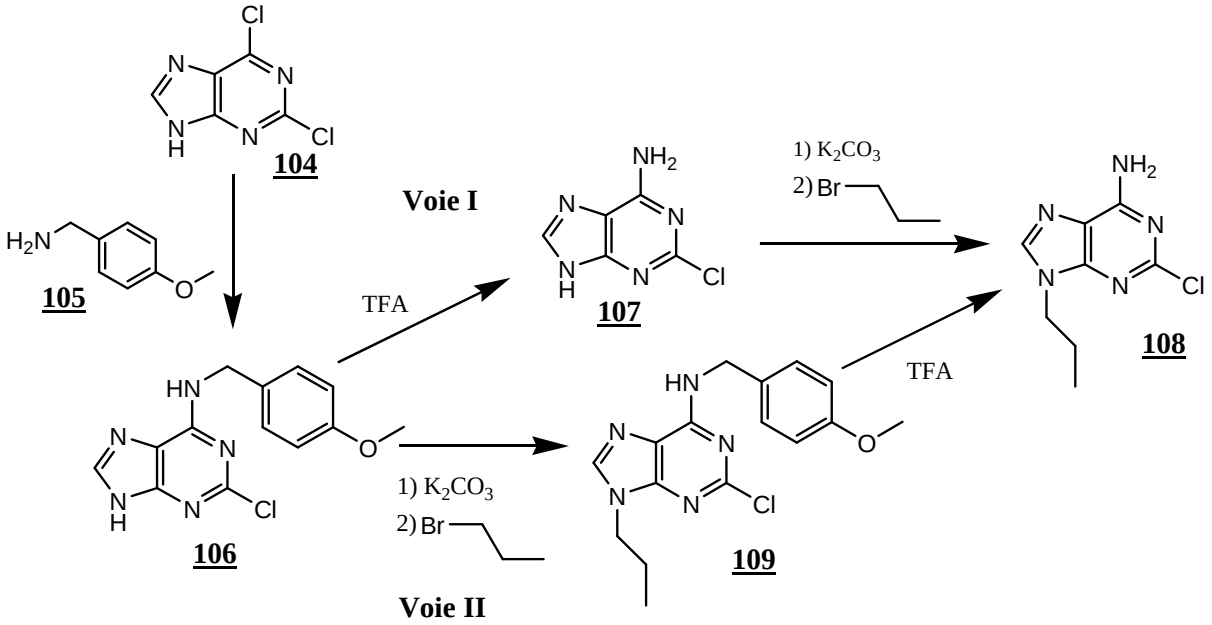


Schéma 42 : Voies de synthèse de l'adénine modifiée en positions 2 et 9

La voie I comporte une étape d'élimination en milieu acide fort du groupement 4-méthoxybenzyle conduisant à la 2-chloroadénine **107**. Cette dernière est peu soluble dans les solvants organiques. Le milieu réactionnel a donc simplement été neutralisé et soumis à une évaporation. Le résidu obtenu est ensuite alkylé, pour introduire une chaîne propyle sur la position 9 de la 2-chloroadénine, dans les mêmes conditions que celles utilisées dans la synthèse de la 9-propyladénine. Cette alkylation conduit à la 2-chloro-9-propyladénine **108**, qui est obtenue avec un rendement global pour les trois étapes de 60 %.

La voie II comprend les mêmes étapes que la voie I mais dans un ordre différent. Une alkylation de la 2-chloro-6-(4-méthoxybenzylamino)adénine **106**, dans les mêmes conditions que celles utilisées dans la synthèse de la 9-propyladénine, conduit à la 2-chloro-6-(4-

méthoxybenzylamino)-9-propyladénine **109**. Cette dernière est soluble dans les solvants organiques du fait de la présence des groupements propyle et 4-méthoxyybenzyle, ce qui permet sa purification par chromatographie sur colonne. Puis une coupure du groupement 4-méthoxybenzyle en milieu acide fort permet d'obtenir le composé cible **108** avec un rendement de 51 % pour les trois étapes.

La voie I permet donc d'obtenir le composé cible avec un meilleur rendement et en évitant une purification intermédiaire. Cette méthode de synthèse est plus rapide et plus efficace, elle sera donc à privilégier pour d'éventuelles synthèses ultérieures.

Un autre dérivé de l'adénine modifiée en positions 2 et 9 a été synthétisé. Il s'agit de la 2-méthoxy-9-propyladénine **110** synthétisée par réaction du méthanolate de sodium avec la 2-chloro-9-propyladénine **108** (Schéma 43).

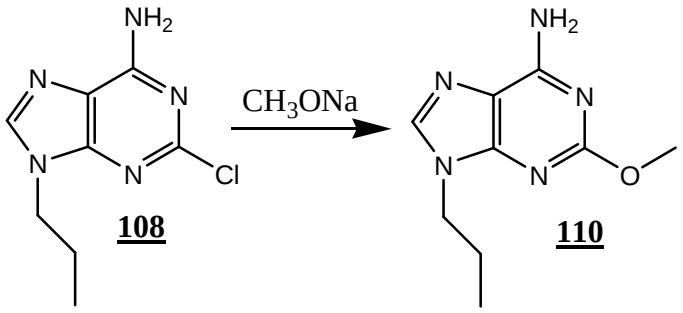
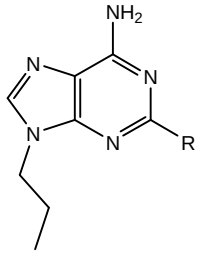


Schéma 43 : Synthèse de la 2-méthoxy-9-propyladénine **110**

Le groupement méthoxy a été choisi de petite taille de manière à ne pas perturber la réaction entre l'atome d'azote en position 1 et le MG. La 2-méthoxy-9-propyladénine **110** a été obtenue avec un bon rendement de 81 %.

Les déplacements chimiques des protons de ces deux composés sont présentés dans le tableau 15.

R =			Déplacements chimiques en ppm (RMN ^{1}H à 400 MHz dans $CDCl_3$ à 21 °C)		
	Composé	Rdt (%)	H*8*	*N9*-CH_x	*C2*-O-$C\underline{H}_3$
Cl	**108**	Voie I : 60 *	7,82	4,15	--
		Voie II : 51 *			
CH_3O	**110**	81 **	7,63	4,07	3,96

* pour les 3 étapes, ** depuis **108**

Tableau 15 : Déplacements chimiques du proton des dérivés de l'adénine modifiée en positions 2 et 9 et rendements de la réaction d'obtention correspondante

Par rapport aux composés alkylés uniquement en position 9, on note la disparition d'un des deux signaux correspondant aux protons aromatiques. Le signal correspondant au CH_2 lié à l'atome d'azote 9 est peu influencé par la nature du groupement fixé en position 2.

2.4.2. Synthèses des adduits du MG sur des dérivés de l'adénine modifiée en positions 2 et 9

Le composé **110** portant un groupement CH_3O en position 2 a été mis à réagir avec le MG. Les analyses par CCM effectuées au cours de la purification sont difficiles à interpréter. En effet, on observe plusieurs composés de polarité très proches formant une traînée lors de la révélation.

Lors de l'analyse par spectrométrie de RMN des fractions de chromatographie sur colonne de silice obtenues lors de la purification, on observe trois signaux distincts aux environs de 8,1 ppm. Dans cette zone, seulement deux signaux sont attendus. Ils correspondent aux protons portés par l'atome de carbone en position 8 de l'adénine dans les mélanges majoritaire **a** et minoritaire **b**.

Le reste du spectre est plus classique montrant un dédoublement (correspondant au mélange **a** et **b**) des signaux des groupements méthyles et CH portés par le nouveau cycle formé, conformément à la structure des molécules voisines synthétisées précédemment.

Lorsque l'analyse par spectrométrie de RMN est effectuée à 45 °C, on n'observe plus, dans la région des protons aromatiques, que deux signaux dont les intégrations sont cohérentes avec celles des autres signaux dédoublés pour les mélanges majoritaire **a** et minoritaire **b**.

On ne retrouve pas ce phénomène lors de l'analyse des adduits **108** portant un atome de chlore en position 2.

Par contre, on observe trois signaux distincts aux environs de 4,90 ppm. Dans cette zone se trouvent les signaux correspondant au proton des mélanges majoritaire **a** et minoritaire **b** liés à l'atome de carbone portant la fonction hydroxyle secondaire du nouveau cycle formé. Dans ce cas également, ce signal disparaît lorsque l'analyse par spectrométrie de RMN est effectuée à 45 °C.

Les signaux supplémentaires observés dans les spectres des adduits MG-dérivé de l'adénine portant un substituant en positions 2 et 9 correspondent probablement à des conformères stables des adduits attendus.

L'encombrement stérique apporté par la substitution en position 2 a donc probablement un effet sur les conformations possibles du cycle créé et entraîne des gênes à la rotation des groupements.

Pour chacun des composés de départ, le mélange d'adduits majoritaires a été isolé (Tableau 16).

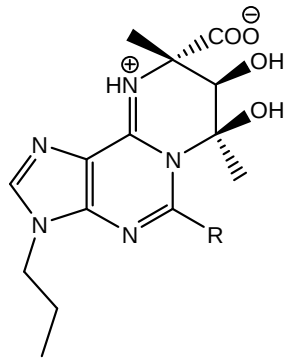
R =	 Mélange majoritaire **a**		Déplacements chimiques en ppm (RMN ^{1}H à 400 MHz dans D_2O à 21 °C)					
	Composé	Rdt (%)	H*8*	C<u>H</u>OH	*N9*-CH_x	*C2*-Y-C<u>H</u>$_x$	CH_3	
Cl	**111**	9	8,08	4,94	4,09	--	2,13	1,63
CH_3O	**112**	15	7,77	4,99	3,90-3,84		2,10	1,64

Tableau 16 : Déplacements chimiques du proton des adduits du MG sur des dérivés de l'adénine modifiée en positions 2 et 9 et rendements de la réaction d'obtention correspondante

Les rendements obtenus pour les adduits du MG sur les dérivés de l'adénine modifiée en positions 2 et 9 sont faibles. Cela est dû aux difficultés de purification. En effet, les analyses par CCM réalisées au cours des chromatographies sur colonne de silice étaient difficiles à interpréter, probablement du fait de l'existence de plusieurs conformères stables.

Nous disposons ainsi de deux autres composés qui permettront d'enrichir la gamme des adduits MG-dérivé de l'adénine et d'établir de nouvelles relations structure-activité vis-à-vis de l'importance des différentes positions de substitution.

3. Conclusions du chapitre

La méthode de purification des adduits du MG-α-aminoazahétérocycles a été optimisée. Cependant, elle reste longue et difficile en raison de la forte polarité de ces composés et du choix d'isoler et de tester les adduits majoritaires.

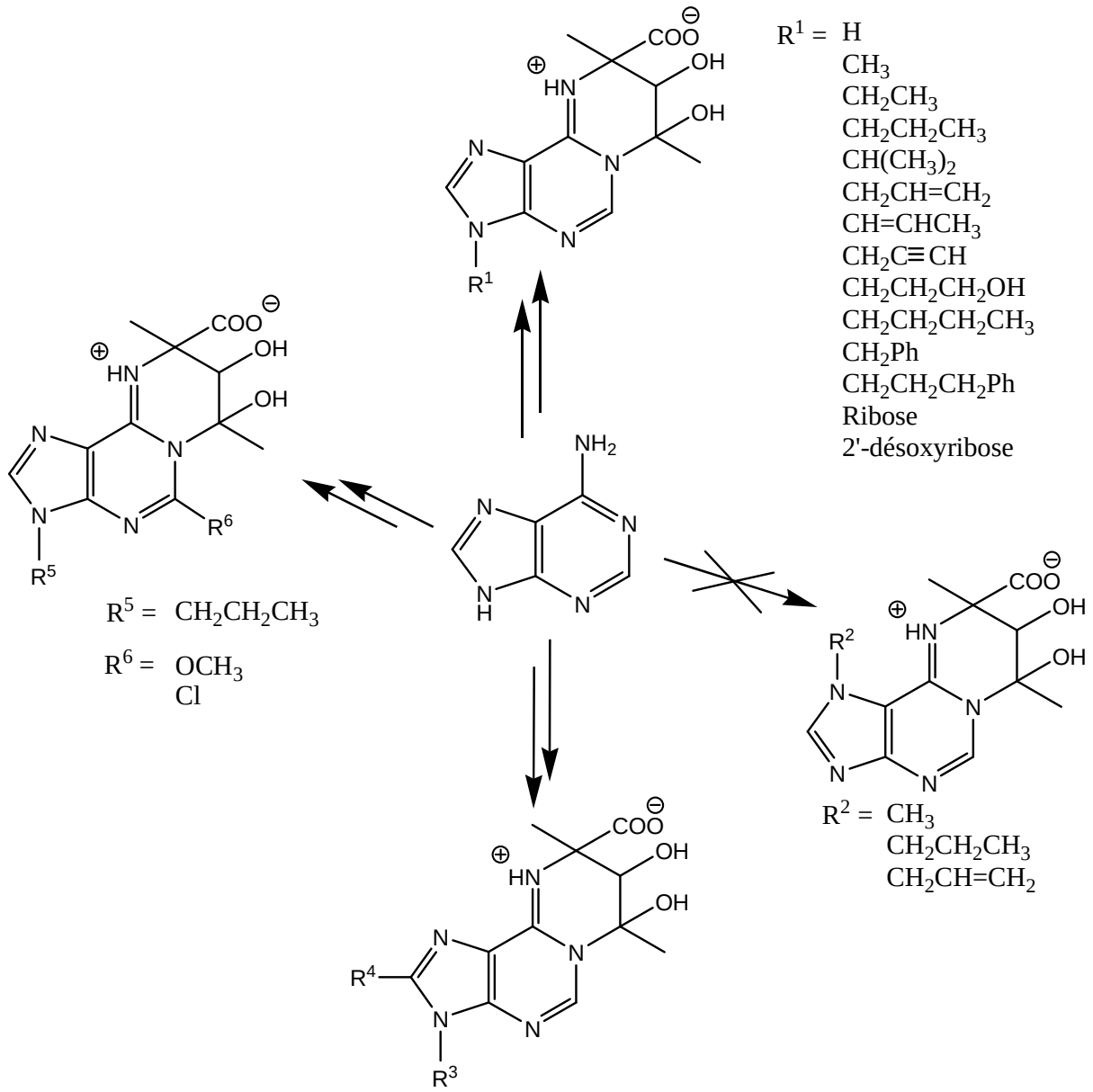
La position 1 et la fonction amine en 6 de l'adénine doivent rester libres pour pouvoir réagir avec le MG. Des substitutions sur les positions 2, 3, 7, 8 et 9 sont donc possibles. Des alkylations sur les atomes d'azote des positions 7 et 9 ont été réalisées mais pas sur l'atome d'azote en position 3, qui ne réagit pas dans les conditions de réaction utilisées. D'autres modifications ont également été introduites sur la position 2 ou 8 à partir de dérivés de l'adénine portant un substituant en position 9 (2'-désoxyadénosine ou 9-propyladénine).

Nous avons ensuite réalisé la synthèse d'une série variée d'adduits du MG sur les dérivés de l'adénine modifiée par introduction de différents substituants en différentes positions (Schéma 44).

La réaction du MG avec différents dérivés de l'adénine permet l'accès à de nouvelles molécules potentiellement actives. Cette réaction aboutit, dans la grande majorité des cas aux produits attendus. L'objectif de ces synthèses, qui était de disposer d'une gamme importante d'analogues des composés actifs **GPinh-5a** et **GPact-11a**, est donc atteint. Cependant, les adduits isolés sont obtenus avec des rendements moyens ou faibles après des étapes de purification longues et délicates.

Ces composés sont destinés à être évalués en tant que modulateurs de la protéine CFTR. Les résultats apportés par cette évaluation devraient permettre d'identifier des relations structure-activité pour cette série de composés. La mise en évidence d'adduits plus actifs que **GPact-11a** et **GPinh-5a** pourrait permettre d'envisager une utilisation de ces composés en tant qu'outils pharmacologiques pour l'étude de CFTR, voire en tant qu'agents thérapeutiques pour le traitement de la mucoviscidose ou des diarrhées infectieuses.

Un résumé des synthèses effectuées d'adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée est représenté sur le schéma 44.



R^3 = H	$CH_2CH_2CH_3$	2'-désoxyribose
R^4 = SCH_2CH_3	OCH_3	SCH_2CH_3
SH	SCH_3	OCH_2CH_3
Br	OH	SH

Schéma 44 : Ensemble des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée

Chapitre 3 : Evaluation des composés préparés

Les molécules retenues parmi des composés commerciaux ou dont les synthèses sont décrites dans les chapitres précédents ont été évaluées sur la protéine CFTR. En plus de leurs activités potentielles, ces composés ont plusieurs autres intérêts. Ils constituent un ensemble de structures qui pourra permettre d'établir des relations structure-activité et ainsi de guider les synthèses ultérieures de molécules actives. De plus, leur étude peut permettre d'identifier le pharmacophore ou encore de proposer des hypothèses concernant leur site et leur mode d'action sur la protéine CFTR. Ces différents aspects sont développés dans ce chapitre.

Les évaluations biologiques des composés synthétisés au laboratoire ont été, pour la plupart, réalisées par l'équipe partenaire : Equipe Physiopathologie et Pharmacologie des Canaux Ioniques (Pr Frédéric Becq) de l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires (UMR 6187 Université de Poitiers/CNRS).

Ce chapitre débute par la description d'études relatives à la synthèse de grandes quantités des composés les plus actifs mis en évidence précédemment et à leurs propriétés physico-chimiques.

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication (Routaboul, 2007).

1. Synthèses et propriétés physico-chimiques

1.1. Synthèses à grande échelle

Les évaluations par des tests sur tissus ou in vivo ainsi que les essais de réactivité nécessitent des quantités importantes de composés actifs. Nous avons donc envisagé d'autres techniques de purification pour réaliser un changement d'échelle et disposer de produits de la famille I dans des proportions supérieures ou égales au gramme.

Trois composés ont été synthétisés à grande échelle. Il s'agit des adduits MG-2-aminopyridine **5** qui ont été utilisés pour des études de réactivité, et de deux composés actifs précédemment mis en évidence : **GPact-11a** et **GPinh-5a**.

Une grande quantité de 2-aminopyridine **4** (30 g) a été mise à réagir dans l'eau avec le MG. La méthode de purification a ensuite été adaptée. En effet, après évaporation, la technique usuelle de purification fait appel à une chromatographie sur phase inverse. Les quantités de phase inverse nécessaires pour cette quantité d'adduit rendraient la purification très coûteuse. Des essais de précipitation des adduits attendus dans le milieu réactionnel ont été réalisés. Le solvant permettant la meilleure précipitation à la fois du point de vue de la sélectivité et de la quantité est le THF (300 mL). Après un simple lavage du précipité à l'éther diéthylique, on obtient les deux mélanges d'adduits minoritaire et majoritaire du composé attendu **5ab** avec un rendement de 63 % soit environ 48 g (Schéma 45).

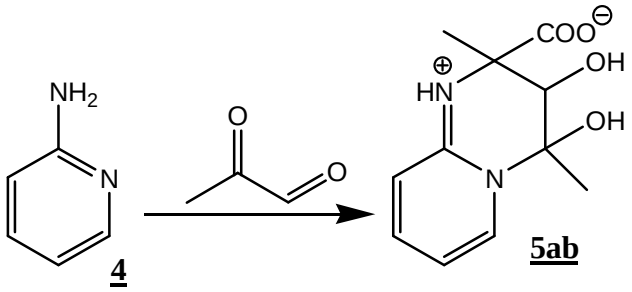


Schéma 45 : Réaction du MG sur la 2-aminopyridine **4** aboutissant aux adduits **5ab**

Malheureusement cette technique de purification n'a pas pu être adaptée à la synthèse de **GPact-11a** et **GPinh-5a**. En effet, la méthode mise au point ne permet pas d'obtenir le mélange majoritaire seul, ce qui est nécessaire pour évaluer ces composés, bien que l'activité du mélange majoritaire **a** soit proche de celle du mélange minoritaire **b** (Cf Ch3 2.1.12).

De plus, la solubilité de **GPact-11a** et **GPinh-5a** est différente de celle de **5ab**, leur précipitation dans le THF n'est donc pas aussi efficace.

GPact-11a et **GPinh-5a** ont donc été synthétisés et purifiés par la méthode classique faisant appel à une chromatographie sur phase inverse suivie d'une chromatographie sur silice. Ces deux composés ont été obtenus dans des quantités voisines du gramme avec des rendements légèrement inférieurs mais comparables à ceux obtenus sur des quantités dix fois plus faible.

En ce qui concerne **GPact-11a**, l'optimisation de la première étape de préparation du dérivé de l'adénine, qui est mis à réagir avec le MG, a beaucoup apporté dans la synthèse de grande quantité d'adduits.

1.2. Solubilité

Les composés préalablement synthétisés sont destinés à être évalués biologiquement. Il est donc important de connaître leur solubilité en milieu aqueux. La solubilité des adduits de la famille I les plus lipophiles, c'est-à-dire les adduits MG-1-aminoisoquinoléine **44**, a donc été mesurée. Ces adduits possèdent une solubilité voisine de 8 mmol/L dans l'eau soit 2,3 g/L. La solubilité du meilleur inhibiteur, **GPinh-5a** qui est beaucoup plus hydrophile, a également été mesurée. Ce composé est soluble dans l'eau à une concentration supérieure à 100 mmol/L (49,3 g/L), ce qui est bien plus élevé que son IC_{50} relevée lors de tests cellulaires (71 pmol/L). Le potentiateur **GPact-11a** possède lui aussi une solubilité dans l'eau supérieure à 100 mmol/L (32,1 g/L). La encore la solubilité de ce composé est bien plus élevée que son EC_{50} relevée lors de tests cellulaires (3 µmol/L).

1.3. Stabilité

1.3.1. Dans l'eau

Les composés **GPact-11a** et **GPinh-5a** ont été utilisés comme témoins pour les criblages de molécules synthétisées par la suite. Ces composés sont stockés au congélateur sous forme de solution mère à 100 mM dans l'eau. Ces solutions sont décongelées lorsqu'un criblage est effectué. Une quantité suffisante pour préparer une solution fille plus diluée est prélevée, puis la solution mère est recongelée. Nous avons donc voulu vérifier la stabilité de **GPact-11a** au cours de cycles de congélation/décongélation successifs.

Une solution de **GPact-11a** à 100 mM dans l'eau a été préparée en remplaçant 10 % en volume de l'eau par D_2O de manière à pouvoir réaliser une étude par spectrométrie de RMN.

Cette solution a été soumise à des cycles de congélation/décongélation et analysée par spectrométrie de RMN lors de chaque cycle.

La séquence de spectrométrie de RMN utilisée permet de réaliser l'analyse malgré la forte proportion d'eau non deuterée. Cependant, certains signaux dont les déplacements chimiques se situent à proximité de celui de l'eau ne sont pas visibles. Ainsi, pour le composé **GPact-11a**, les signaux correspondant aux protons du groupement CH_2 lié à l'atome d'azote et, au proton porté par l'atome de carbone lié à la fonction hydroxyle secondaire n'apparaissent pas sur les spectres de RMN lors de ce type d'expériences.

Aucun changement n'est observé dans les spectres de RMN tout au long de l'expérience (10 cycles de congélation/décongélation) (Figure 63). Ce résultat reflète donc la bonne stabilité du composé **GPact-11a** dans ces conditions. L'utilisation d'une solution mère de **GPact-11a** congelée pour une utilisation en tant que témoin lors des criblages est donc possible au vu de la stabilité de ce composé.

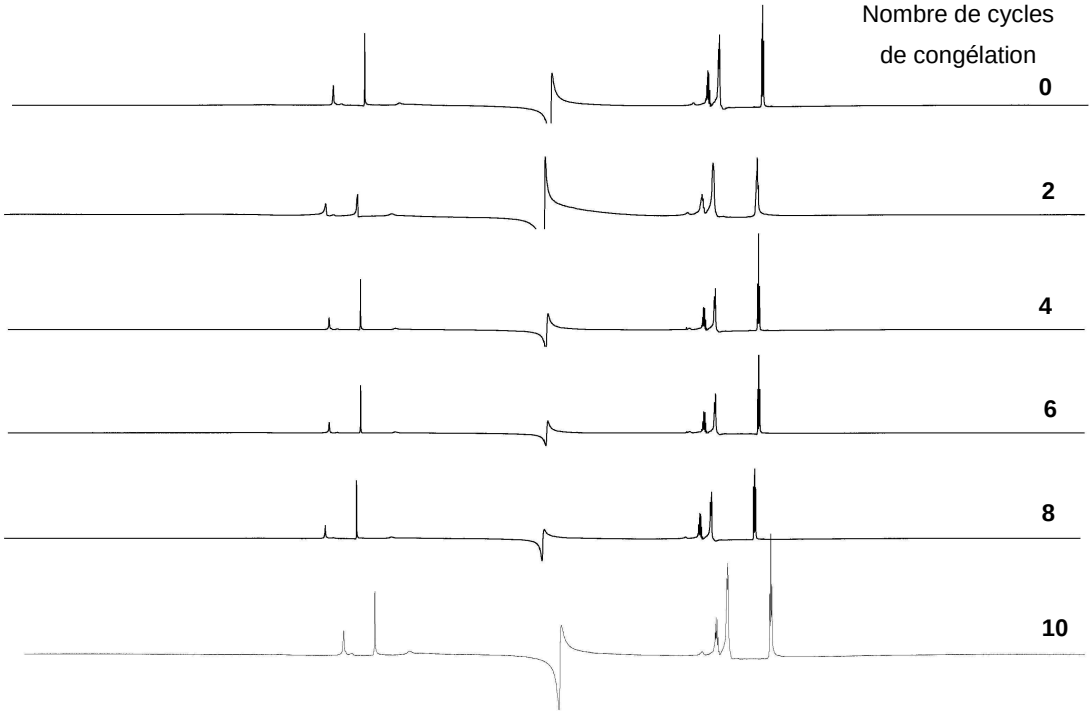


Figure 63 : Spectres de RMN ^{1}H de **GPact-11a** à 100 mM dans D_2O/H_2O (1/9) (400 MHz à 21 °C) enregistrés lors de cycle de congélation/décongélation

1.3.2. En présence de DTT (Dithiothréitol)

Certains tests biologiques d'évaluation de **GPact-11a** sur tissu nécessitent l'emploi de DTT (Figure 64). Ce composé est utilisé comme réducteur pour fluidifier le mucus lors de tests sur intestin de souris.

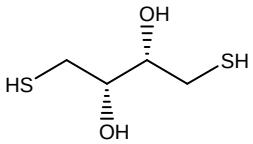


Figure 64 : Structure du DTT

Le DTT, qui est aussi nucléophile, pouvait potentiellement réagir avec **GPact-11a**. Ces deux composés ont donc été mis en solution dans des conditions similaires à celles de l'évaluation biologique (valeurs de pH, de température et milieu identiques). Cette expérience a été menée à l'abri de l'air, sous atmosphère d'argon (24 h), puis à l'air libre (24 h) sans observer de réaction des adduits **GPact-11a** avec le DTT.

2. Evaluations biologiques complémentaires des composés précédemment synthétisés (notamment GPact-11a et GPinh-5a)

2.1. Tests cellulaires (in vitro)

2.1.1. Evaluation par le test d'efflux d'ions iodures

Le test d'efflux d'ions iodures consiste à mesurer la vitesse de sortie d'ions iodures radioactifs $^{125}I^-$ incorporés dans le milieu intracellulaire. Les ions iodures sont utilisés car les deux radiotraceurs $^{125}I^-$ et $^{36}Cl^-$ peuvent être considérés comme équivalents pour la mesure de l'activité d'un canal chlorure (Venglarik, 1990) et que la demi-vie de l'ion $^{125}I^-$ est beaucoup plus courte que celle de l'ion $^{36}Cl^-$ (demi-vie respective de 30 jours et de 300000 ans). Après incubation des cellules dans un milieu contenant les ions iodures radioactifs $^{125}I^-$, la constante de vitesse de sortie de la cellule des $^{125}I^-$ est mesurée en présence d'un activateur de CFTR : la forskoline (fsk) (Figure 65).

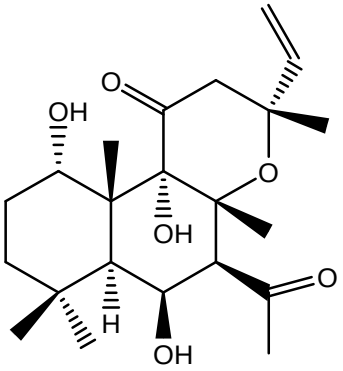


Figure 65 : Structure de la forskoline (fsk)

Après détermination de la constante de vitesse au niveau basal, les molécules à tester sont ajoutées et la variation de la constante de vitesse mesurée. Si cette constante augmente, il s'agit d'un **potentiateur**, si elle diminue, il s'agit d'un inhibiteur. Il est également possible de réaliser le test d'efflux en l'absence de stimulation par la fsk pour évaluer le caractère **activateur** des composés testés sur CFTR.

2.1.1.1. Activité sur différentes mutations de CFTR

2.1.1.1.1. Molécules inhibitrices

Les résultats de l'évaluation d'adduits de la famille I (Figure 66) par le test d'efflux d'ions iodures sur différentes mutations de CFTR sont présentés le tableau 17.

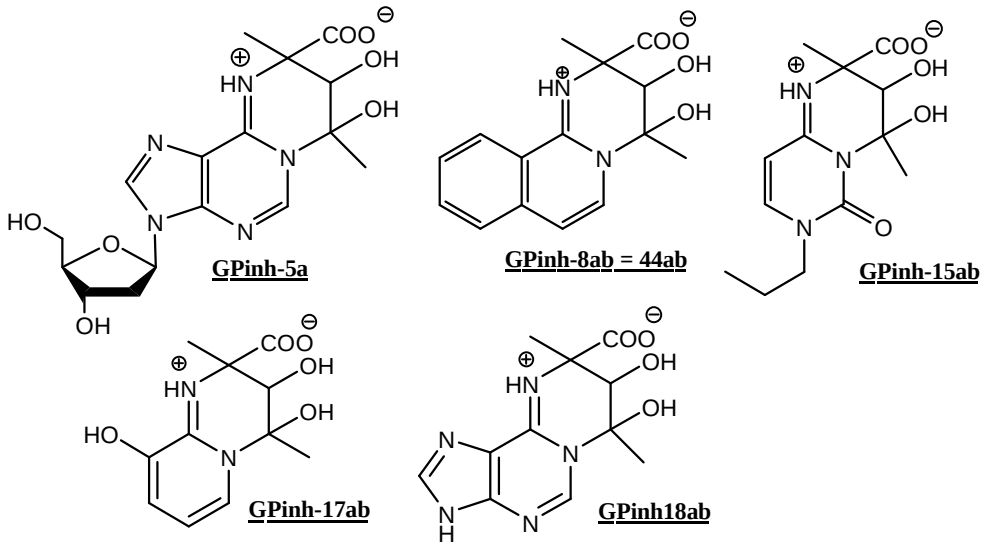


Figure 66 : Structures des principaux inhibiteurs de la famille I

Composés (proportion a:b déterminée par RMN)	Mutations de CFTR (et type cellulaire)				
	Expression endogène		Expression hétérologue		
	wt (Calu 3)	ΔF508 (CF15)	wt (CHO)	G551D (CHO)	G1349D (Cos7)
Glibenclamide	11,7 µM	11,8 µM	14,7 µM	7,9 µM	9,0 µM
$CFTR_{inh}$-172	ND	ND	1,2 µM	ND	ND
GPinh-5a	93,3 pM	67,3 pM	71,0 pM	43,1 nM	72,3 pM
GPinh-8ab = **44ab** (60:40)	15,7 nM	8,7 nM	2,5 nM	190 nM	79,4 nM
GPinh-15ab (60:40)	2,3 nM	6,3 nM	3,4 nM	154 nM	7,0 nM
GPinh-17ab (75:25)	11,2 µM	7,0 µM	4,4 µM	35,5 µM	9,0 µM
GPinh-18ab (60:40)	11,9 µM	6,0 µM	5,7 µM	110 µM	2,9 µM

ND : Non Déterminé. Pour delF508, le test d'efflux est réalisé après incubation des cellules pendant 24 h à 27 °C. Les expériences sont réalisées en présence de 1 µM de fsk (wt), de 10 µM de fsk + 50 µM de génistéine (delF508 et G551D) ou de 10 µM fsk + 250µM de MPB-91 (G1349D).

Tableau 17 : IC_{50} des principaux inhibiteurs de la famille I et des inhibiteurs $CFTR_{inh}$-172 et glibenclamide, déterminées par le test d'efflux des ions iodures sur différentes mutations de CFTR

L'inhibiteur $CFTR_{inh}$-172 et le glibenclamide sont souvent utilisés comme références dans les tests d'inhibition des canaux CFTR.

Parmi les cinq composés évalués, deux d'entre eux (**GPinh-17ab** et **GPinh-18ab**) présentent des IC_{50} sur CFTR-wt de l'ordre de la dizaine de micromolaire, comparables à celle du glibenclamide et à celle de $CFTR_{inh}$-172. Des IC_{50} très basses ont été mesurées pour trois autres composés (**GPinh-5a**, **GPinh-8ab** et **GPinh-15ab**), notamment **GPinh-5a** qui possède la valeur d'IC_{50} la plus basse des inhibiteurs connus de CFTR. La très bonne capacité d'inhibition de ces composés sur CFTR-wt peut permettre d'envisager leur développement en tant qu'agents antidiarrhéiques.

On note également une forte inhibition par ces composés de delF508-CFTR corrigée par la température. Les IC_{50} observées sur cette mutation et sur la protéine sauvage sont comparables. Ces composés peuvent donc être utilisés en recherche fondamentale pour des études nécessitant une inhibition de delF508-CFTR.

Les IC_{50} déterminées sur la mutation G1349D (mutation sur NBD2) sont également comparables à celles observées sur CFTR-wt et delF508-CFTR. Par contre, on note une forte différence de valeur pour les IC_{50} mesurées pour la mutation G551D (mutation sur NBD1). En effet, les rapports IC_{50} CFTR-G551D/ IC_{50} CFTR-wt qui reflètent les différences d'activité sur ces deux types de mutations sont élevés. Ces composés sont donc nettement moins efficaces sur cette mutation. Cela est très marqué pour les plus actifs pour lesquels on note des rapports d'IC_{50} de 45 pour **GPinh-15a** et de 600 pour **GPinh-5a**. Cette différence d'activité n'est pas observée pour le glibenclamide. Elle est donc probablement liée à un mécanisme spécifique des composés **GPinh** qui implique cette zone de la protéine CFTR.

2.1.1.1.2. Molécules potentiatrices

Le composé potentiateur **GPact-11a**, dont la structure est rappelée sur la figure 67, présente une EC_{50} de 2,1 µM déterminée par le test d'efflux d'ions iodures sur cellules CHO-wt.

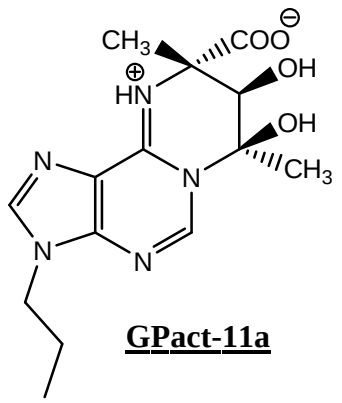


Figure 67 : Structure de **GPact-11a**

Ce composé a également été évalué sur des mutations de CFTR. Les trois mutations utilisées sont G551D, G1349D et 2GD (qui est la double mutation G551D + G1349D). Les résultats de cette évaluation sont représentés sur la figure 68.

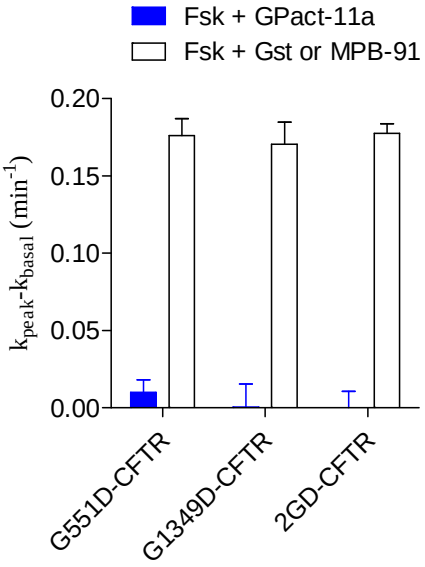


Figure 68 : Activité de **GPact-11a** sur les mutations de CFTR G551D, G1349D et 2GD

On remarque donc que **GPact-11a** n'est pas actif sur ces protéines mutées. Cela peut-être dû à plusieurs facteurs :

- soit **GPact-11a** possède un site de fixation sur CFTR impliquant les deux zones mutées,

- soit la fixation de l'ATP, perturbée par ces mutations, est nécessaire pour la potentialisation par **GPact-11a**,

- soit **GPact-11a** n'est pas un potentiateur suffisamment puissant pour corriger le déficit d'activité de CFTR retrouvé dans le cas de ces deux mutations.

Des essais de potentialisation des canaux ΔF508 doivent être réalisés prochainement.

2.1.1.2. Influence de la stéréochimie sur l'activité de composés inhibiteurs de la famille I

Afin d'évaluer l'influence de la stéréochimie sur l'activité des composés, les mélanges minoritaire **b** et majoritaire **a** des meilleurs inhibiteurs ont été évalués conjointement ou séparément par le test des efflux (Tableau 18).

α-aminoaza hétérocycle initial	Composés de la famille I	IC_{50}		
		Mélange **a**:**b** (proportions déterminées par spectrométrie de RMN)	Mélange majoritaire **a**	Mélange minoritaire **b**
2-amino-3-hydroxypyridine	**GPinh-17**	4,4 µM (75:25)	1,8 µM	4,9 µM
adénine	**GPinh-18**	5,7 µM (60:40)	4,2 µM	2,7 µM
2'-désoxyadénosine	**GPinh-5**	ND	71 pM	194 pM
3-propylcytosine	**GPinh-15**	2,2 nM (60:40)	2,1 nM	1,6 nM
1-aminoisoquinoléine	**GPinh-8** = **44**	2,5 nM (60:40)	3,0 nM	*

* **GPinh-8b** n'a pas pu être obtenu sans trace de **GPinh-8a**

Tableau 18 : IC_{50} des principaux inhibiteurs de la famille I déterminées par le test d'efflux d'iodures sur cellules CHO-wt en présence de fsk 1 µM

On observe une différence d'activité entre le mélange racémique majoritaire **a** et le mélange racémique minoritaire **b**. Le plus actif des deux est, suivant les composés, l'un ou l'autre des mélanges.

Les valeurs des IC_{50} des mélanges **a** et **b** testés ensemble sont proches de celles mesurées séparément sur le mélange majoritaire **a** et le mélange minoritaire **b**. D'autre part, les rapports d'IC_{50} de **b**/**a** restent donc du même ordre de grandeur puisqu'ils varient de 0,64 à 2,7.

Ces résultats ne permettent pas de conclure sur l'influence de la stéréochimie des composés de la famille I. En effet, les composés ont été testés sous forme de mélange racémique, les deux énantiomères ayant vraisemblablement des activités différentes. On peut cependant noter que la stéréochimie de l'atome de carbone portant la fonction hydroxyle secondaire a peu d'importance puisque les mélanges racémiques minoritaire et majoritaire, qui ne diffèrent que par la configuration absolue de cet atome de carbone, sont tous deux actifs.

2.1.1.3. Sélectivité

2.1.1.3.1. Sélectivité vis-à-vis d'autres transporteurs ABC

Dans le but d'étudier la sélectivité des composés actifs vis-à-vis des canaux CFTR, certains d'entre eux (Figure 69) ont été testés en tant qu'inhibiteur de la protéine MRP1 par l'équipe d'Attilio Di Pietro à l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (UMR 5086 CNRS/Université Lyon I). La protéine MRP1 fait partie de la super famille des transporteurs ABC, comme CFTR, et est notamment impliquée dans les phénomènes de résistance aux médicaments anticancéreux.

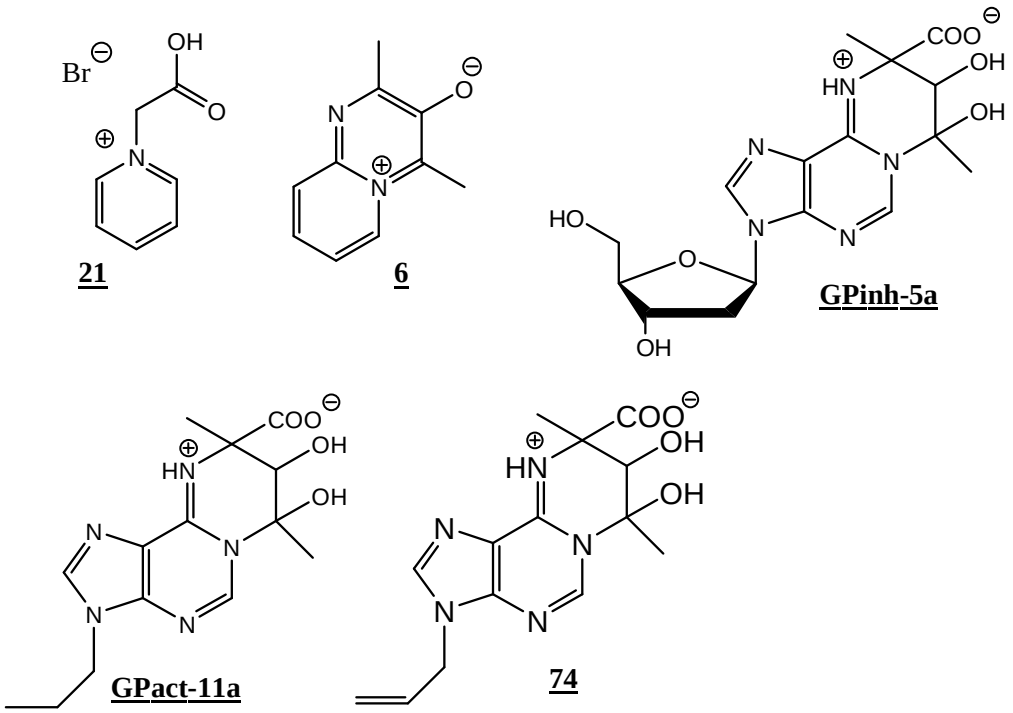


Figure 69 : Structures des composés évalués en tant qu'inhibiteur de la protéine MRP1

Cette évaluation n'a pas permis de mettre en évidence d'effet inhibiteur de ces composés sur la protéine MRP1.

Afin de vérifier la sélectivité au sein de la famille des transporteurs ABC, il serait intéressant d'évaluer ces composés sur d'autres protéines de cette famille comme BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) ou P-gP et de rechercher un éventuel effet activateur.

2.1.1.3.2. Sélectivité vis-à-vis de canaux non chlorures

L'activité de certains composés actifs vis-à-vis des canaux autres que chlorures a été évaluée. Ces tests ont porté sur trois canaux cationiques : potassiques (Herg), sodiques et calciques. Aucun des composés représentés sur la figure 70 n'a présenté d'activité sur ces canaux.

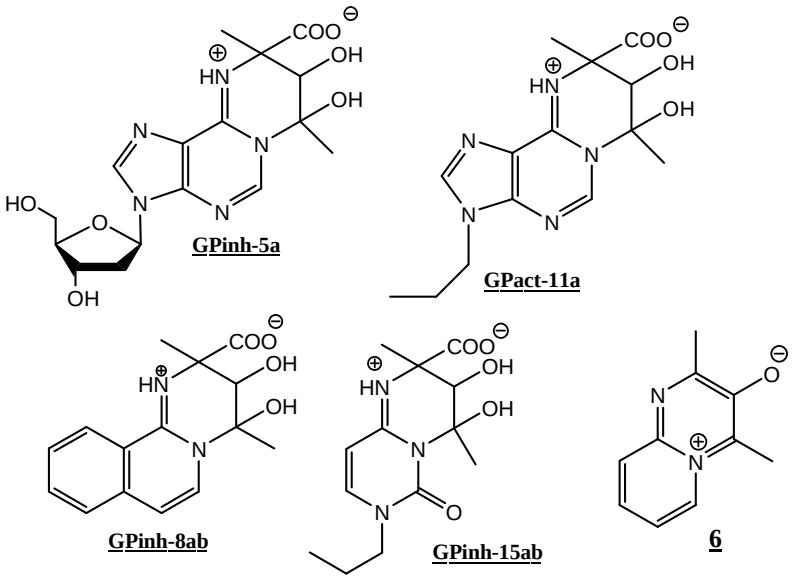


Figure 70 : Structures des composés évalués en tant que modulateurs des canaux potassiques, sodiques et calciques

2.1.1.3.3. Sélectivité vis-à-vis d'autres canaux chlorures

La sélectivité de **GPinh-5a** vis-à-vis de canaux chlorures autres que CFTR, les canaux chlorures calcium- et volume-activés, a été évaluée. Le test d'efflux d'ions iodures a aussi été effectué en présence d'une solution hypotonique activant le canal volume-activé ou en présence de l'ionophore calcique A23187 activant le canal calcium-activé. Dans les deux cas, l'addition de **GPinh-5a** même à forte concentration (1 µM) n'a pas diminué la vitesse de

sortie des ions iodures, démontrant l'inactivité de ce composé vis-à-vis de ces deux canaux (Figure 71).

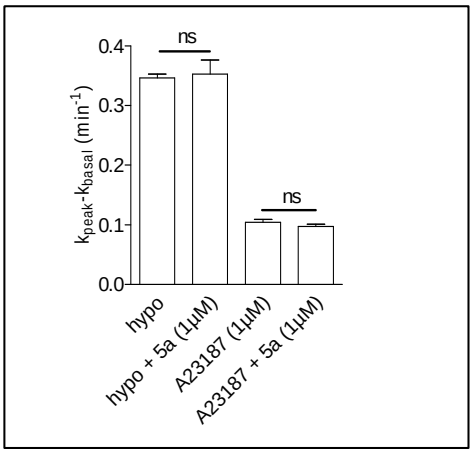


Figure 71 : Rapport des constantes de vitesse de sortie des ions iodures en présence de **GPinh-5a** à 1 µM (noté 5a), d'une solution hypotonique (hypo) ou de l'ionophore calcique A23187

Il serait important d'évaluer également la sélectivité des molécules activatrices vis-à-vis d'autres canaux chlorures.

2.1.1.4. Evaluation de l'effet correcteur sur delF508-CFTR

Les composés actifs sur CFTR ont été évalués en tant que correcteur de la protéine delF508-CFTR (Figure 72).

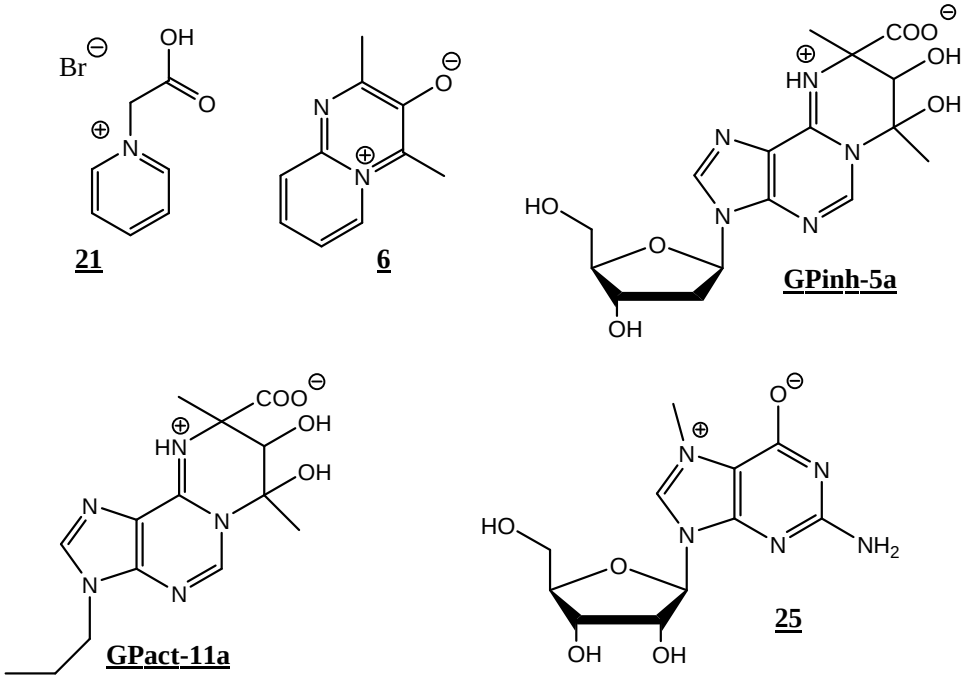


Figure 72 : Structures des composés évalués en tant que correcteur de la protéine delF508-CFTR

Les cellules portant cette mutation sont incubées en présence des composés ou de correcteurs connus puis soumises au test d'efflux d'ions iodures. Aucun des composés testés n'a présenté une influence sur la constante de vitesse de sortie des ions iodures. Ces composés ne sont donc pas, dans ces conditions, des correcteurs de delF508-CFTR.

2.1.2. Tests ADMET

Afin d'évaluer si les composés actifs (Figure 73) peuvent être utilisés en tant qu'agents thérapeutiques, des tests concernant leurs caractéristiques d'absorption, de distribution, de métabolisation, d'élimination ou de toxicité (ADMET) dans l'organisme ont été effectués à l'aide de modèle in vitro.

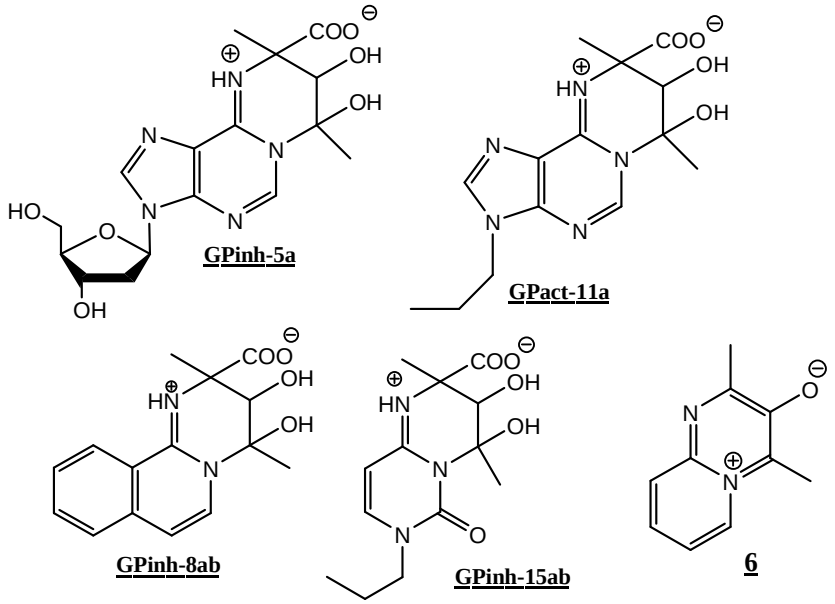


Figure 73 : Structures des composés évalués par des tests ADMET

2.1.2.1. Test de passage transépithélial

Ce test a été effectué à l'aide du modèle Caco-2 qui est utilisé pour évaluer la capacité des composés testés à être absorbés par l'épithélium digestif. Il consiste en une mesure de la de la capacité des composés testés à traverser une couche de cellules polarisées mimant un épithélium.

Les résultats concernant **GPinh-8ab** ne sont pas disponibles car ces adduits ne sont pas assez solubles dans le milieu utilisé. Les composés **GPinh-5a** et **6** possèdent un score de perméabilité moyen alors que ce score est faible pour **GPact-11a** et **GPinh-15ab**.

Il faut toutefois à noter que les résultats concernant **GPinh-5a** sont à prendre avec précaution car il existe de fortes variations entre les différentes mesures effectuées.

Par ailleurs, **GPact-11a** présente une perméabilité supérieure dans le sens basolatéral vers apical par rapport au sens inverse. Ce résultat peut être lié à une activation d'un système d'efflux par transport actif. Ce composé étant un potentiateur de CFTR il est donc possible qu'il active également un autre transporteur ABC (Cf Ch3 2.1.1.3.1).

2.1.2.2. Test de métabolisation

Un test d'évaluation de la métabolisation de **GPact-11a** a été réalisé. Après incubation de ce composé pendant 15 minutes dans des extraits hépatiques, aucune métabolisation n'est observée par analyse LC/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse).

2.1.2.3. Tests de toxicité

2.1.2.3.1. Toxicité cellulaire

La cytotoxicité des composés actifs sur CFTR, représentés sur la figure 72, a été évaluée. Le test effectué est une mesure de l'activité des déshydrogénases cellulaires en utilisant le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Ce dernier est converti en formazan de couleur violette par ces enzymes (Schéma 46). L'apparition de cette couleur reflète donc la viabilité cellulaire.

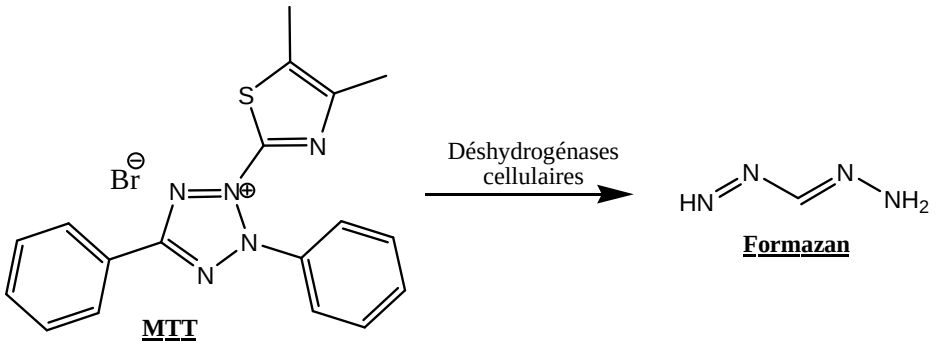


Schéma 46 : Conversion du MTT en formazan par les déshydrogénases cellulaires

Ce test n'a pas montré de cytotoxicité des molécules étudiées après des incubations de 2 et 24 heures à des concentrations allant jusqu'à 100 µM. Ces résultats permettent donc d'éliminer un faux positif concernant l'activité des adduits dû à une toxicité cellulaire.

2.1.2.3.2. Toxicité génétique

Le test d'Ames, qui permet d'évaluer l'effet génotoxique des molécules testées, a été effectué sur les composés représentés sur la figure 73.

Seul le composé **6** a présenté une réponse positive à ce test. Cette probable génotoxicité n'est pas surprenante concernant ce composé de la famille II, qui est un hétérocycle aromatique plan. Il possède donc des caractéristiques d'agent intercalant de l'ADN.

2.1.2.3.3. Test d'induction d'enzymes hépatiques

La possible inhibition de l'activité du cytochrome P450 par les composés représentés sur la figure 73 a été étudiée. Le test utilise la capacité de différentes isoformes de ce cytochrome (1A2, 2C19, 2D6 et 3A4) à convertir différents substrats en molécules fluorescentes.

Aucun des composés testés n'a présenté d'action inhibitrice sur le cytochrome P450. Afin de contrôler l'absence d'effets sur ces enzymes, il serait nécessaire d'évaluer la capacité de ces composés à activer le cytochrome P450.

Ces tests ADMET permettent d'envisager un développement ultérieur de ces composés, à l'exception du composé de la famille II **6** dont la génotoxicité ne permet son emploi qu'en tant qu'outil pharmacologique.

2.1.3. Evaluation par la technique de « patch-clamp »

Un test cellulaire différent du test d'efflux d'ions iodures a été effectué sur les deux meilleurs inhibiteurs (**GPinh-5a** et **GPinh-8ab**). Il s'agit d'un test électrophysiologique de « patch clamp » qui consiste à enregistrer l'intensité du courant transmembranaire.

La méthode utilisée pour l'évaluation des composés est le « patch clamp » sur cellule entière. Une électrode est placée dans une micropipette qui va être insérée dans la membrane d'une cellule surexprimant la protéine CFTR. L'intérieur de la pipette communique donc avec le milieu intracellulaire (Figure 74). Une deuxième électrode est placée dans le milieu dans lequel baignent les cellules. L'enregistrement de l'intensité du courant transmembranaire se fait entre ces deux électrodes.

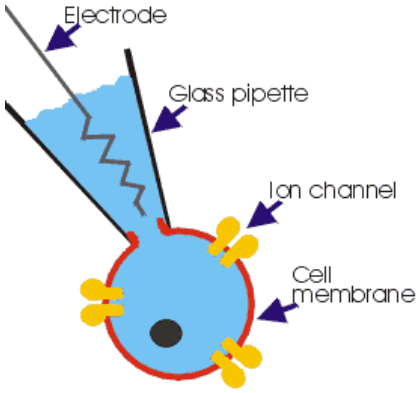


Figure 74 : Principe du « patch clamp » sur cellule entière.

L'intensité enregistrée au niveau basal correspond aux mouvements des ions à travers les canaux ioniques en l'absence de stimulation. Ainsi, si des variations se produisent dans les sorties ou les entrées d'ions de la cellule, l'intensité du courant va être modifiée. De plus, chaque type de canal ionique possédant des caractéristiques électriques propres, il est donc possible de mesurer sélectivement l'intensité du courant résultant de l'activité du canal CFTR.

GPinh-5a et **GPinh-8ab** ont été évalués par la technique de « patch clamp » sur cellules CHO (Figure 75).

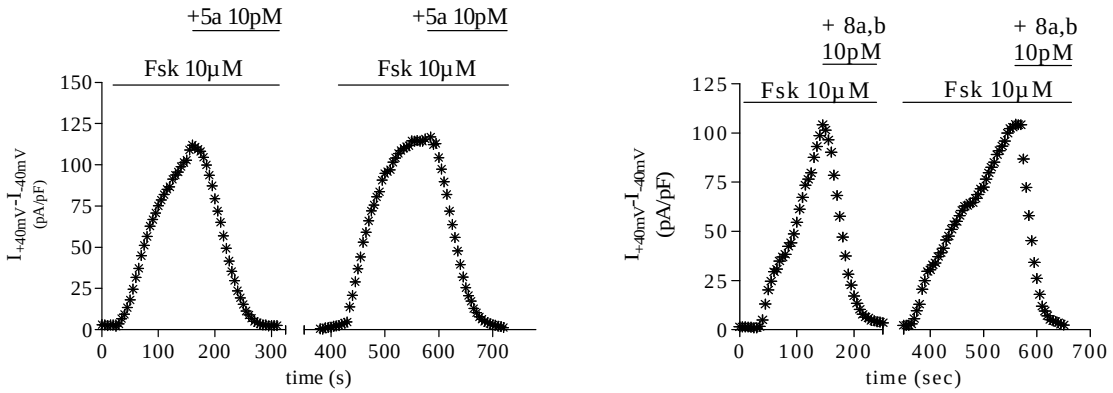


Figure 75 : Mesure par la technique de « patch clamp » de l'effet des composés **GPinh-5a** (noté 5a) et **GPinh-8ab** (noté 8a,b) sur la variation de l'intensité associé au canal CFTR du courant en fonction du temps après activation par la fsk

Pour les deux composés, on note une forte inhibition du courant induit par la fsk à une concentration de 10 pM. Cette inhibition est rapide, complète et réversible.

Dans le but d'évaluer la possibilité d'utilisation de **GPinh-5a** en tant qu'outil pharmacologique pour l'étude de la protéine CFTR, nous avons mis ce composé à la disposition des équipes travaillant sur la mucoviscidose.

L'équipe d'Isabelle Rupera à Nice (UMR 6548) a évalué l'effet de **GPinh-5a** par « patch clamp » sur des cellules rénales de souris exprimant la protéine CFTR sauvage. Leurs résultats montrent, après stimulation par la fsk, une inhibition par **GPinh-5a** dès la concentration de 1 pM (Figure 76).

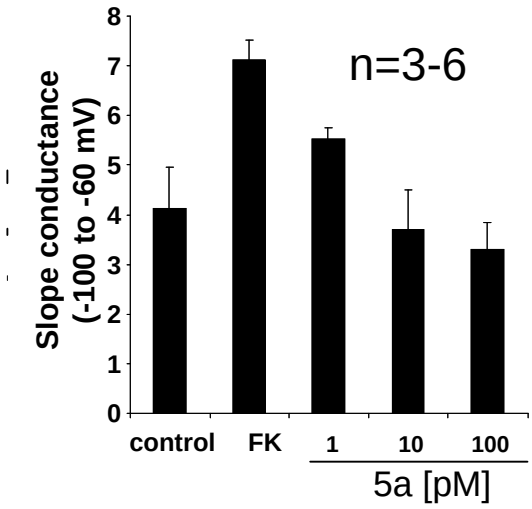


Figure 76 : Inhibition de CFTR par **GPinh-5a** (noté 5a), après stimulation par la fsk (notée FK), mesurée par la technique de « patch clamp » sur cellules rénales de souris

2.1.4. Evaluation par un test de fluorescence

L'équipe de Chantal Gauthier à l'Institut du Thorax de Nantes (Unité INSERM 533) a évalué l'effet de **GPinh-5a** par un test de fluorescence sur des cellules issues de la lignée 16HBE14o-.

Ce test utilise la sonde fluorescente SPQ (bromure de 6-méthoxy-*N*-(3-sulfopropyl)quinolinium) sensible aux ions halogénures. La différence de fluorescence mesurée entre le niveau basal et après stimulation est liée à la concentration en halogénures à l'intérieur de la cellule et donc à la perméabilité transmembranaire de ces derniers.

Ce test a permis la mise en évidence d'une inhibition de la sortie de la cellule d'ions halogénures, après stimulation par la fsk, par **GPinh-5a** dès la concentration de 10 pM (Figure 77).

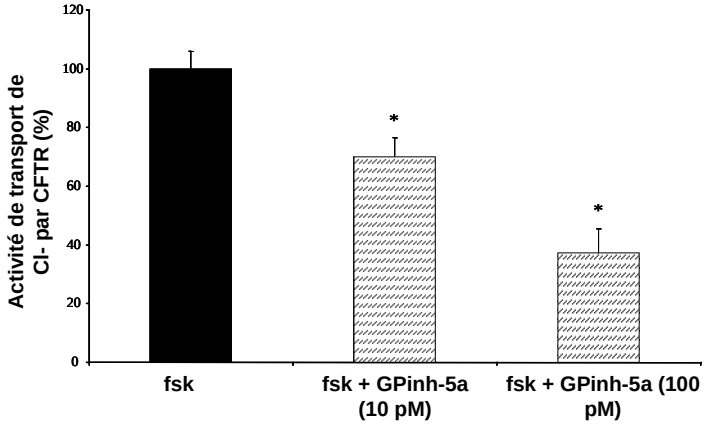


Figure 77 : Pourcentage d'inhibition de sortie d'ions halogénures de la cellule par **GPinh-5a** après stimulation par la fsk sur cellules issues de la lignée 16HBE14o-

2.2. Test tissulaire (ex vivo)

Un test tissulaire utilisant une chambre de Ussing a été réalisé. Cette technique consiste à mesurer un courant entre deux cuves contenant un milieu dans lequel baigne des électrodes. Les cuves sont séparées par un tissu prélevé sur un organisme, ici il s'agit de colon de souris. Les électrodes permettent de mesurer l'intensité du courant transépithélial (Isc) dont la valeur est liée aux mouvements ioniques.

2.2.1. Molécules inhibitrices

Des expériences d'inhibition du courant transépithélial en utilisant **GPinh-5a** à 20 pM après stimulation de CFTR par la fsk ont été menées sans obtenir de résultats. Pour observer un effet du composé **GPinh-5a**, il est nécessaire de le préincuber avec le tissu 10 minutes avant l'application de fsk. Le courant transépithélial ensuite induit par la fsk 1 µM est alors fortement diminué.

Le même type de comportement est observé avec l'inhibiteur $CFTR_{inh}$-172 qui, appliqué après la fsk, n'est pas capable d'inhiber CFTR dans le colon de souris, et ce même en augmentant la concentration utilisée (100 µM).

L'expérience d'inhibition avec **GPinh-5a**, en le préincubant pendant 10 min, a été réalisée à différentes concentrations de 20, 50 et 100 pM. On obtient ainsi une diminution de l'intensité du courant après activation par la fsk 1 µM de respectivement 68 %, 84 % et 95 %, (Figure 78).

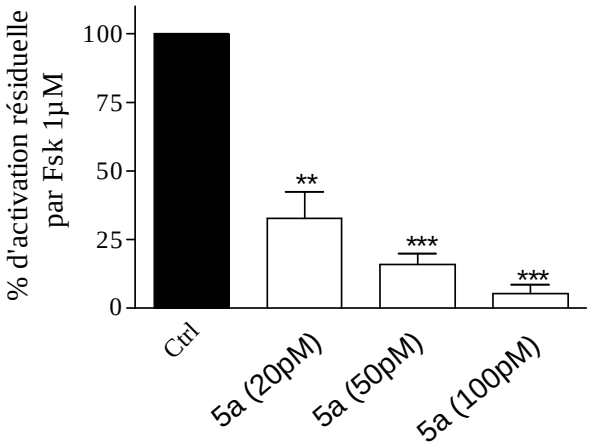


Figure 78 : Effet inhibiteur de **GPinh-5a** (noté 5a) sur l'intensité du courant transépithélial mesuré à travers le colon de souris (**GPinh-5a** étant préincubé des deux côtés de la membrane)

2.2.2. Molécule potentiatrice

Des expériences d'activation de l'intensité du courant transépithélial en utilisant **GPact-11a** à différentes concentrations, avec ou sans préstimulation de CFTR par la fsk ont également été effectuées (Figure 79).

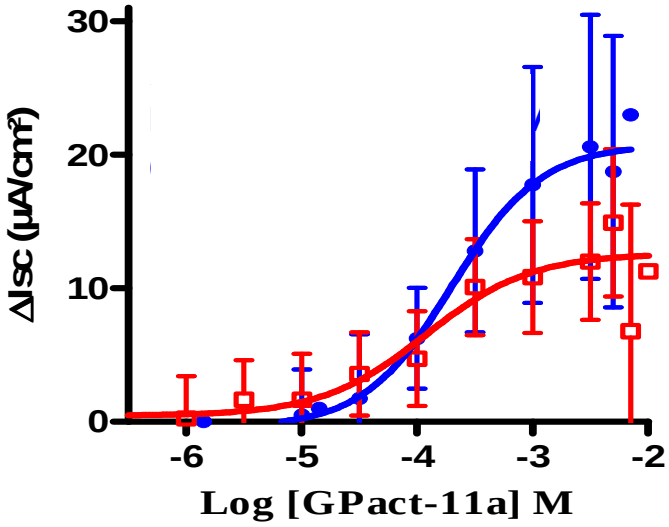


Figure 79 : Courbe dose-effet de **GPact-11a** sur l'augmentation du courant transépithélial (sur colon de souris) avec préstimulation de CFTR par la fsk (1 µM) (symboles carrés) ou sans préstimulation de CFTR par la fsk (symboles ronds)

Ce test a permis de déterminer une EC_{50} de 135 µM sur tissus après stimulation de CFTR par la fsk. De plus, il n'est pas nécessaire de préstimuler CFTR pour observer une activité de **GPact-11a**. Dans ce cas, on observe une EC_{50} plus élevée égale à 256 µM.

Ce résultat tend à montrer que ce composé n'est pas seulement un potentiateur mais également un activateur de CFTR.

En outre, **GPact-11a** n'a pas d'effet sur le courant transépithélial lorsque le tissu utilisé est prélevé sur souris inactivées pour le gène CF (souris KO CFTR-/-) ce qui montre bien que ce composé exerce son effet par l'intermédiaire de la protéine CFTR.

2.3. Test sur souris (in vivo)

La mesure de la salivation induite par une stimulation β-adrénergique peut être utilisée pour évaluer l'activité de CFTR (Best, 2005). Des expériences de collecte de la quantité de salive produite par des souris après stimulation par l'isoprénalne (agoniste β-adrénergique), en absence de modulateurs de CFTR ou après leur injection dans la joue de souris, ont été menées. Les modèles de souris utilisés pour ce test expriment soit CFTR sauvage soit sont de type CFTR-/- et sont, dans ce cas, réfractaires à la stimulation β-adrénergique.

2.3.1. Molécule potentiatrice

Les expériences menées sur souris CFTR-/- montrent l'absence d'effet de **GPact-11a**. Par contre lorsque les souris expriment CFTR-wt, la sécrétion salivaire, après stimulation par l'isoprénaline, est augmentée (Figure 80).

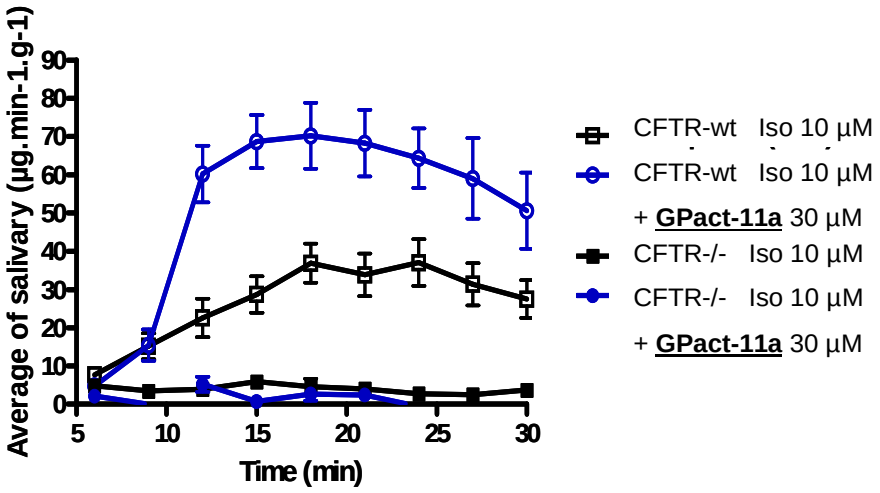


Figure 80 : Sécrétion salivaire en fonction du temps après stimulation par l'isoprénaline (notée Iso)

L'EC_{50} de **GPact-11a** mesurée par cette technique est de 7,2 µM (Figure 81).

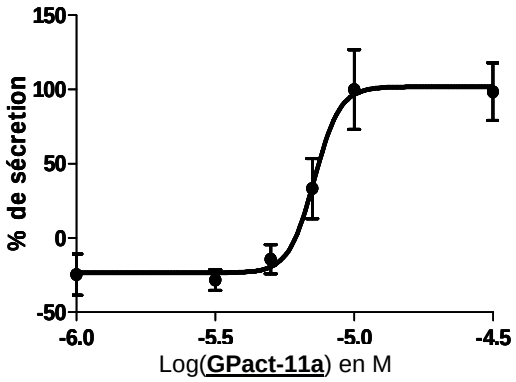


Figure 81 : Courbe dose-effet de **GPact-11a** sur la sécrétion salivaire après stimulation de CFTR par l'isoprénaline (10 µM)

2.3.2. Molécules inhibitrices

La même expérience a été réalisée avec **GPinh-5a**. Comme pour les évaluations en chambre de Ussing, il est nécessaire d'injecter **GPinh-5a** 10 min avant la stimulation par l'isoprénaline pour observer un effet. Dans ce cas, on observe une inhibition de la sécrétion salivaire dès la concentration de 20 pM (Figure 82).

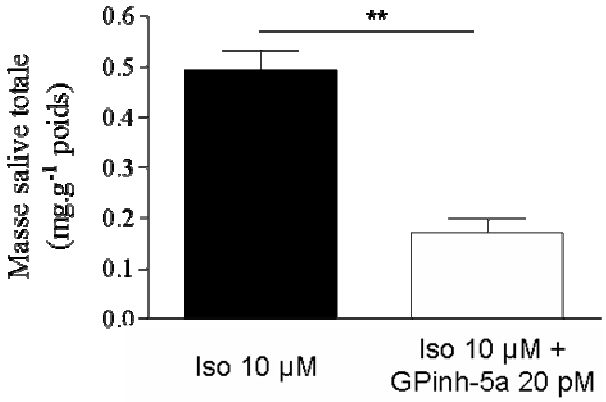


Figure 82 : Masse totale de salive collectée pendant toute la durée de l'expérience (Isoprénaline notée Iso)

2.3.3. Compétition entre inhibiteurs et potentiateurs/activateurs

Une expérience a été réalisée pour évaluer une possible compétition entre **GPinh-5a** et **GPact-11a**. Après stimulation par l'isoprénaline et préincubation de **GPinh-5a**, **GPact-11a** a été injecté dans la joue de la souris sans présenter d'effet potentiateur (Figure 83).

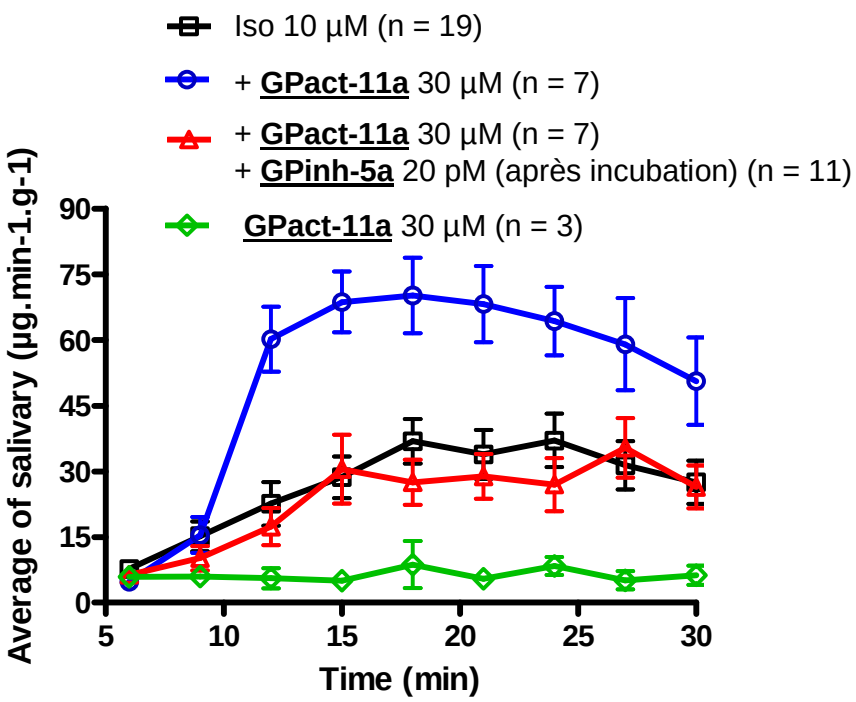


Figure 83 : Sécrétion salivaire en fonction du temps (isoprénaline notée Iso)

Les deux composés, **GPinh-5a** et **GPact-11a**, entrent donc en compétition pour la stimulation de la sécrétion salivaire due à CFTR.

2.4. Conclusions sur les nouvelles évaluations biologiques des composés précédemment synthétisés

Les tests réalisés sur les inhibiteurs, notamment sur **GPinh-5a**, permettent de confirmer l'activité de ces composés. En effet, les évaluations in vitro menées selon trois techniques (efflux d'ions iodures, « patch clamp » et fluorescence) et par trois équipes différentes valident l'intérêt de l'utilisation de **GPinh-5a** en tant qu'outil pharmacologique pour l'étude de CFTR. De plus, l'activité mesurée lors de tests tissulaires ou in vivo tend à confirmer le potentiel thérapeutique des adduits **GPinh-5a** comme anti-diarrhéique.

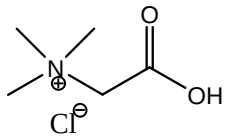
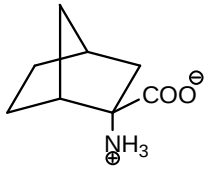
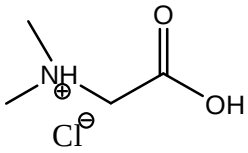
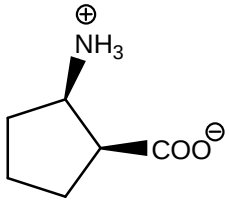
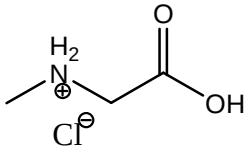
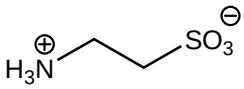
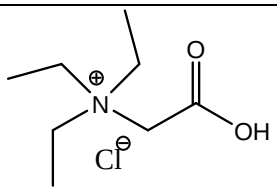
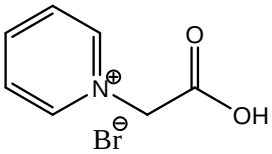
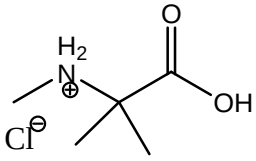
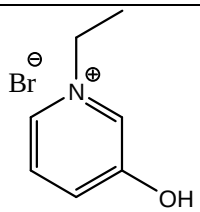
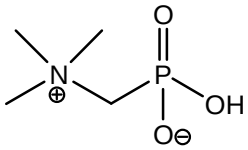
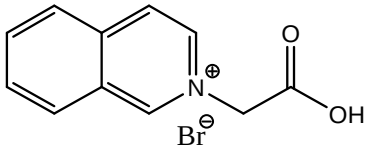
D'autre part, des expériences menées sur **GPact-11a** ont permis de mettre en évidence son effet sur tissu et in vivo lors de tests de sécrétion salivaire chez la souris. De plus, ce composé s'est avéré être activateur de CFTR dans certaines conditions expérimentales. Il semble maintenant nécessaire d'évaluer son activité sur des cellules exprimant la protéine delF508-CFTR corrigée par la température ou par des correcteurs tel le miglustat. En effet, il est possible d'envisager une utilisation thérapeutique de ce composé dans les cas de mucoviscidose dus à la mutation delF508-CFTR. **GPact-11a** serait alors utilisé en complément d'un correcteur pour améliorer l'efficacité sur la stimulation de CFTR.

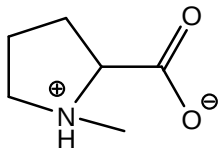
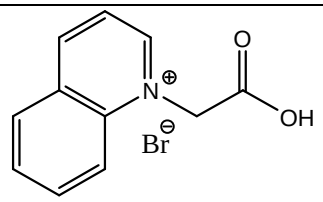
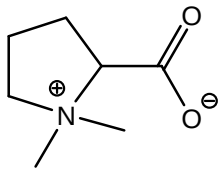
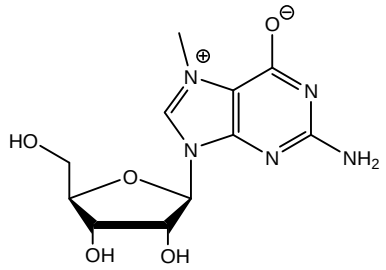
3. Activités des nouveaux composés

3.1. Recherche sur le pharmacophore

3.1.1. Bétaïne et dérivés

La bétaïne et ses dérivés ont été évalués en tant qu'inhibiteurs de CFTR par le test d'efflux d'ions iodures sur cellules CHO-wt. Les résultats concernant ces produits sont représentés dans le tableau 19.

Composés	Structure	IC_{50} *	**Composés**	Structure	IC_{50} *
10		**96 µM**	**18**		> 100 mM
11		> 100 mM	**19**		> 100 mM
12		> 100 mM	**20**		> 100 mM
13		**1 mM**	**21**		**25 µM**
14		> 100 mM	**22**		> 100 mM
15		> 100 mM	**23**		> 100 mM

Composés	Structure	IC_{50} *	**Composés**	Structure	IC_{50} *
16		> 100 mM	**24**		> 100 mM
17		**220 µM**	**25**		**3,5 µM**

* Sur cellules CHO-wt, calculée par le test des efflux d'ions iodures radioactifs

Tableau 19 : Activités sur CFTR des analogues de la bétaïne (mesurées par le test d'efflux d'ions iodures sur cellules CHO-wt)

La bétaïne **10** et certains de ses analogues se sont avérés être des inhibiteurs de CFTR à fortes concentrations. Il s'agit de l'analogue de la bétaïne **13** portant des groupes éthyles sur l'atome d'azote quaternaire, de la L-*N*,*N*-diméthylproline **17** et du bromure de 1-(2-carboxyéthyl)pyridinium **21**. Ce dernier est l'inhibiteur le plus efficace parmi ces composés avec une IC_{50} de 25 µM.

Ces composés portent tous un groupe ammonium quaternaire montrant bien l'importance de la présence de la charge positive permanente puisque les analogues déméthylés, dont la charge est dépendante du pH, **11**, **12** et **14** de la bétaïne ne sont pas inhibiteurs.

Ces composés possèdent peu d'éléments dans leur structure qui peuvent interagir avec les macromolécules biologiques car ils sont de petites tailles. Leur liaison avec leur cible biologique est donc probablement faible. Cela peut peut-être expliquer l'importance d'une charge positive très localisée, qui n'est pas retrouvée pour les composés actifs de la famille I.

Par ailleurs, la bétaïne **10** et ses dérivés actifs possèdent tous deux atomes de carbone entre les hétéroatomes chargés à pH physiologique.

Un encombrement stérique important sur l'ammonium quaternaire est défavorable puisque le composé **13**, le plus encombré, est le moins actif alors que le composé **21** qui comprend un cycle aromatique plan dans cette zone présente l'IC_{50} la plus basse.

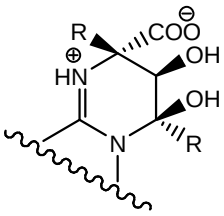
La bétaïne **10** étant connue comme un correcteur de CFTR, il semble intéressant d'évaluer également pour cette action ses analogues inhibiteurs mis en évidence.

L'activité inhibitrice de CFTR observée pour la bétaïne est intéressante puisque ce composé est utilisé en thérapeutique. Associée à de l'arginine, la bétaïne est utilisée pour le traitement des troubles fonctionnels présumés d'origine hépatique. Les indications de ce composé, sous forme de sels de citrate, sont : traitement des troubles dyspeptiques et traitement adjuvant des hypertriglyceridémies mineures (Vidal®). La pharmacodynamie décrit des effets de la bétaïne sur la synthèse des phospholipides et sur la motricité gastrique. L'inhibition de CFTR pourrait donc également participer à l'action thérapeutique dans le cas des troubles digestifs.

D'autre part, la 7-méthylguanosine **25** a également présenté un effet inhibiteur de CFTR intéressant (IC_{50} de 3,5 µM). Ce composé possède une structure plus proche de celle du meilleur inhibiteur **GPinh-5a** et du potentiateur/activateur **GPact-11a** que de celles de la bétaïne **10** et de ses dérivés. Le mode d'action de la 7-méthylguanosine **25** n'est donc pas forcément le même que celui des petites molécules que sont la bétaïne **10** et ses dérivés.

3.1.2. Influence du remplacement des groupes méthyles par des groupements éthyles dû au changement d'α-oxoaldéhyde (MG/EG) dans la réaction de synthèse

Les adduits de l'EG sur la 2-aminopyridine et sur la 1-aminoisoquinoléine ont été évalués. Leur activité ainsi que celle de leurs analogues MG est représentée dans le tableau 20.

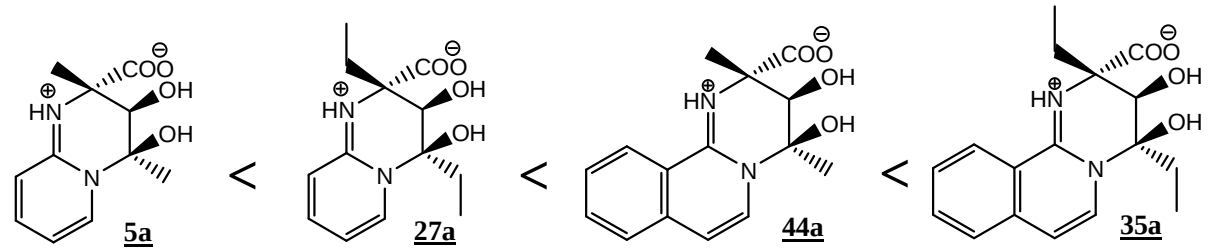
α-aminoazahétérocycle initial	R =	 Mélange majoritaire **a**	Evaluation par le test d'efflux d'ions iodures sur cellules CHO-wt	
		Composés	Activité *	IC_{50}
2-aminopyridine	CH_3	**5a**	0	x
	CH_3-CH_2	**27a**	-	18 µM
1-aminoisoquinoléine	CH_3	**GPinh-8a**	-	3 nM
	CH_3-CH_2	**35a**	0	x

* - inhibiteur, 0 pas d'activité

Tableau 20 : Activité sur CFTR des adduits du MG ou de l'EG sur la 2-aminopyridine ou sur la 1-aminoisoquinoléine

Les adduits du MG sur la 2-aminopyridine **5a** ne sont pas actifs alors que l'analogue EG **27a** est inhibiteur (IC_{50} de 18 µM). Inversement, l'adduit du MG sur la 1-aminoisoquinoléine **GPinh-8a** est un inhibiteur puissant (IC_{50} de 3 nM) alors que son analogue EG **35a** n'est pas actif.

La lipophilie de ces composés peut expliquer leur différence d'activité. En effet, le composé le moins lipophile et le composé le plus lipophile ne sont pas actifs (Figure 84).



Pas d'activité **Inhibiteur** **Inhibiteur** **Pas d'activité**

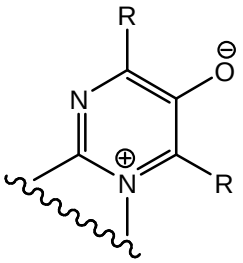
Figure 84: Classement par lipophilie croissante des adduits MG et EG sur la 2-aminopyridine et sur la 1-aminoisoquinoléine

Il est donc possible que l'action inhibitrice ne soit produite que pour une lipophilie suffisante mais sans que celle-ci soit toutefois trop élevée.

On peut également remarquer que l'encombrement stérique supplémentaire apporté par le remplacement des groupements méthyles par des groupements éthyles n'est pas incompatible avec une inhibition de CFTR. Toutefois cette augmentation de l'encombrement reste limitée. Il serait donc intéressant d'étudier l'activité d'adduits du phénylglyoxal sur la 2-aminopyridine (si leur synthèse est réalisable).

3.1.3. Evaluation des composés de la famille II

Les activités des composés de la famille II sur CFTR sont représentées dans le tableau 21.

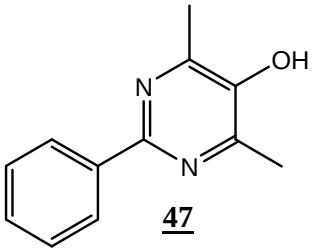
α-aminoazahétérocycle initial			Evaluation par le test d'efflux d'ions iodures sur cellules CHO-wt	
	R =	**Composés**	Activité *	IC_{50}
2-aminopyridine	CH_3	**6**	**-**	**5,1 nM**
	CH_2-CH_3	**48**	0	x
1-aminoisoquinoléine	CH_3	**45**	**-**	**16,5 nM**
benzamidine	CH_3	**47**	0	x

* : - inhibiteur, 0 pas d'activité

Tableau 21 : Activité des produits de la famille II

Les produits de la famille II issus des adduits du MG sur la 2-aminopyridine **6** et sur la 1-aminoisoquinoléine **45** sont tous deux fortement inhibiteurs. Il est à noter que la charge positive portée par ces composés est délocalisée sur plusieurs atomes du cycle aromatique.

Le composé issu de la benzamidine **47** est quant à lui inactif. Ce dernier composé dont la structure est rappelée sur la figure 85 n'est probablement que partiellement sous forme zwitterionique à pH physiologique. Il ne contient donc pas le pharmacophore supposé et n'était donc pas attendu actif.



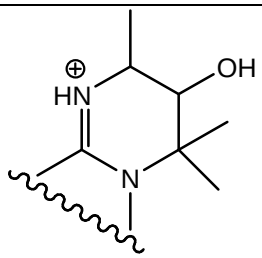
47

Figure 85 : Structure du composé de la famille II **47** issu de la benzamidine

Le produit de la famille II issu des adduits de l'EG sur la 2-aminopyridine **48** n'a pas présenté d'activité sur la protéine CFTR.

3.1.4. Evaluation des composés de la famille III

Les activités des produits de la famille III sur CFTR sont représentées dans le tableau 22.

α-aminoazahétérocycle initial		Evaluation par le test d'efflux d'ions iodures sur cellules CHO-wt		
	Entrée	Activité *	EC_{50}	IC_{50}
2-aminobenzothiazole	**51**	?		
9-butyladénine	**52**	?		
9-propyladénine	**53**	?	x	?
2-aminopyridine	**54**	?		

* : - inhibiteur, 0 pas d'activité, ? évaluation en cours

Tableau 22 : Activité des produits de la famille III

Les composés de la famille III ne possèdent pas le pharmacophore supposé, nous n'attendons donc pas d'activité de leur part. De plus, les produits de la famille I issus de la 2-aminopyridine, de la 9-butyladénine (Cf Ch3 3.2.1) et du 2-aminobenzothiazole ne sont pas actifs sur CFTR. Le composé **53** issu de la 9-propyladénine est donc le plus intéressant parmi les dérivés préparés, puisque c'est l'analogue décarboxylé de **GPact-11a**. Ce dernier a été testé en tant qu'activateur de CFTR et n'a pas présenté d'activité pour des concentrations

inférieures ou égales à 100 µM. L'évaluation du composé **53** en tant qu'inhibiteur de CFTR n'a pas encore été réalisée.

3.1.5. Conclusions sur la recherche du pharmacophore

Les simplifications structurales autour du pharmacophore aboutissant à la bétaïne et ses analogues ont permis la confirmation de la structure minimale active supposée. En effet, l'évaluation de ce type de composés a mis en évidence des caractéristiques moléculaires nécessaires à l'activité sur CFTR. Les composés actifs parmi cette série sont de forme zwitterionique. En effet, ils possèdent tous un groupement ammonium quaternaire lié par quatre liaisons à des atomes de carbone ainsi qu'un atome d'oxygène ionisé à pH physiologique. Ces composés se démarquent donc des inhibiteurs de CFTR de type bloqueur du canal ouvert qui sont généralement des gros anions.

La 7-méthylguanosine **25** s'est également avérée inhibitrice de CFTR. La mise en évidence de cette activité ouvre la voie à l'exploration des activités d'une large série de composés modifiés à partir de cette structure de base (modifications du sucre par exemple).

Le changement d'α-oxoaldéhyde, entraînant le remplacement de groupements méthyles par des groupements éthyles, a permis la mise en évidence d'un nouveau composé inhibiteur. Cette modification est donc compatible avec une activité sur CFTR et a permis de montrer l'importance de l'influence de la lipophilie de ces composés et donc de celle des inhibiteurs.

L'évaluation des produits de la famille II confirme également l'hypothèse de pharmacophore puisque deux composés se sont avérés inhibiteurs de CFTR.

Les produits de la famille III ne portent pas le pharmacophore et sont attendus inactifs. Le résultat négatif de l'évaluation en tant qu'activateur de CFTR de l'analogue décarboxylé de **GPact-11a** est donc une confirmation supplémentaire de la structure du pharmacophore.

Tous ces résultats concordants nous permettent de valider la structure minimale du pharmacophore nécessaire qui avait été proposée pour observer une activité sur CFTR : un

atome d'azote chargé positivement, séparé par deux atomes de carbone d'un atome d'oxygène chargé négativement.

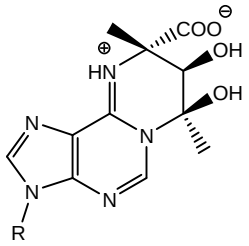
Cependant, cette structure est nécessaire mais n'est pas suffisante pour observer une activité. De nombreux produits testés présentent cette structure minimale sans pour autant être actifs sur la protéine CFTR. On peut supposer une influence de la lipophilie (notamment pour les adduits EG) sur l'activité, mais ce paramètre ne permet pas d'expliquer tous les résultats obtenus. De plus, nous n'avons pas d'informations concernant le mode d'action de ces composés. En effet, les analogues actifs de la bétaïne, qui sont de petites molécules, et la 7-méthylguanosine **25** ont-ils le même mécanisme ou le même site de fixation que les composés des familles I et II qui sont des molécules plus grosses ?

Nous avons donc confirmé la structure minimale nécessaire à l'activité sur CFTR. Il reste maintenant à identifier les modifications autour de cette structure permettant d'observer de manière certaine cette activité.

3.2. Influence des modifications de l'adénine

3.2.1. Modifications en position 9

Les activités sur CFTR des adduits de la famille I issus de dérivés de l'adénine modifiée en position 9 sont représentées dans le tableau 23.

R =	 Mélange majoritaire **a**	Evaluation par le test d'efflux d'ions iodures sur cellules CHO-wt		
	Entrée	Activité *	EC_{50}	IC_{50}
H	**GPinh-18ab**	**-**	x	**4,2 µM**
CH_3	**71a**	**0**	x	x
CH_2-CH_3	**72a**	**0**	x	x
CH_2-CH_2-CH_3	**GPact-11a**	**+**	**2 µM**	x
CH-$(CH_3)_2$	**73a**	**0**	x	x
CH_2-CH=CH_2	**74a**	**+**	**3 µM**	x
CH=CH_2-CH_3	**75a**	**0**	x	x
CH_2-C≡CH	**76a**	**0**	x	x
CH_2-CH_2-CH_2-OH	**63a**	**0**	x	x
CH_2-CH_2-CH_2-CH_3	**77a**	**0**	x	x
CH_2-Ph	**78a**	**0**	x	x
CH_2-CH_2-CH_2-Ph	**79a**	**0**	x	x
2'-désoxyribose	**GPinh-5a**	**-**	x	**71 pM**
ribose	**GPinh-6a**	**-**	x	**Pas de 100 % inhibition**

* : + potentiateur/activateur, - inhibiteur, 0 pas d'activité

Tableau 23 : Activité des adduits du MG sur des dérivés de l'adénine modifiée en position 9

Parmi cette série d'adduits de la famille I issus de dérivés de l'adénine portant un substituant en position 9, on distingue la présence de deux potentiateurs et de trois inhibiteurs. Le composé **GPinh-18ab** est le mélange d'adduits MG-adénine. Il porte donc un atome d'hydrogène en position 9. Les deux autres inhibiteurs portent un sucre en position 9. Le changement du 2'-désoxyribose en ribose influence fortement l'inhibition puisqu'on passe d'une inhibition forte et complète à un inhibiteur partiel.

GPact-11a possède une chaîne propyle en position 9. Lorsqu'on allonge cette chaîne (groupements butyle, benzyle ou 3-phénylpropyle) ou qu'on la raccourcit (groupements éthyle et méthyle), on note une disparition de l'activité.

Parmi les chaînes à trois atomes de carbone, seul le groupement allyle permet de conserver une forte activité potentiatrice sur CFTR. En effet, ni la ramification (groupement isopropyle), ni l'introduction d'un hétéroatome en bout de chaîne (groupement 3-hydroxypropyle), ni la présence d'une triple liaison (groupement propargyle), ni même le changement de position de la double liaison ne permettent de conserver une action significative sur CFTR.

Le mélange majoritaire d'adduits MG-9-allyladénine **74a** est donc potentiateur de CFTR avec une EC_{50} de 3 µM voisine de celle de **GPact-11a**. Ces composés possèdent par contre un délai d'action différent. En effet, la constante de vitesse maximale de sortie des ions iodures est atteinte 2 min après l'ajout de **GPact-11a** soit au bout de 4 min de mesure (Figure 86), alors que cette constante maximale est obtenue au bout de 5 min soit 3 min après l'ajout de **74a** (Figure 87).

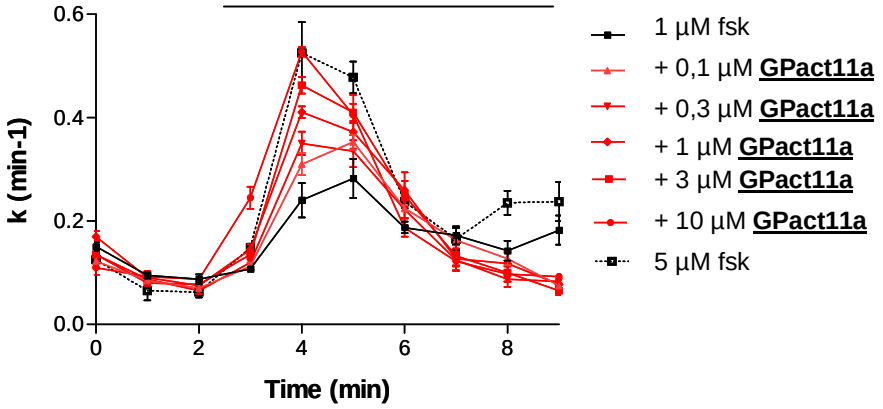


Figure 86 : Evolution de la constante de vitesse de sortie des ions iodures en présence de fsk et de différentes concentrations en **GPact-11a** (Cellules CHO-wt)

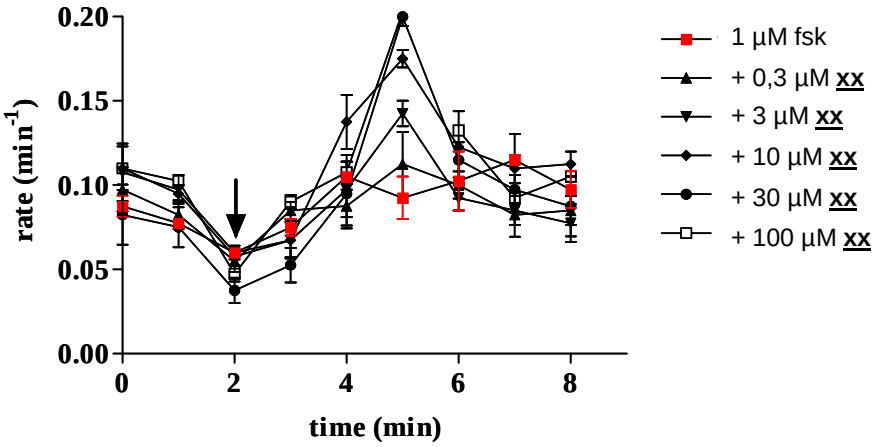


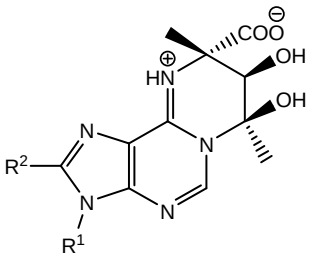
Figure 87 : Evolution de la constante de vitesse de sortie des ions iodures en présence de fsk et de différentes concentrations en **74a** (Cellules CHO-wt)

On observe donc un effet retardé des adduits portant un substituant allyle par rapport à ceux portant un groupement propyle. Cette différence dans le délai d'action est peut être due à des différences de biodisponibilité.

L'évaluation de cette série de dérivés de l'adénine modifiée en position 9 montre qu'il existe très peu de variations chimiques possibles sur cette position permettant d'obtenir des composés potentiateurs. Il est donc opportun d'étudier les modifications chimiques sur d'autres positions de l'adénine afin d'évaluer leur influence sur l'activité des adduits du MG sur ces dérivés de l'adénine.

3.2.2. Modifications en position 8 et/ou 9

Les activités sur CFTR des adduits de la famille I issus de dérivés de l'adénine modifiée en position 8 et/ou 9 sont représentées dans le tableau 24.

R^1 =	R^2 =	 Mélange majoritaire **a**	Evaluation par le test d'efflux d'ions iodures sur cellules CHO-wt		
		Entrée	Activité *	EC_{50}	IC_{50}
dRib	SH	**94a**	**?**		
	CH_3-CH_2-S	**95a**	**0**	x	x
	CH_3-CH_2-O	**96a**	**0**	x	x
H	Br	**97a**	**?**		
	SH	**98a**	**+**	**23 µM**	
	CH_3-CH_2-S	**99a**	**?**		
CH_2-CH_2-CH_3	OH	**101a**	**0**	x	x
	CH_3-S	**102a**	**0**	x	x
	CH_3-O	**103a**	**0**	x	x

* : + potentiateur/activateur, - inhibiteur, 0 pas d'activité, ? évaluation en cours ; dRib : 2'-désoxyribose

Tableau 24 : Activité des adduits du MG sur des dérivés de l'adénine modifiée en position 8 et/ou 9

Certains de ces composés issus de dérivés de l'adénine modifiée en position 8 et/ou 9 sont toujours en cours d'évaluation et nous ne disposons donc pas de la totalité des résultats les concernant.

Cette gamme de composés a tout d'abord été évaluée en tant que potentiateur de CFTR. Parmi les composés synthétisés, un seul d'entre eux **98a** a présenté une activité potentiatrice avec une EC_{50} de 23 µM. Cette valeur est dix fois plus élevée que celle de **GPact-11a**, ce composé est donc moins actif que le composé « chef de file ». De plus, ce

composé possède une fonction thiol, or la présence de ce groupement SH très nucléophile peut être responsable d'une toxicité. Il est donc nécessaire d'évaluer la toxicité cellulaire de **98a** afin d'éliminer un faux positif dû à une perméabilisation de la membrane par effet toxique.

Par ailleurs aucun des composés évalués n'a présenté d'activité inhibitrice de la protéine CFTR.

3.2.3. Modifications en positions 2 et 9

Les deux mélanges d'adduits synthétisés sont actuellement en cours d'évaluation. Nous ne disposons donc pas d'informations sur leurs activités éventuelles.

3.2.4. Conclusions sur les modifications de l'adénine

Les modifications sur la position 9 de l'adénine ont abouti à une large série de composés de la famille I. Le composé **GPinh-5a** présente un fort pouvoir inhibiteur, avec l'IC_{50} la plus basse de toutes celles des inhibiteurs connus de CFTR. Il sera difficile de mettre en évidence un inhibiteur plus puissant.

Peu de nouveaux composés ont montré une activité potentiatrice. Un nouveau potentiateur **74a** issus d'un dérivé de l'adénine modifiée en position 9 a été mis en évidence avec une EC_{50} du même ordre de grandeur que celle de **GPact-11a**.

Lors de l'évaluation des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en position 8 et/ou 9 en tant que modulateurs de CFTR, l'augmentation de l'efflux d'ions iodures obtenue avec la forskoline seule a été plus faible que celle qui était habituellement trouvée lors de ces tests ce qui indique une mauvaise réponse des cellules à la stimulation du canal CFTR. Les résultats de cette évaluation doivent donc être interprétés avec précaution et cette évaluation devra être réalisée à nouveau.

L'évaluation en tant que potentiateur des adduits MG-dérivé de l'adénine modifiée en position 8 et/ou 9 a permis la mise en évidence d'un composé actif **98a** possédant une EC_{50}

dix fois plus élevée que celle de **GPact-11a**. Ces adduits **98a** sont issus d'un dérivé de l'adénine modifiée uniquement en position 8, il sera donc intéressant de synthétiser les adduits MG-8-mercapto-9-propyladénine **113a** et d'évaluer leur activité. En effet, ce composé représenté sur la figure 88 possède des caractéristiques de **GPact-11a** (groupement propyle en position 9) et du nouveau potentiateur **98a** (groupe SH en position 8).

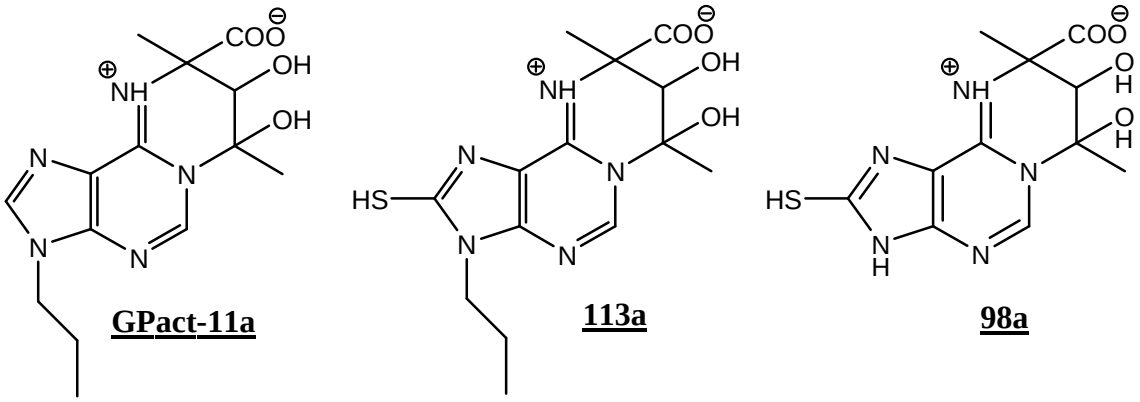


Figure 88 : Structures de **GPact-11a**, du potentiateur mis en évidence **98a** et de **114a**

L'évaluation des adduits du MG sur des adénines modifiées en positions 2 et 9 permettra d'évaluer l'influence de cette substitution.

4. Discussion sur le mode d'action des composés potentiateurs/activateurs et inhibiteurs

Le mode d'action des modulateurs développés au laboratoire n'est pas connu. Cependant, nous pouvons élaborer des hypothèses concernant :

- leur type d'effets sur CFTR : directs ou indirects ;
- leur mécanisme d'action : compétitif et opposé pour les activateurs et les inhibiteurs ou deux mécanismes différents ;
- leur(s) site(s) d'action(s) : unique ou multiples ;
- la localisation de leur site de fixation éventuel sur CFTR.

4.1. Effet direct ou indirect

Comme nous l'avons vu lors de l'introduction de ce travail, les modulateurs de CFTR peuvent agir de deux manières différentes : soit directement par fixation sur la protéine, soit indirectement par l'intermédiaire de second messager et notamment du système AMPc.

Plusieurs arguments sont en faveur d'un effet par fixation directe sur la protéine CFTR des composés des familles I et II.

Tout d'abord, la mise en évidence d'une activation de CFTR indépendamment d'une préstimulation par la fsk suggère une indépendance de ces deux modes de stimulation.

En outre, la rapidité d'action et de réversibilité de cette action observée lors des expériences de « patch clamp » est peu compatible avec un effet indirect. En effet, dans le cas d'une modulation par l'intermédiaire d'un second messager, on observerait probablement un retard plus important de la modulation.

De plus, l'absence de toxicité ou d'action sur les autres cibles évaluées (ABC, autres canaux) des composés actifs, même à des concentrations très supérieures aux IC_{50} ou EC_{50}, montre une sélectivité d'action sur CFTR peu compatible avec une action via un second messager ubiquitaire. Ceci est confirmé par l'inactivité de GPact-11a sur les souris inactivées pour le gène codant pour CFTR.

4.2. Site(s) d'action

Les composés actifs appartiennent à trois classes chimiques différentes : la bétaïne et ses dérivés, les produits de la famille I et les produits de la famille II auxquels il faut rajouter la 7-méthylguanosine **25** qui n'appartient à aucune des classes précédentes.

De plus, nous avons identifié à la fois des inhibiteurs et des activateurs/potentiateurs de CFTR parmi ces molécules.

Ces modulateurs de structures chimiques et d'actions différentes possèdent-ils le même site d'action ? Les composés des familles I et II sont chimiquement voisins : ce sont des hétérocycles assez volumineux présents sous forme zwitterionique à pH physiologique. On peut donc envisager un site d'action identique pour ces deux types de molécules. Par contre, pour la bétaïne et ses dérivéss tout comme pour la 7-méthylguanosine, il est difficile de tirer des conclusions à partir de la structure chimique de ces composés.

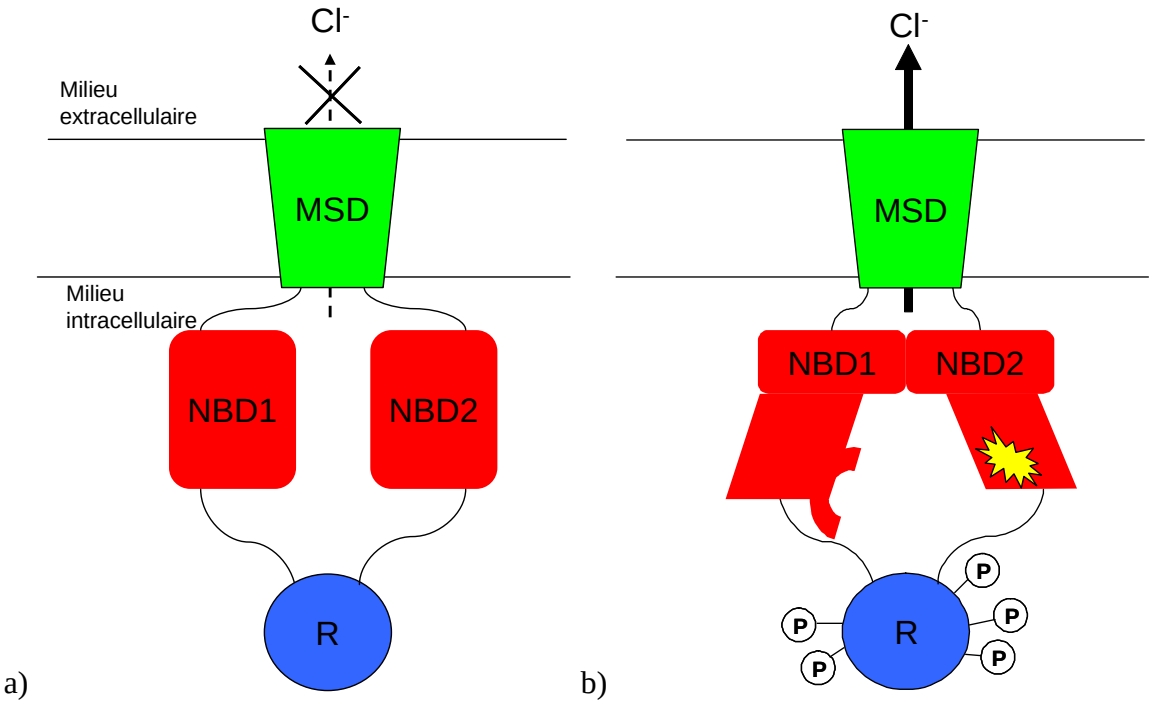
On peut également noter que **GPact-11a** et **GPinh-5a** ont une structure chimique très proche. Le meilleur inhibiteur et le meilleur activateur/potentiateur possèdent le même environnement chimique à proximité du pharmacophore supposé. Il est donc fort propable qu'ils peuvent se lier sur le même site et y entraîner deux actions opposées.

Par ailleurs, on observe une baisse voire une abolition de l'action des modulateurs les plus actifs sur la protéine CFTR portant la mutation G551D. Cette baisse d'activité concernant les inhibiteurs n'est probablement pas due à la difficulté d'activation particuliére retrouvée dans cette protéine mutée, mais est plus vraisemblablement liée à une modification défavorable du site de liaison des modulateurs sur CFTR. Il serait donc intéressant de tester la bétaïne et ses dérivés sur la mutation G551D afin d'évaluer si ces composés agissent de la même manière que les produits des familles I et II.

4.3. Hypothèses

En nous basant sur les informations rappelées dans les deux paragraphes précédents, nous pouvons proposer une hypothèse de fonctionnement des modulateurs de CFTR mis en évidence (à l'exception de la bétaïne et de ses dérivés pour lesquels nous ne disposons pas d'informations suffisantes).

L'hypothèse proposée est celle d'un effet direct sur CFTR par l'intermédiaire d'un site d'action unique. Sur ce site, les composés des deux familles, ce qui inclut donc à la fois des inhibiteurs et des activateurs/potentiateurs, et éventuellement la 7-méthylguanosine, seraient capables de se fixer. Les composés actifs interagiraient avec CFTR principalement par l'intermédiaire de la zone contenant le pharmacophore. Pour les produits de la famille I, cela correspond au cycle à 6 atomes formé par l'addition des deux molécules de MG. Ce site de fixation se situerait sur le domaine NBD1 de CFTR à proximité de la glycine 551. Les activateurs/potentiateurs permettraient après fixation, une stabilisation de la forme ouverte du canal CFTR alors que les inhibiteurs déstabiliseraient cette forme ouverte aboutissant à la fermeture du canal. Cette hypothèse de fonctionnement est schématisée sur la figure 89.



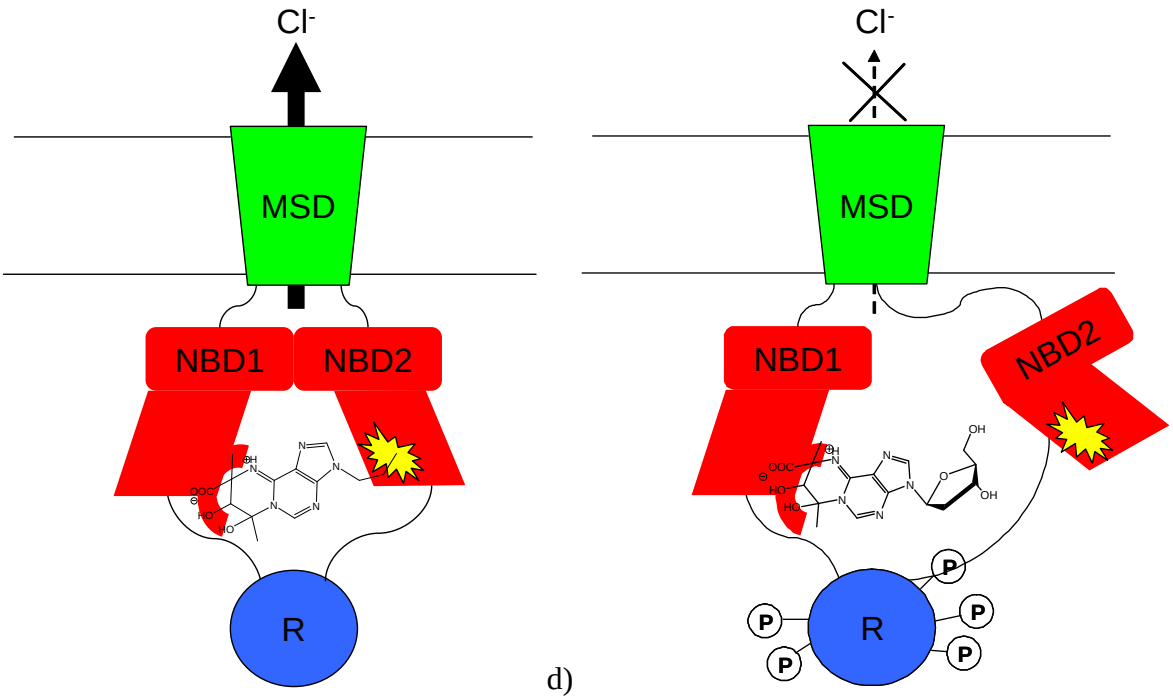


Figure 89 : Hypothèse de modulation de CFTR par les inhibiteurs et activateurs/potentiateurs mis en évidence

a) Le canal CFTR se trouve sous forme fermée ;

b) Après phosphorylation et association des NBD, le canal s'ouvre permettant la sortie d'ions chlorures ;

c) Le composé **GPact-11a** est associé à CFTR. Le cycle à 6 atomes contenant le pharmacophore supposé interagit avec NBD1 à proximité de la glycine 551, alors que la chaîne propyle est liée à un site hydrophobe sur NBD2 stabilisant de ce fait l'interaction entre les deux NBD. Cette stabilisation accroît le temps d'ouverture du canal favorisant la sortie d'ions chlorures ;

d) Le composé **GPinh-5a** est associé à CFTR. Le cycle à 6 atomes contenant le pharmacophore interagit avec NBD1 à proximité de la glycine 551, alors que le groupement désoxyribosyle repousse le même site sur NBD2 déstabilisant de ce fait l'interaction entre les deux NBD, ce qui entraîne la fermeture du canal. En effet, ce site étant hydrophobe, des interactions avec le 2'-désoxyribose ne sont probablement pas possibles.

Conclusion et Perspectives

A la suite de la découverte au laboratoire d'une nouvelle réaction entre le méthylglyoxal et un α-aminoazahétérocycle, des modulateurs de la protéine CFTR ont été mis en évidence. Parmi ces composés actifs, deux « chefs de files » appartenant à la même famille de composés (famille I) ont été identifiés et étudiés : un inhibiteur **GPinh-5a** et un potentiateur/activateur **GPact-11a** (Figure 90).

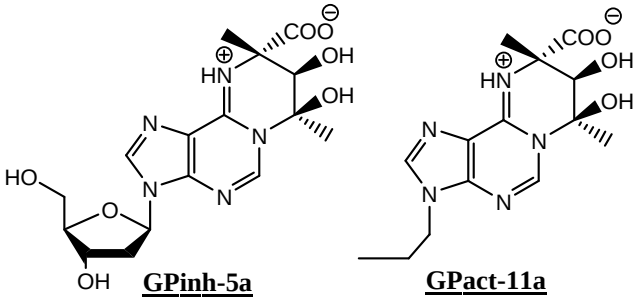


Figure 90 : Structures de deux modulateurs de la protéine CFTR mis en évidence : l'inhibiteur **GPinh-5a** et le potentiateur/activateur **GPact-11a**

Nous avons, tout d'abord cherché, à confirmer la structure du pharmacophore supposé. Deux directions de recherche ont été développées dans ce but.

Nous avons dans un premier temps sélectionné et évalué des petites molécules contenant le pharmacophore supposé. Les résultats de cette évaluation biologique ont ainsi mis en évidence plusieurs inhibiteurs de la protéine CFTR et ont donc permis de confirmer la structure du pharmacophore représentée sur la figure 91.

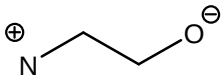


Figure 91 : Structure du pharmacophore

Toutefois, cet élément de structure qui est nécessaire pour observer une activité sur CFTR, n'est pas suffisant puisque toutes les molécules portant ce pharmacophore n'ont pas été trouvées actives.

L'autre direction de recherche développée concernant le pharmacophore a consisté en une modification des structures de base des composés de la famille I. Une de ces

modifications a été basée sur l'utilisation d'un autre α-oxoaldéhyde. En effet, lors de travaux antérieurs, un exemple de composé issu de la réaction entre l'éthylglyoxal et la 2-aminopyridine avait été obtenu. Au cours de ce travail, nous avons décrit et généralisé la réaction entre l'EG et des α-aminoazahétérocycles qui permet l'accès à d'autres composés contenant le pharmacophore supposé.

Par ailleurs, des modifications des composés de la famille I ont également permis l'accès à plusieurs représentants d'une autre famille (II) qui, là encore, comporte dans sa structure de base le pharmacophore supposé (Figure 92).

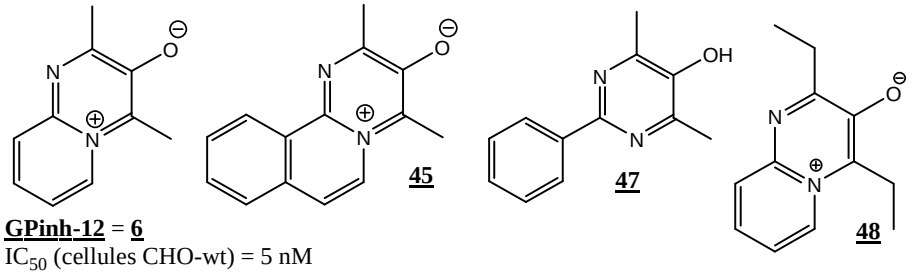


Figure 92 : Structures des quatre composés de la famille II

Enfin, les dernières modifications réalisées autour du pharmacophore ont conduit à la mise en évidence d'une troisième famille de composés obtenus par décarboxylation des composés de la famille I. Dans ce cas, les hétérocycles obtenus ne contiennent plus l'élément de structure correspondant au pharmacophore. Les résultats négatifs obtenus lors de l'évaluation du composé **53** issu de l'activateur **GPact-11a** ont donc permis de confirmer la nécessaire présence de cet élément de structure pour observer une activité sur la protéine CFTR (Figure 93).

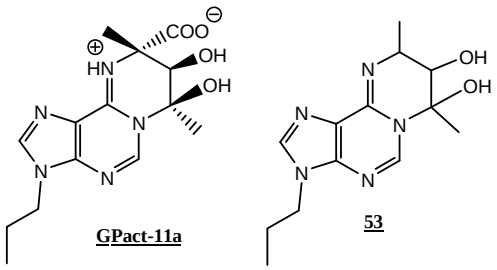


Figure 93 : Structure du composé de la famille III **53** issu de l'activateur **GPact-11a**

Des études menées avec les composés des familles I et III ont permis d'explorer la réactivité de ces composés (Schéma 47). Ainsi, des hypothèses concernant le mécanisme de formation des composés de la famille III ont pu être proposées.

Toutefois, les réactions menant aux familles II et III n'ont pas un caractère totalement généralisable. En effet, les produits de la famille I n'aboutissent pas tous aux mêmes types de produits dans les mêmes conditions réactionnelles.

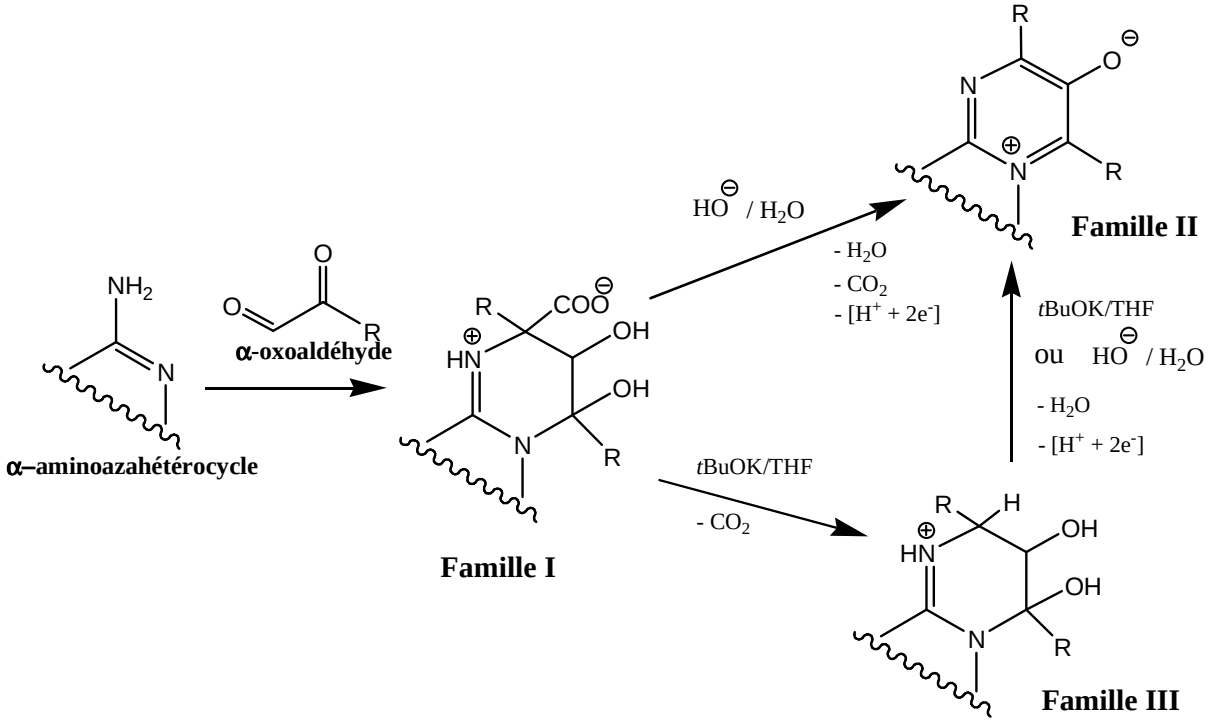


Schéma 47 : Réactions mises en évidence menant aux composés des trois familles

L'évaluation des composés préparés en tant que modulateurs de la protéine CFTR a permis la mise en évidence de nouveaux inhibiteurs de cette protéine comme la 7-méthylguanosine **25** (Figure 94) qui présente une IC_{50} de 3,5 µM sur cellules CHO-wt. Toutefois, aucun de ces nouveaux inhibiteurs ne présentent une activité supérieure à celle de **GPinh-5a** ce qui est a priori difficile (IC_{50} sur cellules CHO-wt = 71 pM).

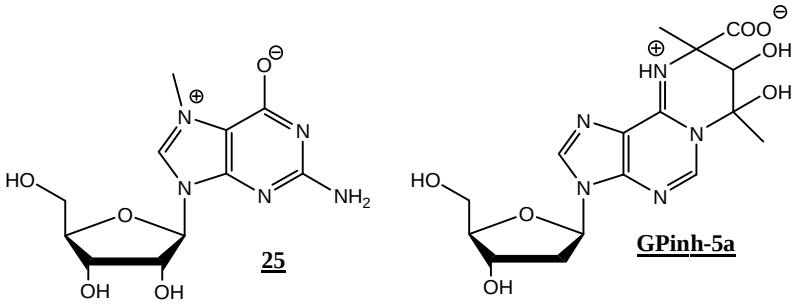


Figure 94 : Structures de la 7-méthylguanosine **25** et de **GPinh-5a**

Par ailleurs, en nous basant sur la structure des deux « chefs de files », l'inhibiteur **GPinh-5a** et le potentiateur/activateur **GPact-11a**, nous avons effectué des modulations chimiques sur le noyau hétérocyclique adénine commun à ces deux composés pour établir des

relations structure-activité et ainsi tenter d'aboutir à une amélioration de l'activité de ces composés (Schéma 48).

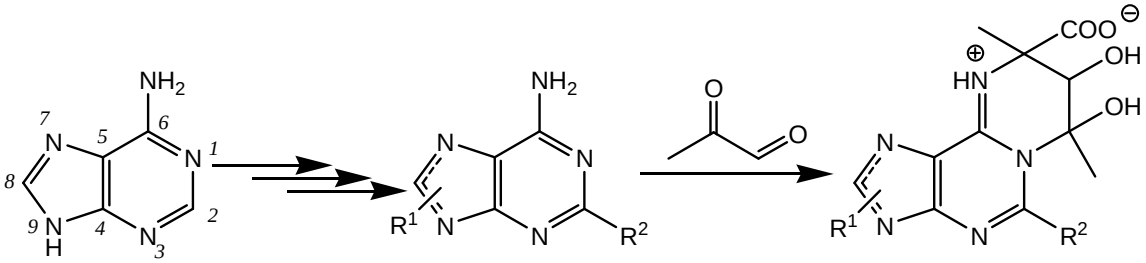


Schéma 48 : Modulations chimiques de **GPinh-5a** et **GPact-11a** par réaction du méthylglyoxal avec des dérivés de l'adénine modifiée en position 9 ou 7 et/ou 8 et/ou 2

Un grand nombre d'analogues de **GPinh-5a** et **GPact-11a** ont été synthétisés. De nouveaux inhibiteurs et deux nouveaux potentiateurs des canaux CFTR ont ainsi été mis en évidence. L'un d'entre eux **74a**, qui a présenté une EC_{50} de l'ordre du micromolaire lors de tests cellulaires (cellules CHO-wt), possède une structure très proche de celle de **GPact-11a**. L'autre potentiateur mis en évidence **98a**, est issu d'un dérivé de l'adénine modifiée sur une position différente de celle des deux autres potentiateurs (Figure 95). Les modifications sur la purine permettant de conserver une potentialisation de la protéine CFTR sont donc extrêmement limitées.

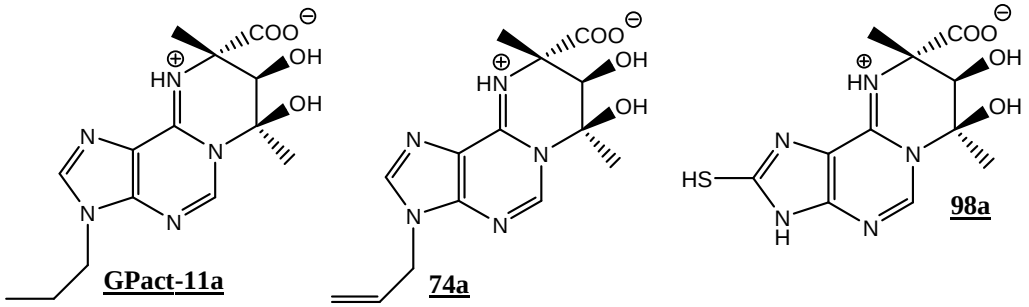


Figure 95 : Structures des activateurs **GPact-11a**, **74a** et **99a**

Après vérification de l'absence de toxicité de ce dérivé **98a**, de nouvelles synthèses pourront être envisagées de façon à combiner les caractéristiques de ces différents potentiateurs.

Des tests d'évaluation des caractéristiques physico-chimiques ou d'activité biologique ont été effectués avec les principaux modulateurs mis en évidence dont **GPinh-5a** et **GPact-11a**. Les résultats des tests ADMET (administration, distribution, métabolisation, élimination

et toxicité) permettent d'envisager un développement ultérieur de l'ensemble de ces composés, à l'exception du produit de la famille II **GPinh-12** = **6** issu de la 2-aminopyridine.

En effet, **6** a présenté un effet génotoxique, ce qui exclut donc son utilisation en tant qu'agent thérapeutique. Cette toxicité est probablement présente chez tous les produits de la famille II qui possèdent des structures voisines aromatiques planes probablement intercalantes de l'ADN (Figure 92).

L'activateur/potentiateur **GPact-11a** a présenté un effet particulier lors d'un test de franchissement de membranes épithéliales. Il présente une perméabilité supérieure dans le sens basolatéral vers apical par rapport au sens inverse. Il faudra donc vérifier si cet effet n'est pas dû à l'activation d'un transporteur assurant un efflux du composé vers l'extérieur de la cellule.

Plusieurs inhibiteurs mis en évidence ont été évalués sur différentes mutations de la protéine CFTR, ce qui a permis de proposer une hypothèse concernant leur mode d'action.

L'activateur **GPact-11a** n'a pas présenté d'effet sur trois mutations de classe III (G551D, G1349D et mutation 2GD). Ces trois mutations perturbent la liaison de l'ATP aux domaines NBD 1 et/ou 2. Il serait donc intéressant d'évaluer **GPact-11a** sur d'autres mutations de cette classe afin de comprendre si cette inactivité est générale ou non dans la classe III.

Les études sur la structure du pharmacophore et la pharmacomodulation des composés actifs ont abouti à des résultats très encourageants.

En effet, nous disposons d'un inhibiteur de CFTR, GPinh-5a, qui est non toxique, puissant, sélectif, hydrosoluble, actif in vivo et dont la synthèse est aisée.

Par ailleurs, GPact-11a présente des caractéristiques de même type qui sont également prometteuses. Il a présenté une action activatrice sur tissu et il est potentiateur in vivo.

Les études de ces composés ainsi que celles de leurs analogues les plus actifs doivent donc être poursuivies dans le but d'aboutir à une utilisation thérapeutique.

Les différents tests biologiques effectués ont apporté beaucoup d'informations sur le pharmacophore et sur le mode d'action des composés, cependant nous n'avons pas de certitudes concernant ce dernier. En parallèle à la poursuite de la recherche de composés plus actifs, les travaux suivants devront donc permettre de disposer de davantage d'informations sur le mode d'action de ces composés.

D'un point de vue chimique, la poursuite de la simplification structurale autour du pharmacophore pourrait permettre de continuer à définir les groupements favorables ou défavorables à l'activité. De plus, en réalisant la synthèse de molécules actives de façon stéréocontrôlée, il devrait être envisageable d'affiner les relations structure-activité concernant le pharmacophore.

Une méthode d'obtention possible de composés présentant ces caractéristiques est représentée sur le schéma 49.

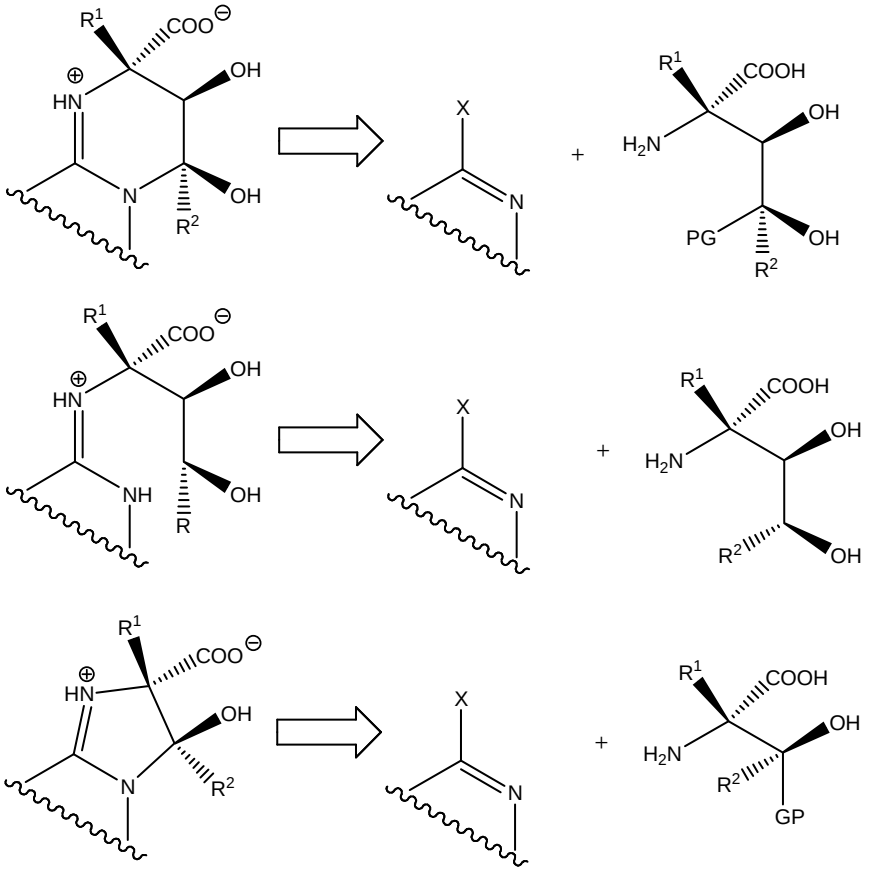


Schéma 49 : Voie d'accès à des analogues des composés actifs

Cette synthèse, basée sur la réaction d'acides α-aminés sous forme d'un seul énantiomère avec des α-halogénoazahétérocycles (6-chloropurines), pourrait permettre d'aboutir à des analogues des composés de la famille I. De nombreux acides α-aminés

fonctionnalisés sont disponibles commercialement ou peuvent facilement être synthétisé, permettant l'accès à des séries différentes de composés.

D'autre part, la 7-méthylguanosine **25** ayant été identifiée en tant qu'inhibiteur de la protéine CFTR, des modifications chimiques, notamment du sucre, pourront être réalisées. En effet, la 7-méthylguanosine **25** peut être considéree comme le « chef de file » d'une nouvelle famille de modulateurs.

Par ailleurs, la construction récente de modèles en trois dimensions de différents domaines de la protéine CFTR par les équipes d'Isabelle Callebaut et de Pierre Lehn (Mornon, 2008) va permettre la réalisation d'études de « docking » entre les composés actifs et les modèles des canaux CFTR. Ces évaluations in silico peuvent aboutir à l'identification d'un site de liaison des molécules sur la protéine CFTR et donc à l'amélioration de l'affinité de ces composés pour les sites d'interaction identifiés.

Il serait également intéressant d'essayer de repérer les couples d'acides aminés portant des charges opposées à pH physiologique se trouvant, dans les modèles en trois dimensions, à une distance compatible avec une interaction entre leurs groupements chargés et les charges du pharmacophore portées par les composés actifs.

Par ailleurs, une évaluation de **GPact-11a** sur la mutation ΔF508, après correction par la température ou par des correcteurs comme le miglustat, apparaît particulièrement importante à réaliser. En effet, ce composé pourrait, dans le cas d'une activité sur cette mutation, être utilisé en complément d'un correcteur avec lequel il agirait en synergie pour restaurer l'efflux d'ions chlorures de la cellule.

De nombreuses autres évaluations biologiques devraient être effectuées pour identifier le mode et le site d'action de ces composés, comme, par exemple, des études de mutagenèse dirigée ou des tests de compétition avec l'ATP.

Partie expérimentale

1. Généralités

1.1. Chromatographies

Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 0,060-0,200 mm 60 Å de chez Acros.

Les chromatographies sur colonne de phase inverse ont été effectuées sur mini colonne de phase inverse sur gel chromabond® Sorbenz C8 end-capped, C18 non end-capped et C18 end-capped de chez Magerey-Nagel.

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées avec des plaques de silice déposée sur feuille d'aluminium (Alugram® Sil G/UV_{254} de chez Magerey-Nagel). Les plaques sont révélées à 254 nm.

1.2. Points de fusion

Les points de fusion ont été mesurés en tube capillaire sur un appareil Buchi 535 et ne sont pas corrigés.

1.3. Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres ont été enregistrés sur un appareil Bruker Avance 400 (400 MHz pour le proton, 100 MHz pour le carbone) à 21 °C.

Les abréviations ont la signification suivante : δ : déplacement chimique en ppm, J : constante de couplage en Hz, s : singulet, sl : singulet large, d : doublet, t : triplet, dd : doublet de doublet, sext : sextuplet, m : multiplet.

NB : Les spectres de RMN ^{13}C des produits de la famille I issus de dérivés de l'adénine modifiée présentent généralement plusieurs signaux très mal définis autour de 150 ppm. Ces signaux correspondent aux atomes de carbone quaternaires issus des atomes de carbone

quaternaires de l'adénine. Fréquemment ces signaux sont trop faiblement résolus pour les attribuer tous et ainsi décrire l'ensemble des atomes de carbone quaternaires.

1.4. Spectrométrie de masse basse résolution

Les spectres de masse ont été enregistrés au Centre d'Etudes et de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) à Grenoble par la technique Fast Atom Bombardment (FAB) en mode positif, par ionisation électronique (EI) ou par électrospray (ESI).

1.5. Spectrométrie de masse haute résolution et analyse élémentaire

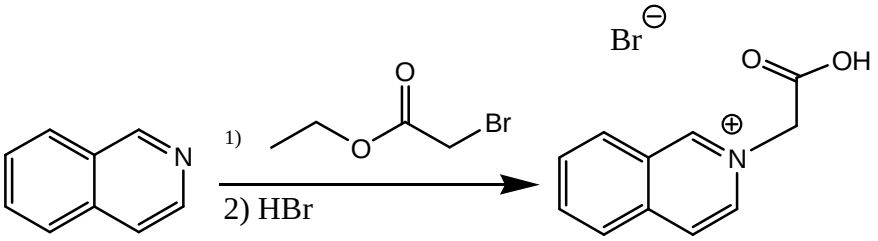
Les spectres de masse haute résolution et les analyses élémentaires (microanalyses) ont été enregistrés au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest à Rennes.

1.6. Solvants

Les solvants ont été utilisés sans purification à l'exception du DCM, qui a été distillé avant usage et lorsque des conditions anhydres étaient requises. Dans ce dernier cas, les solvants ont été distillés puis stockés sur tamis moléculaire.

2. Chapitre 1

Formation du bromure de 2-(2-carboxyéthyl)isoquinolinium 24



24

Mode opératoire :

A de l'isoquinoléine (1,0 mL ; 7,74 mmol) en solution dans l'éthanol à 95 % (1 mL) est ajouté du bromoacétate d'éthyle (1,1 mL ; 9,67 mmol). Ce mélange est agité pendant 3 h. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est soumis à une extraction DCM (20 mL) / H_2O (20 mL). La phase aqueuse est évaporée sous pression réduite puis le solide résiduel est soumis à une hydrolyse dans une solution aqueuse d'acide bromhydrique (48 %) (10 mL). Après évaporation sous pression réduite, le résidu est dissous dans l'eau puis soumis à réévaporatin. Cette opération est reproduite trois fois pour éliminer l'acide bromhydrique en excès. Le bromure de 2-(2-carboxyéthyl)isoquinolinium **24** se présente sous forme d'une poudre brune (bromhydrate : 1,28 g ; 4,77 mmol ; Rdt = 62 %).

Analyses :

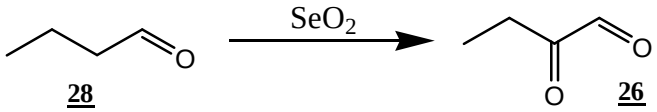
F : 206-220 °C (décomposition).

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 9,53 (1H ; s ; CH) ; 8,33-8,28 (3H ; m ; CH) ; 8,15-8,08 (2H ; m ; CH) ; 7,94-7,90 (1H ; m ; CH) ; 5, 35 (2H ; s ; CH_2).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 169,5 (C_{IV}) ; 150,6 (CH) ; 143.3 (C_{IV}) ; 137,6 (CH) ; 135,0 (CH) ; 131,4 (CH) ; 130,3 (CH) ; 127,3 (C_{IV}) ; 127,1 (CH) ; 126,0 (CH) ; 61,1 (CH_2).

SM : *(FAB [+], glycérol)* : *m/z* 188 ($[M]^+$).

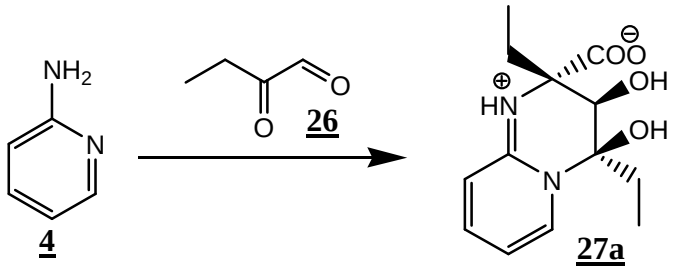
Formation de l'EG 26



Mode opératoire : (Gi, 1995)

Du dioxyde de sélénium (24,6 g ; 222 mmol) est ajouté à du butanal **28** (20 mL ; 222 mmol). Cette suspension est agitée à 60 °C sous argon jusqu'à disparition du dioxyde de sélénium et apparition d'un précipité noir de sélénium. Après filtration du précipité, le filtrat est soumis à une distillation sous pression réduite. Les fractions de distillation contiennent l'EG **26**.

Formation de 27a



Mode opératoire :

A une solution d'aminopyridine **4** (1,0 g ; 10,6 mmol) dans l'eau (10 mL) est ajouté de l'EG **26** (4,1 g ; 47,6 mmol). Cette solution est agitée sous argon à 60 °C pendant 10 h. Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à deux chromatographies sur phase inverse C_{18} en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de méthanol (MeOH). On obtient le mélange majoritaire d'énantiomères **27a** (650 mg ; 2,4 mmol ; Rdt = 23 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : 152-154 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,16 (1H ; d ; J = 7,2 ; CH) ; 7,75 (1H ; t ; J = 8,4 ; CH) ; 7,05 (1H ; d ; J = 8,4 ; CH) ; 6,89 (1H ; t; J = 7,2 ; CH) ; 4,55 (1H ; s ; CH) ; 1,95 (1H ; m ; CH_2) ; 1,82 (3H ; m ; CH_2) ; 0,97 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3) ; 0,91 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 176,2 (COOH) ; 149,5 (C_{IV}) ; 142,0 (CH) ; 133,1 (CH) ; 114,5 (CH) ; 113,0 (CH) ; 91,2 (C_{IV}) ; 68,9 (CH) ; 66,0 (C_{IV}) ; 30,1 (CH_2) ; 29,1 (CH_2) ; 7,3 (CH_3) ; 6,4 (CH_3).

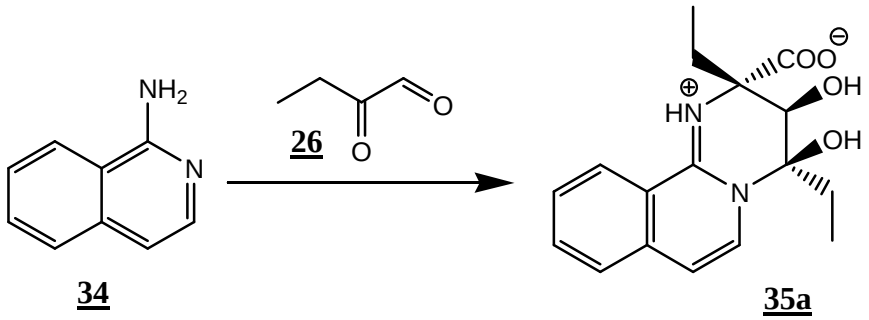
SM : *(FAB [+], glycérol)* : *m/z* 267 ($[M+H]^+$)

SMHR : *(EI)* : $C_{13}H_{19}N_2O_5$:	$[M + H]^+$	Requis	*m/z*	267,13448
		Expérimental	*m/z*	267,1345
	$[M + Na]^+$	Requis	*m/z*	289,11643
		Expérimental	*m/z*	289,1157

Analyse élémentaire : $C_{13}H_{18}N_2O_4$, 0,5 H_2O

	C	H	N
Valeurs théoriques (%)	56,72	6,96	10,18
Valeurs expérimentales (%)	56,79	6,71	10,37

Formation de 35a



Mode opératoire :

A une solution d'aminoisoquinoléine **34** (1,19 g ; 8,3 mmol) dans l'éthanol (20 mL) est ajouté de l'EG **26** (4,2 g ; 48,8 mmol). Cette solution est agitée sous argon à 60 °C pendant 12 h. Lors du refroidissement à température ambiante, il se forme un précipité qui est filtré puis

lavé à l'éther diéthylique. On obtient le mélange majoritaire d'énantiomères **35a** (509 mg ; 1,6 mmol ; Rdt = 21 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : 115-116 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,06 (1H ; d ; J = 8,0 ; CH) ; 7,82 (1H ; t ; J = 8,0 ; CH) ; 7,71 (2H ; m ; CH) ; 7,60 (1H ; m ; CH) ; 7,05 (1H ; d ; J = 8,0 ; CH) ; 2,38 (2H ; m ; CH_2) ; 2,26 (1H ; m ; CH_2) ; 1,86 (1H ; m ; CH_2) ; 0,85 (3H ; t ; J = 8,0 ; CH_3) ; 0,77 (3H ; m ; CH_3).

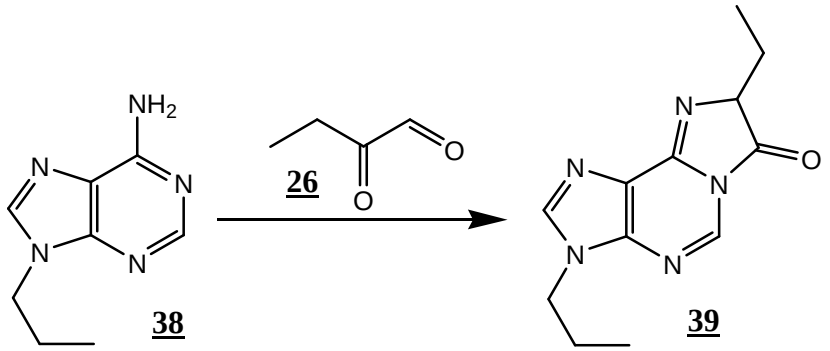
^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 176,5 (COOH) ; 148,6 (C_{IV}) ; 135,8 (CH) ; 134,7 (C_{IV}) ; 129,2 (CH) ; 127,7 (CH) ; 125,1 (CH) ; 124,2 (CH) ; 117,7 (C_{IV}) ; 112,8 (CH) ; 91,0 (C_{IV}) ; 68,4 (C_{IV}) ; 66,6 (CH) ; 30,1 (CH_2) ; 29,3 (CH_2) ; 7,8 (CH_3) ; 6,8 (CH_3).

SM : *(FAB [+], glycérol)* : *m/z* 289 ($[M+H]^+$)

Analyse élémentaire : $C_{17}H_{19}N_2O_4$, H_2O

	C	H	N
Valeurs théoriques (%)	61,07	6,63	8,38
Valeurs expérimentales (%)	60,98	6,81	8,25

Formation de 39



Mode opératoire :

A une solution de 9-propyladénine **38** (200 mg ; 1,13 mmol) dans l'eau (5 mL) est ajouté de l'éthylglyoxal **26**. Cette solution est agitée sous argon à 60 °C pendant 4 h. Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à une chromatographie sur phase inverse C_8 en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de MeOH. On obtient le composé **39** (92 mg ; 0,38 mmol ; Rdt = 33 %) qui se présente sous forme d'une huile jaune pale

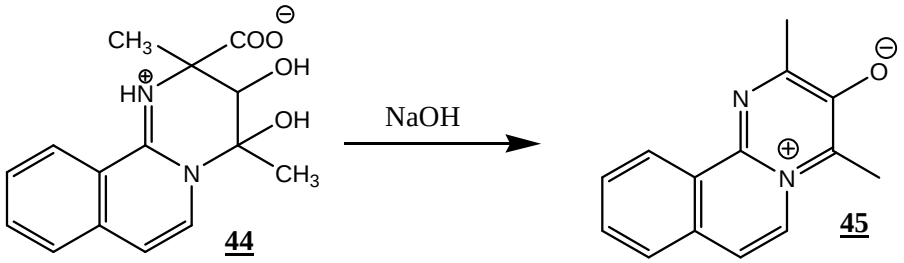
Analyses :

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,27 (1H ; s ; CH) ; 8,22 (1H ; s ; CH) ; 4,92 (1H ; sl ; CH) ; 4,18 (2H ; t ; J = 6,8 ; CH_2) ; 2,06-1,93 (2H ; m ; CH_2) ; 1,83 (2H ; sext ; J = 6,8 ; CH_2) ; 1,02 (3H ; t ; J = 6,8 ; CH_3) ; 0,85 (3H ; t ; J = 6,8 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 176,8 (CO-N) ; 148,8 (CH) ; 147,5 (C_{IV}) ; 143,0 (CH) ; 118,1 (C_{IV}) ; 57,1 (CH) ; 46,0 (CH_2) ; 24,8 (CH_2) ; 22,7 (CH_2) ; 10,2 (CH_3) ; 9,3 (CH_3).

SM : (ESI [+]) : m/z 246 ($[M+H]^+$)

Formation de 45



Mode opératoire :

Le mélange d'adduits du MG sur la 2-aminoisoquinoléine **GPinh-8ab** = **44ab** (200 mg ; 0,63 mmol) est agité pendant 3 h dans 3 mL d'hydroxyde de sodium (2 M). Le milieu réactionnel est neutralisé par ajout d'acide phosphorique (30 % dans l'eau) puis extrait par 3 fois 10 mL de dichlorométhane. Après évaporation, le résidu est chromatographié sur colonne de silice en éluant avec un mélange DCM:MeOH (95:5). On obtient ainsi le composé **45** (14 mg ; 0,06 mmol ; Rdt = 10 %) qui se présente sous la forme d'une huile jaune clair.

Analyses :

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; CD_3OD)* δ_H : 8,73 (1H ; m ; CH) ; 8,14 (1H ; d ; J = 7,6 ; CH) ; 7,79 (1H ; m ; CH) ; 7,71 (3H ; m ; CH) ; 2,67 (3H ; s ; CH_3) ; 2,63 (3H ; s ; CH_3).

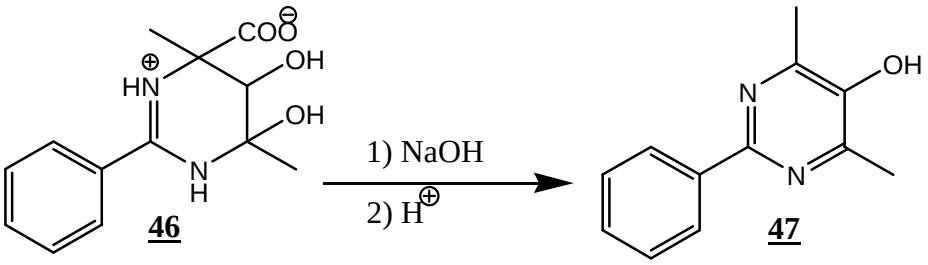
^{13}C : *(100 MHz ; CD_3OD)* δ_C : 166,3 (C_{IV}) ; 160,0 (C_{IV}) ; 136,6 (C_{IV}) ; 136,4 (C_{IV}) ; 132,1 (CH) ; 131,1 (CH) ; 130,8 (C_{IV}) ; 128,0 (CH) ; 128,0 (C_{IV}) ; 126,4 (CH) ; 125,4 (CH) ; 122,6 (CH) ; 22,0 (CH_3) ; 12,3 (CH_3).

SMHR : *(EI)* : $C_{14}H_{12}N_2O$: $[M]^+$ Requis *m/z* 224,0950
Expérimental *m/z* 224,0947

Analyse élémentaire : $C_{14}H_{12}N_2O$, 1/2 H_2O

	C	H	N
Valeurs théoriques (%)	69,86	6,06	11,24
Valeurs expérimentales (%)	69,84	5,81	11,37

Formation de 47



Mode opératoire :

Le mélange d'adduits du méthylglyoxal sur la benzamidine **46** (100 mg ; 0,38 mmol) est agité à 50 °C pendant 3 h dans 20 mL d'hydroxyde de sodium (1 M). Après refroidissement, le milieu réactionnel est neutralisé par ajout d'acide chlorhydrique (1 M). Après évaporation, le résidu est dissous dans du DCM puis chromatographié sur colonne de silice en éluant avec un mélange de DCM:MeOH (95:5). On obtient ainsi le composé **47** (30 mg ; 0,15 mmol ; Rdt = 39 %) qui se présente sous la forme d'un solide blanc.

Analyses :

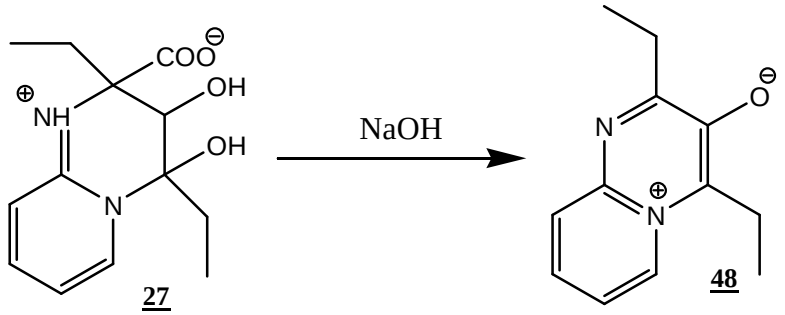
F : 142 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 8,27 (2H ; m ; CH) ; 7,45-7,27 (3H ; m ; CH) ; 2,50 (6H ; s ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; $CDCl_3$)* δ_C : 156,7 (C_{IV}) ; 153,0 (C_{IV}) ; 146,0 (C_{IV}) ; 138,0 (C_{IV}) ; 129,7 (CH) ; 128,6 (CH) ; 127,8 (CH) ; 18,8 (CH_3).

SM : *(FAB [+], glycérol)* : *m/z* 201 ($[M+H]^+$)

Formation de 48



27 **48**

Mode opératoire :

Le mélange d'adduits de l'EG sur la 2-aminopyridine **27** (50 mg ; 0,19 mmol) est agité pendant 6 h dans 25 mL de NaOH (1 M). Le milieu réactionnel est neutralisé par ajout d'acide chlorhydrique (1 M) puis évaporé à sec. Le résidu d'évaporation est dessalé sur phase inverse C_{18}, on obtient ainsi le composé **48** (21 mg ; 0,10 mmol ; Rdt = 55 %) qui se présente sous la forme d'une huile jaune clair.

Analyses :

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; CD_3OD)* δ_H : 8,68 (1H ; d ; J = 6,8 ; CH) ; 8,05 (1H ; d ; J = 8,4 ; CH) ; 7,80 (1H ; m ; CH) ; 7,66 (1H ; m ; CH) ; 3,38 (2H ; m ; CH_2) ; 3,08 (2H ; m ; CH_2) ; 1,39 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3) ; 1,31 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

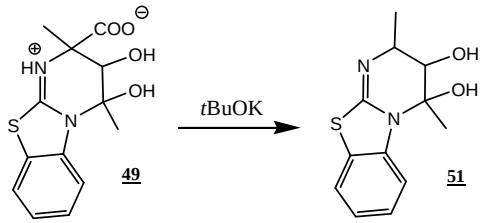
^{13}C : *(100 MHz ; CD_3OD)* δ_C : 170,8 (C_{IV}) ; 156,9 (C_{IV}) ; 138,6 (C_{IV}) ; 136,2 (C_{IV}) ; 128,9 (CH) ; 127,4 (CH) ; 127,1 (CH) ; 121,4 (CH) ; 26,2 (CH_2) ; 17,2 (CH_2) ; 9,2 (CH_3) ; 8,0 (CH_3).

SM : *(ESI [+])* : *m/z* 203 ($[M+H]^+$)

Formation des composés de la famille III

Le mélange d'adduits (composés de la famille I) est dissous dans du THF puis du *t*BuOK (1,5 équivalents) est ajouté. Le mélange réactionnel est ensuite agité sous argon.

Formation de 51



Mode opératoire :

m (**49**) =	n (**49**) =	Quantité de THF	Température de réaction (T°C)	Temps de réaction (TR)
200 mg	0,68 mmol	5 mL	à reflux	1 h

Après évaporation sous pression réduite, le mélange d'isomères est séparé du milieu réactionnel par chromatographie sur colonne de silice, en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient le composé **51** constitué d'un mélange d'isomères (70:30) qui se présente sous la forme d'une poudre blanche (29 mg ; 0,12 mmol ; 17 %).

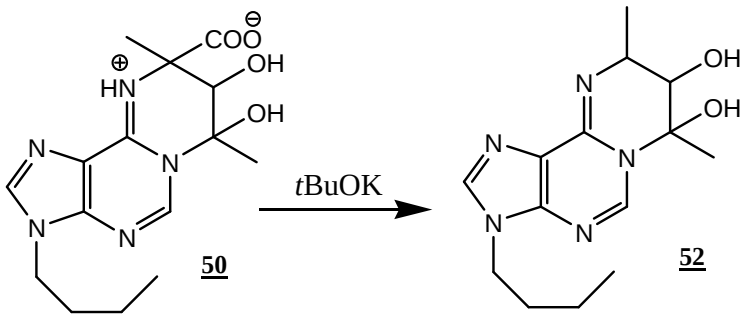
Analyses :

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; CD_3OD)* δ_H : 8,08/8,04 (1H; m ; CH) ; 7,42/7,32 (1H ; m ; CH) ; 6,62/6,54 (1H ; m ; CH) ; 6,45/6,35 (1H ; m ; CH) ; 4,70/4,47 (1H ; m ; CH) ; 4,57 (1H ; sl ; OH) ; 4,35/4,16 (1H ; d ; J = 2,4 ; CH) ; 2,25 (3H ; s ; CH_3) ; 1,38/1,15 (3H ; d ; J = 6,8 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; CD_3OD)* δ_C : 168,5/168,2 (C_{IV}) ; 153,4/153,2 (C_{IV}) ; 132,1/131,6 (C_{IV}) ; 127,0 (CH) ; 122,9 (CH) ; 121,9 (CH) ; 119,2 (CH) ; 119,0 (C_{IV}) ; 80,6/79,9 (CH) ; 53,4/53,2 (CH) ; 26,8/26,7 (CH_3) ; 18,0/14,8 (CH_3).

SM : *(FAB [+], glycérol)* : *m/z* 251 ($[M+H]^+$).

Formation de 52



Mode opératoire :

m (**50**) =	n (**50**) =	Quantité de THF	T°C	TR
100 mg	0,30 mmol	10 mL	à reflux	4 h

Après évaporation sous pression réduite, le mélange d'isomères est séparé du milieu réactionnel par chromatographie sur colonne de silice, en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient le composé **52** constitué d'un mélange d'isomères (65:35) qui se présente sous la forme d'une poudre blanche (12 mg ; 0,04 mmol ; 14 %).

Analyses :

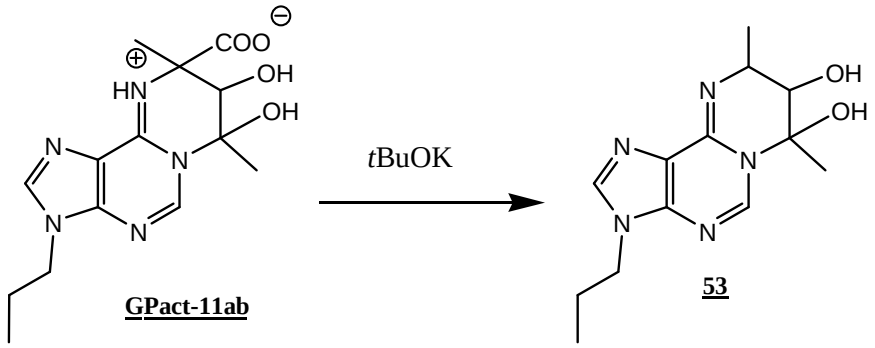
RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 8,42/8,35 (1H ; s ; CH) ; 7,80/7,76 (1H ; s ; CH) ; 6,42/6,05 (1H ; sl ; OH) ; 5,64/5,32 (1H ; m ; CH) ; 4,57/4,27 (1H ; d ; J = 3,2 ; CH) ; 4,23-4,16 (2H ; m ; CH_2) ; 2,36/2,34 (3H ; s ; CH_3) ; 1,90-1,85 (2H ; m ; CH_2) ; 1,49/1,19 (3H ; d ; J = 3,2 ; CH_3) ; 1,40-1,37 (2H ; m ; CH_2) ; 0,99-0,95 (3H ; m ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 208,5 (C_{IV}) ; 153,8 (CH) ; 152,7 (C_{IV}) ; 152,4 (C_{IV}) ; 140,0 (CH) ; 119,7 (C_{IV}) ; 79,8/79,7 (CH) ; 77,2 (CH) ; 43,7 (CH_2) ; 32,1 (CH_2) ; 26,3/25,8 (CH_3) ; 19,9 (CH_2) ; 19,0/14,4 (CH_3) ; 13,5 (CH_3).

SM : *(FAB [+], glycérol)* : *m/z* 292 ($[M+H]^+$)

SMHR : *(ESI)* : $C_{13}H_{19}N_5O_2$: $[M+Na]^+$ Requis *m/z* 300,14364
Expérimental *m/z* 300,1435

Formation de 53



Mode opératoire :

m (**GPact-11ab**) =	n (**GPact-11ab**) =	Quantité de THF	T°C	TR
200 mg	0,62 mmol	5 mL	60 °C	4 h

Après évaporation sous pression réduite, le mélange d'isomères est séparé du milieu réactionnel par chromatographie sur colonne de silice, en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. Après cristallisation dans l'iPrOH, on obtient le composé **53** constitué d'un mélange d'isomères (60:40) se présente sous la forme d'une poudre blanche (64 mg ; 0,23 mmol ; 37 %).

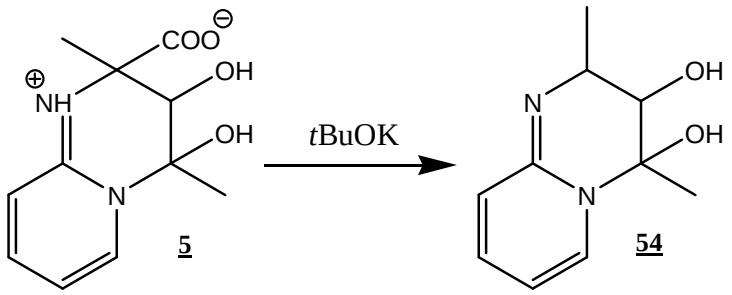
Analyses :

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 8,39-8,32 (1H ; s ; CH) ; 7,81/7,75 (1H ; s ; CH) ; 6,86/6,33 (1H ; sl ; OH) ; 5,14/4,96 (1H ; sl ; CH) ; 4,59/4,26 (1H ; d ; J = 2,0 ; CH) ; 4,16/4,09 (2H ; m ; CH_2) ; 2,32/2,30 (3H ; s ; CH_3) ; 1,95-1,84 (2H ; m ; CH_2) ; 1,46/1,15 (3H ; d ; J = 6,8 ; CH_3) ; 0,97-0,91 (3H ; m ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; $CDCl_3$)* δ_C : 208,6 (C_{IV}) ; 154,1 (C_{IV}) ; 153,1/152,9 (CH) ; 149,5 (C_{IV}) ; 140,2/140,1 (CH) ; 119,8 (C_{IV}) ; 80,1 (CH) ; 48,5/47,6 (CH) ; 45,7 (CH_2) ; 26,4/26,0 (CH_3) ; 23,6 (CH_2) ; 19,1/14,5 (CH_3) ; 11,4 (CH_3).

SMHR : *(ESI)* : $C_{13}H_{19}N_5O_2$: $[M + Na]^+$	Requis	*m/z*	300,14364
	Expérimental	*m/z*	300,1435

Formation de 54



Mode opératoire :

m (**5**) =	n (**5**) =	Quantité de THF	T°C	TR
1,00 g	4,2 mmol	10 mL	65 °C	1 h

Après évaporation sous pression réduite, le mélange d'isomères est séparé du milieu réactionnel par deux chromatographies successives sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient le composé **54** constitué d'un mélange d'isomères (60:40) qui se présente sous la forme d'une poudre jaune pâle (70 mg ; 0,36 mmol ; 9 %).

Analyses :

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 8,08/8,04 (1H ; m ; CH) ; 7,40/7,34 (1H ; m ; CH) ; 6,60/6,56 (1H ; m ; CH) ; 6,45/6,35 (1H ; m ; CH) ; 4,73/4,47 (1H ; m ; CH) ; 4,65/4,54 (1H ; sl ; OH) ; 4,35/4,15 (1H ; d ; J = 4,0 ; CH) ; 2,26/2,25 (3H ; s ; CH_3) ; 1,38/1,15 (3H ; d ; J = 8,0 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; $CDCl_3$)* δ_C : 157,7/157,4 (C_{IV}) ; 147,5 (CH) ; 137,8/137,6 (CH) ; 113,6/113,5 (CH) ; 109,8/109,5 (CH) ; 80,4/80,2 (CH) ; 50,3/48,5 (CH) ; 26,7/25,8 (CH_3) ; 18,4/15,6 (CH_3).

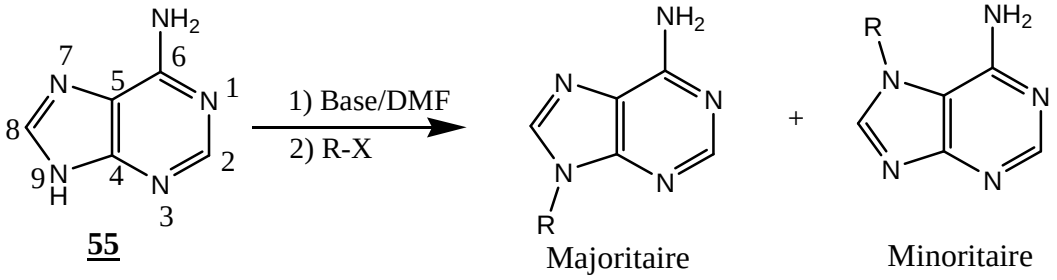
Analyse élémentaire : $C_{10}H_{14}N_2O_2$, 0,25 (CH_3OH)

	C	H	N
Valeurs théoriques (%)	60,87	7,48	13,85
Valeurs expérimentales (%)	60,47	7,15	13,48

3. Chapitre 2

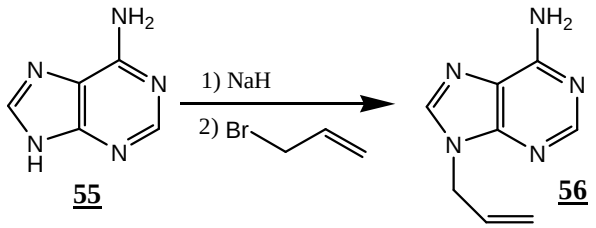
Formation des dérivés de l'adénine modifiée en position 9 ou en position 7

A une suspension d'adénine **55** dans le *N*,*N*-diméthylformamide (DMF) est ajouté de l'hydrure de sodium (NaH) à 60 % dans l'huile (1,1 équivalent). Le mélange obtenu est agité sous argon à température ambiante pendant 1 h. L'agent alkylant (1,05 équivalent) est ensuite ajouté et ce mélange est agité à température ambiante sous argon.



55

Formation de 56



Mode opératoire : (Montgomery, 1965 ; Thibon, 1997)

m (adénine **55**) =	n (adénine **55**)=	Quantité de DMF	TR
5,00 g	37,04 mmol	150 mL	5 h

Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est agité dans 100 mL de NaOH (1 M) puis extrait par 4 fois 100 mL de DCM. Après évaporation, le résidu d'extraction est chromatographié deux fois sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient ainsi la 9-allyladénine **56** (4,06 g ; 23,20 mmol ; Rdt = 63 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : 150-152 °C. Litt 143-145 °C

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 7,83 (1H ; s ; CH) ; 7,82 (1H ; s ; CH) ; 5,89-5,81 (1H ; m ; CH) ; 5,11 (1H ; d ; J = 10,4 ; CH_2) ; 4,88 (1H ; d ; J = 17,2 ; CH_2) ; 4,54 (2H ; dd ; J_1 = 3,6 ; J_2 = 1,2 ; CH_2).

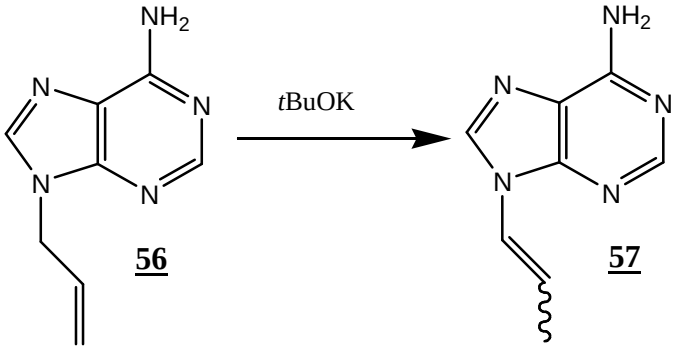
(400 MHz ; CD_3Cl_3) δ_H : 8,36 (1H ; s ; CH) ; 7,80 (1H ; s ; CH) ; 6,37 (2H ; sl ; NH_2) ; 6,08-5,98 (1H ; m ; CH) ; 5,30 (1H ; d ; J = 10,4 ; CH_2) ; 5,18 (1H ; d ; J = 17,6 ; CH_2) ; 4,81 (2H ; dd ; J_1 = 4,4 ; J_2 = 1,2 ; CH_2).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 154,8 (C_{IV}) ; 151,8 (CH) ; 147,9 (C_{IV}) ; 141,7 (CH) ; 131,5 (CH) ; 117,9 (CH_2) ; 117,6 (C_{IV}) ; 45,7 (CH_2).

(100 MHz ; CD_3Cl_3) δ_C : 156,0 (C_{IV}) ; 153,3 (CH) ; 150,1 (C_{IV}) ; 140;4 (CH) ; 132,0 (CH) ; 119,7 (C_{IV}) ; 119,1 (CH_2) ; 45,9 (CH_2).

SM : *(FAB [+], glycérol) : m/z* 176 ($[M+H]^+$).

Formation de 57



Mode opératoire : (Montgomery, 1965)

A une solution de 9-allyladénine **56** (300 mg ; 1,71 mmol) dans le DMSO (6 mL) est ajouté du *t*BuOK (315 mg ; 1,71 mmol). Ce mélange est agité pendant 3 h à 110 °C. Le milieu réactionnel est ensuite ajouté goutte à goutte à de l'éther éthylique. Il se forme un précipité qui est filtré puis remis en suspension dans du DCM. Cette suspension est ensuite filtrée. On obtient le mélange d'isomère Z et E **57** qui se présente sous forme de poudre blanche (105 mg ; 0,60 mmol ; Rdt = 35 % ; (E:Z : 75:25 composition déterminée par spectrométrie de RMN ^{1}H)).

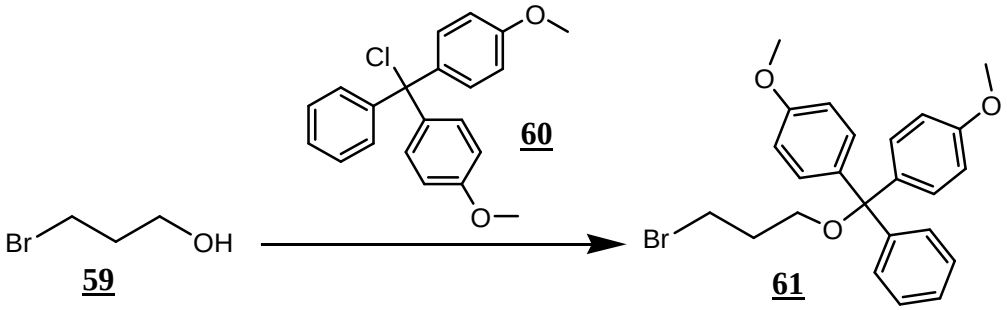
Analyses :

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,02 (1H ; s ; CH) ; 7,99 (1H ; s ; CH) ; 6,70-6,67 (0,75H (E) ; dd ; J_1 = 14,4 ; J_2 = 1,6 ; CH) ; 6,58 (0,25H (Z) ; dd ; J_1 8,4 ; J_2 = 1,6 ; CH) ; 6,19-6,10 (0,75H (E) ; m ; CH) ; 6,01-5,93 (0,25H (Z) ; m ; CH) ; 1,80-1,77 (2,25H (E) ; dd ; J_1 = 6,8 ; J_2 = 1,6 ; CH_3) ; 1,60-1,58 (0,75H (Z) ; dd ; J_1 = 6,8 ; J_2 = 1,6 ; CH_3).

(400 MHz ; CD_3OD) δ_H : 8,31 (1H ; s ; CH) ; 8,23 (1H ; s ; CH) ; 7,08-7,04 (0,75H (E) ; dd ; J_1 = 14.4 ; J_2 = 2,0 ; CH) ; 6,84-6,81 (0,25H (Z) ; dd ; J_1 = 8,4 ; J_2 = 2,0 ; CH) ; 6,55-6,47 (0,75H (E) ; m ; CH) ; 6,03-5,96 (0,25H (Z) ; m ; CH) ; 1,93 (2,25H (E) ; dd ; J_1 = 6,8 ; J_2 = 2,0 ; CH_3) ; 1,81 (0,75H (Z) ; dd ; J_1 = 6,8 ; J_2 = 2,0 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; CD_3OD)* δ_C : 152,6 (CH) ; 138,8 6 (CH); 120,7 (CH) ; 118,7 (CH) ; 14,0 (CH_3).

Formation de 61



Mode opératoire :

A une solution de chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle (DMTr) **60** (2,44 g ; 7,19 mmol) dans la pyridine (5 mL) est ajouté du 3-bromopropanol **59** (1 g ; 0,66 mL). Au bout de 2 h de réaction à température ambiante le mélange réactionnel est précipité dans du MeOH. Après filtration, on obtient le produit **61** (1,97 g ; 4,46 mmol ; Rdt = 62 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

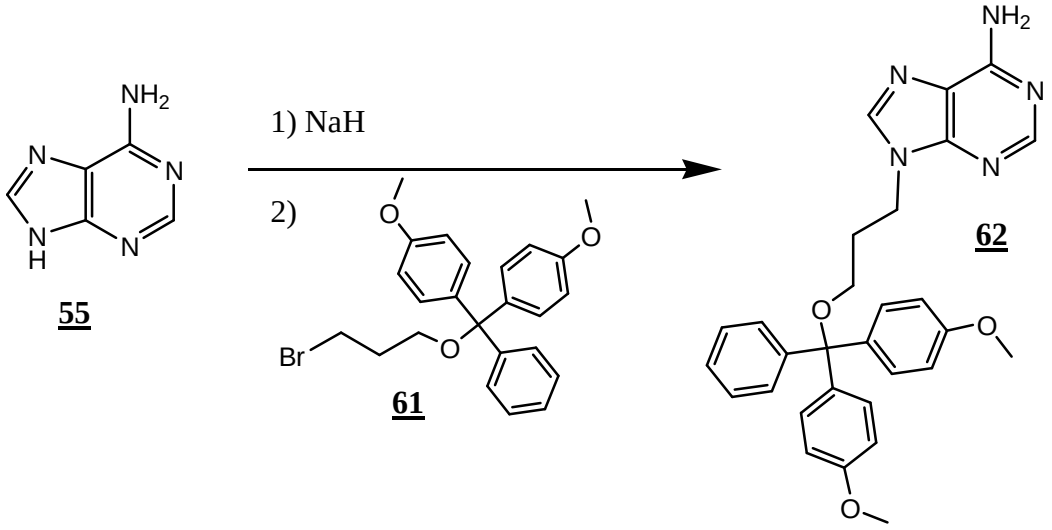
Analyses : (Nielsen, 2004)

F : 85-86 °C.

RMN : ^{1}H: *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 7,63-7,62 (2H ; d ; J = 7,6 ; CH) ; 7,52-7,50 (4H ; d ; J = 8,8 ; CH) ; 7,42 (1H ; t ; J = 7,6 ; CH) ; 7,36-7,31 (2H ; m ; CH) ; 6,99-6,96 (4H ; d ; J = 8,8 ; CH) ; 3,85 (6H ; s ; CH_3-O) ; 3,68 (2H ; t ; J = 6,8 ; CH_2) ; 3,40-3,39 (2H ; m ; CH_2) ; 2,24 (2H ; m ; CH_2).

SMHR : *(EI)* : $C_{24}H_{25}O_3{}^{79}Br$:	$[M+Na]^+$	Requis	*m/z*	463,08848
		Expérimental	*m/z*	463,0884
	$[M+K]^+$	Requis	*m/z*	479,06241
		Expérimental	*m/z*	479,0641

Formation de 62



Mode opératoire :

m (adénine **55**) =	n (adénine **55**)=	Quantité de DMF	TR
612 mg	4,53 mmol	40 mL	5 jours

Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est chromatographié sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH, puis recristallisé dans de l'iPrOH. On obtient ainsi le composé attendu **62** (1,26 g ; 2,54 mmol ; Rdt = 56 %) qui se présente sous forme d'une huile jaune clair.

Analyses :

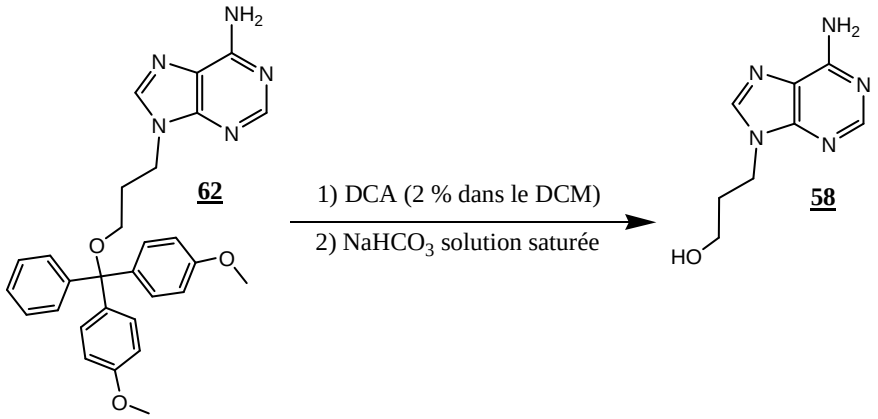
F : 162-164 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 8,39 (1H ; s ; CH) ; 7,66 (1H ; s ; CH) ; 7,46 (2H ; d ; J = 7,6 ; CH) ; 7,36-7,26 (7H ; m CH) ; 6,88 (4H ; d ; J = 7,6 ; CH) ; 5,88 (2H ; sl ; NH_2) ; 4,21 (2H ; t ; J = 6,4 ; CH_2) ; 3,85 (3H ; s ; 2O-CH_3) ; 3,18 (2H ; t ; J = 6,4 ; CH_2) ; 2,12 (2H ; t ; J = 6,4 ; CH_2).

^{13}C : *(100 MHz ; $CDCl_3$)* δ_C : 158,7 (C_{IV}) ; 155,4 (C_{IV}) ; 152,7 (CH) ; 150,2 (C_{IV}) ; 145,0 (C_{IV}) ; 141,1 (CH) ; 136,2 (C_{IV}) ; 130,1 (CH) ; 128,2 (CH) ; 128,1 (CH) ; 127,1 (CH) ; 119,9 (C_{IV}) ; 113,3 (CH) ; 86,3 (C_{IV}) ; 59,9 (CH_2) ; 55,4 (O-CH_3) ; 41,5 (CH_2) ; 30,3 (CH_2).

SMHR : *(ESI)* : $C_{29}H_{30}N_5O_3$:	$[M+H]^+$	Requis	*m/z*	496,23487
		Expérimental	*m/z*	496,2362
	$[M+Na]^+$	Requis	*m/z*	518,21681
		Expérimental	*m/z*	518,2147
	$[M+K]^+$	Requis	*m/z*	534,19075
		Expérimental	*m/z*	534,1910

Formation de 58



Mode opératoire :

Le composé **62** (800 mg ; 1,61 mmol) est agité pendant 1,5 h dans une solution d'acide dichloroacétique à 2 % dans le DCM (65 mL). Le mélange réactionnel est neutralisé par une solution saturée de $NaHCO_3$ puis la phase aqueuse est évaporée et chromatographiée sur phase inverse C_{18}. On obtient ainsi la 9-(3-hydroxypropyl)-adénine **58** (305 mg ; 1,58 mmol ; Rdt = quantitatif) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses : (Holy, 1978 ; Zhang, 2006)

F : 178-179 °C (décomposition). Litt : 215 °C

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; CD_3OD)* δ_H : 8,23 (H ; s ; CH) ; 8,14 (H ; s ; CH) ; 4,37 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 3,57 (2H ; t ; J = 6,4 ; CH_2) ; 2,09 (2H ; m ; CH_2).

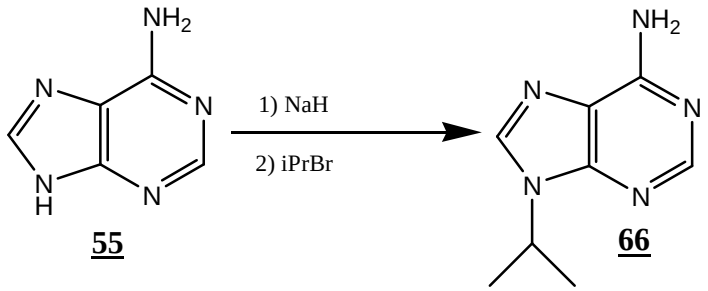
(400 MHz ; $CDCl_3$) δ_H : 8,36 (H ; s ; CH) ; 7,81 (H ; s ; CH) ; 5,66 (2H ; sl ; NH_2) ; 4,39 (2H ; t ; J = 6,4 ; CH_2) ; 3,51 (2H ; t ; J = 5,6 ; CH_2) ; 2,01 (2H ; m ; CH_2).

^{13}C : *(100 MHz ; CD_3OD)* δ_C : 155,9 (C_{IV}) ; 152,2 (CH) ; 149,2 (C_{IV}) ; 141,5 (CH) ; 57,9 (CH_2) ; 40,4 (CH_2) ; 32,0 (CH_2).

(100 MHz ; $CDCl_3$:CD_3OD (8:2)) δ_C : 155,6 (C_{IV}) ; 152,4 (CH) ; 149,3 (C_{IV}) ; 141,1 (CH) ; 118,8 (C_{IV}) ; 57,8 (CH_2) ; 40,5 (CH_2) ; 32,2 (CH_2).

SMHR : *(EI)* : $C_8H_{11}N_5O$: $[M]^+$	Requis	*m/z*	193,0964
	Expérimental	*m/z*	193,0970

Formation de 66



Mode opératoire : (Rasmussen, 1982)

m (adénine **55**) =	n (adénine **55**)=	Quantité de DMF	TR
1,40 g	10,36 mmol	450 mL	18 h

Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est chromatographié sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient le produit **66** (457 mg ; 2,58 mmol ; Rdt = 26 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses : (Young, 1990 ; Soltani Rad, 2008)

F : 102-103 °C. Litt : 235 °C et 114-115 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,39 (1H ; s ; CH) ; 7,90 (1H ; s ; CH) ; 4,91-4,84 (1H ; sept ; J = 6,8 ; CH) ; 1,64 (6H ; d ; J = 6,8 ; CH_3).

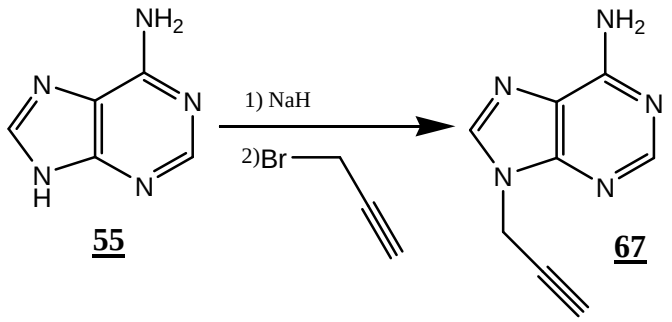
(400 MHz ; $CDCl_3$) δ_H : 8,36 (1H ; s ; CH) ; 7,88 (1H ; s ; CH) ; 5,96 (2H ; sl ; NH_2) ; 4,90-4,80 (1H ; m ; CH) ; 1,61 (6H ; d ; J = 6,8 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 155,4 (C_{IV}) ; 152,5 (CH) ; 149,7 (C_{IV}) ; 138,0 (CH) ; 120,0 (C_{IV}) ; 47,0 (CH) ; 22,7 (CH_3).

(100 MHz ; $CDCl_3$) δ_C : 155,7 (C_{IV}) ; 152,9 (CH) ; 149,9 (C_{IV}) ; 138,2 (CH) ; 120,2 (C_{IV}) ; 47,2 (CH) ; 22,9 (CH_3).

SM : *(DCI NH_3, isobutane)* : *m/z* 178 ($[M+H]^+$).

Formation de 67



Mode opératoire : (Lazrek, 2001)

m (adénine **55**) =	n (adénine **55**)=	Quantité de DMF	TR
1,62 g	11,99 mmol	150 mL	2 h

Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est chromatographié deux fois sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient le produit **67** (1,39 g ; 8,03 mmol ; Rdt = 67 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : 209-210 °C (décomposition). Litt : 213-214 °C

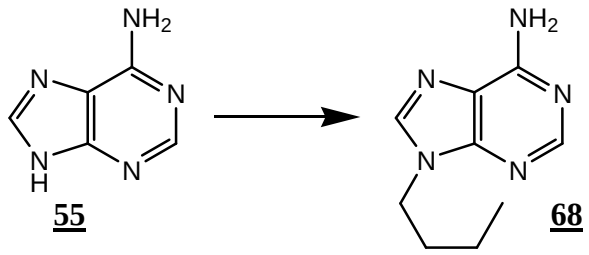
RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; CD_3OD)* δ_H : 8,24 (1H ; s ; CH) ; 8,23 (1H ; s ; CH) ; 5,08 (2H ; d ; J = 2,8 ; CH_2) ; 3,00 (1H ; t ; J = 2,8 ; CH).

(400 MHz ; $CDCl_3$) δ_H : 8,40 (1H ; s ; CH) ; 8,03 (1H ; s ; CH) ; 5,62 (2H ; sl ; NH_2) ; 5,31 (1H ; s ; CH) ; 4,99 (1H ; d ; J = 2,4 ; CH_2).

^{13}C : *(100 MHz ; CD_3OD)* δ_C : 155,9 (C_{IV}) ; 152,5 (CH) ; 148,8 (C_{IV}) ; 140,5 (CH) ; 118,6 (C_{IV}) ; 76,2 (C_{IV}) ; 74,3 (CH_2) ; 32,3 (CH).

SM : *(FAB [+], glycérol)* : 174 *m/z* ($[M+H]^+$).

Formation de 68



Mode opératoire : (Ghosh, 2007)

m (adénine **55**) =	n (adénine **55**)=	Quantité de DMF	TR
10,00 g	74,00 mmol	300 mL	12 h

Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est cristallisé dans de l'iPrOH. On obtient la 9-butyladénine **68** (9,04 g ; 47,28 mmol ; Rdt = 64 %) qui se présente sous forme de cristaux blancs.

Analyses :

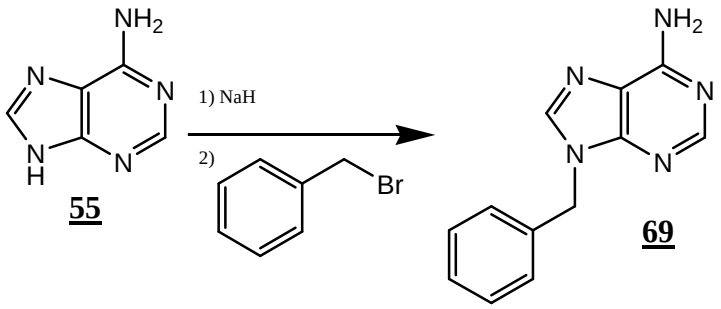
F : 112-114 °C. Litt : 116 °C

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 8,37 (1H ; s ; CH) ; 7,80 (1H ; s ; CH) ; 6,34 (2H ; sl ; NH_2) ; 4,20 (2H ; m ; CH_2) ; 1,89 (2H ; m ; CH_2) ; 1,36 (2H ; m ; CH_2) ; 0,95 (3H ; m ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; $CDCl_3$)* δ_C : 155,4 (C_{IV}) ; 152,9 (C_{IV}) ; 140,4 (CH) ; 129,0 (CH) ; 119,6 (C_{IV}) ; 43,7 (CH_2) ; 32,0 (CH_2) ; 19,9 (CH_2) ; 13,5 (CH_3).

SM : (*FAB [+], NBA*) : m/z 192 ($[M+H]^+$) ; m/z 136 ($[adénine+H]^+$)

Formation de 69



Mode opératoire :

m (adénine **55**) =	n (adénine **55**)=	Quantité de DMF	TR
5,00 g	37,04 mmol	150 mL	5 h

Après évaporation sous pression réduite le résidu obtenu est agité dans 100 mL de NaOH (1 M) puis extrait par 4 fois 100 mL de DCM. Après évaporation du DCM, le résidu d'extraction est chromatographié deux fois sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient ainsi la 9-benzyladénine **69** (3,33 g ; 14,80 mmol ; Rdt = 40 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses : (Ranganathan, 1990)

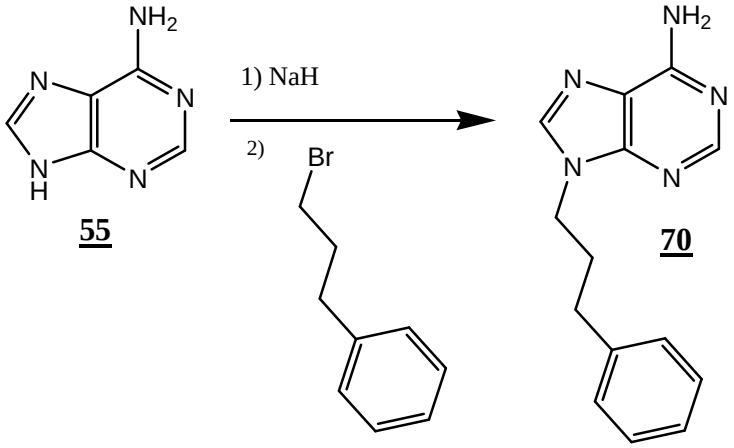
F : 215-217 °C. Litt : 235 °C

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 8,42 (1H ; s ; CH) ; 7,78 (1H ; s ; CH) ; 7,43-7,28 (5H ; m ; CH) ; 5,64 (2H ; sl ; NH_2) ; 5,39 (2H ; s ; CH_2).

^{13}C : *(100 MHz ; $CDCl_3$)* δ_C : 155,6 (C_{IV}) ; 153,5 (CH) ; 150,6 (C_{IV}) ; 140,7 (CH) ; 135,7 (C_{IV}) ; 129,3 (CH) ; 128,7 (CH) ; 128,0 (CH) ; 47,5 (CH_2).

SMHR : *(EI)* : $C_{12}H_{11}N_5$:	$[M]^+$	Requis	*m/z*	225,10145
		Expérimental	*m/z*	225,1015
	$[M-H]^+$	Requis	*m/z*	224,09362
		Expérimental	*m/z*	224,0947

Formation de 70



Mode opératoire : (Petrov, 2003)

m (adénine **55**) =	n (adénine **55**)=	Quantité de DMF	TR
5,00 g	37,04 mmol	150 mL	5 h

Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est lavé au pentane puis cristallisé dans de l'iPrOH. On obtient la 9-(3-phénylpropyl)-adénine **70** (5,31 g ; 20,96 mmol ; Rdt = 57 %) qui se présente sous forme de cristaux blancs.

Analyses :

F : 168-170 °C.

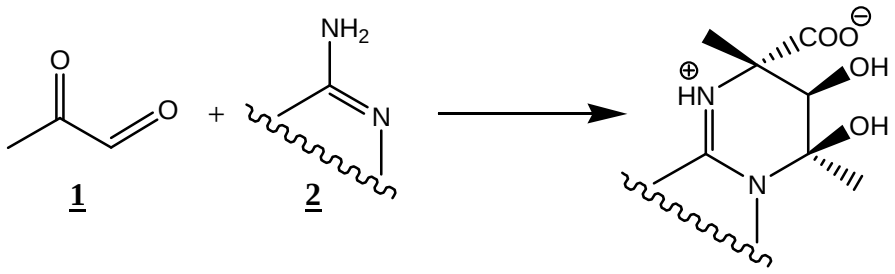
RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 8,39 (1H ; s ; CH) ; 7,76 (1H ; s ; CH) ; 7,36-7,14 (5H , m , CH) ; 5,63 (2H ; sl ; NH_2) ; 4,23 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 2,69 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 2,28 (2H ; m ; CH_2).

^{13}C : *(100 MHz ; $CDCl_3$)* δ_C : 155,5 (C_{IV}) ; 153,1 (CH) ; 150,4 (C_{IV}) ; 140,7 (CH) ; 140,4 (C_{IV}) ; 128,8 (CH) ; 128,6 (CH) ; 126,6 (CH) ; 120,0 (C_{IV}) ; 43,6 (CH_2) ; 32,9 (CH_2) ; 31,4 (CH_2).

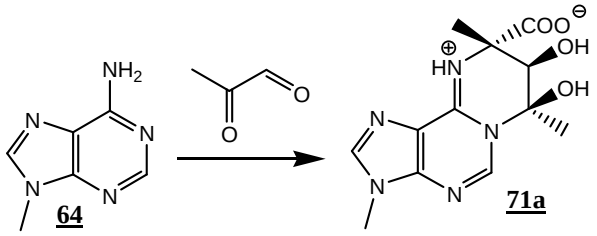
SM : *(ESI [+])* : *m/z* 254 ($[M+H]^+$)

Formation des adduits de la famille I

L'α-aminoazahétérocycle **2** est dissout dans une solution contenant la solution aqueuse commerciale de MG **1** à 40 % (8 équivalents) et de l'eau ou de l'ethanol. Cette solution est ensuite agitée sous argon à 50 °C.



Formation de 71a



Mode opératoire :

m (9-méthyladénine **64**) =	n (9-méthyladénine **64**)=	Quantité d'eau	TR
450 mg	3,00 mmol	5 mL	24 h

Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à deux chromatographies sur cartouche de phase inverse C_{18} en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de MeOH. Après évaporation du solvant, le résidu est cristallisé dans de l'iPrOH puis lavé à l'éther diéthylique. On obtient le mélange majoritaire d'énantiomères **71a** (245 mg ; 0,8 mmol ; Rdt = 28 %) qui se présente sous forme de poudre jaune clair.

Analyses :

F : 102-103 °C (décomposition).

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,31 (1H ; s ; CH) ; 8,00 (1H ; s ; CH) ; 3,73 (3H ; s ; CH_3) ; 1,99 (3H ; s ; CH_3) ; 1,54 (3H ; s ; CH_3).

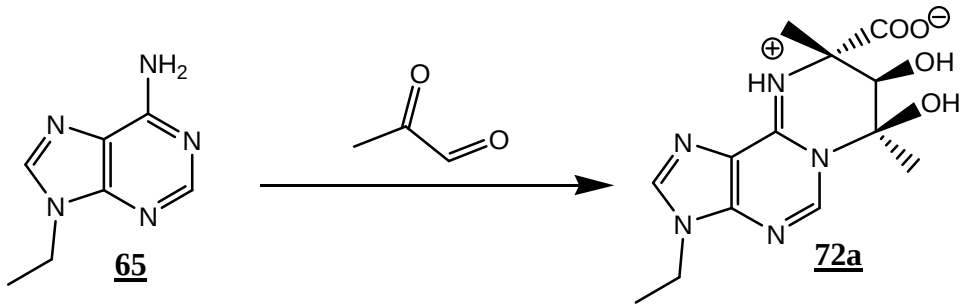
(400 MHz ; D_2O ; 50 °C) δ_H : 8,63 (1H ; s ; CH) ; 8,23 (1H ; s ; CH) ; 5,04 (1H ; s ; CH) ; 3,95 (3H ; s ; CH_3) ; 2,22 (3H ; s ; CH_3) ; 1,82 (3H ; s ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 177,4 (COO); 149,4 (C_{IV}) ; 148,3 (CH) ; 144,0 (CH) ; 118,8 (C_{IV}) ; 82,1 (C_{IV}) ; 68,9 (CH) ; 64,8 (C_{IV}) ; 30,1 (CH_3) ; 26,7 (CH_3) ; 21,2 (CH_3).

SM : *(ES [-])* : 292 *m/z* ($[M+H]^+$).

SMHR : *(EI)* : $C_{12}H_{15}N_5O_4$: $[M+H]^+$	Requis	*m/z*	294,12023
	Expérimental	*m/z*	294,1204

Formation de 72a



Mode opératoire :

m (9-éthtyladénine **65**) =	n (9-éthtyladénine **65**)=	Quantité d'eau	TR
1,00 g	6,19 mmol	15 mL	10 h

Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à une chromatographie sur cartouche de phase inverse C_{18} en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de MeOH. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est cristallisé dans de l'iPrOH, on obtient ainsi le mélange majoritaire d'énantiomères **72a** (680 mg ; 2,21 mmol ; Rdt = 33 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : 139-141 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,75 (1H ; s ; CH) ; 8,11 (1H ; s ; CH) ; 4,42 (1H ; s ; CH) ; 4,14 (2H ; m ; CH_2) ; 1,63 (3H ; s ; CH_3) ; 1,56 (3H ; s ; CH_3) ; 1,35 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

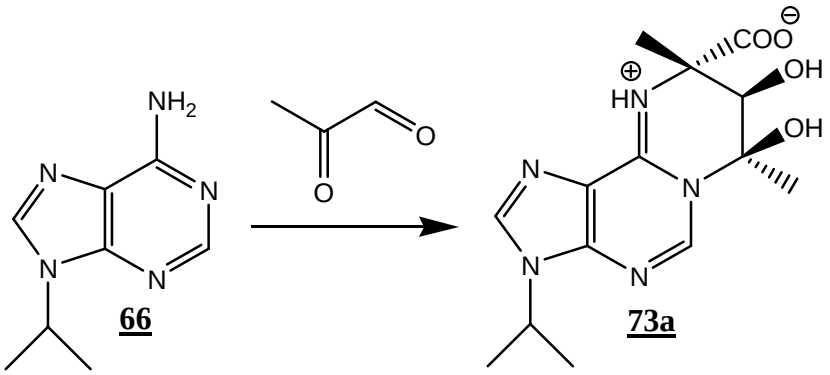
^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 176,5 (COO); 146,3 (C_{IV}) ; 144,4 (CH) ; 142,6 (CH) ; 117,4 (C_{IV}) ; 89,1 (C_{IV}) ; 70,5 (CH) ; 63,2 (C_{IV}) ; 36,7 (CH_2) ; 25,6 (CH_3) ; 22,0 (CH_3) ; 14,4 (CH_3).

SMHR : *(EI)* : $C_{13}H_{17}N_5O_4$:	$[M+H]^+$	Requis	*m/z*	308,13588
		Expérimental	*m/z*	308,1359
	$[M+Na]^+$	Requis	*m/z*	330,11782
		Expérimental	*m/z*	330,1185
	$[M+K]^+$	Requis	*m/z*	346,09176
		Expérimental	*m/z*	346,0926
	$[M-H + 2Na]^+$	Requis	*m/z*	352,09977
		Expérimental	*m/z*	352,1018

Analyse élémentaire : $C_{13}H_{17}N_5O_4$, H_2O

	C	H	N
Valeurs théoriques (%)	48,00	5,89	21,53
Valeurs expérimentales (%)	47,61	5,54	21,28

Formation de 73a



Mode opératoire :

m (9-isopropyladénine **66**) =	n (9-isopropyladénine **66**) =	Quantité d'eau	TR
250 mg	1,41 mmol	3 mL	18 h

Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à une chromatographie sur cartouche de phase inverse C_{18} en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de MeOH. Après évaporation du solvant, le mélange de diastéréoisomères est cristallisé dans l'iPrOH. On obtient le mélange majoritaire d'énantiomères **73a** (121 mg ; 0,38 mmol ; Rdt = 25 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : 144 °C (décomposition)

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,77 (1H ; s ; CH) ; 8,28 (1H ; s ; CH) ; 4,81-4,75 (1H ; m ; CH) ; 4,44 (1H ; s ; CH) ; 1,61 (6H ; s ; CH_3) ; 1,58 (6H ; s ; CH_3) ; 1,07 (6H ; d ; J = 8,4 ; 2 CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 176,5 (COO) ; 146,3 (C_{IV}) ; 145,1 (C_{IV}) ; 142,8 (CH) ; 142,3 (CH) ; 117,7 (C_{IV}) ; 91,8 (C_{IV}) ; 89,0 (C_{IV}) ; 70,5 (CH) ; 63,2 (C_{IV}) ; 48,5 (CH) ; 25,6 (CH_3) ; 22,1 (CH_3) ; 21,4 (CH_3).

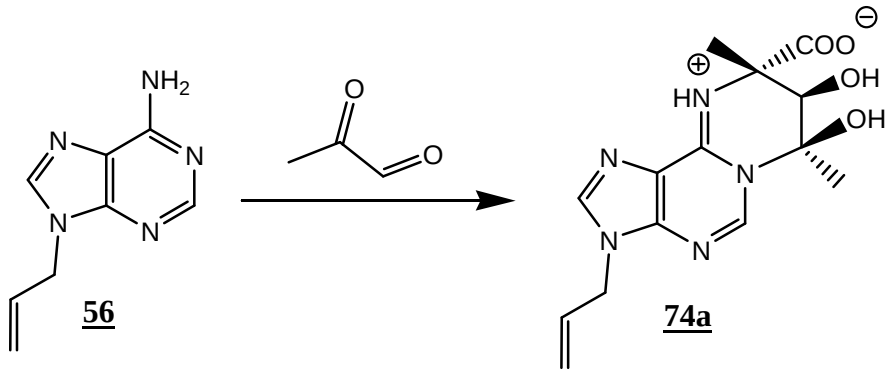
SM : *(DCI NH_3, isobutane)* : *m/z* 322 ($[M+H]^+$).

SMHR : *(ESI)* : $C_{14}H_{19}N_5O_4$:	$[M+Na]^+$	Requis	*m/z*	344,13347
		Expérimental	*m/z*	344,1333
	$[M–H+2Na]^+$	Requis	*m/z*	366,11542
		Expérimental	*m/z*	366,1154

Analyse élémentaire : $C_{14}H_{18}N_5O_4$, Na, 0,5 C_3H_7OH

	C	H	N
Valeurs théoriques (%)	49,86	5,94	18,76
Valeurs expérimentales (%)	49,56	6,06	18,89

Formation de 74a



Mode opératoire :

m (9-allyladénine **56**) =	n (9-allyladénine **56**) =	Quantité d'eau	TR
500 mg	2,86 mmol	5 mL	14 h

Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à une chromatographie sur cartouche de phase inverse C_{18} en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de méthanol. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est cristallisé dans de l'iPrOH, on obtient ainsi le mélange majoritaire d'énantiomères **74a** (390 mg ; 1,22 mmol ; Rdt = 43 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

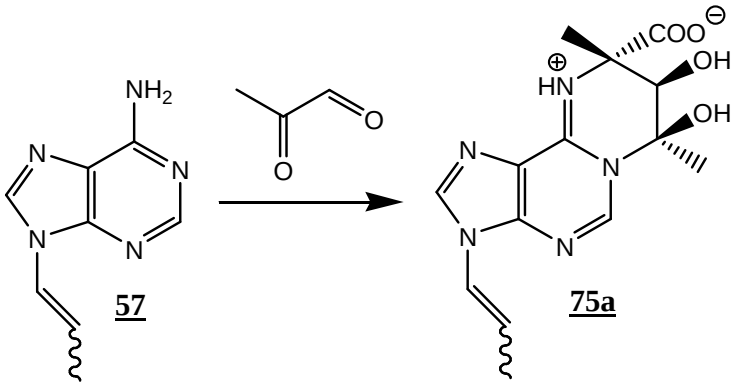
F : 130-131 °C (décomposition).

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,76 (1H ; s ; CH) ; 8,17 (1H ; s ; CH) ; 5,97 (1H ; ddt ; J_1 = 17,0 ; J_2 = 10,4 ; J_3 = 5,2 ; CH) ; 5,19 (1H ; d ; J = 10,4 ; CH_2) ; 4,81 (1H ; d ; J = 17,0 ; CH_2) ; 4,69 (2H ; d ; J = 5,2 ; CH_2) ; 4,42 (1H ; s ; CH) ; 1,59 (3H ; s ; CH_3) ; 1,57 (3H ; s ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 176,5 (COO); 146,5 (C_{IV}) ; 144,8 (CH) ; 142,9 (CH) ; 131,2 (CH) ; 118,4 (CH_2) ; 117,5 (C_{IV}) ; 89,1 (C_{IV}) ; 70,5 (CH) ; 63,2 (C_{IV}) ; 46,2 (CH_2) ; 25,6 (CH_3) ; 22,1 (CH_3).

SM : *(FAB [+], glycérol)* : *m/z* 320 ($[M+H]^+$)

Formation de 75a



Mode opératoire :

m ((Z + E) 9-(prop-1-ènyl)adénine **57**) =	n ((Z + E) 9-(prop-1-ènyl)adénine **57**) =	Quantité d'eau	TR
100 mg	0,60 mmol	1 mL	24 h

Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à une chromatographie sur cartouche de phase inverse C_{18} en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de méthanol. Après évaporation du solvant, le mélange d'isomères est cristallisé dans l'iPrOH puis lavé avec de l'éther diéthylique. On obtient le mélange majoritaire d'énantiomères (Z + E) **75a** (27 mg ; 0,1 mmol ; Rdt = 15 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

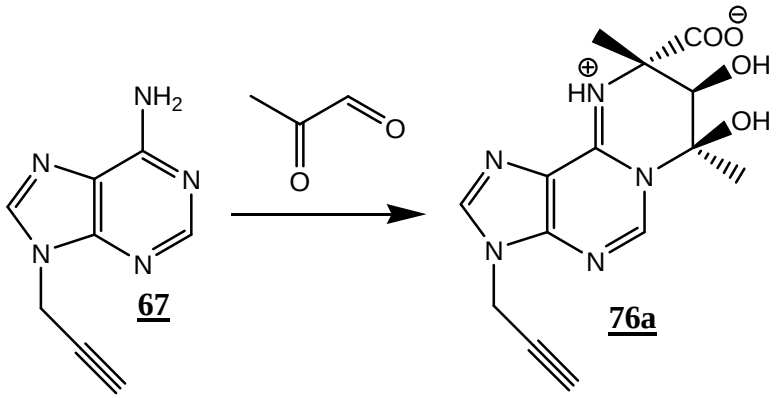
Analyses :

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,26 (1H ; s ; CH) ; 8,12 (1H ; s ; CH) ; 6,72 (0,75H (E); d ; J = 14,0 ; CH) ; 6,62 (0,25H (Z) ; d ; J = 8,4 ; CH) ; 6,19-6,11 (0,75H (E) ; m ; CH) ; 6,01-5,93 (0,25H (Z) ; m ; CH) ; 4,88 (1H ; s ; CH) ; 2,02 (3H ; s ; CH_3) ; 1,79 (2,25H (E) ; d ; J = 5,6; CH_3) ; 1,54 (3H ; s ; CH_3) ; 1,06 (0,75H (Z) ; d ; J = 6,0 ; CH_3).

(400 MHz ; D_2O ; 50 °C) δ_H : 8,62 (1H ; s ; CH) ; 8,42 (1H ; s ; CH) ; 7,12 (0,75H (E); d ; J = 14,4 ; CH) ; 6,93 (0,25H (Z) ; d ; J = 7,6 ; CH) ; 6,64-6,56 (0,75H (E) ; m ; CH) ; 6,35-6,28 (0,25H (Z) ; m ; CH) ; 5,16 (1H ; s ; CH) ; 2,32 (3H ; s ; CH_3) ; 2,10 (2,25H (E) ; d ; J = 6,0 ; CH_3) ; 1,87 (3H ; s ; CH_3) ; 1,75 (0,75H (Z) ; d ; J = 6,4 ; CH_3).

SM : *(ES [+])* : 320 *m/z* ($[M+H]^+$).

Formation de 76a



Mode opératoire :

m (9-propargyladénine **67**) =	n (9-propargyladénine **67**) =	Quantité d'eau	TR
1,00 g	5,78 mmol	20 mL	24 h

Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à deux chromatographies sur cartouche de phase inverse C_{18} en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de méthanol. Après évaporation du solvant, le mélange de diastéréoisomères est cristallisé dans l'iPrOH puis lavé avec de l'éther diéthylique. On obtient le mélange majoritaire d'énantiomères **76a** (495 mg ; 1,56 mmol ; Rdt = 27 %) qui se présente sous forme de poudre jaune clair.

Analyses :

F : 147 °C (décomposition).

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,76 (1H ; s ; CH) ; 8,23 (1H ; s ; CH) ; 4,98 (2H ; s ; CH_2) ; 4,40 (1H ; s ; CH) ; 2,82 (1H ; s ; CH) ; 1,60 (3H ; s ; CH_3) ; 1,55 (3H ; s ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 176,2 (COO) ; 146,1 (C_{IV}) ; 145,1 (C_{IV}) ; 144,0 (CH) ; 143,0 (CH) ; 143,0 (C_{IV}) ; 117,5 (C_{IV}) ; 98,3 (C_{IV}) ; 75,6 (CH) ; 70,4 (CH) ; 63,3 (C_{IV}) ; 33,7 (CH_2) ; 25,5 (CH_3) ; 22,0 (CH_3).

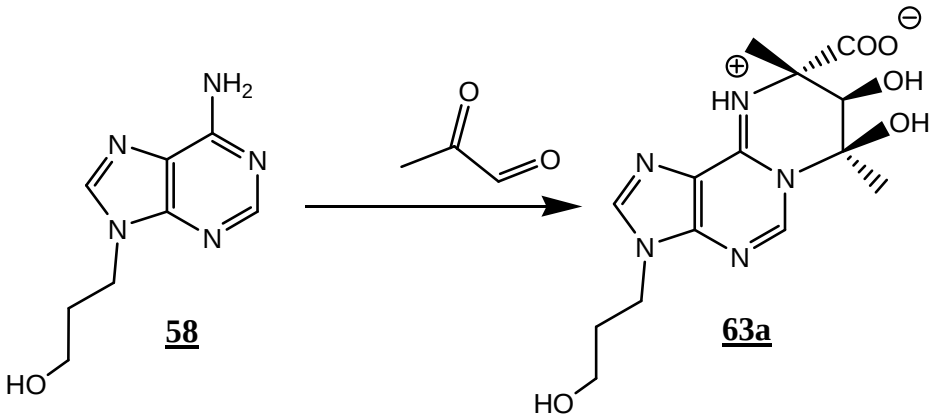
SM : *(FAB [+], glycérol)* : 318 *m/z* ($[M+H]^+$).

SMHR : *(ESI)* : $C_{14}H_{16}N_5O_4$: $[M+H]^+$		Requis	*m/z*	318,12023
		Expérimental	*m/z*	318,1195
	$[M+Na]^+$	Requis	*m/z*	340,10217
		Expérimental	*m/z*	340,1037
	$[M+K]^+$	Requis	*m/z*	356,07611
		Expérimental	*m/z*	356,0752

Analyse élémentaire : $C_{14}H_{14}N_5O_4$, Na, 0,5 C_3H_7OH

	C	H	N
Valeurs théoriques (%)	50,41	4,91	18,96
Valeurs expérimentales (%)	50,69	4,82	19,06

Formation de 63a



Mode opératoire :

m (9-(3-hydroxypropyl)-adénine **58**) =	n (9-(3-hydroxypropyl)-adénine **58**) =	Quantité d'eau	TR
250 mg	1,29 mmol	2 mL	48 h

Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à une chromatographie sur cartouche de phase inverse C_8 en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de MeOH. Après évaporation sous pression réduite, les fractions présentant le produit sont chromatographiées sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient le mélange majoritaire d'énantiomères **63a** (283 mg ; 0,84 mmol ; Rdt = 65 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : 103-105 °C (décomposition).

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,58 (1H ; s ; CH) ; 8,14 (1H ; s ; CH) ; 4,72 (1H ; s ;CH) ; 4,34 (2H ; m ; CH_2) ; 3,57 (2H ; m ; CH_2) ; 2,09-2,00 (5H ; m ; CH_2 + CH_3) ; 1,72 (3H ; s ; CH_3).

(400 MHz ; D_2O) ; 45 °C) δ_H : 8,33 (1H ; s ; CH) ; 8,13 (1H ; s ; CH) ; 4,95 (1H ; s ; CH) ; 4,36 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 3,57 (2H ; m; CH_2) ; 2,10 (2H ; m ; CH_2) ; 1,91 (3H ; s ; CH_3) ; 1,74 (3H ; s ; CH_3).

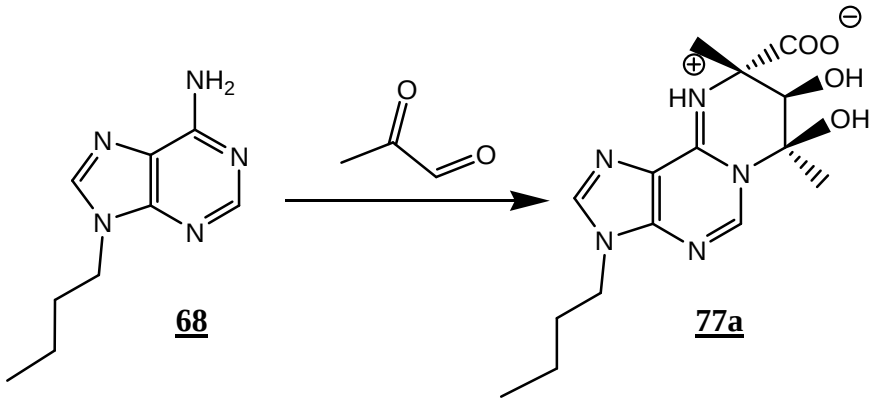
^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 175,9 (COO) ; 152,0 (C_{IV}) ; 147,9 (CH) ; 141,8 (CH) ; 118,8 (C_{IV}) ; 97,4 (C_{IV}) ; 79,0 (CH) ; 63,8 (C_{IV}) ; 58,0 (CH_2) ; 40,8 (CH_2) ; 32,1 (CH_2) ; 25,7 (CH_3) ; 20,9 (CH_3).

SMHR : *(EI)* : $C_{14}H_{19}N_5O_5$: $[M + H]^+$	Requis	*m/z*	338,14644
	Expérimental	*m/z*	338,1472
$[M + Na]^+$	Requis	*m/z*	360,12839
	Expérimental	*m/z*	360,1306

Analyse élémentaire : $C_{14}H_{18}N_5O_5$, Na, 0,5 H_2O, 0,5 CH_3OH

	C	H	N
Valeurs théoriques (%)	45,31	5,51	18,22
Valeurs expérimentales (%)	45,38	5,48	18,08

Formation de 77a



Mode opératoire :

m (9-butyladénine **68**) =	n (9-butyladénine **68**) =	Quantité d'eau	TR
2,50 g	13,07 mmol	5 mL	48 h

Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à deux chromatographies sur cartouche de phase inverse C_{18} en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de MeOH. On obtient le mélange majoritaire d'énantiomères **77a** (432 mg ; 1,29 mmol ; Rdt = 10 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : 140-142 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,84 (1H ; s ; CH) ; 8,21 (1H ; s ; CH) ; 4,53 (1H ; s ; CH) ; 4,25 (2H ; t ; J = 6,8 ; CH_2) ; 1,82 (2H ; m ; CH_2) ; 1,74 (3H ; s ; CH_3) ; 1,67 (3H ; s ; CH_3) ; 1,26 (2H ; sext ; J = 7,2 ; CH_2) ; 0,87 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 176,5 (COO) ; 146,5 (C_{IV}) ; 145,4 (C_{IV}) ; 144,8 (CH) ; 142,6 (CH) ; 117,4 (C_{IV}) ; 89,1 (C_{IV}) ; 70,5 (CH) ; 63,2 (C_{IV}) ; 44,2 (CH_2) ; 31,2 (CH_2) ; 25,5 (CH_3) ; 22,0 (CH_3) ; 19,0 (CH_2) ; 12,6 (CH_3).

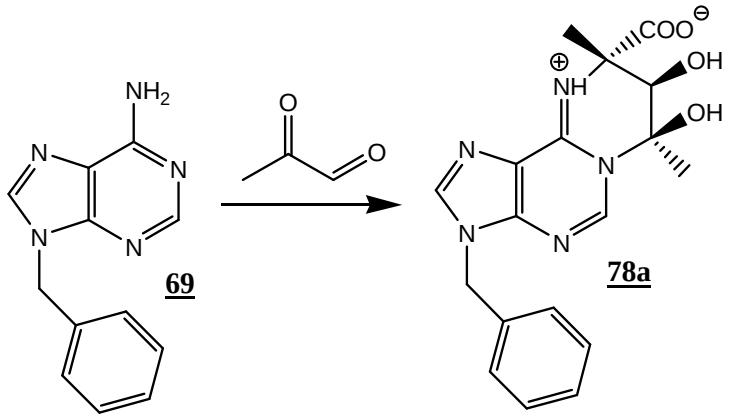
SM : *(FAB [+], NBA)* : m/z 336 ($[M+H]^+$).

SMHR : *(EI)* : $C_{15}H_{22}N_5O_4$: $[M+H]^+$ Requis *m/z* 336,16718
Expérimental *m/z* 336,1683

Analyse élémentaire : $C_{15}H_{21}N_5O_4$, H_2O

	C	H	N
Valeurs théoriques (%)	50,98	6,56	19,82
Valeurs expérimentales (%)	51,11	6,35	19,76

Formation de 78a



Mode opératoire :

m (9-benzyladénine **69**) =	n (9-benzyladénine **69**) =	Quantité d'eau	TR
600 mg	2,67 mmol	5 mL	7 jours

Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à deux chromatographies sur cartouche de phase inverse C_{18} en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de MeOH. Après évaporation sous pression réduite, les fractions présentant le produit sont chromatographiées sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. Les fractions contenant le produit d'intérêt sont ensuite soumises à une recristallisation dans l'iPrOH. On obtient le mélange majoritaire d'énantiomères **78a** (140 mg ; 0,35 mmol ; Rdt = 14 %) qui se présente sous forme de poudre brune.

Analyses :

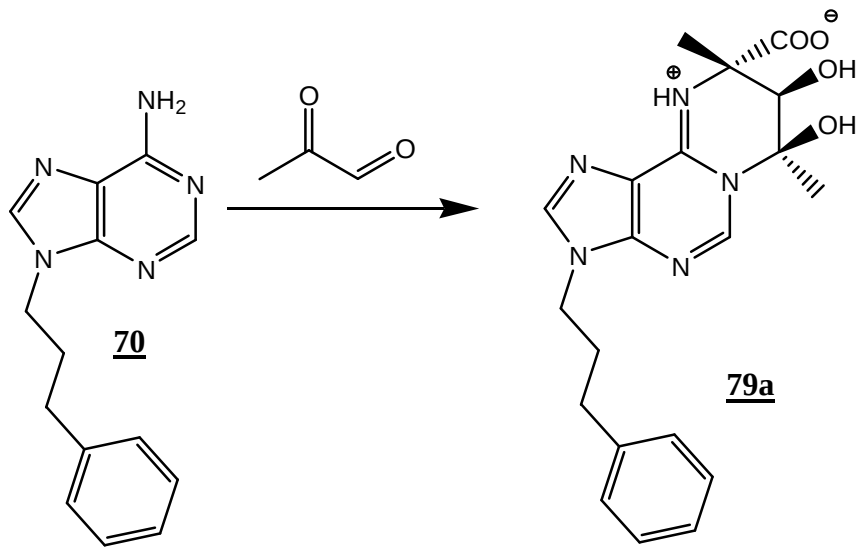
F : 170-171 °C (décomposition).

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,24 (1H ; s ; CH) ; 8,10 (1H ; s ; CH) ; 7,30-7,17 (5H ; m ; CH) ; 5,36 (2H ; s ; CH_2) ; 4,89 (1H ; s ; CH) ; 2,03 (3H ; s ; CH_3) ; 1,53 (3H ; s ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 177,5 (COO) ; 151,3 (C_{IV}) ; 147,8 (C_{IV}) ; 142,5 (CH) ; 135,7 (C_{IV}) ; 135,5 (CH) ; 128,9 (CH) ; 128,2 (CH) ; 127,2 (CH) ; 119,1 (C_{IV}) ; 98,1 (C_{IV}) ; 81,1 (CH) ; 64,8 (C_{IV}) ; 47,5 (CH_2) ; 20,2 (CH_3) ; 12,3 (CH_3).

SM : *(ES [+])* : m/z 370 ($[M+H]^+$).

Formation de 79a



Mode opératoire :

m (9-(3-phénylpropyl)-adénine **70**) =	n (9-(3-phénylpropyl)-adénine **70**) =	Quantité d'eau	TR
2,00 g	8,36 mmol	10 mL	48 h

Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à deux chromatographies sur cartouche de phase inverse C_{18} en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de MeOH. On obtient le mélange majoritaire d'énantiomères **79a** (808 mg ; 2,11 mmol ; Rdt = 25 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : 149 °C (décomposition).

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,11 (1H ; s ; CH) ; 7,76 (1H ; s ; CH) ; 6,64 (5H ; m ; CH) ; 4,80 (1H ; s ; CH) ; 4,02 (2H ; t ; J = 6,6 ; CH_2) ; 2,43 (2H ; t ; J = 6,6 ; CH_2) ; 2,04 (2H ; m ; CH_2) ; 2,00 (3H ; s ; CH_3) ; 1,46 (3H ; s ; CH_3).

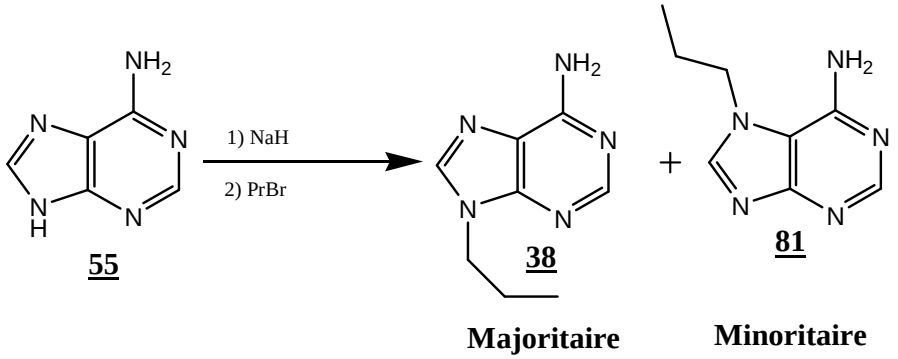
^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 177,0 (COO) ; 151,1 (C_{IV}) ; 149,6 (CH) ; 147,2 (C_{IV}) ; 142,0 (CH) ; 139,8 (C_{IV}) ; 127,4 (CH) ;127,3 (CH) ; 125,2 (CH) ; 118,6 (C_{IV}) ; 80,1 (CH) ; 64,4 (C_{IV}) ; 43,5 (CH_2) ; 31,8 (CH_2) ; 28,7 (CH_2) ; 26,3 (CH_3) ; 20,2 (CH_3).

SM : *(FAB [+], NBA)* : m/z 398 ($[M+H]^+$).

Analyse élémentaire : $C_{20}H_{23}N_5O_4$

	C	H	N
Valeurs théoriques (%)	60,44	5,83	17,62
Valeurs expérimentales (%)	60,32	5,94	17,54

Formation de 81



Mode opératoire : (Lambertucci, 2007)

m (adénine **55**) =	n (adénine **55**) =	Quantité de DMF	TR
10,00 g	74,08 mmol	500 mL	18 h

Après évaporation sous pression réduite le résidu obtenu est agité dans 100 mL d'hydroxyde de sodium (1 M) pendant 3h. On obtient un précipité qui est ensuite filtré. Le solide résultant de la filtration est lavé au pentane. Le solide est ensuite soumis à une chromatographie sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient ainsi la 7-propyladénine **81** (1,31 g ; 7,41 mmol ; Rdt = 10 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

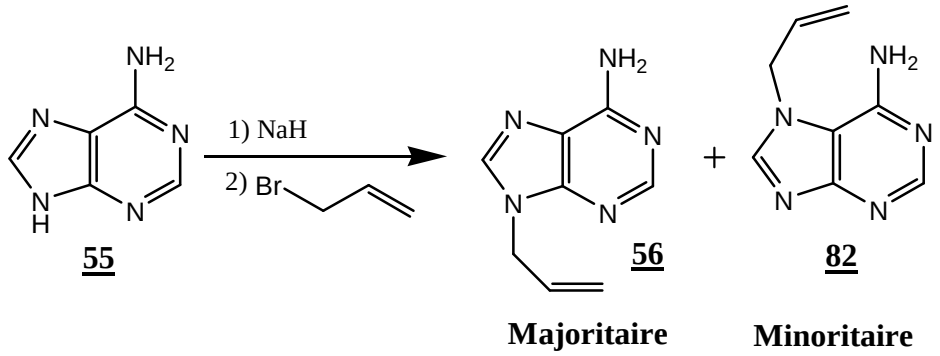
F : >270 °C. Litt : > 250 °C

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 8,03 (1H ; s ; CH) ; 8,00 (1H ; s ; CH) ; 4,35 (2H ; m ; CH_2) ; 2,04 (2H ; m ; CH_2) ; 1,00 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

SM : *(ESI [+])* : *m/z* 178 ($[M+H]^+$).

UV : λ_{max} = 273 nm.

Formation de 82



Mode opératoire : (Montgomery, 1965 ; Thibon, 1997)

m (adénine **55**) =	n (adénine **55**) =	Quantité de DMF	TR
5,00 g	37,04 mmol	150 mL	5 h

Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est agité dans 100 mL de NaOH (1 M) puis extrait par 4 fois 100 mL de DCM. Après évaporation du DCM, le résidu d'extraction est chromatographié deux fois sur colonne de silice. On obtient ainsi la 7-allyladénine **82** (633 mg ; 3,61 mmol ; Rdt = 10 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : 184-186 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,13 (1H ; s ; CH) ; 7,80 (1H ; s ; CH) ; 5,98-5,92 (1H ; m ; CH) ; 5,19 (1H ; d ; J = 10,4 ; CH_2) ; 5,04 (1H ; d ; J = 17,2 ; CH_2) ; 4,81 (2H ; dd ; J_1 = 3,6 ; J_2 = 1,2 ; CH_2).

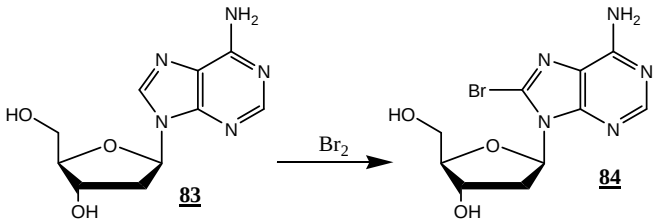
(400 MHz ; CD_3Cl_3) δ_H : 8,07 (1H ; s ; CH) ; 8,03 (1H ; s ; CH) ; 6,18-6,08 (1H ; m ; CH) ; 5,42-5,33 (2H ; m ; CH_2) ; 5,03 (2H ; d ; J = 3,6 ; CH_2) ; 2,77 (2H ; sl ; NH_2).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 154,6 (C_{IV}) ; 152,7 (CH) ; 149,1 (C_{IV}) ; 144,7 (CH) ; 130,6 (CH) ; 119,5 (C_{IV}) ; 119,0 (CH_2) ; 52,1 (CH_2).

(100 MHz ; CD_3Cl_3) δ_C : 154,6 (CH) ; 150,9 (C_{IV}) ; 142,1 (CH) ; 139,8 (C_{IV}) ; 130,8 (CH) ; 121,4 (C_{IV}) ; 120,8 (CH_2) ; 52,3 (CH_2).

SM : *(FAB [+], glycérol) : m/z* 176 ($[M+H]^+$).

Formation de 84



Mode opératoire : (Laayoun, 1992)

La 2'-désoxyadénosine **83** (4,0 g ; 14,87 mmol) est dissoute dans une solution d'acétate de sodium tamponnée à pH = 5 (200 mL ; 0,5 M). A cette solution est ajoutée une solution aqueuse de brome préparée en mélangeant 2 mL de dibrome à 140 mL d'eau. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 36 h. Puis l'excès de brome est éliminé par ajout d'une solution aqueuse saturée de thiosulfate de sodium. Suite à la neutralisation par ajout de NaOH (1 M), le produit précipite. Après filtration, on obtient le composé **84** (3,65 g ; 11,09 mmol ; 75 %) qui se présente sous forme de poudre brun clair.

Analyses :

F : 202 °C. Litt : 202 °C

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; DMSOd$_6$)* δ_H : 8,18 (1H ; s ; CH) ; 7,38 (2H ; sl ; NH_2) ; 6,28 (1H ; t ; J = 7,0 ; CH) ; 5,25 (1H ; s ; OH) ; 5,20 (1H ; s ; OH) ; 4,48 (1H ; m ; CH) ; 3,89 (1H ; m ; CH) ; 3,66 (1H ; m ; CH) ; 3,50 (1H ; m ; CH) ; 3,27 (1H ; m ; CH) ; 2,23 (1H ; m ; CH).

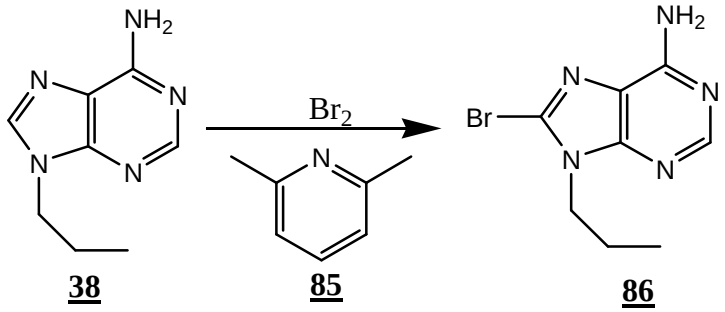
(400 MHz ; CD$_3$OD) δ_H : 8,13 (1H ; s ; CH) ; 6,49 (1H ; dd ; J_1 = 8.8 ; J_2 = 6,4 ; CH) ; 4,64 (1H ; m ; CH) ; 4,10 (1H ; dd ; J_1 = 4,8 ; J_2 = 2,8 ; CH) ; 3,88 (1H ; dd ; J_1 = 12,4 ; J_2 = 2,8 ; CH) ; 3,75 (1H ; dd ; J_1 = 4,8 ; J_2 = 2,8 ; CH) ; 3,16-3,09 (1H ; m ; CH) ; 2,33-2,27 (1H ; m ; CH).

^{13}C : *(100 MHz ; DMSOd$_6$)* δ_C : 155,0 (C_{IV}) ; 152,5 (CH) ; 150,0 (C_{IV}) ; 126,6 (C_{IV}) ; 119,6 (C_{IV}) ; 88,3 (CH) ; 86,3 (CH) ; 71,1 (CH) ; 62,1 (CH_2) ; 37,0 (CH_2).

(100 MHz ; CD$_3$OD) δ_C : 155,4 (C_{IV}) ; 152,1 (CH) ; 149,8 (C_{IV}) ; 126,9 (C_{IV}) ; 120,3 (C_{IV}) ; 89,2 (CH) ; 88,1 (CH) ; 72,3 (CH) ; 62,9 (CH_2) ; 38,6 (CH_2).

SM : *(FAB [+], glycérol)* : *m/z* 330 ($[M+H]^+$)

Formation de 86



Mode opératoire :

A une solution de 9-propyladénine **38** (5,00 g ; 28,24 mmol) dans du MeOH (220 mL) est ajoutée la 2,6-lutidine **85** (9,07 g ; 84,72 mmol) et un excès de dibrome. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 h. Puis le dibrome en excès est éliminé par addition d'une solution saturée de thiosulfate de sodium jusqu'à décoloration du milieu réactionnel, puis le pH est ramené à 6 par ajout d'une solution saturée de $NaHCO_3$. Le milieu réactionnel est ensuite soumis à une extraction par 4 fois 100 mL de DCM. Après évaporation du DCM, le résidu d'extraction est recristallisé dans du MeOH. Le solide résultant de la recristallisation est dissout à froid dans le minimum de DCM puis cette solution est ajoutée goutte à goutte dans de l'eau. Le précipité qui se forme est filtré. On obtient ainsi le produit **86** (4,74 g ; 18,51 mmol ; Rdt = 66 %).

Analyses : (Zhang, 2006)

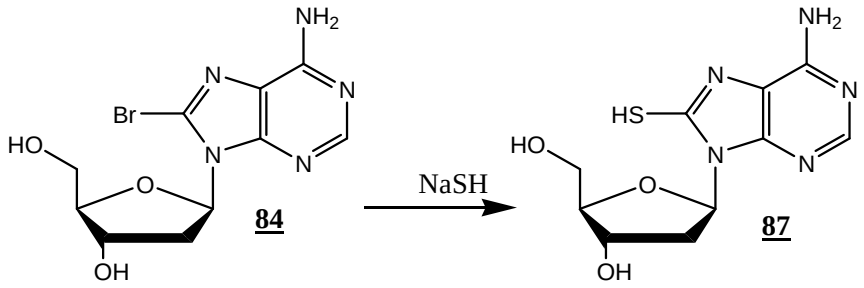
F : 196-198 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; CD_3OD)* δ_H : 8,19 (1H ; s ; CH) ; 4,22 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 1,89 (2H ; sext ; J = 7,2 ; CH_2) ; 0,98 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; DMSO)* δ_C : 155,2 (C_{IV}) ; 155,1 (C_{IV}) ; 153,2 (CH) ; 151,2 (C_{IV}) ; 126,7 (C_{IV}) ; 45,6 (CH_2) ; 22,6 (CH_2) ; 11,3 (CH_3).

SM : *(ES [+])* : *m/z* 256 (^{79}Br) et 258 (^{81}Br) ($[M+H]^+$).

Formation de 87



Mode opératoire : (Laayoun, 1992)

La 8-bromo-2'-désoxyadénosine **84** (1,0 g ; 3,03 mmol) est dissoute dans du DMF (200 mL) puis une solution aqueuse d'hydrogénosulfure de sodium à 40 % (20 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 h sous argon. Après évaporation du DMF le résidu huileux est lavé au cyclohexane puis séché. Après dissolution dans le minimum d'eau (80 mL), la solution obtenue est neutralisée par addition d'acide chlorhydrique (1 M) ce qui entraîne la précipitation du produit. Après filtration, on obtient le composé **87** (716 mg ; 2,53 mmol ; 84 %) qui se présente sous forme de poudre beige.

Analyses :

F : 141-142 °C.

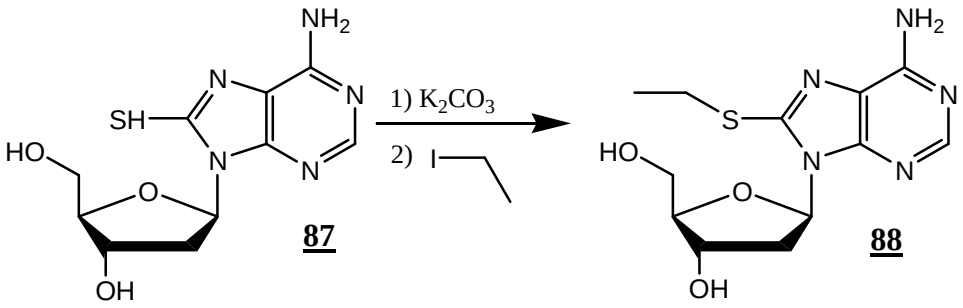
RMN :

^{1}H : *(400 MHz ; DMSOd$_6$)* δ_H : 12,55 (1H ; s ; SH) ; 8,18 (1H ; s ; CH) ; 6,95 (2H ; sl ; NH_2) ; 6,28 (1H ; t ; J = 6,4 ; CH) ; 5,35 (1H ; sl ; OH) ; 5,23 (1H ; sl ; OH) ; 4,46 (1H ; m ; CH) ; 3,68 (1H ; m ; CH) ; 3,53 (1H ; m ; CH) ; 2,95 (1H ; m ; CH) ; 2,07 (1H ; m ; CH).

^{13}C : *(100 MHz ; DMSOd$_6$)* δ_C : 155,0 (C_{IV}) ; 152,5 (CH) ; 150,0 (C_{IV}) ; 126,6 (C_{IV}) ; 119,6 (C_{IV}) ; 88,3 (CH) ; 86,3 (CH) ; 71,1 (CH) ; 62,1 (CH_2) ; 37,0 (CH_2).

SM : *(FAB [+], glycérol)* : *m/z* 284 ($[M+H]^+$)

Formation de 88



Mode opératoire :

A une solution de 8-mercaptodésoxyadénosine **87** (400 mg ; 1,41 mmol) dans du DMF (15 mL) est ajouté du carbonate de potassium (975 mg ; 7,07 mmol). Après une heure d'agitation, de l'iodoéthane (0,12 mL ; 1,48 mmol) est ajouté en 3 fois, à une heure d'intervalle. Le milieu réactionnel est ensuite agité à température ambiante pendant 13 h. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est mis en suspension dans 50 mL d'un mélange DCM/MeOH (9/1) puis est chromatographié sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient ainsi la 8-éthylthiodésoxyadénosine **88** (430 mg ; 1,38 mmol ; Rdt = 96 %) qui se présente sous forme d'une poudre jaune.

Analyses :

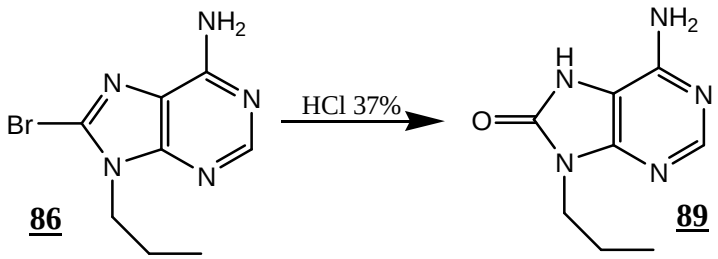
F : 123-125 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; CD_3OD)* δ_H : 8,08 (1H ; s ; H2) ; 6,37 (1H ; dd ; J_1 = 6,0 ; J_2 = 3,2 ; H1') ; 4,62 (1H ; d ; J = 6,0 ; H3') ; 4,11 (1H ; d ; J = 1,6 ; H4') ; 3,89 (1H ; dd ; J_1 = 12,8 ; J_2 = 2,4 ; H5') ; 3,76 (1H ; dd ; J_1 = 12,8 ; J_2 = 3,2 ; H5'') ; 3,30-3,28 (2H ; m ; CH_2) ; 3,04-2,97 (1H ; m ; H2') ; 2,28-2,22 (1H ; ddd ; J_1 = 13,6 ; J_2 = 6,0 ; J_3 = 1,6 ; H2'') ; 1,42 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; CD_3OD)* δ_C : 154,4 (C_{IV}) ; 150,6 (C2) ; 150;1 (C_{IV}) ; 149,6 (C_{IV}) ; 120,0 (C_{IV}) ; 88,9 (C4') ; 86,2 (C1') ; 72,2 (C3') ; 62,8 (C5') ; 36,7 (C2') ; 26,5 (CH_2) ; 13,7 (CH_3).

SMHR : *(EI)* : $C_{12}H_{17}N_5O_3S$:	$[M+H]^+$	Requis	*m/z*	312,11304
		Expérimental	*m/z*	312,1144
	$[M+Na]^+$	Requis	*m/z*	334,095498
		Expérimental	*m/z*	334,0944
	$[M+K]^+$	Requis	*m/z*	350,06892
		Expérimental	*m/z*	350,0683

Formation de 89



Mode opératoire :

La 8-bromo-9-propyladénine **86** (500 mg ; 1,95 mmol) est dissoute dans 20 ml d'acide chlorhydrique (37% m/m) puis agitée à 100 °C pendant 24 h. Après refroidissement, le milieu réactionnel est amené à pH 7 par ajout d'une solution saturée de $NaHCO_3$. Après évaporation sous pression réduite, le résidu est chromatographié sur colonne de phase inverse C_{18} en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de MeOH. On obtient ainsi la 8-hydroxy-9-propyladénine **89** (370 mg ; 1,93 mmol ; Rdt quantitatif).

Analyses :

F : 142-144 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; DMSO)* δ_H : 7,83 (1H ; s ; CH) ; 6,80 (2H ; sl ; NH_2) ; 3,68 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 1,72-1,63 (2H ; sext ; J = 7,2 ; CH_2) ; 0,86 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

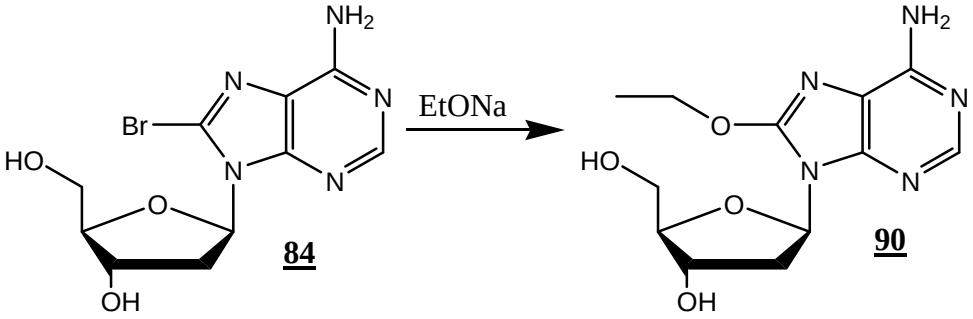
(400 MHz ; CD_3OD) δ_H : 7,96 (1H ; s ; CH) ; 3,83 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 1,82-1,71 (2H ; sext ; J = 7,2 ; CH_2) ; 0,94 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; DMSO)* δ_C : 158,1 (C_{IV}) ; 148,8 (C_{IV}) ; 148,6 (CH) ; 148,1 (C_{IV}) ; 110,2 (C_{IV}) ; 41,0 (CH_2) ; 22,1 (CH_2) ; 11,6 (CH_3).

(100 MHz ; CD_3OD) δ_C : 159,2 (C_{IV}) ; 150,1 (C_{IV}) ; 149,8 (CH) ; 149,6 (C_{IV}) ; 111,4 (C_{IV}) ; 42,8 (CH_2) ; 23,3 (CH_2) ; 11,6 (CH_3).

SMHR : *(EI)* : $C_8H_{11}N_5O$:	$[M]^+$	Requis	*m/z*	193,09636
		Expérimental	*m/z*	193,0952

Formation de 90



Mode opératoire :

La 8-bromo-désoxyadénosine **84** (600 mg ; 1,82 mmol) est dissoute dans 10 ml d'éthanol absolu, puis de l'éthanolate de sodium (1,49 g ; 21,98 mmol) est ajouté. Le mélange est agité à température ambiante pendant 6 h. Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est dissous dans 50 mL d'eau puis soumis à une extraction par 3 fois 50 mL de DCM. La phase DCM est chromatographiée sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient la 8-éthoxy-désoxyadénosine **90** qui se présente sous forme de poudre blanche (210 mg ; 0,72 mmol ; Rdt = 40 %).

Analyses :

F : 157-160 °C.

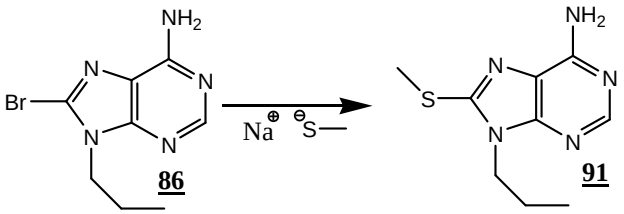
RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; CD_3OD)* δ_H : 8,07 (1H ; s ; CH) ; 6,39-6,35 (1H ; dd ; J = 6,4 ; H1') ; 4,63-4,58 (2H ; m ; CH_2) ; 4,05 (1H ; d ; J = 1,5 ; H4') ; 3,85 (1H ; dd ; J_1 = 2,0 ; J_2 = 2,5 ; H5') ; 3,73 (1H ; dd ; J_1 = 2,0 ; J_2 = 2,5 ; H5'') ; 3,01-2,97 (1H ; m ; H2') ; 2,28-2,22 (1H ; m ; H2'') ; 1,52 (3H ; t ; J = 4,5 ; CH_3).

(400 MHz ; D_2O) δ_H : 7,87 (1H ; s ; CH) ; 6,20 (1H ; m ; H1') ; 4,49 (1H ; m ; H3') ; 4,48-4,35 (2H ; m ; CH_2) ; 3,97 (1H ; m ; H4') ; 3,71-3,62 (2H ; m ; H5') ; 2,80-2,73 (1H ; m ; H2') ; 2,25-2,19 (1H ; m ; H2'') ; 1,39 (3H ; m ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 154,3 (C_{IV}) ; 152,6 (C_{IV}) ; 150,1 (C2) ; 147,7 (C_{IV}) ; 114,4 (C_{IV}) ; 86,9 (C4') ; 82,8 (C1') ; 71,3 (C3') ; 65,6 (CH_2) ; 61,9 (C5') ; 37,0 (C2') ; 13,5 (CH_3).

SMHR : *(ESI)* : $C_{12}H_{17}N_5O_4$:	$[M+H]^+$	Requis	*m/z*	296,13588
		Expérimental	*m/z*	296,1373
	$[M+Na]^+$	Requis	*m/z*	318,11782
		Expérimental	*m/z*	318,1177
	$[M+K]^+$	Requis	*m/z*	334,09176
		Expérimental	*m/z*	334,0924

Formation de 91



Mode opératoire :

La 8-bromo-9-propyladénine **86** (500 mg ; 1,95 mmol) est dissoute dans 30 ml de DMF puis du méthylthiolate de sodium (695 mg ; 9,77 mmol) est ajouté. Le mélange est agité à température ambiante pendant 6 h. Après évaporation sous pression réduite du DMF, le milieu réactionnel est dissout dans 40 mL de solution saturée de Na_2HPO_4. Cette phase aqueuse est soumise à une extraction par 3 fois 50 mL de DCM. Après une chromatographie sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH, on obtient la 8-méthylthio-9-propyladénine **91** qui se présente sous forme de poudre blanche (245 mg ; 1,05 mmol ; Rdt = 54 %).

Analyses :

F : 198-200 °C.

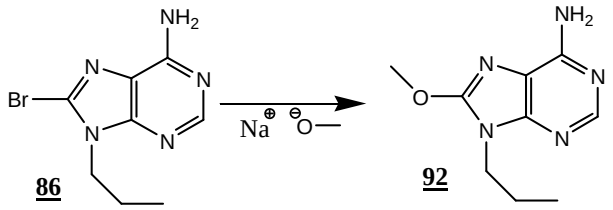
RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 8,26 (1H ; s ; CH) ; 5,88 (2H ; sl ; NH_2) ; 4,10 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 2,77 (3H ; s ; S-CH_3) ; 1,88 (2H ; sext ; J = 7,2 ; CH_2) ; 0,98 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

(400 MHz ; CD_3OD) δ_H : 8,11 (1H ; s ; CH) ; 4,09 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 2,77 (3H ; s ; S-CH_3) ; 1,83 (2H ; m ; CH_2) ; 0,94 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

***^{13}C** : (100 MHz ; CD3OD)* δ_C : 155,5 (C_{IV}) ; 152,9(C_{IV}) ; 152,8 (C_{IV}) ; 152,7 (CH) ; 120,5 (C_{IV}) ; 45,8 (S-CH_3) ; 23,7 (CH_2) ; 14,5 (CH_2) ; 11,4 (CH_3).

SMHR : *(EI)* : $C_9H_{13}N_5S$:	$[M]^+$	Requis	*m/z*	223,08917
		Expérimental	*m/z*	223,0904
	$[M-CH_3]^+$	Requis	*m/z*	208,06557
		Expérimental	*m/z*	208,0643

Formation de 92



Mode opératoire :

La 8-bromo-9-propyladénine **86** (200 mg ; 0,78 mmol) est dissoute dans 12 ml de DMF puis du méthanolate de sodium (421 mg ; 7,81 mmol) est ajouté. Le mélange est agité à température ambiante, sous argon, pendant 36 h. Après évaporation sous pression réduite, le résidu d'évaporation est dissout dans l'eau puis est extrait par 3 fois 50 mL de DCM. La phase organique, après évaporation, est soumise à une chromatographie sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. Une recristallisation dans le MeOH permet d'obtenir la 8-méthoxy-9-propyladénine **92** sous forme de poudre blanche (80 mg ; 0,39 mmol; Rdt = 50 %).

Analyses :

F : 172-174 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 8,26 (1H ; s ; CH) ; 6,11 (2H ; sl ; NH_2) ; 4,20 (3H ; s ; O-CH_3) ; 4,01 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 1,88-1,79 (2H ; m ; CH_2) ; 0,96 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

(400 MHz ; CD_3OD) δ_H : 8,08 (1H ; s ; CH) ; 4,18 (3H ; s ; O-CH_3) ; 3,98 (2H ; t ; J = 7,0 ; CH_2) ; 1,84-1,75 (2H ; m ; CH_2) ; 0,91 (3H ; t ; J = 7,0 ; CH_3).

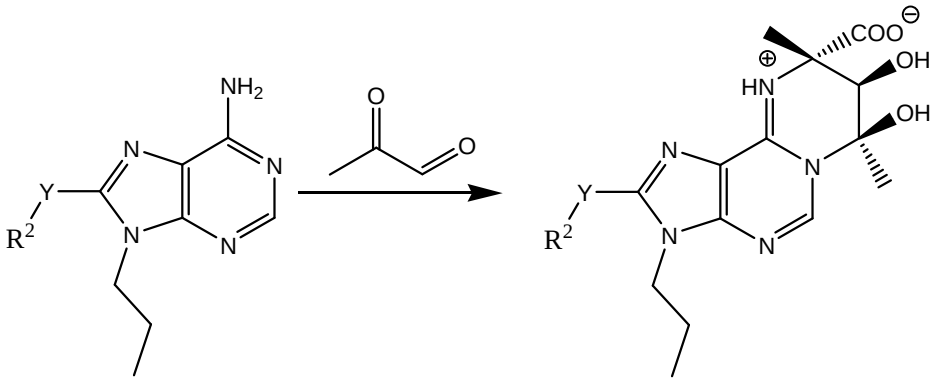
^{13}C : *(100 MHz ; $CDCl_3$)* δ_C : 155,8 (C_{IV}) ; 152,6 (C_{IV}) ; 150,8 (CH) ; 115,6 (C_{IV}) ; 56,8 (O-CH_3) ; 42,9 (N-CH_2) ; 22,4 (CH_2) ; 11,0 (CH_3).

(100 MHz ; CD_3OD) δ_C : 157,2 (C_{IV}) ; 155,1 (C_{IV}) ; 152,0 (CH) ; 150,7 (C_{IV}) ; 116,2 (C_{IV}) ; 58,0 (O-CH_3) ; 44,1 (N-CH_2) ; 23,5 (CH_2) ; 11,4 (CH_3).

SMHR : *(EI)* : $C_9H_{13}N_5O$:	$[M]^+$	Requis	*m/z*	207,11201
		Expérimental	*m/z*	207,1119

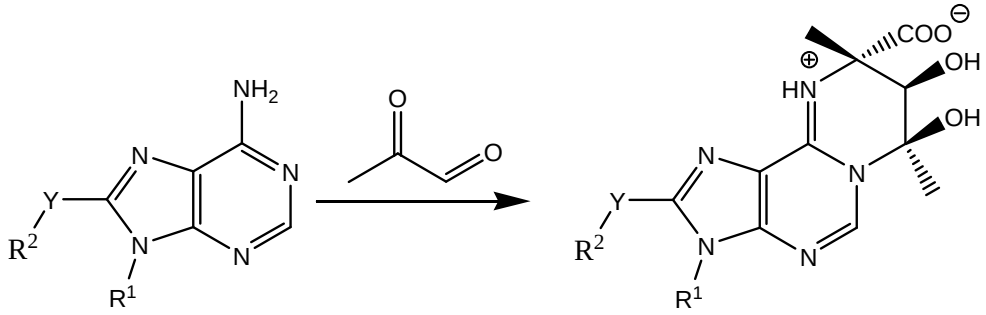
Formation des adduits de la famille I issus de dérivés de l'adénine modifiée en position 8 et/ou 9

L'α-aminoazahétérocycle est dissout dans la solution aqueuse commerciale de MG à 40 % (8 équivalents). Pour les dérivés de la 2-désoxyadénosine modifiée en position 8, la solution aqueuse commerciale de MG est préalablement ramenée à pH 6 par ajout d'acétate de sodium. Le milieu réactionnel est agité sous argon à 50 °C. A la fin de la réaction, après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à deux chromatographies sur cartouche de phase inverse C_8 en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de MeOH. Après évaporation sous pression réduite, les fractions présentant le produit sont chromatographiées sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH.



Mélange majoritaire **a**

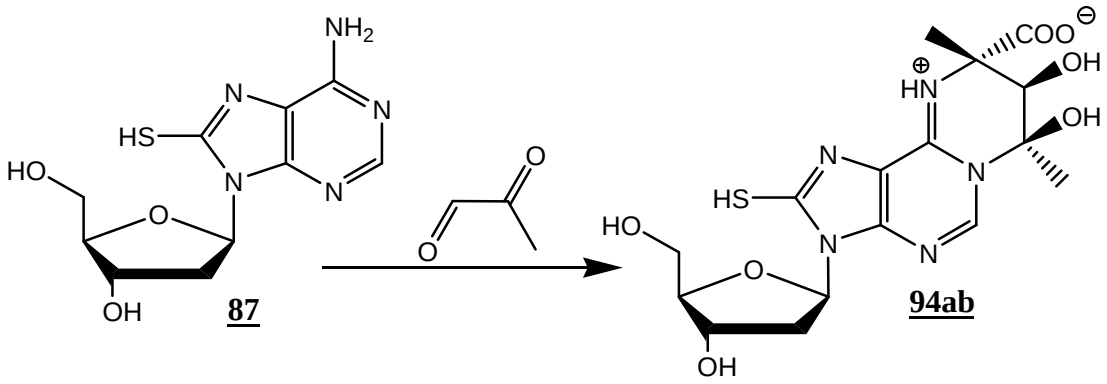
Adduits de la famille I issus de dérivés de la 9-propyladénine modifiée en position 8



Mélange majoritaire **a**

Adduits de la famille I issus de dérivés de la 2-désoxyadénosine modifiée en position 8 (R^1 = H ou 2'-désoxyribose)

Formation de 94ab



Mode opératoire :

m (**87**) =	n (**87**) =	TR
400 mg	1,41 mmol	10 h

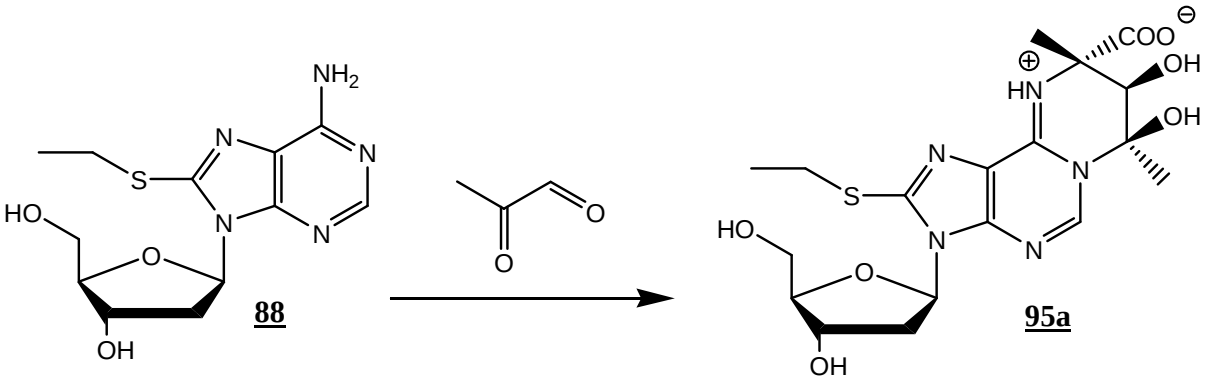
Le mélange **94ab** (37 mg ; 0,09 mmol ; Rdt = 6 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

Analyses :

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,08/8,06 (1H ; s ; CH) ; 6,84 (1H ; m ; H1') ; 4,97/* (1H ; s ; CH) ; 4,51 (1H ; m ; H3') ; 3,95 (1H ; m ; H4') ; 3,76 (1H ; m ; H5') ; 3,65 (1H ; m ; H5'') ; 2,75 (1H ; m ; H2') ; 2,18 (1H ; m ; H2'') ; 2,06 (3H ; sl ; CH_3) ; 1,61/1,57 (3H ; s ; CH_3).

*signal masqué par le signal de D_2O

Formation de 95a



Mode opératoire :

m (**88**) =	n (**88**) =	TR
350 mg	1,13 mmol	3 jours

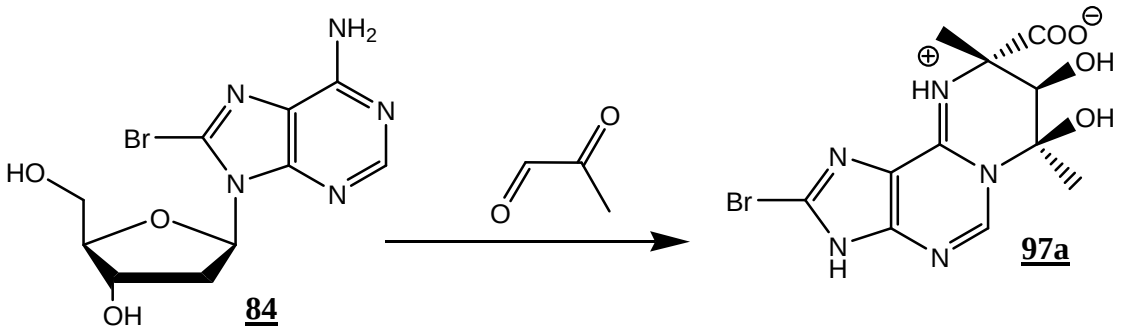
Le mélange majoritaire d'énantiomères **95a** (76 mg ; 0,17 mmol ; Rdt = 15 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

Analyses :

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,34 (1H ; s ; H2) ; 6,45 (1H ; t ; J = 7,6 ; H1') ; 4,91 (1H ; s ; CH) ; 4,66 (1H ; m ; H3') ; 4,14 (1H ; d ; J = 1,6 ; H4') ; 3,83 (2H ; m ; H5') ; 3,24 (2H ; m ; CH_2) ; 2,97 (1H ; m ; H2') ; 2,34 (1H ; m ; H2'') ; 1,98 (3H ; sl ; CH_3) ; 1,60 (3H ; s ; CH_3) ; 1,34 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 177,5 (COO) ; 150,2 (C_{IV}) ; 148,82 (C2) ; 120,3 (C_{IV}) ; 87,8 (C4') ; 87,4 (CH) ; 85,6 (C1') ; 71,7 (C3') ; 64,7 (C_{IV}) ; 62,0 (C5') ; 37,8 (C2') ; 27,6 (CH_2) ; 26,6 (CH_3) ; 20,5 (CH_3) ; 13,8 (CH_3).

Formation de 97a



Mode opératoire :

m (**84**) =	n (**84**) =	TR
300 mg	0,91 mmol	10 h

Le mélange majoritaire d'énantiomères **97a** (60 mg ; 0,17 mmol ; Rdt = 19 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

Analyses :

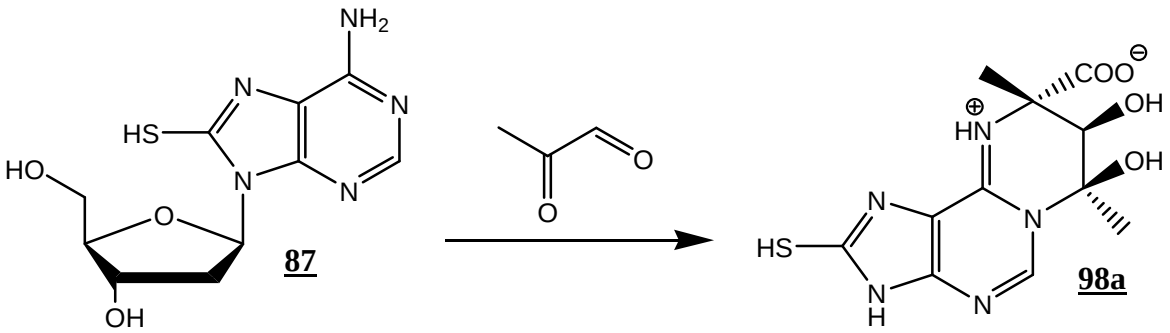
F : 219 °C (décomposition).

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,54 (1H ; s ; CH) ; 4,50 (1H ; s ; CH) ; 1,86 (3H ; s ; CH_3) ; 1,63 (3H ; s ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 177,8 (COO) ; 156,5 (C_{IV}) ; 143,3 (C_{IV}) ; 140,4 (C_{IV}) ; 140,3 (CH) ; 119,4 (C_{IV}) ; 74,4 (C_{IV}) ; 72,2 (CH) ; 63,0 (C_{IV}) ; 26,2 (CH_3) ; 22,6 (CH_3).

SMHR : *(EI)* : $C_{11}H_{13}N_5O_4{}^{79}Br$:	$[M + H]^+$	Requis	*m/z*	358,01509
		Expérimental	*m/z*	358,0160

Formation de 98a



Mode opératoire :

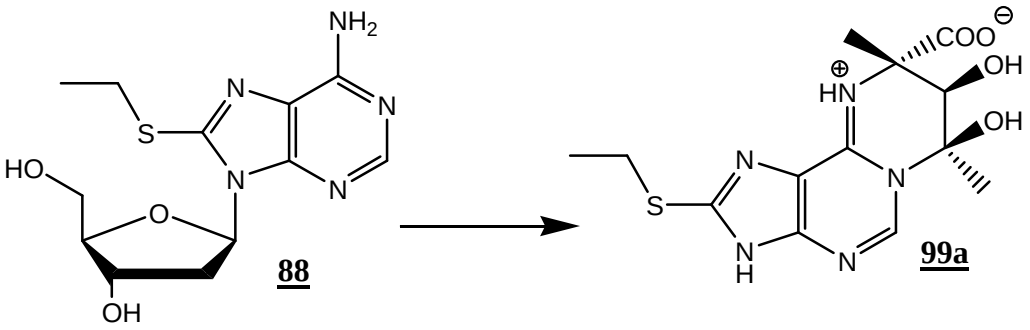
m (**87**) =	n (**87**)=	TR
400 mg	1,41 mmol	10 h

Le mélange majoritaire d'énantiomères **98a** (20 mg ; 0,06 mmol ; Rdt = 5 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

Analyses :

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,60 (1H ; s ; CH) ; 5,13 (1H ; s ; CH) ; 2,31 (3H ; s ; CH_3) ; 1,86 (3H ; s ; CH_3).

Formation de 99a



Mode opératoire :

m (**88**) =	n (**88**) =	TR
290 mg	0,93 mmol	11 h

Le mélange majoritaire d'énantiomères **99a** (41 mg ; 0,13 mmol ; Rdt = 13 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : < 220 °C (décomposition).

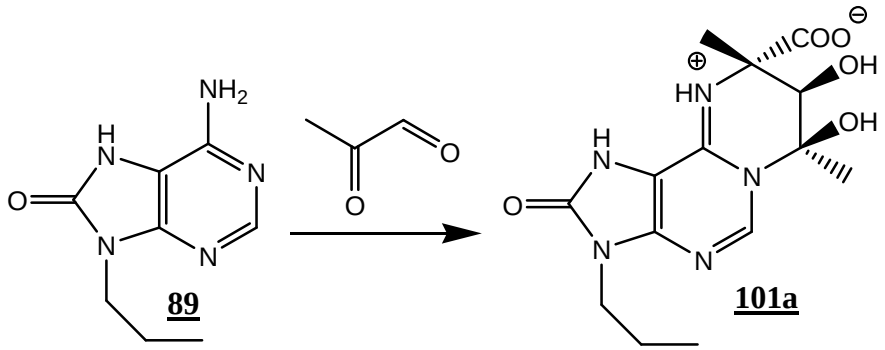
RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,40 (1H ; s ; CH) ; 3,19-3,14 (2H ; m ; CH_2) ; 1,95 (3H ; s ; CH_3) ; 1;62 (3H ; s ; CH_3) ; 1,33 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 177,7 (C_{IV}) ; 153,8 (CH) ; 145,9 (2C_{IV}) ; 118,4 (C_{IV}) ; 76,8 (CH) ; 63,8 (C_{IV}) ; 48,8 (CH_2) ; 26,1 ; (CH_3) ; 21,4 (CH_3) ; 14,1 (CH_3).

Analyse élémentaire : $C_{13}H_{16}N_5O_4$, Na, H_2O, CH_3OH

	C	H	N	S
Valeurs théoriques (%)	39,33	5,16	16,38	7,50
Valeurs expérimentales (%)	39,65	5,11	16,03	7,39

Formation de 101a



Mode opératoire :

m (**89**) =	n (**89**) =	TR
250 mg	1,30 mmol	8 h

Le mélange majoritaire d'énantiomères **101a** (70 mg ; 0,21 mmol ; Rdt = 16 %) est obtenu sous forme de poudre blanche après une cristallisation dans l'iPrOH.

Analyses :

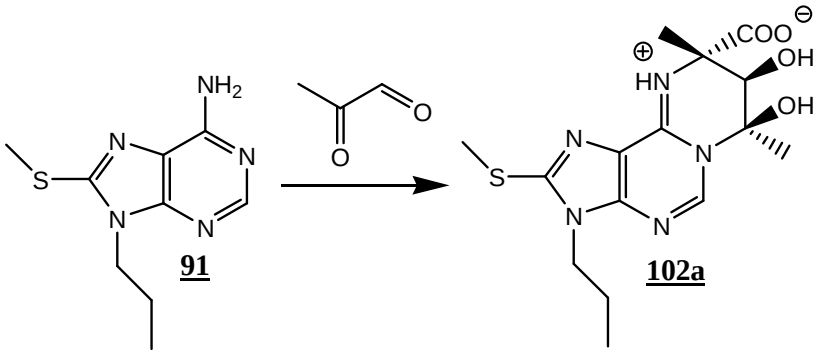
F : 203-204 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,23 (1H ; s ; CH) ; 4,94 (1H ; s ; CH) ; 3,81 (2H ; t ; J = 6,8 ; CH_2) ; 2,10 (3H ; s ; CH_3) ; 1,70 (2H ; m ; CH_2) ; 1,56 (3H ; s ; CH_3) ; 0,87 (3H ; t ; J = 6,8 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 177,8 (COO) ; 149,2 (C_{IV}) ; 146,5 (CH) ; 121,6 (C_{IV}) ; 80,4 (CH) ; 65,0 (C_{IV}) ; 41,7 (CH_2) ; 26,8 (CH_3) ; 21,2 (CH_2) ; 20,4 (CH_3) ; 10,1 (CH_3).

SM : *(ESI [+])* : m/z 338 ($[M+H]^+$) ; m/z 360 ($[M+Na]^+$)

Formation de 102a



Mode opératoire :

m (**91**) =	n (**91**) =	TR
210 mg	0,94 mmol	2 jours

Le mélange majoritaire d'énantiomères **102a** (41 mg ; 0,11 mmol ; Rdt = 12 %) est obtenu sous forme de poudre blanche après une cristallisation dans l'iPrOH.

Analyses :

F : 87-89 °C (décomposition).

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,68 (1H ; s ; CH) ; 4,60 (1H ; s ; CH) ; 4,60 (3H ; m ; CH_2) ; 2,73 (3H ; s ; S-CH_3) ; 1,94-1,50 (8H ; m ; 2CH_3 + CH_2) ; 0,84 (3H ; m ; CH_3).

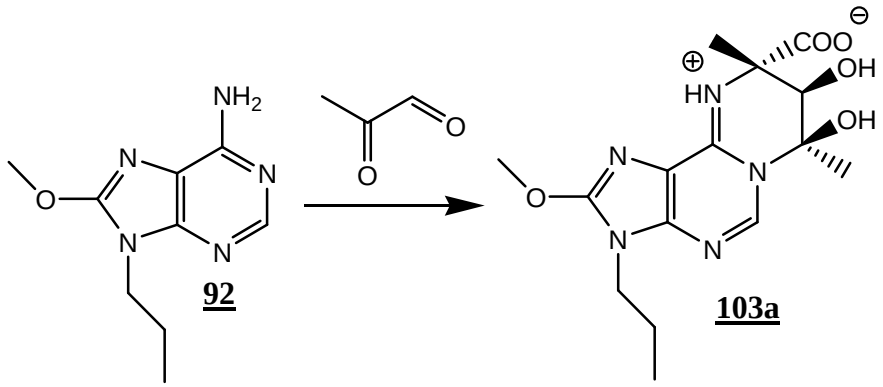
^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : : 177,3 (COO) ; 156,6 (C_{IV}) ; 150,1 (C_{IV}) ; 149,4 (C_{IV}) ; 149,3 (C2) ; 118,7 (C_{IV}) ; 89,1 (C_{IV}) ; 78,8 (CH) ; 63,8 (C_{IV}) ; 45,4 (CH_3) ; 26,1 (CH_3) ; 22,1 (CH_2) ; 11,1 (CH_3) ; 14,1 (CH_2) ; 10,1 (CH_3).

SMHR : *(EI)* : $C_{15}H_{22}N_5O_4S$:	$[M+H]^+$	Requis	*m/z*	368,13925
		Expérimental	*m/z*	368,1390

Analyse élémentaire : $C_{15}H_{20}N_5O_4S$, Na, 1/3 (CH_3OH)

	C	H	N	S
Valeurs théoriques (%)	45,81	5,56	17,05	7,81
Valeurs expérimentales (%)	46,07	5,75	17,18	7,64

Formation de 103a



Mode opératoire :

m (**92**) =	n (**92**) =	TR
190 mg	0,91 mmol	20 h

Le mélange majoritaire d'énantiomères **103a** (114 mg ; 0,33 mmol ; Rdt = 36 %) est obtenu sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : 91-93 °C (décomposition).

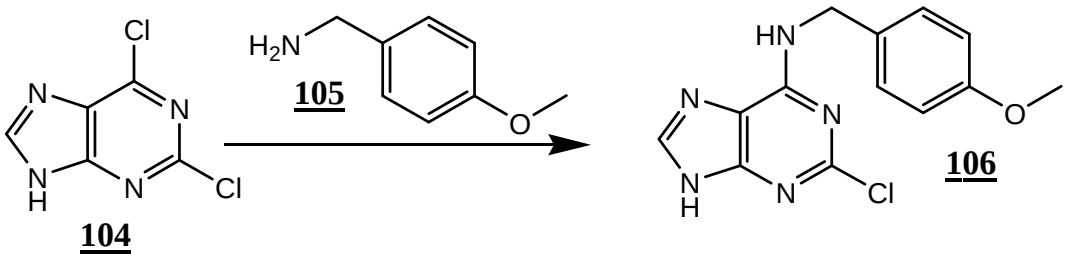
RMN :

^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,59 (1H ; s ; CH) ; 4,70 (1H ; s ; CH) ; 4,19 (3H ; s ; OCH_3) ; 3,96 (2H ; m ; CH_2) ; 1,89 (3H ; sl ; CH_3) ; 1, 75 (2H ; m ; CH_2); 1,66 (3H ; s ; CH_3) ; 0,84 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 177,4 (COO) ; 157,0 (C_{IV}) ; 147,3 (CH) ; 143,8 (C_{IV}) ; 114,6 (C_{IV}) ;90,0 (C_{IV}) ; 72,9 (CH) ; 63,7 (C_{IV}) ; 57,5 (CH_3) ; 43,1 (CH_2) ; 26,1 (CH_3) ; 21,6 (CH_2) ; 21,3 (CH_3) ; 10,0 (CH_3).

SMHR : *(EI)* : $C_{15}H_{21}N_5O_5$:	$[M + H]^+$	Requis	*m/z*	352,19609
		Expérimental	*m/z*	352,1621
	$[M + Na]^+$	Requis	*m/z*	374,14404
		Expérimental	*m/z*	374,1438

Formation de 106

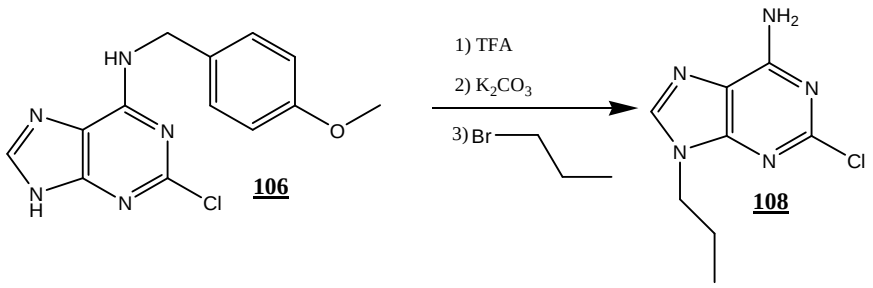


Mode opératoire :

A une solution de 2,6-dichloro-purine **104** (900 mg ; 4,76 mmol) dans du DMF (7 mL) est ajoutée de la triéthylamine (1,32 mL ; 9,52 mmol) et de la *para*-méthoxybenzylamine **105** (683 µL ; 5,24 mmol). Le mélange obtenu est agité à 80 °C sous argon pendant 4h. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est precipité au DCM puis le solide est lavé à l'eau froide. On obtient ainsi le composé attendu **106** (1,23 g ; 4,25 mmol ; Rdt = 90 %) qui se présente sous forme d'une poudre jaune clair.
Le composé **106** est disponible commercialement.

Formation de 108

Voie I

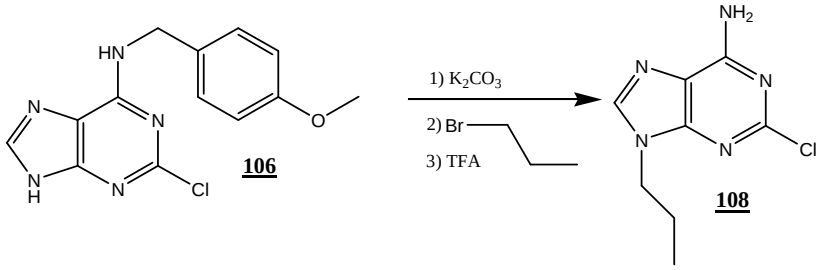


Mode opératoire :

La 2-chloro-6-(*para*-méthoxybenzylamino)purine **106** (1,23 g ; 4,25 mmol) est agitée dans de l'acide trifluoroacétique (10 mL) à 70 °C sous argon pendant 15 min. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est dissout dans du DCM (20 mL) puis est extrait par une solution saturée de $NaHCO_3$ (3 fois 20 mL). La phase organique est soumise à une

évaporation sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est mis en solution dans du DMF (50 mL) et du K_2CO_3 (646 mg ; 4,68 mmol) est ajouté. Le mélange obtenu est agité à température ambiante pendant 2 h. Du bromopropane (425 µL ; 4,68 mmol) est ensuite ajouté. Le mélange obtenu est agité à température ambiante pendant 24 h. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est chromatographié sur colonne de silice. On obtient ainsi le composé attendu **108** (539 mg ; 2,55 mmol ; Rdt = 60 %) qui se présente sous forme d'un solide blanc.

Voie II :



Mode opératoire :

A une solution de 2-chloro-6-(*para*-méthoxybenzylamino)-purine **106** (612 g ; 4,53 mmol) dans du DMF (10 mL) est ajouté du K_2CO_3 (1,47 g ; 10,64 mmol). Le mélange obtenu est agité à température ambiante pendant 1 h. Du bromopropane (502 µL ; 5,54 mmol) est ensuite ajouté. Le mélange obtenu est agité à température ambiante pendant 2 jours. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est chromatographié sur colonne de silice. Les fractions contenant le composé intermédiaire attendu sont agitées dans de l'acide trifluoroacétique (10 mL) à 70 °C sous argon pendant 15 min. Après évaporation sous pression réduite le résidu obtenu est dissout dans du DCM (20 mL) puis est extrait par une solution saturée de $NaHCO_3$ (3 fois 20 mL). La phase organique est soumise à une évaporation sous pression réduite puis est chromatographiée sur colonne de silice. On obtient ainsi le composé attendu **108** (489 mg ; 2,31 mmol ; Rdt = 51 %) qui se présente sous forme d'une poudre blanche.

Analyses : (Maruyama, 2000)

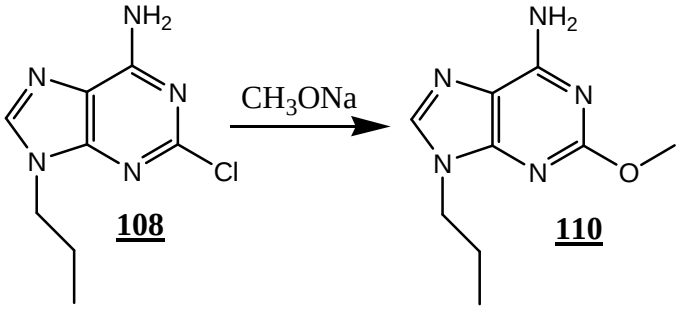
F : 176-179 °C (décomposition). Litt : 168-172 °C

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 7,82 (1H ; s ; CH) ; 6,08 (2H ; s ; NH_2) ; 4,15 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 1,93 (2H ; sext ; J = 7,2 ; CH_2) ; 0,97 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; $CDCl_3$)* δ_C : 156,2 (C_{IV}) ; 154,4 (C_{IV}) ; 151,2 (C_{IV}) ; 140,8 (CH) ; 117,8 (C_{IV}) ; 46,0 (CH_2) ; 23,5 (CH_2) ; 11,3(CH_3).

SM : *(ESI [+])* : m/z 212 ($[M+H]^+$) ; m/z 234 ($[M+Na]^+$)

Formation de 110



Mode opératoire :

La 2-chloro-9-propyladénine **108** (200 mg ; 0,94 mmol) est dissoute dans du MeOH anhydre (18 mL) puis du méthanolate de sodium (408 mg ; 9,45 mmol) est ajouté. Le mélange est agité à reflux, sous argon, pendant 3 jours. Après neutralisation par ajout d'HCl (1 M), le milieu réactionnel est soumis à une évaporation sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est dissout dans l'eau (20 mL) puis est extrait par 3 fois 50 mL de DCM. Après évaporation de la phase organique, on obtient la 2-méthoxy-9-propyladénine **110** sous forme de poudre blanche (156 mg ; 0,75 mmol; Rdt = 81 %).

Analyses :

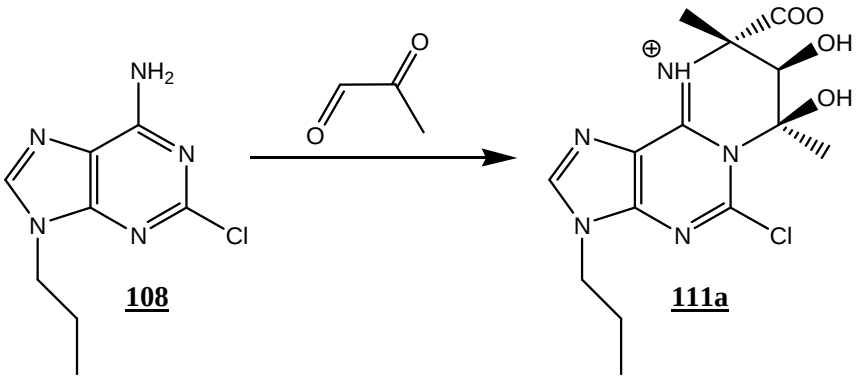
F : 203-205 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; $CDCl_3$)* δ_H : 7,63 (1H ; s ; CH) ; 5,77 (2H ; sl ; NH_2) ; 4,07 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 3,96 (3H ; s ; O-CH_3) ; 1,90 (2H ; m ; CH_2) ; 0,95 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; $CDCl_3$)* δ_C : 162,6 (C_{IV}) ; 156,4 (C_{IV}) ; 152,2 (C_{IV}) ; 139,4 (CH) ; 116,0 (C_{IV}) ; 54,8 (CH_3) ; 45,5 (CH_2) ; 23,4 (CH_2) ; 11,4 (CH_3).

SM : *(ESI [+])* : m/z 208 ($[M+H]^+$) ; m/z 230 ($[M+Na]^+$)

Formation de 111a



108 **111a**

Mode opératoire :

La 2-chloro-9-propyladénine **108** (300 mg ; 1,42 mmol) est dissoute dans une solution contenant la solution aqueuse commerciale de MG à 40 % (1,2 mL ; 11,34 mmol). Le mélange est chauffé à 50 °C sous argon pendant 7 jours. Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à deux chromatographies sur cartouche de phase inverse C_8 en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de MeOH. Après évaporation sous pression réduite, les fractions présentant le produit sont chromatographiées sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient le mélange majoritaire d'énantiomères **111a** (45 mg ; 126 µmol ; Rdt = 9 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

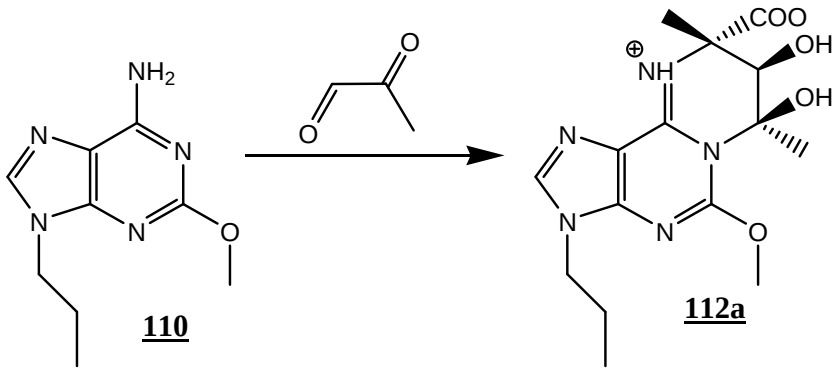
F : 99-101 °C.

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 8,08 (1H ; s ; CH) ; 4,94 (1H ; s ; CH) ; 4,09 (2H ; t ; J = 7,2 ; CH_2) ; 2,13 (3H ; s ; CH_3) ; 1,81 (2H ; sext ; J = 7,2 ; CH_2) ; 1,63 (3H ; s ; CH_3) ; 0,85 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 177,2 (COO) ; 152,7 (C_{IV}) ; 151,9 (C_{IV}) ; 149,2 (C_{IV}) ; 142,7 (CH) ; 142,0 (C_{IV}) ; 118,1 (C_{IV}) ; 81,3 (CH) ; 65,2 (C_{IV}) ; 45,7 (CH_2) ; 27,0 (CH_3) ; 22,7 (CH_2) ; 20,5 (CH_3) ; 10,1 (CH_3).

SMHR : *(EI)* : $C_{14}H_{18}N_5O_5{}^{35}Cl$:	$[M + Na]^+$	Requis	*m/z*	378,09450
		Expérimental	*m/z*	378,0945
	$[M – H + 2Na]^+$	Requis	*m/z*	400,07645
		Expérimental	*m/z*	400,0776

Formation de 112a



Mode opératoire :

La 2-méthoxy-9-propyladénine **110** (120 mg ; 0,58 mmol) est dissoute dans une solution contenant la solution aqueuse commerciale de MG à 40% (0,7 mL ; 4,64 mmol). Le mélange est chauffé à 50°C sous argon pendant 24 h. Après évaporation sous pression réduite, le milieu réactionnel est soumis à deux chromatographie sur cartouche de phase inverse C_8 en éluant avec de l'eau et un gradient croissant de MeOH. Après évaporation sous pression réduite, les fractions présentant le produit sont chromatographiées sur colonne de silice en éluant avec du DCM et un gradient croissant de MeOH. On obtient le mélange majoritaire d'énantiomères **112a** (31 mg ; 0,88 mmol ; Rdt = 15 %) qui se présente sous forme de poudre blanche.

Analyses :

F : 135 °C (décomposition).

RMN : ^{1}H : *(400 MHz ; D_2O)* δ_H : 7,78 (1H ; s ; CH) ; 4,99 (1H ; s ; CH) ; 3,99-3,89 (5H ; m ; O-CH_3 + CH_2) ; 2,12 (3H ; s ; CH_3) ; 1,75 (2H ; m ; CH_2) ; 1,63 (3H ; s ; CH_3) ; 0,78 (3H ; t ; J = 7,2 ; CH_3).

^{13}C : *(100 MHz ; D_2O)* δ_C : 177,8 (COO) ; 161,4 (C_{IV}) ; 153,7 (C_{IV}) ; 150,4 (C_{IV}) ; 141,6 (CH) ; 115,5 (C_{IV}) ; 81,4 (CH) ; 64,9 (C_{IV}) ; 52,2 (O- CH_3 ou CH_2) ; 45,5 (O- CH_3 ou CH_2) ; 27,4 (CH_3) ; 22,7 (CH_2) ; 20,4 (CH_3) ; 10,4 (CH_3).

SM : *(ESI [+])* : m/z 352 ($[M+H]^+$) ; m/z 374 ($[M+Na]^+$)

SMHR : *(EI)* : $C_{15}H_{21}N_5O_5$:	$[M + Na]^+$	Requis	*m/z*	374,14404
		Expérimental	*m/z*	374,1436
	$[M – H + 2Na]^+$	Requis	*m/z*	396,12598
		Expérimental	*m/z*	396,1261

Bibliographie

Ai T; Bompadre S G; Sohma Y; Wang X H; Li M; Hwang T C, **2004**. Direct effects of 9-anthracene compounds on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gating, *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology 449*, 88.

Ai T; Bompadre S G; Wang X H; Hu S H; Li M; Hwang T C, **2004**. Capsaicin potentiates wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride-channel currents, *Molecular Pharmacology 65*, 1415.

Alarcon K; Demeunynck M; Lhomme J; Carrez D; Croisy A, **2001**. Diaminopurine-acridine heterodimers for specific recognition of abasic site containing DNA. Influence on the biological activity of the position of the linker on the purine ring, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 11*, 1855.

Amaral M D; Kunzelmann K, **2007**. Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis, *Trends in Pharmacological Sciences 28*, 334.

Bachmann A; Russ U; Quast U, **1999**. Potent inhibition of the CFTR chloride channel by suramin, *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 360*, 473.

Becq F, **2006**. On the discovery and development of CFTR chloride channel activators, *Current Pharmaceutical Design 12*, 471.

Becq F; Mettey Y; Gray M A; Galietta L J V; Dormer R L; Merten M; Metaye T; Chappe V; Marvingt-Mounir C; Zegarra-Moran O; Tarran R; Bulteau L; Derand R; Pereira M M C; McPherson M K; Rogier C; Joffre M; Argent B E; Sarrouilhe D; Kammouni W; Figarella C; Verrier B; Gola M; Vierfond J M, **1999**. Development of substituted benzo[c]quinolizinium compounds as novel activators of the cystic fibrosis chloride channel, *Journal of Biological Chemistry 274*, 27415.

Bedwell D M; Kaenjak A; Benos D J; Bebok Z; Bubien J K; Hong J; Tousson A; Clancy J P; Sorscher E J, **1997**. Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line, *Nature Medicine 3*, 1280.

Berger A L; Randak C O; Ostedgaard L S; Karp P H; Vermeer D W; Welsh M J, **2005**. Curcumin stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl- channel activity, *Journal of Biological Chemistry 280*, 5221.

Best J A; Quinton P M, **2005**. Salivary secretion assay for drug efficacy for cystic fibrosis in mice, *Experimental Physiology 90*, 189.

Brownlee M, **2001**. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature 414*, 813.

Burke J F; Mogg A E, **1985**. Suppression of a Nonsense Mutation in Mammalian-Cells Invivo by the Aminoglycoside Antibiotics G-418 and Paromomycin, *Nucleic Acids Research 13*, 6265.

Caci E; Folli C; Zegarra-Moran O; Ma T H; Springsteel M F; Sammelson R E; Nantz M H; Kurth M J; Verkman A S; Galietta L J V, **2003**. CFTR activation in human bronchial epithelial cells by novel benzoflavone and benzimidazolone compounds, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 285*, L180.

Cai Z; Li H; Scott-Ward T S; Sheppard D N. (2003). "Pharmacology of the CFTR Cl-Channel." from http://central.igc.gulbenkian.pt/cftr//vr/d/sheppard_pharmacology_cftr_cl_channel.pdf.

Cai Z; Scott-Ward T S; Li H; Schmidt A; Sheppard D N, **2004**. Strategies to investigate the mechanism of action of CFTR modulators, *J Cyst Fibros 3 Suppl 2*, 141.

Clancy J P; Bobok Z; Ruiz F; King C; Jones J; Walker L; Greer H; Hong J; Wing L; Macaluso M; Lyrene R; Sorscher E J; Bedwell D M, **2001**. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 163*, 1683.

Cuppoletti J; Tewari K P; Sherry A M; Kupert E Y; Malinowska D H, **2001**. ClC-2Cl(-) channels in human lung epithelia: activation by arachidonic acid, amidation, and acid-activated omeprazole, *American Journal of Physiology-Cell Physiology 281*, C46.

Cystic-Fibrosis-Foundation. from http://www.cff.org/treatments/Pipeline/.

Davis P B; Drumm M L, **2004**. Some like it hot: curcumin and CFTR, *Trends in Molecular Medicine 10*, 473.

deCarvalho A C V; Ndi C P; Tsopmo A; Tane P; Ayafor J; Connolly J D; Teem J L, **2002**. A novel natural product compound enhances cAMP-regulated chloride conductance of cells expressing CFTR Delta F508, *Molecular Medicine 8*, 75.

Denning G M; Anderson M P; Amara J F; Marshall J; Smith A E; Welsh M J, **1992**. Processing of Mutant Cystic-Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is Temperature-Sensitive, *Nature 358*, 761.

Devillers I; Dive G; De Tollenaere C; Falmagne B; de Wergifosse B; Rees J F; Marchand-Brynaert J, **2001**. Imidazolopyrazinones as potential antioxidants, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 11*, 2305.

Diena T; Melani R; Caci E; Pedemonte N; Sondo E; Zegarra-Moran O; Galietta L J V, **2007**. Block of CFTR-dependent chloride currents by inhibitors of multidrug resistance-associated proteins, *European Journal of Pharmacology 560*, 127.

Field M, **2003**. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea, *Journal of Clinical Investigation 111*, 931.

Fischer H; Machen T E; Widdicombe J H; Carlson T J S; King S R; Chow J W S; Illek B, **2004**. A novel extract SB-300 from the stem bark latex of Croton lechleri inhibits CFTR-mediated chloride secretion in human colonic epithelial cells, *Journal of Ethnopharmacology 93*, 351.

Fuller M D; Thompson C H; Zhang Z R; Freeman C S; Schay E; Szakacs G; Bakos E; Sarkadi B; McMaster D; French R J; Pohl J; Kubanek J; McCarty N A, **2007**. State-dependent inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by a novel peptide toxin, *Journal of Biological Chemistry 282*, 37545.

Gabriel S E; Brigman K N; Koller B H; Boucher R C; Stutts M J, **1994**. Cystic-Fibrosis Heterozygote Resistance to Cholera-Toxin in the Cystic-Fibrosis Mouse Model, *Science 266*, 107.

Gabriel S E; Davenport S E; Steagall R J; Vimal V; Carlson T; Rozhon E J, **1999**. A novel plant-derived inhibitor of cAMP-mediated fluid and chloride secretion, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 276*, G58.

Garnier E; Guillard J; Pasquinet E; Suzenet F; Poullain D; Jarry C; Leger J M; Lebret B; Guillaumet G, **2003**. Highly diastereoselective synthesis of C(6)-functionalized dihydroimidazotriazines, *Organic Letters 5*, 4595.

Ghosh K; Sen T; Froehlich R, **2007**. Adenine-based receptor for dicarboxylic acids, *Tetrahedron Letters 48*, 7022.

Ghosh M; Talukdar D; Ghosh S; Bhattacharyya N; Ray M; Ray S, **2006**. In vivo assessment of toxicity and pharmacokinetics of methylglyoxal - Augmentation of the curative effect of methylglyoxal on cancer-bearing mice by ascorbic acid and creatine, *Toxicology and Applied Pharmacology 212*, 45.

Gi U-S; Baltes W, **1995**. Model Reactions on Roast Aroma Formation. 15. Investigations on the Formation of Pyrido[3,4-d]imidazoles during the Maillard Reactions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry 43*, 2226.

Gong X D; Linsdell P; Cheung K H; Leung G P H; Wong P Y D, **2002**. Indazole inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl- channels in rat epididymal epithelial cells, *Biology of Reproduction 67*, 1888.

Hanrahan J W; Wioland M-A, **2004**. Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function, *Proc Am Thorac Soc 1*, 17.

Hao L M; Liu X; Xu L N; Zhu N; Lin S; Hou S G; Zhou N; Shi D C; Shang D J; Ma T H; Yang H, **2008**. Natural compound curcumin corrects the gating defect of G551Dmutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *Chemical Research in Chinese Universities 24*, 92.

He C Y; Zhao L; Liu Y L; Xu L N; Shang D J; Yang H, **2004**. A class of high-affinity bicyclooctane G551D-CFTR activators identified by high throughput screening, *Chemical Research in Chinese Universities 20*, 743.

Hogenauer C; Santa Ana C A; Porter J L; Millard M; Gelfand A; Rosenblatt R L; Prestidge C B; Fordtran J S, **2000**. Active intestinal chloride secretion in human carriers of cystic fibrosis mutations: An evaluation of the hypothesis that heterozygotes have subnormal active intestinal chloride secretion, *American Journal of Human Genetics 67*, 1422.

Holy A, **1978**. Synthesis of new mono- and disubstituted hydroxyalkyl and aminoalkyl derivatives of heterocyclic bases, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications 43*, 3444.

Ito Y; Aoyama M; Yamada N; Mizuno Y; Kume H; Yamaki K, **2001**. [(Dihydroindenyl) oxy]alkaonic acid inhibits the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *European Journal of Pharmacology 426*, 175.

Jang H Y; Huddleston R R; Krische M J, **2003**. A new catalytic C-C bond-forming hydrogenation: Reductive coupling of dienes and glyoxals under catalytic hydrogenation conditions, *Angewandte Chemie-International Edition 42*, 4074.

Jang H Y; Huddleston R R; Krische M J, **2004**. Hydrogen-mediated C-C bond formation: Catalytic regio- and stereoselective reductive condensation of alpha-keto aldehydes and 1,3-enynes, *Journal of the American Chemical Society 126*, 4664.

Jin L L; Liu X; Sun Y; Lin S; Zhou N; Xu L N; Yu B; Hou S G; Yang H, **2008**. Activation of CFTR-mediated Cl- transport by magnolin, *Chemical Research in Chinese Universities 24*, 187.

Kalapos M P, **1999**. Methylglyoxal in living organisms - Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications, *Toxicology Letters 110*, 145.

Kerem E, **2006**. Mutation specific therapy in CF, *Paediatric Respiratory Reviews 7*, S166.

Konstas A A; Koch J P; Tucker S J; Korbmacher C, **2002**. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent up-regulation of Kir1.1 (ROMK) renal K+ channels by the epithelial sodium channel, *Journal of Biological Chemistry 277*, 25377.

Kotian P L; Kumar V S; Lin T H; El-Kattan Y; Ghosh A; Wu M W; Cheng X G; Bantia S; Babu Y; Chand P, **2006**. An efficient synthesis of acyclic N-7- and N-9-adenine nucleosides via alkylation with secondary carbon electrophiles to introduce versatile functional groups at the C-1 position of acyclic moiety, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids 25*, 121.

Kuroda N K, Akiyama S., **1993**. Chemiluminescence method for the determination of adenine after reaction with phenylglyoxal, *Analytica Chimica Acta 278*, 275.

Laayoun A (1992). Nucleoside modifies et lesions de l'ADN - mise au point d'une nouvelle methode de synthese d'oligonucleotides a site abasique, universite Jouseph Fourier - Grenoble I.

Laayoun A; Decout J L; Lhomme J, **1994**. Hydrolysis of 2'-Deoxypurine Nucleosides - the Effect of Substitution at the C-8 Position, *Tetrahedron Letters 35*, 4989.

Lallemand J Y; Stoven V; Annereau J P; Boucher J; Blanquet S; Barthe J; Lenoir G, **1997**. Induction by antitumoral drugs of proteins that functionally complement CFTR: a novel therapy for cystic fibrosis?, *Lancet 350*, 711.

Lambertucci C; Cristalli G; Dal Ben D; Kachare D D; Bolcato C; Klotz K-N; Spalluto G; Volpini R, **2007**. New 2,6,9-trisubstituted adenines as adenosine receptor antagonists: a preliminary SAR profile, *Purinergic Signalling 3*, 339.

Lazrek H B; Taourirte M; Oulih T; Barascut J L; Imbach J L; Pannecouque C; Witrouw M; De Clercq E, **2001**. Synthesis and anti-HIV activity of new modified 1,2,3-triazole acyclonucleosides, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 20*, 1949.

Li Y Y; Cohenford M A; Dutta U; Dain J A, **2008**. The structural modification of DNA nucleosides by nonenzymatic glycation: an in vitro study based on the reactions of glyoxal and methylglyoxal with 2 '-deoxyguanosine, *Analytical and Bioanalytical Chemistry 390*, 679.

Linsdell P, **2000**. Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel currents by arachidonic acid, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 78*, 490.

Linton K J, **2007**. Structure and function of ABC transporters, *Physiology (Bethesda) 22*, 122.

Liu J; Liu L D; Wang S M; Xu L N; Yu B; Lin S; Hou S G; Zhou N; Jin L L; Yang H, **2007**. Dictamine stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl-transport, *Chemical Research in Chinese Universities 23*, 554.

Liu J; Na W L; Xin W H; Liu L D; Yu B; Ma T H; Yang H, **2008**. Natural compound 20(S)-protopanaxadiol activates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel, *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese 29*, 731.

Liu L; Chen M; Cai K, **1992**. Oxidation of a-methyl or a-methylene groups in carbonyl compounds with ammonium chlorochromate, *Chinese Chemical Letters 3*, 585.

Loussouarn G; Demolombe S; MohammadPanah R; Escande D; Baro I, **1996**. Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K+ currents, *American Journal of Physiology-Cell Physiology 40*, C1565.

Ma T H; Thiagarajah J R; Yang H; Sonawane N D; Folli C; Galietta L J V; Verkman A S, **2002**. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion, *Journal of Clinical Investigation 110*, 1651.

Ma T H; Vetrivel L; Yang H; Pedemonte N; Zegarra-Moran O; Galietta L J V; Verkman A S, **2002**. High-affinity activators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride conductance identified by high-throughput screening, *Journal of Biological Chemistry 277*, 37235.

Mall M; Bleich M; Greger R; Schreiber R; Kunzelmann K, **1998**. The amiloride-inhibitable Na+ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance

regulator in normal but not in cystic fibrosis airways, *Journal of Clinical Investigation 102*, 15.

Marcet B; Becq F; Norez C; Delmas P; Verrier B, **2004**. General anesthetic octanol and related compounds activate wild-type and delF508 cystic fibrosis chloride channels, *British Journal of Pharmacology 141*, 905.

Marivingt-Mounir C; Norez C; Derand R; Bulteau-Pignoux L; Nguyen-Huy D; Viossat B; Morgant G; Becq F; Vierfond J M; Mettey Y, **2004**. Synthesis, SAR, crystal structure, and biological evaluation of benzoquinoliziniums as activators of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels, *Journal of Medicinal Chemistry 47*, 962.

Maruyama T; Kozai S; Sasaki F, **2000**. Method for the synthesis of uric acid derivatives, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 19*, 1193.

Meade S J; Miller A G; Gerrard J A, **2003**. The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study, *Bioorg Med Chem 11*, 853.

Montgomery J A; Thomas H J, **1965**. Use of allyl group as a blocking group for synthesis of N-substituted purines, *Journal of Organic Chemistry 30*, 3235.

Mornon J P; Lehn P; Callebaut I, **2008**. Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: Membrane-spanning domains and coupling interfaces, *Cellular and Molecular Life Sciences 65*, 2594.

Morral N; Bertranpetit J; Estivill X; Nunes V; Casals T; Gimenez J; Reis A; Varonmateeva R; Macek M; Kalaydjieva L; Angelicheva D; Dancheva R; Romeo G; Russo M P; Garnerone S; Restagno G; Ferrari M; Magnani C; Claustres M; Desgeorges M; Schwartz M; Schwarz M; Dallapiccola B; Novelli G; Ferec C; Dearce M; Nemeti M; Kere T; Anvret M; Dahl N; Kadasi L, **1994**. The Origin of the Major Cystic-Fibrosis Mutation (Delta-F508) in European Populations, *Nature Genetics 7*, 169.

Muanprasat C; Kaewmokul S; Chatsudthipong V, **2007**. Identification of new small molecule inhibitors of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein: In vitro and in vivo studies, *Biological & Pharmaceutical Bulletin 30*, 502.

Muanprasat C; Sonawane N D; Salinas D; Taddei A; Galietta L J V; Verkman A S, **2004**. Discovery of glycine hydrazide pore-occluding CFTR inhibitors: Mechanism, structure-activity analysis, and in vivo efficacy, *Journal of General Physiology 124*, 125.

Nemet I; Vikic-Topic D; Varga-Defterdarovic L, **2004**. Spectroscopic studies of methylglyoxal in water and dimethylsulfoxide, *Bioorganic Chemistry 32*, 560.

Nielsen M; Thomsen A H; Clo E; Kirpekar F; Gothelf K V, **2004**. Synthesis of Linear and Tripoidal Oligo(phenyleneethynylene)-Based Building Blocks for Application in Modular DNA-Programmed Assembly, *Journal of Organic Chemistry 69*, 2240.

Nissim-Rafinia M; Aviram M; Randell S H; Shushi L; Ozeri E; Chiba-Falek O; Eidelman O; Pollard H B; Yankaskas J R; Kerem B, **2004**. Restoration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function by splicing modulation, *Embo Reports 5*, 1071.

Noel S; Faveau C; Norez C; Rogier C; Mettey Y; Becq F, **2006**. Discovery of pyrrolo[2,3-b] pyrazines derivatives as submicromolar affinity activators of wild type, G551D, and F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 319*, 349.

Norez C; Noel S; Wilke M; Bijvelds M; Jorna H; Melin P; DeJonge H; Becq F, **2006**. Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat, *Febs Letters 580*, 2081.

Ohba Y; Sakata M; Zaitsu K, **2000**. Chemiluminescence derivatization of methylglyoxal using 2-aminonicotinic acid, *Chem Pharm Bull (Tokyo) 48*, 1236.

Oya T; Hattori N; Mizuno Y; Miyata S; Maeda S; Osawa T; Uchida K, **1999**. Methylglyoxal modification of protein - Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts, *Journal of Biological Chemistry 274*, 18492.

Pariwat P; Homvisasevongsa S; Muanprasat C; Chatsudthipong V, **2008**. A natural plant-derived dihydroisosteviol prevents cholera toxin-induced intestinal fluid secretion, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 324*, 798.

Pedemonte N; Boido D; Moran O; Giampieri M; Mazzei M; Ravazzolo R; Galietta L J V, **2007**. Structure-activity relationship of 1,4-dihydropyridines as potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel, *Molecular Pharmacology 72*, 197.

Pedemonte N; Diena T; Caci E; Nieddu E; Mazzei M; Ravazzolo R; Zegarra-Moran O; Galietta L J V, **2005**. Antihypertensive 1,4-dihydropyridines as correctors of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating defect caused by cystic fibrosis mutations, *Molecular Pharmacology 68*, 1736.

Pedemonte N; Sonawane N D; Taddei A; Hu J; Zegarra-Moran O; Suen Y F; Robins L I; Dicus C W; Willenbring D; Nantz M H; Kurth M J; Galietta L J V; Verkman A S, **2005**. Phenylglycine and sulfonamide correctors of defective Delta F508 and G551D cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride-channel gating, *Molecular Pharmacology 67*, 1797.

Petrov V I; Ozerov A A; Novikov M S; Pannecouque C; Balzarini J; De Clercq E, **2003**. 9-(2-aryloxyethyl) derivatives of adenine - a new class of non-nucleosidic antiviral agents, *Chemistry of Heterocyclic Compounds (New York, NY, United States)(Translation of Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii) 39*, 1218.

Pier G B; Grout M; Zaidi T; Meluleni G; Mueschenborn S S; Banting G; Ratcliff R; Evans M J; Colledge W H, **1998**. Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells, *Nature 393*, 79.

Poolman E M; Galvani A P, **2007**. Evaluating candidate agents of selective pressure for cystic fibrosis, *Journal of the Royal Society Interface 4*, 91.

Price F C, **1962**. New: liquid-process sodium silicate, *Chem. Eng. 69*, 76.

Ranganathan D; Rathi R, **1990**. Urea cycle: chemical simulation of arginine biosynthesis, *Journal of Organic Chemistry 55*, 2351.

Rasmussen M; Hope J M, **1982**. Heterocyclic ambident nucleophiles. III. The alkylation of sodium adenide, *Australian Journal of Chemistry 35*, 525.

Riordan J R, **2005**. Assembly of functional CFTR chloride channels, *Annual Review of Physiology 67*, 701.

Riordan J R, **2008**. CFTR Function and Prospects for Therapy, *Annu Rev Biochem 77*, 701.

Riordan J R; Rommens J M; Kerem B; Alon N; Rozmahel R; Grzelczak Z; Zielenski J; Lok S; Plavsic N; Chou J L; et al., **1989**. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA, *Science 245*, 1066.

Roussey M. (2000). "La Mucoviscidose ", from http://www.med.univ-rennes1.fr/etud/pediatrie/mucoviscidose.htm.

Routaboul C (2003). Nouvelle réaction du méthylglyoxal avec des bases nucléiques et des composés apparentés. Accès à de nouvelles familles d'hétérocycles., Joseph Fourier - Grenoble I.

Routaboul C; Dumas L; Gautier-Luneau I; Vergne J; Maurel M C; Decout J L, **2002**. New stereoselective reaction of methylglyoxal with 2-aminopyridine and adenine derivatives: Formation of imino acid-nucleic base derivatives in water under mild conditions, *Chemical Communications* 1114.

Routaboul C; Norez C; Melin P; Molina M C; Boucherle B; Bossard F; Noel S; Robert R; Gauthier C; Frederic B; Decout J L, **2007**. Discovery of alpha-aminoazaheterocycle-methylglyoxal adducts as a new class of high-affinity inhibitors of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 322*, 1023.

Rowntree R K; Harris A, **2003**. The phenotypic consequences of CFTR mutations, *Annals of Human Genetics 67*, 471.

Sammelson R E; Ma T; Galietta L J V; Verkman A S; Kurth M J, **2003**. 3-(2-benzyloxyphenyl)isoxazoles and isoxazolines: Synthesis and evaluation as CFTR activators, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 13*, 2509.

Schultz B D; Venglarik C J; Bridges R J; Frizzell R A, **1995**. Regulation of Cftr Cl- Channel Gating by Adp and Atp Analogs, *Journal of General Physiology 105*, 329.

Schwiebert E M; Benos D J; Egan M E; Stutts M J; Guggino W B, **1999**. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel, *Physiol Rev 79*, S145.

Sermet-Gaudelus I; Stoven V; Annereau J P; Witko-Sarsat V; Reinert P; Guyot M; Descamps-Latscha B; Lallemand J Y; Lenoir G, **1999**. Interest of colchicine for the treatment of cystic fibrosis patients. Preliminary report, *Mediators of Inflammation 8*, 13.

Sheppard D N, **2004**. CFTR channel pharmacology: Novel pore blockers identified by high-throughput screening, *Journal of General Physiology 124*, 109.

Sheppard D N; Welsh M J, **1999**. Structure and function of the CFTR chloride channel, *Physiol Rev 79*, S23.

Singh A K; Devor D C; Gerlach A C; Gondor M; Pilewski J M; Bridges R J, **2000**. Stimulation of Cl- secretion by chlorzoxazone, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 292*, 778.

Soltani Rad M N; Khalafi-Nezhad A; Behrouz S; Faghihi M A; Zare A; Parhami A, **2008**. One-pot synthesis of N-alkyl purine and pyrimidine derivatives from alcohols using TsIm: a rapid entry into carboacyclic nucleoside synthesis, *Tetrahedron 64*, 1778.

Sonawane N D; Hu J; Muanprasat C; Verkman A S, **2005**. Luminally active, nonabsorbable CFTR inhibitors as potential therapy to reduce intestinal fluid loss in cholera, *Faseb Journal 19*, 130.

Sonawane N D; Zhao D; Zegarra-Moran O; Galietta L J V; Verkman A S, **2007**. Lectin conjugates as potent, nonabsorbable CFTR inhibitors for reducing intestinal fluid secretion in cholera, *Gastroenterology 132*, 1234.

Szkotak A J; Murthy M; MacVinish L J; Duszyk M; Cuthbert A W, **2004**. 4-chloro-benzo[F]isoquinoline (CBIQ) activates CFTR chloride channels and KCNN4 potassium channels in Calu-3 human airway epithelial cells, *British Journal of Pharmacology 142*, 531.

Thiagarajah J R; Verkman A S, **2005**. New drug targets for cholera therapy, *Trends in Pharmacological Sciences 26*, 172.

Thibon J; Latxague L; Deleris G, **1997**. Synthesis of Silicon Analogs of Acyclonucleotides Incorporable in Oligonucleotide Solid-Phase Synthesis, *Journal of Organic Chemistry 62*, 4635.

Thornalley P J, **1996**. Pharmacology of methylglyoxal: Formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification - A role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy, *General Pharmacology 27*, 565.

van der Deen M; de Vries E G E; Timens W; Scheper R J; Timmer-Bosscha H; Postma D S, **2005**. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung, *Respiratory Research 6*,

Van Herreweghe F; Mao J Q; Chaplen F W R; Grooten J; Gevaert K; Vandekerckhove J; Vancompernolle K, **2002**. Tumor necrosis factor-induced modulation of glyoxalase I

activities through phosphorylation by PKA results in cell death and is accompanied by the formation of a specific methyl glyoxal-derived AGE, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99*, 949.

Vangoor F F; Hadida Ruah S S; Singh A K; Olson E R; Makings L R; Gonzalez J E, III; Rader J A; Chambers F, III; Miller M T; Grootenhuis P; Liu Y (2004). Preparation of substituted pyrazoles as modulators of ATP-binding cassette transporters. Application: WO, (Vertex Pharmaceuticals Incorporated, USA). 174 pp.

Vankeerberghen A; Cuppens H; Cassiman J-J, **2002**. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions, *J Cyst Fibros 1*, 13.

Venglarik C J; Bridges R J; Frizzell R A, **1990**. A Simple Assay for Agonist-Regulated Cl and K-Conductances in Salt-Secreting Epithelial-Cells, *American Journal of Physiology 259*, C358.

Verhe R; Courtheyn D; de Kimpe N; de Buyck L; Schamp N, **1982**. Preparation of 1,1-dialkoxy-2-alkanones, *Synthesis* 667.

Vidal® Dictionnaire Vidal.

Wang W; Bernard K; Li G; Kirk K L, **2007**. Curcumin opens cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels by a novel mechanism that requires neither ATP binding nor dimerization of the nucleotide-binding domains, *Journal of Biological Chemistry 282*, 4533.

Wang W; Li G; Clancy J P; Kirk K L, **2005**. Activating cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels with pore blocker analogs, *Journal of Biological Chemistry 280*, 23622.

Welsh M J; Smith A E, **1993**. Molecular Mechanisms of Cftr Chloride Channel Dysfunction in Cystic-Fibrosis, *Cell 73*, 1251.

Wilschanski M; Yahav Y; Yaacov Y; Blau H; Bentur L; Rivlin J; Aviram M; Bdolah-Abram T; Bebok Z; Shushi L; Kerem B; Kerem E, **2003**. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations, *New England Journal of Medicine 349*, 1433.

Wyde P R; Ambrose M W; Meyerson L R; Gilbert B E, **1993**. The Antiviral Activity of Sp-303, a Natural Polyphenolic Polymer, against Respiratory Syncytial and Parainfluenza Type-3 Viruses in Cotton Rats, *Antiviral Research 20*, 145.

Xu H; Shen W; Tang Y; Shen J; Shan W; Du J (2005). Preparation for 2-oxobutanal from 1,2-butanediol. Application: CN, (Fudan University, Peop. Rep. China). 6 pp.

Yang H; Shelat A A; Guy R K; Gopinath V S; Ma T H; Du K; Lukacs G L; Taddei A; Folli C; Pedemonte N; Galietta L J V; Verkman A S, **2003**. Nanomolar affinity small molecule correctors of defective Delta F508-CFTR chloride channel gating, *Journal of Biological Chemistry 278*, 35079.

Yang M L; Kuo P C; Damu A G; Chang R J; Chiou W F; Wu T S, **2006**. A versatile route to the synthesis of 1-substituted beta-carbolines by a single step Pictet-Spengler cyclization, *Tetrahedron 62*, 10900.

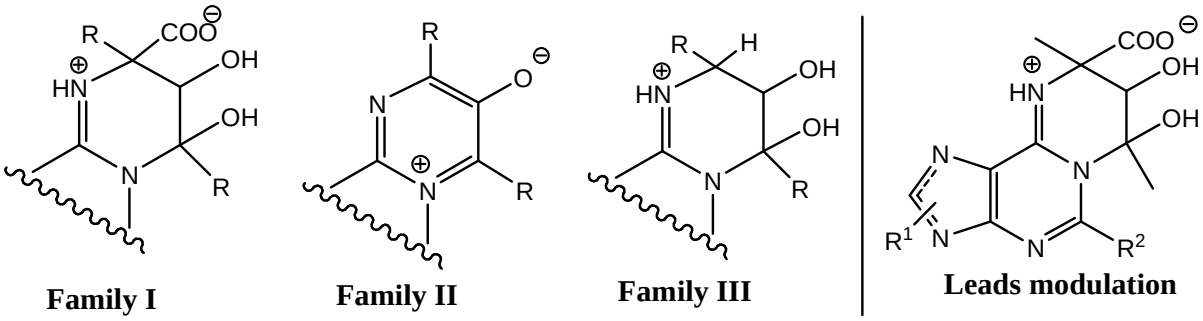
Young R C; Jones M; Milliner K J; Rana K K; Ward J G, **1990**. Purine Derivatives as Competitive Inhibitors of Human Erythrocyte-Membrane Phosphatidylinositol 4-Kinase, *Journal of Medicinal Chemistry 33*, 2073.

Zav'yalov S I; Ezhova G I, **1979**. Synthesis of a-dicarbonyl compounds from N-acyl-a-amino ketones, *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimicheskaya* 1044.

Zeitlin P L, **1999**. Novel pharmacologic therapies for cystic fibrosis, *J Clin Invest 103*, 447.

Zhang L; Fan J; Vu K; Hong K; Le Brazidec J-Y; Shi J; Biamonte M; Busch D J; Lough R E; Grecko R; Ran Y; Sensintaffar J L; Kamal A; Lundgren K; Burrows F J; Mansfield R; Timony G A; Ulm E H; Kasibhatla S R; Boehm M F, **2006**. 7'-Substituted Benzothiazolothio- and Pyridinothiazolothio-Purines as Potent Heat Shock Protein 90 Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry 49*, 5352.

Synthesis and evaluation of CFTR protein modulators

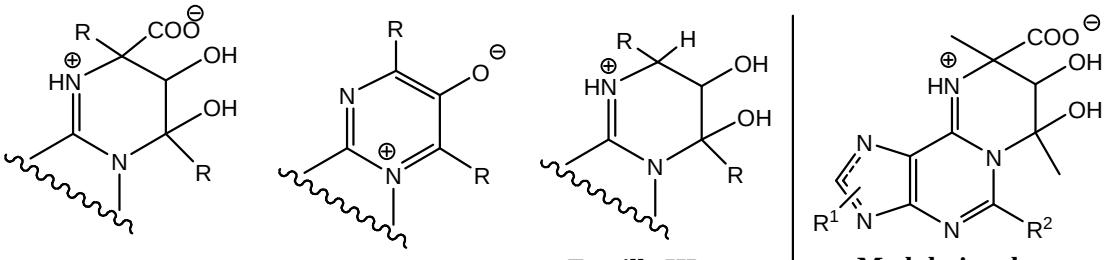


Key words: Methylglyoxal, α-oxoaldehyde, purines, α-aminoazaheterocycles, CFTR, Cystic Fibrosis.

After the discovery of a new stereoselective reaction between methylglyoxal and α-aminoazaheterocycles in water under mild conditions leading to a new family of compounds (family I), some of the resulting compounds appeared to be able to modulate efficiently the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR). Mutations of this protein which forms a cAMP-regulated chloride channel cause the severe genetic disease cystic fibrosis.

Small molecules able to modulate Cl^- channels are interesting to understand the physiological role of these channels and also in the development of molecules of therapeutic interest. In the search for the chemical structure of the pharmacophore responsible for the observed effects in the active compounds (a positively charged nitrogen atom linked through two carbon atoms to a negatively charged oxygen atom), various compounds carrying or not the assumed pharmacophore were prepared and evaluated (compounds of families II and III prepared from compounds of the family I). Some of the prepared compounds were found to be interesting modulators of CFTR channels confirming the proposed structure of the pharmacophore.

Synthèse et évaluation de modulateurs de la protéine CFTR



Mots clés : Méthylglyoxal, α-oxoaldéhyde, Purines, α-aminazahétérocycles, CFTR, Mucoviscidose.

A la suite de la découverte au laboratoire d'une nouvelle réaction entre le méthylglyoxal et un α-aminoazahétérocycle, une nouvelle famille de modulateurs (famille I) de la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) a été mise en évidence. Les dysfonctionnements de cette protéine, qui constitue un canal chlorure transmembranaire, sont responsables de plusieurs pathologies de la mucoviscidose résultant de mutations du gêne correspondant.

Nous avons tout d'abord cherché à confirmer la structure du pharmacophore supposé en sélectionnant et évaluant des petites molécules contenant le pharmacophore ou en modifiant les groupements à proximité du pharmacophore. Cette étude a permis l'accès à de nouveaux composés issus de la réaction entre un autre α-oxoaldéhyde (éthylglyoxal) et des α-aminoazahétérocycles, et à deux autres familles de composés dérivés de la première (familles II et III).

Par ailleurs, en nous basant sur la structure des deux « chef de files », l'inhibiteur **GPinh-5a** et le potentiateur/activateur **GPact-11a**, nous avons développé une pharmacomodulation de la structure de base des composés actifs qui sont des dérivés de purine. Un grand nombre d'analogues ont ainsi été synthétisés.

Ces deux approches ont permis la mise en évidence de plusieurs nouveaux inhibiteurs et de deux nouveaux potentiateurs de la protéine CFTR.

Au regard des caractéristiques et des propriétés des composés les plus actifs, leur étude biologique doit donc être poursuivie dans le but d'aboutir à une utilisation thérapeutique.