

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mohamed Khider – Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences
de la nature et de la vie
Département des sciences de la matière
Réf :



جامعة محمد خيضر بسكرة

جامعة محمد خيضر بسكرة
كلية العلوم الدقيقة وعلوم
الطبيعة و الحياة
قسم علوم المادة
المرجع:

Thèse présentée en vue de l'obtention
du diplôme de
Doctorat en sciences

Spécialité : Chimie

Thème :

**Synthèse et évaluation biologique de nouveaux
carbonucléosides à visée antivirale**

Présentée par :
Ali DOUADI

Soutenue publiquement le 15 Mai 2012

Devant le jury composé de :

Salah BELAIDI	Professeur	Président	Université de Biskra
Touhami LANEZ	Professeur	Rapporteur	Université d'El-Oued
Djamel BARKAT	Professeur	Examineur	Université de Biskra
Mohamed YOUSFI	Professeur	Examineur	Université de Laghouat
Mahmoud OMARI	Professeur	Examineur	Université de Biskra
Belgacem TERKI	Docteur	Examineur	Université d'Ouargla
Gérard AUDRAN	Professeur	Invité	Université d'Aix Marseille (France)

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Réactivité Organique Sélective (ROS) de l'université d'Aix-Marseille (France), sous la direction des Professeurs Gérard AUDRAN et Touhami LANEZ.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Gérard AUDRAN pour m'avoir accueilli au sein de l'Institut de Chimie radicalaire (ICR) de l'université d'Aix-Marseille (France). Je le remercie pour l'ensemble des moyens qui ont été mis à ma disposition. Je le remercie pour les différentes techniques de laboratoire qu'il m'a transmises. Je lui exprime ma plus profonde reconnaissance pour sa disponibilité, son écoute attentive, et son soutien tout au long de ce travail de thèse.

Je tiens à adresser au Pr. Touhami LANEZ ma profonde reconnaissance pour m'avoir confié ce thème de recherche passionnant, pour l'aide qu'il m'a apportée tout au long de ce travail de thèse, et surtout pour m'avoir fait confiance. Son regard critique et ses conseils avisés m'ont aidé dans la conduite mais également dans la rédaction de cette thèse.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Pr. Mahmoud OMARI, au Pr. Djamel BARKAT (Université de Biskra), au Pr. Mohamed YOUSFI (Université de Laghouat) et au Dr. Belgacem TERKI (Université d'Ouargla) qui ont bien voulu jugé ce travail et en être les examinateurs de cette thèse.

Mes sincères remerciements s'adressent également au Professeur Salah BELAIDI (Université de Biskra) pour l'honneur qu'il me fait de présider ce jury.

J'associe à ces remerciements tous mes collègues de laboratoire et particulièrement le Docteur Paul BRÉMOND pour ses conseils pertinents, et les discussions fructueuses échangées tout au long de cette thèse. Je remercie Messieurs, Messaoud GUERRI et Djemoui AMAR pour avoir su apporter une très bonne ambiance de travail au sein du laboratoire.

Enfin, je remercie profondément les membres de ma famille et mes proches, en particulier ma mère, mes frères, mes sœurs et ma femme, qui m'ont toujours fait confiance et aidé quels que furent mes choix, et pour leur soutien permanent tout au long de cette thèse.

RÉSUMÉ

Au travers de ce manuscrit, nous présentons la synthèse stéréocontrôlée et l'évaluation biologique de carbonucléosides inédits analogues de la néplanocine F et l'abacavir, à partir d'un alcool cyclique à 5 chaînons. Il est présenté en 2 thèmes.

Le premier thème aborde une présentation bibliographique générale des virus et des traitements utilisés mettant en évidence l'intérêt de concevoir des nouvelles molécules antivirales. Parmi celles-ci, les analogues de nucléosides, et plus particulièrement les carbonucléosides, constituent une famille actuellement très étudiée en chimie médicinale car ils présentent une remarquable stabilité métabolique.

Le second thème est consacrée à la synthèse stéréocontrôlée de 3 séries de carbonucléosides inédits caractérisés par la présence d'un groupement méthyle en position 3' et un groupement hydroxyle en position 2' ou 4' sur le carbosucrose. Les molécules cibles sont des analogues de la néplanocine F et de l'abacavir, une prodrogue utilisée en trithérapie pour lutter contre le VIH. Les synthèses utilisent un intermédiaire commun, un alcool cyclopenténique. Deux approches ont été envisagées pour atteindre notre objectif. Le choix des groupements protecteurs et la mise en œuvre des réactions hautement stéréocontrôlées a permis d'obtenir un carbosucrose correctement fonctionnalisé. Ensuite, le couplage direct de ce carbosucrose avec des nucléobases substituées en utilisant les conditions de Mitsunobu a été réalisé avec succès sans formation d'autres régioisomères. La transformation chimique de cet intermédiaire-clé permet d'atteindre les carbonucléosides analogues de l'abacavir (\pm)-**1a-b** en 10 étapes mettant en œuvre comme étapes cruciales une hydroxylation allylique et une réduction, une déprotection catalytique et une insertion de la base purique, avec un rendement global de 23%. Ainsi, la synthèse des carbonucléosides inédits analogues de la néplanocine F, (\pm)-**2a-b** et (\pm)-**3a-b** a été accomplie en 10 à 12 étapes avec un rendement global de 24 à 32%. L'activité antivirale et la cytotoxicité de ces 6 carbonucléosides préparés ont été évaluées sur deux souches virales en collaboration avec le Pr. Christophe Pannecouque (Rega Institute, Belgique).

MOTS CLES : synthèse stéréocontrôlée, nucléosides, réaction de Mitsunobu, purine, nucléosides carbocycliques (carbonucléosides).

SYMMARY

TITLE : Synthesis and Biological Evaluation of Novel Antiviral Carbanucleosides Target.

The sterecontrolled synthesis and biological evaluation of novel carbanucleosides analogs of neplanocin F and abacavir, from a five-membered ring alcohol is described. It is presented in two parts.

The first one is dedicated to a general presentation of viruses and drugs which have shown interest in the synthesis of novel antiviral molecules. Among them, the nucleoside analogs, in particular the carbanucleosides, are very well studied in medicinal chemistry because this class of compounds exhibits remarkable metabolic stability.

The second part is dedicated to the stereocontrolled synthesis of 3 series of new carbanucleosides characterized by the presence of a methyl group on the 3'-position and a hydroxyl group on the 2' or 4'-position of the carbasugar. The target compounds are analogs of neplanocin F and abacavir, a prodrug used in tritherapy against HIV. The syntheses use a common building block, a cyclopentenic alcohol. Two strategies have been studied to achieve our goal. The choice of protective groups and the implementation of highly sterecontrolled reactions allow to obtain a correctly functionalized carbasugar. Then, direct coupling of this carbasugar with substituted purine nucleobases under the Mitsunobu conditions is accomplished as a key step successfully without formation of the other regioisomers. The chemical transformation of this cornerstone allows the synthesis of, for instance, carbanucleosides analogs of abacavir (\pm)-**1a-b** in 10 steps with 23% overall yield. So, our synthesis of new carbanucleosides analogs of neplanocin F, (\pm)-**2a-b** and (\pm)-**3a-b** affords the target molecules in 10 to 12 steps and 24 to 32% overall yield. The antiviral activity and the cytotoxicity of this 6 synthesized carbanucleosides have been evaluated on two viruses in collaboration with Pr. Christophe Pannecouque (Rega Institute, Belgium).

KEY WORDS : sterecontrolled synthesis, nucleosides, Mitsunobu reaction, purine, carbocyclic nucleosides (carbanucleosides).

ملخص

بنجاح تم التصنيع المراقب فراغيا لستة كربونيكليوزيدات جديدة إنطلاقا من كحول حلقي وإختبار فعاليتها البيولوجية ضد فيروس فقدان المناعة المكتسبة (السيدا).

الفصل الأول أخذ عنوان مضادات الفيروسات النيكلوزيدية و الكربونيكليوزيدية و كان عبارة عن دراسة ببليوغرافية عن الفيروس المسبب لمرض فقدان المناعة المكتسبة من حيث تاريخه، دورة حياته و طرق معالجته الكيميائية و تم التطرق كذلك للنيكلوزيدات كمضادات للفيروسات و أهم طرق تصنيعها.

الفصل الثاني كان بعنوان التصنيع المراقب فراغيا للكربونيكليوزيدات (\pm) -1a-b، (\pm) -2a-b و (\pm) -3a-b و الخطة المتبعة للتصنيع ومن ثم تفاصيل عملية التصنيع حيث تم تحضير المركبين (\pm) -1a-b في 10 خطوات بمردود عام 23%. أما المركبات (\pm) -2a-b و (\pm) -3a-b فقد حضرت في ما بين 10 إلى 12 خطوة بمردود إجمالي من 24 إلى 32%. الفعالية البيولوجية ضد فيروس السيدا وكذا سمية هذه المركبات تم إنجازها بالتعاون مع مركز البحث الطبي لجامعة لوفان - بلجيكا.

الفصل الثالث كان بعنوان الجزء التجريبي و تم التطرق فيه إلى التجارب المنجزة خلال تحضير هذه السلسلة الجديدة من الكربونيكليوزيدات و نتائج الفعالية البيولوجية، في البداية تم الحديث عن ظروف العمل و الأجهزة و المواد الكيميائية المستعملة في عمليات التصنيع كما تم التطرق إلى تقنيات التحليل البنيوي و أخيرا بروتوكول تحضير كل مركب. الخاتمة تم عرض فيها محصلة لما تم التوصل إليه من نتائج

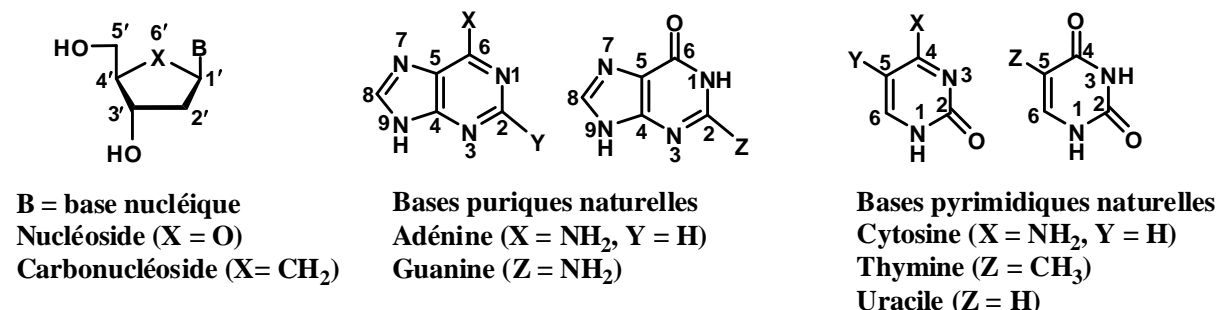
الكلمات الدالة : التصنيع المراقب فراغيا، النيكلوزيدات، تفاعل ميتسونوبو، البيورين، النيكلوزيدات الكربوحلقية (الكربونيكليوزيدات).

Abréviations utilisées

Ac : acétyle	HRMS : spectrométrie de masse haute résolution
Ac₂O : anhydride acétique	<i>i</i>Pr : isopropyle
AcOH : acide acétique	LiAlH₄ : hydrure de lithium et d'aluminium
ADN : acide désoxyribonucléique	M : masse molaire
ATP : adénosine 5'-triphosphate	Me : méthyle
ARN : acide ribonucléique	MeOH : méthanol
B : base nucléique	Min : minute(s)
Bn : benzyle	MOM : méthoxyméthyle
CC₅₀ : concentration à 50 %, représente la concentration nécessaire pour amener à une cytotoxicité de 50 % (toxicité).	MOMCl : chlorure de méthoxyméthyle
DBU : 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undéc-7-ène	MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
DEAD : azodicarboxylate de diéthyle	NaBH₄ : borohydrure de sodium
DIAD : azodicarboxylate de diisopropyle	NaH : hydrure de sodium
Dibal-H : hydrure de diisobutylaluminium	NMO : oxyde de <i>N</i> -méthylmorpholine
Dic : 1,1'-carbonyldiimidazole	Ph : phényle
DMAP : <i>N,N</i> -diméthylaminopyridine	PPh₃ : triphénylphosphine
DMF : <i>N,N</i> -diméthylformamide	RMN/NMR : résonance magnétique nucléaire
DMSO : diméthylsulfoxyde	t.a. / r.t. : température ambiante
EC₅₀ : concentration effective à 50 %, représente la concentration nécessaire d'un composé pour observer 50 % de la réponse maximale (activité).	SeO₂ : dioxyde de sélénium
EP : éther de pétrole	SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
equiv : équivalent	SN₂ : substitution nucléophile de type 2
Et : éthyle	TBAF : fluorure de tétrabutyle ammonium
Et₂O : éther diéthylique	TBS : <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
Et₃N : triéthylamine	TBSCl : chlorure de tertibutyldiméthylsilyle
EtOH : éthanol	TFA : acide trifluoroacétique
h : heure(s)	THF : tétrahydrofurane
	VIH : virus de l'immunodéficience humaine

CONVENTIONS ET NOMENCLATURE

Les conventions et les règles internationales utilisées pour la nomenclature et la numérotation des nucléosides et leurs analogues sont résumées dans le schéma suivant :



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

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

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

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

LISTE DES FIGURES

Titre	PAGE
Figure 1 : Structure générale d'un virus	6
Figure 2 : Structures des nucléosides, nucléotides et analogues anti VIH	8
Figure 3 : Cycle de réplication du VIH	10
Figure 4 : Structure générale des nucléosides naturels	12
Figure 5 : Structure d'un nucléotide	13
Figure 6 : Exemples d'inhibiteurs utilisés en chimiothérapie	14
Figure 7 : Structure de deux nucléosides de <i>Tethya Crypta</i> et de ses analogues	14
Figure 8 : Structure d'un 3'-désoxynucléoside	15
Figure 9 : Métabolisme et activation de l'aciclovir	16
Figure 10 : Structure de l'AZT	16
Figure 11 : Structure de l'IdU, TFT, EdU et BVDU	19
Figure 12 : Structure de la Cladribine, Fludaribine et la Pentostatine	19
Figure 13 : Structure d'un nucléoside et d'un carbonucléoside	20
Figure 14 : Carbonucléosides naturels	21
Figure 15 : Carbonucléosides synthétiques ayant des activités antivirales	21
Figure 16 : Adénosines substituées par un groupement méthyle	22
Figure 17 : Exemples de carbonucléosides substitués par un groupement méthyle	23
Figure 18 : Molécules cibles préparés au cours de ce travail	23
Figure 19 : Structure du carbovir et de l'abacavir	30
Figure 20 : L'abacavir commercialisé sous le nom de Ziagen [®]	31
Figure 21 : Carbonucléosides cibles (±)- 1a-b	31
Figure 22 : Analyse RX de l'acétate allylique (±)- 11	36
Figure 23 : NOESY et HMBC du composé (±)- 18	43
Figure 24 : Famille des néplanocines	46
Figure 25 : Carbonucléosides (±)- 2a-b et (±)- 3a-b	47
Figure 26 : Spectre de masse haute résolution en mode electrospray positif de l'échantillon (±)- 1a	155

Figure 27 : Spectre de masse haute résolution en mode electrospray positif de l'échantillon (\pm)- 1b	158
Figure 28 : Spectre de masse haute résolution en mode electrospray positif de l'échantillon (\pm)- 2a	160
Figure 29 : Spectre de masse haute résolution en mode electrospray positif de l'échantillon (\pm)- 2b	162
Figure 30 : Spectre de masse haute résolution en mode electrospray positif de l'échantillon (\pm)- 3a	165
Figure 31 : Spectre de masse haute résolution en mode electrospray positif de l'échantillon (\pm)- 3b	167

LISTE DE TABLEAUX

Titre	PAGE
Tableau 1 : Groupements présents sur les bases naturelles des nucléosides	12
Tableau 2 : Activité (EC ₅₀ en µg/mL) anti VIH et cytotoxicité des composés (±)-1a-b, (±)-2a-b and (±)-3a-b	105
Tableau 3 : Mesures de masse haute résolution de l'ion [M+H] ⁺ , obtenues après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (±)-1a	155
Tableau 4 : Mesures de masse haute résolution de l'ion [M+H] ⁺ , obtenues après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (±)-1b	157
Tableau 5 : Mesures de masse haute résolution de l'ion [M+H] ⁺ obtenues après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (±)-2a	160
Tableau 6 : Mesures de masse haute résolution de l'ion [M+Na] ⁺ obtenues après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (±)-2b	162
Tableau 7 : Mesures de masse haute résolution de l'ion [M+H] ⁺ obtenues après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (±)-3a	164
Tableau 8 : Mesures de masse haute résolution de l'ion [M+Na] ⁺ obtenues après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (±)-3b	167

SOMMAIRE

Titre	PAGE
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PREMIÈRE PARTIE : LES ANTIVIRAUX NUCLÉOSIDIQUES ET CARBONUCLÉOSIDIQUES	5
I. INTRODUCTION SUR LES VIRUS	6
I.1. Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	7
I.2. Cycle de vie du VIH	9
I.3. Chimiothérapie antivirale	10
II. LES ANTIVIRAUX NUCLÉOSIDIQUES ET LEURS ANALOGUES	11
II.1. Les nucléosides	11
II.2. Les analogues de nucléosides	13
II.2.1. Les analogues de nucléosides à base modifiée	18
a. Analogues à base pyrimidique modifiée	18
b. analogues à base purique modifiée	19
II.2.2. Les analogues de nucléosides carbocycliques (carbonucléosides)	20
a. Présentation	20
b. Les carbonucléosides substitués	22
c. Les principales méthodologies de synthèse des carbonucléosides	24
DEUXIÈME PARTIE : SYNTHÈSE STÉRÉOCONTRÔLÉE DES CARBONUCLÉOSIDES (±)-1a-b, (±)-2a-b et (±)-3a-b	29
I. SYNTHÈSE DIASTÉROSELECTIVE DES CARBONUCLÉOSIDES (±)-1a-b	30
I.1. Introduction sur l'abacavir	30
I.2. Analyse rétrosynthétique	32
I.3. Présentation de la stratégie générale de la synthèse des carbonucléosides (±)-1a-b	32
I.4. Détails de la synthèse de carbonucléoside (±)-1a	33
I.4.1. Synthèse de la brique moléculaire de départ (±)-8	33
I.4.2. Protection de l'alcool : composé (±)-9	34
I.4.3. Hydroxylation allylique du composé (±)-9	35
I.4.4. Détermination de la configuration de l'alcool allylique (±)-10	35
I.4.5. Réduction de l'ester (±)-10	37
I.4.6. Protection du diol (±)-12	37
I.4.7. Déprotection de l'éther silylé (±)-13	38
I.4.8. Première voie de synthèse de (±)-1a-b suivant la réaction de Tsuji-Trost	38
a. Protection de l'alcool (±)-14	38
b. Réaction de Tsuji-Trost	39

I.4.9. Deuxième voie de synthèse de (±)-1a-b suivant la réaction de Mitsunobu	39
a. Inversion de l'alcool (±)-14	39
b. Couplage de Mitsunobu avec la 6-chloropurine	42
c. Fonctionnalisation de la base purique	43
d. Déprotection de l'acétal	44
I.5. Détails de la synthèse de carbonucléoside (±)-1b	44
I.6. Conclusion	45
II. SYNTHÈSE DIASTÉRÉOSELECTIVE DES CARBONUCLÉOSIDES (±)-2a-b et (±)-3a-b	46
II.1. Introduction sur les néplanocines	46
II.2. Analyse rétrosynthétique	47
II.3. Présentation de la stratégie générale de la synthèse des carbonucléosides (±)-2a-b	48
II.4. Détails de la synthèse de carbonucléoside (±)-2a	49
II.4.1. Dihydroxylation de l'alcène (±)-9	49
II.4.2. Protection du diol (±)-20	50
II.4.3. Déprotection du carbonate cyclique (±)-21	50
II.4.4. Réduction de l'ester (±)-22	51
II.4.5. Protection du diol (±)-23 sous forme de MOM	51
II.4.6. Déprotection du TBS	52
II.4.7. Insertion de la base purique	52
II.4.8. Fonctionnalisation de la base purique	52
II.4.9. Déprotection de carbonucléoside (±)-35 sous forme de MOM	53
II.4.10. Protection du diol (±)-23 sous forme d'éther benzylique	53
II.4.11. Déprotection de l'éther silylé	54
II.4.12. Introduction et fonctionnalisation de la base purique	54
II.4.13. Essais de la déprotection de carbonucléoside (±)-29a protégé sous forme de dibenzyl	55
II.5. Détails de la synthèse de carbonucléoside (±)-2b	56
II.6. Présentation de la stratégie générale de la synthèse des carbonucléosides (±)-3a-b	57
II.7. Détails de la synthèse de carbonucléoside (±)-3a	57
II.7.1. Inversion de la configuration de l'alcool (±)-25	57
II.7.2. Couplage de la base purique et fonctionnalisation	58
II.7.3. Déprotection de l'éther dibenzylique	59
II.8. Détails de la synthèse de carbonucléoside (±)-3b	59
II.9. Conclusion	60
II.10. Évaluation biologique des carbonucléosides préparés	61
II.10.1. Test MTT	61

II.10.2. Principe du test MTT	61
II.10.3. Évaluation d'activité <i>in vitro</i> anti VIH	61
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	63
TROISIÈME PARTIE : PARTIE EXPÉRIMENTALE	66
I. CONDITIONS GÉNÉRALES DE TRAVAIL	67
I.1. Réactifs et solvants	67
I.2. Atmosphère réactionnelle	67
I.3. Techniques d'analyse et appareillage	67
II. PROCÉDÉS EXPÉRIMENTAUX	69
III. Tests d'activité anti VIH	104
ANNEXE DE LA THÈSE	106

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les infections virales représentent aujourd'hui une des principales causes de mortalité dans le monde. Ainsi la recherche et la mise au point de nouvelles molécules, capables de traiter ou de conduire à l'éradication de ces maladies, est d'une grande importance. Depuis l'identification, au début des années 1980, du **S**yndrome de l'**I**mmuno**D**éficienc**A**cquise (SIDA), dont l'agent pathogène est le **V**irus de l'**I**mmunodéficienc**H**umaine (VIH), des progrès considérables ont été accomplis dans la lutte contre les maladies d'origine virale.

Aujourd'hui parmi une vingtaine de composés approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) dans le traitement du SIDA, un tiers est de nature nucléosidique. De ce fait, ces composés occupent, par leur nombre et leur importance curative, une place significative dans les traitements thérapeutiques.

Les nucléosides constituent les éléments fondamentaux des acides nucléiques (ADN ou ARN). La Chimie des nucléosides représente un des développements majeurs dans le domaine de la chimie fine. L'importance biologique de ces composés est apparue dès la première moitié du vingtième siècle en raison de leur rôle dans la transmission de l'information génétique et dans la synthèse des protéines. Cette fonction particulière implique que ces composés, après quelques modifications, constitue une source importante d'agents thérapeutiques.

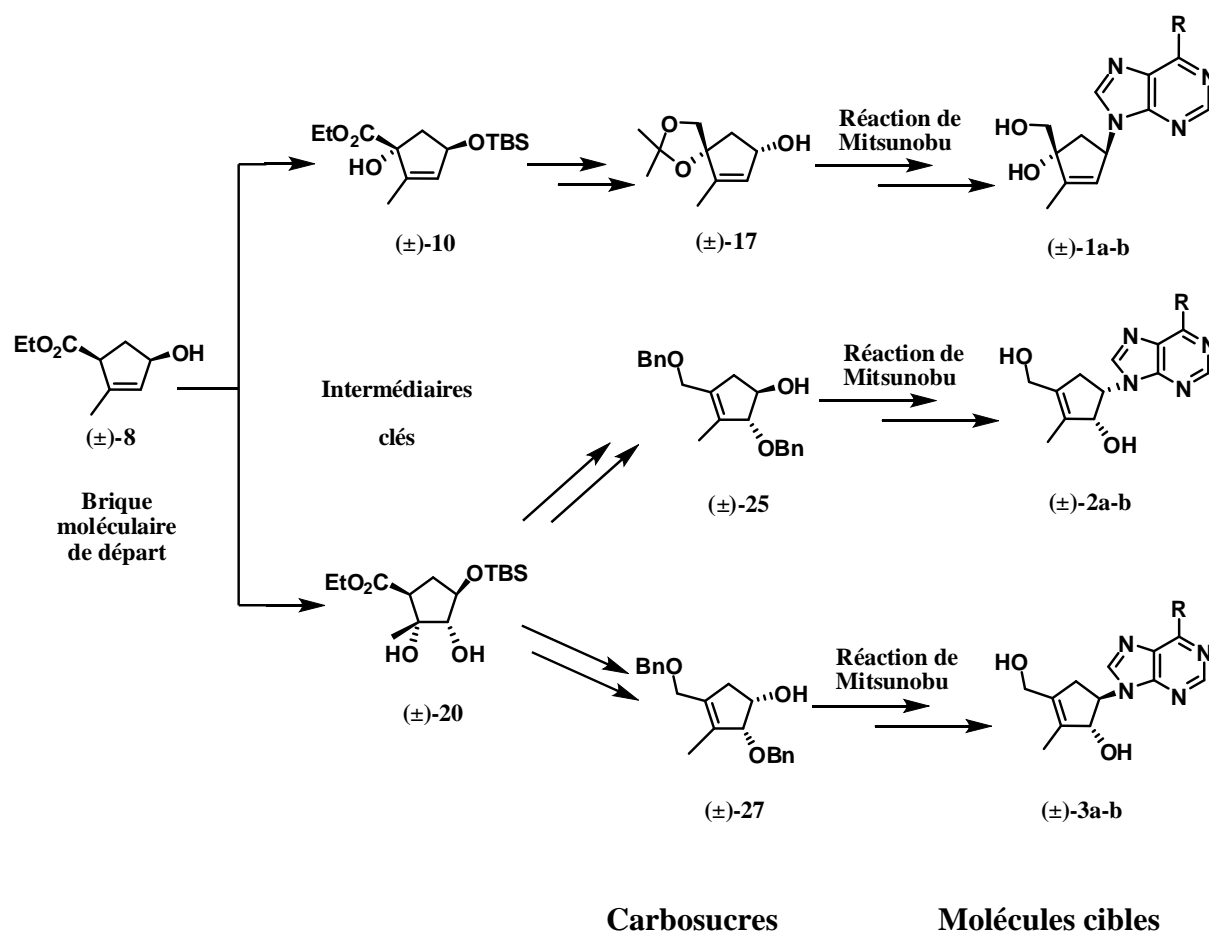
Les très nombreuses recherches effectuées depuis les trois dernières décennies, ont montré des applications des nucléosides comme antiviraux. Si des molécules comme l'AZT (3'-azido-3'-désoxythymidine, anti-VIH), le d4T (2',3'-didéhydro-2',3'-didésoxythymidine, également anti-VIH) ou l'aciclovir (9-(2-hydroxyéthoxyméthyl) guanine, anti herpès) ont été largement médiatisées, on ne dispose que d'un éventail relativement modeste de molécules réellement actives.

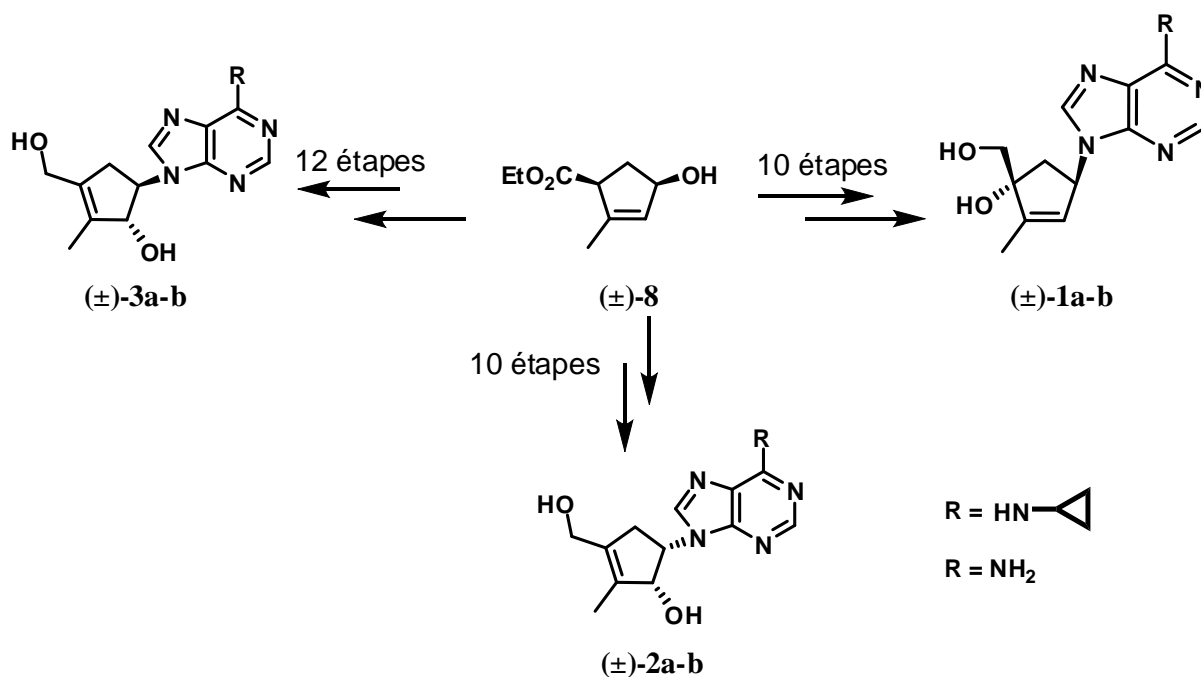
Les nucléosides modifiés ont vivement intéressé le chimiste et le pharmacologue en raison de leur impact dans le domaine thérapeutique. Les modifications structurales, situées sur la partie osidique comme sur la base nucléique, ont mené à des composés capables de limiter la progression des tumeurs ou d'inhiber la réplication virale en bloquant une des étapes clé du cycle cellulaire. De plus, les phénomènes de résistances virales peuvent apparaître dans des délais plus ou moins longs. C'est pourquoi la recherche de nouveaux analogues est toujours d'actualité.

La recherche de nouvelles molécules de types carbonucléosidiques reste un sujet d'actualité, en particulier en raison des phénomènes de résistance virale qui peuvent apparaître vis à vis de telle ou telle structure. En raison du grand nombre de cibles l'activité de ces composés ne peut cependant que très difficilement être prédite à l'avance, il est donc nécessaire de synthétiser de nouvelles molécules et de les tester.

Dans le cadre de cette thèse, il m'a été confié la tâche de synthétiser quelques carbonucléosides originaux, analogues de l'abacavir et de la néplanocine F. Ces dérivés posséderont à la fois un groupement méthyle en position 3' et un groupement hydroxyle en position 2' ou 4' sur le carbose. La base purique quant à elle possèdera un groupement amine ou cyclopropylamino.

Les schémas récapitulatifs suivants mettent en exergue l'approche développée et l'idée directrice qui sera suivie au cours de ce travail.





Ce manuscrit comprendra les thèmes suivants :

Les différents aspects importants de la chimie des nucléosides et de leurs analogues ; nous présenterons leur mécanisme d'action, ainsi que des médicaments à structure nucléosidique utilisés pour traiter différentes maladies virales.

Par la suite, nous décrirons quelques méthodes de synthèses décrites dans la littérature pour ce type de molécules.

La synthèse stéréocontrôlée de carbusucres fonctionnalisés, précurseurs des carbonucléosides.

La synthèse des carbonucléosides cibles $(\pm)\text{-1a-b}$, $(\pm)\text{-2a-b}$ et $(\pm)\text{-3a-b}$ par utilisation de la réaction de couplage de Mitsunobu.

L'efficacité thérapeutique ainsi que la toxicité de ces molécules ont été évaluées par le Pr. Christophe Pannecouque (Institut Rega, Belgique) sur deux souches virales.

En fin, la conclusion générale présentera un bilan du travail accompli.

L'annexe comporte tous les résultats des analyses spectroscopiques (RMN ^1H , RMN ^{13}C , spectroscopie de masse) des produits synthétisés et leurs évaluations biologiques.

PREMIÈRE PARTIE :
LES ANTIVIRAUX
NUCLÉOSIDIQUES ET
CARBONUCLÉOSIDIQUES

I. Introduction sur les virus

Le mot virus¹ est un terme ancien puisqu'il vient du latin et signifie poison. Un virus est un parasite intracellulaire ne pouvant se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule-cible et utilisant ses constituants pour l'infecter. Il contient une information génétique sous forme d'ADN ou d'ARN, et une structure de protection souvent protéique, pour protéger son acide nucléique : la capside (Figure 1).

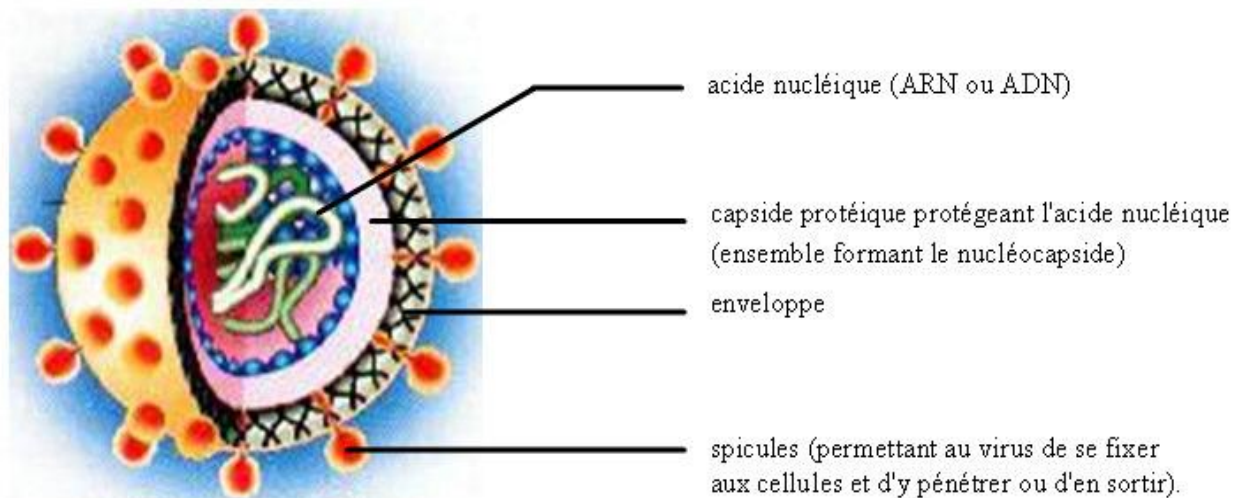


Figure 1 : Structure générale d'un virus

La Capside est une structure qui entoure et protège le génome (l'ensemble du matériel génétique) du virus. Le virus utilise un nombre de gènes minimal pour constituer cette capside formée de plusieurs unités répétitives (les protéines de capside). La capside protège le virion lorsque celui-ci se trouve à l'extérieur. Pour les virus nus (sans enveloppe), c'est elle qui porte les déterminants viraux qui se lient spécifiquement à des récepteurs cellulaires. La capside de certains virus peut être entourée d'une enveloppe de même nature lipidique que les cellules infectées. Cette enveloppe porte alors les déterminants viraux (glycoprotéines...) qui se lient aux récepteurs cellulaires de manière spécifique. Après fixation aux récepteurs de la membrane cellulaire, l'enveloppe peut fusionner avec cette membrane et permettre l'introduction de la nucléocapside dans la cellule.

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

Les virus peuvent être classés selon 4 critères essentiels établis par Lwoff, Horne et Tournier² : la nature du matériel génétique, (c'est à dire le type d'acides nucléiques), le type de symétrie de la capsid (cubique ou hélicoïdale), le caractère nu (ne possédant pas d'enveloppe) ou enveloppé (possédant une enveloppe autour de la capsid) et les caractéristiques morphologiques du virion. Le VIH, le virus transmettant le SIDA, est un rétrovirus, ou virus à ARN car son matériel génétique est présenté sous forme d'ARN à l'intérieur de sa capsid.

Les virus à ARN se distinguent notamment par la présence d'une enzyme virale : la transcriptase inverse (TI ou RT) qui rétro-transcrit leur génome d'ARN en ADN pour être intégré par la suite dans le génome de la cellule-hôte. Le brin d'ARN étant monocaténaire et la TI étant une enzyme infidèle, des erreurs de transcription surviennent fréquemment ce qui fait que certains rétrovirus ont une grande variabilité génétique.

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

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

I.1. Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) :

En 1981, aux Etats Unis puis en Europe, apparaît une nouvelle maladie infectieuse : le syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA. Cette épidémie est un fléau planétaire, et

² (a) Lwoff, A. *J. Gen. Microbiol.* **1957**, 17, 239. (b) Lwoff, A.; Horne, R.; Tournier, P. A. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1962**, 27, 51. (c) Lwoff, A.; Horne, R.; Tournier, P. *C. R. Acad. Sci., Paris* **1962**, 254, 4225. (d) Lwoff, A.; Anderson, T. F.; Jacob, F. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **1959**, 97, 281.

plus particulièrement dans les pays en voie de développement. Près de 30 millions de personnes sont décédées depuis la découverte de l'épidémie. Elle est due au virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1), le virus le plus courant. Une autre épidémie due au VIH-2 moins agressif, fut identifiée postérieurement en Afrique de l'Ouest³.

Le VIH appartient à la famille des lentivirus (ou rétrovirus lents) et est responsable du SIDA qui provoque un affaiblissement du système immunitaire de l'homme. Ce système est indispensable pour l'organisme car il est capable de reconnaître les agents infectieux et de leur opposer une cascade de réactions de défense. Ce sont les lymphocytes qui ont ce rôle de défense.

La lutte contre le VIH a généré plus d'efforts et de développements pour la recherche de nouvelles molécules plus actives et moins toxiques. Il existe plusieurs familles d'inhibiteurs parmi lesquels les nucléosides sont les plus anciens (AZT), ceux-ci inhibent la transcriptase inverse nécessaire à la réplication du virus. A présent, plusieurs nucléosides ou analogues sont utilisés en chimiothérapie contre ce virus. Parmi eux, on peut citer l'adéfovир, le ténofovир, le ddC, l'AZT et la didanosine, dont les structures figurent sur la figure 2.

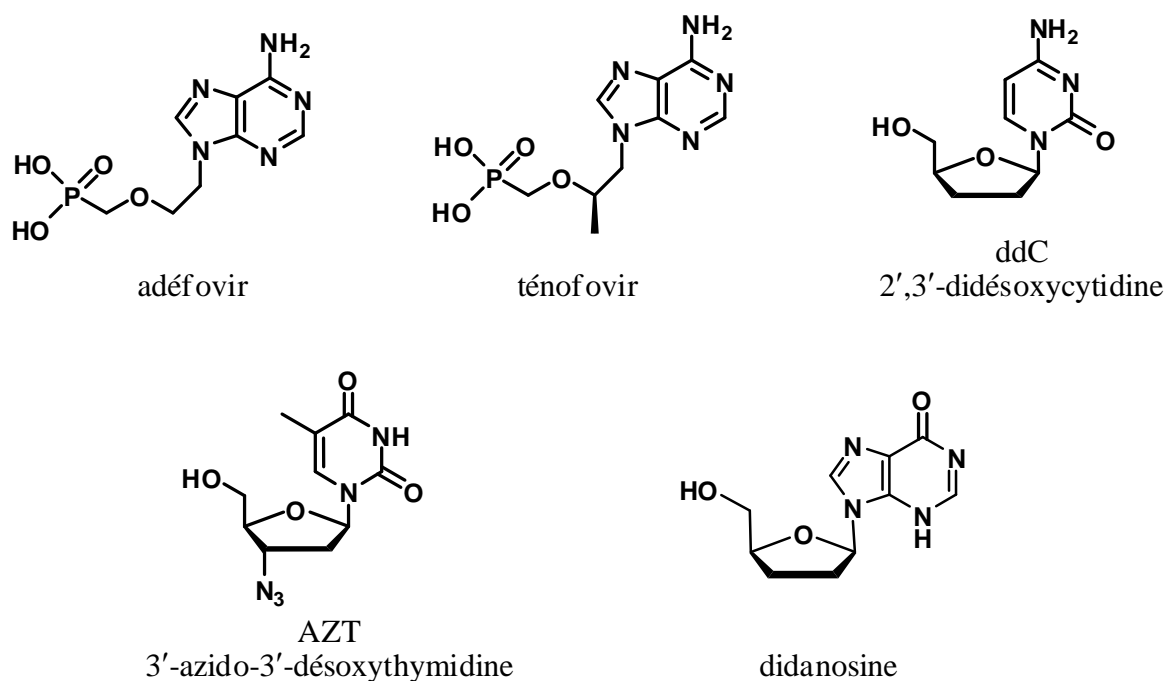


Figure 2 : Structures des nucléosides, nucléotides et analogues anti VIH

³ Lévy, J. P. *Pour la Science* Hors-série, 26-32 (octobre 1995).

Le traitement antirétroviral hautement actif (HAART) pour le VIH basé sur la combinaison des différents médicaments antiviraux a commencé en 1996. Pendant les 10 dernières années, ce traitement a évolué de 20 comprimés par jour (1996) à une en 2006. L'atrilpa est le premier comprimé antivirale prise une fois par jour et il est composé des trois différents types des inhibiteurs de VIH : nucléosides inhibiteurs de la transcriptase inverse (NRTIs), nucléotides inhibiteurs de la transcriptase inverse (NtRTIs) et non-nucléosides inhibiteurs de la transcriptase inverse (NNRTIs).

Un autre développement très important dans les domaines des nucléosides a été de prouver que les L-nucléosides (configuration opposée aux D-nucléosides naturels) sont également actifs contre diverses infections virales.⁴ Cette découverte a généré une quantité importante de développements⁵ dans la chimie des nucléosides et de leurs analogues.

I.2. Cycle de vie du VIH

Un virus est un élément de matériel génétique, ADN ou ARN incapable d'exprimer cette information et de la reproduire par elle-même. Il a donc besoin pour cela de cellules-hôtes (bactéries, cellules animales ou végétales) dites permissives auxquelles il emprunte divers constituants tels que les ribosomes, les ARN de transfert et les acides aminés. Ce virus possède, comme tout organisme vivant, un cycle de vie qui lui permet de se "reproduire". Cette reproduction est appelée cycle de réplication.

Une fois le virus entré dans l'organisme, l'interaction avec différents récepteurs et corécepteurs permet la fusion avec l'ADN cellulaire. Les cellules infectées par le VIH portent une protéine appelée CD4 (cluster de différenciation 4) à leur surface. Cette protéine se trouve principalement dans les cellules immunitaires, particulièrement dans les lymphocytes T facilitateurs, ainsi que sur les macrophages qui contrôlent l'organisme pour digérer les bactéries et autres germes.

Le VIH pénètre dans les cellules en s'attachant au récepteur de CD4 grâce à la protéine gp120 qui se trouve à la surface du virus. Une fois que le virus est fixé sur la protéine

⁴ Gumina, G.; Chong, Y.; Choo, H.; Song, G. Y.; Chu, C. K. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1065.

⁵ Mathé, C.; Gosselin, G. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 276.

CD4, il active d'autres protéines à la surface de la cellule (CCR5 et CXCR4) afin d'achever sa fusion avec la cellule.

Une fois que la fusion s'est produite, les composants du virus sont libérés, c'est-à-dire l'ARN et quelques enzymes importantes sont absorbés à l'intérieur de la cellule. C'est à ce stade qu'intervient la transcriptase inverse, qui réalise le processus nécessaire pour traduire le matériel génétique du virus en ADN. Tous les médicaments à structure nucléosidique ou analogues agissent comme inhibiteurs de cette transcriptase inverse et par conséquent empêchent la "reproduction" du virus (Figure 3).

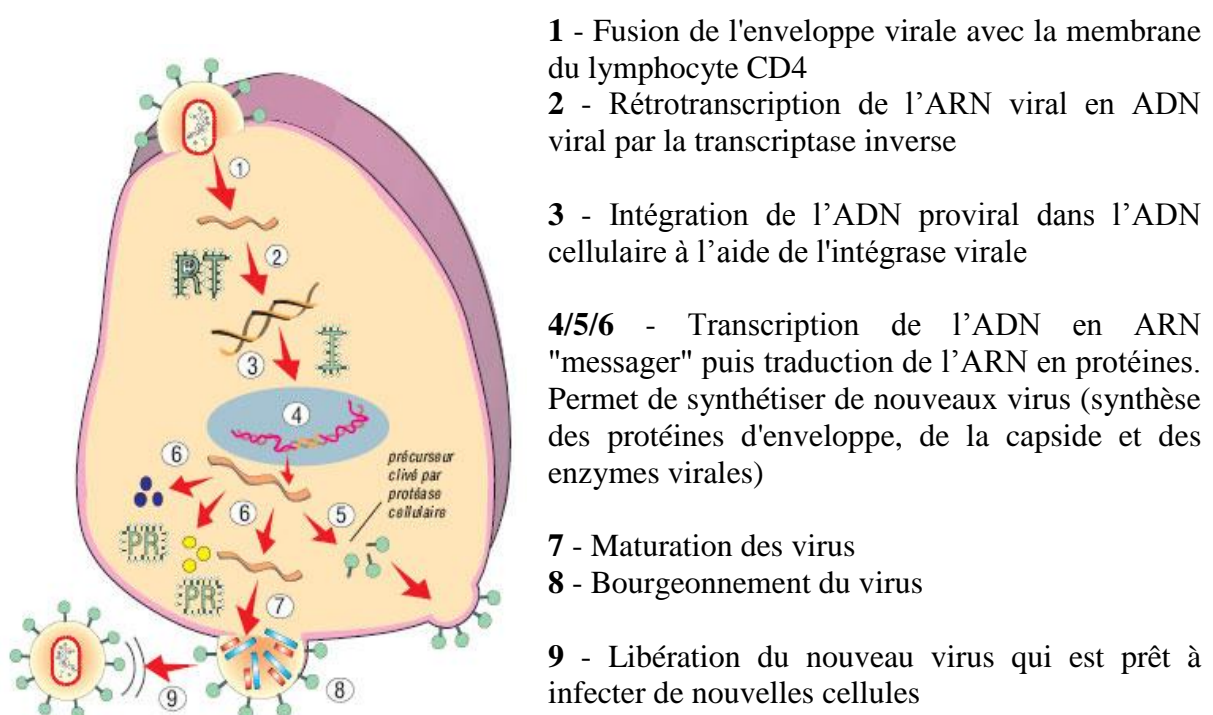


Figure 3 : Cycle de réplication du VIH

I.3. Chimiothérapie antivirale

Parmi les différentes stratégies visant à limiter la multiplication virale dans l'organisme, l'immunothérapie active représentée par la vaccination qui a constituée dès la fin du 19^{ème} siècle, la première réponse thérapeutique efficace (contre la variole ou la grippe). Cependant l'approche immunothérapeutique *via* la vaccination a ses limites en raison notamment du nombre considérable de virus pathogènes pour l'homme recensés à ce jour (plus de deux cents espèces) et du taux souvent élevé de mutation des gènes viraux face au système immunitaire de l'hôte.

Parallèlement à cette approche, l'élaboration d'agents synthétiques capables d'interférer avec la réplication virale a permis d'apporter une réponse curative à un certain nombre d'infections. Bien que toutes les étapes du cycle de réplication virale puissent être considérées comme des cibles potentielles, la cible privilégiée demeure la réplication du matériel génétique viral impliquant une polymérase codée par le virus : l'étape de transcription inverse.

II. Les antiviraux nucléosidiques et leurs analogues

II.1. Les nucléosides

Les nucléosides sont des molécules d'origine naturelle, constituants de base des acides nucléiques (ADN et ARN), qui jouent un rôle fondamental dans la vie et la reproduction des cellules animales, végétales et microbiennes. Les acides nucléiques sont des substances qui, comme leur nom l'indique, ont été tout d'abord isolées du noyau des cellules. En fait, comme on l'a su plus tard, il existe des acides nucléiques non seulement dans le noyau, mais aussi dans le cytoplasme des cellules. Ce terme n'est donc plus approprié, mais il a été cependant conservé. Il existe deux types d'acides nucléiques, l'ADN (acide désoxyribonucléique) essentiellement localisé dans le noyau des cellules, et l'ARN (acide ribonucléique) essentiellement retrouvé dans le cytoplasme des cellules. C'est dans la synthèse des protéines, composés fondamentaux de la cellule, supports de la plupart des activités biologiques, que les acides nucléiques ADN et ARN jouent un rôle essentiel.

D'une façon très schématique, l'ADN contient l'information nécessaire à cette synthèse, le programme. Il servira en quelque sorte à dicter l'ordre dans lequel tel acide aminé, puis tel autre acide aminé, doivent s'enchaîner pour donner finalement la protéine adéquate. Il renferme également l'information nécessaire à la régulation de la synthèse protéique. L'ADN est un élément permanent de la cellule. Les informations qu'il contient seront transmises aux descendants. On dit que l'ADN est le support de l'hérédité. Les ARN, quant à eux, permettent l'exécution de la synthèse protéique.

Du point de vue structural, les nucléosides (Figure 4, Tableau 1) sont constitués par l'association d'une base hétérocyclique purique (adénine ou guanine) ou pyrimidique

(cytosine, uracile ou thymine) et d'une partie glucidique (ribose pour l'ARN et désoxyribose pour l'ADN), reliées entre elles par une liaison carbone-azote. La majorité des nucléosides naturels adoptent la configuration β c'est-à-dire que la base est située au-dessus du plan moyen du cycle dans la représentation de Haworth.

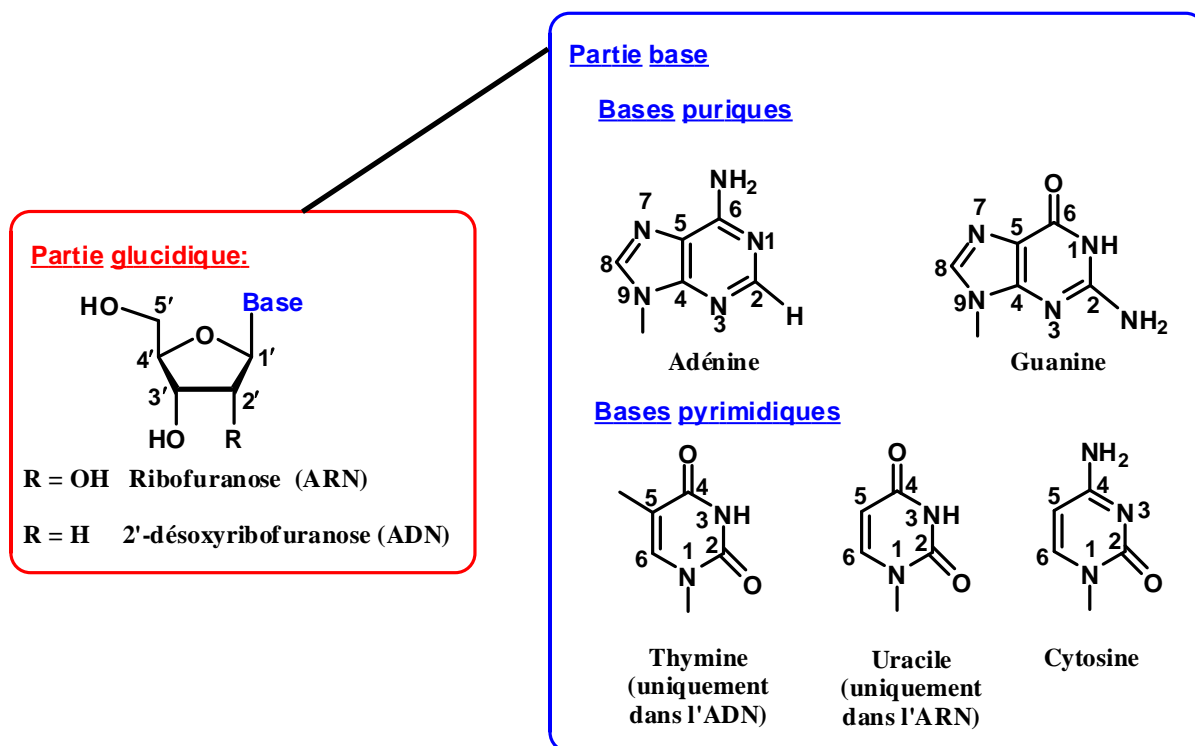


Figure 4 : Structure générale des nucléosides naturels

Bases	R = OH	R = H
Adénine	Adénosine	2'-désoxyadénosine
Guanine	Guanosine	2'-désoxyguanosine
Cytosine	Cytidine	2'-désoxycytidine
Uracile	Uridine	2'-désoxyuridine
Thymine	Thymidine	2'-désoxythymidine

Tableau 1 : Groupements présents sur les bases naturelles des nucléosides

Les nucléotides (Figure 5) résultent de la phosphorylation des nucléosides. On appelle ainsi nucléotide, tout motif complet qui comporte un ou plusieurs groupes phosphates, un sucre et une base azotée. La liaison d'un ou plusieurs groupements phosphates aux

nucléosides conduit à la formation des nucléotides monophosphates (NMP), diphosphates (NDP) et triphosphates (NTP).

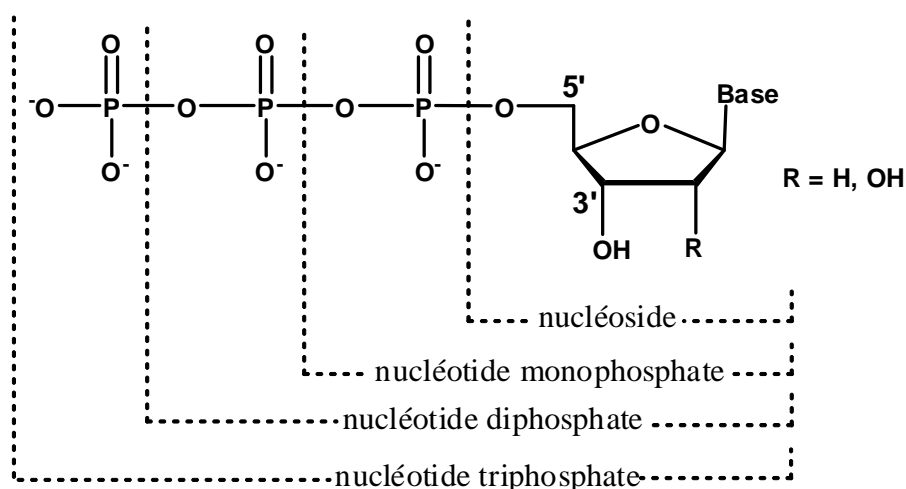


Figure 5 : Structure d'un nucléotide

II.2. Les analogues de nucléosides

Compte-tenu de l'importance de l'ADN et de l'ARN, et de leur implication dans de nombreuses maladies, les scientifiques se sont orientés vers la synthèse de briques élémentaires de ces acides nucléiques, tels que les nucléosides. De nombreuses modifications, portant sur la base et / ou sur le sucre, ont été apportées sur les nucléosides naturels. Nous détaillerons donc, les principaux changements effectués.

Les cibles thérapeutiques les plus intéressantes sont les enzymes virales qui sont nécessaires à la réplication du virus. Les enzymes reconnues par cette famille d'antiviraux sont par exemple l'ADN polymérase des virus du groupe de l'herpès ou la transcriptase inverse du VIH. Lorsque les polymérases copient le génome viral, elles utilisent des nucléotides comme brique élémentaires. Ceux-ci proviennent de nucléosides préalablement phosphorylés. Une des méthodes envisagées en chimiothérapie virale est l'utilisation d'analogues de nucléosides⁶ ayant une analogie structurale avec celle du substrat. Dans la

⁶ (a) Marquez, V. E. In *Advances in Antiviral Drug Design*; De Clercq, E. Ed.; JAI Press Inc.: Greenwich, CT, 1996; Vol 2, pp 89-146. (b) *Carbohydrate Mimics: Concepts and Methods*; Chapleur, Y. Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998. (c) *Recent Advances in Nucleosides: Chemistry and chemotherapy*; Chu, C. K. Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, 2002. (d) *Antiviral nucleosides: Chiral Synthesis and chemotherapy*; Chu, C. K. Ed.; Elsevier: New York, 2003.

cellule, ces analogues subissent les mêmes transformations que les nucléosides cellulaires et deviennent ainsi des analogues de nucléosides qui agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs et/ou comme substrats alternatifs⁷ (Figure 6).

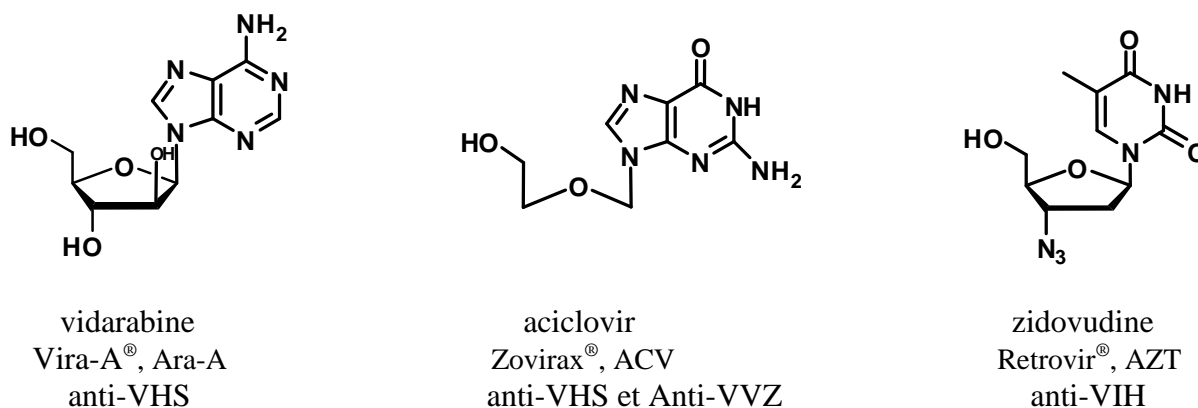


Figure 6 : Exemples d'inhibiteurs utilisés en chimiothérapie

Voyons quelques exemples d'analogues de nucléosides utilisés en chimiothérapie :

a. La vidarabine

Dans les années 50, Bergmann a isolé plusieurs nucléosides de *Tethya Crypta* (Tethylidae), une éponge des Caraïbes.⁸ Deux d'entre eux, la spongothymidine et la spongouridine sont constitués d'un sucre de type D-arabinose (Figure 7). Ces composés ont mené à la synthèse d'une nouvelle génération d'analogues de nucléosides modifiés comme la vidarabine (Vira-A[®]), qui est active contre le virus de l'herpès simplex.

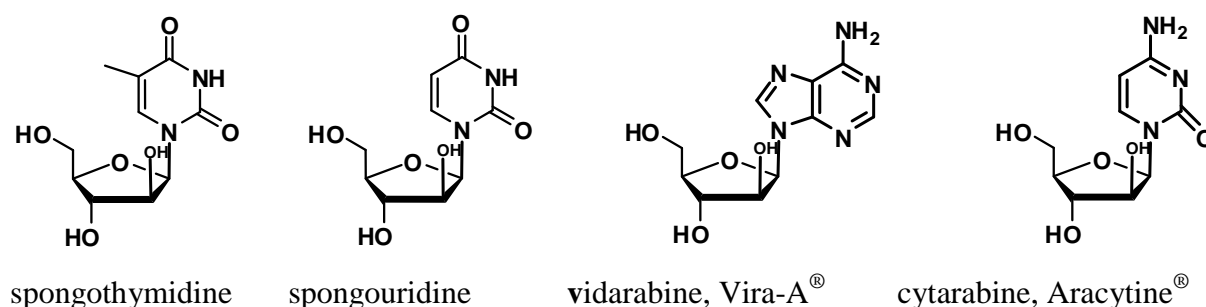


Figure 7 : Structure de deux nucléosides de *Tethya Crypta* et de ses analogues

⁷ De Clercq, E. *J. Clin. Virol.* **2004**, *30*, 115.

⁸ (a) Bergmann, W.; Feeney, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2809. (b) Bergmann, W.; Feeney, R. J. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 981. (c) Bergmann, W.; Burke, D. C. *J. Org. Chem.* **1955**, *20*, 1501. (d) Kijjoa, A.; Sawangwong, P. *Mar. Drugs* **2004**, *2*, 73.

Contrairement aux autres types de médicaments (comme par ex. Invirase[®]), qui agissent directement avec une polymérase de la cellule-hôte après pénétration intracellulaire, les analogues de nucléosides, eux, sont délivrés sous forme de prodrogues. Cela signifie que pour exercer leur activité antivirale, ces analogues doivent être au préalable transformés en nucléotides correspondant par des enzymes cellulaires ou virales, les kinases.⁹

b. L'aciclovir

L'aciclovir (ACV), commercialisé sous le nom de Zovirax[®], est un analogue de nucléoside synthétique. L'originalité de ce composé est la modification importante de la partie osidique : seuls les carbones C-1', C-4' et l'oxygène O-4' du pentofuranose sont présents, constituant ainsi une chaîne linéaire. Il en résulte donc que l'hydroxyle en position 3' est absent (Figure 8).

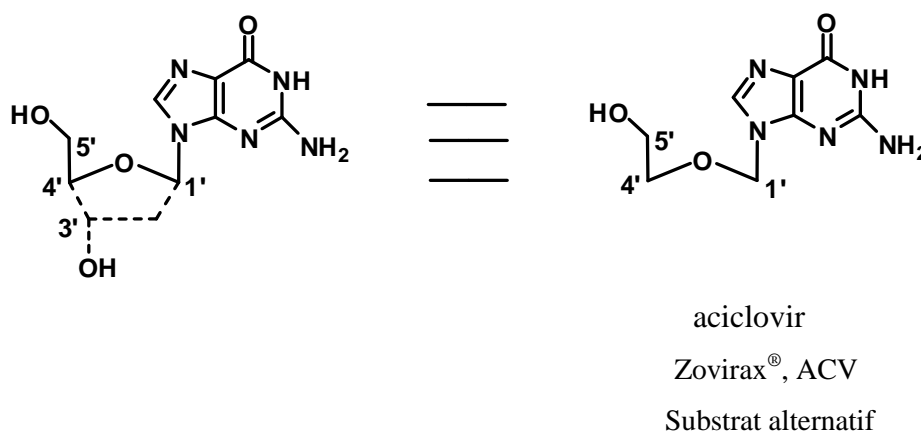


Figure 8 : Structure d'un 3'-désoxynucléoside

L'ACV est prescrit principalement pour prévenir et traiter des infections du virus de l'herpès simplex (VHS-1, VHS-2) et du virus de la varicelle zona (VVZ) touchant les sujets cancéreux ou immunodéprimés, mais aussi pour lutter contre l'encéphalite herpétique et la varicelle. Ce nucléoside agit sous la forme de nucléotide triphosphate ACV-TP (Figure 9), qui entre en compétition avec la désoxyguanosine triphosphate (dGTP). Ainsi, après pénétration de la membrane cellulaire, l'ACV en présence de virus (VHS ou VVZ) est triphosphorylé de

⁹ Chiacchio, U.; Iannazzo, D.; Piperno, A.; Romeo, R.; Giovanni, R.; Rescifina, A.; Saglimbeni, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 955.

manière sélective.¹⁰ La spécificité de l'action de l'ACV vient du fait qu'il est phosphorylé par la thymidine kinase du virus et non par les kinases de la cellule-hôte. C'est pourquoi, en absence d'infection, l'ACV n'est pas transformé en nucléotide monophosphate ACV-MP et les étapes ultérieures ne sont donc pas possibles.

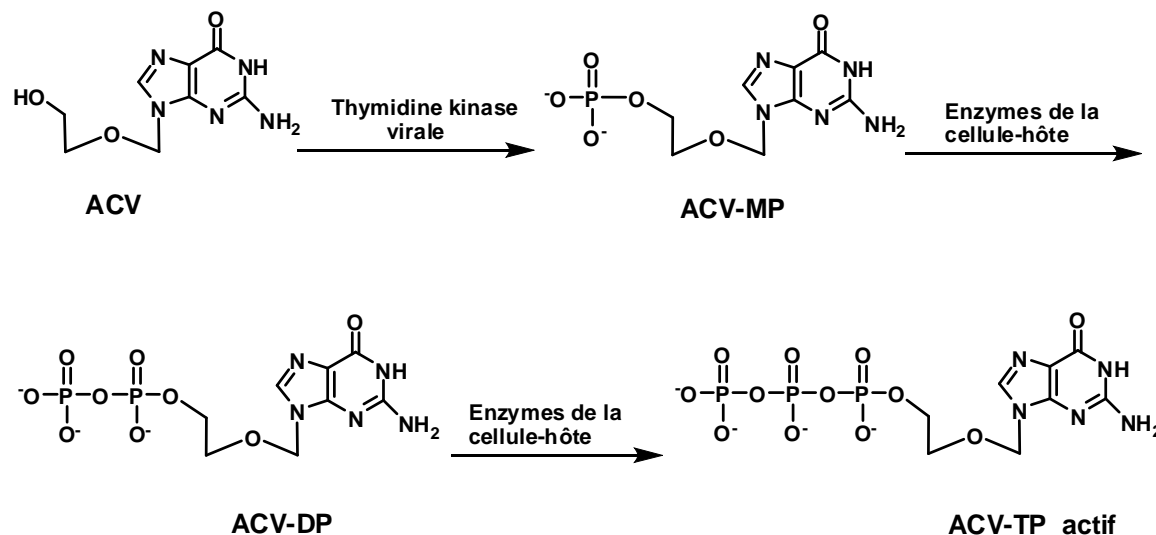
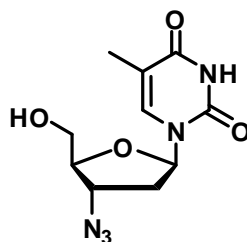


Figure 9 : Métabolisme et activation de l'aciclovir

c. La zidovudine

D'autres inhibiteurs alternatifs agissent en se fixant sur le site actif des polymérases virales. La zidovudine¹¹ (AZT) est notamment un exemple intéressant. Ce médicament-phare, commercialisé sous le nom de Retrovir[®], a inauguré l'ère de la chimiothérapie anti-VIH. L'AZT est un analogue de la thymidine possédant un groupement azide à la place du groupement hydroxyle en position 3' (Figure 10). Son brevet est tombé dans le domaine public en 1995.



zidovudine, Retrovir[®]

Figure 10 : Structure de l'AZT

¹⁰ Elion, G. B. *J. Med. Viro.* **1993**, 2.

¹¹ (a) Horwitz, J. P.; Chua, J.; Noel, M. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 2076. (b) Czernecki, S.; Valéry, J.-M. *Synthesis* **1991**, 239. (c) Sugimura, H.; Osumi, K.; Yamazaki, T.; Yamaya, T. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1813. (d) Jung, M. E.; Gardiner, J. M. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2614.

Cette molécule, approuvée par la FDA en 1987, est prescrite lors d'infection par le VIH en tant qu'inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (INTI).¹² Plus récemment, la famille des INTIs¹³ s'est étendue aux substances comprenant une double liaison entre les positions 2' et 3' du didésoxyribose : elle inclut la stavudine (Zerit[®], d4T),¹⁴ l'abacavir (Ziagen[®], ABC),¹⁵ la didanosine (Videx[®], ddl)¹⁶ et la zalcitabine (Hivid[®], ddC).¹⁷ D'autres molécules avec un groupement β -L-oxathiolane à la place du ribose, l'emcitabine (Emtriva[®], FTC) et la lamivudine (Epivir[®], 3TC),¹⁸ ont également été approuvées. Il est à noter que ces deux dernières, contrairement aux précédentes, appartiennent à la série L.¹⁹

A la différence de l'ACV, les 3 étapes de phosphorylation de l'AZT sont toutes assurées par des kinases cellulaires.²⁰ Dans la plupart des cas, l'étape limitante est la première phosphorylation du composé. Pour l'AZT, la phosphorylation du nucléoside monophosphate (AZT-MP) par la thymidylate kinase est limitante²¹ ainsi que, dans une moindre mesure, la dernière phosphorylation.²² L'AZT n'est pas un substrat idéal pour les kinases humaines, il en résulte une accumulation de l'AZT-MP et de l'AZT-diphosphate (AZT-DP) dans les

¹² (a) Mitsuya, H.; Weinhold, K. J.; Furman, P. A.; St. Clair, M. H.; Lehrman, S. N.; Gallo, R. L.; Bolognesi, D.; Barry, D. W.; Broder, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 7096. (b) De Clercq, E. *Nucleosides Nucleotides* **1994**, *13*, 1271.

¹³ Jonckheere, H.; Anné, J.; De Clercq, E. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 129.

¹⁴ (a) Horwitz, J. P.; Chua, J.; Da Rooge, M. A.; Noel, M.; Klundt, I. L. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 205. (b) Mansuri, M. M.; Starrett Jr., J. E.; Ghazzouli, I.; Hitchcock, M. J. M.; Sterzycki, R. Z.; Brankovan, V.; Lin, T.-S.; August, E. M.; Prusoff, W. H.; Sommadossi, J. -P.; Martin, J. C. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 461. (c) Crimmins, M. T.; King, B. W. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4192.

¹⁵ (a) Hervey, P. S.; Perry, C. M. *Drugs* **2000**, *60*, 447. (b) Weller, S.; Radomski, K. M.; Lou, Y.; Stein, D. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2052.

¹⁶ (a) Mitsuya, H.; Broder, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 1911. (b) Chu, C. K.; Bhadti, V. S.; Doboszewski, B.; Gu, Z. P.; Kosugi, Y.; Pullaiah, K. C.; Van Roey, P. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2217. (c) Shelton, M. J.; O'Donnell, A. M.; Morse, G. D. *Ann. Pharmacother.* **1992**, *26*, 660.

¹⁷ (a) Horwitz, J. P.; Chua, J.; Noel, M.; Donatti, J. T. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 817. (b) Cooney, D. A.; Dalal, M.; Mitsuya, H.; McMahon, J. B.; Nadkarni, M.; Balzarini, J.; Border, S.; Johns, D. G. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 2065. (c) Mitsuya, H.; Broder, S. *Nature* **1987**, *325*, 773. (d) Okabe, M.; Sun, R. C.; Tam, S. Y. K.; Todaro, L. J.; Coffen, D. L. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4780.

¹⁸ (a) Coates, J. A. V.; Cammack, N. S.; Jenkinson, H. J.; Jowett, A. J.; Jowett, M. I.; Pearson, B. A.; Pen, C. R.; Rouse, P. L.; Viner, K. C.; Cameron, J. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 733. (b) Perry, C. M.; Faulds, D. *Drugs* **1997**, *53*, 657.

¹⁹ Mathé, C.; Gosselin, G. *Antiviral Research* **2006**, *71*, 276.

²⁰ (a) Balzarini, J.; Pauwels, R.; Baba, M.; Herdewijn, P.; De Clercq, E.; Broder, S.; Johns, D. G. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 897. (b) Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; St. Clair, M. H.; Weinhold, K.; Rideout, J. L.; Freeman, G. A.; Lehrman, S. N.; Bolognesi, D. P.; Broder, S.; Mitsuya, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8333. (c) Balzarini, J.; Herdewijn, P.; De Clercq, E. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6127.

²¹ (a) Lavie, A.; Vetter, I. R.; Konrad, M.; Goody, R. S.; Reinstein, J.; Schlichting, I. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 601. (b) Lavie, A.; Konrad, M. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 351.

²² (a) Xu, Y.; Morera, S.; Janin, J.; Cherfils, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 3579. (b) Tepper, A.; Dammann, H.; Bominaar, A. A.; Veron, M. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32175. (c) Schneider, B.; Xu, Y. W.; Sellam, O.; Sarfati, R.; Janin, J.; Veron, M.; Deville-Bonne, D. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11491. (d) Bourdais, J.; Biondi, R.; Lascu, I.; Sarfati, S.; Guerreiro, C.; Janin, J.; Veron, M. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 7887.

cellules²³ ce qui est la cause d'effets secondaires chez les patients. La transcriptase inverse interagit avec l'AZT triphosphate (AZT-TP), suivant deux mécanismes possibles : soit une inhibition de la TI, soit un arrêt de la synthèse de l'ADN proviral par l'incorporation d'un substrat alternatif, l'AZT-TP.

Les limitations majeures des inhibiteurs nucléosidiques sont leur toxicité, leur manque d'activité dans certaines cellules et l'apparition de virus résistants. Leur activité et leur efficacité d'action dépendent à la fois de leur taux de phosphorylation, qui déterminent la concentration intracellulaires de la forme active et de leur capacité à être compétitive vis-à-vis du désoxynucléotide triphosphate naturel. Aussi, il semble impératif d'entreprendre la synthèse de nouveaux analogues de nucléosides. A ce titre, comme nous le verrons par la suite, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux analogues de nucléosides, les carbonucléosides.

II.2.1. Les analogues de nucléosides à base modifiée

a. Analogues à base pyrimidique modifiée

La modification la plus fréquemment apportée sur les bases pyrimidiques consiste à introduire sur leur noyau un ou plusieurs substituants. La 5-iodo-2'-désoxyuridine (IdU)²⁴ est le premier nucléoside antiviral décrit possédant une base pyrimidique modifiée (Figure 11). Ce composé a été utilisé dans le traitement de diverses infections herpétiques mais son utilisation n'a pas été poursuivie à cause de son manque de sélectivité et de ses effets secondaires intolérables en utilisation systémique. Deux autres exemples, la 5-trifluorométhyl-2'-désoxyuridine (TFT)²⁵ et la 5-éthyl-2'-désoxyuridine (EdU)²⁶, ont montré des propriétés anti-VHS et servent pour traiter l'herpès oculaire. La 5-bromovinyl-2'-désoxyuridine (BVDU),²⁷ quant à elle, est employée contre le Virus Varicelle-Zona (VVZ).

²³ Zhu, C.; Johansson, M.; Permert, J.; Karlsson, A. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14707.

²⁴ Prusoff, W. H. *Biophys. Acta* **1959**, *32*, 295.

²⁵ Kaufman, H. E.; Martola, E.; Heidelberger, C. *Science* **1964**, *145*, 585.

²⁶ De Clercq, E. Synthesis pyrimidine analogs in *Advances to antiviral agents*. Harnden, M., Ed.; Macmillan : London, **1985**, 57.

²⁷ (a) De Clercq, E.; Descamp, J.; Desomer, P.; Barr, P. J.; Jones, A. S.; Walker, R. T. *Proc. Natl. Sci. USA* **1979**, *76*, 2947. (b) De Clercq, E. *Biochem. Pharm.* **2004**, *68*, 2301.

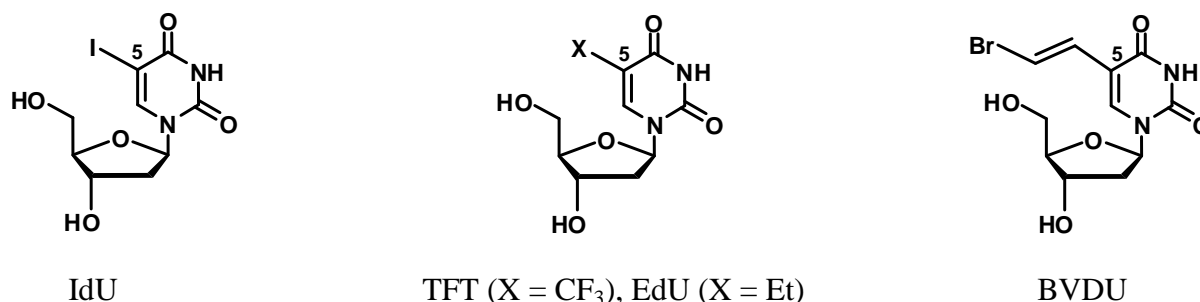


Figure 11 : Structure de l'IdU, TFT, EdU et BVDU

b. Analogues à base purique modifiée

Les principales modifications présentes sur les bases puriques consistent, comme dans le cas des bases pyrimidiques, à fonctionnaliser le noyau hétérocyclique. Cela conduit généralement à de bonnes activités biologiques et a donc vivement intéressé les chercheurs.²⁸ Dans les années 1980-90, plusieurs dérivés à base purique modifiée ont été mis sur le marché (Figure 12). La cladribine comporte une base 2-chloro-6-aminopurine et la fludarabine une base 2-fluoro-6-aminopurine. Quant à la pentostatine, sa base possède un hétérocycle non aromatique à sept atomes. Différents essais cliniques ont confirmé que ces molécules, utilisées seules ou en synergie avec d'autres composés cytotoxiques, étaient actives face aux tumeurs lymphoïdes.²⁹ La cladribine et la pentostatine servent contre la leucémie à tricholeucocytes.³⁰ La cladribine est également utilisée, comme la fludarabine, pour traiter la leucémie lymphoïde chronique et le lymphôme non hodgkinien.³¹

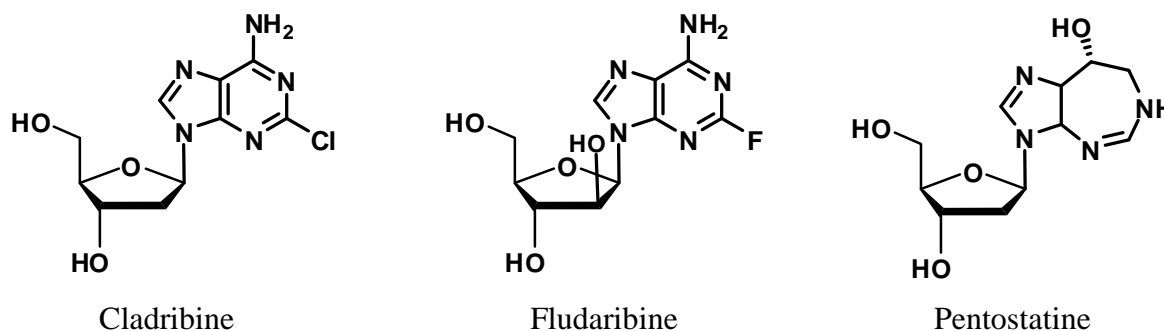


Figure 12 : Structure de la Cladribine, Fludaribine et la Pentostatine

²⁸ (a) Tallman, M.S.; Hakimian, D.; Variakojis, D.; Koslow, D.; Sisney, G.A.; Rademaker, A.W.; Rose, E.; Kaul, K. *Blood* **1992**, *80*, 2203-2209 ; (b) Robak, T.; Korycka, A.; Kasznicki, M.; Wrzesień-Kuś, A.; Smolewski, P. *Curr. Cancer Drug Targets* **2005**, *5*, 421.

²⁹ (a) Robak, T.; Lech-Maranda, E.; Korycka, A.; Robak, E. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 3165 ; (b) Pettit, A. R. *Br. J. Haematol.* **2003**, *121*, 692.

³⁰ Robak, T. *Cancer Treat. Rev.* **2006**, *32*, 365.

³¹ (a) Pastor-Anglada, M.; Molina-Arcas, M.; Casado, F. J.; Bellosillo, B.; Colomer, D.; Gil, J. *Leukemia* **2004**, *18*, 385. (b) Robak, T. *Cancer Treat. Rev.* **2007**, *33*, 710. (c) Kalinka-Warzocho, E.; Wajs, J.; Lech-Maranda, E.; Ceglarek, B.; Holowiecki, J.; Federowicz, I.; Walewski, J.; Czyz, J.; Robak, T.; Warzocho, K. *Cancer* **2008**, *113*, 367. (d) Zinzani, P. L. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2002**, *15*, 505.

II.2.2. Les analogues de nucléosides carbocycliques (carbonucléosides)

a. Présentation

Les analogues de nucléosides se différencient des nucléosides naturels par des modifications chimiques sur la partie osidiques et/ou au niveau de la base azotée. Ces modifications structurales et fonctionnelles peuvent améliorer grandement les propriétés biologiques (antitumorales ou antivirales) et pharmacologiques.³² Les carbonucléosides³³ sont considérés comme des bioisostères classiques de nucléosides dans lesquels l'atome d'oxygène du cycle furannique a été remplacé par un méthylène (Figure 13).

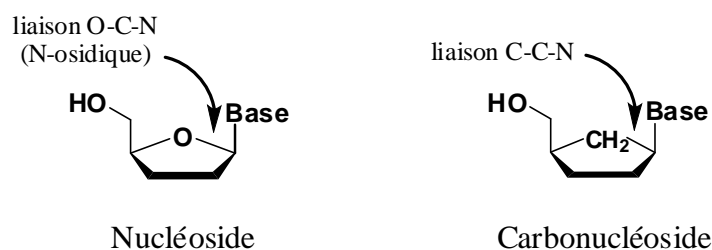


Figure 13 : Structure d'un nucléoside et d'un carbonucléoside

En raison du remplacement de la liaison O-C-N (liaison *N*-osidique) par une liaison C-C-N, le remplacement de l'oxygène intracyclique du ribose par un méthylène a permis d'obtenir des analogues de nucléosides carbocycliques. Cette modification de la partie sucre conduit à l'absence d'une véritable liaison glycosidique entre la base et le sucre, et rend ainsi ces molécules résistantes aux phosphorylases et aux dégradations chimiques ou enzymatiques³⁴ et, par voie de conséquence, ont une durée de vie plus importante lorsqu'ils se trouvent dans le milieu vivant. Ces analogues peuvent être classés selon la taille du cycle remplaçant le ribose (analogues à 3, 4, 5 ou 6 chaînons). Leurs propriétés thérapeutiques peuvent donc s'en trouver améliorées. De plus, ne se différenciant pas énormément des nucléosides apparentés, ils sont reconnus par les mêmes enzymes (par exemples les enzymes

³² (a) De Clercq, E. *Antiviral Res.* **2005**, *67*, 56. (b) De Clercq, E. *Microbiol.* **2005**, *8*, 552.

³³ (a) Agrofolio, L. A.; Challaud, S. R. *Acyclic, Carbocyclic and L-Nucleosides*; Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, Boston, London, 1998. (b) Crimmins, M. T. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9229. (c) Rodriguez, J. B.; Comin, M. J. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 95.

³⁴ (a) Herdewijn, P.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Vanderhaeghe, H. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 550. (b) Marquez, V. E.; Lim, M. *Med. Res. Rev.* **1986**, *6*, 1. (c) Roberts, S.; Biggadike, K.; Borthwick, A. D.; Kirk, B. In *Topics in Medicinal Chemistry*; Leeming, P. R. Ed.; Royal Society of Chemistry: London, 1988. (d) Saunders, J.; Cameron, J. M. *Med. Res. Rev.* **1995**, *15*, 497.

b. Les carbonucléosides substitués

Récemment, une nouvelle classe de nucléosides d'analogues de l'adénosine substitués par un groupement méthyle sur la position 1', 2' ou 3' du ribose³⁷ a été préparée et évaluée biologiquement (Figure 16).

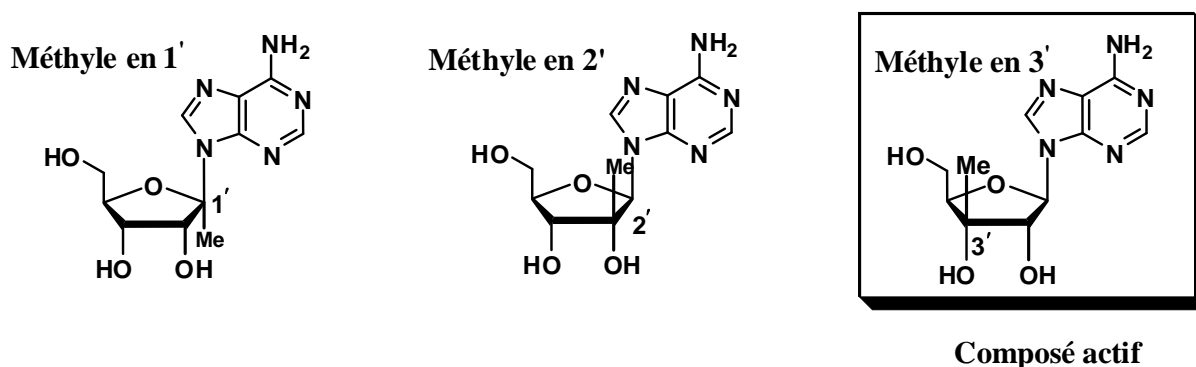


Figure 16 : Adénosines substituées par un groupement méthyle

Parmi cette série, le nucléoside possédant le groupement méthyle en position 3' s'est révélé être, de loin, le plus actif. La relation structure-activité étudiée par les auteurs au cours de ce travail³⁸ a mis en évidence que la position du groupement méthyle en 3' est cruciale pour l'activité biologique de cette classe de nucléosides.

En outre, différentes synthèses des carbonucléosides possédant un groupement méthyle sur différentes positions du cycle à cinq chaînons ont été développées ces dernières années³⁹ (Figure 17) montrant l'intérêt de ces molécules, nous citons comme exemple :

³⁷ Franchetti, P.; Cappellacci, L.; Pasqualini, M.; Petrelli, R.; Vita, P.; Jayaram, H. N.; Horvath, Z.; Szekeres, T.; Grifantini, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4983.

³⁸ Katagiri, N.; Yamatoya, Y.; Ishikura, M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 9069.

³⁹ Des exemples représentatifs des carbonucléosides substitués par un groupement méthyle en différentes positions : (a) Méthyle en position 1' : Kim, A.; Hong, J. H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2006**, *27*, 976. Méthyle en position 2' : (b) Lee, J. A.; Kim, H. O.; Tosh, D. K.; Moon, H. R.; Kim, S.; Jeong, L. S. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5081. (c) Gosselin, G.; Griffe, L.; Meillon, J.-C.; Storer, R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 906. (d) Dübon, P.; Schelwies, M.; Helmchen, G. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6722. Méthyle en position 3' : (e) Aubin, Y.; Audran, G.; Monti, H.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 374. (f) Brémond, P.; Audran, G.; Monti, H.; De Clercq, E.; Pannecouque, C. *Synthesis* **2009**, 290. Méthyle en position 4' : (g) Kim, A.; Hong, J. H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2005**, *26*, 1767. (h) Yin, X.-Q.; Schneller, S. W. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4057. (i) Méthyle en position 5' : Ye, W.; Schneller, S. W. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8641. (j) Méthyle en position 6' : Kim, A.; Hong, J. H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, *28*, 1545.

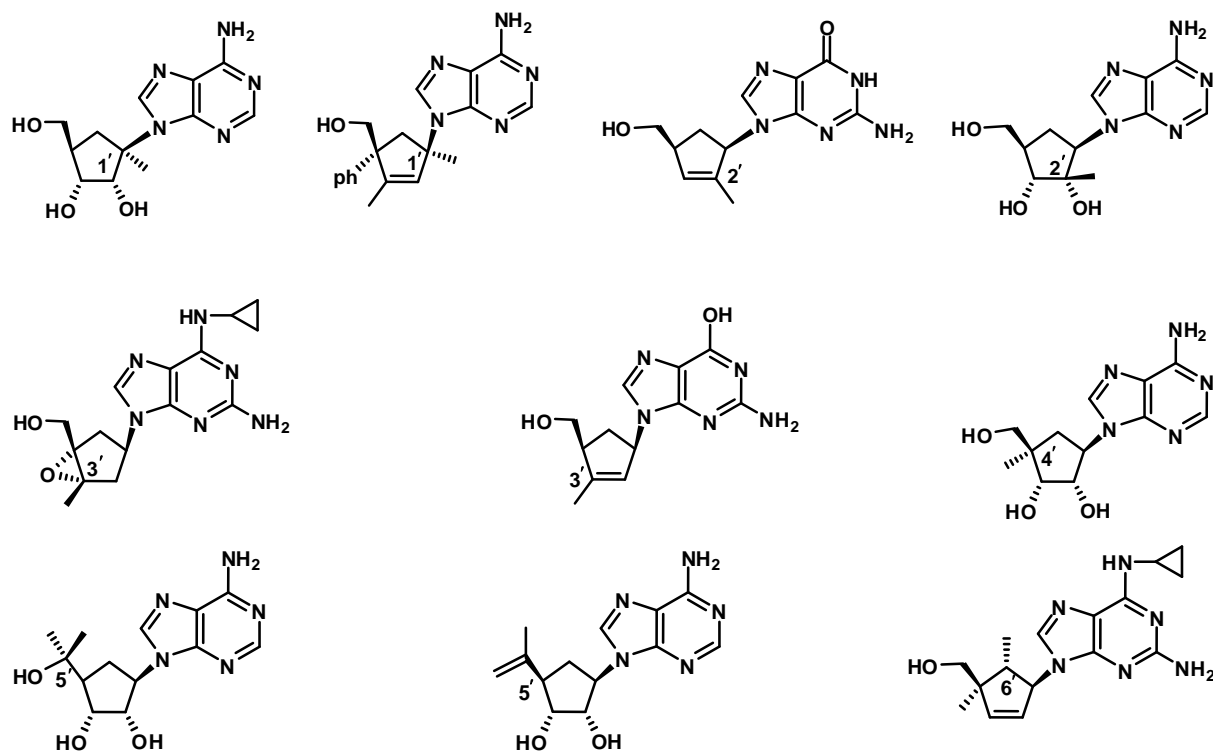


Figure 17 : Exemples de carbonucléosides substitués par un groupement méthyle

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la synthèse stéréocontrôlée de carbonucléosides inédits appartenant à la série D (Figure 18). Les molécules cibles envisagées sont des analogues de l'abacavir et de la néplanocine F substitués par un groupement méthyle en position 3' et un groupement hydroxyle en position 2' ou 4' sur le carbose. Une modification fonctionnelle a également été apportée au niveau de la base purique. L'évaluation de leur activité biologique a été réalisée par le groupe du Pr. Christophe Pannecoque (Rega institute, Louvain, Belgique).

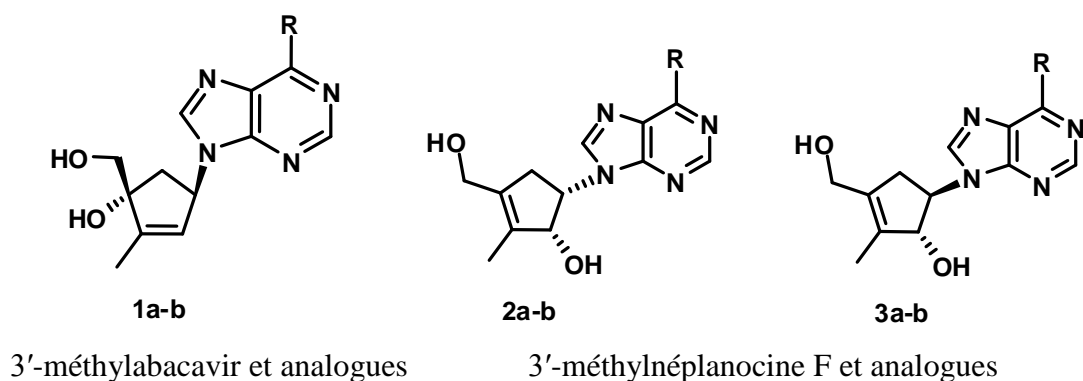


Figure 18 : Molécules cibles préparés au cours de ce travail

c. Les principales méthodologies de synthèse des carbonucléosides

La synthèse de carbonucléosides peut être réalisée à partir du pool chiral (D-ribose, D-ribolactone, acide L-tartrique...) ou par transformation chimique de composés usuels (lactame, cyclopentadiène⁴⁰...). Dans la plupart des méthodologies reportées dans la littérature, un carbo sucre fonctionnalisé est tout d'abord préparé, puis couplé avec un dérivé azoté. Les principales méthodologies sont les suivantes :

- **Construction de la base purique**

Les lactames bicycliques sont des produits très utilisés pour la construction des carbonucléosides.⁴¹ Par exemple, la 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-én-3-one est une brique de départ commode et facilement accessible aussi bien sous forme racémique qu'énantiopure (Schéma 1).⁴² Après la fonctionnalisation et l'ouverture du lactame, la base purique⁴³ ou pyrimidique⁴⁴ est construite à partir de la fonction amine de l'amino-alcool A.⁴⁵

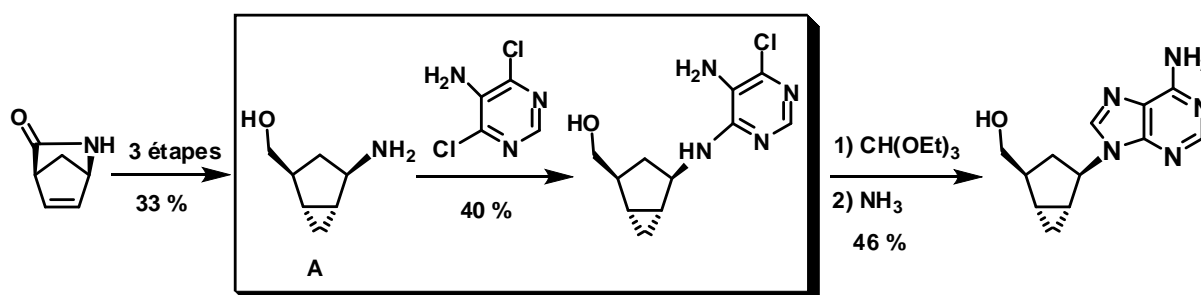


Schéma 1

⁴⁰ Daluge, S.; Vince, R. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2311

⁴¹ (a) Vince, R.; Hua, M.; Brownell, J.; Daluge, S. M.; Lee, F. C.; Shannon, W. M.; Lavelle, G. C.; Quails, J.; Weislow, O. S.; Kiser, R.; Canonico, P. G.; Schultz, R. H.; Narayanan, V. L.; Mayo, J. G.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *156*, 1046. (b) Daluge, S. M. **1991**, brevet U.S. 5,034,394. (c) Daluge, S. M.; Good, S. S.; Faletto, M. B.; Miller, W. H.; St. Clair, H.; Boone, L. R.; Tisdale, V. L.; Parry, N. R.; Reardon, J. E.; Dornsife, R. E.; Averett, D. R.; Krenitsky, T. A. *Antimicrob. Agents Chem.* **1997**, *41*, 1082. (d) Wyatt, P. G.; Anslow, A. S.; Coombs, B. A.; Cousins, R. P. C.; Evans, D. N.; Gilbert, V. S.; Humber, D. C.; Patemoster, I. L.; Sollis, S. L.; Tapolczay, D. J.; Weingarten, G. G.; *Nucleosides Nucleotides*, **1995**, *14*, 2039. (e) Katagiri, N.; Matsushashi, Y.; Kokufuda, I.-L.; Takebayashi, M.; Kaneko, C. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1961.

⁴² Taylor, S. J. C.; McCague, R.; Wisdom, R.; Lee, C.; Dickson, K.; Ruecroft, G.; O'Brien, F.; Littlechild, J.; Evans, J.; Roberts, S. M.; Evans, C. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1117.

⁴³ (a) Ainaï, T.; Wang, Y.-G.; Tokoro, Y.; Kobayashi, Y. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 655. (b) Woo Kim, K.; Hee, Hong, J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, *25*, 668. (c) Jiang, M. X.-W.; Jin, B.; Gage, J. L.; Priour, A.; Savela, G.; Miller, M. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4164.

⁴⁴ (a) Yang, Y.-Y.; Meng, W.-D.; Qing, F. L. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4257. (b) Wang, P.; Agrofoglio, L. A.; Newton, M. G.; Chu, C. K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4173. (c) Ezzitouni, A.; Russ, P.; Marquez, V. E. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4870.

⁴⁵ Gupta Bhushan, R.; Vince, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2325.

- **Substitution d'un groupe hydroxyle activé**

La synthèse de spiroribonucléosides **B** est décrite à partir du (+)-camphre (Schéma 2).⁴⁶ La nucléobase est introduite en deux étapes. La fonction alcool est dans un premier temps activée sous la forme d'un mésylate, puis celui-ci est substitué par l'anion de l'adénine. La réaction peut être effectuée sur un mésylate⁴⁷ ou un triflate.⁴⁸

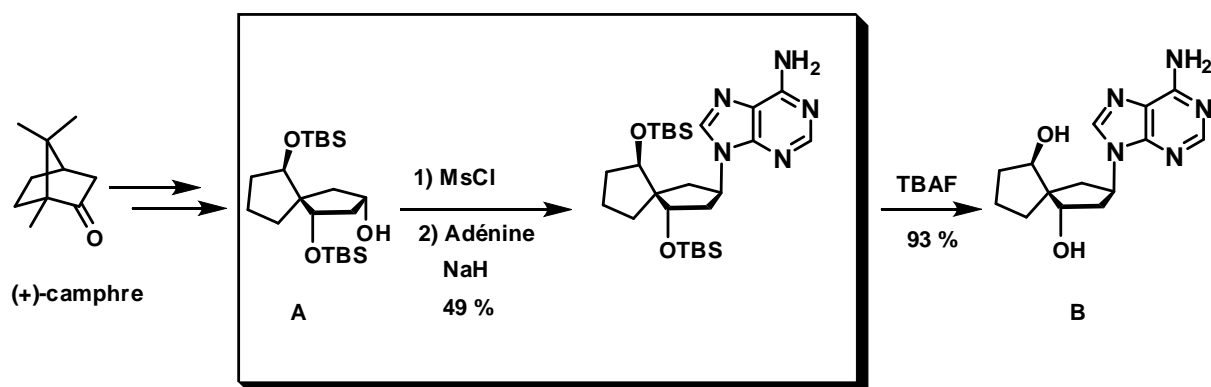


Schéma 2

- **Réaction de Mitsunobu**

Les dérivés de sucre,⁴⁹ notamment les lactones,⁵⁰ sont des briques de départ également employées pour la synthèse des carbonucléosides. Par exemple, la synthèse de

⁴⁶ Hartung, R.; Paquette, L. A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1597.

⁴⁷ (a) Tseng, C.; Marquez, V. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 3669. (b) Marquez, V.; Lim, M.; Tseng, C.; Markovac, A.; Priest, M.; Khan, M.; Kaskar, B. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5709. (c) Jones, M.; Roberts, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 2927. (d) Tseng, C.; Marquez, V.; Fuller, R.; Goldstein, B.; Haines, D.; McPherson, H.; Parsons, J.; Shannon, W.; Arnett, G.; Hollingshead, M.; Driscoll, J. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1442. (e) Marquez, V.; Bodenteich, M.; Copp, R.; Lim, B. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* **1990**, *22*, 35. (f) Wolfe, M.; Anderson, B.; Borcharding, D.; Borchardt, R. *J. Org. Chem.* **1990**, *5*, 4712. (g) Moon, H. R.; Kim, H. O.; Lee, K. M.; Chun, M.W.; Kim, J. H.; Jeong, L. S. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3501.

⁴⁸ (a) Bisacchi, G. S.; Singh, J.; Godfrey, Jr., J. D.; Kissick, T. P.; Mitt, T.; Malley, M. F.; Di Marco, J. D.; Gougoutu, J. Z.; Mueller, R. H.; Zahler, R. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2902. (b) Brémond, P.; Audran, G.; Aubin, Y.; Monti, H. *Synlett* **2007**, 1124.

⁴⁹ (a) Nowak, I.; Cannon, J. F.; Robins, M. J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 532. (b) Chu, C. K.; Beach, J. W.; Jeong, L. S.; Choi, B. G.; Comer, F. I.; Alves, A. J.; Schinazi, R. F. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6503. (c) Gillaizeau, I.; Charamon, S.; Agrofoglio, L. A. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8817. (d) Agrofoglio, L. A.; Amblard, F.; Nolan, S. P.; Charamon, S.; Gillaizeau, I.; Zevaco, T. A.; Guenot, P. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8397. (e) Ovaa, H.; Code, J. D. C.; Lastdrager, B.; Overkleeft, H. S.; Van Der Marel, G. A.; Van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7987. (f) Hong, J. H.; Shim, M. J.; Ro, B. O.; Ko, O. H. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6837. (g)

carbonucléosides contraints **B** est accomplie à partir de la D-(+)-ribo- γ -lactone⁵¹ (Schéma 3). L'étape clé de la synthèse est un couplage de Mitsunobu entre la 6-chloropurine et le carbosucrose **A**.⁵² Après quatre étapes, le carbonucléoside **B** est obtenu.

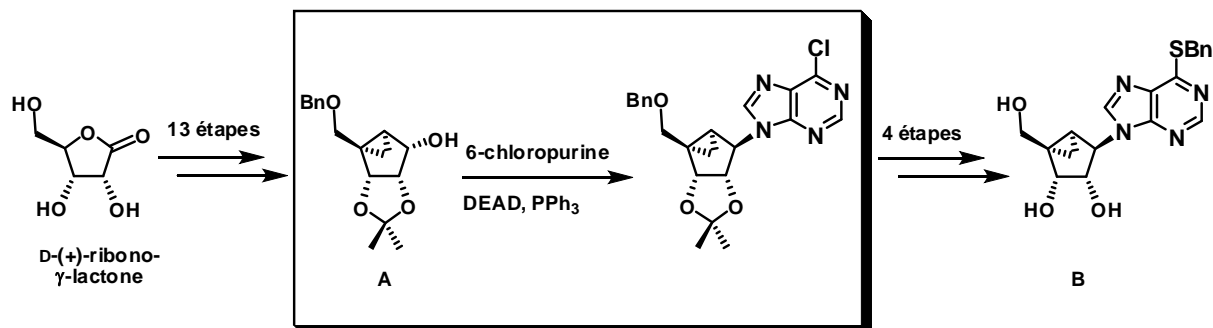


Schéma 3

- Ouverture d'un cycle

La synthèse du carbonucléoside⁵³ **C** est effectuée à partir du D-ribose⁵⁴ (Schéma 4). Après quelques étapes, la condensation de l'anion de l'adénine sur un sulfate cyclique **A**

-
- Gurjar, M. K.; Maheshwar, K. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7552. (h) Song, G. Y.; Paul, V.; Choo, H.; Morrey, J.; Sidwell, R. W.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3985.
- ⁵⁰ (a) Joschi, B. V.; Moon, H. R.; Fettingner, J. C.; Marquez, V. E.; Jacobson, K. A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 439. (b) Choi, W. J.; Park, J. G.; Yoo, S. J.; Kim, H. O.; Moon, H. R.; Chun, M. W.; Jung, Y. H.; Jeong, L. S. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6490. (c) Ali, S. M.; Ramesh, K.; Borchardt, R. T. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1509. (d) Song, G. Y.; Naguib, F. N. M.; El Kouni, M. H.; Chu, C. K. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 1915. (e) Rodriguez, S.; Edmont, D.; Mathé, C.; Périgaud, C. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7165. (f) Hegedus, L. S. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4200. (g) Marquez, V. E.; Lim, M., III; Markovac, A.; Priest, M. A. *Nucleic Acid Chem.* **1991**, 252.
- ⁵¹ Lee, K.; Cass, C.; Jacobson, K. A. *Org. Lett.* **2001**, *4*, 597.
- ⁵² (a) Gnana Ravi, R.; Sung Kim, H.; Servos, J.; Zimmermann, H.; Lee, K.; Maddileti, S.; Boyer, J. L.; Kendall Harden, T.; Jacobson, K. A. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2090. (b) Martin, S. F.; Dodge, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3017. (c) Jin, Y. H.; Liu, P.; Wang, J.; Baker, R.; Huggins, J.; Chu, C. K. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9012. (d) Comin, M. J.; Leitofuter, J.; Rodriguez, J. B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3129. (e) Paquette, L. A.; Hartung, R. E.; France, D. *J. Org. Lett.* **2003**, *5*, 869.
- ⁵³ (a) Lee, J. A.; Kim, H. O.; Tosh, D. K.; Ryong Moon, H.; Kim, S.; Shin Jeong, L. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5081. (b) Jun Choi, W.; Ryong Moon, H.; Kim, H. O.; Nae Yoo, B.; Lee, J. A.; Hong, Shin, D.; Shin Jeong, L. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2634.
- ⁵⁴ (a) Hyun Cho, J.; Bernard, D. L.; Sidwell, R. W.; Kern, E. R.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1140. (b) Borcharding, D. R.; Scholtz, S. A.; Borchardt, R. T. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5457. (c) Jin, Y. H.; Liu, P.; Wang, J.; Baker, R.; Huggins, J.; Chu, C. K. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9012. (d) Wang, P.; Gullen, P.; Gary Newton, M.; Cheng, Y.-C.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3390. (e) Rao, J. R.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 839. (f) Ohira, S.; Sawamoto, T.; Yamamoto, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1537. (g) Jin, Y. H.; Liu, P.; Wang, J.; Baker, R.; Huggins, J.; Chu, C. K. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9012. (h) Moon, H. R.; Choi, W. J.; Kim, H. O.; Jeong, L. S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1189. (i) Yang, M.; Ye, W.; Schneller, S. W. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3993.

conduit régiosélectivement au carbonucléoside protégé **B**. La déprotection de ce dernier permet d'accéder à la molécule cible.

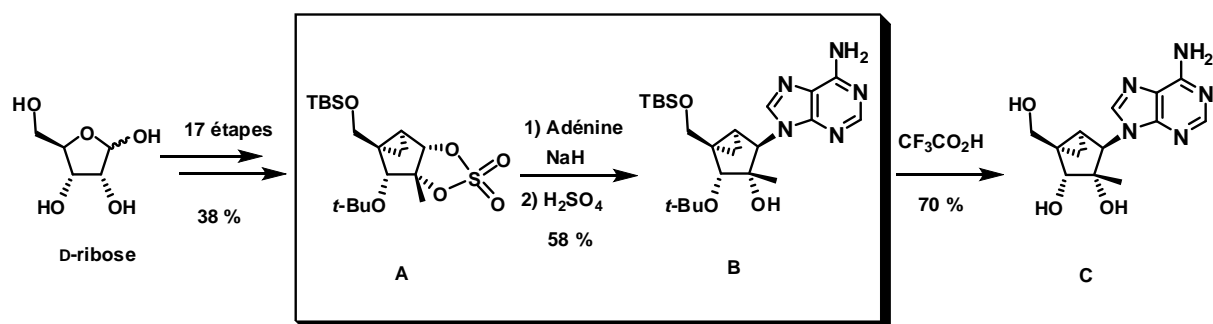


Schéma 4

La réaction peut être conduite sur un époxyde,⁵⁵ un sulfate⁵⁶ ou un sulfite.⁵⁷

• Chimie du palladium

Hong a réalisé la synthèse d'un analogue du carbovir à partir du L-tartrate de diisopropyle (Schéma 5).⁵⁸ Après quelques étapes, un dicarbonate allylique **A** est mis en présence de l'anion de l'adénine et de palladium (0)⁵⁹ pour conduire à un composé de symétrie C₂ diadénylé **B**. Après trois étapes, la synthèse de la molécule cible est réalisée avec un rendement de 61%.

⁵⁵ (a) Kondo, K.; Sato, T.; Takemoto, K. *Chem. Lett.* **1973**, 967. (b) DiMenna, W.; Piantadosi, C.; Lamb, R. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 1073. (c) Martin, J.; Smee, D.; Verheyden, J. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 755. (d) Bindu Madhavan, G.; Martin, J. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1287. (e) Palmer, C.; Parry, K.; Roberts, S. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 279. (f) Ruediger, E.; Martel, A.; Meanwell, A.; Solomon, C.; Turmel, B. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 739.

⁵⁶ (a) Ryong, Moon, H.; Ok Kim, H.; Woo Chun, M.; Shin Jeong, L. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4733. (b) Jeon, L. S.; Marquez, V. E. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2353.

⁵⁷ Lang, H.; Moser, H. E. *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1527.

⁵⁸ Fang, Z.; Hee Hong, J. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 993.

⁵⁹ (a) Trost, B. M.; Kuo, G.-H.; Benneche, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 621. (b) Agrofoglio, L. A.; Gillaizeau, I.; Saito, Y. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1875. (c) Frost, C. G.; Howarth, J.; Williams, J. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 1089. (d) Stary, I.; Zajicek, J.; Kocovsky, P. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 7229. (e) Williams, J. M. *Synlett* **1996**, 705. (f) Trost, B. M.; Verhoeven, T. R. In *Comprehensive Organometallic Chemistry*; Wilkinson, G., Stone, F. G. A., Abel, E. W., Eds.; Pergamon: New York, 1982; Vol. 8. (g) Tsuji, J.; Minami, I. *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 140. (h) Tsuji, J. *Palladium Reagents and Catalysts: Innovations in Organic Synthesis*, Wiley: Chichester, UK, 1995.

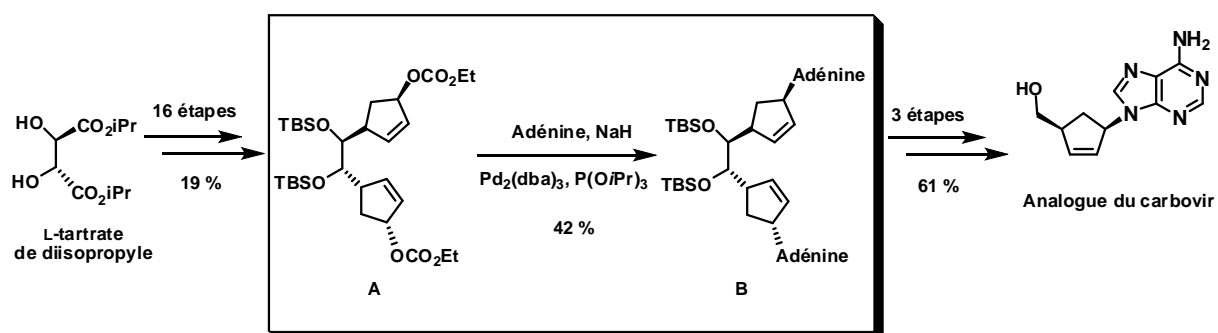


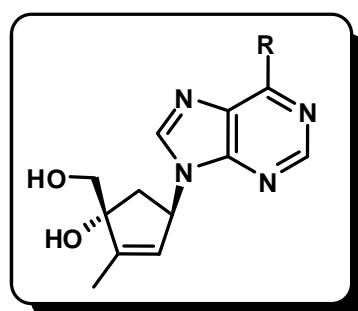
Schéma 5


DEUXIÈME PARTIE :

SYNTHÈSE STÉRÉOCONTRÔLÉE

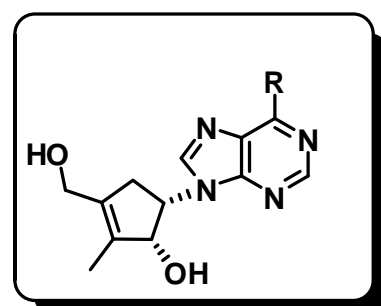
DES CARBONUCLÉOSIDES


(±)-1a-b, (±)-2a-b et (±)-3a-b



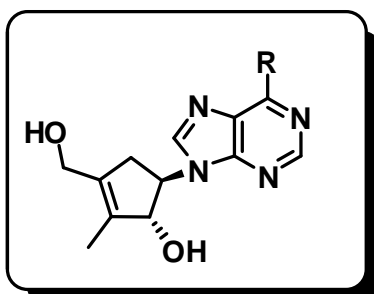
(±)-1a $R_1 = \text{HN}$ 


(±)-1b $R_2 = \text{NH}_2$



(±)-2a $R_1 = \text{HN}$ 

(±)-2b $R_2 = \text{NH}_2$



(±)-3a $R_1 = \text{HN}$ 

(±)-3b $R_2 = \text{NH}_2$

CHAPITRE I - Synthèse diastéréosélective des carbonucléosides (±)-1a-b

I.1. Introduction sur l'abacavir

Le carbovir (Figure 19), synthétisé par Vince⁶⁰ en 1988, a montré une forte activité *in vitro* contre le VIH par inhibition sélective de la transcriptase inverse. De plus, son action est synergique de celle de l'AZT. Malheureusement, il a été retiré des essais cliniques à cause de problèmes pharmacocinétiques et toxicologiques. La particularité de ce composé est qu'il s'agit d'un 2',3'-didéoxy-2',3'-didéhydrocarbonucléoside.

A la recherche d'analogues moins toxiques que le carbovir, une équipe de Glaxo-SmithKline (GSK) a synthétisé le 1592U89, ou abacavir⁶¹ (Figure 19). Ce composé a montré une activité anti-VIH similaire à celle du carbovir, tout en ayant une meilleure biodisponibilité orale et la capacité de pénétrer le système nerveux central en franchissant la barrière hématoencéphalique. Après des essais cliniques fructueux, l'abacavir a ensuite été approuvé par la FDA le 18 décembre 1998 pour le traitement du SIDA. Il est le quinzième médicament anti-rétrovirus approuvé aux Etats-Unis et son brevet a été tombé dans le domaine public le 26 décembre 2009.

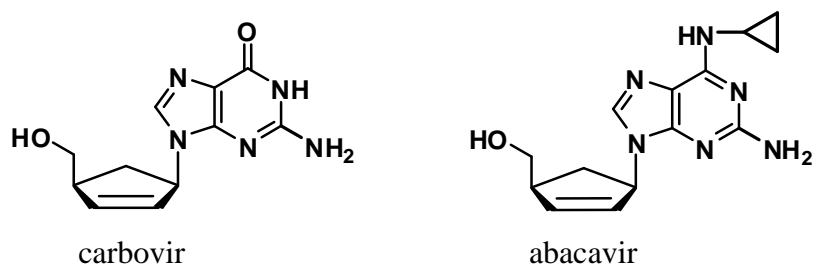


Figure 19 : Structure du carbovir et de l'abacavir

⁶⁰ (a) Vince, R.; Hua, M.; Brownell, J.; Daluge, S. M.; Lee, F. C.; Shannon, W. M.; Lavelle, G. C.; Qualls, J.; Weislow, O. S.; Kiser, R.; Canonico, P. G.; Schultz, R. H.; Narayanan, V. L.; Mayo, J. G.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *156*, 1046. (b) Vince, R.; Hua, M. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 17. (c) Vince, R. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1991**, *25*, 193. (d) Parker, W. B.; Shaddix, S. C.; Bowdon, B. J.; Rose, L. M.; Vince, R.; Shannon, W. M.; Bennett, L. L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 1004.

⁶¹ (a) Daluge, S. M. **1991**, brevet U.S. 5,034,394. (b) Good, S. S.; Daluge, S. M.; Ching, S. V.; Ayers, K. M.; Mahony, W. B.; Faletto, M. B.; Domin, B. A.; Owens, B. S.; Dornsife, R. E.; McDowell, J. A.; Lafon, S. W.; Symonds, W. T. *Antiviral Res.* **1995**, *26*, A229. (c) Crimmins, M. T.; King, B. W. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4192. (d) Daluge, S. M.; Good, S. S.; Faletto, M. B.; Miller, W. H.; St. Clair, M. H.; Boone, L. R.; Tisdale, M.; Parry, N. R.; Reardon, J. E.; Dornsife, R. E.; Averett, D. R.; Krenitsky, T. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1082. (e) Hervey, P. S.; Perry, L. M. *Drugs* **2000**, *60*, 447. (f) Daluge, S. M.; Martin, M. T.; Sickles, B. R.; Livingston, D. A. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 297.

L'abacavir est commercialisé par GSK sous le nom de Ziagen[®] (Figure 20). Il est également disponible en dithérapie, en combinaison avec la lamivudine (Kivexa[®], Epzicom[®]), et en trithérapie en combinaison avec la zidovudine et la lamivudine (Trizivir[®]). Il présente cependant un grand risque d'hypersensibilité⁶² (10% des patients) et peut augmenter la possibilité d'infarctus du myocarde (90% des patients).



Figure 20

Dans le but de découvrir des composés plus actifs et/ou moins toxiques que l'abacavir, nous avons entrepris la synthèse et l'évaluation biologique d'analogues de l'abacavir substitués par un groupement méthyle en position 3' et un groupement hydroxyle en position 4' sur le carbose et possédant différentes bases puriques (Figure 21).

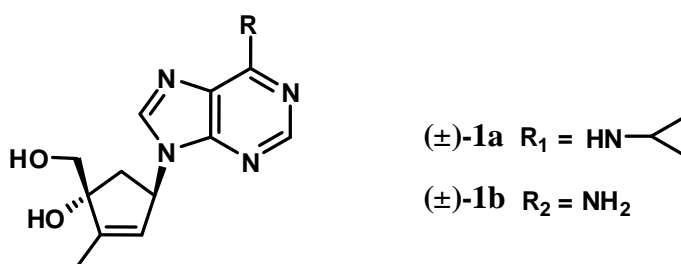


Figure 21 : Carbonucléosides cibles (±)-1a-b

⁶² (a) Mallal, S.; Nolan, D.; Witt, C.; Masel, G.; Martin, A.; Moore, C.; Sayer, D.; Castley, A.; Mamotte, C.; Maxwell, D. *The Lancet* **2002**, 359, 727. (b) Hetherington, S.; Hugues, A.; Mosteller, M.; Shortino, K.; Baker, K.; Spreen, W.; Lai, E.; Davies, A.; Handley, A.; Dow, D. *The Lancet* **2002**, 359, 1121.

La synthèse des nucléosides et de leurs analogues a fait l'objet de nombreuses recherches pendant plusieurs années. Il existe plusieurs méthodes de synthèse⁶³, partant en général d'un sucre (ribose). Après différentes étapes de protection sélective, fonctionnalisation et déprotection, les analogues de nucléosides sont obtenus.

I.2. Analyse rétrosynthétique

Notre stratégie de synthèse repose sur l'utilisation d'une brique moléculaire à cinq chaînons (\pm)-**8**. Le plan rétrosynthétique des molécules cibles (\pm)-**1a-b** est décrit dans le schéma 6.

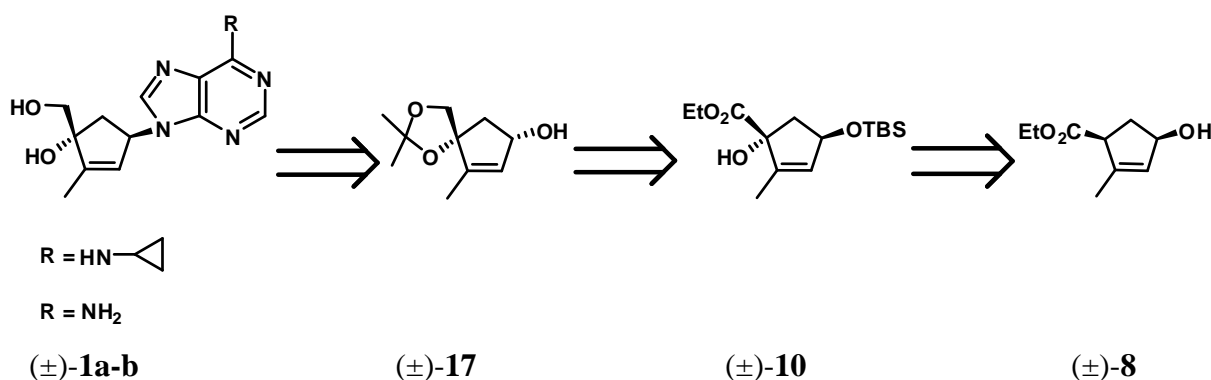


Schéma 6

Les molécules cibles (\pm)-**1a-b** pourraient être préparées à partir de l'alcool (\pm)-**17** mis en œuvre une déprotection et une réaction de Mitsunobu. L'alcool (\pm)-**17**, quant à lui, pourrait être obtenu à partir du composé (\pm)-**10** qui proviendrait d'une oxydation allylique régiosélective effectuée sur la brique moléculaire de départ (\pm)-**8**.

I.3. Présentation de la stratégie générale de la synthèse des carbonucléosides (\pm)-**2a-b**

Le Schéma 7 présente le tableau synoptique des étapes de nos approches synthétiques basées sur l'analyse rétrosynthétique effectuée précédemment.

⁶³ Huryn, D. M.; Okabe, M. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1745.

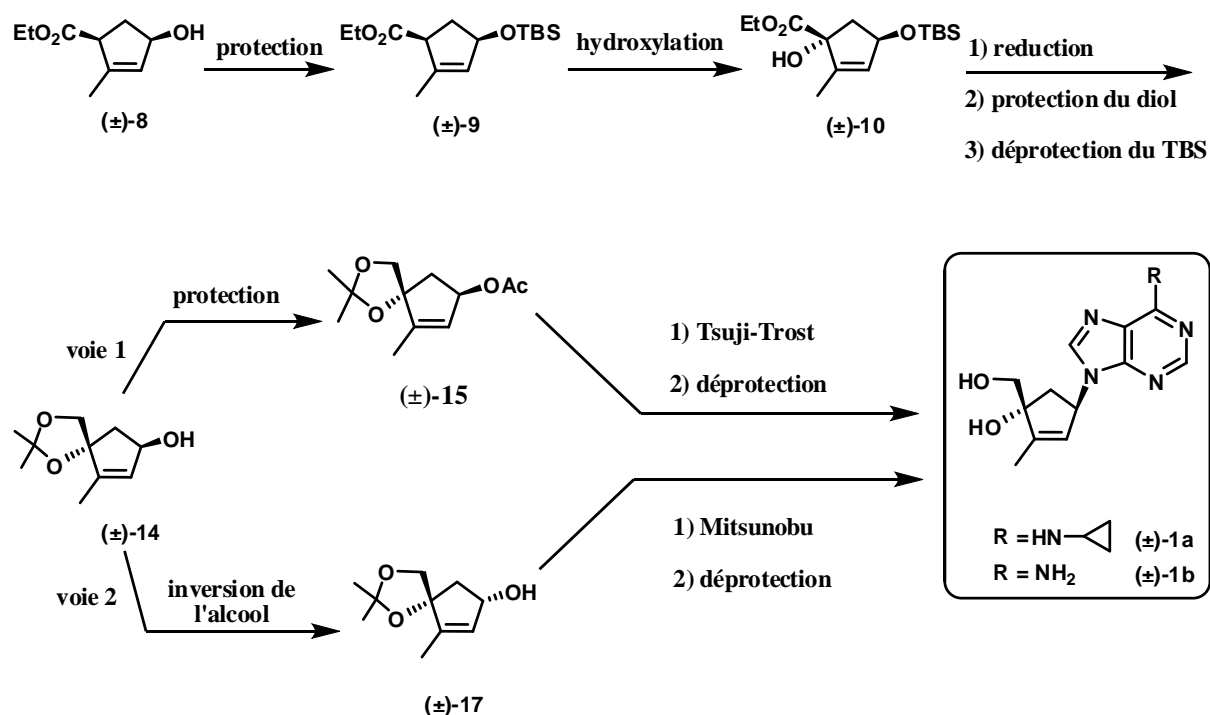


Schéma 7

I.4. Détails de la synthèse de carbonucléoside (±)-1a

I.4.1. Synthèse de la brique moléculaire de départ (±)-8

Le point de départ de notre synthèse réside dans l'emploi d'une brique moléculaire à 5 chaînons, le *cis*-4-hydroxy-2-méthylcyclopent-2-ènedicarboxylate d'éthyle (±)-8, préparée en 4 étapes⁶⁴ avec un rendement global de 41% à partir de l'acétoacétate de méthyle (±)-4 (Schéma 8). La bromation régiosélective de ce dernier fournit le composé bromé (±)-5 avec un rendement de 90%. L'étape suivante est une condensation entre ce dérivé bromé et l'acétoacétate d'éthyle en présence de sodium métallique dans le 1,2-diméthoxyéthane (glyme). Le cycle à cinq chaînons (±)-6 est ainsi formé avec un rendement de 71%. La décarboxylation de ce composé est réalisé en utilisant une réaction de Krapcho : l'action de l'iodure de sodium au reflux d'un mélange acide acétique/diglyme (bis(2-méthoxyéthylether)) conduit à l'énone (±)-7 avec un rendement de 80%. La réduction de la fonction cétone, sans toucher à la fonction ester carboxylique, peut être aisément réalisée avec le borohydrure de

⁶⁴ Dolby, L. J.; Elliger, C. A.; Esfandiari, S.; Marshall, K. S. *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 4508.

sodium (NaBH_4) dans les conditions décrites par Luche⁶⁵ a permis d'accéder à l'alcool *cis* (\pm)-**8** avec un rendement de 79% et à son épimère *trans* (\pm)-**8'** avec 14% de rendement.

Les deux produits sont facilement séparables par simple colonne chromatographique. Le rendement global de la séquence est de 41% et permet d'accéder rapidement à plusieurs dizaines de grammes d'alcool (\pm)-**8**.

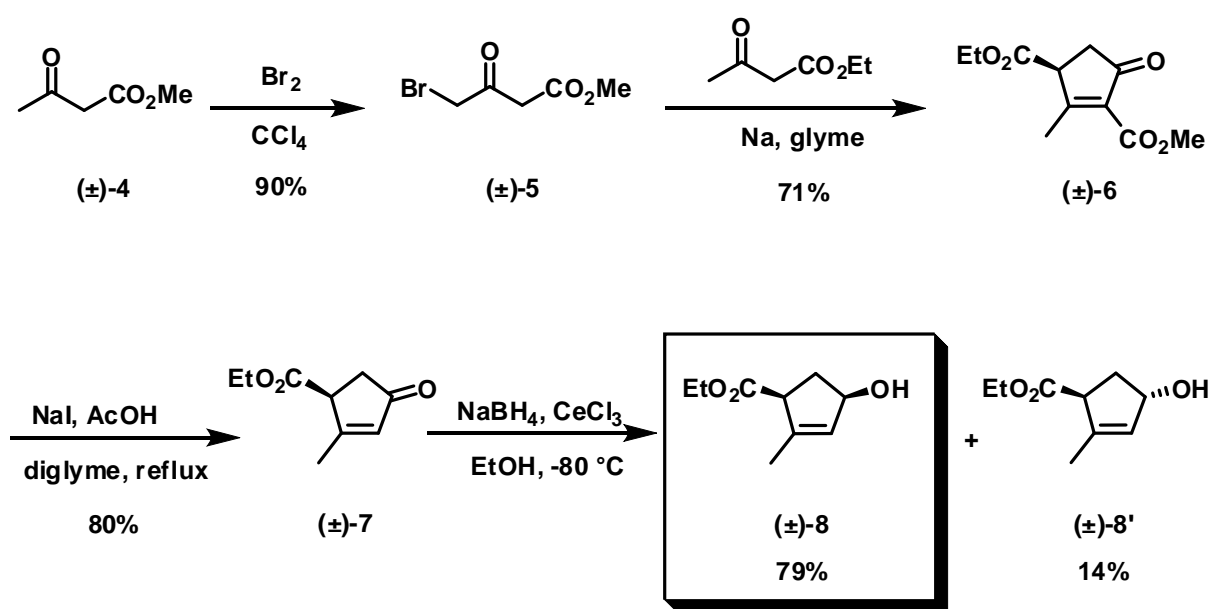


Schéma 8

Les deux énantiomères sont accessibles en grandes quantités et leurs configurations absolues ont été déterminées par analyse cristallographique d'un dérivé cristallin comportant un auxiliaire chiral (chlorure de l'acide (-)-(1*S*,4*R*)-camphanique).⁶⁶

I.4.2. Protection de l'alcool : composé (\pm)-**9**

La protection de l'alcool secondaire sous forme d'éther silylé par le chlorure de tertibutyldiméthylsilyle (TBSCl) en présence d'imidazole dans le N,N-diméthylformamide (DMF) selon la méthodologie décrite par Corey⁶⁷ conduit au composé (\pm)-**9** avec un rendement de 90% à partir de l'alcool (\pm)-**8** (Schéma 9).

⁶⁵ Gemal, A. L.; Luche, J.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5454.

⁶⁶ Audran, G.; Acherar, S.; Monti, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *5*, 92.

⁶⁷ Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190.

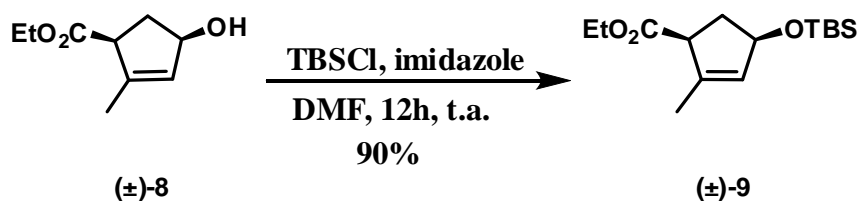


Schéma 9

I.4.3. Hydroxylation allylique du composé (±)-9

L'hydroxylation allylique régiosélective du composé (±)-9 est réalisée en utilisant du dioxyde de sélénium⁶⁸ (SeO₂) dans le dichlorométhane au reflux pendant 12h à fournir un seul diastéréoisomère (±)-10 avec un rendement isolé de 56% (Schéma 10).

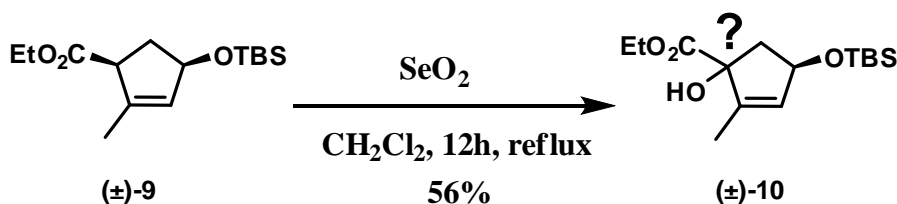


Schéma 10

I.4.4. Détermination de la configuration de l'alcool allylique (±)-10

La structure de l'alcool (±)-10 ne peut être établie sans ambiguïté par analyse RMN. Nous avons donc essayé de cristalliser ce composé et plusieurs de ces dérivés afin d'effectuer une analyse par diffraction aux rayons X. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à obtenir des cristaux adéquats pouvant être étudiés par cette technique. Ce problème a été résolu par transformation de cet alcool en dérivé acétate (±)-11 (Schéma 11). Ce dérivé est un beau solide et une analyse par diffraction aux rayons X de ce composé obtenu sous forme cristalline a été réalisée permettant de déterminer sa structure ainsi que celles de ses précurseurs (Figure 22).

⁶⁸ Riley, H. L.; Friend, N. A. C. *J. Chem. Soc.* **1932**, 2342.

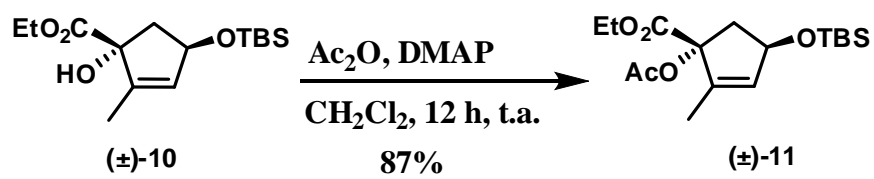


Schéma 11

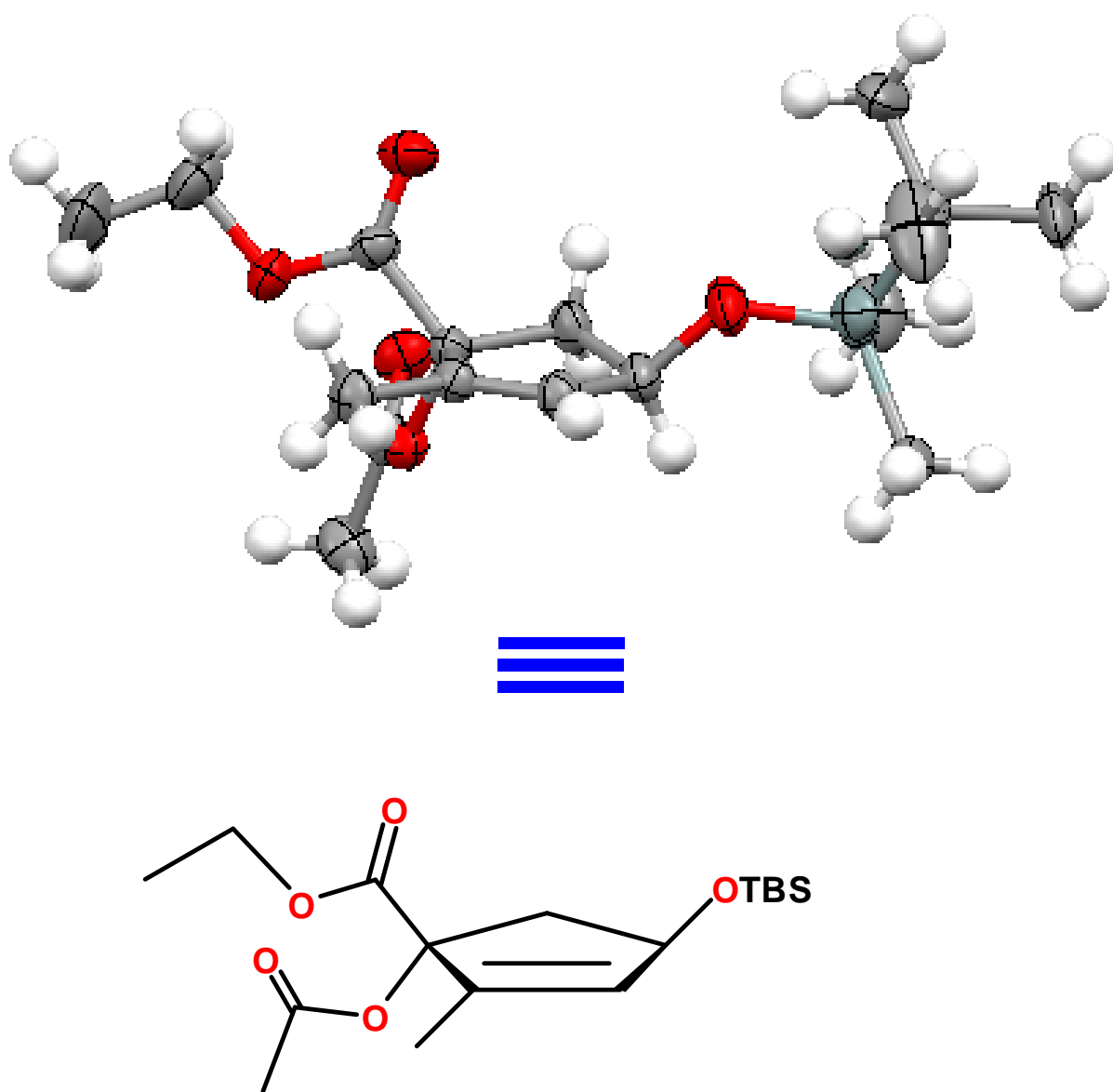


Figure 22 : Analyse RX de l'acétate allylique (±)-11

1.4.5. Réduction de l'ester (±)-10

Il est connu que les éthers silylés⁶⁹ encombrés sont des groupements protecteurs stables lors d'étapes de réduction⁷⁰ utilisant des donneurs d'hydrure comme LiAlH₄. Ayant établi la structure de l'alcool (±)-10, nous avons poursuivi la synthèse en effectuant la réduction de la fonction ester par action de l'hydrure mixte d'aluminium et de lithium (LiAlH₄) dans l'éther diéthylique à 0°C, pour conduire au diol (±)-12 avec un rendement de 93% (Schéma 12).

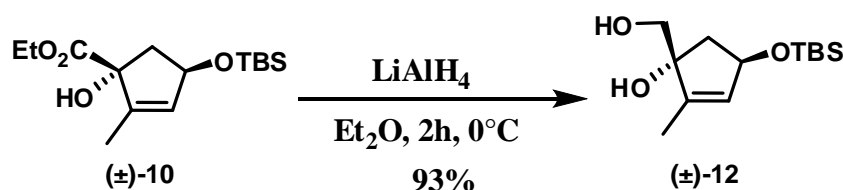


Schéma 12

1.4.6. Protection du diol (±)-12

La protection de diols vicinaux est une étape couramment employée dans la chimie des carbohydrates. Parmi tous les groupements protecteurs utilisés, les acétals, et plus particulièrement le groupement isopropylidène acétal⁷¹, sont les plus courants. Ainsi le diol (±)-12 a été protégé sous forme d'acétal par action du 2,2-diméthoxypropane en présence d'une quantité catalytique d'acide camphorsulfonique (CSA) à température ambiante pour conduire au composé (±)-13 avec un rendement de 89% (Schéma 13).

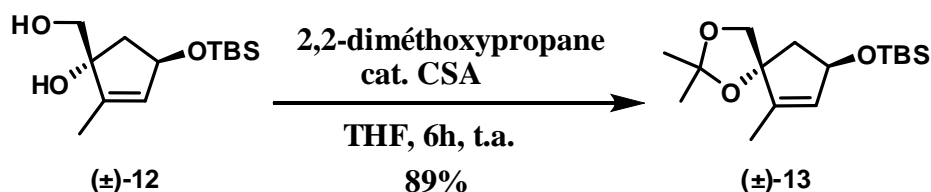


Schéma 13

⁶⁹ Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed.; John Wiley and Sons, Inc.: New York, **1999**, 127-141, 708.

⁷⁰ Lalonde, M.; Chan, T. H. *Synthesis* **1985**, 817.

⁷¹ Ahmed, M. M.; Berry, B. P.; Hunter, T. J.; Tomcik, D. J.; O'Doherty, G. A. *Org. Lett.* **2005**, 7, 745.

1.4.7. Déprotection de l'éther silylé (\pm)-13

La déprotection de l'alcool secondaire (\pm)-13 a été effectuée par le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) dans le tétrahydrofurane (THF) avec un rendement de 96% (Schéma 14).

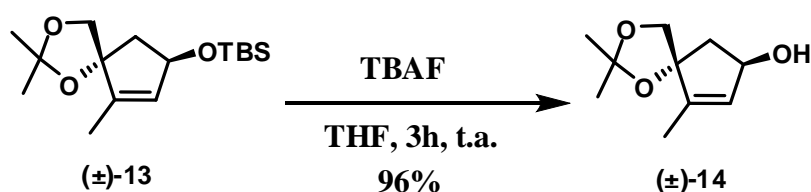


Schéma 14

Les carbonucléosides (\pm)-1a-b pourraient être obtenus selon deux voies distinctes. La première résulterait d'une réaction de substitution allylique pallado-catalysée (réaction de Tsuji-Trost) sur le composé (\pm)-15, lequel serait obtenu après protection de l'alcool (\pm)-14. La deuxième voie résulterait d'une réaction de Mitsunobu sur le composé (\pm)-17, obtenu par inversion de configuration de la fonction alcool du composé (\pm)-14.

I.4.8. Première voie de synthèse de (\pm)-1a-b suivant la réaction de Tsuji-Trost

a. Protection de l'alcool (\pm)-14

Afin d'effectuer la substitution allylique pallado-catalysée pour introduire la base purique directement, l'alcool allylique doit être activé sous forme d'acétate (Schéma 15).

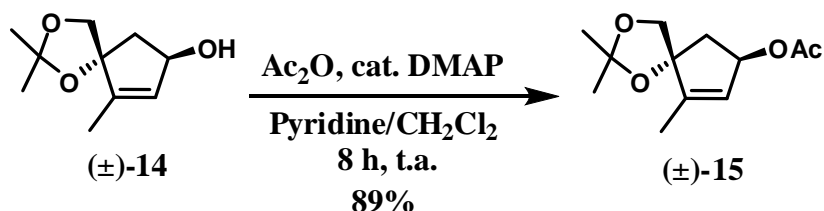


Schéma 15

b. Réaction de Tsuji-Trost

Le substrat (\pm)-**15** a été utilisé pour réaliser le couplage avec l'adénine et la 6-chloropurine en présence de palladium(0).⁷² Malgré différentes conditions employées, telles que le catalyseur ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$), le ligand (PPh_3 , $\text{P}(\text{O}i\text{-Pr})_3$) et le sel de la purine (formé par l'action de NaH ou AlEt_3), aucune réaction n'a eu lieu, et le produit de départ est récupéré.

Puisque cette approche s'est avérée infructueuse, nous nous sommes tournés vers la seconde stratégie.

I.4.9. Deuxième voie de synthèse de (\pm)-**1a-b** suivant la réaction de Mitsunobu

a. Inversion de l'alcool (\pm)-**14**

A ce stade, il faut inverser la fonction alcool, afin de pouvoir introduire ultérieurement la base azotée présentée dans les carbonucléosides cibles avec la stéréochimie 1',4'-*cis*. Ceci nécessite l'utilisation de l'alcool *trans*. C'est pourquoi nous avons décidé de transformer l'alcool *cis* (\pm)-**14** en alcool *trans* (\pm)-**17**. Parmi les méthodes disponibles pour l'inversion de la stéréochimie d'un groupement hydroxyle, la réaction de Mitsunobu⁷³ utilisant la triphénylphosphine (PPh_3), l'azodicarboxylate de diéthyle (DEAD) ou l'azodicarboxylate de diisopropyle (DIAD) et un acide carboxylique comme nucléophile (Schéma 16). L'hydrolyse de cet ester permet d'obtenir l'alcool inversé. Le processus global de cette réaction permet d'inverser la stéréochimie des alcools *via* une séquence en deux étapes estérification/hydrolyse avec un excellent rendement global.

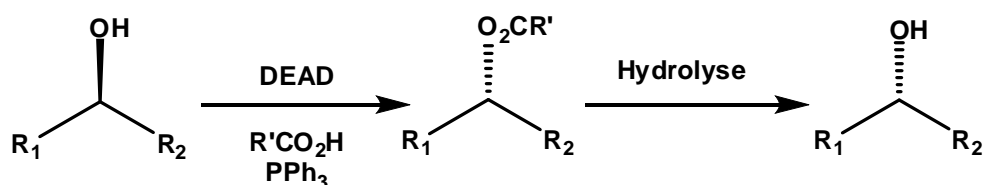
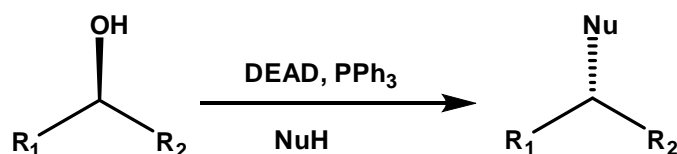


Schéma 16

⁷² (a) Agrofoglio, L. A.; Gillaizeau, I.; Saito, Y. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1875. (b) Trost, B. M.; Li, L.; Guile, S. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8745. (c) Trost, B. M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5813.

⁷³ (a) Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1. (b) Jenny, T. F.; Horlacher, J.; Previsani, N.; Benner, S. A. *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 1944. (c) Hughes, D. L. *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 127.

De plus, la réaction de Mitsunobu est une méthode simple et compatible avec une grande variété de groupements fonctionnels qui permet de remplacer un groupement hydroxyle par une variété de nucléophiles en utilisant le même système formé par le DEAD et la PPh_3 , et ce, encore une fois avec une inversion complète de la stéréochimie (Schéma 17).

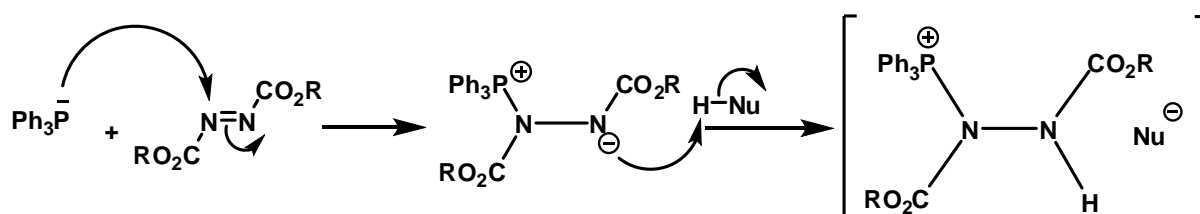


NuH = amines, thioacides, imides, sulfonamides, phénols, thiols, hétérocycles
acides carboxyliques, azotures, cyanures, halogénures

Schéma 17

Le mécanisme de la réaction de Mitsunobu est présenté dans le schéma 18 et met en œuvre trois étapes. Lors de la première étape, la triphénylphosphine réagit rapidement avec l'azodicarboxylate de dialcyle pour former un adduit P-N zwitterionique, communément appelé la "bétaine de Mitsunobu". Cet adduit se comporte comme une base et réagit avec le proton relativement acide du nucléophile présent dans le milieu réactionnel pour conduire à la formation du sel de N-phosphonium. Dans l'étape d'activation de l'alcool ; l'alcool réagit avec ce groupement phosphonium, pour former le sel d'alkoxyphosphonium et l'hydrazine fonctionnalisée. Finalement, le nucléophile déprotonné réagit avec le phosphonium *via* une réaction $\text{S}_{\text{N}}2$ pour conduire au produit de stéréochimie inverse et l'oxyde de triphénylphosphine.

1. Formation d'un adduit zwitterionique



2. Activation de l'alcool

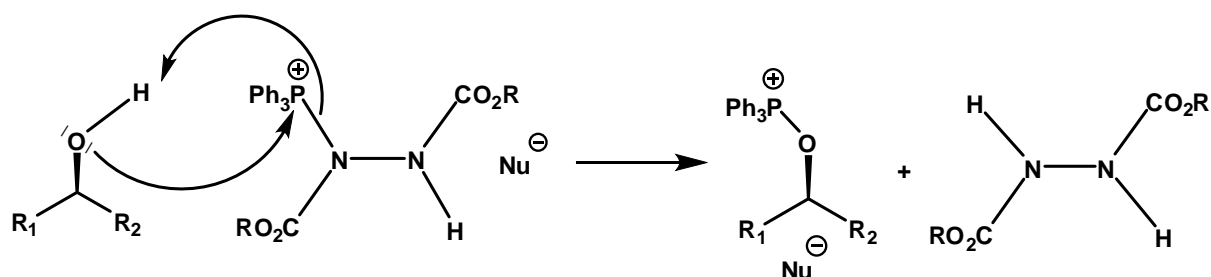
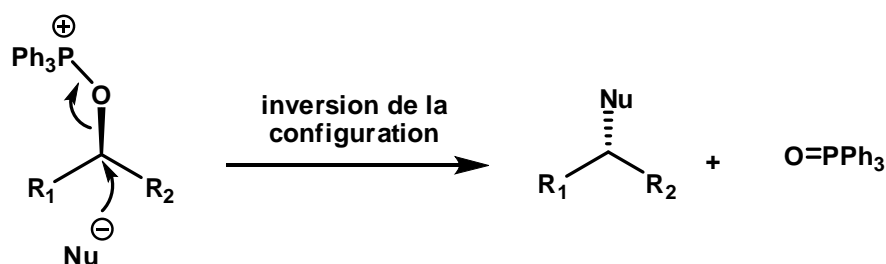
3. Réaction S_N2 

Schéma 18

pour cela le composé (\pm)-**14** est mis en présence d'acide acétique (AcOH), de triphénylphosphine (PPh₃) et d'azodicarboxylate de diisopropyle (DIAD) dans le THF, puis l'acétate ainsi obtenu a été saponifiée par une suspension de carbonate de potassium (K₂CO₃) dans le méthanol pour conduire à l'alcool (\pm)-**17**. Ces deux étapes permettent d'obtenir l'alcool inversé (\pm)-**17** avec un rendement global de 86% (Schéma 19).

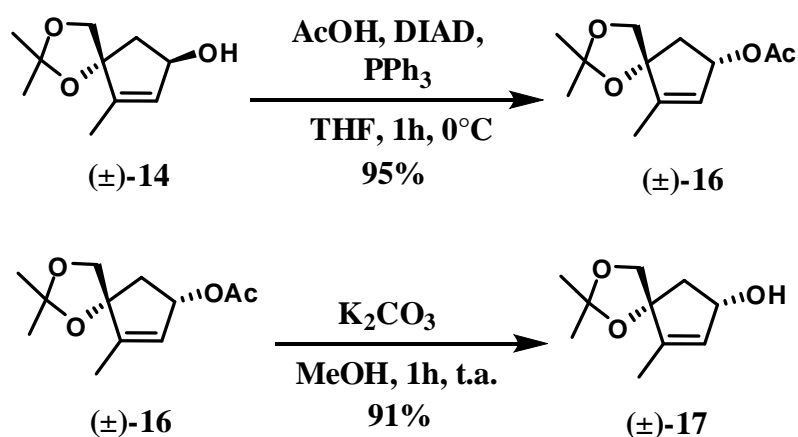


Schéma 19

b. Couplage de Mitsunobu avec la 6-chloropurine

L'étape clé de notre approche consiste à utiliser cette méthodologie en mettant en œuvre des bases puriques comme nucléophile (Schéma 20). La stratégie présente l'avantage d'introduire directement la base purique complète, évitant ainsi sa construction. Le couplage entre l'alcool secondaire (\pm)-**17** et la 6-chloropurine dans les conditions de Mitsunobu (DIAD, PPh₃, THF) a conduit à la formation unique du régioisomère N9 (\pm)-**18** avec un rendement de 79%. Il est connu que le succès de la réaction de Mitsunobu dépend des conditions opératoires.⁷⁴

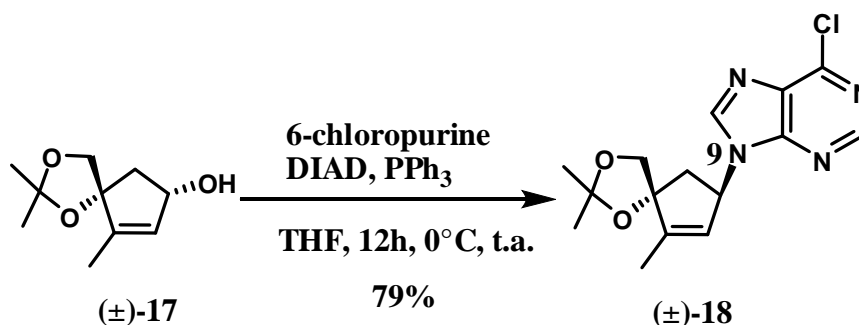


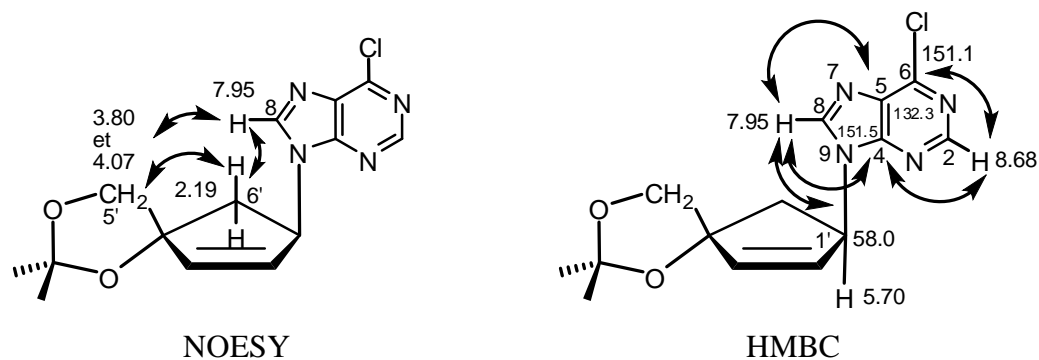
Schéma 20

La stéréochimie de la molécule (\pm)-**18** a été vérifiée par une séquence RMN 2D NOESY (Figure 23). Des tâches de corrélation observées entre les deux protons H-5' ($\delta = 3.80$ ppm et $\delta = 4.07$ ppm) et le proton de la base purique H-8 ($\delta = 7.95$ ppm), et entre ces mêmes protons H-5' et le proton H-6'_a ($\delta = 2.19$ ppm). H-6'_a présente également une tâche de corrélation avec le proton de la base H-8 ($\delta = 7.95$ ppm). La base purique est donc du même côté que les protons H-5'.

La structure (\pm)-**18** a été déterminée par la réalisation d'une séquence RMN 2D de type HMBC (Figure 23). En effet, les tâches de corrélation observées entre le proton H-8 ($\delta = 7.95$ ppm), le carbone C-4 ($\delta = 151.5$ ppm), le carbone C-5 ($\delta = 132.3$ ppm) et carbone C-1' ($\delta = 58.0$ ppm) du carbo sucre d'une part, et entre le proton H-2 de la base purique ($\delta = 8.68$ ppm), le carbone C-6 ($\delta = 151.1$ ppm), et le carbone C-4 ($\delta = 151.5$ ppm) d'autre part, confirment la formation du régioisomère N9.

⁷⁴ (a) Wachtmeister, J.; Classon, B.; Samuelsson, B. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 2029. (b) Cadet, G.; Chan, C.-S.; Daniel, R. Y.; Davis, C. P.; Guiadeen, D.; Rodriguez, G.; Thomas, T.; Walcott, S.; Scheiner, P. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4574. (c) Diaz, Y.; Bravo, F.; Castillon, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6508. (d) Chong, Y.; Gumina, G.; Chu, C. K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4853.

Le N9 du régioisomère (\pm)-**18** a été confirmé aussi par comparaison avec les données UV décrits dans la littérature⁷⁵ ($\lambda_{\text{max}} = 267 \text{ nm}$ (CH_2Cl_2)).



Composé (\pm)-**18**

Figure 23

c. Fonctionnalisation de la base purique

Le carbonucléoside (\pm)-**18** ainsi obtenu, peut être fonctionnalisé⁷⁶ par l'action de la cyclopropylamine pour former (\pm)-**19a** avec un rendement de 95% (Schéma 21).

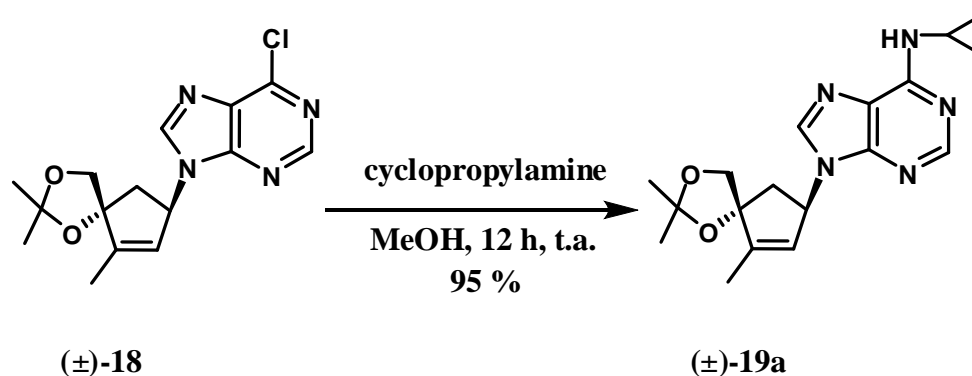


Schéma 21

⁷⁵ (a) Takagi, C.; Sukeda, M.; Kim, H.-S.; Wataya, Y.; Yabe, S.; Kitade, Y.; Matsuda, A.; Shuto, S. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1245. (b) Lee, J. A.; Moon, H. R.; Kim, H. O.; Kim, K. R.; Lee, K. M.; Kim, B. T.; Hwang, K. J.; Chun, M. W.; Jacobson, K. A.; Jeong, L. S. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5006.

⁷⁶ Holy, A.; Votruba, I.; Tloustova, E.; Masojdikova, M. *Collection of Czechoslovak Chem. Comm.* **2001**, *66*, 1545.

d. Déprotection de l'acétal

La synthèse de la première molécule cible (\pm)-**1a** est réalisée par déprotection de l'acétal⁷⁷ en milieu acide avec un rendement de 94%. Celui-ci est obtenu sous forme solide ($T_f = 208-209\text{ }^\circ\text{C}$) (Schéma 22).

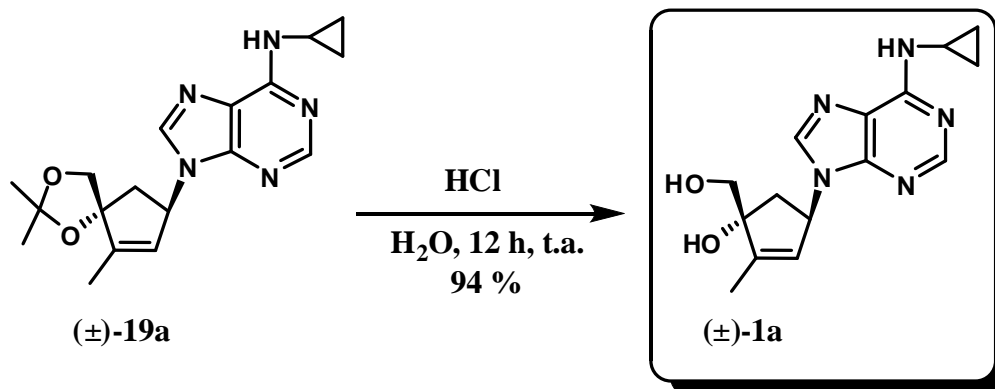


Schéma 22

La synthèse du carbonucléoside (\pm)-**1a** a été réalisée en 10 étapes avec 24.4% de rendement global.

I.5. Détails de la synthèse de carbonucléoside (\pm)-**1b**

Ayant le carbonucléoside (\pm)-**18** en main, la fonctionnalisation par le méthanol ammoniacal donne accès à (\pm)-**19b**, comportant une base adénine avec un rendement de 89%. Le même protocole décrit précédemment a été appliqué avec succès pour déprotéger l'acétal avec un rendement de 87% pour former le carbonucléoside (\pm)-**1b**. (Schéma 23).

⁷⁷ Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th ed.; John Wiley and Sons, Inc.: New Jersey, 2007, 451.

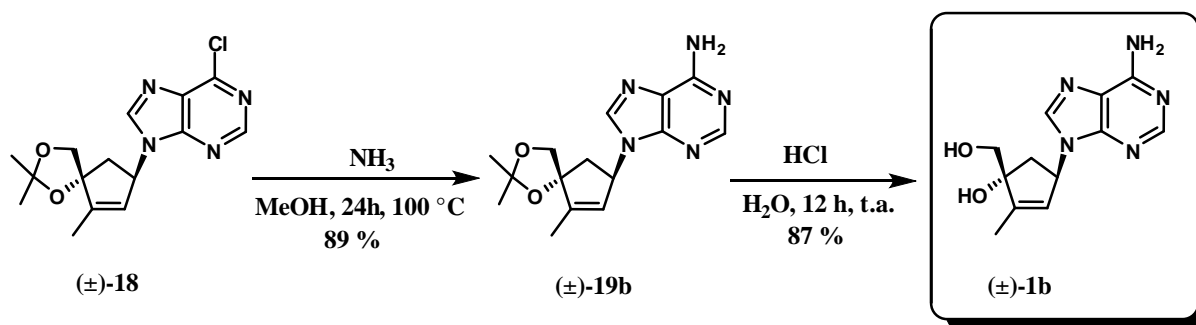


Schéma 23

La synthèse du carbonucléoside (±)-1b a été réalisée en 10 étapes avec 21.2% de rendement global.

I.6. Conclusion

Dans le cadre de notre étude sur la synthèse des carbonucléosides inédits, nous avons réalisé la synthèse stéréocontrôlée des molécules cibles (±)-1a-b, comportant un groupement méthyle en position 3' et un groupement hydroxyle en position 4' sur le carbose. Les molécules cibles sont des analogues de l'abacavir, une prodrogue commercialisée par le groupe anglais GSK en tant que puissant agent antiviral, utilisé en trithérapie pour lutter contre le VIH, mais possédant cependant d'importants effets secondaires.

Après avoir mis au point la synthèse de la brique moléculaire de départ (*cis*-4-hydroxy-2-méthylcyclopent-2-ènecarboxylate d'éthyle (±)-8) avec de bon rendement, la synthèse a été accomplie grâce à une succession de réactions hautement stéréocontrôlées. L'insertion directe de la base purique par la réaction de Tsuji-Trost a échoué. Le couplage des carbo sucres avec une nucléobase en mettant en œuvre la réaction de Mitsunobu a résolu le problème. Les structures des molécules cibles ont été confirmées sans ambiguïté par des analyses approfondies en RMN, montrant que seul le régioisomère N9 est obtenu. Enfin, la fonctionnalisation de la nucléobase a finalisé l'obtention des carbonucléosides-cibles. Les carbonucléosides (±)-1a-b ont été préparés en 10 étapes avec un rendement global de 23 %.

CHAPITRE II - Synthèse diastéréosélective des carbonucléosides (±)-2a-b et (±)-3a-b

II.1. Introduction sur les néplanocines

Au début des années 80, une nouvelle famille de nucléosides carbocycliques naturels connue sous le nom de néplanocine (Figure 24), a été isolée du filtrat du champignon *Ampuriella regularis*,⁷⁸ cinq composés ont été identifiés : néplanocine A, néplanocine B, néplanocine C, néplanocine D et néplanocine F.

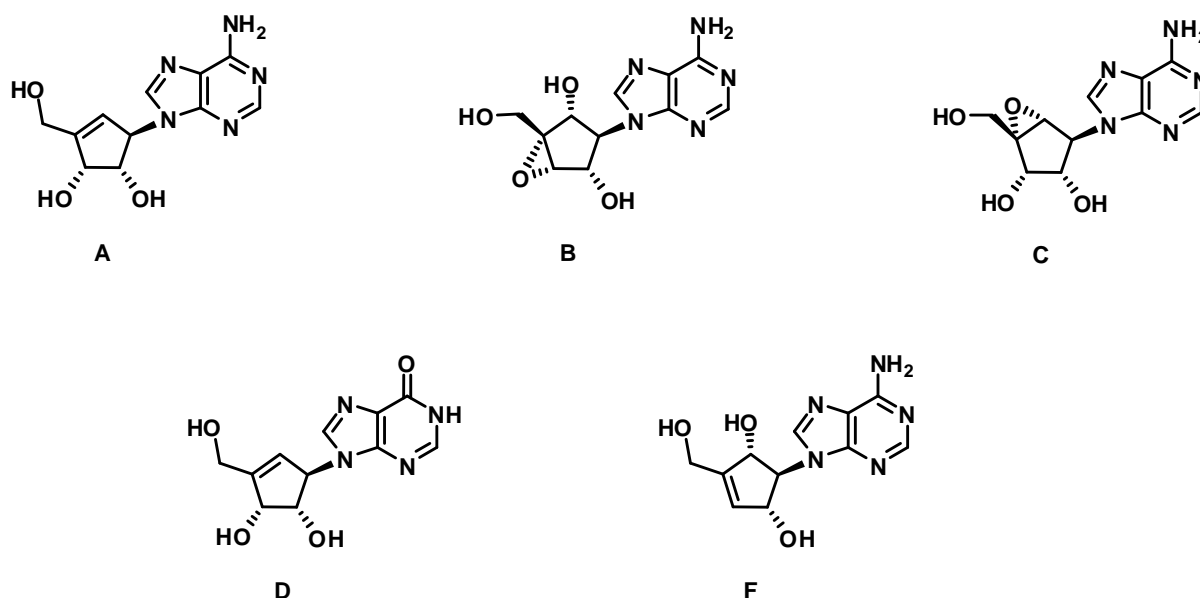


Figure 24 : Famille des néplanocines

La néplanocine A est assurément le membre le plus connu de cette famille du fait de son activité comme inhibiteur d'un enzyme cellulaire, la S-adenosyl-L-homocystéine (Adohcy) hydrolase,⁷⁹ mais malheureusement présente une cytotoxicité prononcée associée principalement à son interaction avec des kinases cellulaires qui la transforment en nucléotide correspondant toxique.⁸⁰

⁷⁸ (a) Yaginuma, S.; Muto, N.; Tsujino, M.; Sudate, Y.; Hayashi, M.; Otani, M. *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 359. (b) Hayashi, M.; Yaginuma, S.; Yoshioka, H.; Nakatsu, K. *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 675.

⁷⁹ (a) Ueland, P. M. *Pharmacol. Rev.* **1982**, *34*, 223. (b) De Clercq, E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *28*, 84. (c) Wolfe, M. S.; Borhardt, R. T. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1521. (d) Yuan, C.-S.; Saso, Y.; Lazarides, E.; Borhardt, R. T.; Robins, M. *J. Exp. Opin. Ther. Patents* **1999**, *9*, 1197.

⁸⁰ Michel, B. Y.; Strazewski, P. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9836.

La néplanocine F,⁸¹ un dérivé de la néplanocine A avec un réarrangement allylique, présentant une moindre cytotoxicité par rapport à la néplanocine A bien que ses activités biologiques sont inconnues.⁸² Zhang et ses collaborateurs ont synthétisés un analogue de néplanocine F (5'-déoxynéplanocine F), possédant une activité intéressante contre le virus VIH et aucune cytotoxicité significative.⁸³

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la synthèse stéréocontrôlée de nouveaux analogues de la néplanocine F, substitués par un groupement méthyle en position 3' sur le carbo sucre et possédant différentes bases puriques, afin d'évaluer leurs propriétés biologiques (Figure 25).

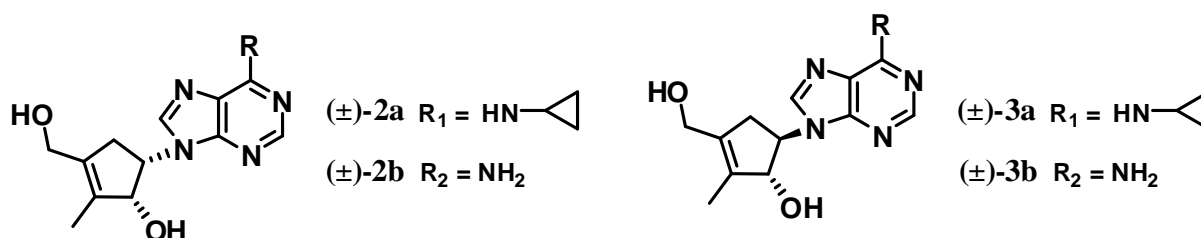


Figure 25 : Carbonucléosides (±)-2a-b et (±)-3a-b

II.2. Analyse rétrosynthétique

Les molécules cibles (±)-2a-b et (±)-3a-b pourraient être préparées à partir des deux intermédiaires (±)-25 et (±)-27 en mettant en œuvre une réaction de Mitsunobu et une déprotection, ces deux intermédiaires pourraient être obtenus par une brique moléculaire commune (±)-22; on pourrait obtenir cette brique à partir du diol (±)-20 qui est facilement accessible par transformation chimique de cet alcool allylique que nous avons déjà préparé dans la première synthèse.

L'analyse rétrosynthétique des molécules cibles (±)-2a-b et (±)-3a-b est décrite dans le schéma 24.

⁸¹ (a) Comin, M. J.; Leitofuter, J.; Rodriguez, J. B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3129. (b) Rodriguez, S.; Edmont, D.; Mathé, C.; Périgaud, C. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7165.

⁸² Bodenteich, M.; Marquez, V. E.; Hallows, W. H.; Goldstein, B. M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2071.

⁸³ Zhang, H.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8314.

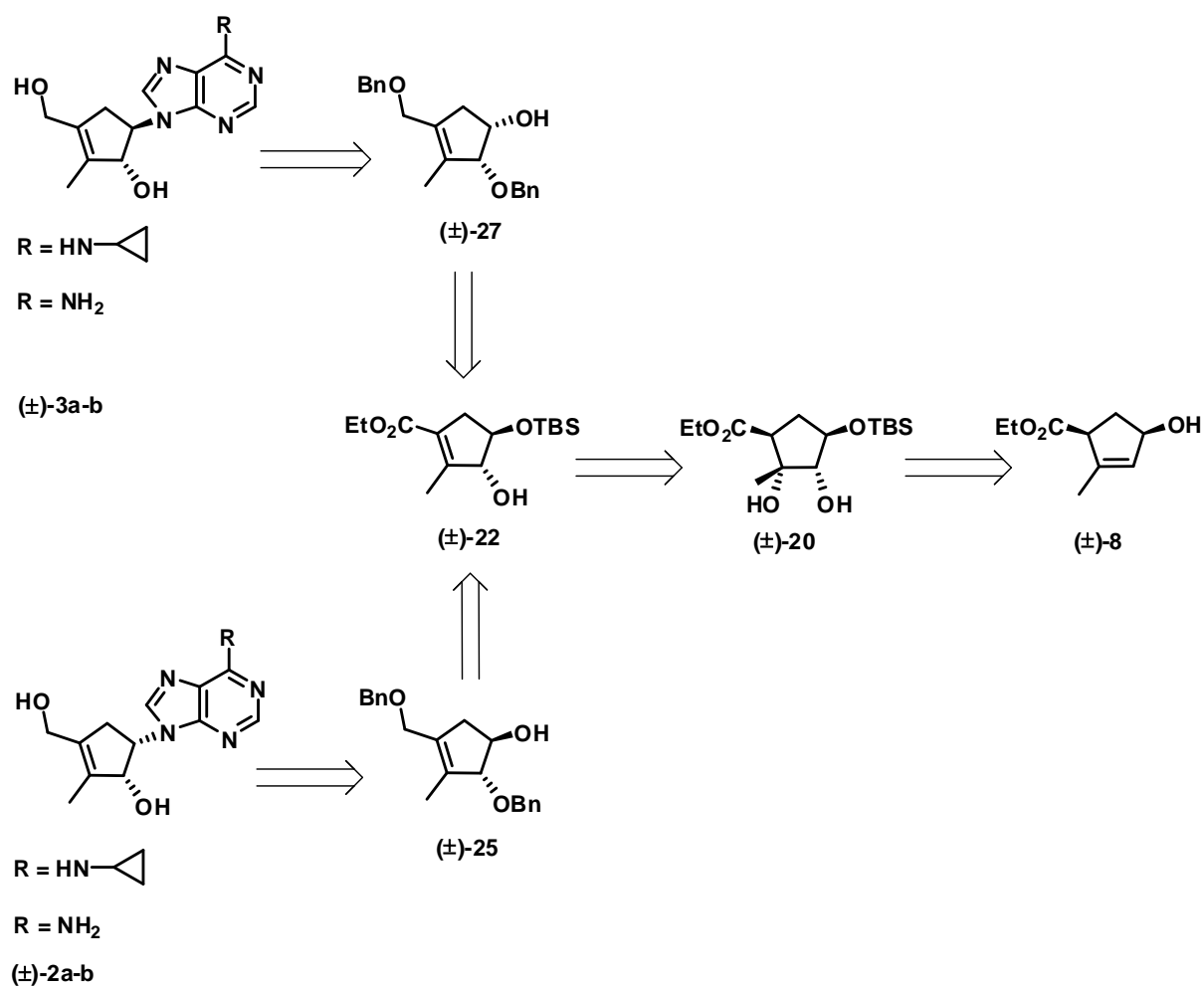
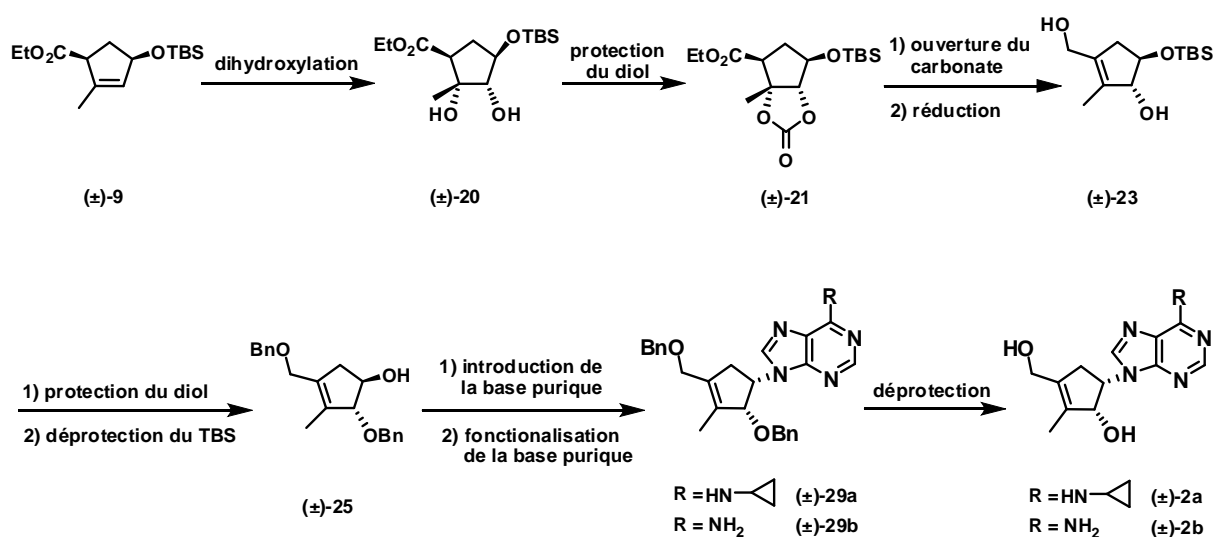


Schéma 24

II.3. Présentation de la stratégie générale de la synthèse des carbonucléosides (±)-2a-b

Le schéma 25 présente le tableau synoptique des étapes de notre approche synthétique basée sur l'analyse rétrosynthétique effectuée précédemment.



II.4. Détails de la synthèse de carbonucléoside (\pm)-2a

La synthèse de (\pm)-2a-b emploie le même alcool protégé (\pm)-9 utilisé judicieusement dans la synthèse de (\pm)-1a-b, et qui est obtenu par protection de l'alcool de départ (\pm)-8.

II.4.1. Dihydroxylation de l'alcène (\pm)-9

La dihydroxylation stéréosélective de l'alcène (\pm)-9 a été réalisée par ajout d'une quantité catalytique de tétraoxyde d'osmium⁸⁴ (OsO_4) en présence de 2 équivalents d'oxyde de *N*-méthylmorpholine (NMO) dans un mélange acétone/eau (3:1) à température ambiante. Après une neutralisation par ajout de sulfite de sodium, ceci a permis d'obtenir majoritairement le diol (\pm)-20 avec un rendement de 78%. Ce composé est accompagné du diastéréoisomère (\pm)-20' obtenu avec un rendement de 8% (Schéma 26). Les deux produits sont facilement séparables par simple colonne chromatographique.⁸⁵ La sélectivité peut s'expliquer par l'encombrement stérique généré par les substituants en position *cis* du produit de départ.

⁸⁴ Pour la rationalisation de la sélectivité de l'osmylation : (a) Poli, G. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 7385. (b) Katagiri, N.; Ito, Y.; Kitano, K.; Toyota, A.; Konoko, C. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 2653. (c) Ward, S. E.; Holmes, A. B.; McCague, R. *Chem. Commun.* **1997**, 2085.

⁸⁵ Brémond, P.; Audran, G.; Aubin, Y.; Monti, H. *Synlett* **2007**, 1124-1126.

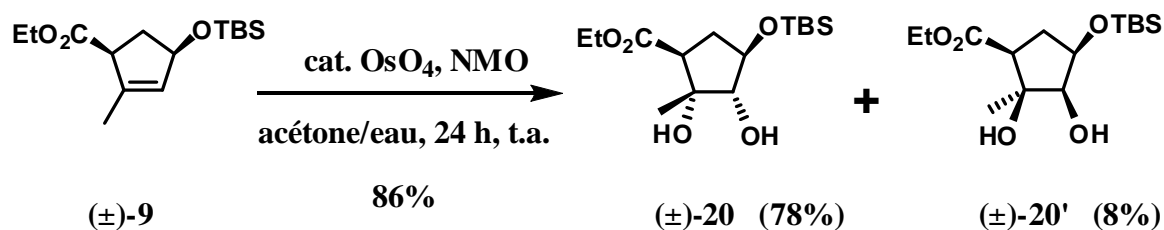


Schéma 26

II.4.2. Protection du diol (±)-20

La protection du diol (±)-20 a été effectuée en présence du 1,1'-carbonyldiimidazole pour conduire au carbonate⁸⁶ cyclique (±)-21 avec un rendement de 94% (Schéma 27).

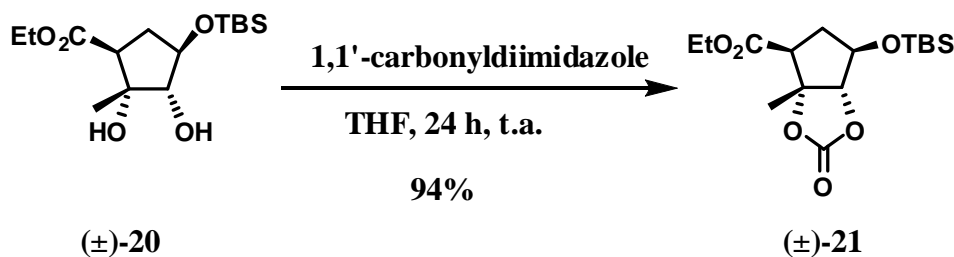


Schéma 27

II.4.3. Déprotection du carbonate cyclique (±)-21

Une réaction d'élimination engendrée par action du 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undéc-7-ène (DBU) sur le carbonate (±)-21 a permis l'ouverture⁸⁷ du carbonate cyclique en obtenant l'alcool allylique (±)-22 avec un excellent rendement (Schéma 28).

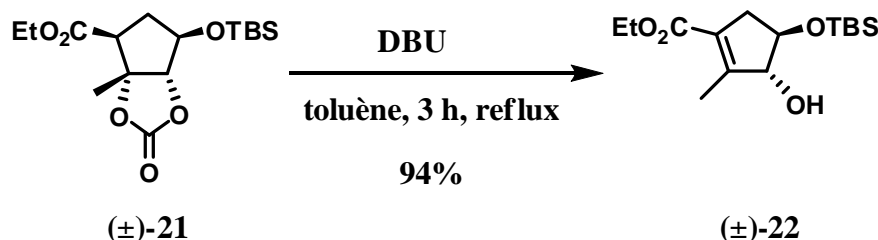


Schéma 28

⁸⁶ Tanino, K.; Onuki, K.; Asano, K; Miyashita, M; Nakamura, T.; Takahashi, Y.; Kuwajima, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1498.

⁸⁷ Xu, P.; Liu, L.; Chen, X.-Z.; Li, Y.; Liu, J.; Jin, Z.-P.; Wang, G.-Q.; Lei, P.-S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4079.

II.4.4. Réduction de l'ester (±)-22

Le chimiste organicien dispose de nombreux outils pour réduire une fonction ester en alcool correspondant. Dans notre cas, l'ester (±)-22 a été réduit en présence d'hydrure de diisobutylaluminium (Dibal-H)⁸⁸ pour former l'alcool correspondant (±)-23 avec un rendement de 97% (Schéma 29).

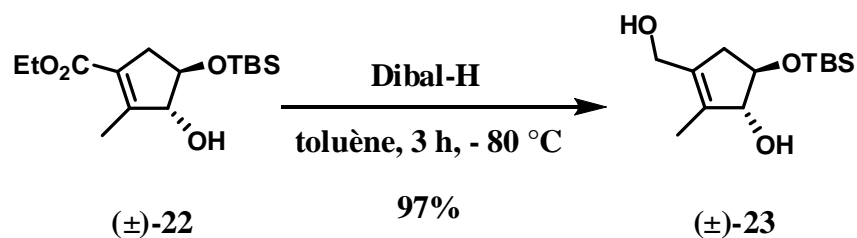


Schéma 29

II.4.5. Protection du diol (±)-23 sous forme de MOM

Dans un premier temps la protection du diol (±)-23 sous forme d'éther de méthoxyméthyle⁸⁹ (MOM) est effectuée par action du chlorure de méthoxyméthyle (MOMCl) en présence de diisopropyléthylamine (*i*Pr₂NEt) dans le dichlorométhane à température ambiante pour conduire au composé protégé avec un excellent rendement (Schéma 30).

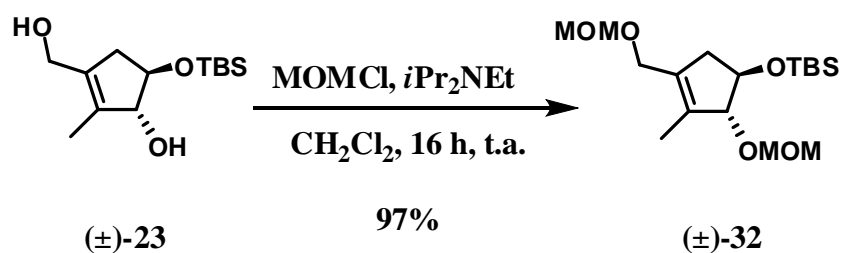


Schéma 30

⁸⁸ Wilso, K. E.; Seidner, R. T.; Masamune, S. *Chem. Commun.* **1970**, 213.

⁸⁹ Stork, G.; Takahashi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1275.

II.4.6. Déprotection du TBS

L'action du fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) a permis de déprotéger l'éther silylé (\pm)-**32** pour conduire à l'alcool (\pm)-**33** avec un rendement de 80% (Schéma 31).

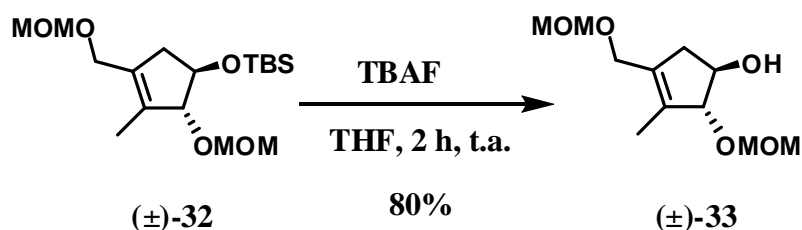


Schéma 31

II.4.7. Insertion de la base purique

La base purique a été introduite en utilisant la 6-chloropurine, la triphénylphosphine (PPh_3) et l'azodicarboxylate de diisopropyle (DIAD) dans le THF avec un rendement de 87% (Schéma 32).

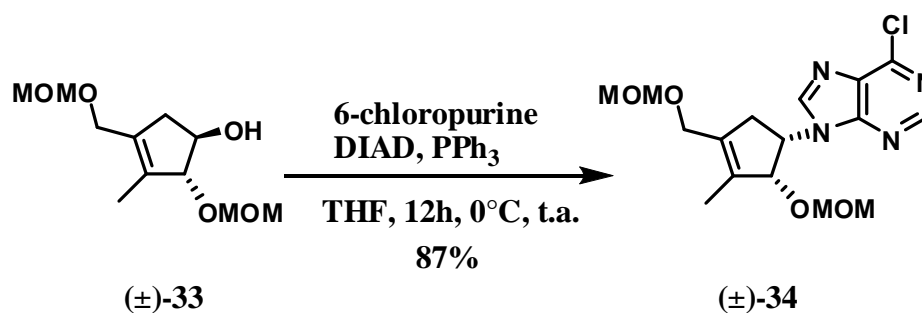


Schéma 32

II.4.8. Fonctionnalisation de la base purique

La base fonctionnalisée est préparée par substitution de l'atome de chlore par la cyclopropylamine et conduit à l'obtention de la molécule (\pm)-**35** avec 80% de rendement (Schéma 33).

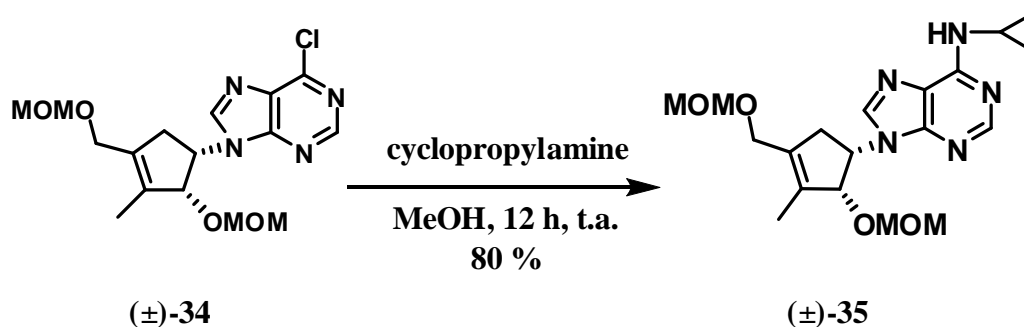


Schéma 33

II.4.9. Déprotection de carbonucléoside (±)-35 sous forme de MOM

La déprotection de MOM dans un milieu acide⁹⁰ a donné un mélange des produits non identifiés (Schéma 34).

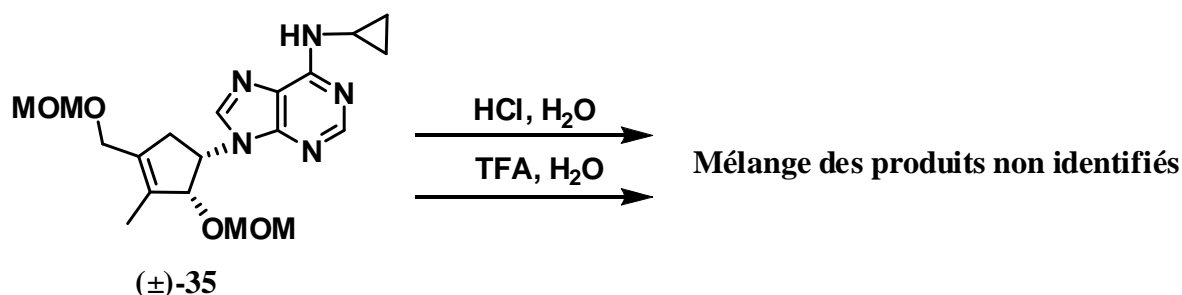


Schéma 34

Devant ce problème, nous avons changé de stratégie et nous avons décidé de protéger le diol sous forme de dibenzyl éther.

II.4.10. Protection du diol (±)-23 sous forme d'éther benzylique

Le bromure de benzyle en présence d'hydrure de sodium (NaH) et d'une quantité catalytique d'iodure de tétrabutylammonium (NBu₄I) a permis de protéger simultanément les fonctions alcools de (±)-23 sous forme d'éthers benzyliques (±)-24 avec un rendement de 92% (Schéma 35).

⁹⁰ (a) Auerback, J.; Weinreb, S. M. *J. Chem. Soc., Chem.* 1974, 298. (b) Meyers, A. I.; Durandetta, J. L.; Munavu, R. *J. Org. Chem.* 1975, 40, 2025–2029.

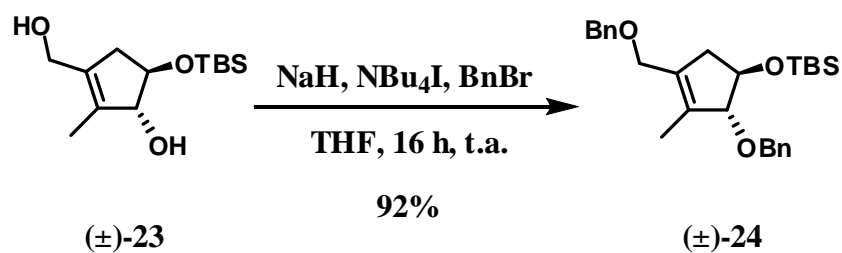


Schéma 35

II.4.11. Déprotection de l'éther silylé

L'action du fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) a permis de déprotéger l'éther silylé (±)-24 pour conduire à l'alcool (±)-25 avec un rendement de 93% (Schéma 36).

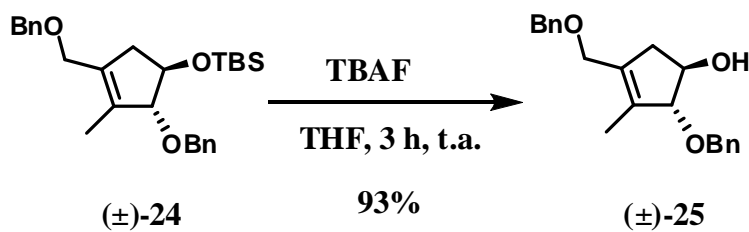


Schéma 36

II.4.12. Introduction et fonctionnalisation de la base purique

Le couplage de la 6-chloropurine avec l'alcool secondaire (±)-25 dans les conditions de Mitsunobu (DIAD, PPh₃, 6-chloropurine et THF) a conduit au dérivé chloré (±)-28 avec un rendement de 74% (Schéma 37).

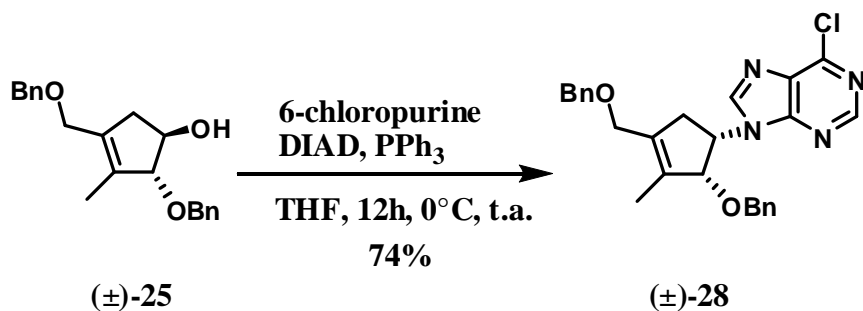


Schéma 37

La base purique a été fonctionnalisée en utilisant la cyclopropylamine et a conduit à l'obtention de ce carbonucléoside protégé (\pm)-**29a** avec un bon rendement (Schéma 38).

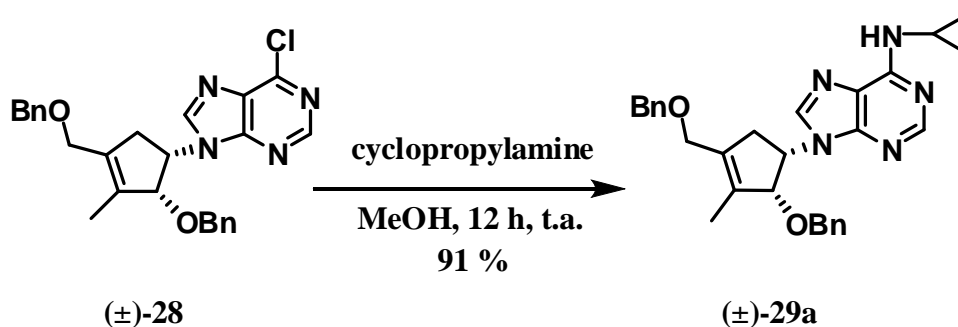


Schéma 38

II.4.13. Essais de déprotection de carbonucléoside (\pm)-**29a** protégé sous forme de dibenzyl

La déprotection de dibenzyl a été difficile, en effet l'utilisation de BCl_3 , FeCl_3 , Li-naphtaleine, Pd Black et Pd/C^{91} sous différentes conditions n'a pas donné le produit désiré mais un mélange difficilement analysable (Schéma 39).

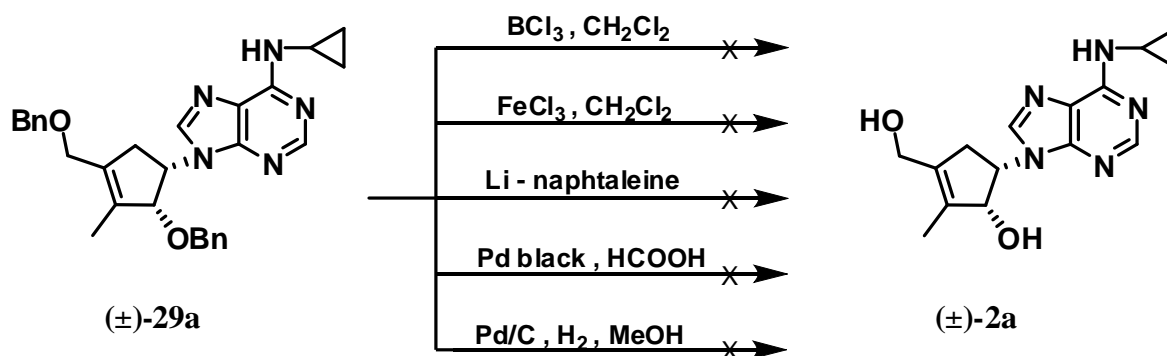


Schéma 39

La réaction de Birch⁹² a résolu ce problème par utilisation des métaux dissous (Sodium dans l'ammoniaque), cette réaction a été réalisée avec un rendement de 83% (Schéma 40).

⁹¹ (a) Liu, H. J.; Yip, J.; Shia, K. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 2253. (b) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed.; John Wiley and Sons, Inc.: New York, **1999**, 76.

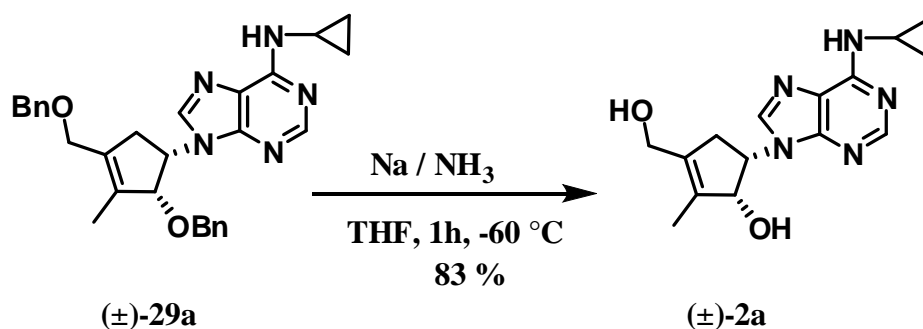


Schéma 40

La synthèse du carbonucléoside (±)-2a a été réalisée en 10 étapes avec 31.72% de rendement global.

II.5. Détails de la synthèse de carbonucléoside (±)-2b

Ayant le carbonucléoside (±)-28 en main, la fonctionnalisation par le méthanol ammoniacal donne accès à (±)-29b, comportant une base adénine avec un rendement de 79%. Le même protocole décrit précédemment a été appliqué avec succès pour déprotéger l'éther dibenzyle avec un rendement de 95% pour former le carbonucléoside (±)-2b (Schéma 41).

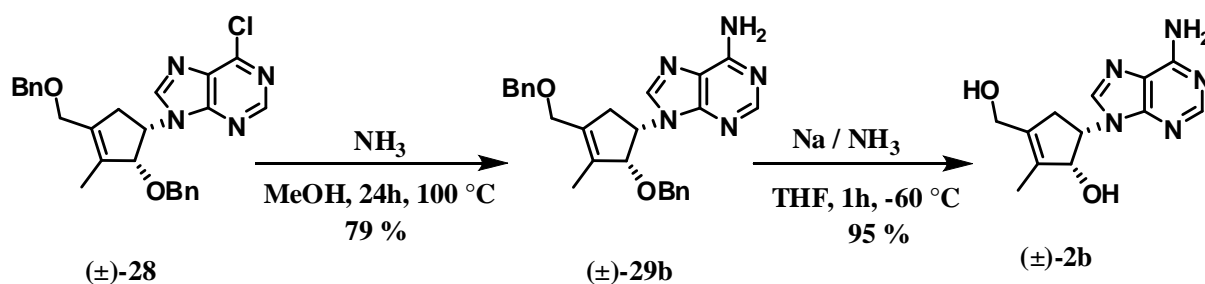


Schéma 41

La synthèse du carbonucléoside (±)-2b a été réalisée en 10 étapes avec 31.52% de rendement global.

⁹² Birch, A. J. *J. Chem. Soc.* **1944**, 430.

II.6. Présentation de la stratégie générale de la synthèse des carbonucléosides (±)-3a-b

Le schéma 42 présente les étapes de notre approche synthétique basée sur l'analyse rétrosynthétique effectuée précédemment.

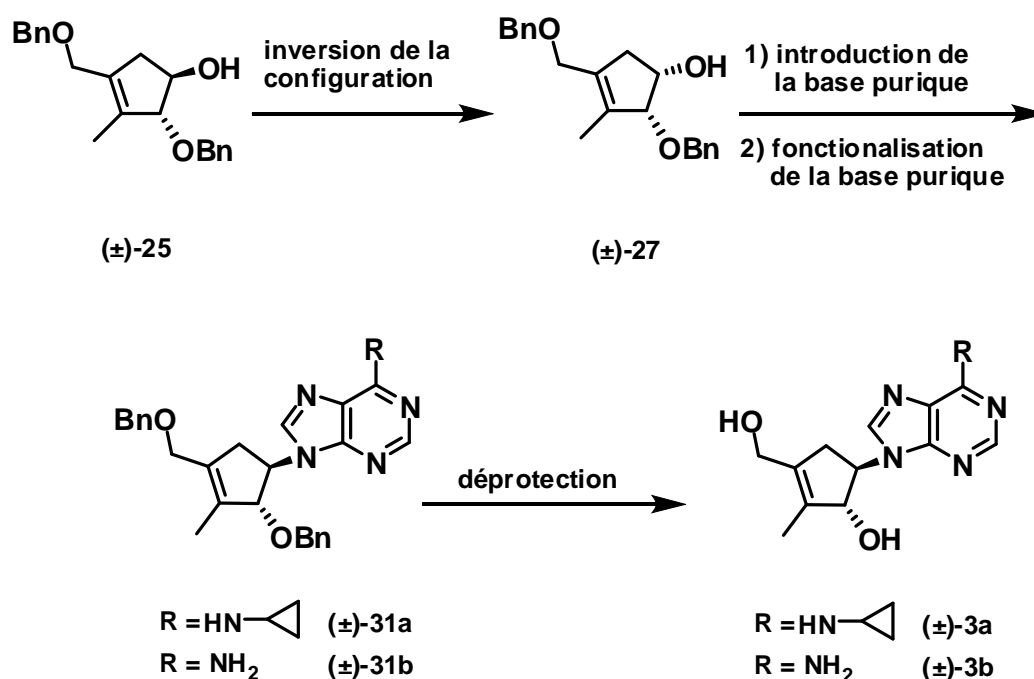


Schéma 42

II.7. Détails de la synthèse de carbonucléoside (±)-3a

Ayant atteint notre deuxième objectif, nous nous sommes focalisés sur la synthèse des dernières molécules cibles (±)-3a-b en employant l'alcool dibenzyle (±)-25, utilisé lors de l'approche précédente.

II.7.1. Inversion de la configuration de l'alcool (±)-25

L'inversion de la configuration de la fonction alcool a été réalisée en deux étapes (Schéma 43). Tout d'abord, une réaction de Mitsunobu utilisant comme nucléophile l'acide acétique, préparée à partir de l'alcool (±)-25, a conduit à la formation de l'acétate (±)-26

correspondant avec un rendement de 96%. Enfin la réduction de l'acétate (\pm)-**26** par K_2CO_3 a permis d'obtenir l'alcool épimère (\pm)-**27** avec un rendement de 92%.

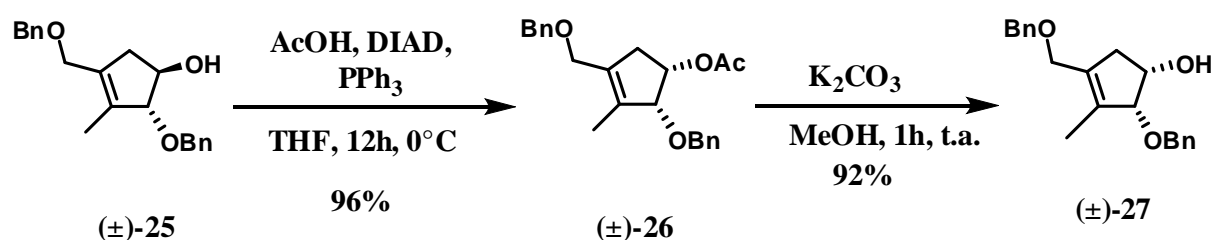


Schéma 43

II.7.2. Couplage de la base purique et fonctionnalisation

Ayant le précurseur clé (\pm)-**27** en main, la réaction de couplage introduisant directement la base purique par le couplage de la 6-chloropurine avec l'alcool (\pm)-**27** dans les conditions de Mitsunobu (DIAD, PPh_3 , 6-chloropurine, THF) a conduit au dérivé chloré (\pm)-**30** avec un rendement satisfaisant de 75% (Schéma 44).

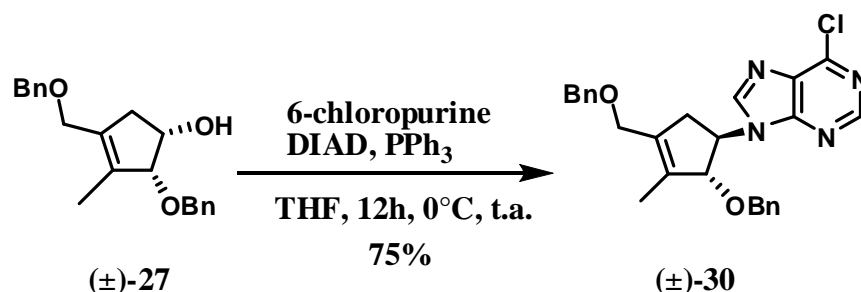


Schéma 44

La base fonctionnalisée est préparée par substitution de l'atome de chlore par la cyclopropylamine et conduit à l'obtention de la molécule (\pm)-**31a** avec 91% de rendement (Schéma 45).

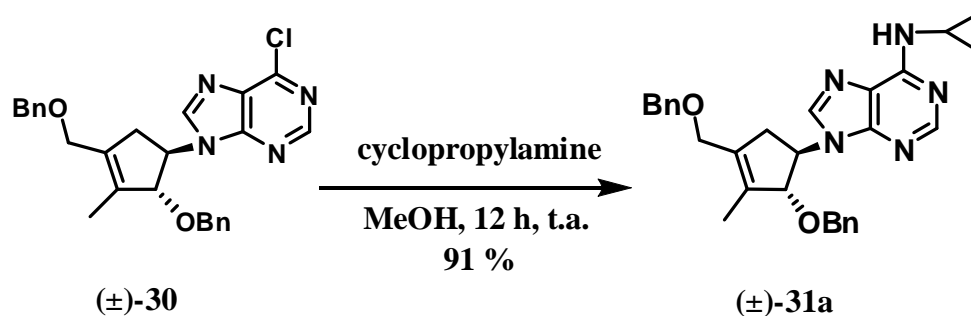


Schéma 45

II.7.3. Déprotection de l'éther dibenzyle

Pour mener à bien cette voie, la dernière étape consiste à déprotéger l'éther benzylique. La déprotection de ce groupement a été effectuée par l'utilisation de sodium dans l'ammoniaque liquide, et a conduit au produit final avec un rendement de 72% (Schéma 46).

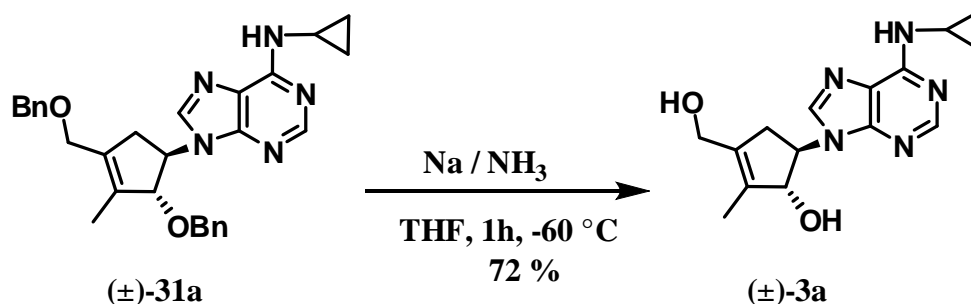


Schéma 46

La synthèse du carbonucléoside (±)-**3a** a été réalisée en 12 étapes avec 24.63% de rendement global.

II.8. Détails de la synthèse de carbonucléoside (±)-**3b**

Ayant le dérivé chloré (±)-**30** en main, la fonctionnalisation par le méthanol ammoniacal donne accès au carbonucléoside protégé (±)-**31b**, comportant une base adénine avec un rendement de 73%. Le même protocole décrit précédemment a été appliqué avec succès pour déprotéger l'éther benzylique avec un rendement de 89% pour former le carbonucléoside (±)-**3b**. (Schéma 47).

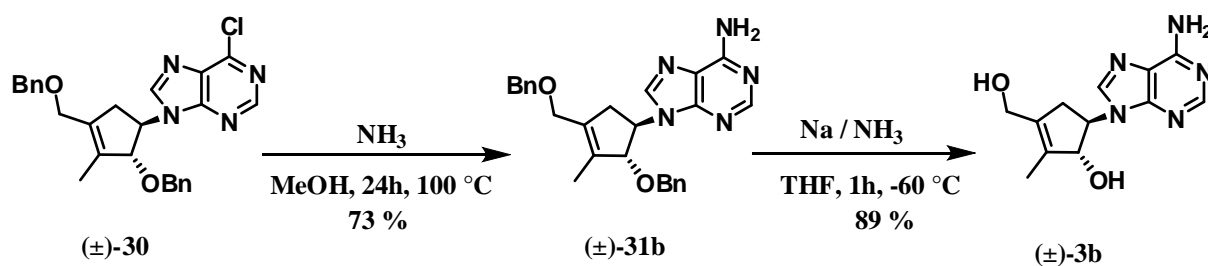


Schéma 47

La synthèse du carbonucléoside (±)-3b a été réalisée en 12 étapes avec 24.42% de rendement global.

II.9. Conclusion

Conformément à ce que nous souhaitons réaliser, ces différents travaux nous ont conduit à proposer la synthèse stéréocontrôlée de carbonucléosides inédits (±)-2a-b et (±)-3a-b à partir de la même brique moléculaire obtenu lors de la première synthèse, comportant à la fois un groupement méthyle en position 3' et un groupement hydroxyle en position 2' sur le carbosucre. Les molécules cibles sont des analogues de la néplanocine F naturelle, un agent antiviral récent extrait du filtrat du champignon *Ampuriella regularis*, et présentant une variation chimique au niveau de la base purique. Pour cela, nous avons effectué d'abord la dihydroxylation stéréosélective d'un alcool cyclopenténique protégé. Après plusieurs transformations chimiques, l'alcool primaire du carbosucre a été protégé sous forme d'éthers benzyliques avec d'excellent rendement. Après avoir essayé différents groupements protecteurs, le groupement éther benzylique s'est révélé être le plus judicieux et le plus adapté à la chimie des carbonucléosides que nous voulions développer. Le couplage de ces carbosucres avec une nucléobase en mettant en œuvre la réaction de Mitsunobu est réalisé avec succès après avoir fonctionnalisé avec différentes bases puriques. La déprotection des groupements dibenzyl éther a été échouée, cette difficulté a été surmontée par la réaction de Birch et a permis d'obtenir de nouveaux analogues de nucléosides (±)-2a-b et (±)-3a-b avec de bons rendements. La synthèse des molécules (±)-2a-b et (±)-3a-b est réalisée en 10 à 12 étapes avec des rendements globaux de 24 à 32%.

II.10. Evaluation biologique des carbonucléosides préparés

II.10.1. Test MTT

L'effet des différents composés sur la viabilité cellulaire a été étudié grâce à un test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ; Acros organics, Geel, Belgique).

II.10.2. Principe du test MTT

Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT. L'anneau qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives en formazan (Schéma 48). Ceci forme un précipité bleu dans la mitochondrie. Les cristaux de formazan sont solubilisés dans du DMSO et la coloration est quantifiée au spectrophotomètre (Multiscan Ascent Reader, Labsystems, Helsinki, Finlande). La quantité de formazan formée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

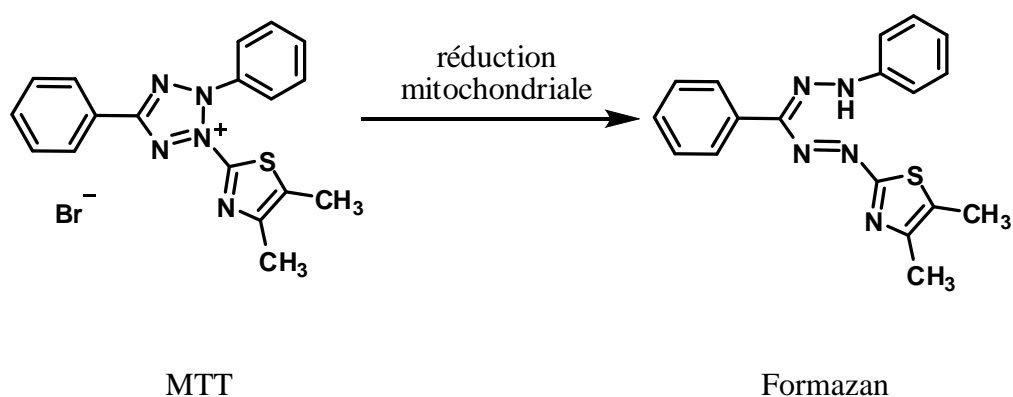


Schéma 48 : Réduction du MTT en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale

II.10.3. Evaluation de l'activité *in vitro* anti VIH

Les activités thérapeutiques et toxicologiques des molécules cibles (\pm)-**1a-b**, (\pm)-**2a-b** et (\pm)-**3a-b** ont été évaluées *in vitro* sur deux souches virales par le professeur Christophe Pannecouque (voir tableau 2, page 105) sur des cellules MT-4 [virus VIH type 1 (souche III_B) et type 2 (souche ROD)].

Cependant, aucune de ces molécules n'a révélé d'activité ou de cytotoxicité significative à des concentrations allant jusqu'à 125 µg/mL (la toxicité est donnée par la CC₅₀ et l'activité par l'EC₅₀). L'absence de l'activité et de cytotoxicité anti-VIH observé avec ces carbonucléosides résulte probablement au manque de phosphorylation par les kinases nucléosidiques sous forme de mono, di ou triphosphates.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Le travail présenté dans cette thèse est axé sur la synthèse de nouveaux agents antiviraux.

Ce travail nous a permis de proposer une stratégie pour la synthèse stéréocontrôlée de nouveaux carbonucléosides à structure inédite, analogues de l'abacavir et de la néplanocine F, à partir d'une brique moléculaire commune à cinq chaînons. Pour cela des réactions hautement diastéréosélectives, réalisées avec des bons rendements, ont été mises en œuvre conduisant à l'obtention de carbonucléosides possédant à la fois un groupement méthyle en position position 3' et un groupement hydroxyle en position 2' ou 4' sur le carbosucre.

Dans un premier temps, la synthèse diastéréosélective de carbosucres fonctionnalisés, précurseurs de carbonucléosides de structure inédite, a été accomplie avec efficacité, la synthèse stéréocontrôlée d'analogues de l'abacavir a été accomplie par une méthodologie directe par couplage de Mitsunobu. L'abacavir est un carbonucléoside commercialisé par le groupe anglais GSK en tant que puissant agent antiviral utilisé en trithérapie pour lutter contre le VIH, mais cette prodrogue possède cependant d'importants effets secondaires. Les deux molécules cibles sont caractérisées par la structure 3'-méthylcyclopenténique et possèdent une base purique naturelle ou non naturelle. L'accès à un carbosucre clé a été réalisé notamment par une hydroxylation allylique, une protection sous forme d'acétal et une inversion de la configuration. L'insertion directe de la base purique par la réaction de Tsuji-Trost a été échouée. Cette difficulté a été surmontée par couplage du carbosucre avec une nucléobase en mettant en œuvre la réaction de Mitsunobu. Les structures des molécules cibles ont été confirmées sans ambiguïté par des analyses approfondies en RMN, montrant que seul le régioisomère N9 est obtenu. Enfin, la fonctionnalisation de la nucléobase a finalisé l'obtention des carbonucléosides-cibles. Les carbonucléosides (\pm)-**1a-b** ont été préparés en 10 étapes avec un rendement global de 23 %.

Notre second objectif fût la synthèse stéréocontrôlée de carbonucléosides inédits (\pm)-**2a-b** et (\pm)-**3a-b** à partir de la même brique moléculaire obtenu lors de la première synthèse, comportant à la fois un groupement méthyle en position 3' et un groupement hydroxyle en position 2' sur le carbosucre. Les molécules cibles sont des analogues de la néplanocine F naturelle, un agent antiviral récent extrait du filtrat du champignon *Ampuriella regularis*.

L'intermédiaire (\pm)-**20**, obtenu après une protection de la brique de départ et une dihydroxylation de l'alcène (\pm)-**9**, a été valorisé dans la synthèse d'une deuxième série de

carbonucléosides appartenant à la série D. Ainsi la transformation chimique de cet intermédiaire a été accomplie à l'aide d'une séquence réactionnelle astucieuse et a permis d'accéder de manière totalement univoque au carbosucré correctement fonctionnalisé. Le couplage de ces carbosucres avec une nucléobase en mettant en œuvre la réaction de Mitsunobu est réalisé avec succès après avoir fonctionnalisé avec différentes bases puriques. La déprotection des groupements dibenzyl éther a été échouée, cette difficulté a été surmontée par la réaction de Birch et a permis d'obtenir de nouveaux analogues de nucléosides (\pm)-**2a-b** et (\pm)-**3a-b** avec de bons rendements. La synthèse des molécules (\pm)-**2a-b** et (\pm)-**3a-b** est réalisée en 10 à 12 étapes avec des rendements globaux de 24 à 32%.

Les activités biologiques et toxicologiques des molécules obtenues ont été testées par le groupe du Pr. Christophe Pannecouque (Rega Institute, Louvain, Belgique). Les résultats des essais d'inhibition sur le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1 et VIH-2) se sont avérés négatifs, nous pensons avoir induit une famille assez large de nouveaux composés dont la modulation des différents paramètres structuraux permettra de parvenir à des molécules biologiquement actives. Il n'est par ailleurs pas exclus que ces composés présentent une activité plus significative sur d'autres virus comme l'herpès simplex par exemple. L'absence de l'activité et de cytotoxicité anti-VIH observé avec ces carbonucléosides résulte probablement au manque de phosphorylation par les kinases nucléosidiques sous forme de mono, di ou triphosphates. Bien que ces molécules constituent toutefois une banque de données pour la communauté scientifique.

Dans les perspectives de ce travail, la phosphorylation des composés préparés et de les retester, des tests biologiques de nos six dérivés carbonucléosidiques sur d'autres virus tels que la stomatite vésiculaire, l'herpès simplex, la vaccine et la grippe A H1N1 seront effectués ainsi que le greffage de différentes bases puriques ou pyrimidiques sur ces carbosucres aboutissant à la synthèse d'autres analogues de carbonucléosides.

Sur le plan personnel, la réussite que j'ai eu la chance de rencontrer pour atteindre les objectifs qui m'étaient fixés dans ce travail de thèse m'a enrichi d'une grande expérience et d'une grande satisfaction scientifique et morale.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Conditions générales du travail

I.1. Réactifs et solvants

Les réactifs utilisés au cours de ce travail proviennent essentiellement des compagnies : Aldrich, Acros, Alfa Aesar, Prolabo, SDS et Strem. Tous ces produits sont utilisés sans traitement préalable.

La plupart des réactions sont réalisées avec les solvants commerciaux. Lorsque les traces d'eau doivent être éliminées, ils sont purifiés par distillation sous argon et conservés sur tamis moléculaires 4 Å :

- Le tétrahydrofurane sur sodium et benzophénone
- Le dichlorométhane, toluène et le N,N-diméthylformamide sur CaH₂.
- L'éther diéthylique sur LiAlH₄.

I.2. Atmosphère réactionnelle

Les manipulations sensibles à l'air et/ou à l'humidité sont effectuées sous atmosphère inerte (argon) avec des solvants anhydres. La verrerie a été flambée ou séchée à l'étuve (80 °C).

I.3. Techniques d'analyse et appareillage

a. Chromatographie

Les contrôles chromatographiques sur couche mince (CCM) sont réalisés sur des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice Merck 60 F₂₅₄ (épaisseur 0.2 mm). La révélation des plaques est effectuée sous une lampe UV et d'une immersion dans une solution éthanolique de *p*-anisaldéhyde ou d'acide phosphomolybdique puis chauffage au moyen d'une plaque chauffante.

Les chromatographies d'élution ont été réalisées avec de la silice Merck 60 (230-400 mesh ASTM). Le solvant d'élution est un gradient éther de pétrole / éther ou de CH₂Cl₂ / MeOH. Les phases organiques ont été séchées sur sulfate de magnésium et évaporées à l'évaporateur rotatif sous pression réduite.

b. Point de fusion

Les températures de fusion (T_f) sont mesurées en tube capillaire sur un appareil à point de fusion digital Buchi B-450. Les valeurs obtenues ne sont pas corrigées.

c. Analyses élémentaires

Les microanalyses ont été effectuées sur un appareil Thermo Finnigan EA 1112.

d. Spectroscopie Infra-Rouge

Les spectres IR ont été réalisés sur un appareil à transformateur de Fourier FTIR (Perkin Elmer 1600). Les produits solides sont analysés sous forme de pastilles de KBr, alors que les huiles sont analysées sous forme d'un film. Les nombres d'ondes sont exprimés en cm^{-1} .

e. Spectrométrie RMN

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur spectromètres Bruker AM-300 avec une fréquence de 300 MHz pour le proton et de 75 MHz pour le carbone 13. Les déplacements chimiques δ sont donnés en partie par million (ppm) en utilisant le TMS comme référence interne et les constantes de couplage (J) en Hertz (Hz).

La multiplicité est exprimée de la manière suivante : singulet (s), singulet élargi (br s), doublet (d), doublet élargi (br d), doublet de doublet (dd), doublet de doublet de doublet (ddd), triplet (t), doublet de triplet (dt), quadriplet (q), multiplet (m),...etc.

La numérotation utilisée lors de la description des spectres RMN n'est pas forcément celle correspondant à la nomenclature systématique.

Les solvants deutérés de solubilisation des produits pour la réalisation des spectres sont précisés à chaque fois.

f. Spectrométrie de masse à haute résolution

Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse QStar Elite (Applied Biosystems SCIEX) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) assistée pneumatiquement.

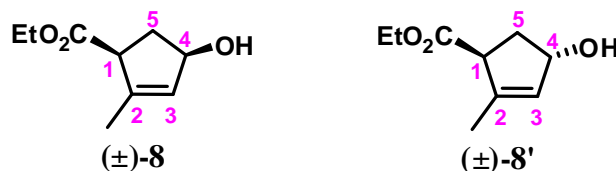
L'échantillon a été ionisé en mode electrospray positif dans les conditions suivantes : tension electrospray (ISV) : 5500 V ; tension d'orifice (OR) : 15-45 V ; pression du gaz de nébulisation (air) : 20-22 psi.

Le spectre de masse haute résolution (MS) a été obtenu avec un analyseur temps de vol (TOF). La mesure de masse exacte a été effectuée en triplicat avec un double étalonnage interne.

II. Procédés expérimentaux

Pour des raisons pratiques, la partie expérimentale a été rédigée en anglais et dans le style des publications déjà parues.

Ethyl *cis*-4-Hydroxy-2-methylcyclopent-2-ene-1-carboxylate

((±)-**8**)

$$M = 170.21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

A solution of ethyl 2-methyl-4-oxocyclopent-2-ene-1-carboxylate (±)-**7** (4.0 g, 23.8 mmol) and $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10.7 g, 28.6 mmol) in absolute EtOH (300 mL) was stirred at r.t. for 1 h. The solution was cooled to -90°C and treated with NaBH_4 (2.3 g, 60.8 mmol) in two portions. The reaction mixture was stirred for an additional 2.5 h before being concentrated under reduced pressure to provide a residue that was partitioned between 200 mL of water and 350 mL of CH_2Cl_2 . After separation, the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 100 mL) and the combined extracts were dried with MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel to afford 3.2 g (79%) of pure (±)-**8** and 0.6 g (14%) of (±)-**8'**.

Alcohol (±)-**8** :

IR (neat): $\nu = 3502, 3055, 1722, 1640 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.72$ (br. s, 1H, 3-H), 4.62 (br. t, $J = 8.6$ Hz, 1 H, 4-H), 4.22 and 4.14 (ABX₃, $J = 13.4, 7.2$ Hz, 2 H, O- CH_2 - CH_3), 3.22 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, 1-H), 2.61 (d, $J = 11.0$ Hz, 1 H, OH), 2.34 (ddd, $J = 14.3, 8.1, 7.2$ Hz, 1 H, 5-H), 1.97 (d, $J = 14.3$ Hz, 1 H, 5-H), 1.78 (s, 3 H, CH_3 -C-2), 1.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H, O- CH_2 - CH_3) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 175.6 (C), 142.5 (C), 131.7 (CH), 76.2 (CH), 61.2 (CH_2), 52.8 (CH), 38.2 (CH_2), 15.4 (CH_3), 14.2 (CH_3) ppm.

Anal. Calculated for $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_3$: C, 63.51%; H, 8.29%; found: C, 63.19% ; H, 8.21%.

Diastereoisomer **8'** :

Ethyl *trans*-4-Hydroxy-2-methylcyclopent-2-ene-1-carboxylate

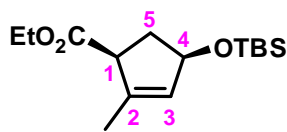
((\pm)-8'**)**

IR (neat): ν = 3383, 3037, 1727, 1646, 1182 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.60 (br. s, 1 H, 3-H), 4.97-4.91 (m, 1H, 4-H), 4.16 and 4.10 (ABX_3 , J = 11.2, 7.2 Hz, 2 H, O- CH_2 - CH_3), 3.59-3.50 (m, 1H, 1-H), 2.53 (ddd, J = 14.0, 7.2, 4.4 Hz, 1 H, 5-H), 1.95 (ddd, J = 13.8, 8.3, 3.4 Hz, 1 H, 5-H), 1.77 (br. s, 3 H, CH_3 -C-2), 1.24 (t, J = 7.2 Hz, 3 H, O- CH_2 - CH_3) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 174.2 (C), 142.2 (C), 131.3 (CH), 76.5 (CH), 60.6 (CH_2), 53.0 (CH), 38.8 (CH_2), 15.4 (CH_3), 14.1(CH_3).

Anal. Calculated for $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_3$: C, 63.51%; H, 8.29%; found: C, 63.43% ; H, 8.17%.

(1S,4R)-Ethyl 4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-2-methylcyclopent-2-enecarboxylate ((±)-9**((±)-9****C₁₅H₂₈O₃Si****M = 284.47 g.mol⁻¹**

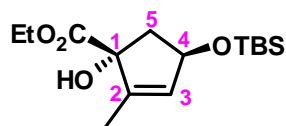
To an ice-cold solution of alcohol (±)-8 (5.0 g, 29.4 mmol) in DMF (40 mL) under argon was added imidazole (8.0 g, 117.5 mmol, 4.0 equiv) followed by TBSCl (6.6 g, 44.1 mmol, 1.5 equiv). After stirring at r.t. for 12 h, the solution was poured into H₂O (200 mL). The aqueous layer was extracted with Et₂O (3 × 150 mL), then the organic layers were combined, washed with H₂O (100 mL), brine (100 mL), and dried with MgSO₄. Concentration of the organic extracts *in vacuo* and purification of the residue by column chromatography gave compound (±)-9 (7.5 g, 90%) as a clear oil.

IR (neat): $\nu = 3055, 1729, 1215, 1150 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.48$ (m, 1 H, 3-H), 4.78 (m, 1 H, 4-H), 4.16 and 4.11 (ABX₃, $J = 13.4, 7.2, 7.2$ Hz, 2 H, O-CH₂-CH₃), 3.18 (br t, $J = 7.2$ Hz, 1H, 1-H), 2.48 (ddd, $J = 12.9, 8.9, 7.4$ Hz, 1 H, 5-H), 1.96 (ddd, $J = 12.9, 7.3, 5.4$ Hz, 1 H, 5-H), 1.74 (q, $J = 1.5$ Hz, 3 H, CH₃-C-2), 1.24 (ABX₃, $J = 7.2$ Hz, 3H, O-CH₂-CH₃), 0.87 (s, 9 H, (CH₃)₃C), 0.04 (br s, 6 H, (CH₃)₂Si) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 173.3$ (C), 139.9 (C), 131.8 (CH), 76.2 (CH), 60.4 (CH₂), 51.9 (CH), 38.5 (CH₂), 25.9 (3 × CH₃), 18.1(C), 15.4 (CH₃), 14.2 (CH₃), -4.7 (2 × CH₃) ppm.

Anal. Calculated for C₁₅H₂₈O₃Si: C, 63.33%; H, 9.92%; found: C, 63.66%; H, 9.87%.

(1R,4R)-4-(tert-Butyl-dimethyl-silyloxy)-1-hydroxy-2-methyl-cyclopent-2-enecarboxylic acid ethyl ester**((±)-10)****(±)-10****C₁₅H₂₈O₄Si****M = 300.47 g.mol⁻¹**

To an ice-cold solution of (±)-9 (1.00 g, 3.52 mmol) in CH₂Cl₂ (100 mL) was added SeO₂ (585 mg, 5.27 mmol, 1.5 equiv) under argon. The mixture was stirred vigorously at reflux for 12 h and then was filtered and poured into aqueous saturated Na₂SO₃ solution (200 mL). The layers were separated, and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 200 mL). The combined organic layers were washed with aqueous sat. Na₂SO₃ solution (50 mL), water (50 mL), brine (50 mL), and dried with MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 590 mg (56 %) of alcohol (±)-10 as a colorless oil.

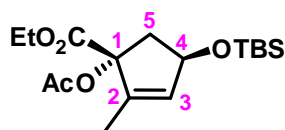
IR (neat): $\nu = 3308, 3026, 1743, 1251 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.66$ (br s, 1H, 3-H), 5.09-5.04 (m, 1H, 4-H), 4.28 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₃), 3.61 (br s, 1H, OH), 2.37 (dd, $J = 13.8, 6.8$ Hz, 1H, 5-H), 2.19 (dd, $J = 13.8, 4.5$ Hz, 1H, 5-H), 1.63 (br s, 3H, CH₃-C-2), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, O-CH₂-CH₃), 0.89 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.07 (s, 3H, CH₃-Si), 0.06 (s, 3H, CH₃-Si) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 175.6$ (C), 142.0 (C), 135.0 (CH), 85.0 (C), 75.5 (CH), 62.5 (CH₂), 48.4 (CH₂), 26.1 (3 × CH₃), 18.3 (C), 14.3 (CH₃), 12.0 (CH₃), -4.4 (CH₃), -4.5 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI) calculated for C₁₅H₃₂NO₄Si [M + NH₄⁺] 318.2095; found : 318.2094.

Anal. Calculated for C₁₅H₂₈O₄Si: C, 59.96%; H, 9.39%; found: C, 60.47%; H, 9.18%.

(1*R*,4*R*)-1-Acetoxy-4-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxy)-2-methyl-cyclopent-2-enecarboxylic acid ethyl ester**((±)-11)****((±)-11****C₁₇H₃₀O₅Si****M = 342.50 g.mol⁻¹**

To an ice-cold solution of (±)-**10** (200 mg, 0.67 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) were added, under argon, DMAP (244 mg, 2.00 mmol, 3.0 equiv) followed by acetic anhydride (95 μL, 1.00 mmol, 1.5 equiv). The mixture was stirred at r.t. for 12 h and then diluted with CH₂Cl₂ (50 mL) and poured into water (25 mL). The layers were separated, and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 50 mL). The combined organic layer were washed with water (15 mL), brine (15 mL), and dried with MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 197 mg (87 %) of compound (±)-**11**. Mp = 78.5-79.5 °C. A single crystal of (±)-**11** that was suitable for X-ray diffractometry was obtained by dissolving the chromatographically purified product in the smallest possible quantity of Et₂O in a vial, then slow evaporation of the solvent at r.t.

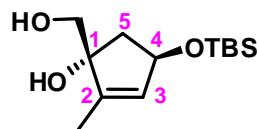
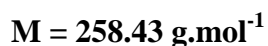
IR (neat): $\nu = 3038, 1750, 1723, 1198 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.74$ (br s, 1H, 3-H), 4.89-4.85 (m, 1H, 4-H), 4.25-4.13 (m, 2H, O-CH₂-CH₃), 2.74 (dd, $J = 14.9, 3.6$ Hz, 1H, 5-H), 2.45 (dd, $J = 14.9, 7.0$ Hz, 1H, 5-H), 2.06 (s, 3H, CH₃-CO), 1.73 (br s, 3H, CH₃-C-2), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃-CH₂), 0.88 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.06 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.7$ (C), 169.3 (C), 139.7 (C), 137.4 (CH), 90.8 (C), 74.7 (CH), 61.7 (CH₂), 44.5 (CH₂), 26.0 (3 × CH₃), 21.1 (CH₃), 18.3 (C), 14.2 (CH₃), 12.9 (CH₃), -4.5 (CH₃), -4.6 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI) calculated for C₁₇H₃₀O₅SiNa [M + Na⁺] 365.1755; found 365.1751.

Anal. Calculated for C₁₇H₃₀O₅Si: C, 59.61%; H, 8.83%; found: C, 59.35%; H, 8.88%.

(1*R*,4*R*)-4-(*tert*-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-1-hydroxymethyl-2-methyl-cyclopent-2-enol
enol **((±)-12)****((±)-12**

A solution of (±)-**10** (870 mg, 2.89 mmol) in dry Et₂O (10 mL) was added dropwise at 0 °C to a stirred slurry of LiAlH₄ (165 mg, 4.34 mmol, 1.5 equiv) in dry Et₂O (10 mL). After 2 h at 0 °C, Celite (5 g) and Na₂SO₄·10H₂O (5 g) were added, and the solution was allowed to warm to r.t. and was stirred for a further 1 h. The mixture was filtered through a pad of MgSO₄ and then concentrated to give a residue, which was purified by column chromatography (silica gel) to afford 695 mg (93 %) of diol (±)-**12** as a solid. Recrystallization from Et₂O afforded pure (±)-**12** as white needles. Mp = 50-51 °C.

IR (KBr): $\nu = 3402, 3024, 1249, 1053 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.55$ (br s, 1H, 3-H), 4.74 (br d, $J = 6.1$ Hz, 1H, 4-H), 3.61 and 3.54 (AB, $J = 10.2$ Hz, 2H, CH₂-OH), 3.12 (br s, 1H, OH), 2.50 (br s, 1H, OH), 2.14 (dd, $J = 14.0, 6.1$ Hz, 1H, 5-H), 1.93 (dd, $J = 14.0, 1.8$ Hz, 1H, 5-H), 1.72 (br s, 3H, CH₃-C-2), 0.86 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.06 (s, 3H, CH₃-Si), 0.05 (s, 3H, CH₃-Si) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 146.4$ (C), 131.2 (CH), 85.0 (C), 73.4 (CH), 66.9 (CH₂), 48.1 (CH₂), 25.9 (3 × CH₃), 18.2 (C), 11.9 (CH₃), -4.5 (CH₃), -4.7 (CH₃) ppm.

Anal. Calculated for C₁₃H₂₆O₃Si: C, 60.42%; H, 10.14%; found: C, 60.48%; H, 10.41%.

tert-Butyl-dimethyl-((5R,7R)-2,2,9-trimethyl-1,3-dioxaspiro[4.4]non-8-en-7-yloxy)-silane**((±)-13)****((±)-13****C₁₆H₃₀O₃Si****M = 298.49 g.mol⁻¹**

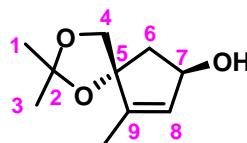
To an ice-cold solution of (±)-**12** (650 mg, 2.51 mmol) in THF (25 mL) were added, under argon, 2,2-dimethoxypropane (0.93 mL, 7.55 mmol, 3.0 equiv) followed by a catalytic amount of camphorsulfonic acid. The mixture was stirred at r.t. for 6 h and then diluted with Et₂O (100 mL) and poured into aqueous sat. NaHCO₃ solution (50 mL). The layers were separated, and the aqueous layer was extracted with Et₂O (2 × 100 mL). The combined organic layers were washed with aqueous sat. NaHCO₃ solution (50 mL), water (50 mL), brine (50 mL), and dried with MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 671 mg (89 %) of compound (±)-**13** as a clear oil.

IR (neat): $\nu = 3018, 1256, 1147, 1048 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.54$ (br s, 1H, 8-H), 4.84-4.80 (m, 1H, 7-H), 3.98 and 3.88 (AB, $J = 8.9$ Hz, 2H, O-CH₂-C-5), 2.35 (dd, $J = 13.8, 6.6$ Hz, 1H, 6-H), 1.88 (dd, $J = 13.8, 2.9$ Hz, 1H, 6-H), 1.73 (br s, 3H, CH₃-C-9), 1.41 (s, 3H, CH₃-C-2), 1.39 (s, 3H, CH₃-C-2), 0.87 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.05 (s, 3H, CH₃-Si), 0.04 (s, 3H, CH₃-Si) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 143.5$ (C), 132.7 (CH), 109.2 (C), 91.4 (C), 74.0 (CH), 72.2 (CH₂), 48.5 (CH₂), 26.6 (CH₃), 26.3 (CH₃), 26.0 (3 × CH₃), 18.3 (C), 11.7 (CH₃), -4.5 (CH₃), -4.6 (CH₃) ppm.

Anal. Calculated for C₁₆H₃₀O₃Si: C, 64.38%; H, 10.13%; found: C, 64.48%; H, 10.45%.

(5*R*,7*R*)-2,2,9-Trimethyl-1,3-dioxaspiro[4.4]non-8-en-7-ol**((±)-14)****((±)-14****C₁₀H₁₆O₃****M = 184.23 g.mol⁻¹**

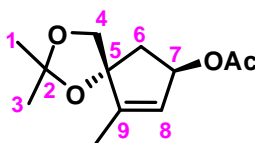
Under an argon atmosphere, a 1.0 M solution of TBAF in THF (3.16 mL, 3.16 mmol, 1.5 equiv) was added dropwise to an ice-cold solution of compound (±)-**13** (630 mg, 2.11 mmol) in THF (25 mL). The resulting mixture was stirred 3 h at r.t., then diluted with Et₂O (100 mL) and poured into water (50 mL). The layers were separated, and the aqueous layer was extracted with Et₂O (2 × 100 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL), and dried with MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 372 mg (96 %) of alcohol (±)-**14** as a clear oil.

IR (neat): $\nu = 3313, 3023, 1146, 1047 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.61$ (br s, 1H, 8-H), 4.82-4.76 (m, 1H, 7-H), 3.96 and 3.90 (AB, $J = 8.7$ Hz, 2H, O-CH₂-C-5), 2.39 (dd, $J = 14.2, 6.6$ Hz, 1H, 6-H), 2.07 (br s, 1H, OH), 1.92 (dd, $J = 14.2, 2.3$ Hz, 1H, 6-H), 1.74 (br s, 3H, CH₃-C-9), 1.40 (s, 3H, CH₃-C-2), 1.38 (s, 3H, CH₃-C-2) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 145.1$ (C), 131.7 (CH), 109.4 (C), 91.4 (C), 73.4 (CH), 72.5 (CH₂), 48.2 (CH₂), 26.5 (CH₃), 26.3 (CH₃), 11.7 (CH₃) ppm.

Anal. Calculated for C₁₀H₁₆O₃: C, 65.19%; H, 8.75%; found: C, 64.97%; H, 8.83%.

Acetic acid (5*R*,7*R*)-2,2,9-trimethyl-1,3-dioxaspiro[4.4]non-8-en-7-yl ester ((±)-15)

((±)-15)

 $C_{12}H_{18}O_4$ $M = 226.27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

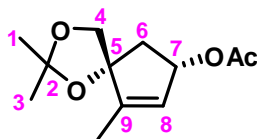
A solution of (±)-14 (250 mg, 1.36 mmol), acetic anhydride (255 μl , 2.72 mmol, 2.0 equiv) and a catalytic amount of *N,N*-dimethylaminopyridine in CH_2Cl_2 /pyridine (10 mL, 10:1 mixture) was stirred at rt. The resulting mixture was stirred 8 h at r.t., then diluted with Et_2O (100 mL) and poured into water (50 mL). The layers were separated, and the aqueous layer was extracted with Et_2O (2 \times 100 mL). The combined organic layers were washed with aqueous HCl (1M, 50 mL), water (50 mL), brine (50 mL), and dried with MgSO_4 . After concentration *in vacuo*, the residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 273 mg (89 %) of acetate (±)-15 as a clear oil.

IR (neat): $\nu = 3036, 1729, 1165, 1035 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.60$ (br s, 1H, 8-H), 5.51 (br d, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 3.88 and 3.84 (AB, $J = 8.9 \text{ Hz}$, 2H, O- CH_2 -C-5), 2.38 (dd, $J = 14.5, 6.7 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 2.02 (dd, $J = 14.5, 1.7 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 1.94 (s, 3H, CH_3 -CO), 1.73 (br s, 3H, CH_3 -C-9), 1.37 (s, 3H, CH_3 -C-2), 1.35 (s, 3H, CH_3 -C-2) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.8$ (C), 148.1 (C), 127.2 (CH), 109.6 (C), 90.9 (C), 76.5 (CH), 72.3 (CH_2), 45.0 (CH_2), 26.4 (CH_3), 26.3 (CH_3), 21.2 (CH_3), 11.8 (CH_3) ppm.

Anal. Calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_4$: C, 63.70%; H, 8.02%; found: C, 63.52%; H, 8.19%.

Acetic acid (5*R*,7*S*)-2,2,9-trimethyl-1,3-dioxaspiro[4.4]non-8-en-7-yl ester ((±)-**16**)((±)-**16**) $C_{12}H_{18}O_4$ $M = 226.27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

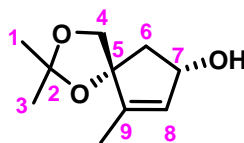
A stirred solution of (±)-**14** (350 mg, 1.90 mmol), AcOH (218 μL , 3.80 mmol, 2.0 equiv), and Ph_3P (1.00 g, 3.80 mmol, 2.0 equiv) in THF (20 mL) was cooled in an ice bath, and DIAD (746 μL , 3.80 mmol, 2.0 equiv) was slowly added. After removing the ice bath, the mixture was allowed to warm to r.t. and was further stirred for 1 h. The solvent was removed *in vacuo*, and the residue was directly purified by column chromatography (silica gel) to afford 410 mg (95 %) of acetate (±)-**16** as a colorless oil.

IR (neat): $\nu = 3041, 1727, 1149, 1049 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.57$ (br s, 1H, 8-H), 5.42-5.36 (m, 1H, 7-H), 3.83 and 3.76 (AB, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, O- CH_2 -C-5), 2.63 (dd, $J = 14.2, 7.2 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 2.04-1.97 (m, 1H, 6-H, partially overlapped), 1.99 (s, 3H, CH_3 -CO), 1.75 (br s, 3H, CH_3 -C-9), 1.39 (s, 3H, CH_3 -C-2), 1.37 (s, 3H, CH_3 -C-2) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.1$ (C), 146.0 (C), 127.7 (CH), 109.8 (C), 89.7 (C), 75.5 (CH), 71.8 (CH_2), 45.5 (CH_2), 26.5 (CH_3), 26.3 (CH_3), 21.3 (CH_3), 11.7 (CH_3) ppm.

Anal. Calculated for $C_{12}H_{18}O_4$: C, 63.70%; H, 8.02%; found: C, 64.02%; H, 8.26%.

(5*R*,7*S*)-2,2,9-Trimethyl-1,3-dioxaspiro[4.4]non-8-en-7-ol**((±)-17)****(±)-17****C₁₀H₁₆O₃****M = 184.23 g.mol⁻¹**

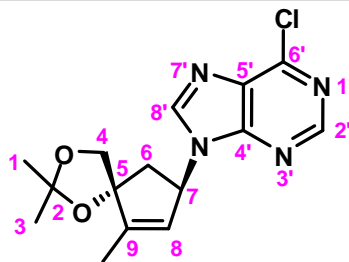
To an ice-cold solution of (±)-**16** (400 mg, 1.77 mmol) in MeOH (20 mL) was added K₂CO₃ (489 mg, 3.54 mmol, 2.0 equiv). The mixture was stirred under argon at r.t. for 1 h and then diluted with Et₂O (100 mL) and poured into aqueous sat. NH₄Cl solution (50 mL). The layers were separated, and the aqueous layer was extracted with Et₂O (2 × 100 mL). The combined organic layers were washed with aqueous sat. NH₄Cl solution (50 mL), water (50 mL), brine (50 mL), and dried with MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 295 mg (91 %) of compound (±)-**17** as a clear oil.

IR (neat): $\nu = 3404, 3031, 1146, 1049 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.59$ (br s, 1H, 8-H), 4.55-4.45 (br s, 1H, 7-H), 3.79 and 3.72 (AB, $J = 8.7$ Hz, 2H, O-CH₂-C-5), 2.55 (dd, $J = 13.9, 7.0$ Hz, 1H, 6-H), 2.20 (br s, 1H, OH), 1.87 (dd, $J = 13.9, 4.5$ Hz, 1H, 6-H), 1.72 (br s, 3H, CH₃-C-9), 1.38 (s, 6H, (CH₃)₂C-2) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 143.3$ (C), 132.3 (CH), 109.7 (C), 90.0 (C), 73.0 (CH), 71.5 (CH₂), 49.0 (CH₂), 26.6 (CH₃), 26.3 (CH₃), 11.6 (CH₃) ppm.

Anal. Calculated for C₁₀H₁₆O₃: C, 65.19%; H, 8.75%; found: C, 64.75%; H, 9.02%.

6-Chloro-9-((5*R*,7*R*)-2,2,9-trimethyl-1,3-dioxaspiro[4.4]non-8-en-7-yl)-9*H*-purine**((±)-18)****((±)-18****C₁₅H₁₇ClN₄O₂****M = 320.77 g.mol⁻¹**

DIAD (320 μ L, 1.63 mmol, 1.5 equiv) was added dropwise to a solution of Ph₃P (427 mg, 1.63 mmol, 1.5 equiv) in THF (10 mL) under an argon atmosphere at 0 °C. The mixture was stirred for 30 min and then 6-chloropurine (252 mg, 1.63 mmol, 1.5 equiv) was added. The mixture was stirred for an additional 30 min and then a solution of alcohol (±)-17 (200 mg, 1.09 mmol) in THF (5 mL) was added slowly. The cooling bath was removed and the mixture was stirred at r.t. for 12 h. The solvent was removed *in vacuo*, and the residue was directly purified by column chromatography (silica gel) to afford 276 mg (79 %) of compound (±)-18 as a white powder. Mp = 154-155 °C (dec.).

IR (KBr): $\nu = 3046, 1647, 1152, 1047 \text{ cm}^{-1}$.

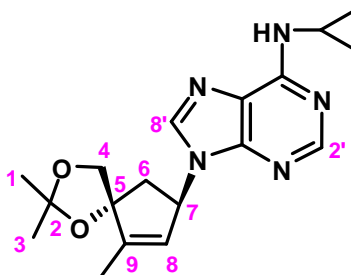
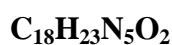
UV (CH₂Cl₂) λ_{max} 267 nm.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.69$ (s, 1H, 2'-H), 7.99 (s, 1H, 8'-H), 5.73 (m, 1H, 7-H), 5.70 (m, 1H, 8-H), 4.10 and 3.83 (AB, $J = 9.1$ Hz, 2H, O-CH₂-C-5), 2.90 (dd, $J = 14.5, 7.7$ Hz, 1H, 6-H), 2.22 (dd, $J = 14.5, 3.5$ Hz, 1H, 6-H), 1.90 (t, $J = 1.5$ Hz, 3H, CH₃-C-9), 1.43 (s, 3H, CH₃-C-2), 1.36 (s, 3H, CH₃-C-2) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 151.9$ (CH), 151.6 (C), 151.1 (C), 149.7 (C), 143.1 (CH), 132.3 (C), 125.1 (CH), 110.0 (C), 91.0 (C), 71.9 (CH₂), 58.1 (CH), 45.7 (CH₂), 26.4 (CH₃), 25.9 (CH₃), 12.0 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI) calculated for C₁₅H₁₈N₄O₂Cl [$M + H^+$] 321.1113; found: 321.1127.

Anal. Calculated for C₁₅H₁₇N₄O₂Cl: C, 56.16%; H, 5.34%; N, 17.47%; found: C, 56.43%; H, 5.28%; N, 17.09%.

Cyclopropyl-[9-((5*R*,7*R*)-2,2,9-trimethyl-1,3-dioxaspiro[4.4]non-8-en-7-yl)-9*H*-purin-6-yl]-amine **((±)-19a)****((±)-19a**

$$M = 341.41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

To an ice-cold solution of purine ((±)-**18**) (100 mg, 0.31 mmol) in MeOH (5 mL) was added cyclopropylamine (1 mL, 14.2 mmol), and the resulting mixture was stirred at r.t. for 12 h. After concentration *in vacuo*, column chromatography (silica gel) of the residue gave 101 mg (95 %) of compound ((±)-**19a**) as a foam.

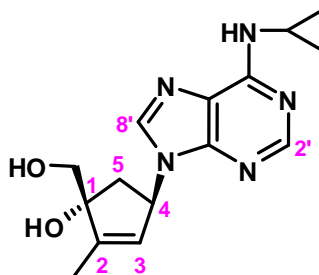
IR (KBr): $\nu = 3291, 3023, 1642, 1038 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.40$ (s, 1H, 2'-H), 7.58 (s, 1H, 8'-H), 6.36 (br s, 1H, NH), 5.67 (br s, 1H, 8-H), 5.62-5.57 (m, 1H, 7-H), 4.01 and 3.76 (AB, $J = 8.9$ Hz, 2H, O-CH₂-C-5), 2.98 (br s, 1H, CH-NH), 2.82 (dd, $J = 14.6, 8.0$ Hz, 1H, 6-H), 2.16 (dd, $J = 14.6, 3.2$ Hz, 1H, 6-H), 1.85 (br s, 3H, CH₃-C-9), 1.39 (s, 3H, CH₃-C-2), 1.32 (s, 3H, CH₃-C-2), 0.88-0.81 (m, 2H, H_{cyclopropyl}), 0.59-0.54 (m, 2H, H_{cyclopropyl}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 155.9$ (C), 153.1 (CH), 149.1 (C), 148.7 (C), 137.5 (CH), 125.8 (CH), 120.5 (C), 109.8 (C), 91.1 (C), 72.0 (CH₂), 57.0 (CH), 46.0 (CH₂), 26.4 (CH₃), 26.0 (CH₃), 23.7 (CH), 11.9 (CH₃), 7.4 (2 × CH₂) ppm.

HRMS (ESI) calculated for C₁₈H₂₄N₅O₂ [M + H⁺] 342.1925; found: 342.1925.

Anal. Calculated for C₁₈H₂₃N₅O₂: C, 63.32%; H, 6.79%; N, 20.51%; found: C, 62.96%; H, 6.85%; N, 20.19%.

(1*R*,4*R*)-4-(6-Cyclopropylamino-purin-9-yl)-1-hydroxymethyl-2-methyl-cyclopent-2-enol**((±)-1a)****((±)-1a****C₁₅H₁₉N₅O₂****M = 301.34 g.mol⁻¹**

A solution of purine (±)-**1a** (100 mg, 0.30 mmol) in 0.1 M aq. HCl solution (10 mL) was stirred at r.t. for 12 h. The reaction mixture was then cooled, neutralized with Amberlite IRA-67 ion-exchange resin (5 g), filtered and concentrated. Purification of the residue by column chromatography (silica gel) gave 82.8 mg (94 %) of compound (±)-**1a** as a white solid. Mp = 208-209 °C (dec.).

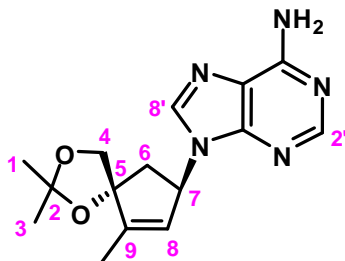
IR (KBr): $\nu = 3408, 3018, 1638, 1042 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8.23$ (s, 1H, 2'-H), 8.02 (s, 1H, 8'-H), 7.83 (br s, 1H, NH), 5.65-5.55 (m, 2H, 3-H, 4-H), 4.97 (s, 1H, OH), 4.86 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H, OH), 3.47 (dd, $J = 10.5, 5.1$ Hz, 1H, CHH-OH), 3.29 (dd, $J = 10.5, 5.1$ Hz, 1H, CHH-OH), 3.06 (br s, 1H, CH-NH), 2.41 (dd, $J = 14.3, 8.3$ Hz, 1H, 5-H), 2.21 (dd, $J = 14.3, 4.1$ Hz, 1H, 5-H), 1.76 (br s, 3H, CH₃-C-2), 0.74-0.67 (m, 2H, H_{cyclopropyl}), 0.62-0.58 (m, 2H, H_{cyclopropyl}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 155.5$ (C), 152.1 (CH), 149.3 (C), 148.8 (C), 138.6 (CH), 125.9 (CH), 119.3 (C), 84.3 (C), 64.8 (CH₂), 56.3 (CH), 43.5 (CH₂), 23.9 (CH), 11.7 (CH₃), 6.4 (2 × CH₂) ppm.

HRMS (ESI) calculated for C₁₅H₂₀N₅O₂ [M + H⁺] 302.1612; found: 302.1611.

Anal. Calculated for C₁₅H₁₉N₅O₂: C, 59.79%; H, 6.36%; N, 23.24%; found: C, 60.12%; H, 6.21%; N, 22.99%.

9-((5*R*,7*R*)-2,2,9-Trimethyl-1,3-dioxaspiro[4.4]non-8-en-7-yl)-9*H*-purin-6-ylamine((±)-**19b**)((±)-**19b**) $C_{15}H_{19}N_5O_2$ $M = 301.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

A stirred solution of purine (±)-**18** (100 mg, 0.31 mmol) in MeOH (5 mL) saturated with NH_3 was heated at 100 °C for 24 h in a Parr stainless steel sealed reaction vessel. After concentration *in vacuo*, column chromatography (silica gel) of the residue gave 84 mg (89 %) of compound (±)-**19b** as a white solid. Mp = 223-224 °C (dec.).

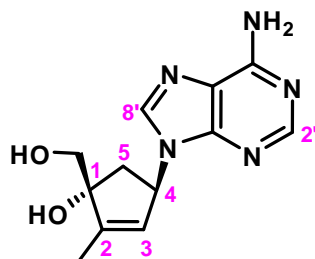
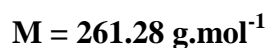
IR (KBr): $\nu = 3028, 1646, 1143, 1036 \text{ cm}^{-1}$.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.13$ (s, 1H, 2'-H), 7.98 (s, 1H, 8'-H), 7.19 (s, 2H, NH_2), 5.76 (br s, 1H, 8-H), 5.59-5.50 (m, 1H, 7-H), 4.12 and 3.86 (AB, $J = 9.0$ Hz, 2H, O- CH_2 -C-5), 2.67 (dd, $J = 14.4, 7.9$ Hz, 1H, 6-H), 2.27 (dd, $J = 14.4, 3.6$ Hz, 1H, 6-H), 1.80 (br s, 3H, CH_3 -C-9), 1.37 (s, 3H, CH_3 -C-2), 1.31 (s, 3H, CH_3 -C-2) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 156.0$ (C), 152.3 (CH), 149.3 (C), 146.7 (C), 138.7 (CH), 126.7 (CH), 119.3 (C), 108.6 (C), 90.8 (C), 71.0 (CH_2), 56.5 (CH), 44.7 (CH_2), 26.3 (CH_3), 25.6 (CH_3), 11.6 (CH_3) ppm.

HRMS (ESI) calculated for $C_{15}H_{20}N_5O_2$ [$M + H^+$] 302.1612; found: 302.1613.

Anal. Calculated for $C_{15}H_{19}N_5O_2$: C, 59.79%; H, 6.36%; N, 23.24%; found: C, 60.01%; H, 23.19%; N, 23.40%.

(1*R*,4*R*)-4-(6-Amino-purin-9-yl)-1-hydroxymethyl-2-methyl-cyclopent-2-enol ((±)-1b)**(±)-1b**

A solution of purine (±)-**1b** (70 mg, 0.23 mmol) in 0.1 M aq. HCl solution (10 mL) was stirred at r.t. for 12 h. The reaction mixture was then cooled, neutralized with Amberlite[®] IRA-67 ion-exchange resin (5 g), filtered and concentrated. Purification of the residue by column chromatography (silica gel) gave 53 mg (87 %) of compound (±)-**1b** as a foam.

IR (KBr): $\nu = 3401, 3016, 1638, 1044 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, MeOH-*d*₄): $\delta = 8.19$ (s, 1H, 2'-H), 8.13 (s, 1H, 8'-H), 5.75-5.66 (m, 2H, 3-H, 4-H), 3.67 and 3.48 (AB, $J = 10.8$ Hz, 2H, CH₂-OH), 2.60 (dd, $J = 14.7, 8.3$ Hz, 1H, 5-H), 2.33 (dd, 14.7, 3.9 Hz, 1H, 5-H), 1.88 (br s, 3H, CH₃-C-2) ppm.

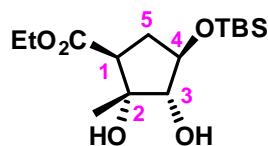
¹³C NMR (75 MHz, MeOH-*d*₄): $\delta = 157.2$ (C), 153.4 (CH), 151.2 (C), 150.4 (C), 141.0 (CH), 127.5 (CH), 120.2 (C), 86.1 (C), 66.0 (CH₂), 58.6 (CH), 44.8 (CH₂), 11.9 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI) calculated for C₁₂H₁₆N₅O₂ [M + H⁺] 262.1299; found: 262.1297.

Anal. Calculated for C₁₂H₁₅N₅O₂: C, 55.16%; H, 5.79%; N, 26.80%; found: C, 55.41%; H, 5.83%; N, 27.02%.

(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-(*tert*-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-2,3-dihydroxy-2-methyl-cyclopentanecarboxylic acid ethyl ester

((±)-20)



((±)-20

C₁₅H₃₀O₅Si

M = 318.48 g.mol⁻¹

A catalytic amount of OsO₄ (4% wt in water) was added to an ice-cold solution of (±)-**9** (5.00 g, 17.6 mmol) in acetone/water (240 mL, 3:1). The solution turned black, then NMO (4.20 g, 35.2 mmol, 2.0 equiv) was added to the reaction mixture. After stirring at r.t. for 24 h, the solution was diluted with Et₂O, poured into an aqueous solution of Na₂SO₃ (8.80 g, 70 mmol, 4.0 equiv) and stirred for 30 min. The aqueous layer was extracted with Et₂O, then the organic layers were combined, washed with water, brine, and dried with MgSO₄. Concentration *in vacuo* and purification by column chromatography gave pure diol (±)-**20** (4.36 g, 78% yield) as clear oil. The diastereoisomer **20'** was also isolated in pure form (445 mg, 8% yield).

Compound **20** :

IR (neat): $\nu = 3433, 1742, 1223, 1139 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.18$ and 4.17 (ABX₃, $J = 13.4, 7.2, 7.2$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₃), 4.02 (ddd, $J = 8.5, 6.4, 3.5$ Hz, 1H, 4-H), 3.51 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, 3-H), 2.91 (dd, $J = 10.5, 8.5$ Hz, 1H, 1-H), 2.28 (dt, $J = 13.8, 8.5$ Hz, 1H, 5-H), 1.83 (ddd, $J = 13.8, 10.5, 6.4$ Hz, 1H, 5-H), 1.27 (ABX₃ partially overlapped, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.25 (s, 3H, CH₃-C-2), 0.87 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.06 (s, 3H, CH₃-Si), 0.05 (s, 3H, CH₃-Si).

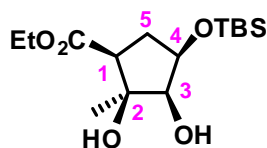
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.3$ (C), 83.6 (CH), 77.8 (C), 75.2 (CH), 60.7 (CH₂), 50.9 (CH), 33.1 (CH₂), 25.7 (3 x CH₃), 22.2 (CH₃), 17.9 (C), 14.3 (CH₃), -4.8 (CH₃), -4.9 (CH₃).

Anal. Calculated for C₁₅H₃₀O₅Si: C, 56.57%; H, 9.49%; found: C, 56.85%; H, 9.44%.

Diastereoisomer 20':

(1*S*,2*S*,3*R*,4*R*)-4-(*tert*-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-2,3-dihydroxy-2-methyl-cyclopentanecarboxylic acid ethyl ester

((±)-20')



(±)-20'

C₁₅H₃₀O₅Si

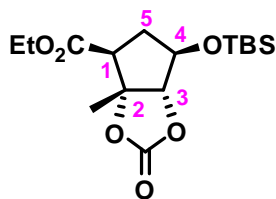
M = 318.48 g.mol⁻¹

IR (neat): $\nu = 3439, 1738, 1218, 1135 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.26\text{-}4.09$ (m, 3H, 4-H, O-CH₂-CH₃), 3.44 (m, 1H, 3-H), 2.68 (dd, $J = 10.3, 7.4$ Hz, 1H, 1-H), 2.29 (ddd, $J = 14.8, 7.4, 2.3$ Hz, 1H, 5-H), 2.02 (ddd, $J = 14.8, 10.3, 5.8$ Hz, 1H, 5-H), 1.38 (s, 3H, CH₃-C-2), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃-CH₂), 0.89 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.13 (s, 3H, CH₃-Si), 0.10 (s, 3H, CH₃-Si).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.8$ (C), 79.4 (C), 77.8 (CH), 73.5 (CH), 60.7 (CH₂), 50.2 (CH), 32.3 (CH₂), 25.7 (3 x CH₃), 23.8 (CH₃), 17.9 (C), 14.3 (CH₃), -4.8 (CH₃), -5.1 (CH₃).

Anal. Calculated for C₁₅H₃₀O₅Si: C, 56.57%; H, 9.49%; found: C, 56.29%; H, 9.56%.

(3aR,4S,6R,6aS)-6-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-3a-methyl-2-oxo-tetrahydro-cyclopenta-1,3-dioxole-4-carboxylic acid ethyl ester**((±)-21)****((±)-21****C₁₆H₂₈O₆Si****M = 344.48 g.mol⁻¹**

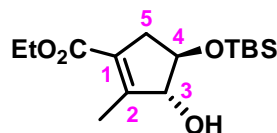
To an ice-cold solution of diol (±)-**20** (2.00 g, 6.28 mmol) in THF (40 mL) was added 1,1'-carbonyldiimidazole (1.53 g, 9.42 mmol, 1.5 equiv) under argon. The mixture was stirred at r.t. for 24 h, then diluted with Et₂O (100 mL) and poured into water (100 mL). The layers were separated, and the aqueous layer was extracted with Et₂O (2 × 100 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL), and dried with MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 2.03 g (94 %) of carbonate (±)-**21** as a solid. Recrystallization from Et₂O afforded pure (±)-**21** as white needles. Mp = 53-54 °C.

IR (KBr): $\nu = 1797, 1703, 1283, 1070 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.25$ (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, 3-H), 4.21-4.13 (m, 3H, 4-H, O-CH₂-CH₃), 3.03 (dd, $J = 11.6, 6.5$ Hz, 1H, 1-H), 2.22 (dt, $J = 13.4, 6.5$, 1H, 5-H), 2.00 (ddd, $J = 13.4, 11.6, 8.6$ Hz, 1H, 5-H), 1.55 (s, 3H, CH₃-C-2), 1.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃-CH₂), 0.86 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.08 (s, 3H, CH₃-Si), 0.07 (s, 3H, CH₃-Si) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.3$ (C), 153.9 (C), 92.3 (CH), 88.5 (C), 76.3 (CH), 61.7 (CH₂), 51.5 (CH), 34.2 (CH₂), 26.0 (3 × CH₃), 21.9 (CH₃), 18.3 (C), 14.6 (CH₃), -4.6 (2 × CH₃) ppm.

Anal. Calculated for C₁₆H₂₈O₆Si: C, 55.79%; H, 8.19%; found: C, 55.92%; H, 8.36%.

(3*R*,4*R*)-4-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxy)-3-hydroxy-2-methyl-cyclopent-1-enecarboxylic acid ethyl ester**((±)-22)****((±)-22****C₁₅H₂₈O₄Si****M = 300.47 g.mol⁻¹**

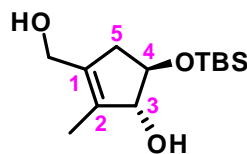
To an ice-cold solution of carbonate (±)-**21** (1.90 g, 5.52 mmol) in toluene (120 mL) was added DBU (1.24 mL, 8.27 mmol, 1.5 equiv) under argon. The mixture was stirred at reflux for 3 h, then diluted with Et₂O (100 mL) and poured into water (100 mL). The layers were separated, and the aqueous layer was extracted with Et₂O (3 × 100 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL), and dried with MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 1.56 g (94 %) of compound (±)-**22** as a solid. Recrystallization from Et₂O-hexane afforded pure (±)-**22** as white needles. Mp = 36.5-37.5 °C.

IR (KBr): $\nu = 3483, 1674, 1622, 1240 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.45$ (br d, $J = 6.2$ Hz, 1H, 3-H), 4.20 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₃), 4.12 (ddd, $J = 7.7, 6.6, 5.8$ Hz, 1H, 4-H), 2.84 (ddt, $J = 15.5, 7.7, 1.4$ Hz, 1H, 5-H), 2.39-2.28 (m, 1H, 5-H), 2.10 (br s, 3H, CH₃-C-2), 1.96 (br s, 1H, OH), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃-CH₂), 0.90 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.10 (s, 3H, CH₃-Si), 0.09 (s, 3H, CH₃-Si) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 165.8$ (C), 152.4 (C), 125.8 (C), 86.8 (CH), 79.7 (CH), 60.3 (CH₂), 38.6 (CH₂), 26.0 (3 × CH₃), 18.3 (C), 14.4 (CH₃), 13.3 (CH₃), -4.6 (2 × CH₃) ppm.

Anal. Calculated for C₁₅H₂₈O₄Si: C, 59.96%; H, 9.39%; found: C, 59.76%; H, 9.71%.

(1*R*,5*R*)-5-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxy)-3-hydroxymethyl-2-methyl-cyclopent-2-enol**((±)-23)****((±)-23****C₁₃H₂₆O₃Si****M = 258.43 g.mol⁻¹**

Under an argon atmosphere, a 1.0 M solution of Dibal-H in toluene (20.0 mL, 20.0 mmol, 4.0 equiv) was added dropwise to a -80 °C solution of ester (±)-**22** (1.50 g, 5.00 mmol) in toluene (100 mL). The resulting mixture was stirred 3 h at -80 °C, then Celite (25 g), and Na₂SO₄·10H₂O (25 g) were added, and the solution was allowed to warm to r.t. and was stirred for a further 1 h. The mixture was filtered through a pad of MgSO₄ and then concentrated to give a residue, which was purified by column chromatography (silica gel) to afford 1.25 g (97 %) of diol (±)-**23** as a solid. Recrystallization from Et₂O afforded pure (±)-**23** as white needles. Mp = 122-123 °C.

IR (KBr): $\nu = 3271, 1246, 1095, 1029$ cm⁻¹.

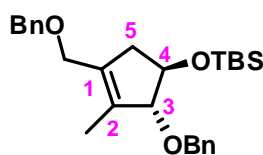
¹H NMR (300 MHz, MeOH-*d*₄): $\delta = 4.28$ (br s, 1H, 3-H), 4.14 (ddd, $J = 7.5, 5.7, 4.7$ Hz, 1H, 4-H), 4.12 and 4.05 (AB, $J = 12.4$ Hz, 2H, CH₂-OH, partially overlapped), 2.67 (dd, $J = 15.6, 7.5$ Hz, 1H, 5-H), 2.20 (br d, $J = 15.6$ Hz, 1H, 5-H), 1.68 (s, 3H, CH₃-C-2), 0.92 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.12 (s, 3H, CH₃-Si), 0.11 (s, 3H, CH₃-Si) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, MeOH-*d*₄): $\delta = 135.5$ (C), 135.4 (C), 87.8 (CH), 81.3 (CH), 59.2 (CH₂), 40.9 (CH₂), 26.4 (3 × CH₃), 19.0 (C), 10.8 (CH₃), -4.4 (CH₃), -4.5 (CH₃) ppm.

Anal. Calculated for C₁₃H₂₆O₃Si: C, 60.42%; H, 10.14%; found: C, 60.28%; H 10.36.

((1*R*,2*R*)-2-Benzyloxy-4-benzyloxymethyl-3-methyl-cyclopent-3-enyloxy)-*tert*-butyl-dimethyl-silane

((±)-24)



((±)-24

C₂₇H₃₈O₃Si

M = 438.67 g.mol⁻¹

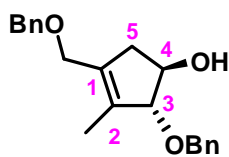
Sodium hydride (0.74 g, 18.4 mmol, 4.0 equiv, 60% suspension in mineral oil) was washed with Et₂O (2 × 10 mL) and suspended in THF (20 mL) under argon at 0 °C. A solution of diol (±)-**23** (1.19 g, 4.60 mmol) in THF (5 mL) was added dropwise, and the mixture was stirred for 30 min at 0 °C. Benzyl bromide (1.64 mL, 13.8 mmol, 3.0 equiv) and a catalytic amount of tetra-*n*-butylammonium iodide were added, and the resulting mixture was stirred at r.t. for 16 h. After addition of Et₂O (100 mL) and water (100 mL), the organic layers were separated, and the aqueous layer was extracted with Et₂O (3 × 100 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL), and dried with MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 1.86 g (92 %) of (±)-**24** as a clear oil.

IR (neat): $\nu = 3060, 1245, 1078, 1061 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.42\text{-}7.29$ (m, 10H, H_{Ar}), 4.79 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, CHH-C₆H₅), 4.61 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, CHH-C₆H₅), 4.46 (br s, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.43-4.33 (m, 2H, 3-H, 4-H), 4.10 and 4.02 (AB, $J = 12.1$ Hz, 2H, O-CH₂-C-1), 2.76 (dd, $J = 15.8, 7.1$ Hz, 1H, 5-H), 2.29 (br d, $J = 15.8$ Hz, 1H, 5-H), 1.68 (br s, 3H, CH₃-C-2), 0.94 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.15 (s, 3H, CH₃-Si), 0.12 (s, 3H, CH₃-Si) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 139.0$ (C), 138.5 (C), 135.2 (C), 133.0 (C), 128.8 (2 × CH), 128.7 (2 × CH), 128.1 (4 × CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 94.3 (CH), 78.2 (CH), 71.9 (CH₂), 71.8 (CH₂), 66.2 (CH₂), 41.3 (CH₂), 26.0 (3 × CH₃), 18.1 (C), 11.6 (CH₃), -4.1 (CH₃), -4.7 (CH₃) ppm.

Anal. Calculated for C₂₇H₃₈O₃Si: C, 73.92%; H, 8.73%; found: C, 73.69%; H, 8.68%.

(1R,2R)-2-Benzyloxy-4-benzyloxymethyl-3-methyl-cyclopent-3-enol**((±)-25)****((±)-25****C₂₁H₂₄O₃****M = 324.41 g.mol⁻¹**

Under an argon atmosphere, a 1.0 M solution of TBAF in THF (6.40 mL, 6.40 mmol, 1.5 equiv) was added dropwise to an ice-cold solution of compound (±)-**24** (1.71 g, 3.90 mmol) in THF (40 mL). The resulting mixture was stirred 3 h at r.t., then diluted with Et₂O (100 mL) and poured into water (100 mL). The layers were separated, and the aqueous layer was extracted with Et₂O (3 × 100 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL), and dried with MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 1.18 g (93 %) of alcohol (±)-**25** as a solid. Recrystallization from Et₂O-hexane afforded pure (±)-**25** as white needles. Mp = 52-53 °C.

IR (KBr): $\nu = 3287, 3006, 1057 \text{ cm}^{-1}$.

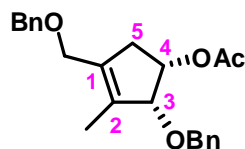
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.40\text{-}7.29$ (m, 10H, H_{Ar}), 4.73 and 4.65 (AB, $J = 12.1$ Hz, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.47 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.34 (m, 1H, 4-H), 4.28 (br s, 1H, 3-H), 4.12 and 4.02 (AB, $J = 11.9$ Hz, 2H, O-CH₂-C-1), 2.86 (dd, $J = 16.4, 7.2$ Hz, 1H, 5-H), 2.29 (br d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 5-H), 1.83 (br s, 1H, OH), 1.71 (s, 3H, CH₃-C-2) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 138.9$ (C), 138.4 (C), 135.0 (C), 133.9 (C), 128.6 (2 × CH), 128.5 (2 × CH), 127.9 (2 × CH), 127.8 (3 × CH), 127.7 (CH), 94.5 (CH), 76.6 (CH), 72.2 (CH₂), 71.8 (CH₂), 66.2 (CH₂), 41.3 (CH₂), 11.7 (CH₃) ppm.

Anal. Calculated for C₂₁H₂₄O₃: C, 77.75%; H, 7.46%; found: C, 77.72%; H, 7.67%.

Acetic acid (*1S,2R*)-2-benzyloxy-4-benzyloxymethyl-3-methyl-cyclopent-3-enyl ester

((±)-26)



((±)-26

 $C_{23}H_{26}O_4$ $M = 366.45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

A stirred solution of alcohol (±)-**25** (1.16 g, 3.58 mmol), AcOH (333 μL , 5.83 mmol, 1.5 equiv), and Ph_3P (1.53 g, 5.83 mmol, 1.5 equiv) in THF (50 mL) was cooled in an ice bath, and DIAD (1.14 mL, 5.83 mmol, 1.5 equiv) was slowly added. After removing the ice bath, the mixture was allowed to warm to r.t. and was further stirred for 12 h. The solvent was removed *in vacuo*, and the residue was directly purified by column chromatography (silica gel) to afford 1.26 g (96 %) of acetate (±)-**26** as a colorless oil.

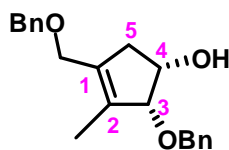
IR (neat): $\nu = 3052, 1723, 1237, 1058 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.38\text{-}7.28$ (m, 10H, H_{Ar}), 5.40 (ddd, $J = 9.4; 6.0; 3.6$ Hz, 1H, 4-H), 4.65 and 4.50 (AB, $J = 11.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.49 and 4.44 (AB, $J = 11.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.41 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 3-H), 4.14 and 4.07 (AB, $J = 11.9$ Hz, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-C-1}$), 2.76 (br dd, $J = 16.8, 6.0$ Hz, 1H, 5-H), 2.56 (br d, $J = 16.8$ Hz, 1H, 5-H), 2.06 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 1.70 (br s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C-2}$) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.2$ (C), 138.6 (C), 138.3 (C), 135.2 (C), 133.2 (C), 128.5 (2 \times CH), 128.4 (2 \times CH), 128.1 (2 \times CH), 127.9 (2 \times CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 85.5 (CH), 73.0 (CH_2), 72.1 (CH_2), 71.5 (CH), 65.9 (CH_2), 38.2 (CH_2), 21.3 (CH_3), 11.8 (CH_3) ppm.

HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{NO}_4$ [$\text{M} + \text{NH}_4^+$] 384.2169; found: 384.2168.

Anal. Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_4$: C, 75.38%; H, 7.15%; found: C, 74.98%; H, 7.34%.

(1*S*,2*R*)-2-Benzyloxy-4-benzyloxymethyl-3-methyl-cyclopent-3-enol**((±)-27)****((±)-27****C₂₁H₂₄O₃****M = 324.41 g.mol⁻¹**

To an ice-cold solution of acetate (±)-**26** (570 mg, 1.56 mmol) in MeOH (20 mL) was added K₂CO₃ (430 mg, 3.11 mmol, 2.0 equiv). The mixture was stirred under argon at r.t. for 1 h and then diluted with Et₂O (60 mL) and poured into aqueous sat. NH₄Cl solution (30 mL). The layers were separated, and the aqueous layer was extracted with Et₂O (2 × 50 mL). The combined organic layers were washed with aqueous sat. NH₄Cl solution (30 mL), water (30 mL), brine (30 mL), and dried with MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 465 mg (92 %) of alcohol (±)-**27** as a clear oil.

IR (neat): $\nu = 3484, 3064, 1245, 1052 \text{ cm}^{-1}$.

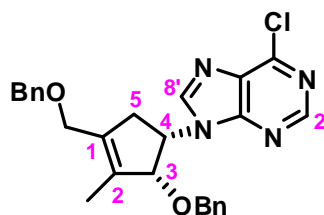
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.41\text{-}7.28$ (m, 10H, H_{Ar}), 4.75 and 4.63 (AB, $J = 11.7$ Hz, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.49 and 4.43 (AB, $J = 11.8$ Hz, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.38-4.28 (m, 2H, 4-H, 3-H), 4.13 and 4.05 (AB, $J = 11.9$ Hz, 2H, O-CH₂-C-1), 2.79 (br d, $J = 4.3$ Hz, 1H, OH), 2.62 (br d, $J = 16.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.47 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H, 5-H), 1.70 (s, 3H, CH₃-C-2) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 138.4$ (C), 138.0 (C), 134.5 (C), 133.7 (C), 128.6 (2 × CH), 128.5 (2 × CH), 128.1 (CH), 128.1 (2 × CH), 127.9 (2 × CH), 127.7 (CH), 87.2 (CH), 73.2 (CH₂), 72.1 (CH₂), 68.6 (CH), 66.1 (CH₂), 41.3 (CH₂), 11.7 (CH₃) ppm.

Anal. Calculated for C₂₁H₂₄O₃: C, 77.75%; H, 7.46%; found: C, 77.45%; H, 7.73%.

9-((1*S*,2*R*)-2-Benzyloxy-4-benzyloxymethyl-3-methyl-cyclopent-3-enyl)-6-chloro-9H-purine

((±)-28)



((±)-28

C₂₆H₂₅ClN₄O₂

M = 460.96 g.mol⁻¹

DIAD (545 μ L, 2.77 mmol, 1.5 equiv) was added dropwise to a solution of Ph₃P (728 mg, 2.77 mmol, 1.5 equiv) in THF (10 mL) under an argon atmosphere at 0 °C. The mixture was stirred for 30 min and then 6-chloropurine (429 mg, 2.77 mmol, 1.5 equiv) was added. The mixture was stirred for an additional 30 min and then a solution of alcohol (±)-**25** (600 mg, 1.85 mmol) in THF (5 mL) was added slowly. The cooling bath was removed and the mixture was stirred at r.t. for 12 h. The solvent was removed *in vacuo*, and the residue was directly purified by column chromatography (silica gel) to afford 628 mg (74 %) of compound (±)-**28** as a foam.

IR (KBr): $\nu = 3054, 3036, 1243, 1019 \text{ cm}^{-1}$.

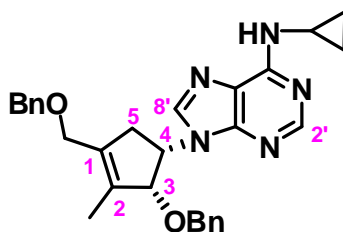
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.67$ (s, 1H, 2'-H), 8.25 (s, 1H, 8'-H), 7.34-7.30 (m, 5H, H_{Ar}), 7.15-7.10 (m, 3H, H_{Ar}), 6.90-6.86 (m, 2H, H_{Ar}), 5.43 (ddd, $J = 11.3, 6.2, 5.1$ Hz, 1H, 4-H), 4.53-4.50 (m, 1H, 3-H, partially overlapped), 4.51 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.24 and 4.09 (AB, $J = 11.7$, 2H, CH₂-O), 4.14 (s, 2H, O-CH₂-C-1), 3.03 (ddd, $J = 16.3, 7.8, 1.1$ Hz, 1H, 5-H), 2.81 (br d, $J = 16.3$ Hz, 1H, 5-H), 1.76 (s, 3H, CH₃-C-2) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 152.1$ (C), 151.6 (CH), 150.7 (C), 145.4 (CH), 138.0 (C), 136.8 (C), 135.8 (C), 134.3 (C), 131.1 (C), 128.5 (2 \times CH), 128.3 (2 \times CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (2 \times CH), 127.7 (2 \times CH), 85.6 (CH), 73.8 (CH₂), 72.8 (CH₂), 65.7 (CH₂), 53.4 (CH), 38.9 (CH₂), 12.0(CH₃) ppm.

HRMS (ESI) calculated for C₂₆H₂₆N₄O₂Cl [M + H⁺] 461.1739; found: 461.1740.

Anal. Calculated for C₂₆H₂₅N₄O₂Cl: C, 67.75%; H, 5.47%; N, 12.15%; found: C, 70.01%; H, 5.52%; N, 11.89%.

[9-((1*S*,2*R*)-2-Benzoyloxy-4-benzoyloxymethyl-3-methyl-cyclopent-3-enyl)-9*H*-purin-6-yl]-cyclopropyl-amine (±)-(29a)



(±)-29a

$C_{29}H_{31}N_5O_2$

$M = 481.59 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To an ice-cold solution of purine (±)-28 (200 mg, 0.43 mmol) in MeOH (8 mL) was added cyclopropylamine (2 mL, 28.5 mmol), and the resulting mixture was stirred at r.t. for 12 h. After concentration *in vacuo*, column chromatography (silica gel) of the residue gave 190 mg (91 %) of compound (±)-29a as a foam.

IR (KBr): $\nu = 3271, 3056, 1231, 1041 \text{ cm}^{-1}$.

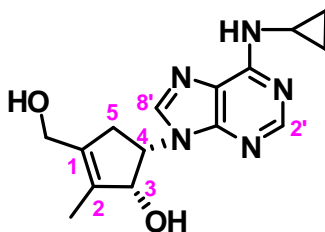
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.48$ (s, 1H, 2'-H), 7.92 (s, 1H, 8'-H), 7.33-7.25 (m, 5H, H_{Ar}), 7.20-7.10 (m, 3H, H_{Ar}), 6.95-6.84 (m, 2H, H_{Ar}), 6.29 (br d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 1H, NH), 5.42 (ddd, $J = 11.7, 6.3, 5.5 \text{ Hz}$, 1H, 4-H), 4.49 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.46-4.43 (m, 1H, 3-H, partially overlapped), 4.13 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.10 and 4.03 (AB, $J = 11.3 \text{ Hz}$, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-C-1}$), 3.01 (br dd, $J = 16.8, 9.9 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 2.85 (br d, $J = 16.8 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 1.72 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C-2}$), 1.26-1.22 (m, 1H, CH-NH), 0.94-0.80 (m, 2H, $\text{H}_{\text{cyclopropyl}}$), 0.67-0.62 (m, 2H, $\text{H}_{\text{cyclopropyl}}$) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 155.8$ (C), 153.1 (CH), 149.6 (C), 140.0 (CH), 138.1 (C), 137.3 (C), 135.8 (C), 134.4 (C), 128.5 (2 × CH), 128.3 (2 × CH), 128.0 (2 × CH), 127.8 (2 × CH), 127.7 (2 × CH), 119.3 (C), 85.6 (CH), 73.3 (CH_2), 72.6 (CH_2), 65.7 (CH_2), 52.6 (CH), 39.0 (CH_2), 23.8 (CH), 12.0 (CH_3), 7.5 (2 × CH_2) ppm.

HRMS (ESI) calculated for $C_{29}H_{32}N_5O_2$ [$M + H^+$] 482.2551; found: 482.2551.

Anal. Calculated for $C_{29}H_{31}N_5O_2$: C, 72.33%; H, 6.49%; N, 14.54%; found: C, 72.63%; H, 6.40%; N, 14.81%.

(1*R*,5*S*)-5-(6-Cyclopropylamino-purin-9-yl)-3-hydroxymethyl-2-methyl-cyclopent-2-enol ((±)-2a)



(±)-2a

$C_{15}H_{19}N_5O_2$

$M = 301.34 \text{ g.mol}^{-1}$

A solution of protected carbocyclic nucleoside (±)-**29a** (100 mg, 0.20 mmol) in THF (5 mL) was added at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ to a solution of liquid ammonia (10 mL) and sodium metal (100 mg) and the reaction mixture was stirring during 1 h at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. After neutralization with solid NH_4Cl and evaporation of ammonia, solvents were removed *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 50 mg (83 %) of compound (±)-**2a** as a foam.

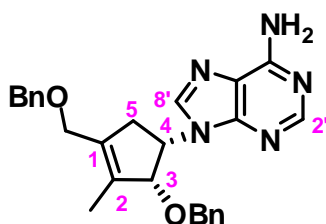
IR (KBr): $\nu = 3389, 3278, 1034 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): $\delta = 8.29$ (s, 1H, 2'-H), 8.11 (s, 1H, 8'-H), 5.20 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, 4-H), 4.61 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, 3-H), 4.30 and 4.21 (AB, $J = 13.1$ Hz, 2H, O- CH_2 -C-1), 3.05-2.96 (m, 3H, 2 x 5-H, CH-NH), 1.81 (s, 3H, CH_3 -C-2), 1.28 (s, 1H, NH), 0.89 (m, 2H, $\text{H}_{\text{cyclopropyl}}$), 0.64 (m, 2H, $\text{H}_{\text{cyclopropyl}}$) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): $\delta = 157.0$ (C), 153.4 (CH), 150.5 (C), 142.0 (CH), 137.8 (C), 136.2 (C), 120.1 (C), 79.4 (CH), 58.7 (CH_2), 56.1 (CH), 37.9 (CH_2), 24.6 (CH), 11.5 (CH_3), 7.6 ($2 \times \text{CH}_2$) ppm.

HRMS (ESI) calculated for $C_{15}H_{20}N_5O_2$ [$M + H^+$] 302.1612; found: 302.1611.

Anal. Calculated for $C_{15}H_{19}N_5O_2$: C, 59.79%; H, 6.36%; N, 23.24%; found: C, 59.47%; H, 6.43%; N, 23.46%.

9-((1*S*,2*R*)-2-Benzoyloxy-4-benzoyloxymethyl-3-methyl-cyclopent-3-enyl)-9H-purin-6-ylamine**((±)-29b)****((±)-29b****C₂₆H₂₇N₅O₂****M = 441.52 g.mol⁻¹**

A stirred solution of purine (±)-**28** (350 mg, 0.75 mmol) in MeOH (15 mL) saturated with NH₃ was heated at 100 °C for 24 h in a Parr stainless steel sealed reaction vessel. After concentration *in vacuo*, column chromatography (silica gel) of the residue gave 264 mg (79 %) of compound (±)-**29b** as a white solid. Mp = 143.5-144.5 °C (dec.).

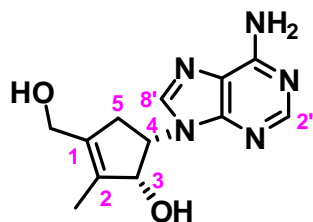
IR (KBr): $\nu = 3314, 3041, 1643, 1046 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.36$ (s, 1H, 2'-H), 7.97 (s, 1H, 8'-H), 7.35-7.25 (m, 5H, H_{Ar}), 7.20-7.15 (m, 3H, H_{Ar}), 6.95-6.90 (m, 2H, H_{Ar}), 5.73 (s, 2H, NH₂), 5.43 (dt, $J = 8.3, 5.5$ Hz, 1H, 4-H), 4.51 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.48 (m, 1H, 3-H, partially overlapped), 4.15 (s, 2H, CH₂-O), 4.11 and 4.05 (AB, $J = 11.6$ Hz, 2H, O-CH₂-C-1), 3.03 (ddd, $J = 16.2, 7.2, 0.9$ Hz, 1H, 5-H), 2.86 (br d, $J = 16.2$ Hz, 1H, 5-H), 1.74 (s, 3H, CH₃-C-2) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 155.5$ (C), 152.9 (CH), 150.6 (C), 140.8 (CH), 138.1 (C), 137.3 (C), 135.9 (C), 134.5 (C), 128.6 (2 × CH), 128.4 (2 × CH), 128.1 (2 × CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (2 × CH), 119.1 (C), 85.7 (CH), 73.5 (CH₂), 72.7 (CH₂), 65.8 (CH₂), 52.8 (CH), 39.1 (CH₂), 12.0 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI) calculated for C₂₆H₂₈N₅O₂ [M + H⁺] 442.2238; found: 442.2241.

Anal. Calculated for C₂₆H₂₇N₅O₂: C, 70.73%; H, 6.16%; N, 15.86%; found: C, 70.97%; H, 6.29%; N, 15.76%.

(1*R*,5*S*)-5-(6-Amino-purin-9-yl)-3-hydroxymethyl-2-methyl-cyclopent-2-enol ((±)-2b)**(±)-2b****C₁₂H₁₅N₅O₂****M = 261.28 g.mol⁻¹**

A solution of protected carbocyclic nucleoside (±)-**29b** (88.5 mg, 0.20 mmol) in THF (5 mL) was added at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ to a solution of liquid ammonia (10 mL) and sodium metal (100 mg) and the reaction mixture was stirring during 1 h at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. After neutralization with solid NH_4Cl and evaporation of ammonia, solvents were removed *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 50 mg (95 %) of compound (±)-**2b** as a foam.

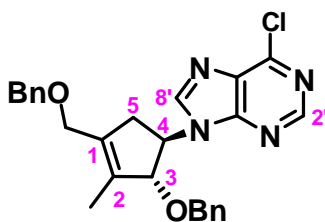
IR (KBr): $\nu = 3382, 3037, 1642, 1056\text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8.11$ (s, 1H, 2'-H), 8.05 (s, 1H, 8'-H), 7.11 (s, 2H, NH₂), 5.07 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, 3-H), 5.01 (br t, $J = 6.8$ Hz, 1H, 4-H), 4.87 (br t, $J = 5.2$ Hz, 1H, OH), 4.39 (br t, $J = 6.8$ Hz, 1H, OH), 4.14-3.93 (m, 2H, O-CH₂-C-1), 2.92-2.76 (m, 2H, 2 x 5-H), 1.69 (s, 3H, CH₃-C-2) ppm. **¹³C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 155.9$ (C), 152.2 (CH), 150.1 (C), 140.6 (CH), 136.6 (C), 133.7 (C), 118.3 (C), 77.3 (CH), 57.0 (CH₂), 53.9 (CH), 37.3 (CH₂), 11.6 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI) calculated for C₁₂H₁₅N₅O₂Na [M + Na⁺] 284.1118; found: 284.1119.

Anal. Calculated for C₁₂H₁₅N₅O₂: C, 55.16%; H, 5.79%; N, 26.80%; found: C, 55.40%; H, 5.86%; N, 26.59%.

9-((1*R*,2*R*)-2-Benzyloxy-4-benzyloxymethyl-3-methyl-cyclopent-3-enyl)-6-chloro-9H-purine ((±)-30)



(±)-30

$C_{26}H_{25}ClN_4O_2$

$M = 460.96 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

DIAD (363 μL , 1.85 mmol, 1.5 equiv) was added dropwise to a solution of Ph_3P (485 mg, 1.85 mmol, 1.5 equiv) in THF (15 mL) under an argon atmosphere at 0 °C. The mixture was stirred for 30 min and then 6-chloropurine (252 mg, 1.63 mmol, 1.5 equiv) was added. The mixture was stirred for an additional 30 min and then a solution of alcohol (±)-**27** (400 mg, 1.23 mmol) in THF (5 mL) was added slowly. The cooling bath was removed and the mixture was stirred at r.t. for 12 h. The solvent was removed *in vacuo*, and the residue was directly purified by column chromatography (silica gel) to afford 425 mg (75 %) of compound (±)-**30** as a foam.

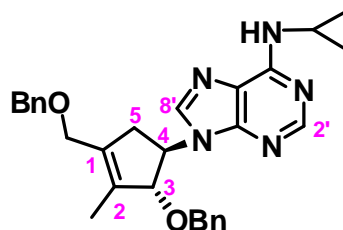
IR (KBr): $\nu = 3058, 3032, 1256, 1046 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.68$ (s, 1H, 2'-H), 7.97 (s, 1H, 8'-H), 7.34-7.28 (m, 5H, H_{Ar}), 7.13-7.06 (m, 5H, H_{Ar}), 5.00 (ddd, $J = 8.5, 6.1, 4.9 \text{ Hz}$, 1H, 4-H), 4.76 (br d, $J = 5.5 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 4.61 and 4.51 (AB, $J = 12.0 \text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.52 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.19 and 4.10 (AB, $J = 12.0 \text{ Hz}$, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-C-1}$), 3.08 (dd, $J = 16.5, 8.5 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 2.91 (br d, $J = 16.5 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 1.79 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C-2}$) ppm. **^{13}C NMR** (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 151.5$ (CH), 151.4 (C), 151.0 (C), 144.2 (CH), 138.0 (C), 137.5 (C), 135.5 (C), 134.2 (C), 132.1 (C), 128.5 (2 \times CH), 128.3 (2 \times CH), 128.0 (CH), 127.9 (2 \times CH), 127.8 (CH), 127.7 (2 \times CH), 90.1 (CH), 72.6 (CH_2), 72.5 (CH_2), 65.7 (CH_2), 60.1 (CH), 37.6 (CH_2), 11.6 (CH_3) ppm.

HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 461.1739; found: 461.1735.

Anal. Calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}$: C, 67.75%; H, 5.47%; N, 12.15%; found: C, 70.06%; H, 5.41%; N, 12.52%.

[9-((1*R*,2*R*)-2-Benzoyloxy-4-benzylloxymethyl-3-methyl-cyclopent-3-enyl)-9H-purin-6-yl]-cyclopropyl-amine **((±)-31a)**



((±)-31a

C₂₉H₃₁N₅O₂

M = 481.59 g.mol⁻¹

To an ice-cold solution of purine ((±)-**30**) (230 mg, 0.5 mmol) in MeOH (5 mL) was added cyclopropylamine (1 mL, 14.4 mmol), and the resulting mixture was stirred at r.t. for 12 h. After concentration *in vacuo*, column chromatography (silica gel) of the residue gave 218 mg (91 %) of compound ((±)-**31a**) as a foam.

IR (KBr): $\nu = 3288, 3061, 1226, 1045 \text{ cm}^{-1}$.

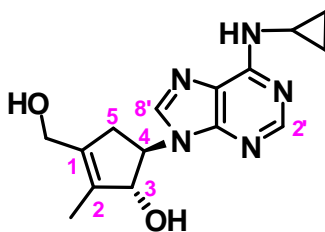
¹H NMR (300 MHz, MeOH-*d*₄): $\delta = 8.23$ (s, 1H, 2'-H), 7.93 (s, 1H, 8'-H), 7.29-7.21 (m, 5H, H_{Ar}), 7.07-6.99 (m, 5H, H_{Ar}), 4.99-4.82 (m, 2H, 4-H, 3-H, partially overlapped with DOH), 4.46 (s, 4H, 2 x CH₂-C₆H₅), 4.13 and 4.07 (AB, $J = 12.1$ Hz, 2H, O-CH₂-C-1), 2.95 (dd, $J = 16.0, 7.3$ Hz, 1H, 5-H), 2.78 (br d, $J = 16.0$ Hz, 1H, 5-H), 1.74 (s, 3H, CH₃-C-2), 1.23 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, CH-NH), 0.91-0.84 (m, 2H, H_{cyclopropyl}), 0.66-0.61 (m, 2H, H_{cyclopropyl}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, MeOH-*d*₄): $\delta = 156.9$ (C), 153.3 (CH), 149.7 (C), 141.0 (CH), 139.5 (C), 139.1 (C), 137.0 (C), 134.8 (C), 129.4 (2 x CH), 129.0 (2 x CH), 128.9 (4 x CH), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 120.9 (C), 91.3 (CH), 73.2 (CH₂), 73.1 (CH₂), 66.6 (CH₂), 61.2 (CH), 38.8 (CH₂), 24.5 (CH), 11.6 (CH₃), 7.7 (2 x CH₂) ppm.

HRMS (ESI) calculated for C₂₉H₃₂N₅O₂ [M + H⁺] 482.2551; found: 482.2554.

Anal. Calculated for C₂₉H₃₁N₅O₂: C, 72.33%; H, 6.49%; N, 14.54%; found: C, 72.68%; H, 6.57%; N, 14.33%.

(1*R*,5*R*)-5-(6-Cyclopropylamino-purin-9-yl)-3-hydroxymethyl-2-methyl-cyclopent-2-enol **((±)-3a)**



((±)-3a

C₁₅H₁₉N₅O₂

M = 301.34 g.mol⁻¹

A solution of protected carbocyclic nucleoside (±)-**31a** (100 mg, 0.20 mmol) in THF (5 mL) was added at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ to a solution of liquid ammonia (10 mL) and sodium metal (100 mg) and the reaction mixture was stirring during 1 h at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. After neutralization with solid NH_4Cl and evaporation of ammonia, solvents were removed *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 44 mg (72 %) of compound (±)-**3a** as a foam.

IR (KBr): $\nu = 3381, 3276, 1036\text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): $\delta = 8.27$ (s, 1H, 2'-H), 8.13 (s, 1H, 8'-H), 5.02 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, 3-H), 4.77 (ddd, $J = 13.5, 7.8, 6.3$ Hz, 1H, 4-H), 4.25 and 4.19 (AB, $J = 12.5$ Hz, 2H, O-CH₂-C-1), 3.09-2.86 (m, 3H, 2 x 5-H, CH-NH), 1.79 (s, 3H, CH₃-C-2), 1.28 (s, 1H, NH), 0.87 (m, 2H, H_{cyclopropyl}), 0.65 (m, 2H, H_{cyclopropyl}) ppm.

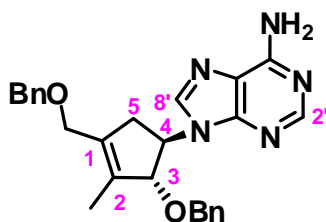
¹³C NMR (75 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): $\delta = 157.1$ (C), 153.3 (CH), 150.2 (C), 141.5 (CH), 136.3 (C), 136.0 (C), 121.1 (C), 84.3 (CH), 64.3 (CH), 58.9 (CH₂), 37.4 (CH₂), 24.5 (CH), 10.9 (CH₃), 7.6 (2 x CH₂) ppm.

HRMS (ESI) calculated for C₁₅H₂₀N₅O₂ [M + H⁺] 302.1612; found: 302.1609.

Anal. Calculated for C₁₅H₁₉N₅O₂: C, 59.79%; H, 6.36%; N, 23.24%; found: C, 60.13%; H, 6.27%; N, 22.99%.

9-((1*R*,2*R*)-2-Benzoyloxy-4-benzoyloxymethyl-3-methyl-cyclopent-3-enyl)-9H-purin-6-ylamine

((±)-31b)



((±)-31b

C₂₆H₂₇N₅O₂

M = 441.52 g.mol⁻¹

A stirred solution of purine ((±)-**30**) (150 mg, 0.33 mmol) in MeOH (7 mL) saturated with NH₃ was heated at 100 °C for 24 h in a Parr stainless steel sealed reaction vessel. After concentration *in vacuo*, column chromatography (silica gel) of the residue gave 105 mg (73 %) of compound ((±)-**31b**) as a foam.

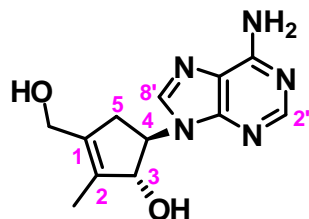
IR (KBr): $\nu = 3326, 3052, 1629, 1061 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.38$ (s, 1H, 2'-H), 7.73 (s, 1H, 8'-H), 7.40-7.25 (m, 5H, H_{Ar}), 7.20-7.09 (m, 5H, H_{Ar}), 6.55 (s, 2H, NH₂), 5.05 (dt, $J = 9.4, 5.1$ Hz, 1H, 4-H), 4.75 (br s, 1H, 3-H), 4.62 and 4.54 (AB, $J = 12.1$, 2H, CH₂-C₆H₅, partially overlapped), 4.53 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 4.20 and 4.10 (AB, $J = 12.1$ Hz, 2H, O-CH₂-C-1), 3.11 (dd, $J = 16.8, 8.5$ Hz, 1H, 5-H), 2.91 (br d, $J = 16.8$ Hz, 1H, 5-H), 1.77 (s, 3H, CH₃-C-2) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 155.9$ (C), 152.7 (CH), 149.6 (C), 139.1 (CH), 138.1 (C), 137.8 (C), 135.4 (C), 134.5 (C), 128.5 (2 × CH), 128.3 (2 × CH), 127.9 (2 × CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.7 (2 × CH), 120.3 (C), 91.0 (CH), 72.4 (CH₂), 72.2 (CH₂), 65.8 (CH₂), 59.1 (CH), 38.2 (CH₂), 11.6 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI) calculated for C₂₆H₂₈N₅O₂ [M + H⁺] 442.2238; found: 442.2232.

Anal. Calculated for C₂₆H₂₇N₅O₂: C, 70.73%; H, 6.16%; N, 15.86%; found: C, 80.01%; H, 6.32%; N, 15.46%.

(1*R*,5*R*)-5-(6-Amino-purin-9-yl)-3-hydroxymethyl-2-methyl-cyclopent-2-enol ((±)-3b)**(±)-3b****C₁₂H₁₅N₅O₂****M = 261.28 g.mol⁻¹**

A solution of protected carbocyclic nucleoside (±)-**31b** (88.5 mg, 0.20 mmol) in THF (5 mL) was added at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ to a solution of liquid ammonia (10 mL) and sodium metal (100 mg) and the reaction mixture was stirring during 1 h at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. After neutralization with solid NH_4Cl and evaporation of ammonia, solvents were removed *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel) to afford 47 mg (89 %) of compound (±)-**3b** as a foam.

IR (KBr): $\nu = 3382, 3021, 1647, 1049\text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.18$ (s, 1H, 2'-H), 8.13 (s, 1H, 8'-H), 7.22 (s, 2H, NH_2), 5.47 (d, $J = 6.4\text{ Hz}$, 1H, 3-H), 4.96 (br s, 1H, OH), 4.73 (br s, 1H, OH), 4.63 (q, $J = 6.7\text{ Hz}$, 1H, 4-H), 4.03 (s, 2H, O- CH_2 -C-1), 2.85-2.75 (m, 2H, 2 x 5-H), 1.67 (s, 3H, CH_3 -C-2) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 156.1$ (C), 152.1 (CH), 149.6 (C), 140.5 (CH), 134.4 (C), 134.0 (C), 119.5 (C), 81.6 (CH), 62.7 (CH), 57.3 (CH_2), 36.1 (CH_2), 10.8 (CH_3) ppm.

HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_2\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}^+$] 284.1118; found: 284.1119.

Anal. Calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_2$: C, 55.16%; H, 5.79%; N, 26.80%; found: C, 54.77%; H, 5.73%; N, 27.01%.

III. Tests d'activité anti VIH (Rega Institute, Leuven, Belgique)

Evaluation of the antiviral activity of compounds (\pm)-**1a-b**, (\pm)-**2a-b** and (\pm)-**3a-b** against HIV-1 strain III_B and HIV-2 strain (ROD) in MT-4 cells was performed using the MTT assay as previously described.⁹³ Stock solutions ($10 \times$ final concentration) of test compounds were added in 25 μ L volumes to two series of triplicate wells to allow the simultaneous evaluation of their effects on mock- and HIV-infected cells at the beginning of each experiment. Serial five-fold dilutions of test compounds were made directly in flat-bottomed 96-well microtiter trays using a Biomek 3000 robot (Beckman instruments, Fullerton, CA). Untreated control mock- and HIV-infected cell samples were included for each sample. HIV-1 (III_B)⁹⁴ or HIV-2 (ROD)⁹⁵ stock (50 μ L) at 100–300 CCID₅₀ (50% cell culture infectious dose) and culture medium was added to the infected and mock-infected wells of the microtiter tray, respectively. Mock-infected cells were used to evaluate the cytotoxicity of the test compound. Exponentially growing MT-4 cells⁹⁶ were centrifuged for 5 min at 1000 rpm, and the supernatant was discarded. The MT-4 cells were resuspended at 6×10^5 cells per mL and were transferred to the microtiter tray wells in 50 μ L volumes. Five days after infection, the viability of the mock- and HIV-infected cells was examined spectrophotometrically by the MTT assay. The MTT assay is based on the reduction of yellow-colored 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Acros Organics, Geel, Belgium) by mitochondrial dehydrogenase of metabolically active cells to a blue-purple formazan that can be measured spectrophotometrically. The absorbances were read in an eight-channel computer-controlled photometer (Multiscan Ascent Reader, Labsystems, Helsinki, Finland) at two wavelengths (540 and 690 nm). All data were calculated using the median OD (optical density) value of three wells. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was defined as the concentration of the test compound that reduced the absorbance (OD₅₄₀) of the mock-infected control sample by 50%. The concentration achieving 50% protection from the cytopathic effect of the virus in infected cells was defined as the 50% effective concentration (EC₅₀).

⁹³ Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, R.; Schols, D.; Herdewijn, P.; Desmyter, J.; De Clercq, E. *J. Virol. Methods* **1988**, *20*, 309.

⁹⁴ Popovic, M.; Sarngadharan, M. G.; Read, E.; Gallo, R. C. *Science* **1984**, *224*, 497.

⁹⁵ Barrè-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Grest, J.; Dautet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. *Science* **1983**, *220*, 868.

⁹⁶ Miyoshi, I.; Taguchi, H.; Kobonishi, I.; Yoshimoto, S.; Ohtsuki, Y.; Shiraiishi, Y.; Akagi, T. *Gann Monogr.* **1982**, *28*, 219.

Compound	HIV-1 (III _B) EC ₅₀ (μg/mL) ^{a, c}	HIV-2 (ROD) EC ₅₀ (μg/mL) ^{b, c}	CC ₅₀ (μg/mL) ^{b, c}	SI ^d (III _B)	SI (ROD)
(±)- 1a	>125	>125	>125	-	-
(±)- 1b	>125	>125	>125	-	-
(±)- 2a	>125	>125	>125	-	-
(±)- 2b	>125	>125	>125	-	-
(±)- 3a	>125	>125	>125	-	-
(±)- 3b	>92.6	>92.6	92.6±9.4	<1	<1
AZT	0.0022±0.0011	0.00094±0.00049	>25	>11364	>26596
d4T	0.061±0.006	0.038±0.015	>20	>328	>526
ddI	2.09±0.68	3.78±1.22	>50	>24	>13
Abacavir	1.70±0.21	2.71±0.64	>20	>12	>7

Table 2 : Anti-HIV-1 and HIV-2 Activity (EC₅₀ in μg/mL) and Cytotoxicity of compounds (±)-1a-b, (±)-2a-b and (±)-3a-b in MT-4 cells.

^aEC₅₀: concentration of compound required to achieve 50% protection of MT-4 cells from HIV induced cytopathogenicity, as determined by the MTT method.

^bCC₅₀: concentration of compound that reduces the viability of mock-infected cells by 50%, as determined by the MTT method.

^cDatas represent mean values ± standard deviations for at least two separate experiments.

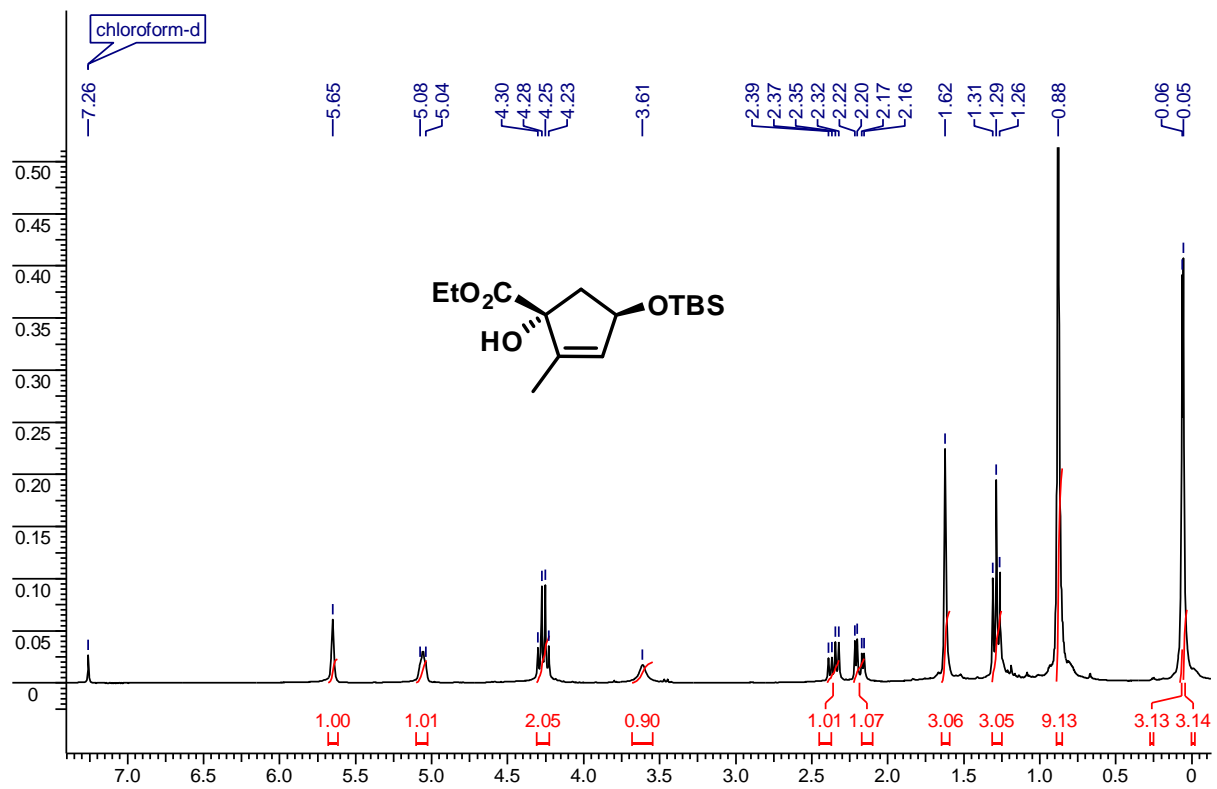
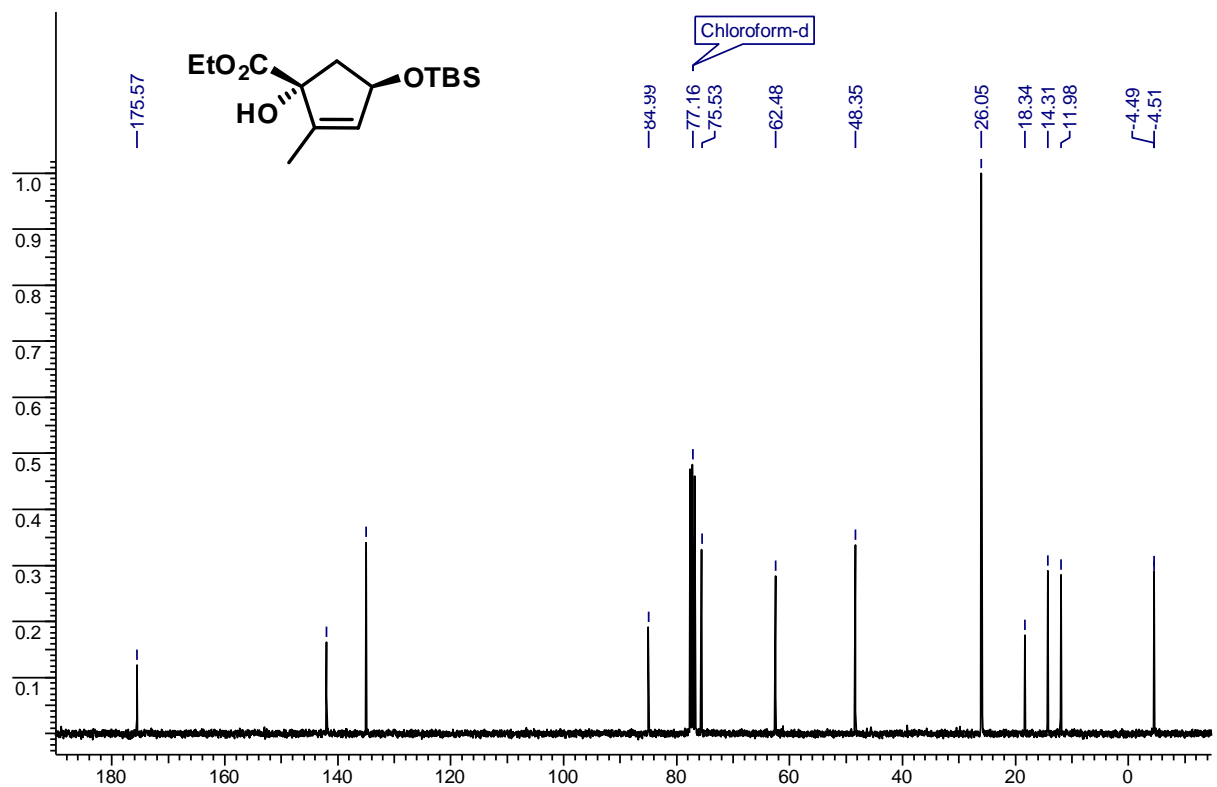
^dSI: Selectivity index = 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) / 50% effective concentration (EC₅₀).

ANNEXE :

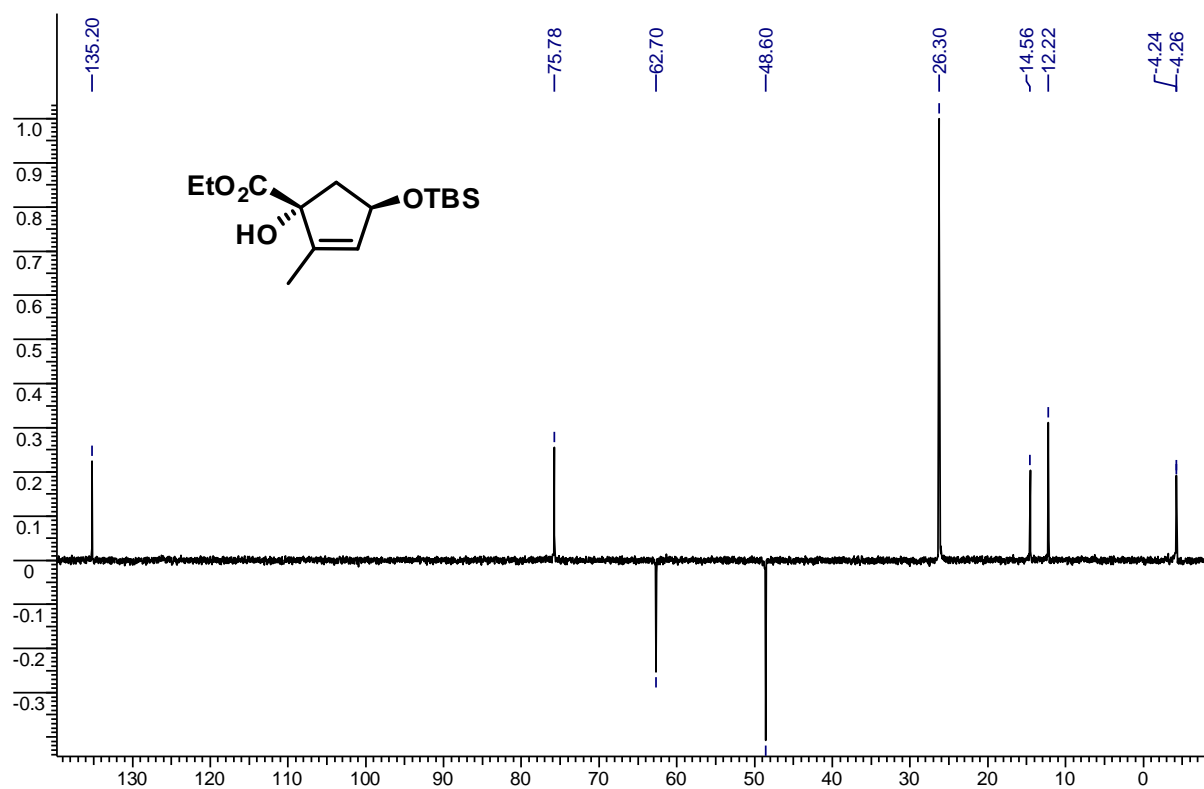
SPECTRES RMN

SPECTRES HMQC

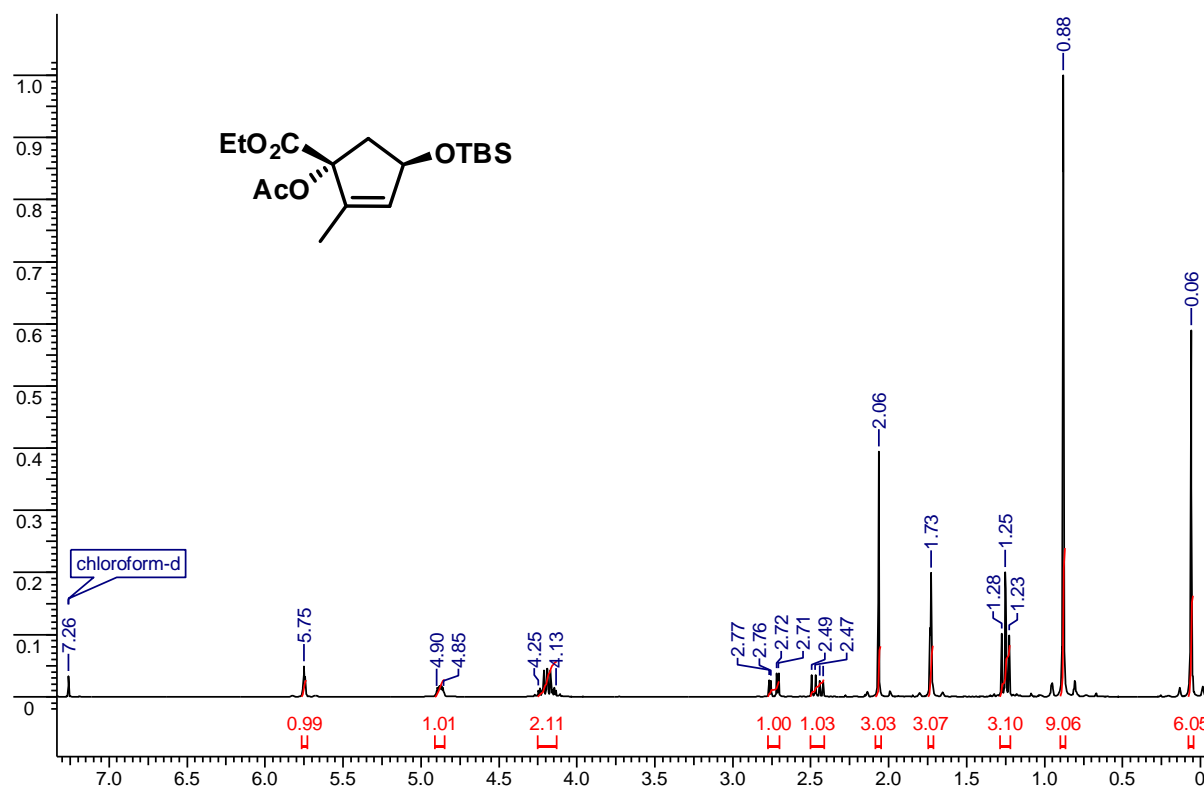
SPECTRES DE MASSE

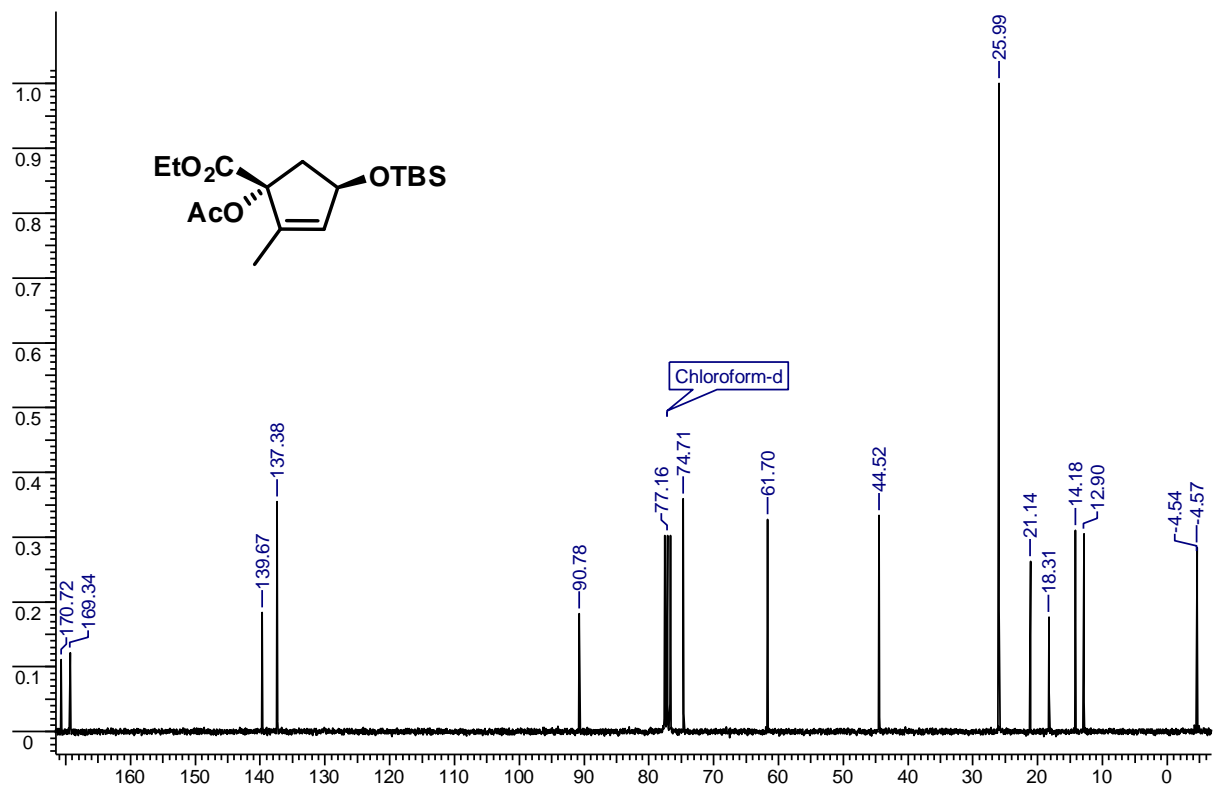
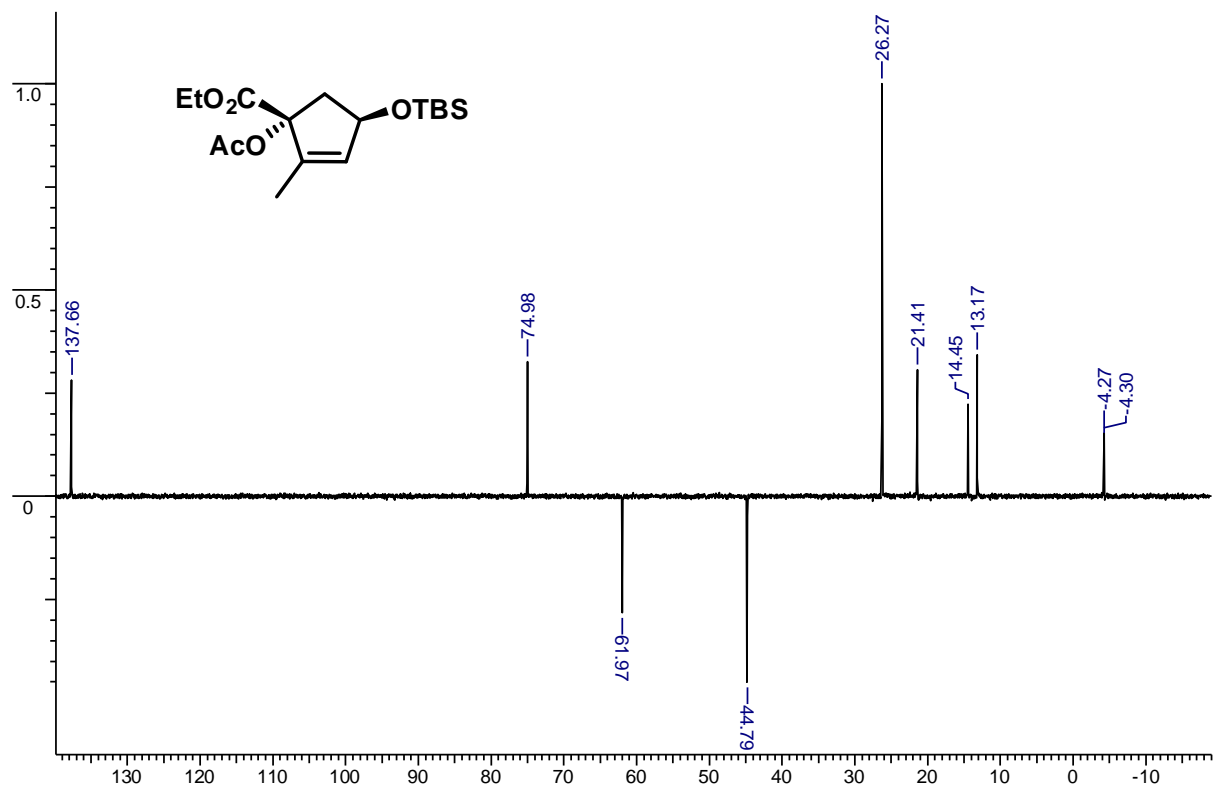
RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**10**RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**10**

DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (±)-10

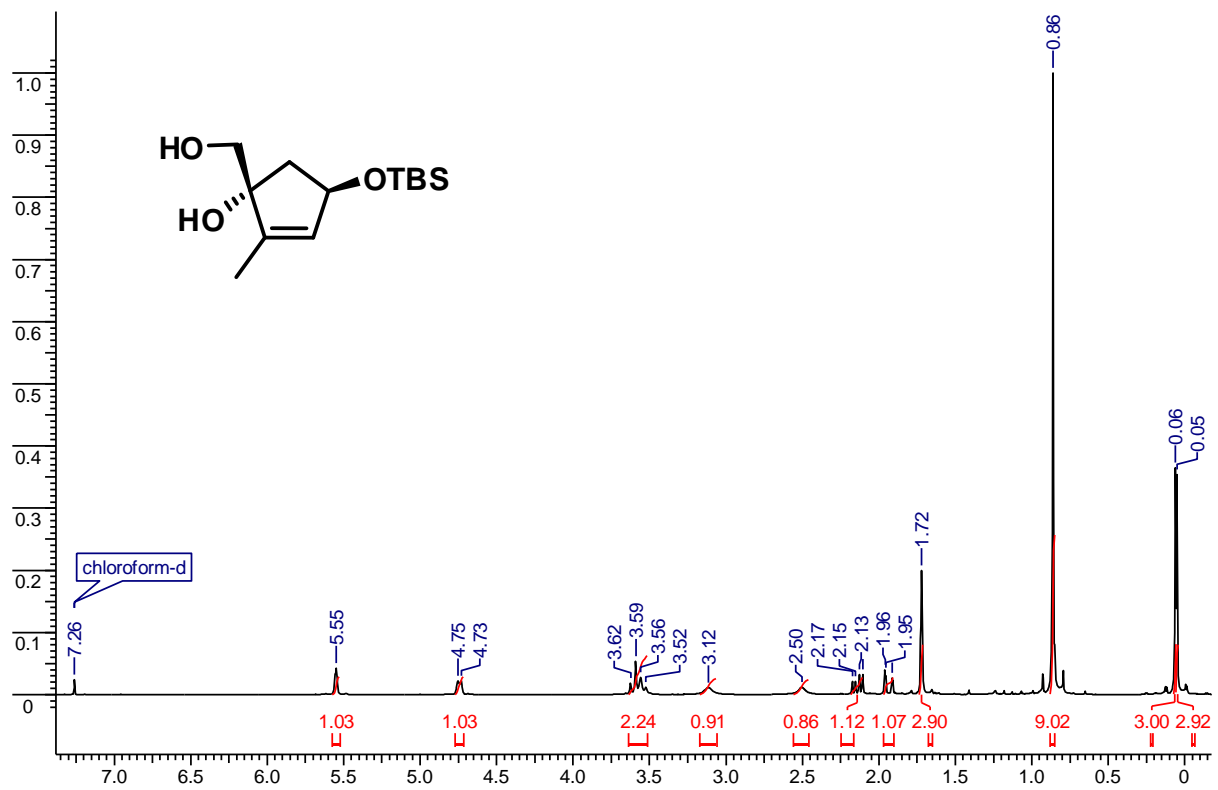


RMN ¹H 300 MHz solvant : chloroforme composé (±)-11

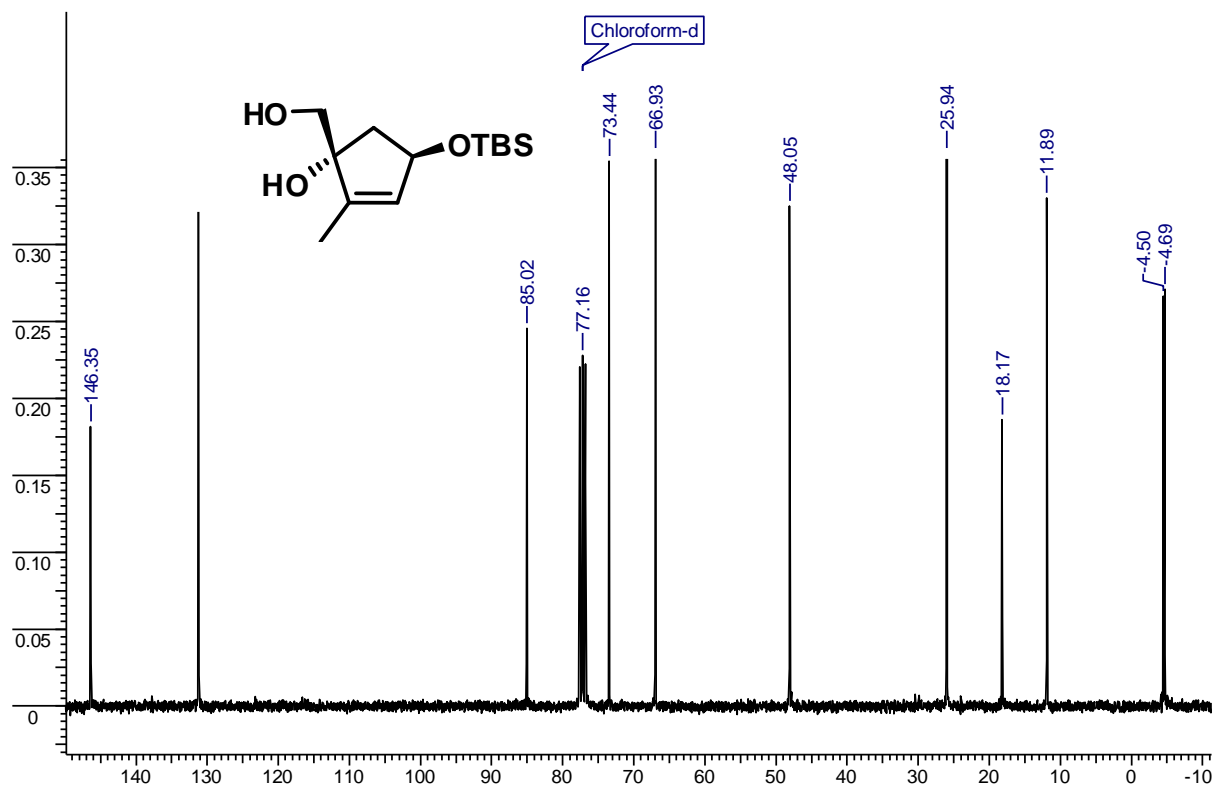


RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**11**DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**11**

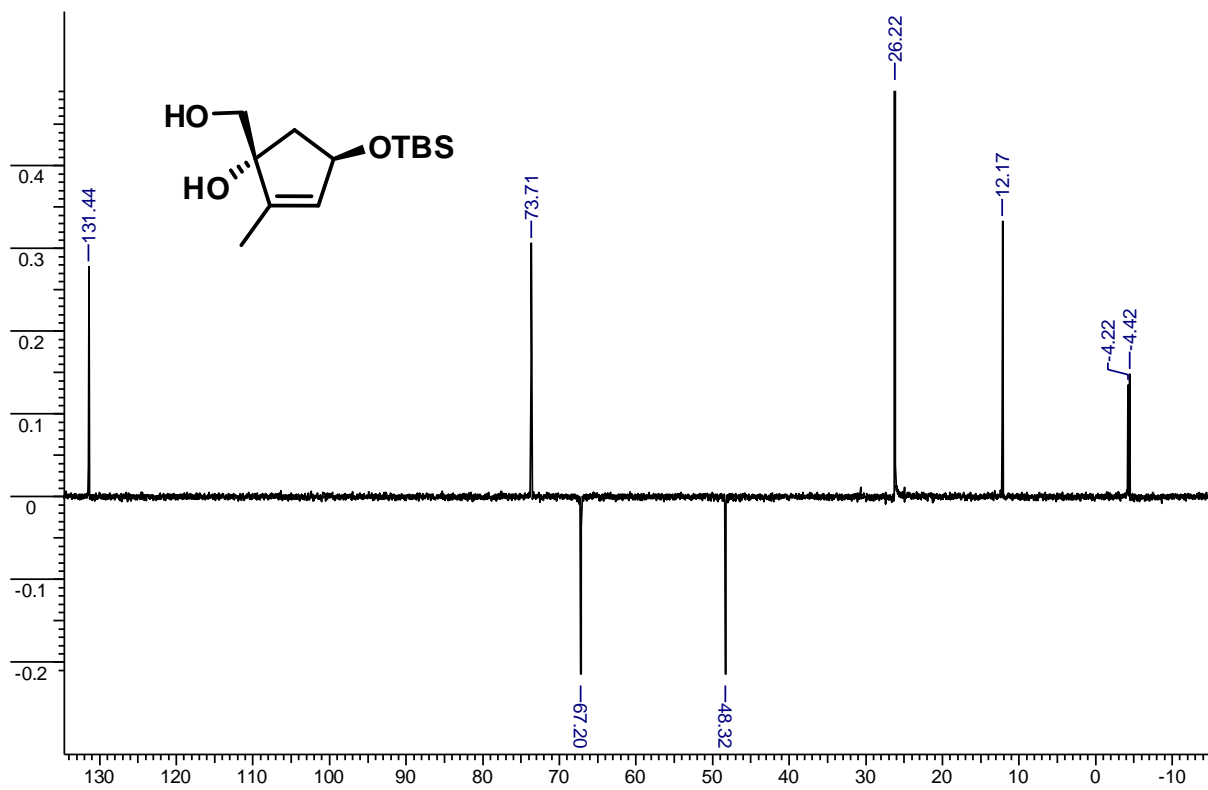
RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**12**



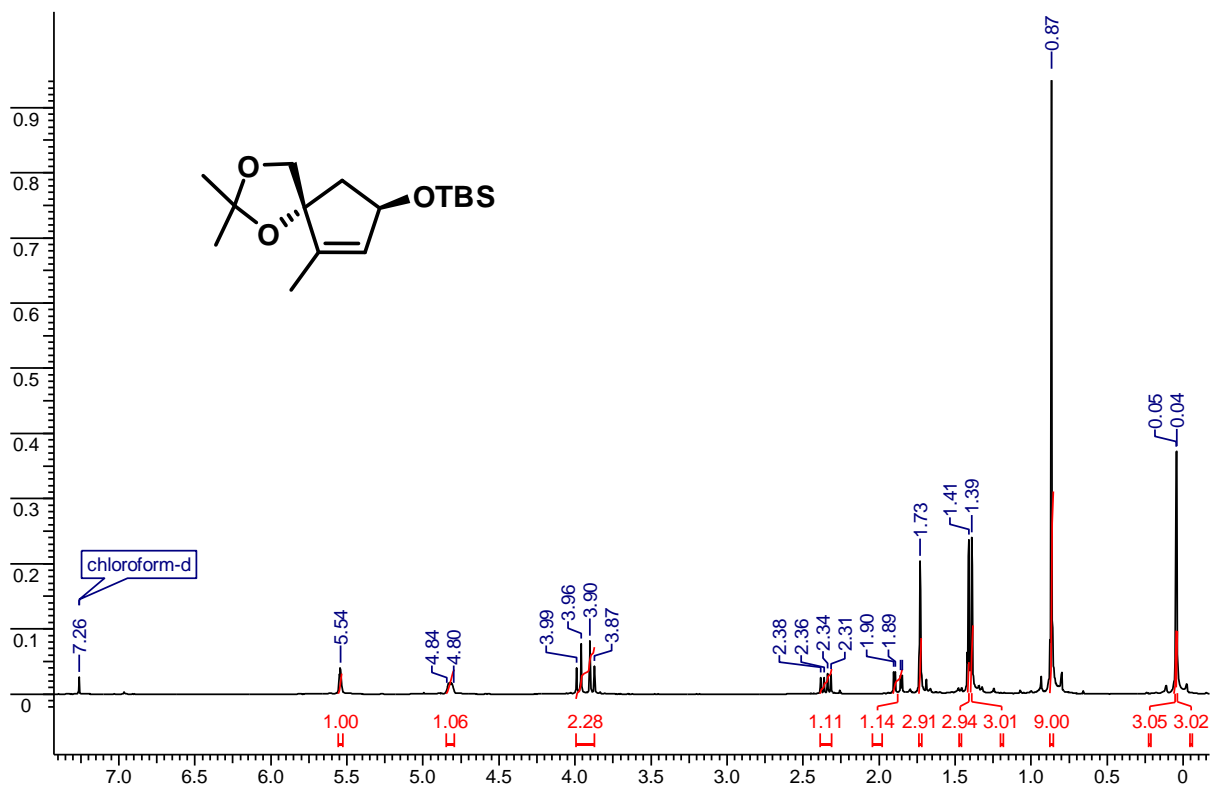
RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**12**

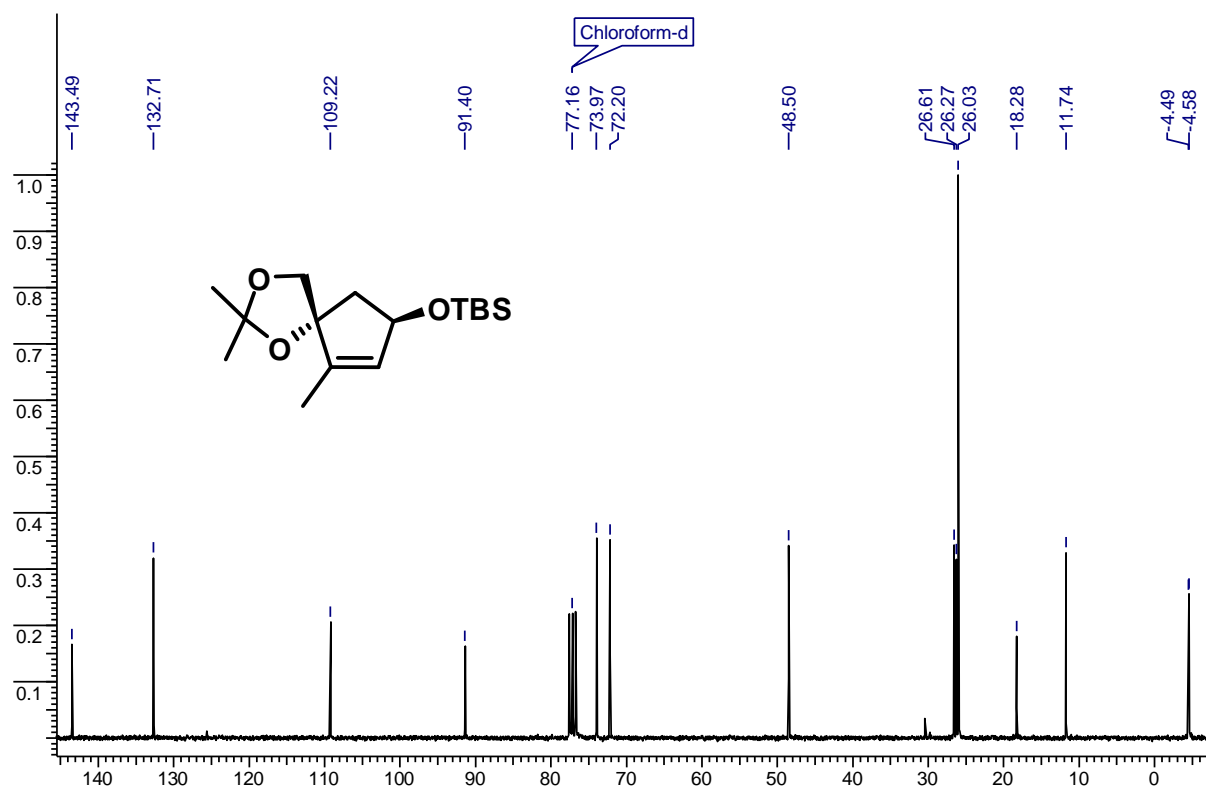
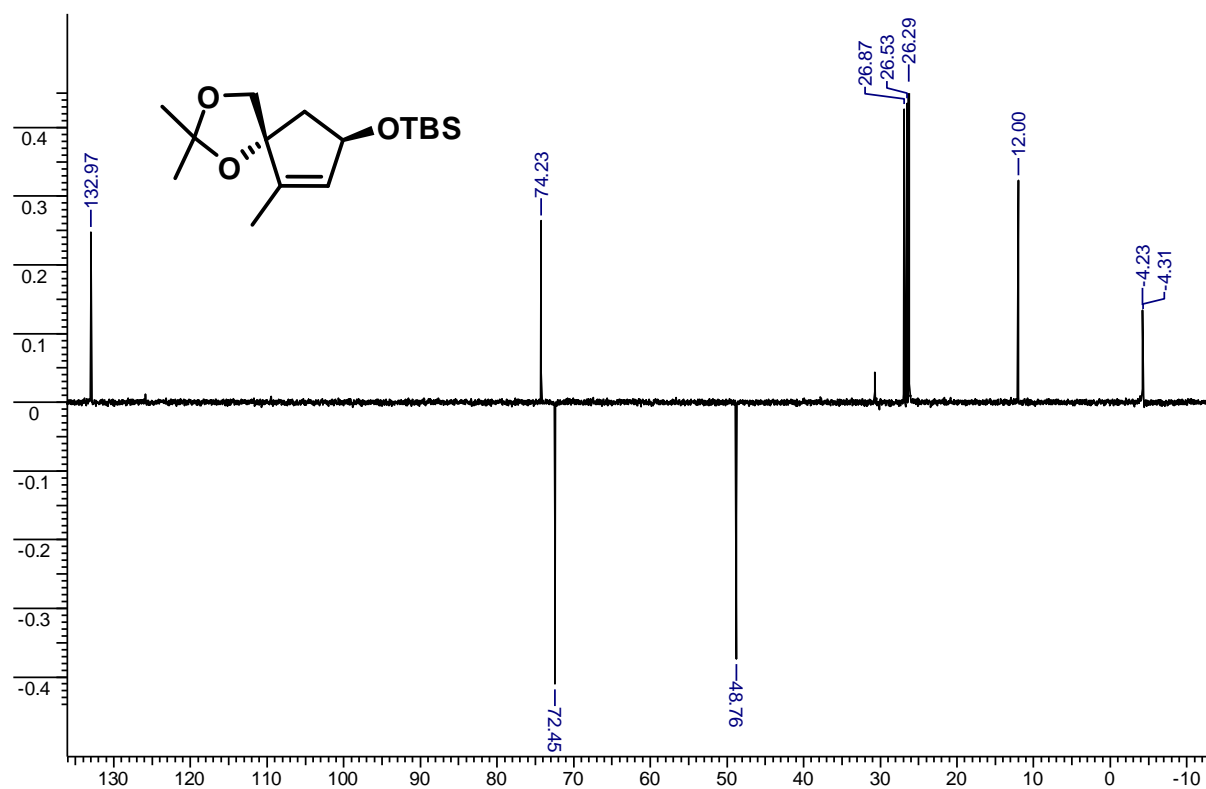


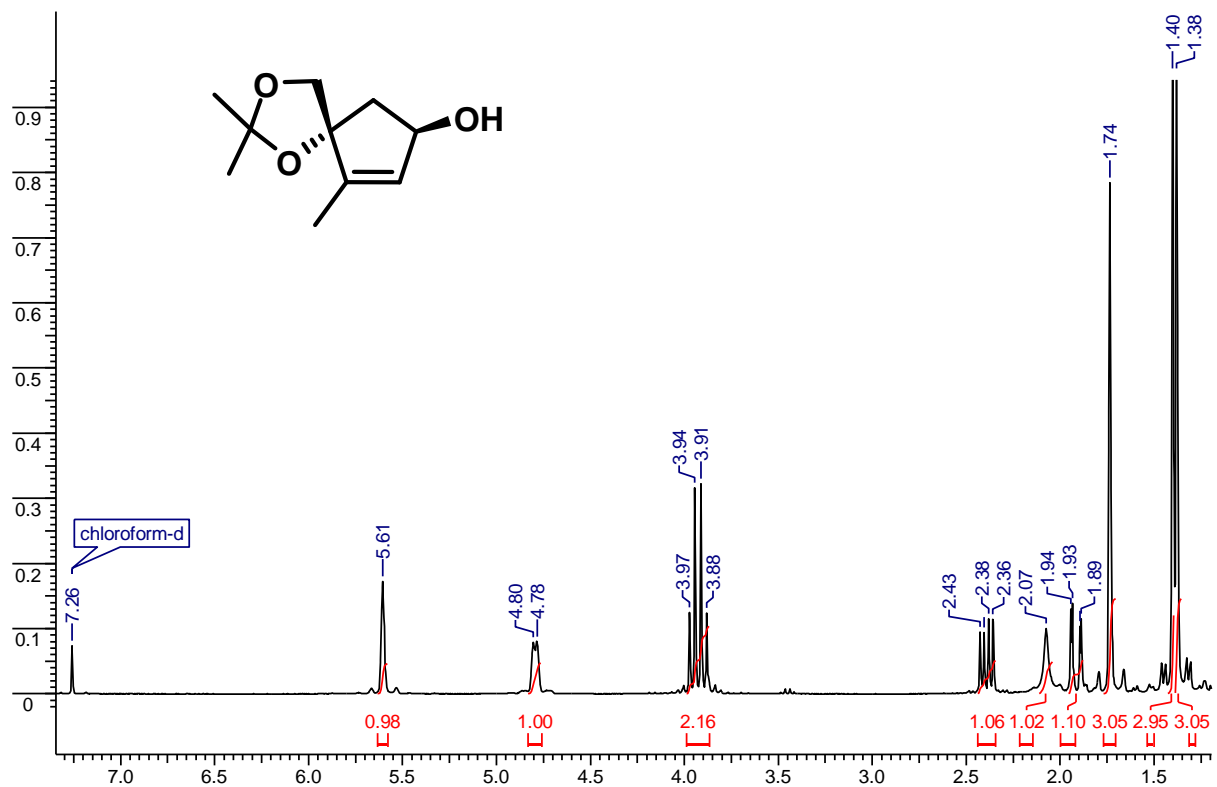
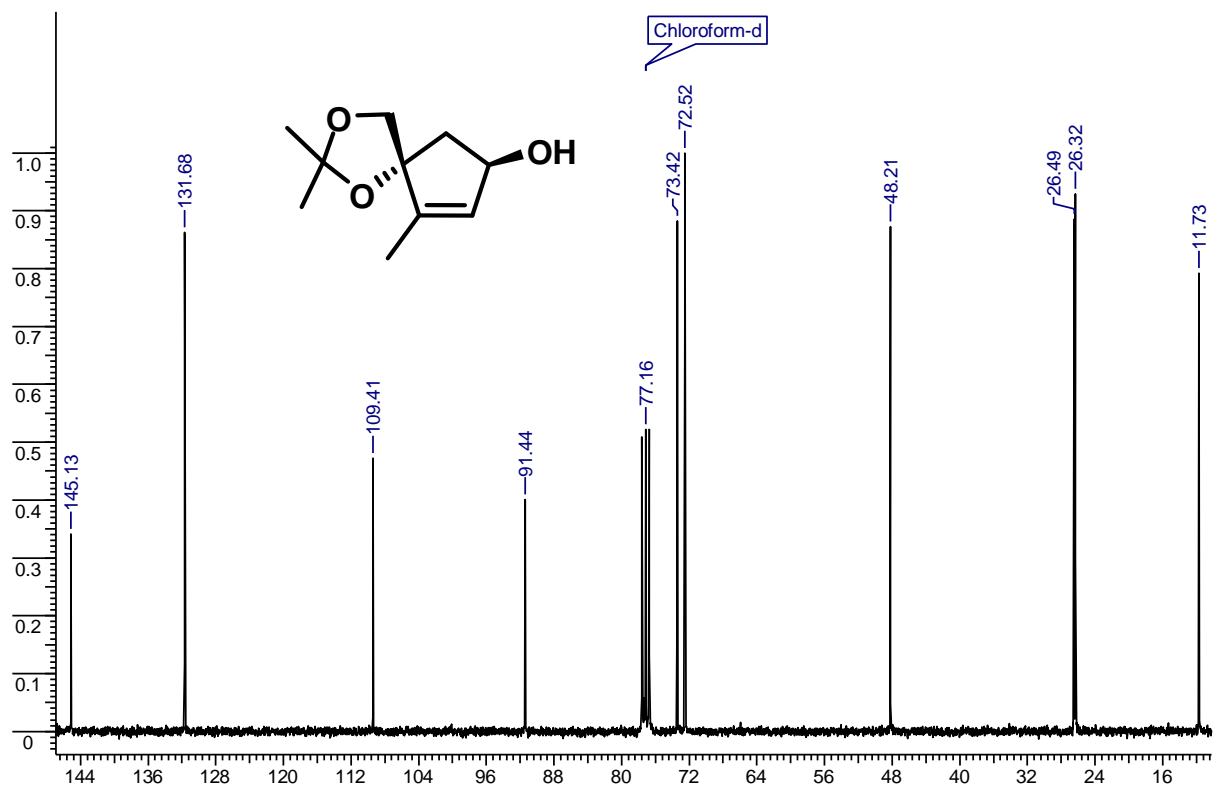
DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (±)-**12**



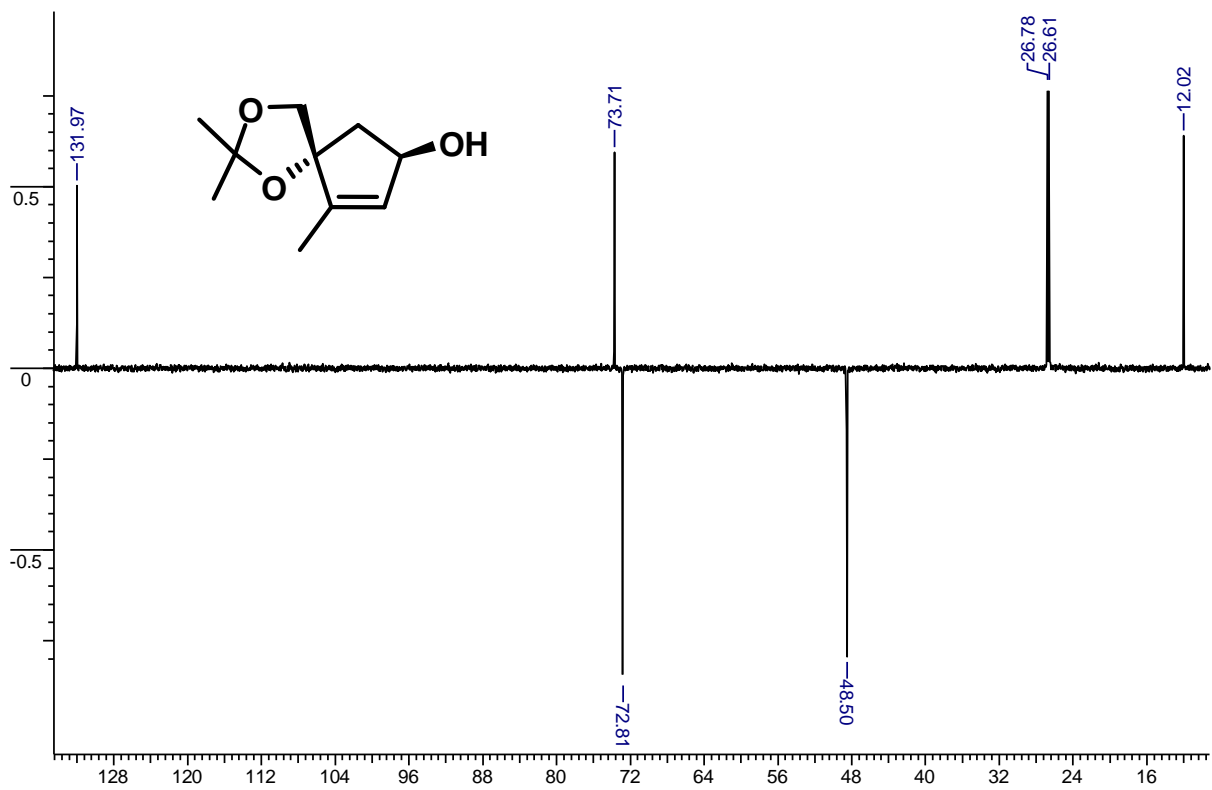
RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (±)-**13**



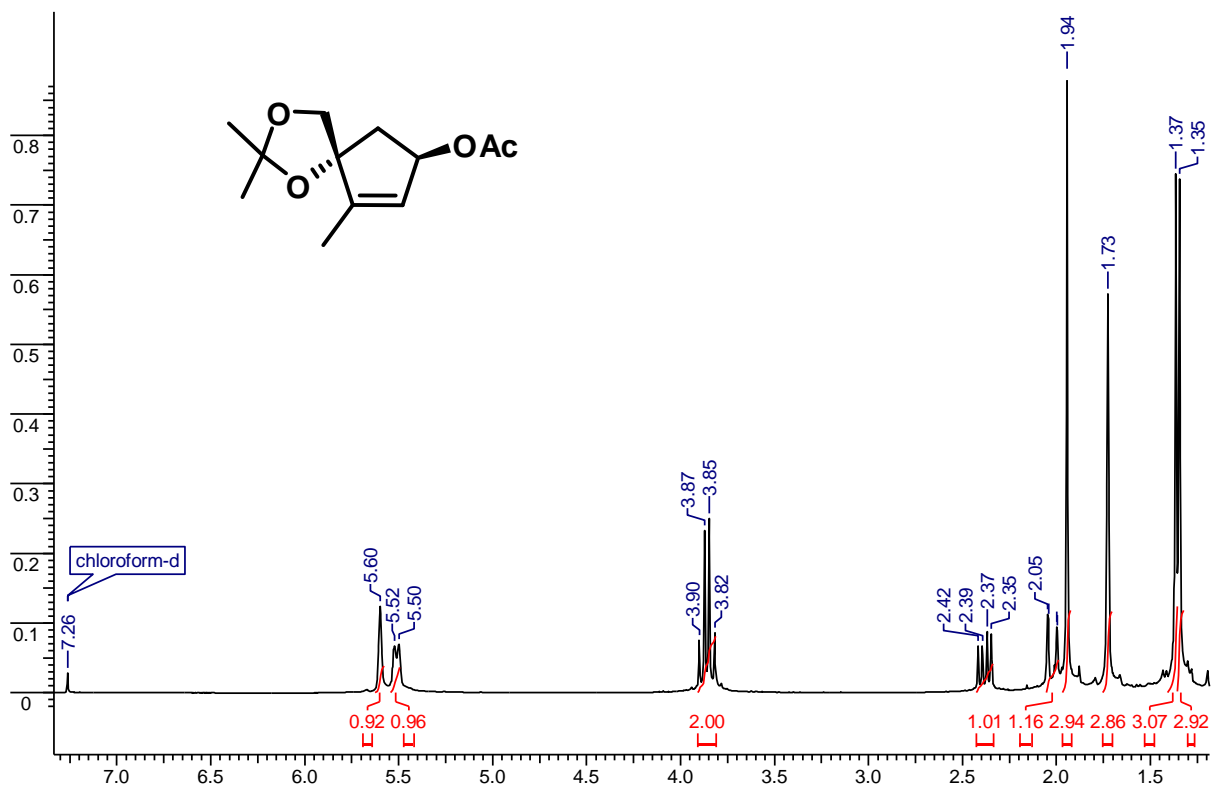
RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**13**DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**13**

RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-14RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-14

DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (±)-**14**



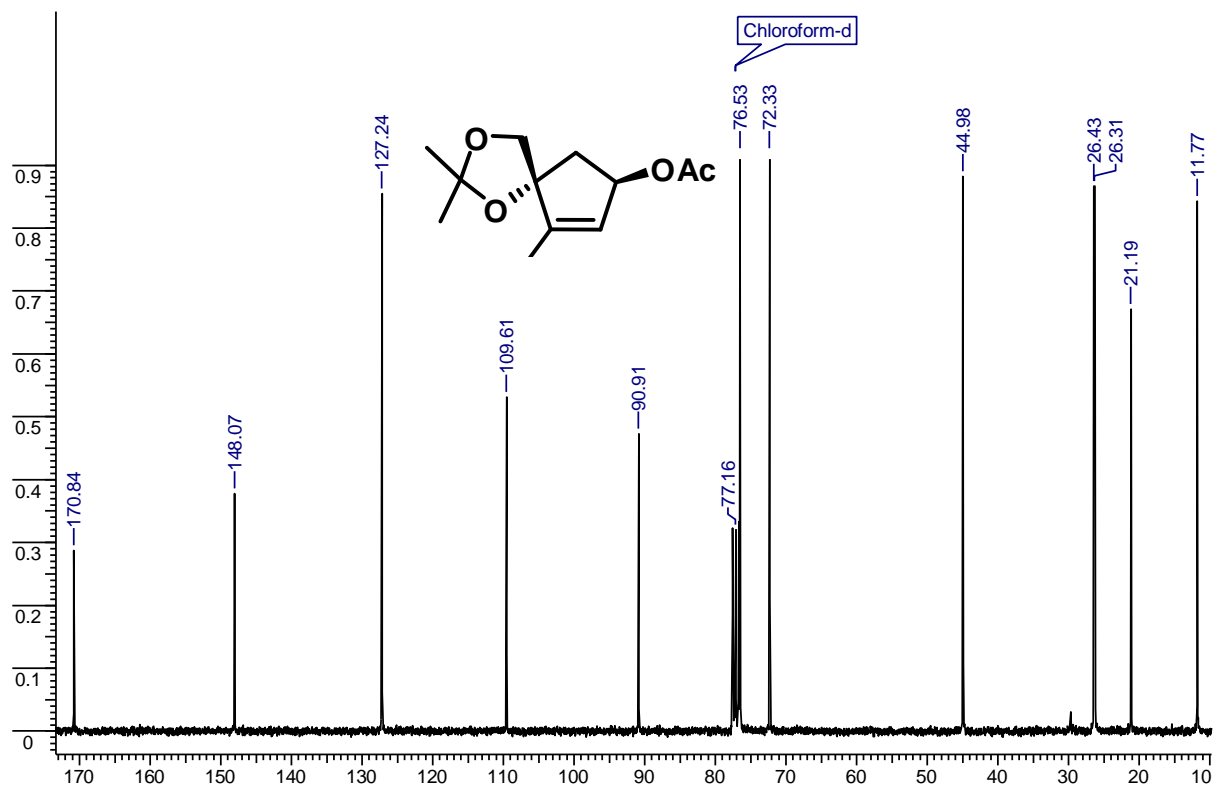
RMN ¹H 300 MHz solvant : chloroforme composé (±)-**15**



RMN ^{13}C

75 MHz

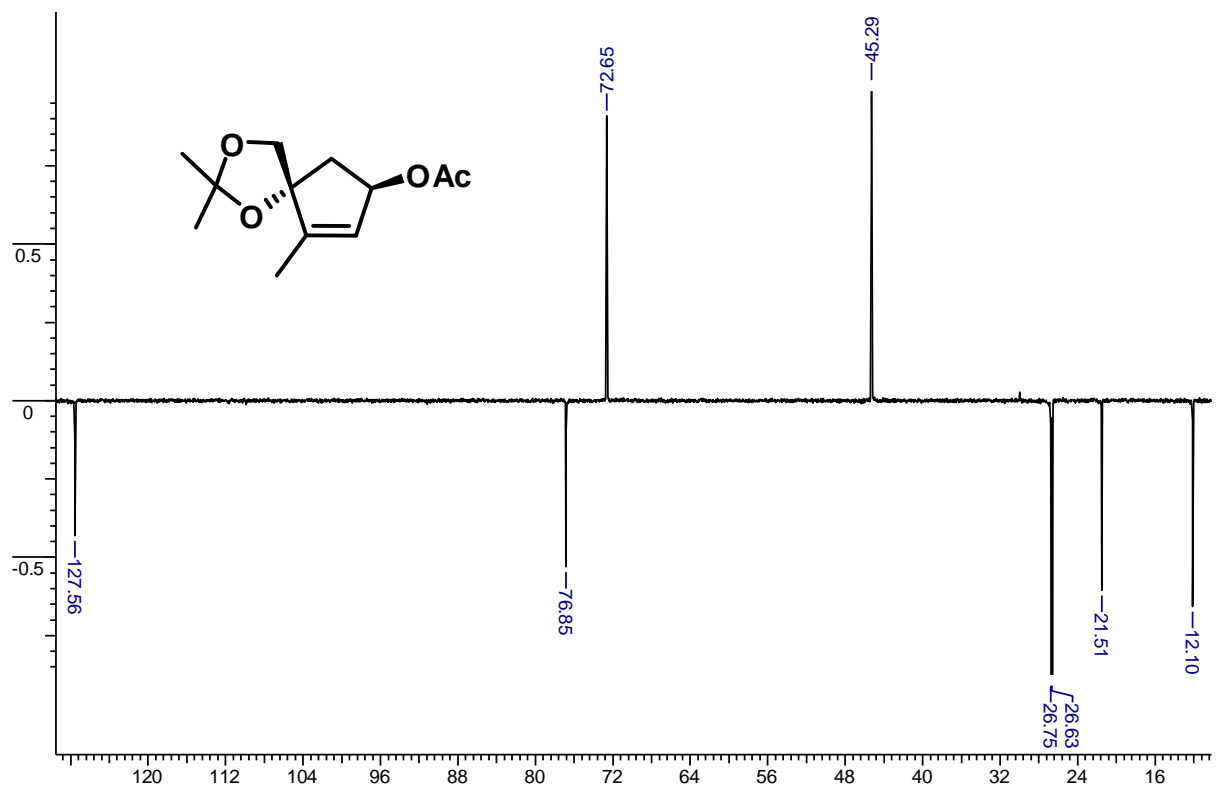
solvant : chloroforme

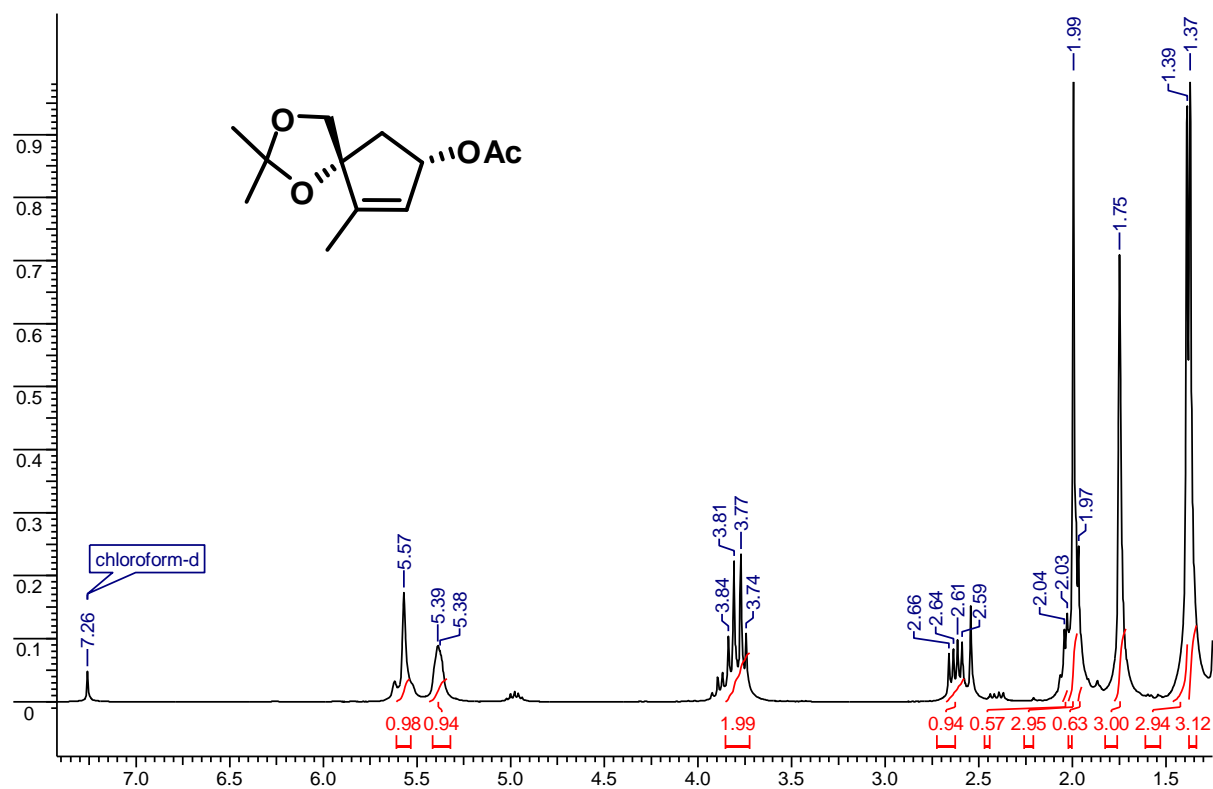
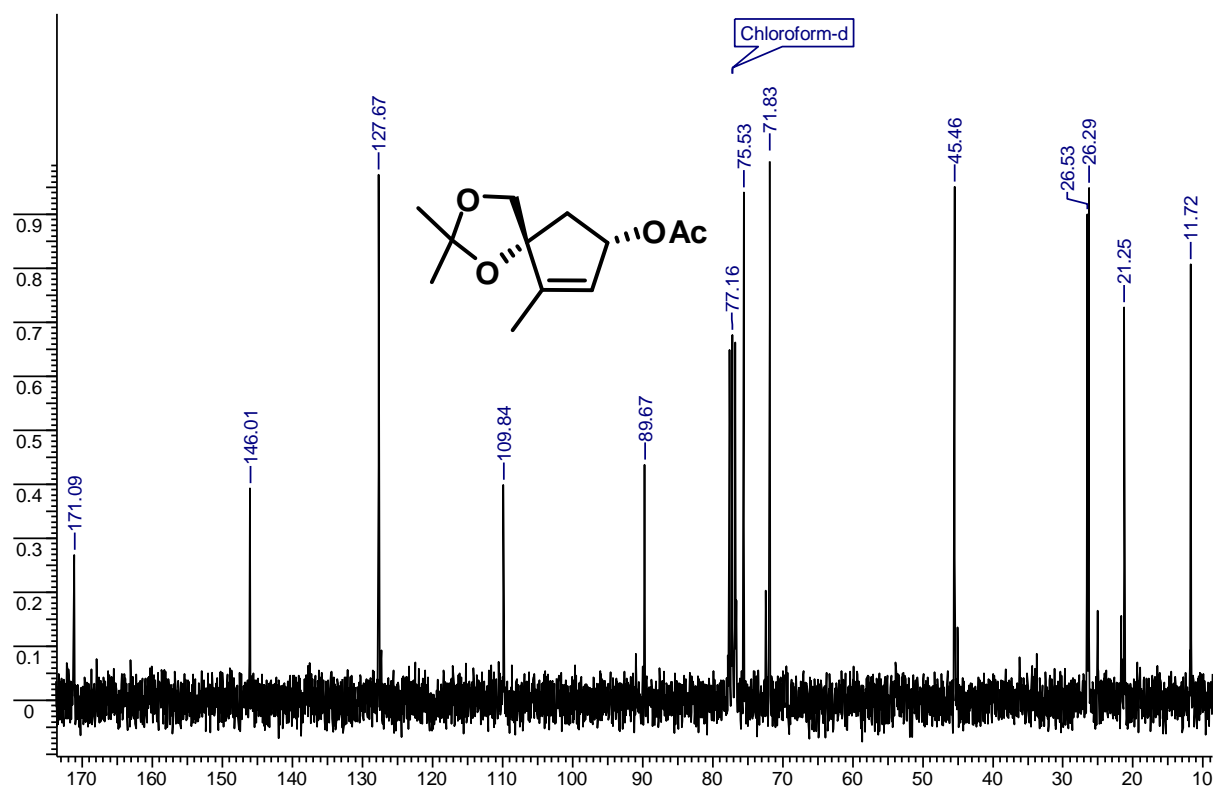
composé (\pm)-15

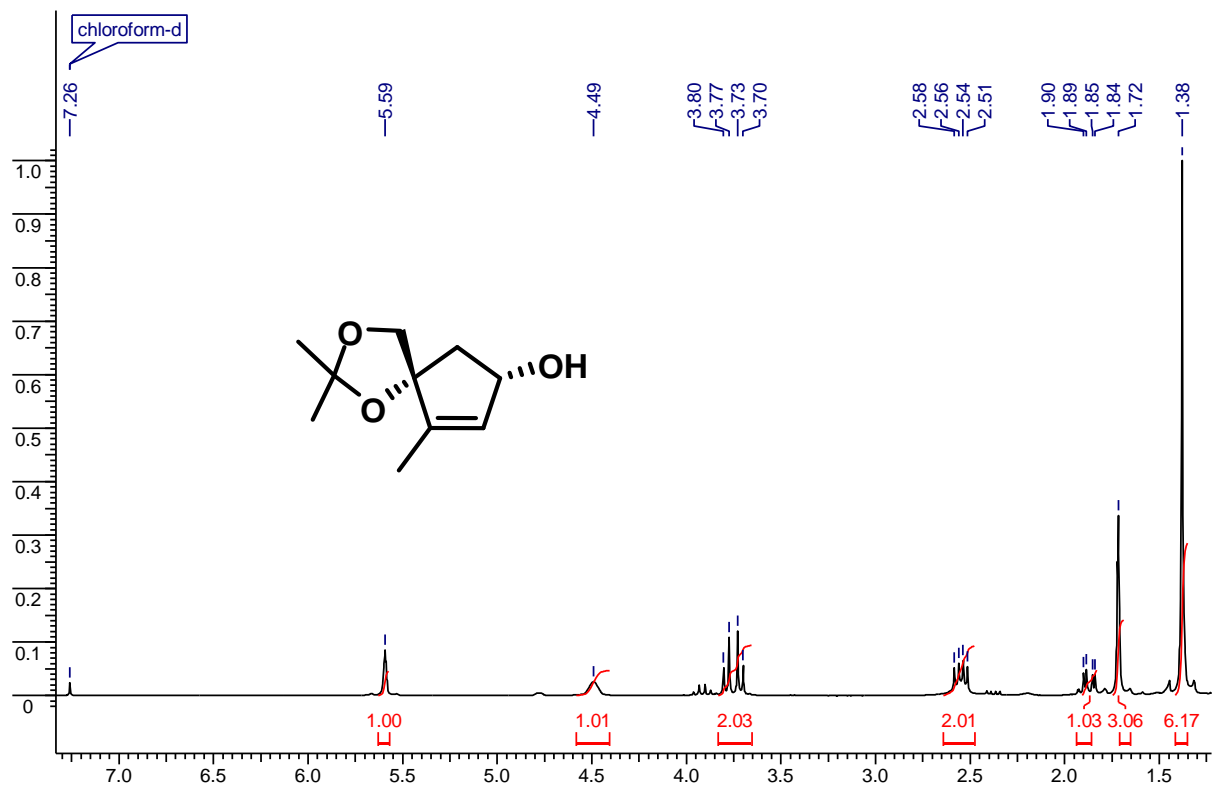
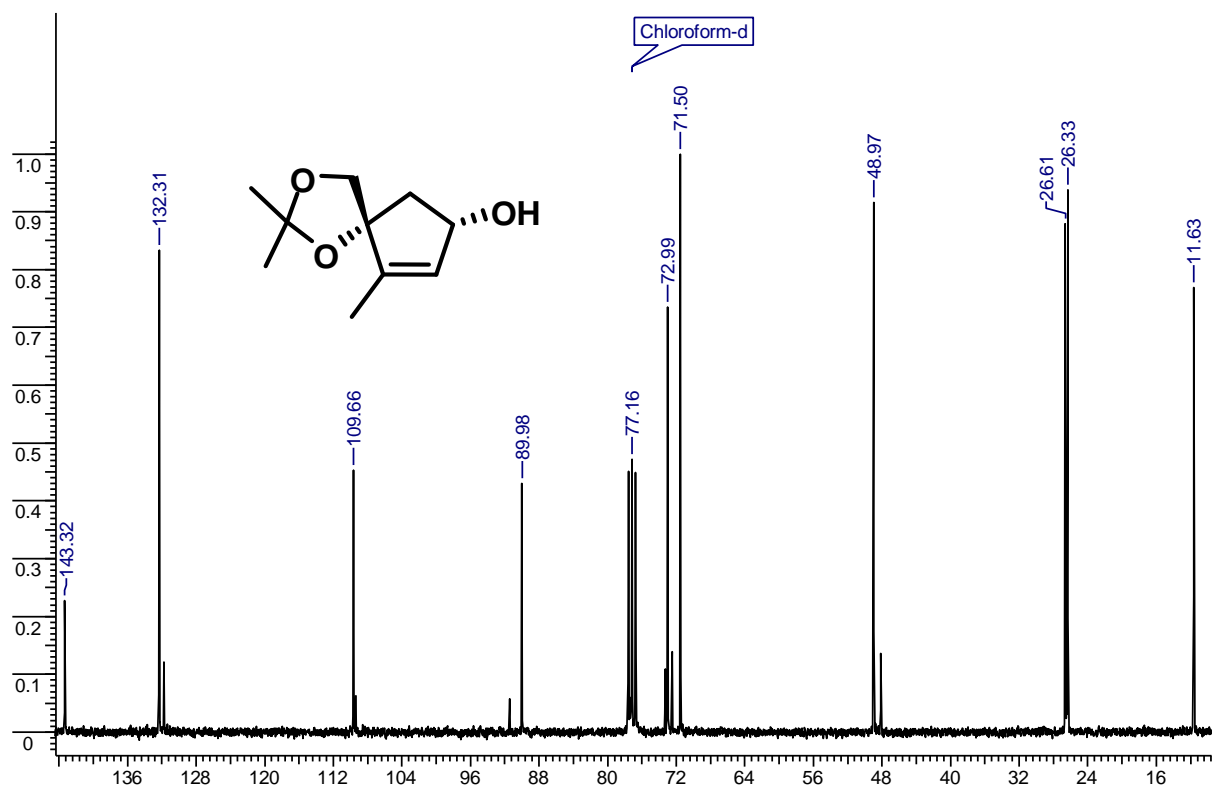
DEPT

75 MHz

solvant : chloroforme

composé (\pm)-15

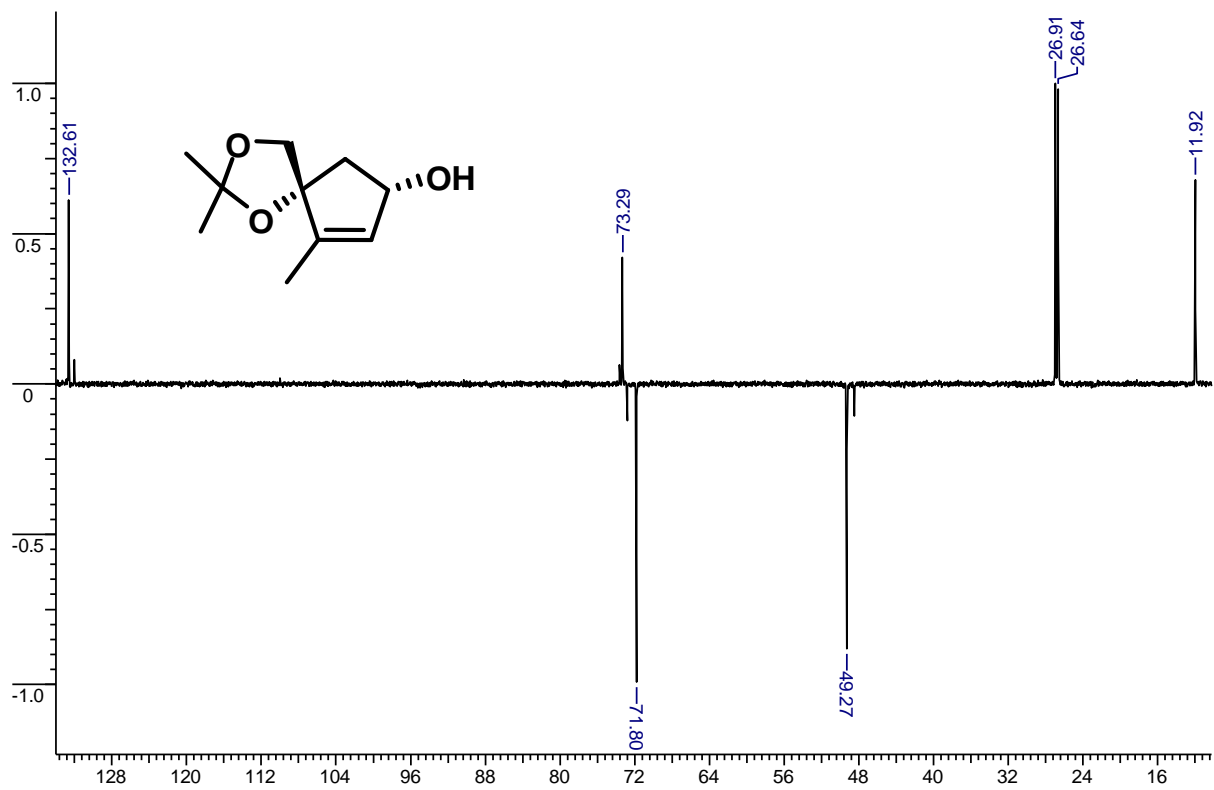
RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-16RMN ^{13}C 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-16

RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**17**RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**17**

DEPT

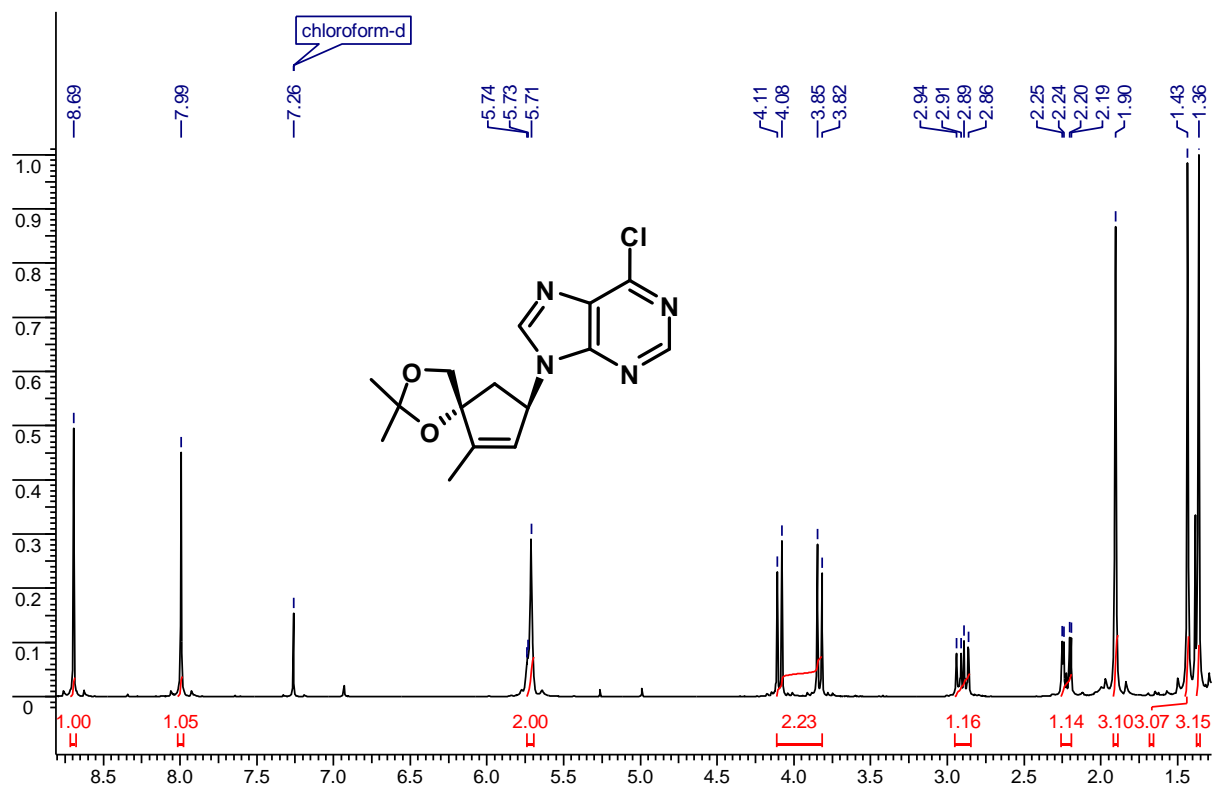
75 MHz

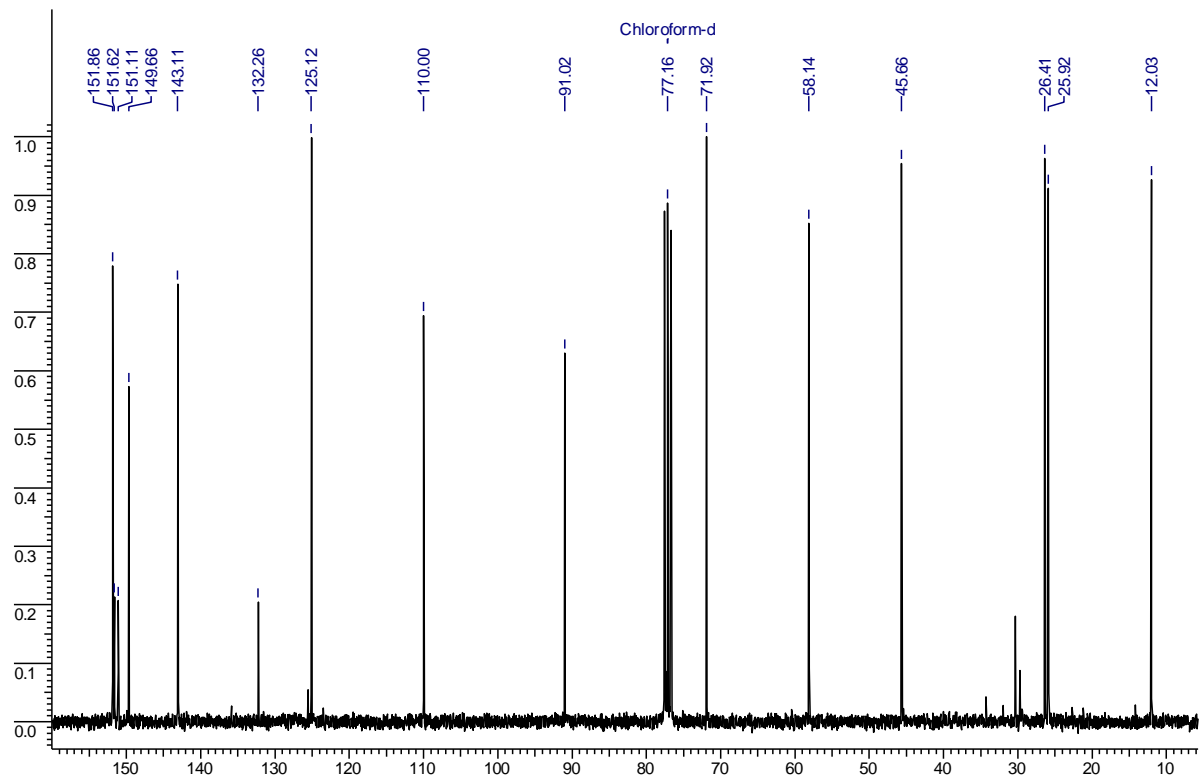
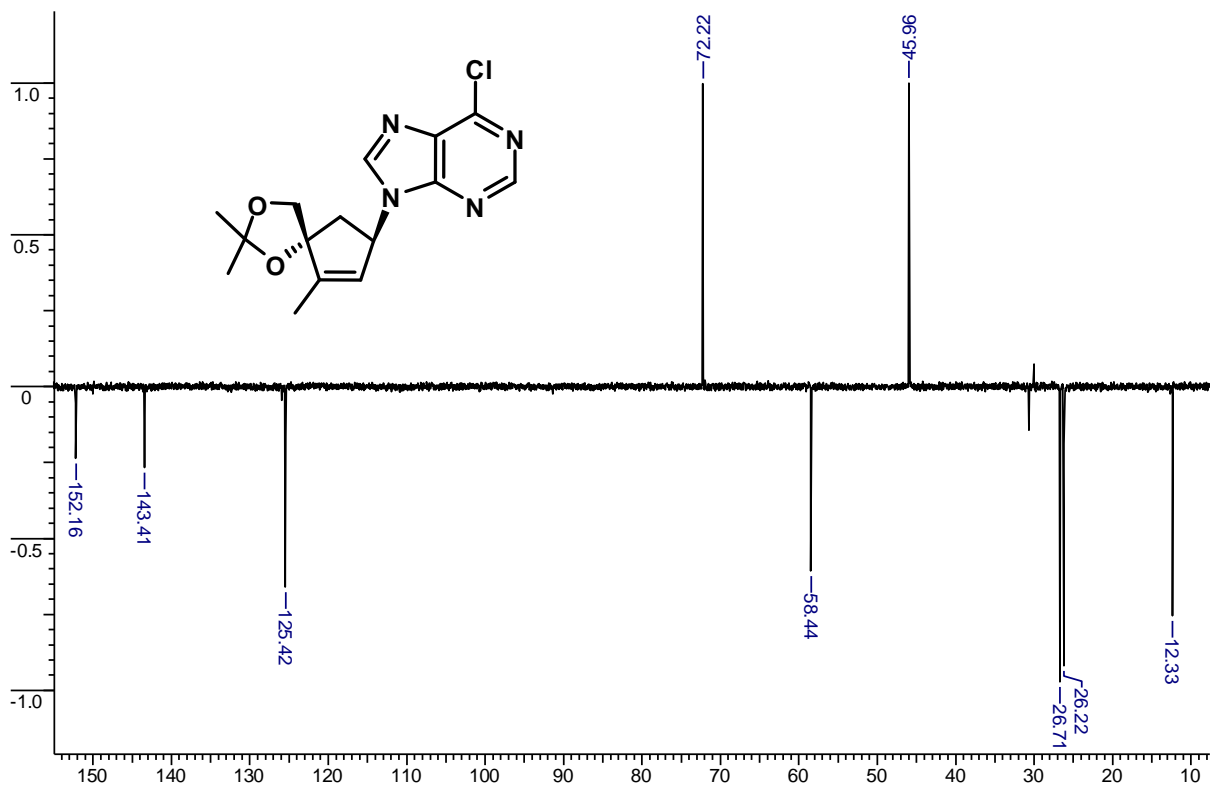
solvant : chloroforme

composé (±)-**17**RMN ^1H

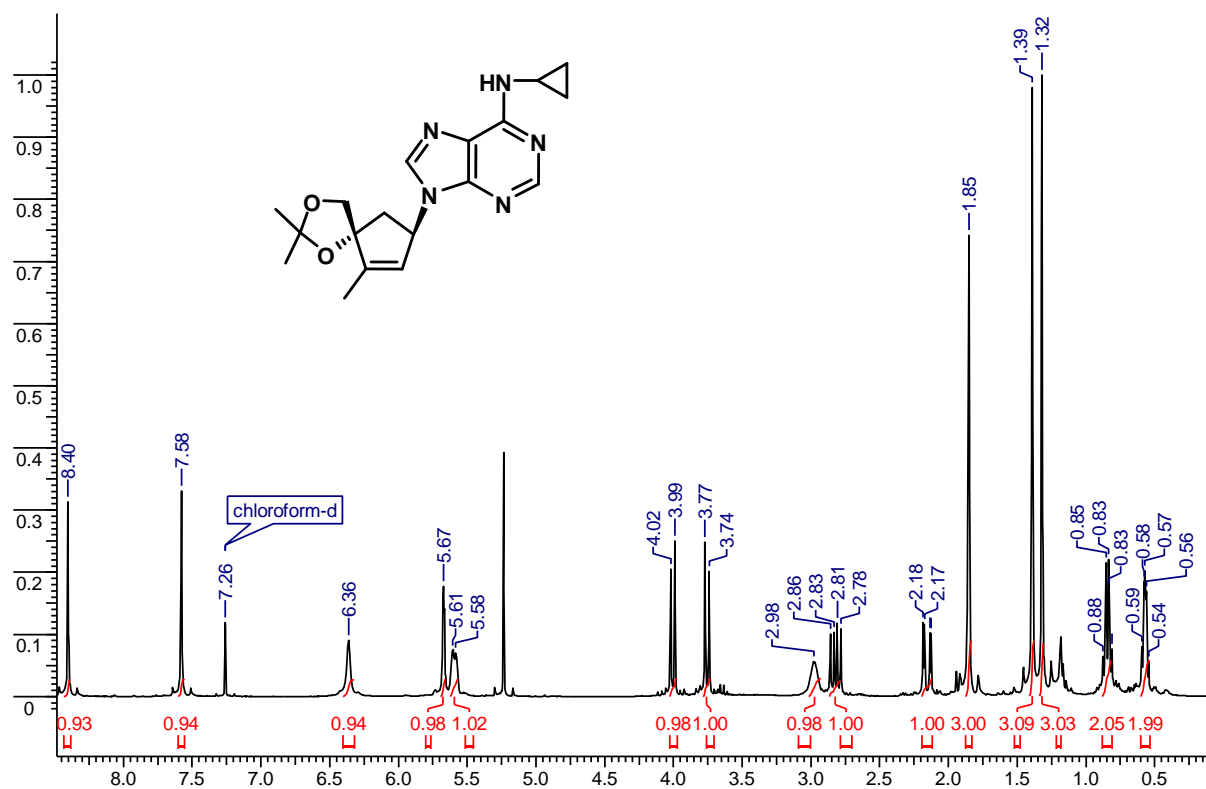
300 MHz

solvant : chloroforme

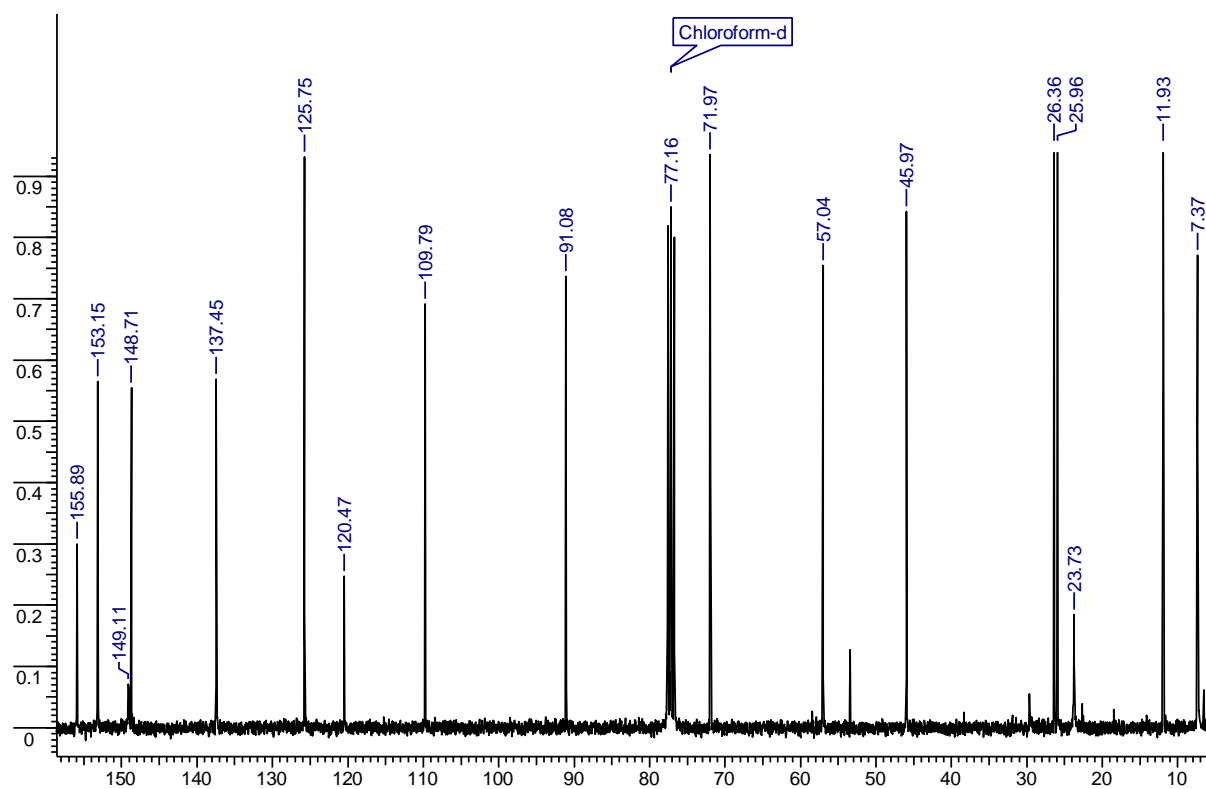
composé (±)-**18**

RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**18**DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**18**

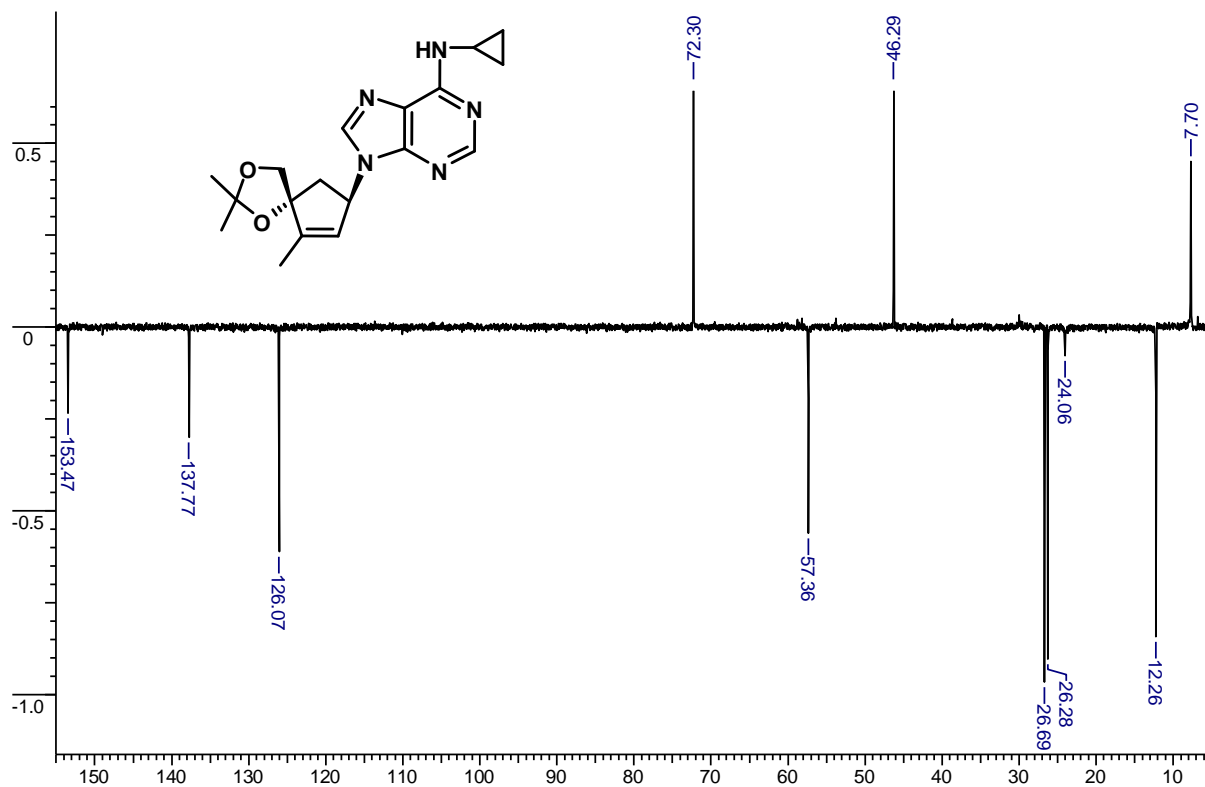
RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**19a**



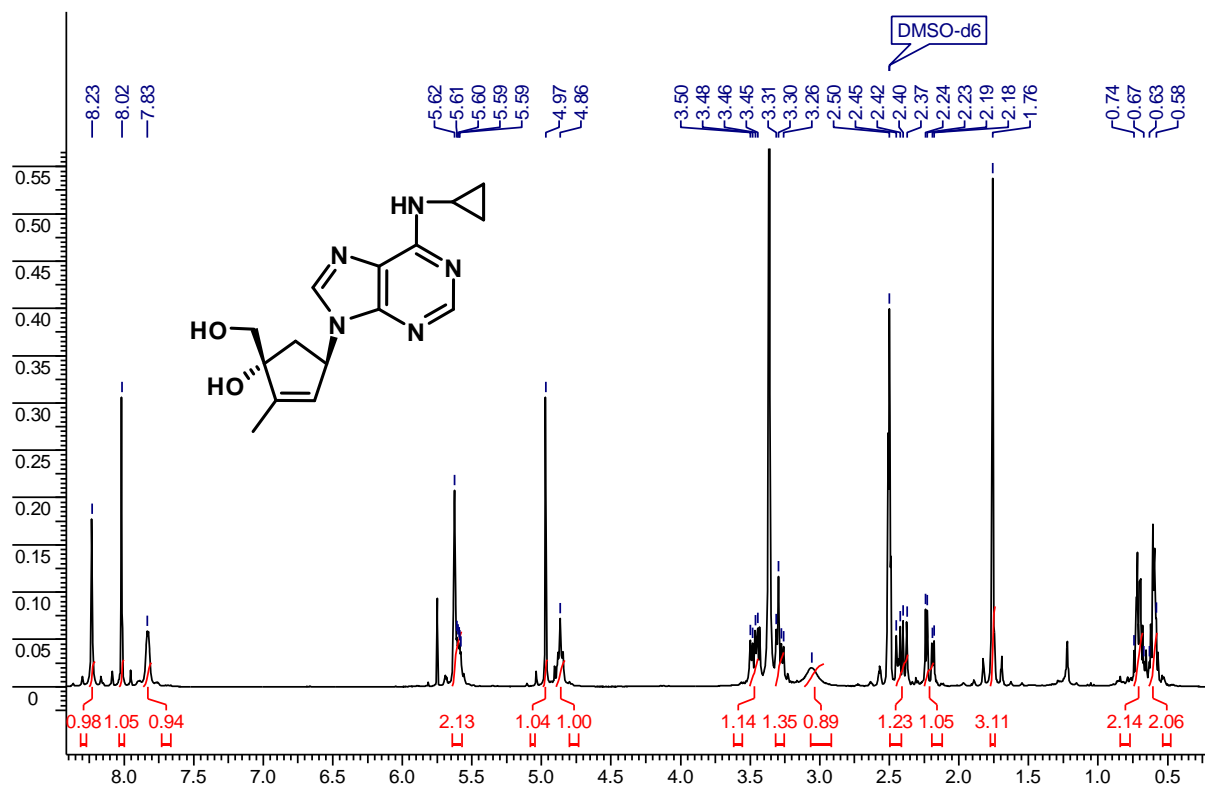
RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**19a**

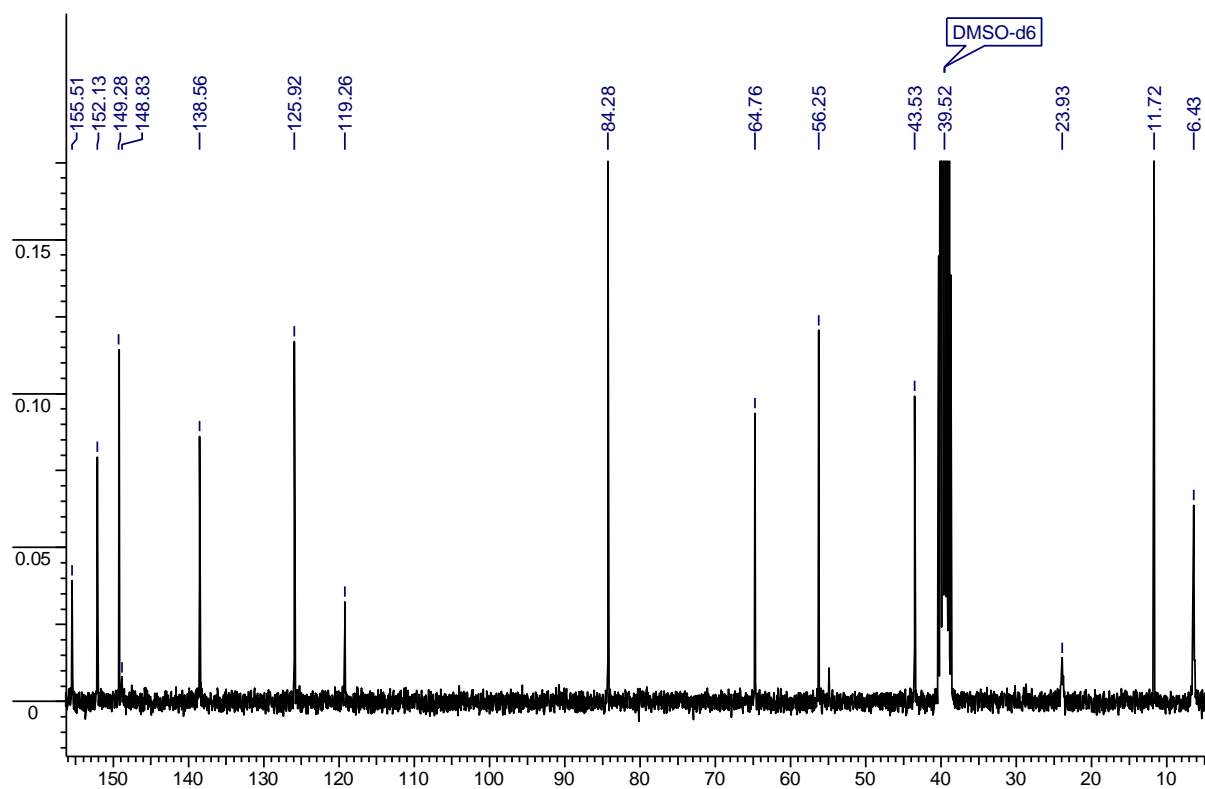
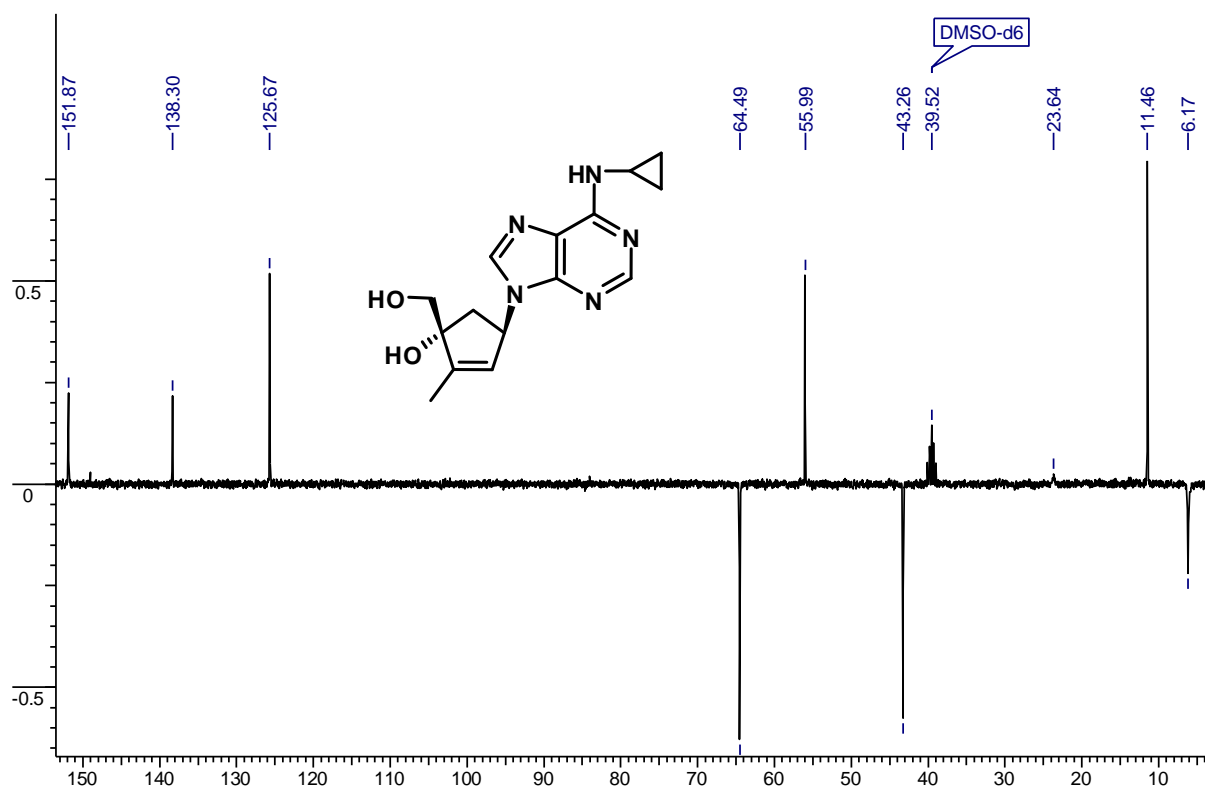


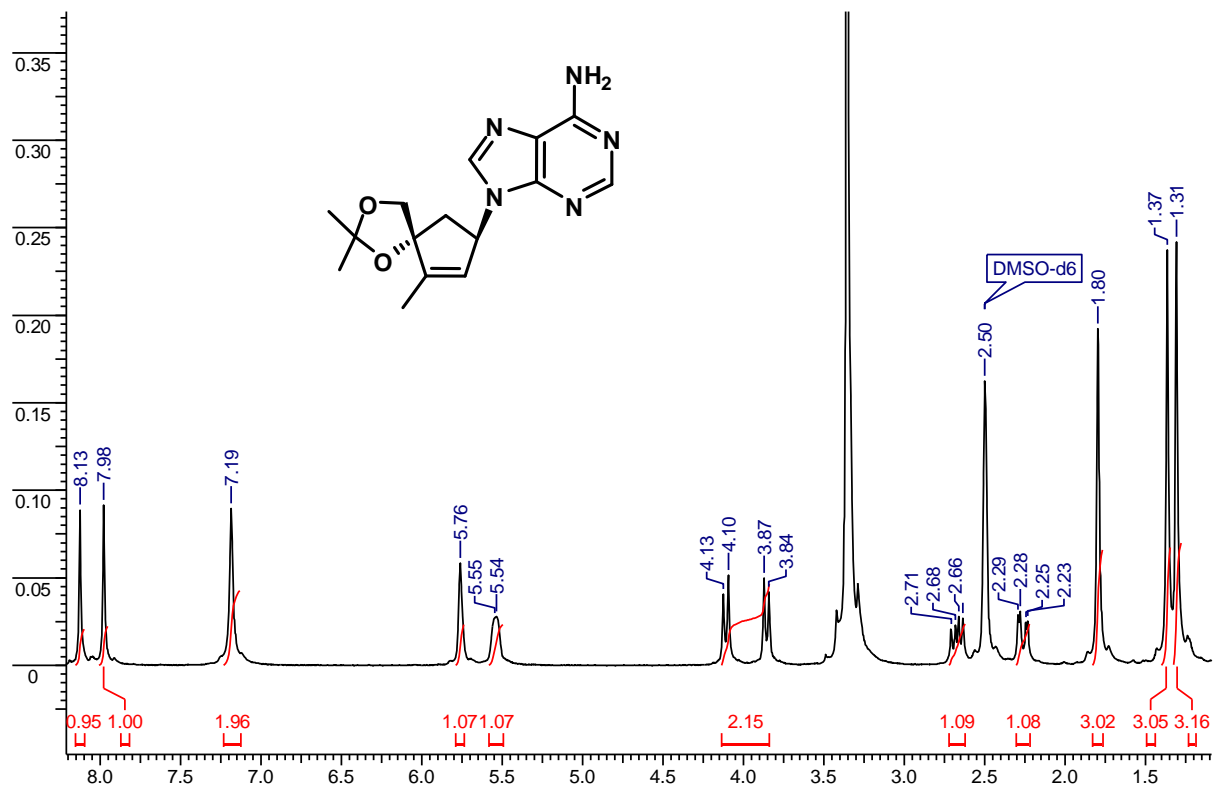
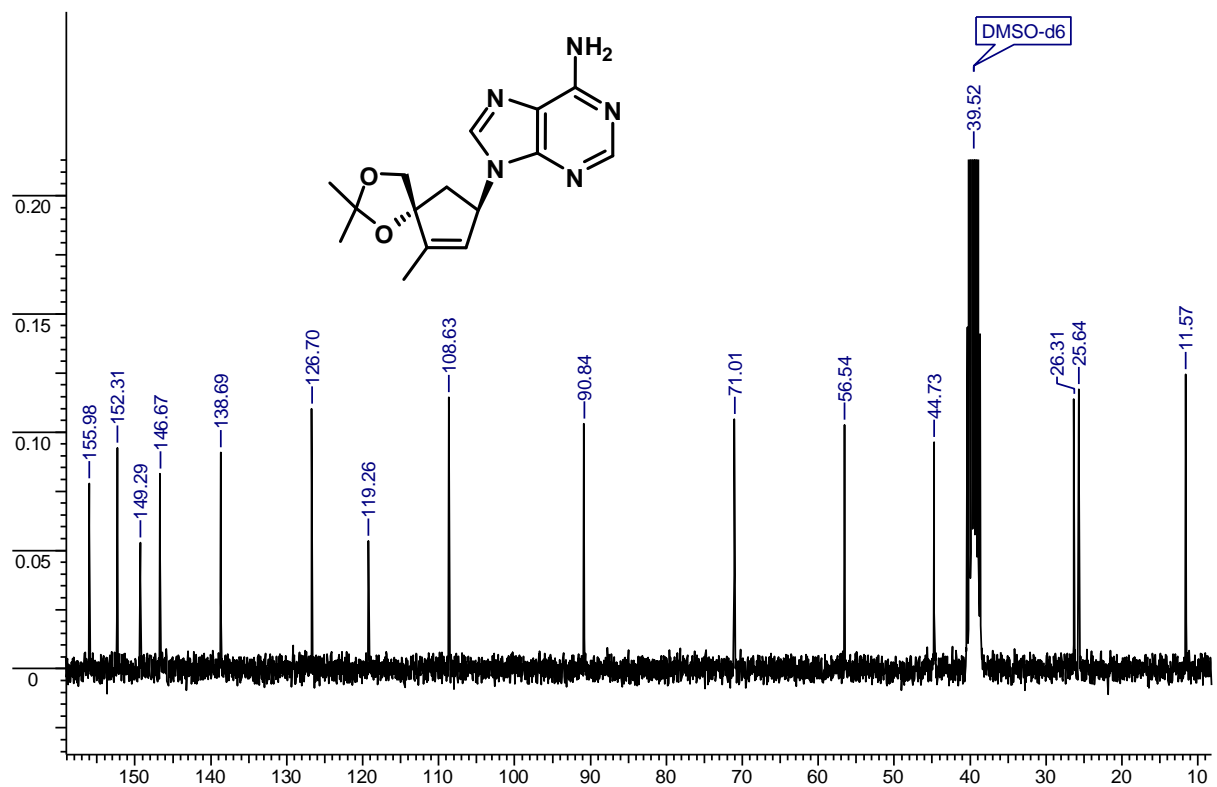
DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (±)-**19a**

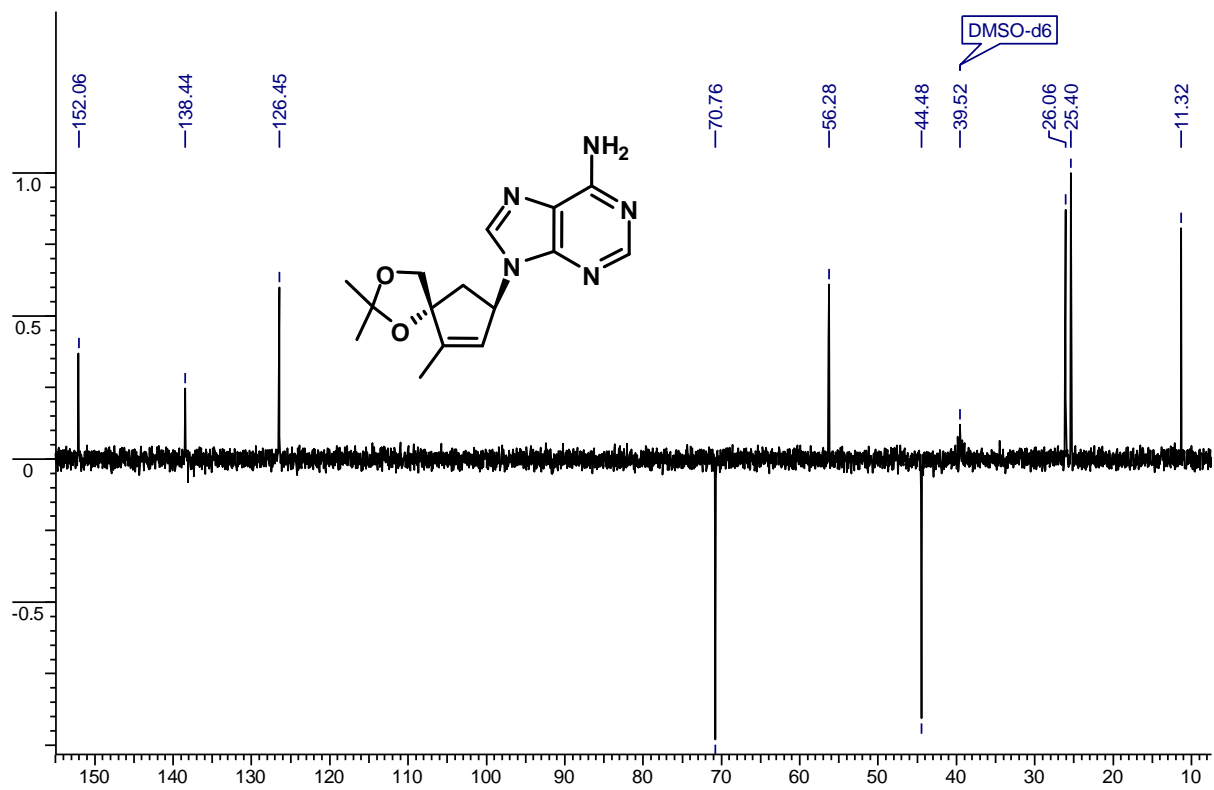
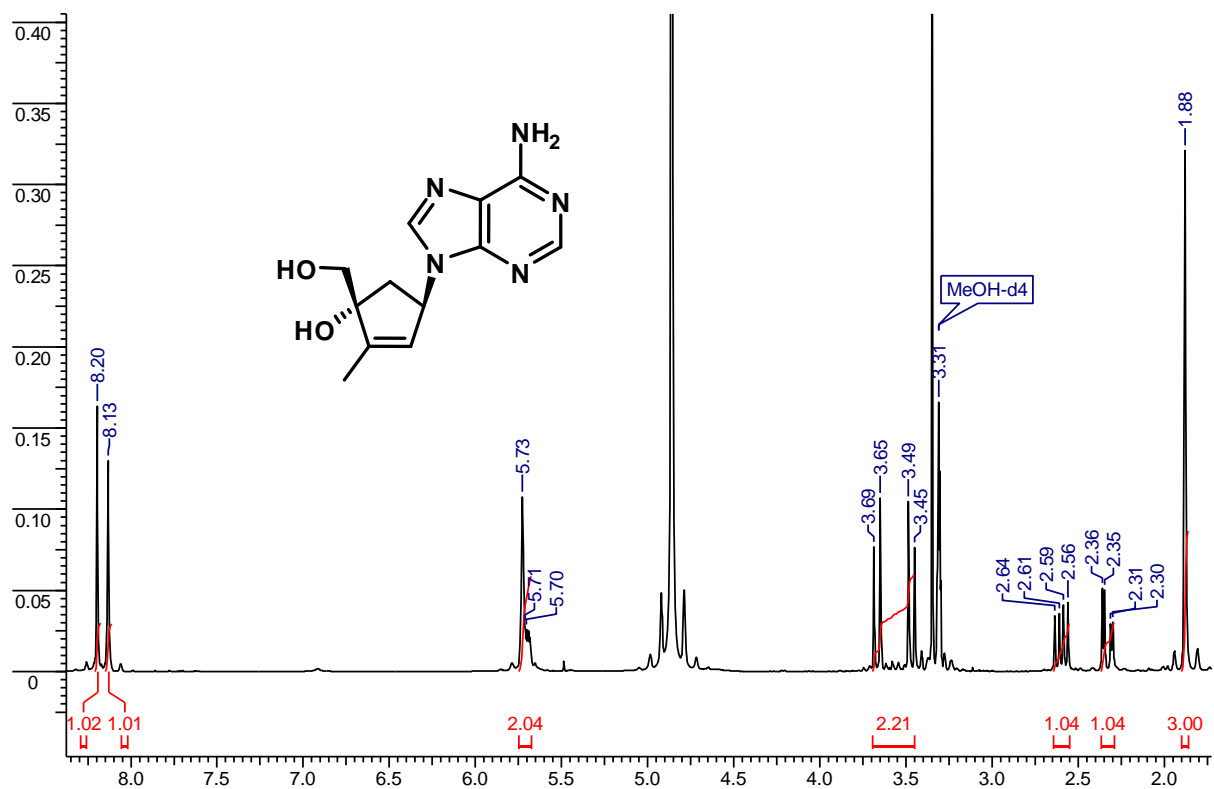


RMN ^1H 300 MHz solvant : DMSO- d_6 composé (±)-**1a**



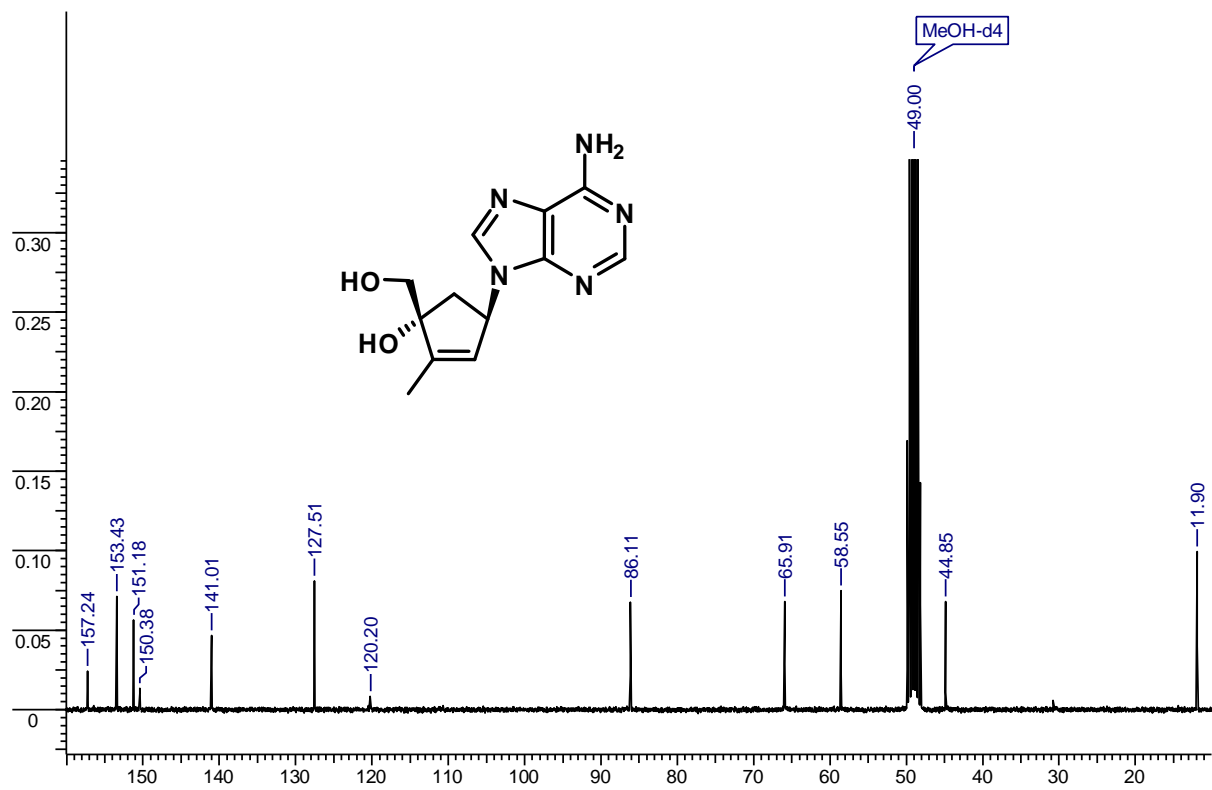
RMN ^{13}C 75 MHz solvant : DMSO- d_6 composé (\pm)-**1a**DEPT 75 MHz solvant : DMSO- d_6 composé (\pm)-**1a**

RMN ^1H 300 MHz solvant : $\text{DMSO-}d_6$ composé (\pm)-**19b**RMN ^{13}C 75 MHz solvant : $\text{DMSO-}d_6$ composé (\pm)-**19b**

DEPT 75 MHz solvant : DMSO- d_6 composé (\pm)-**19b**RMN ^1H 300 MHz solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**1b**

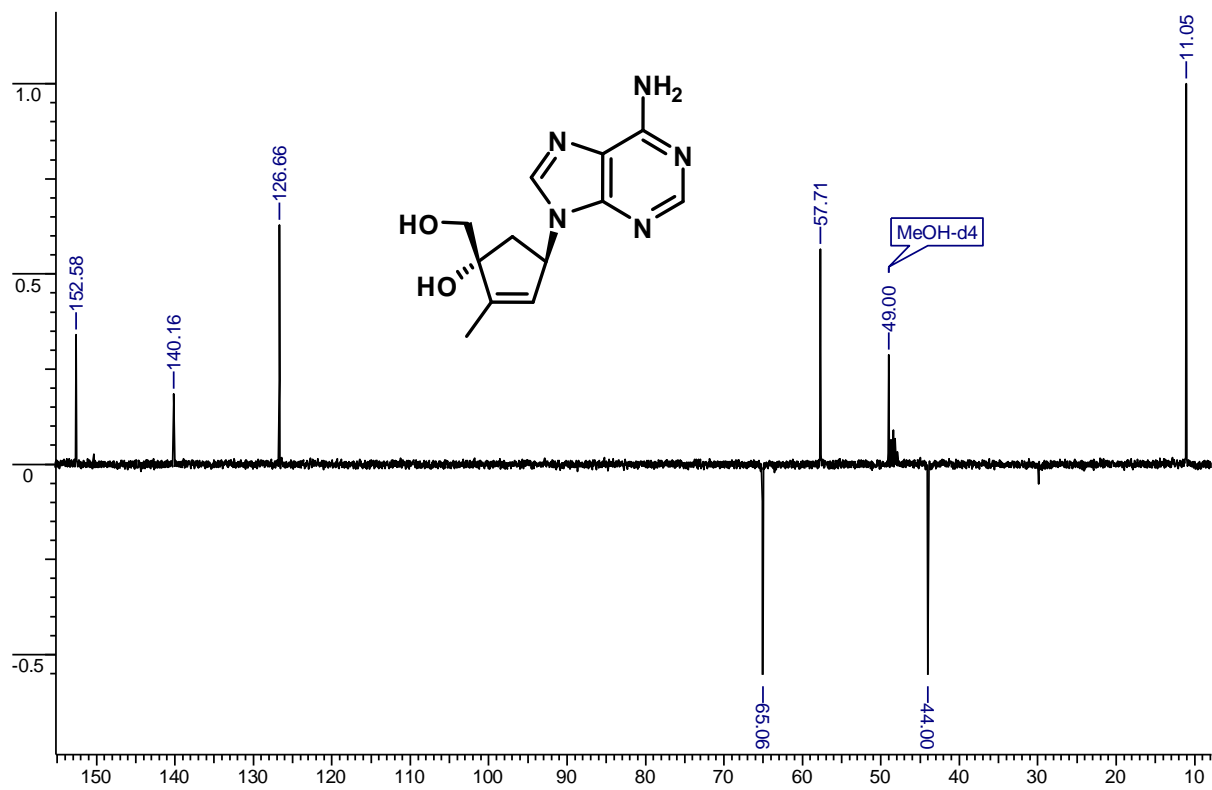
RMN ^{13}C

75 MHz

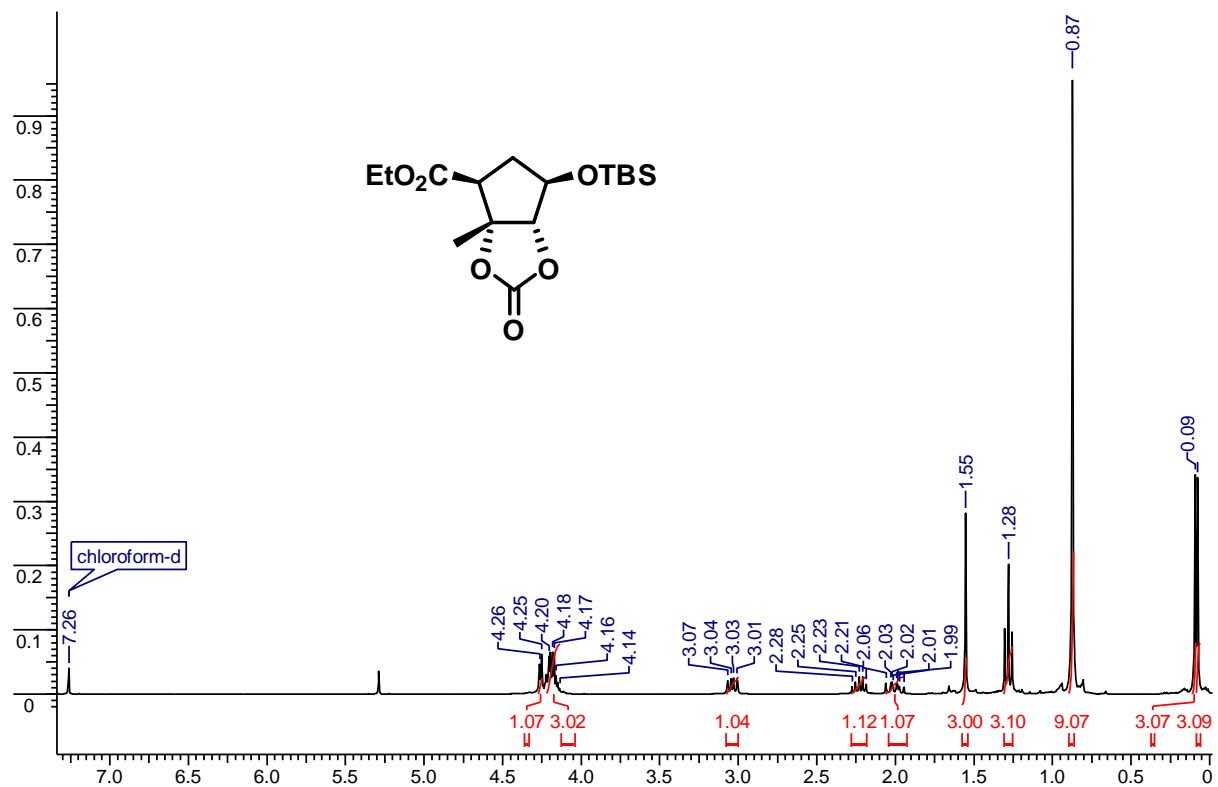
solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**1b**

DEPT

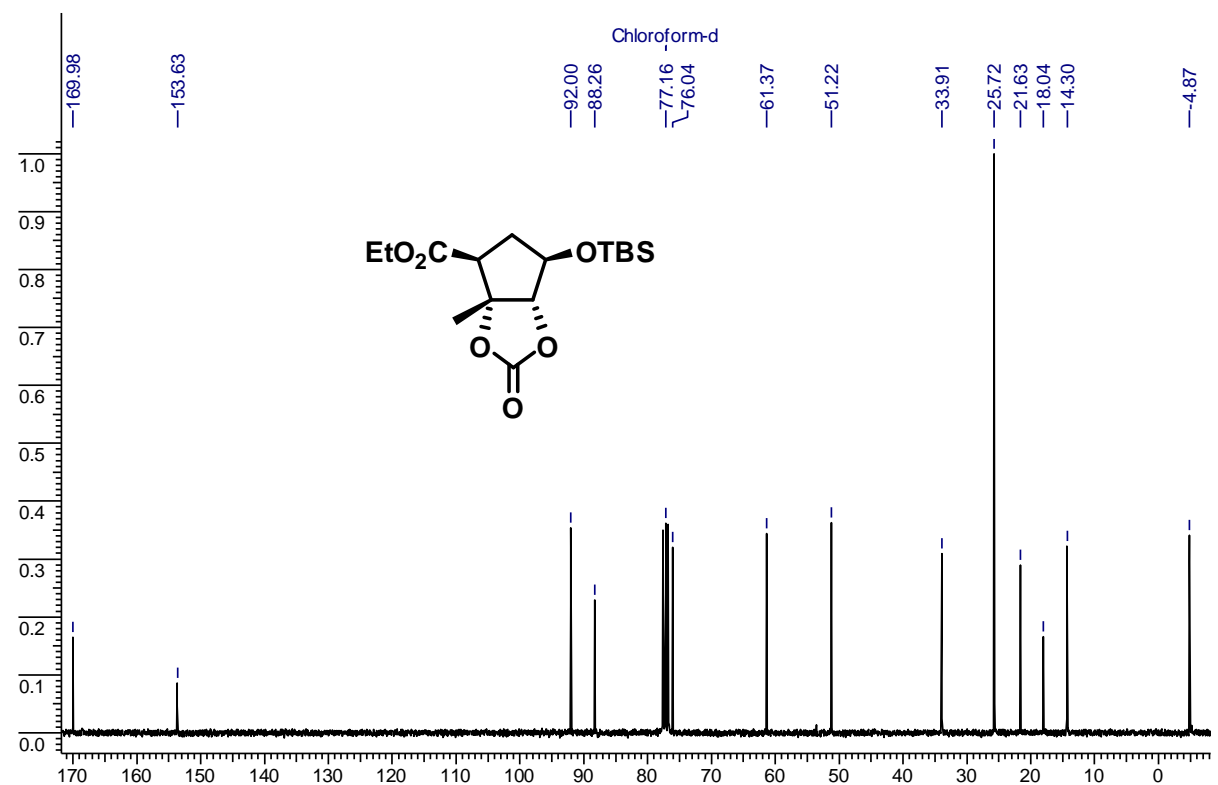
75 MHz

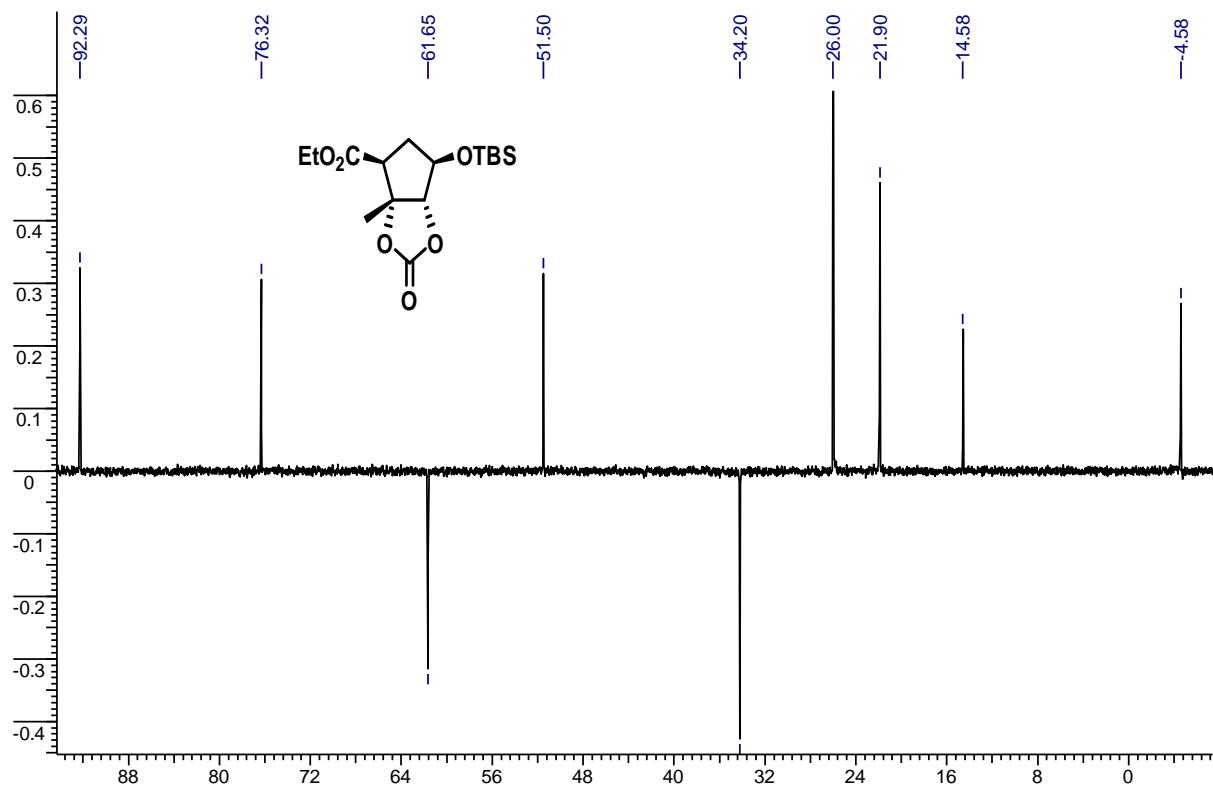
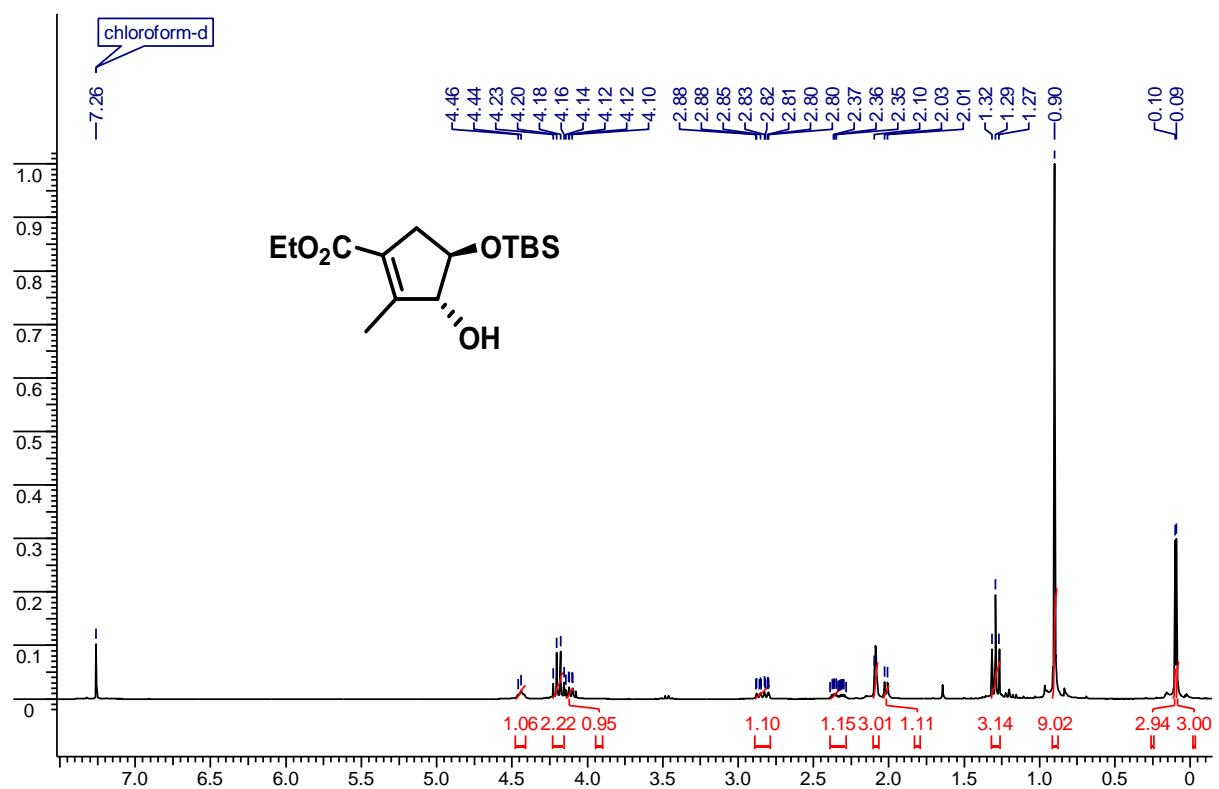
solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**1b**

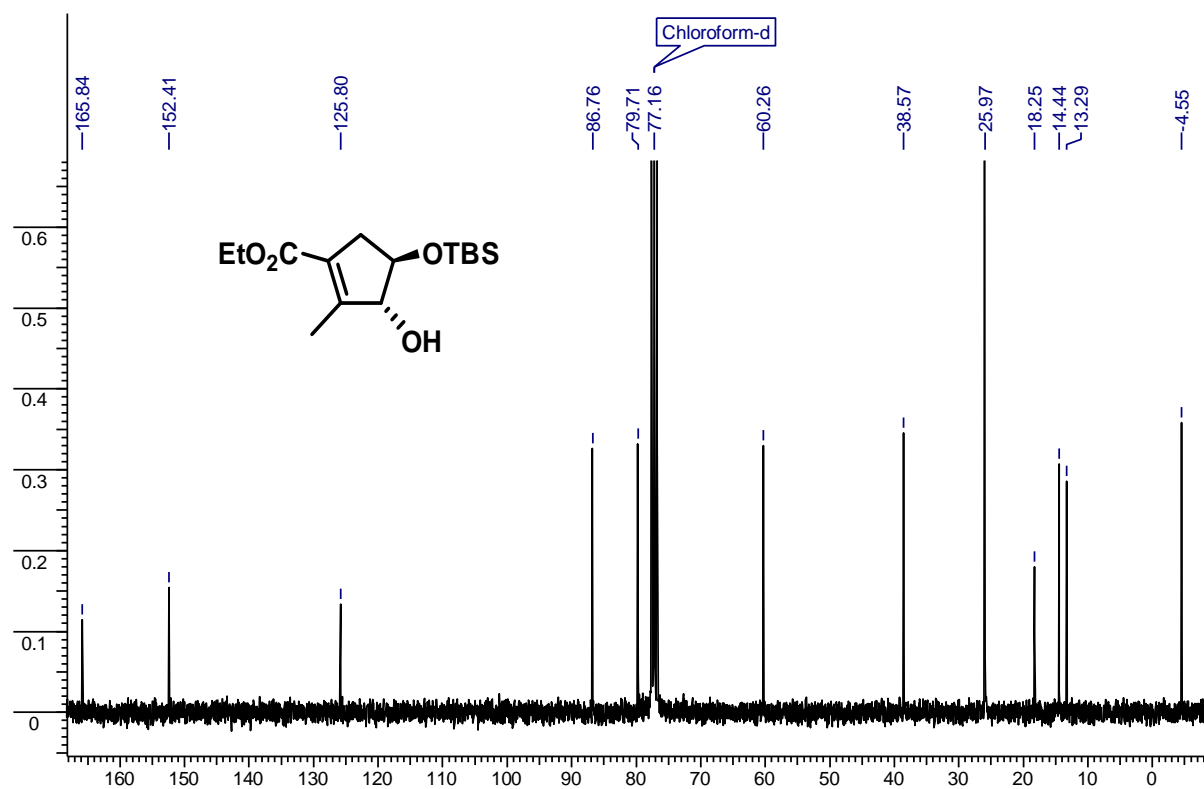
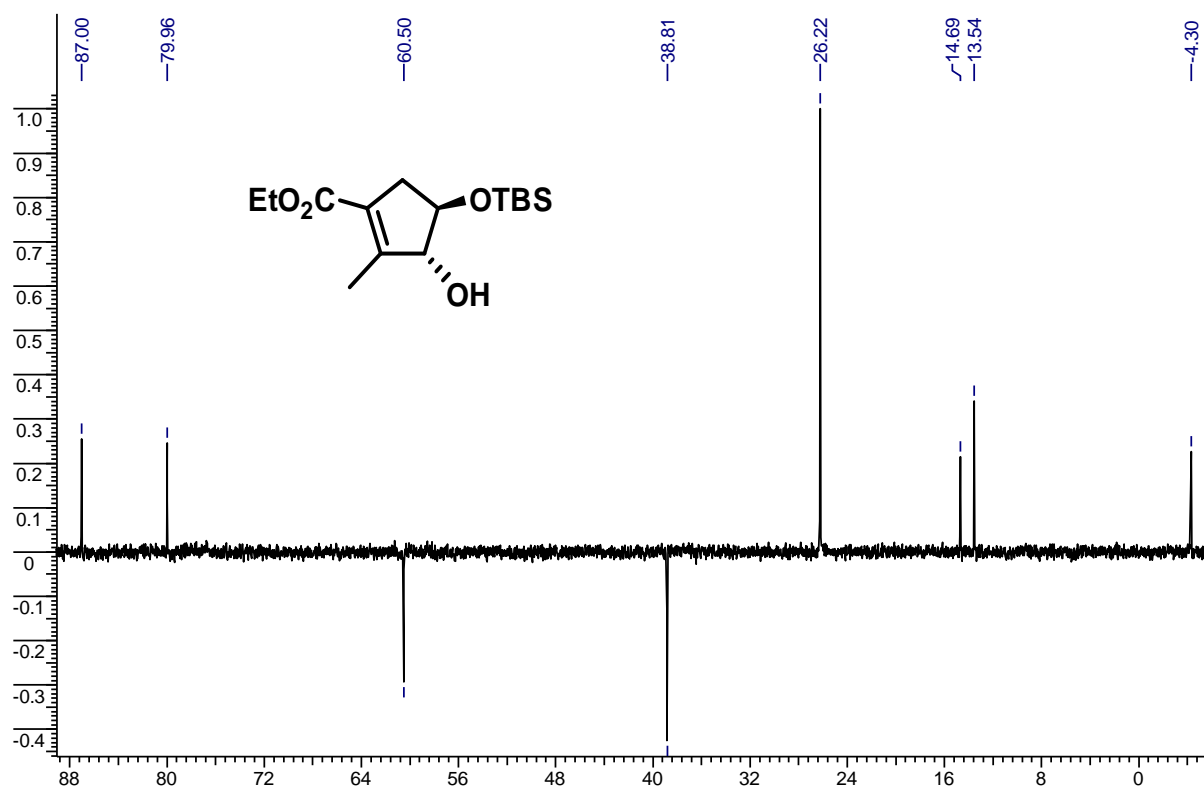
RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**21**

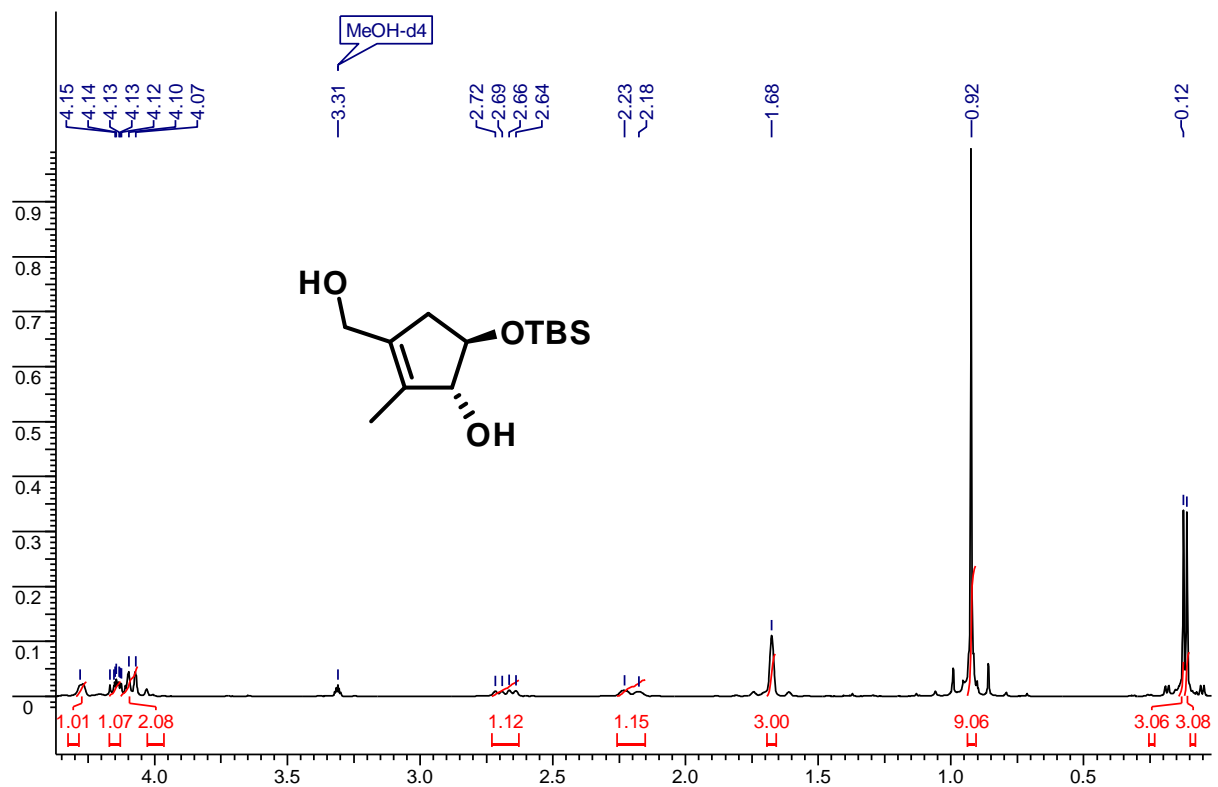
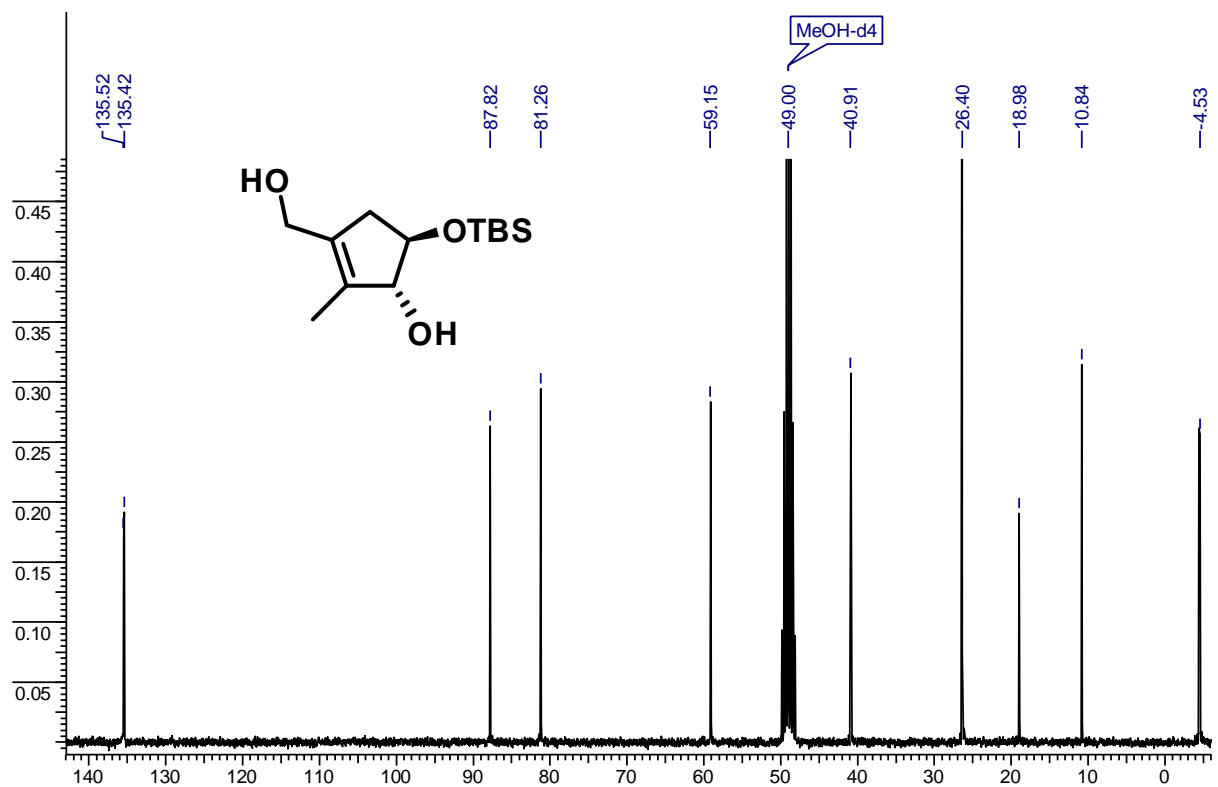


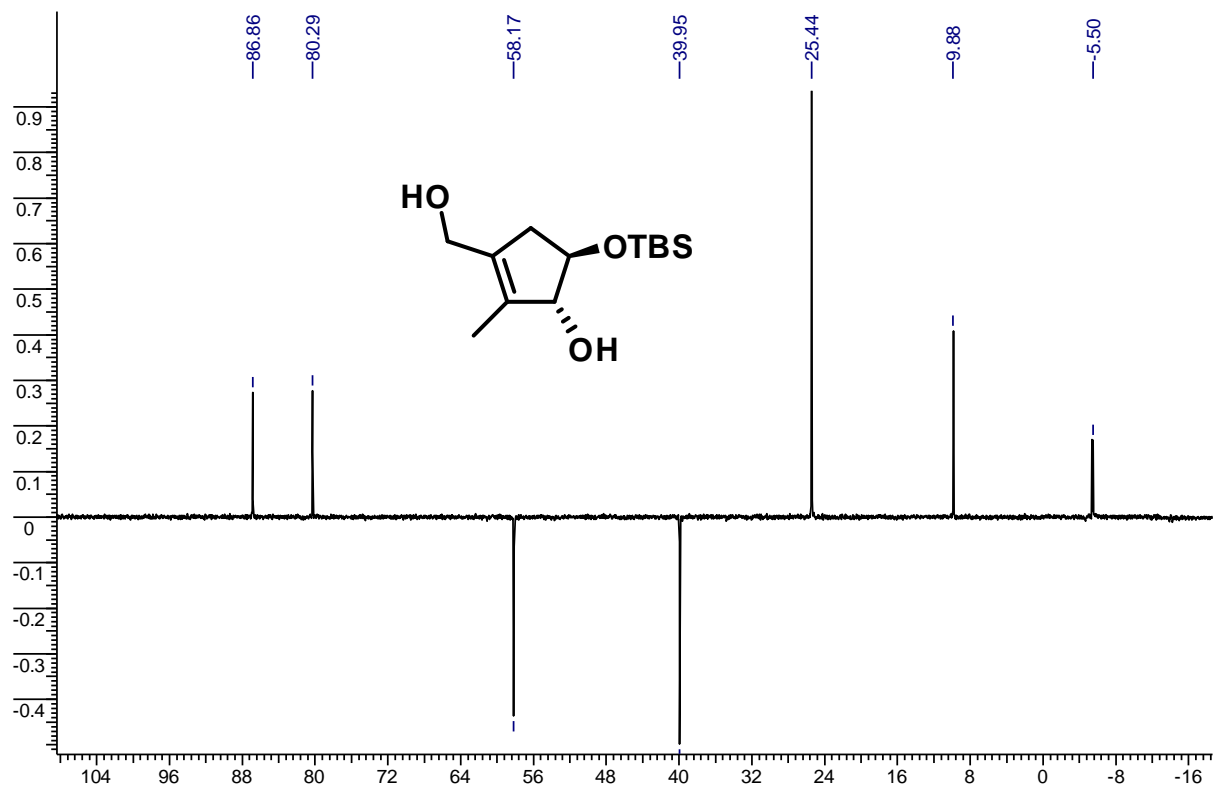
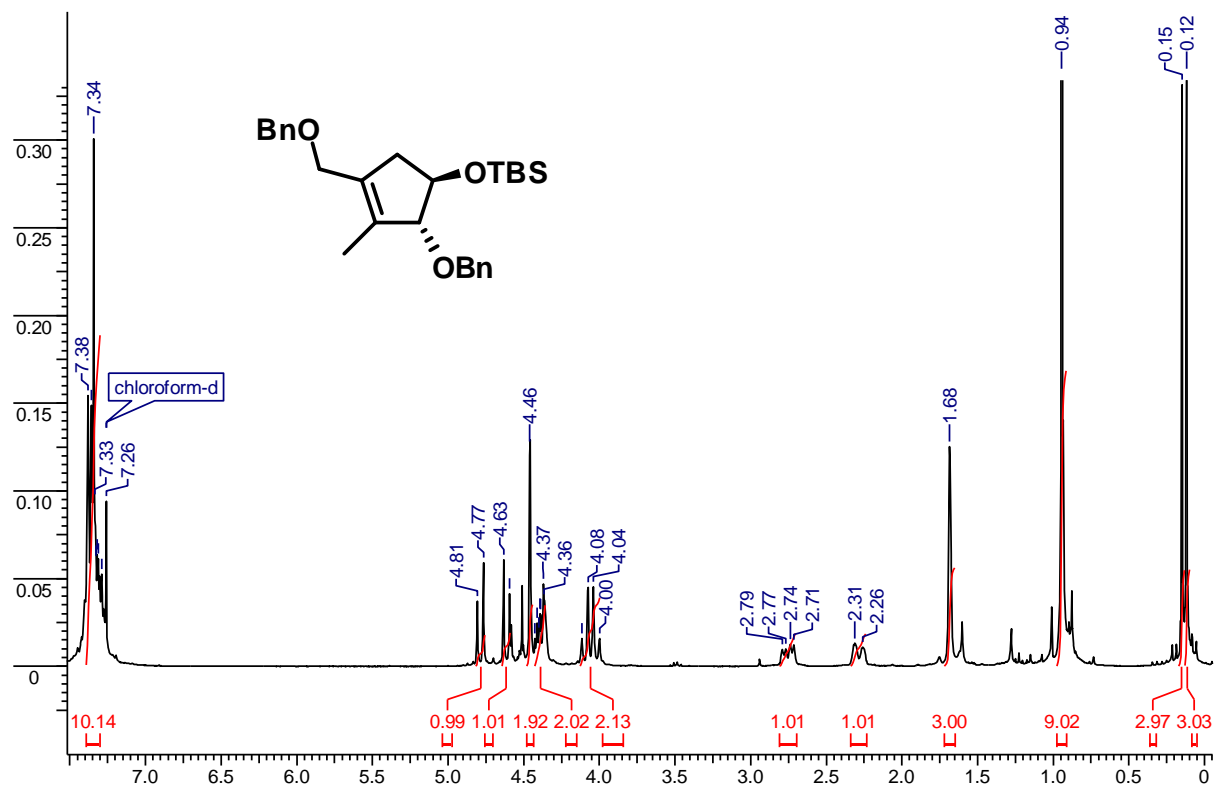
RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**21**



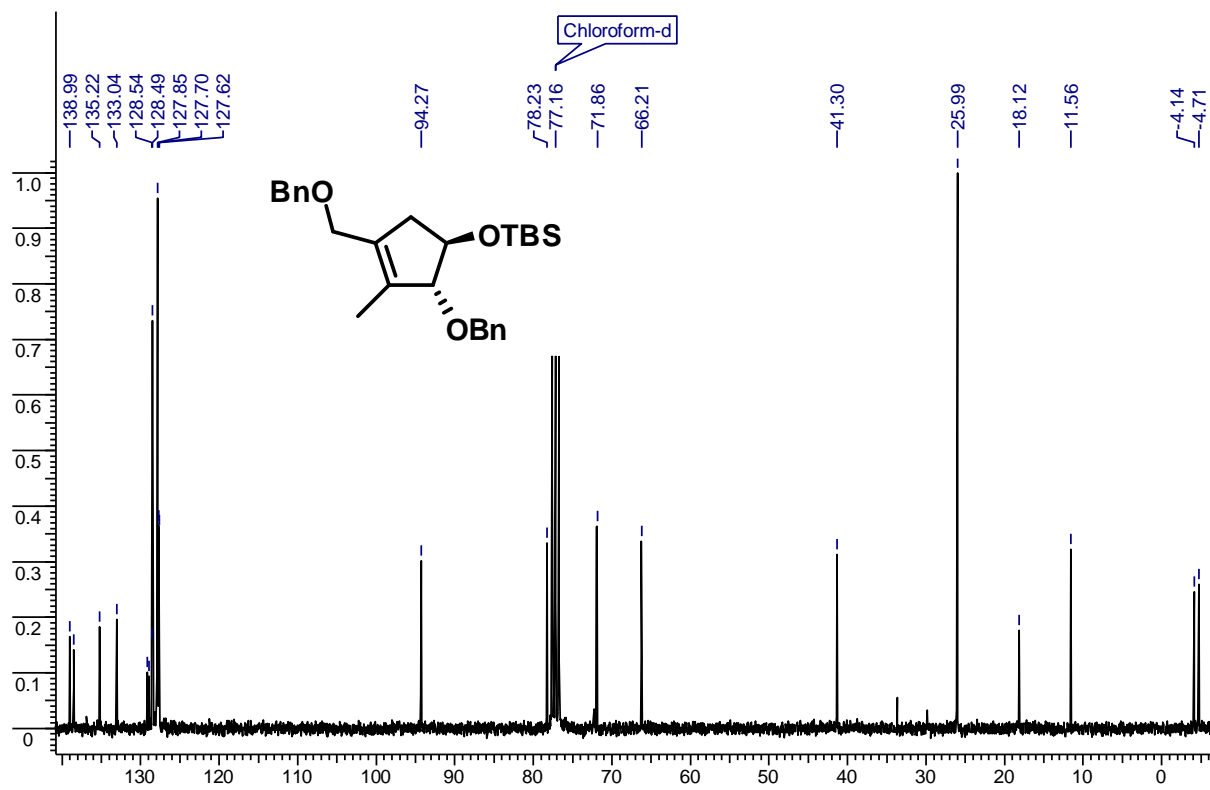
DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-21RMN ¹H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-22

RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**22**DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**22**

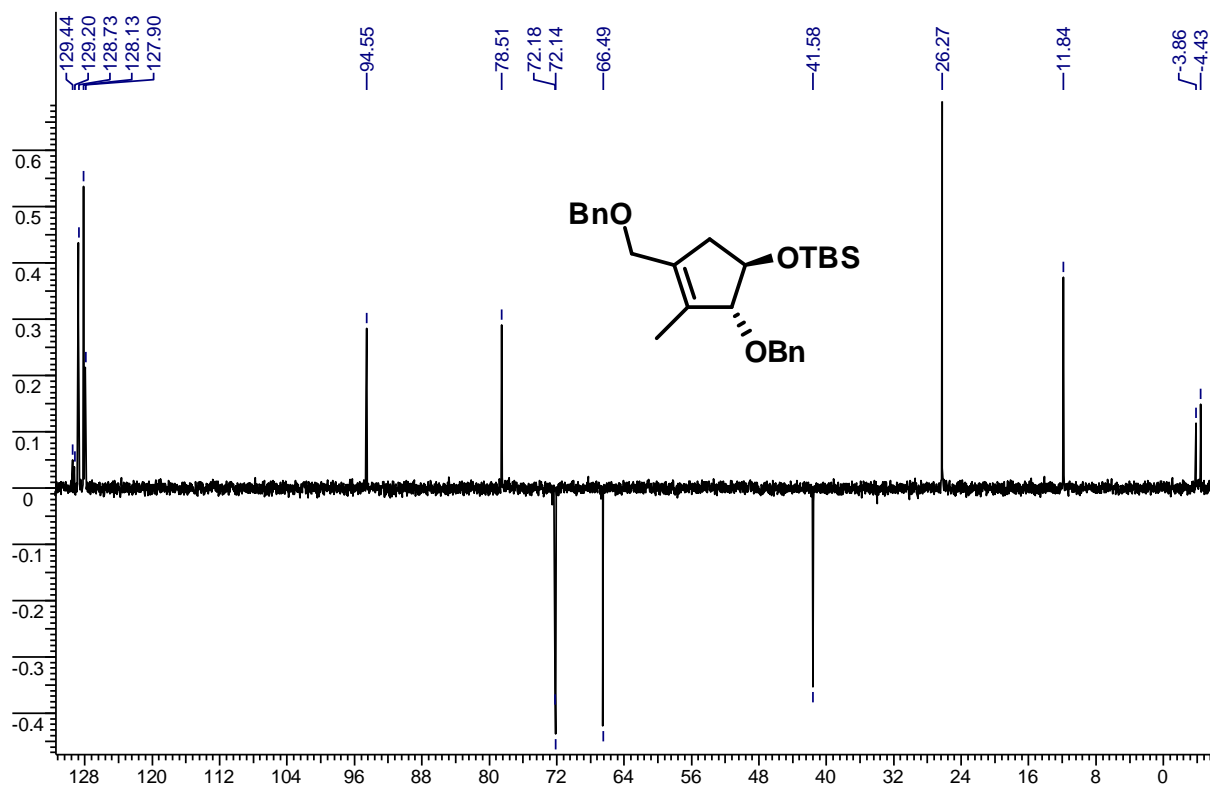
RMN ^1H 300 MHz solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**23**RMN ^{13}C 75 MHz solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**23**

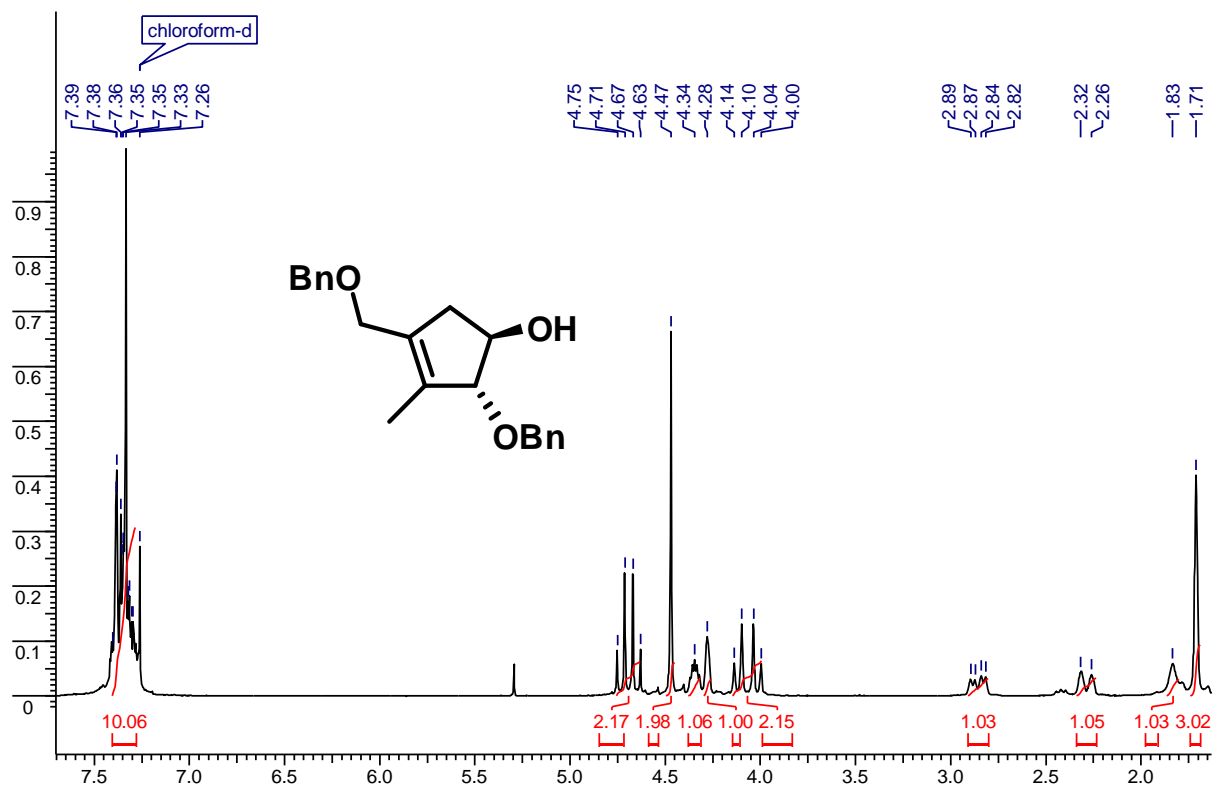
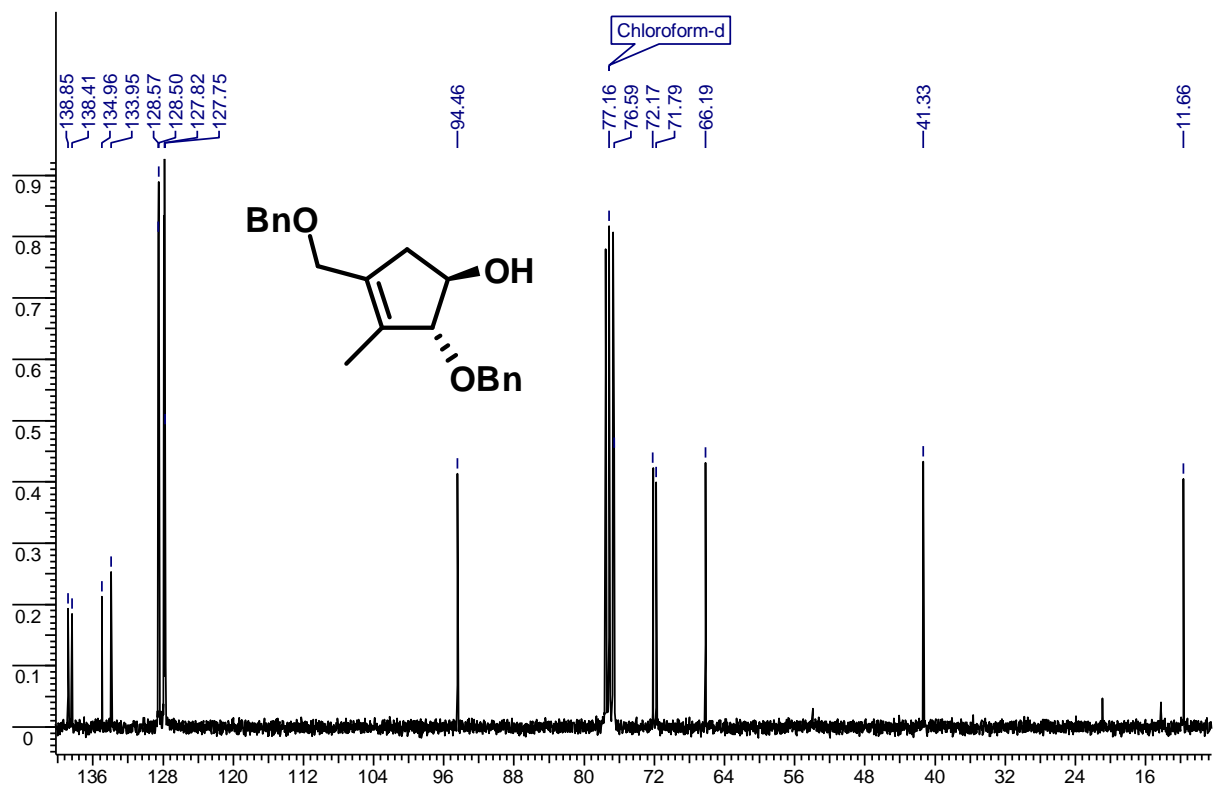
DEPT 75 MHz solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**23**RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**24**

RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**24**

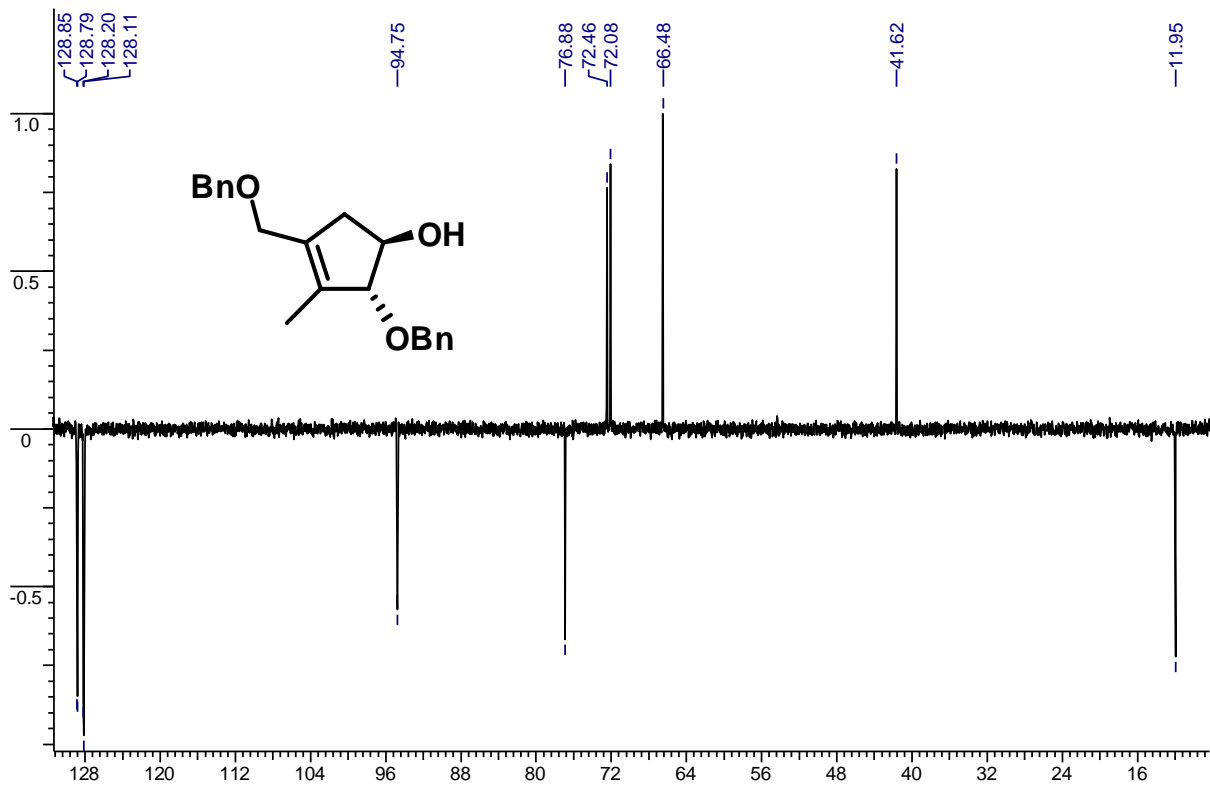


DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**24**

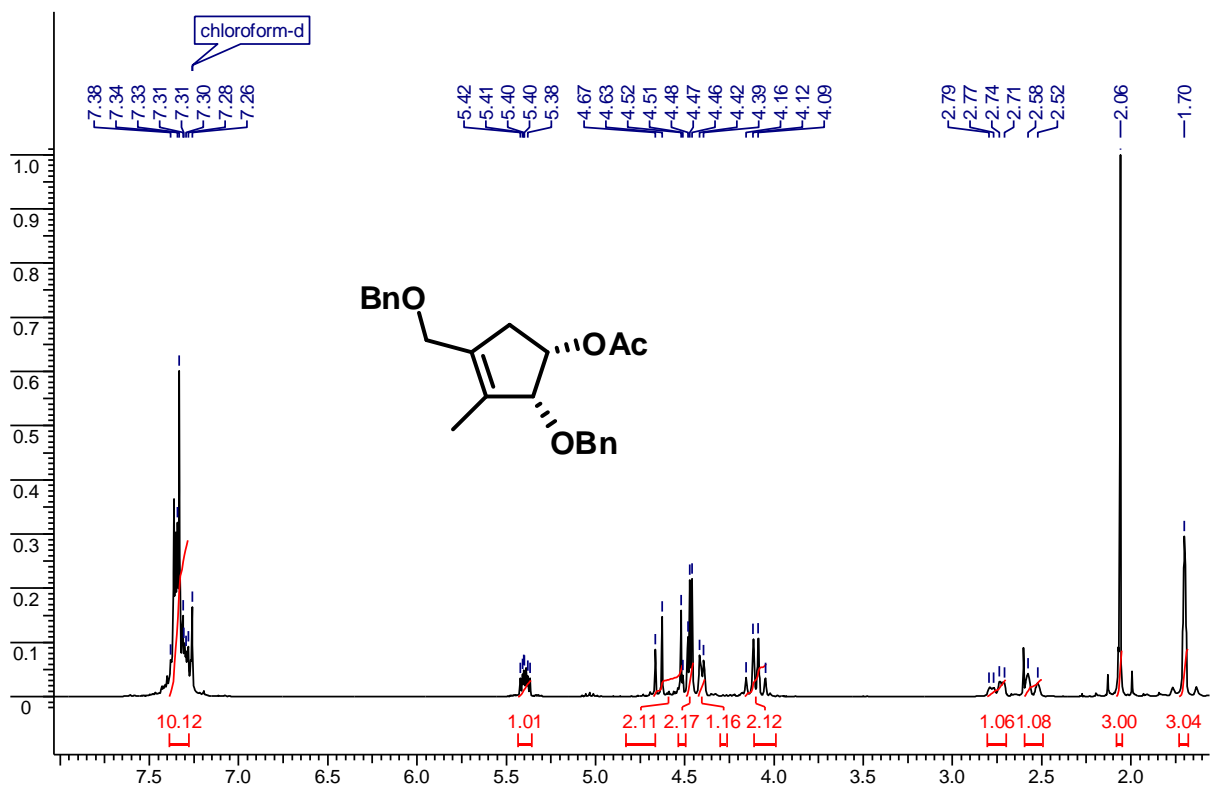


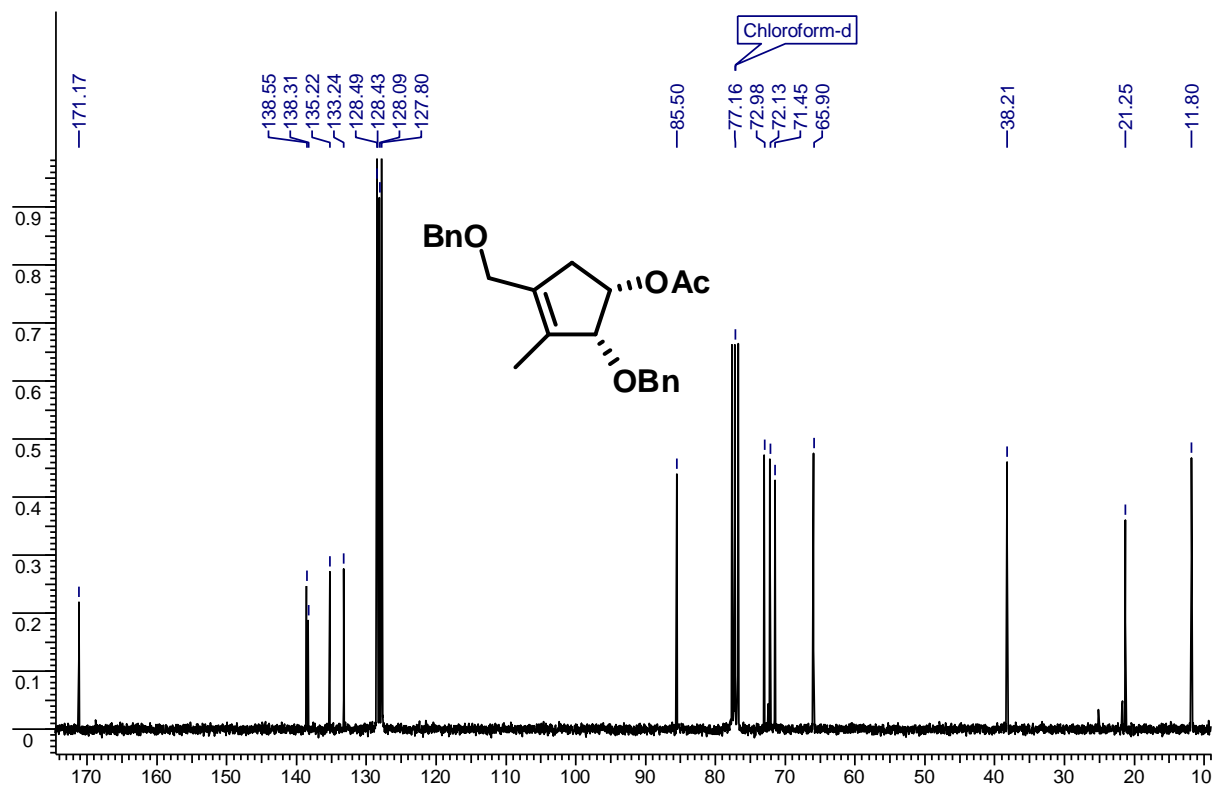
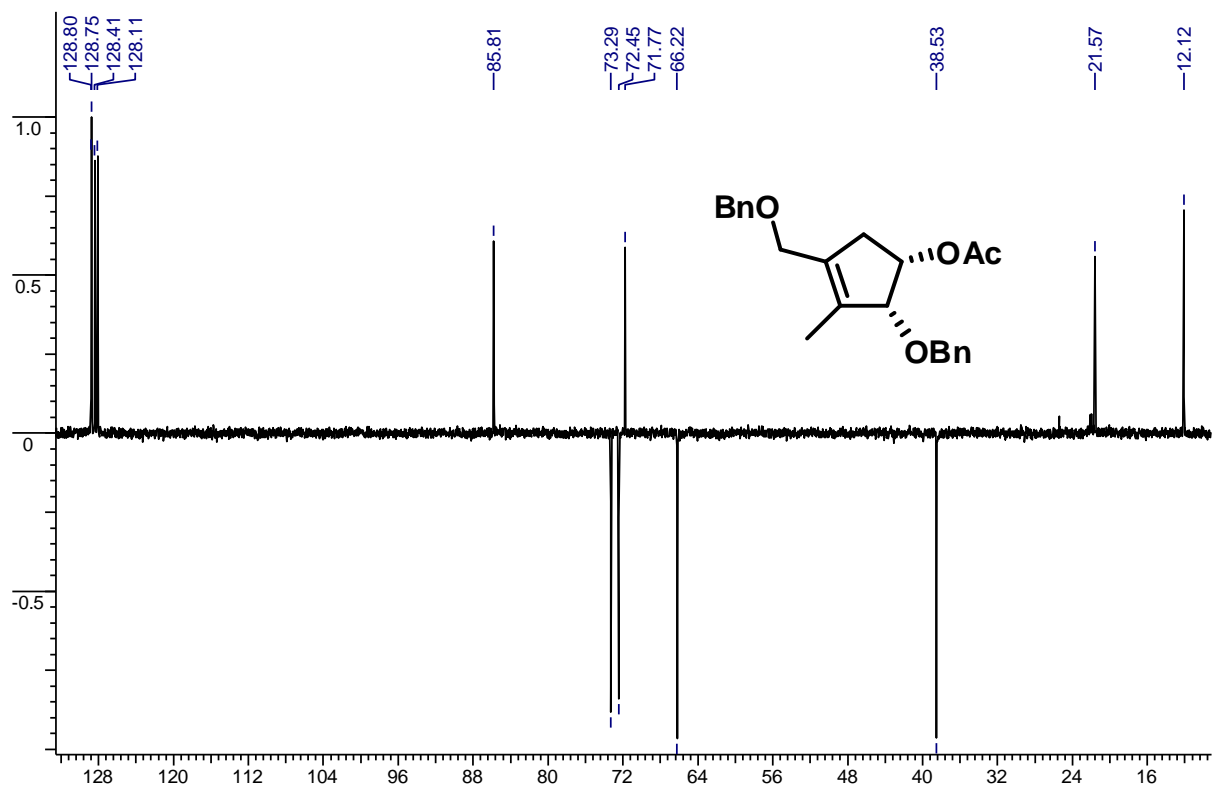
RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**25**RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**25**

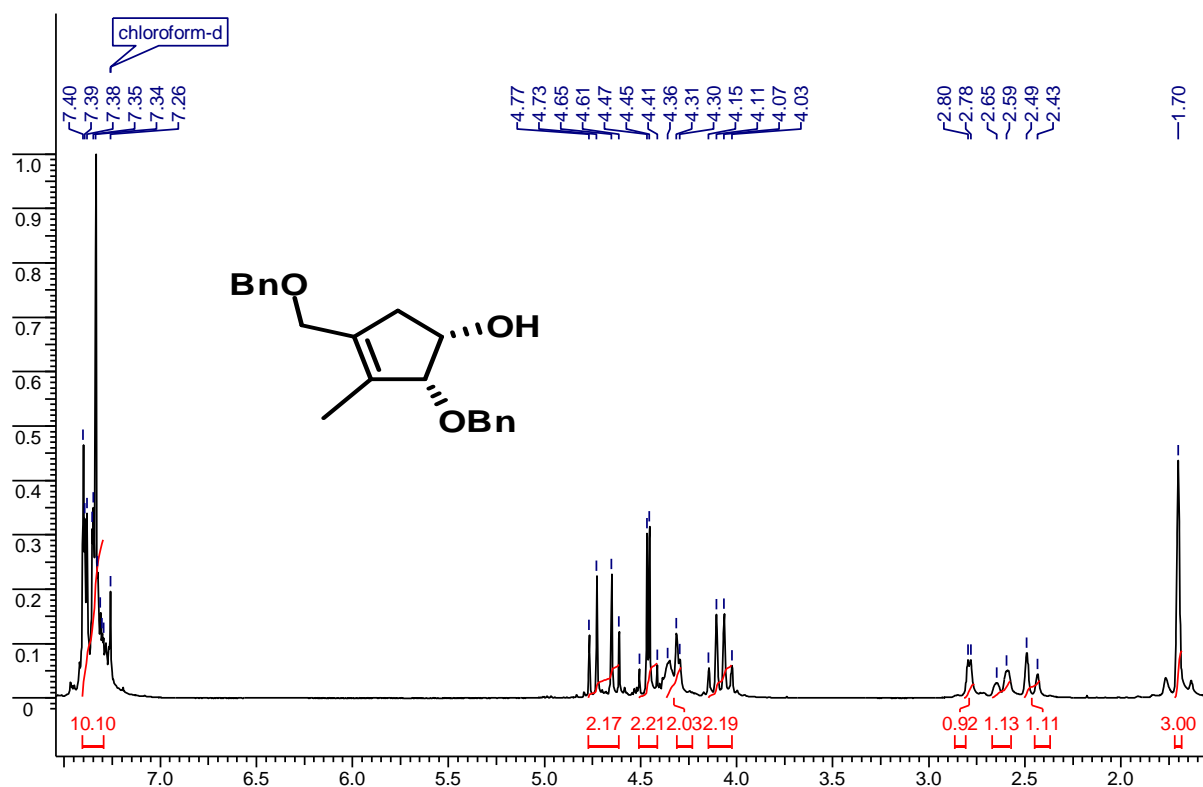
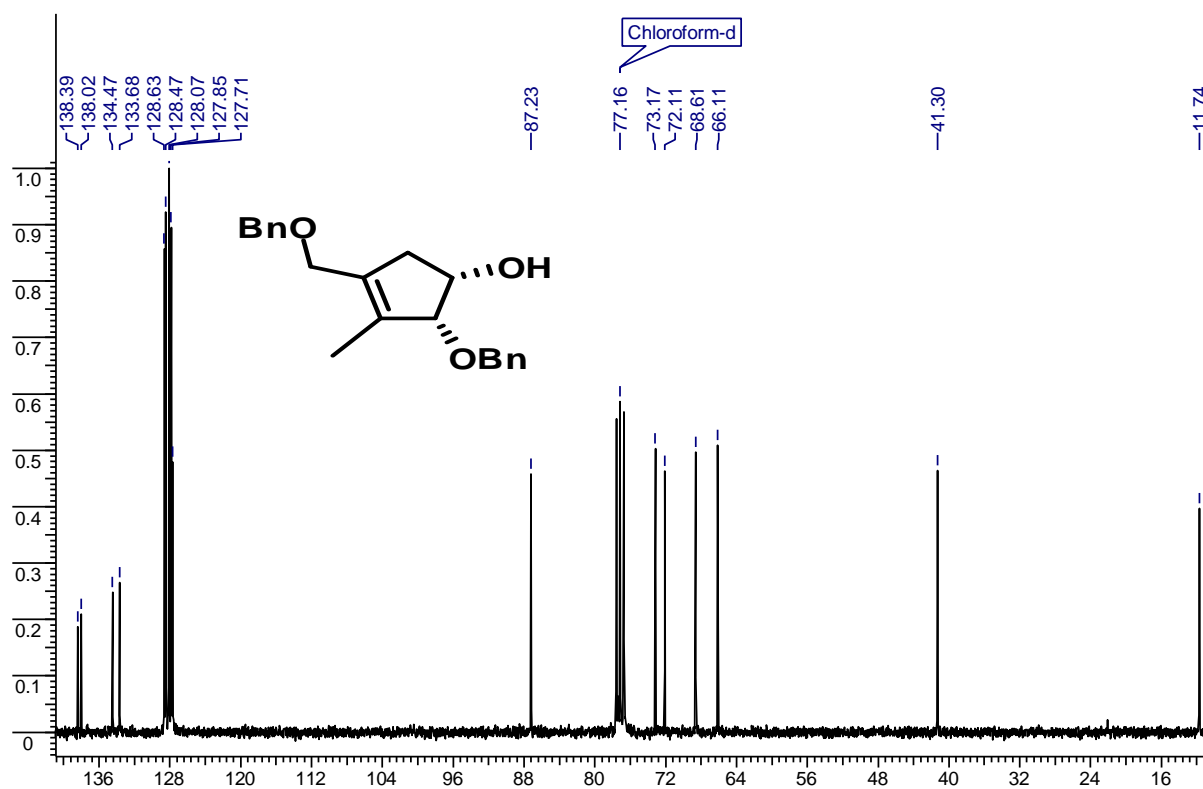
DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (±)-25



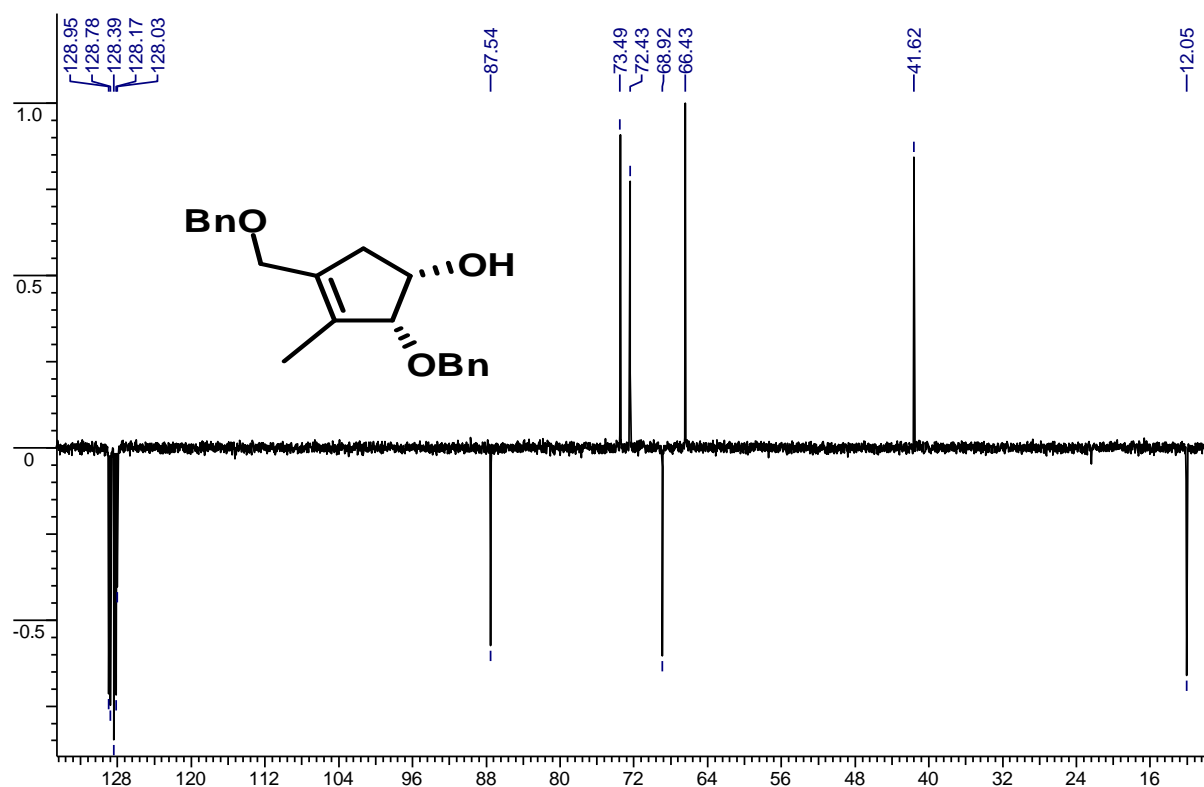
RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (±)-26



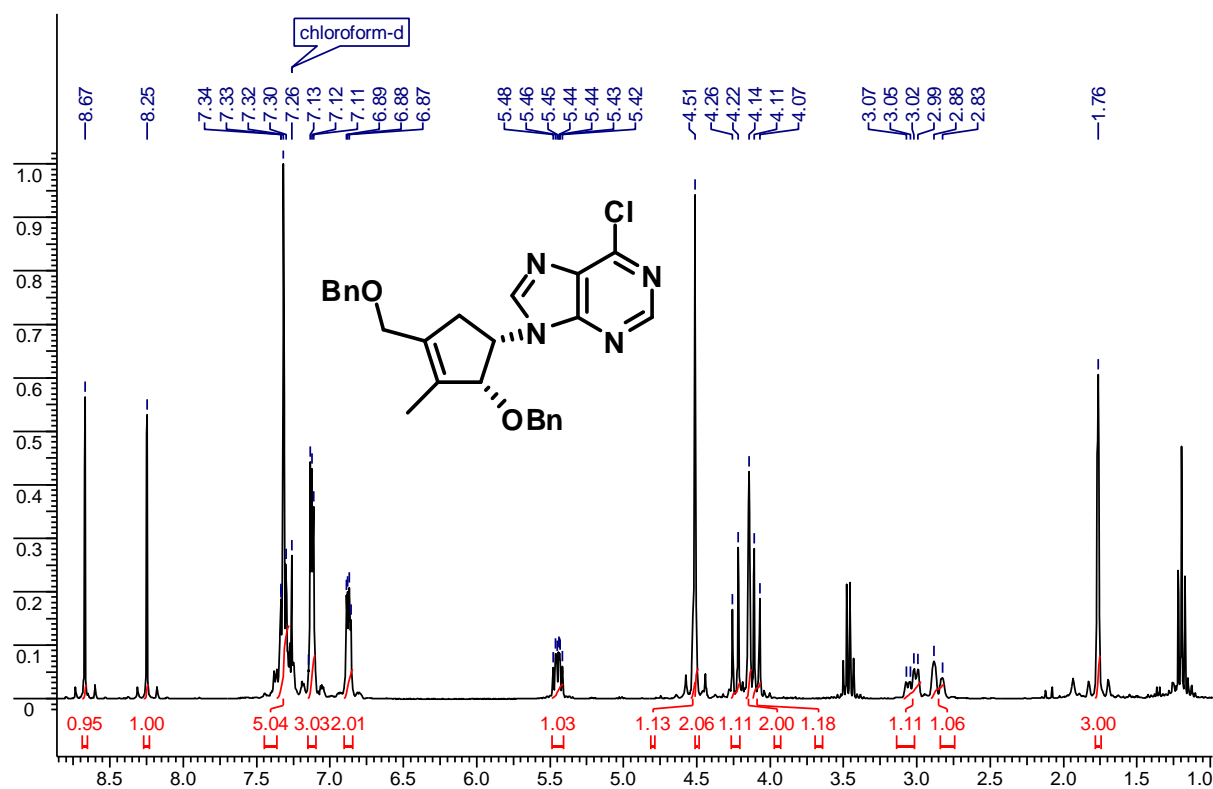
RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**26**DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**26**

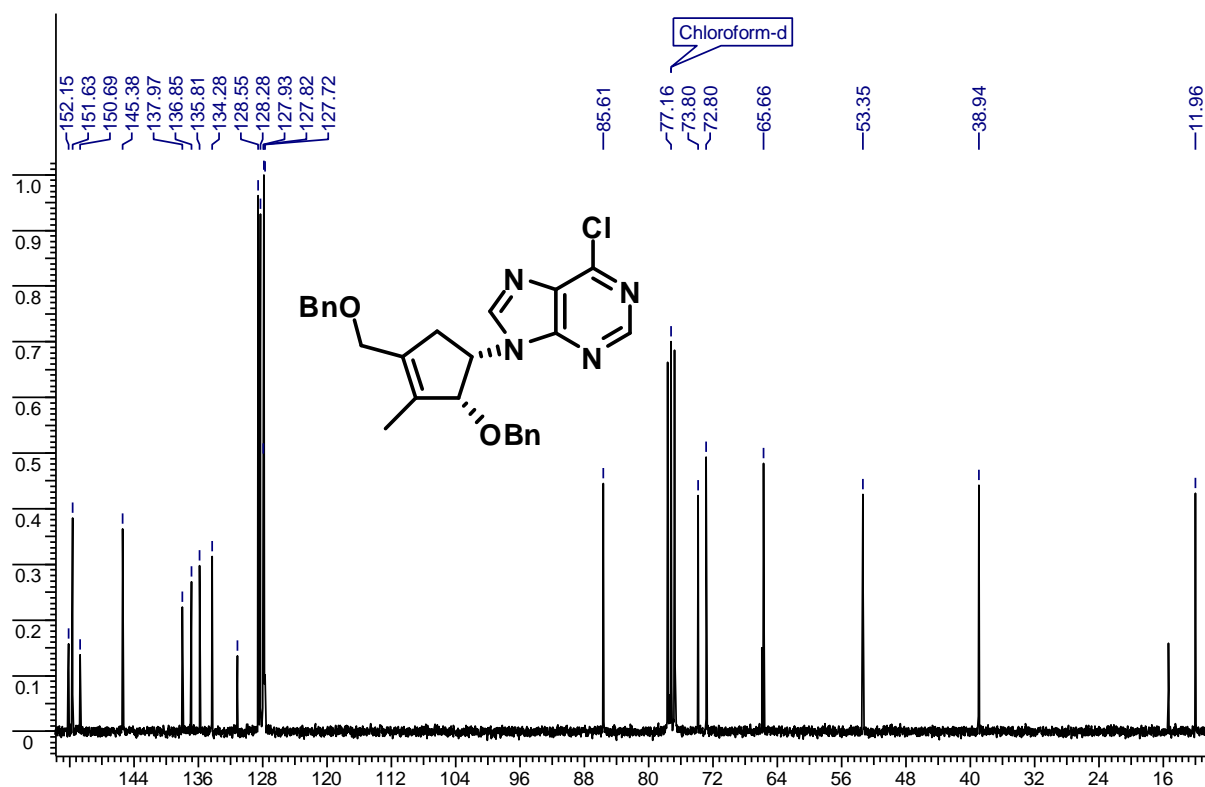
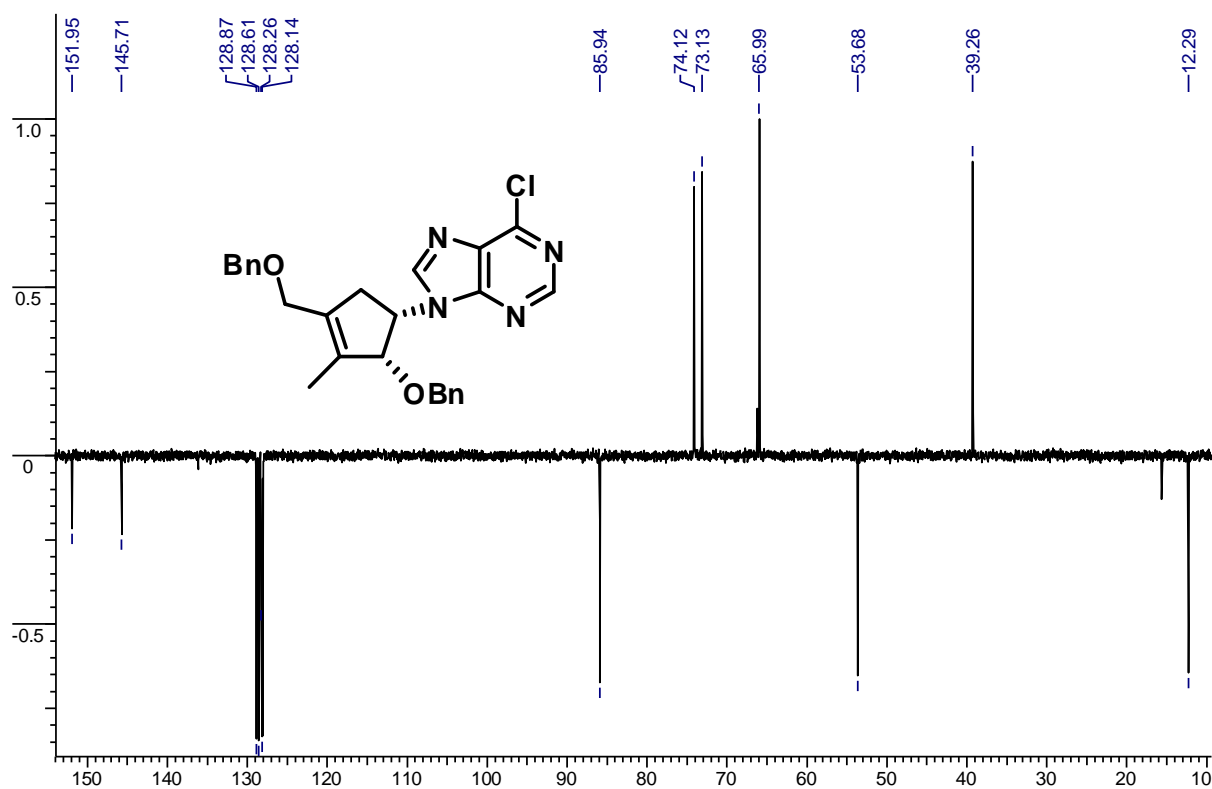
RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**27**RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**27**

DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (±)-27

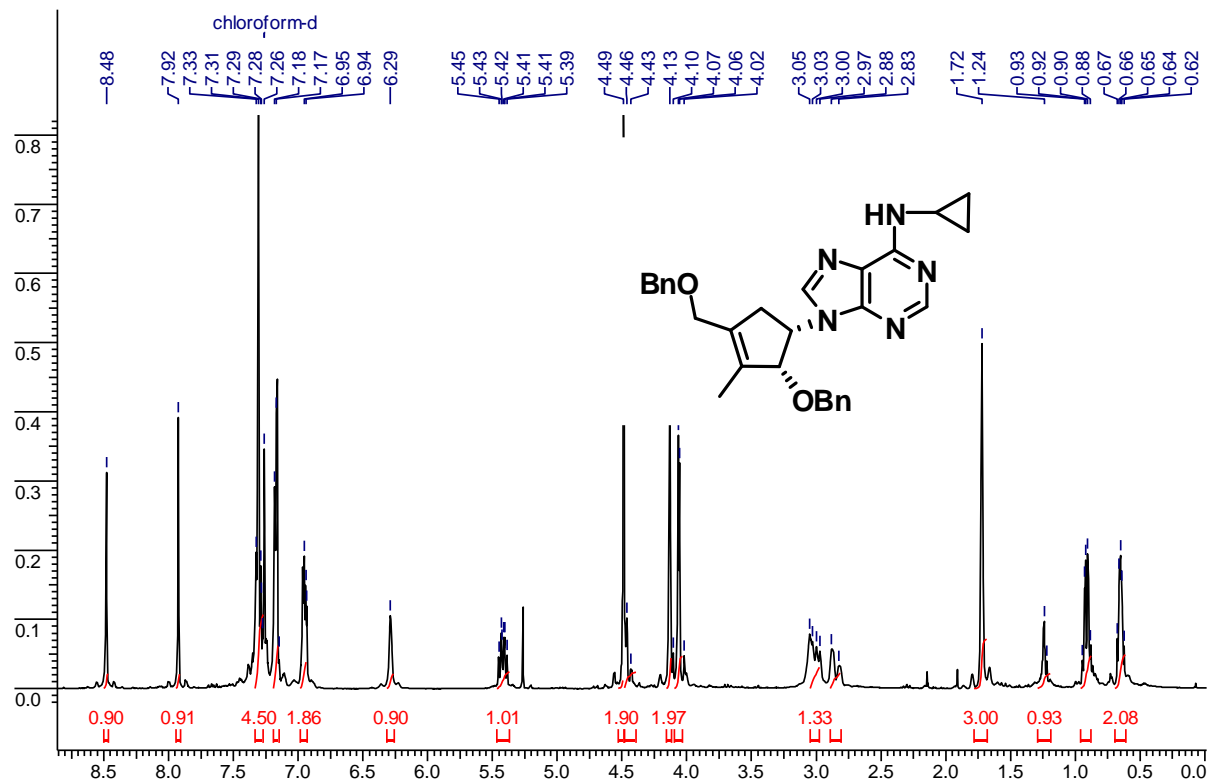


RMN ¹H 300 MHz solvant : chloroforme composé (±)-28

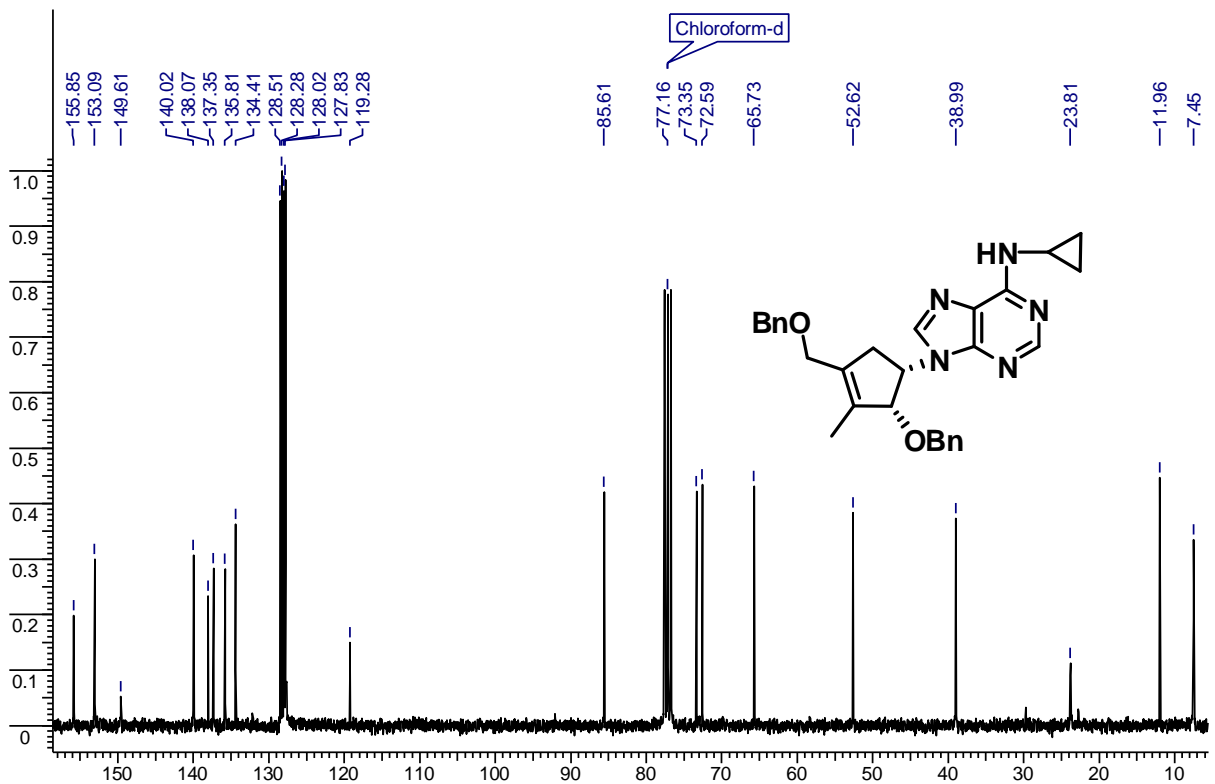


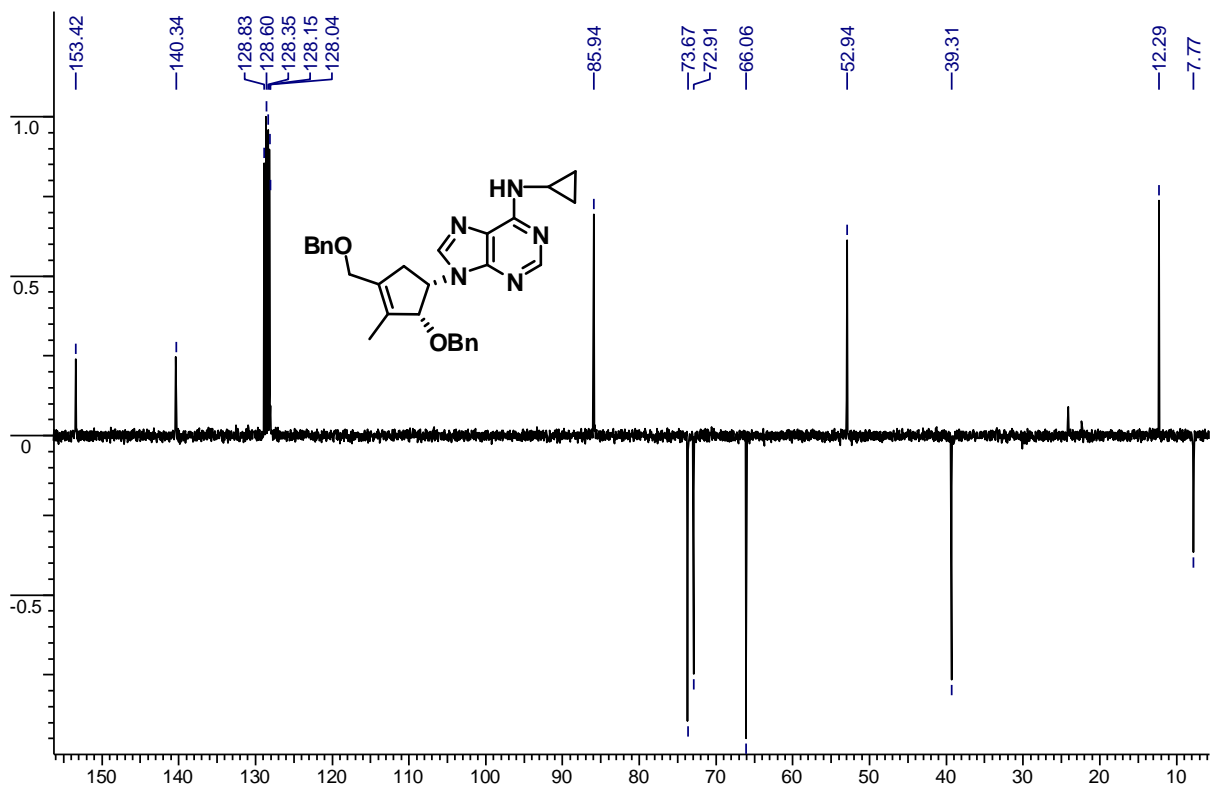
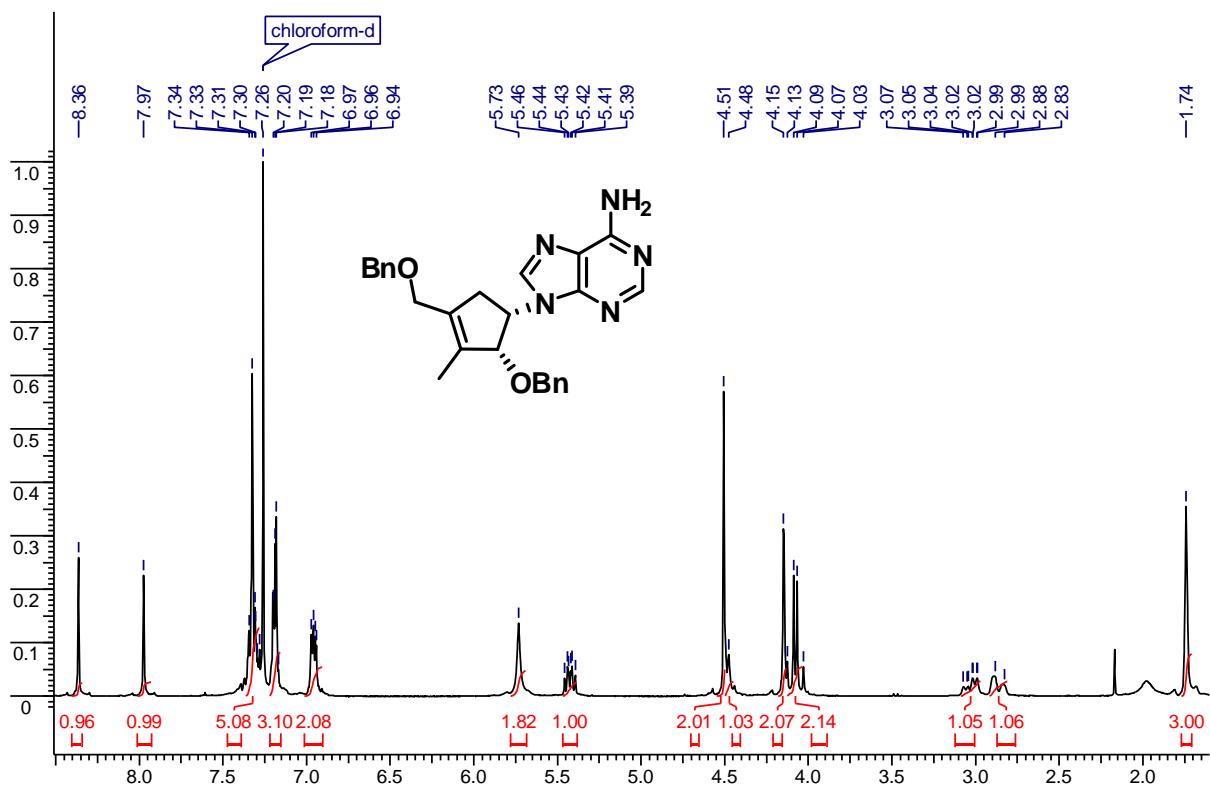
RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**28**DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**28**

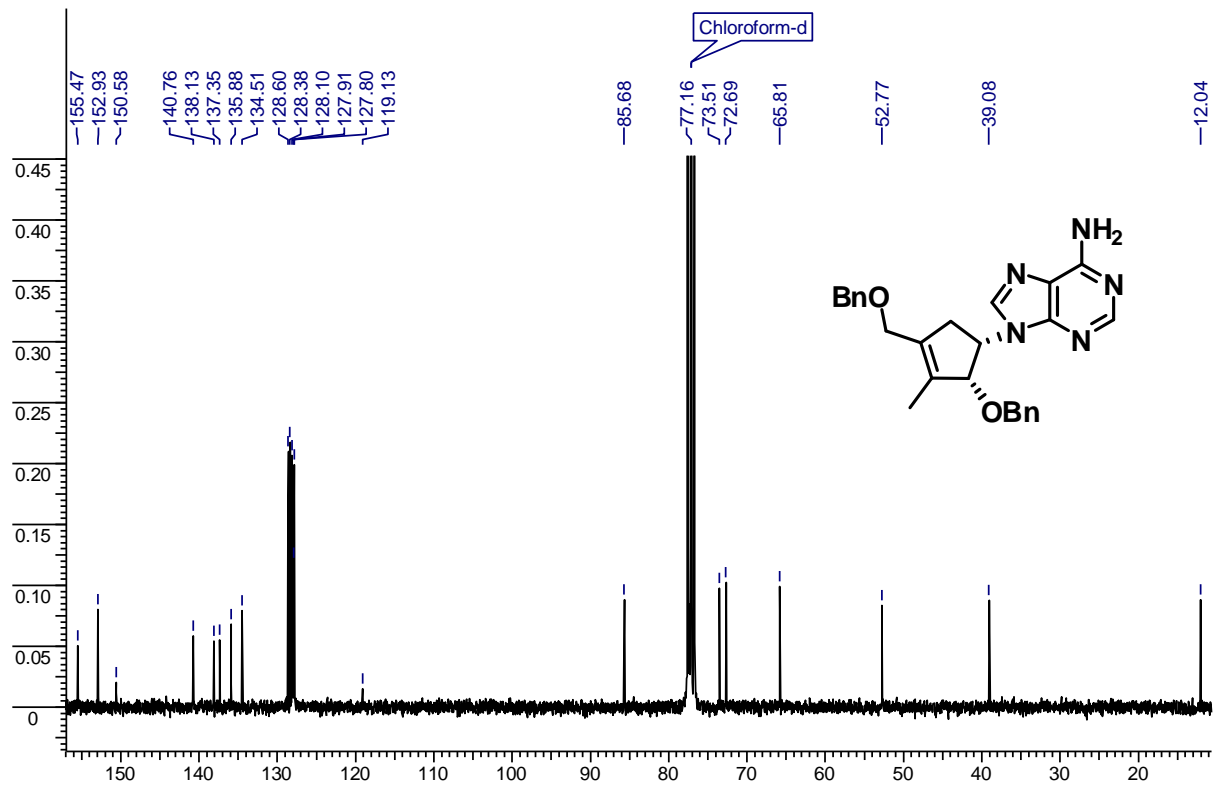
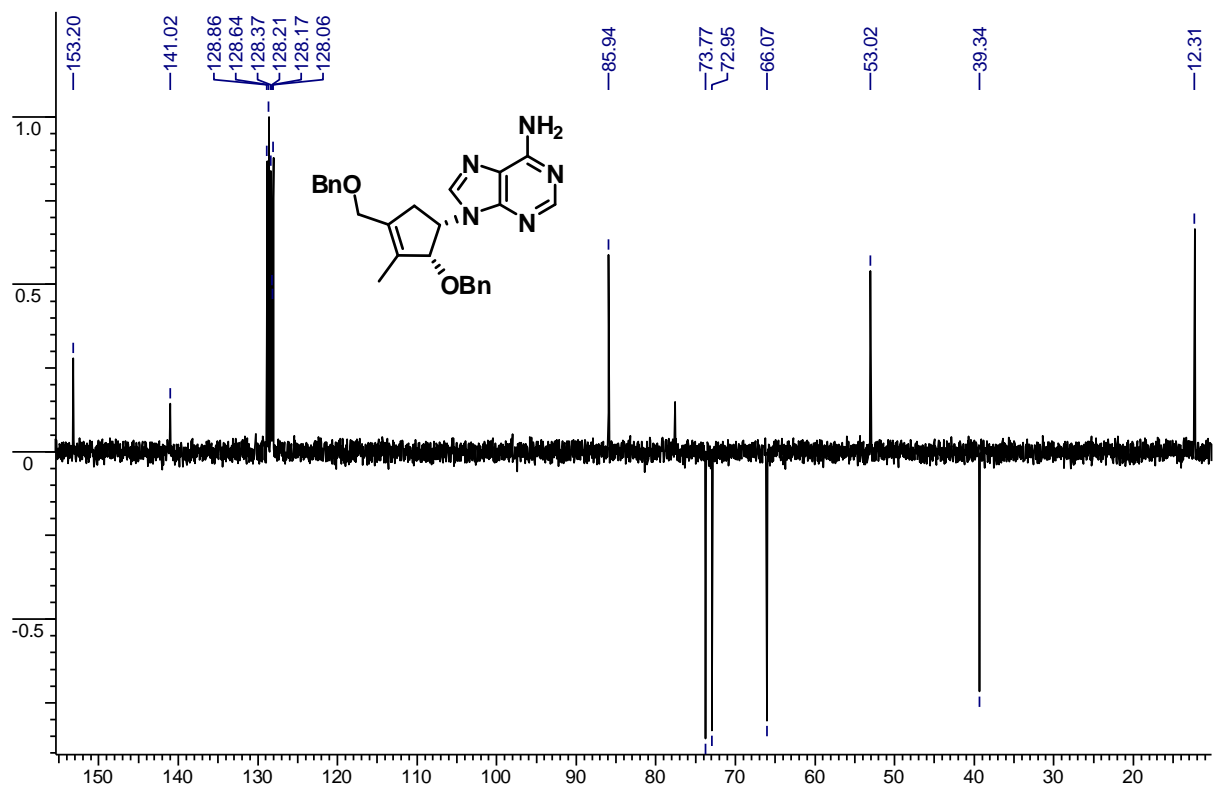
RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**29a**

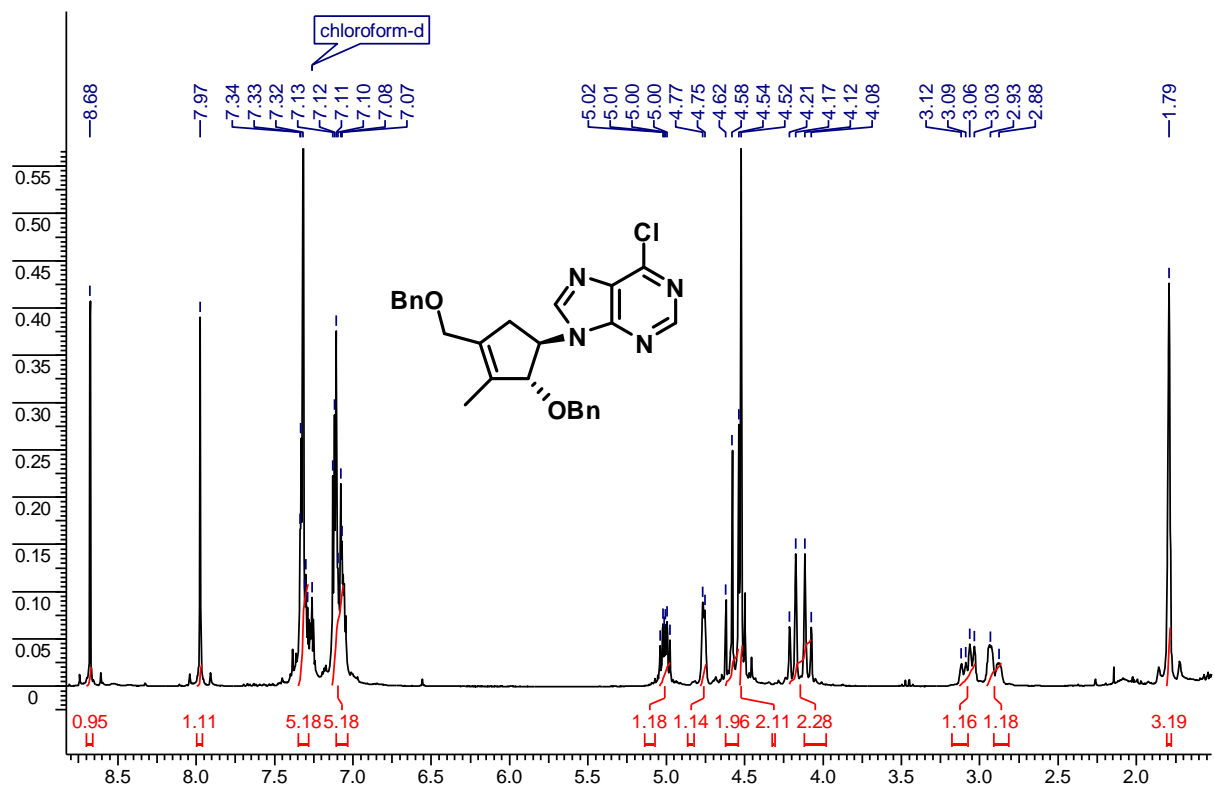
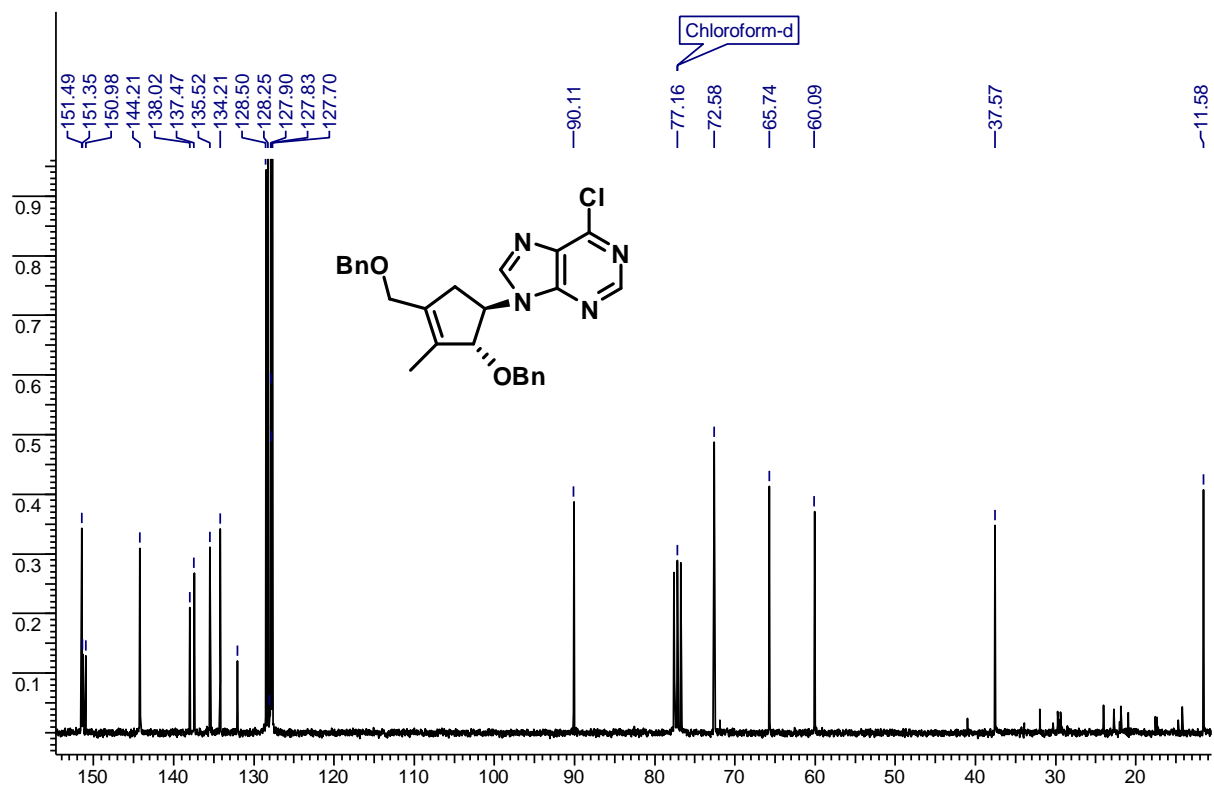


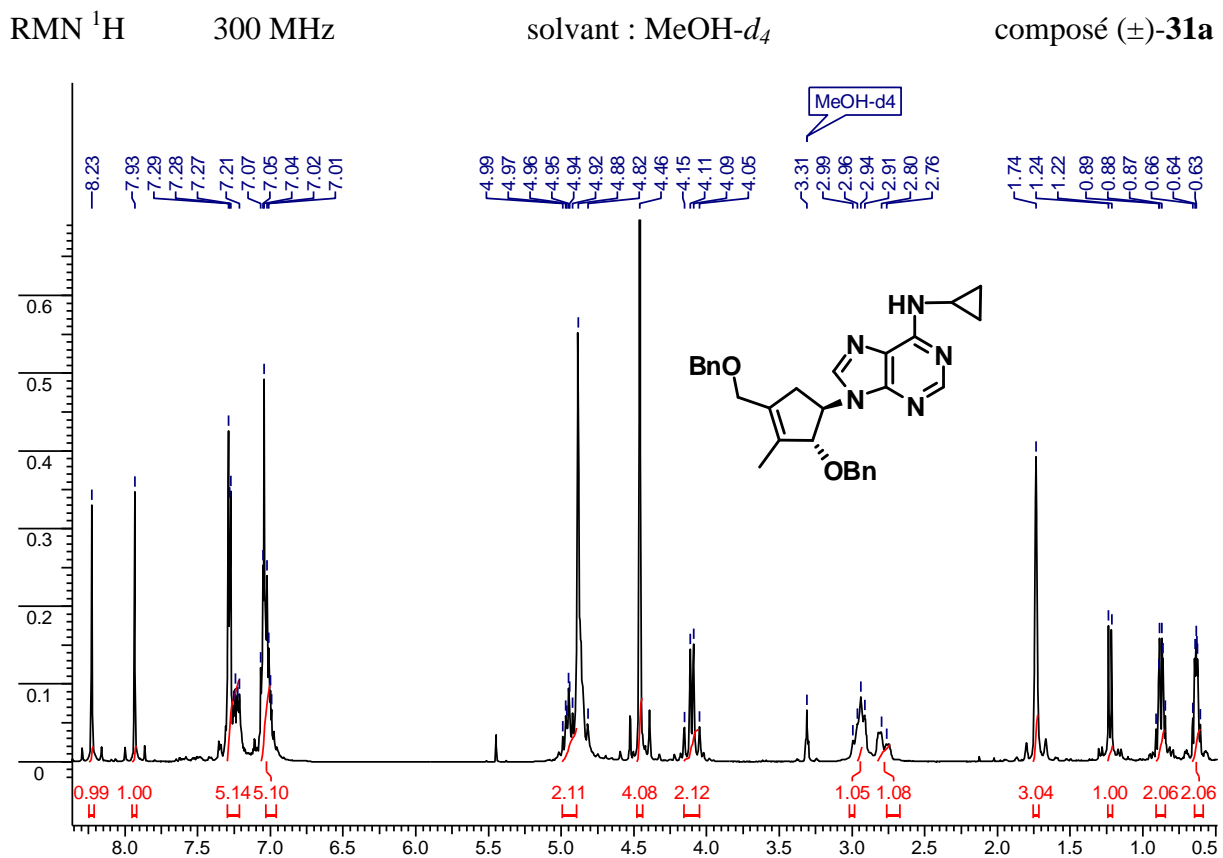
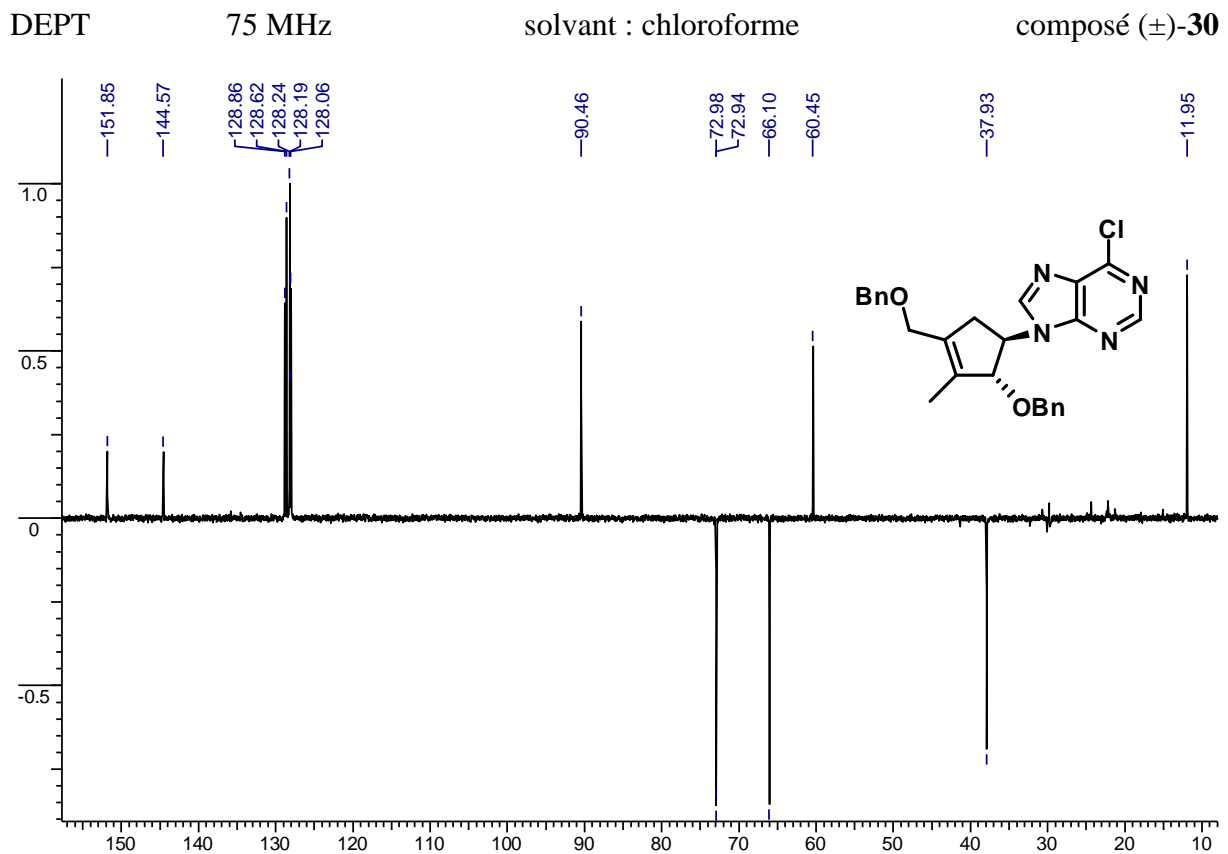
RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**29a**

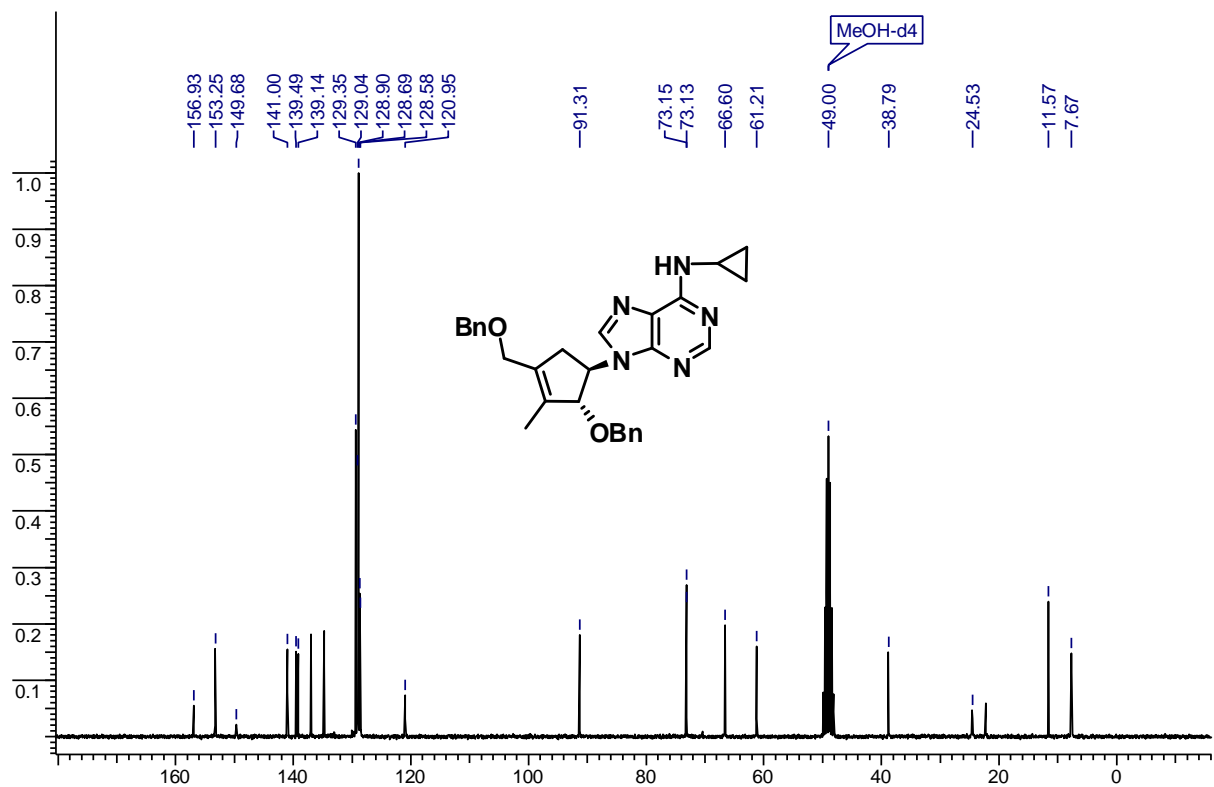
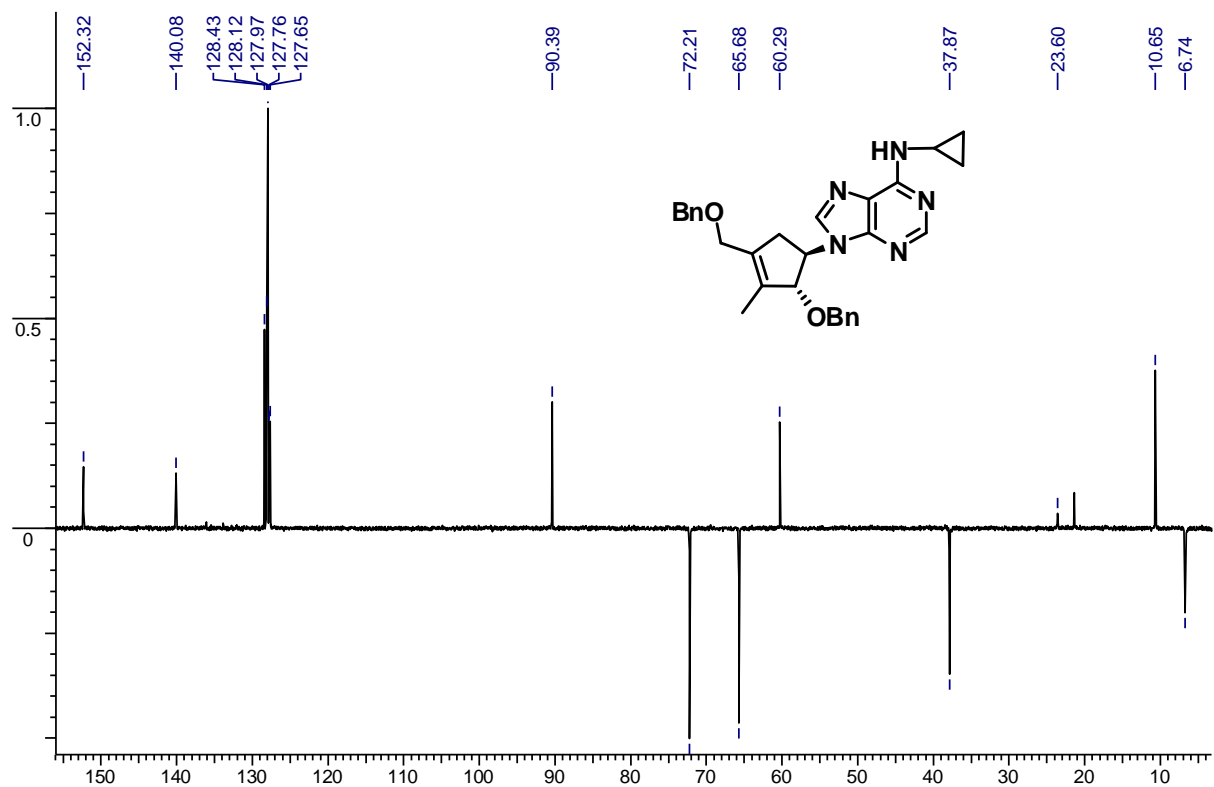


DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (±)-**29a**RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (±)-**29b**

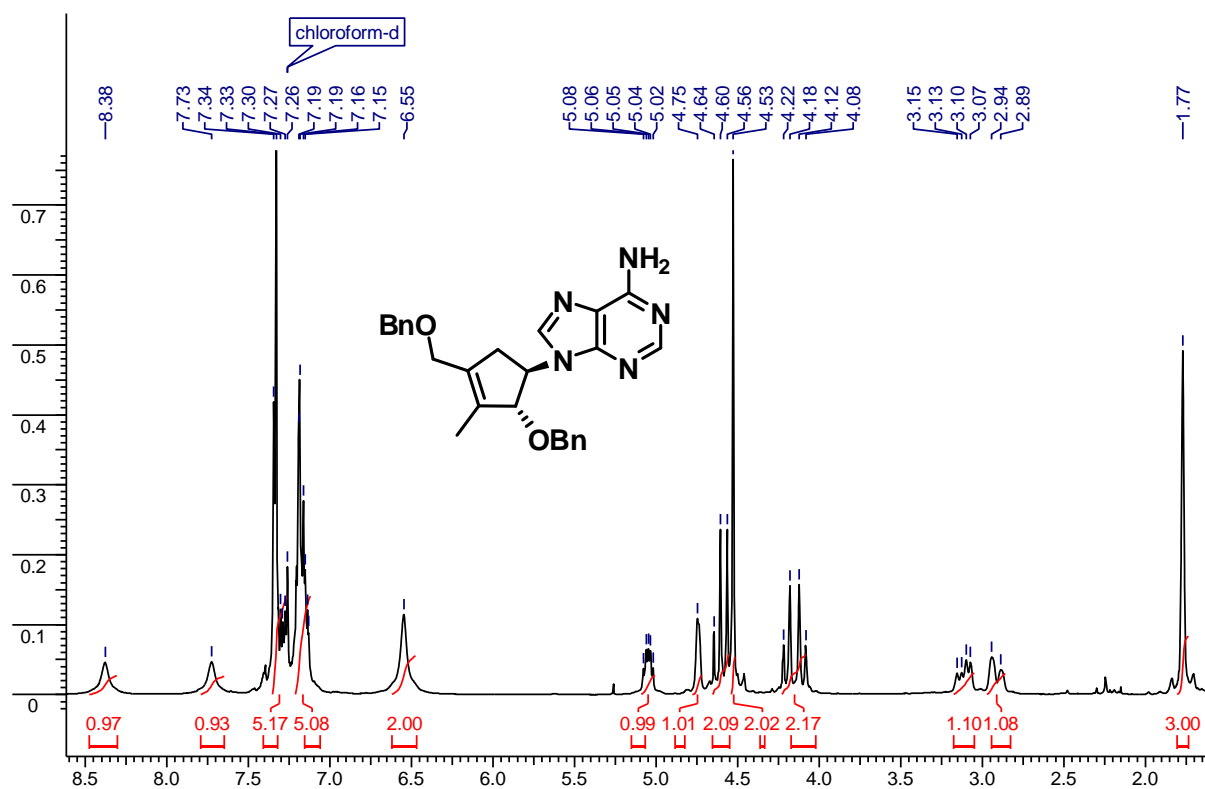
RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**29b**DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**29b**

RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**30**RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**30**

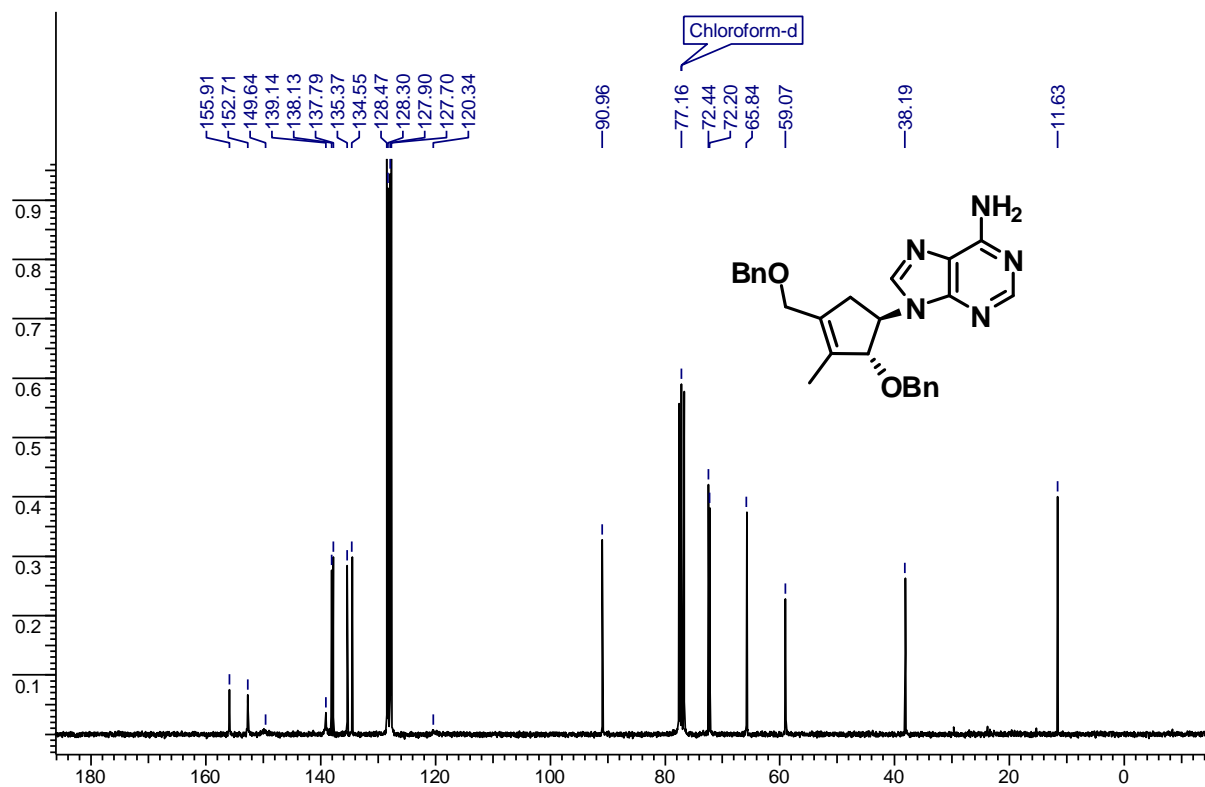


RMN ^{13}C 75 MHz solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**31a**DEPT 75 MHz solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**31a**

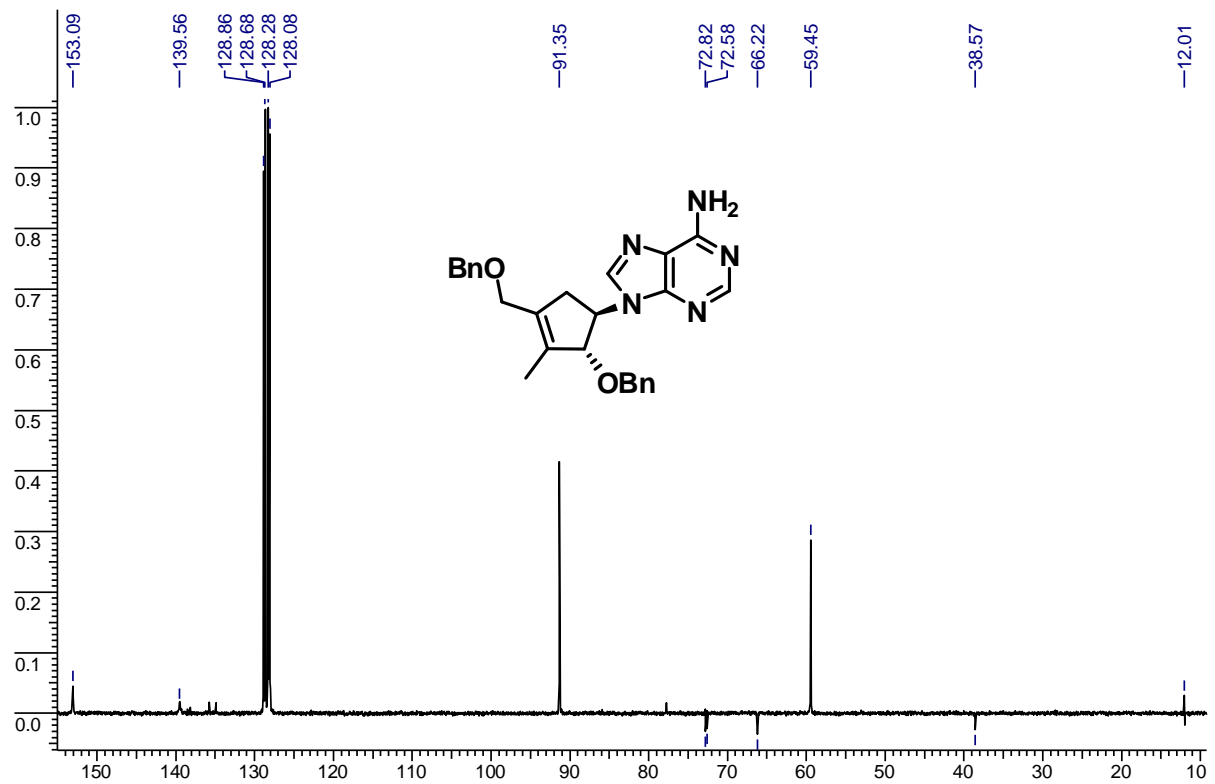
RMN ^1H 300 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**31b**



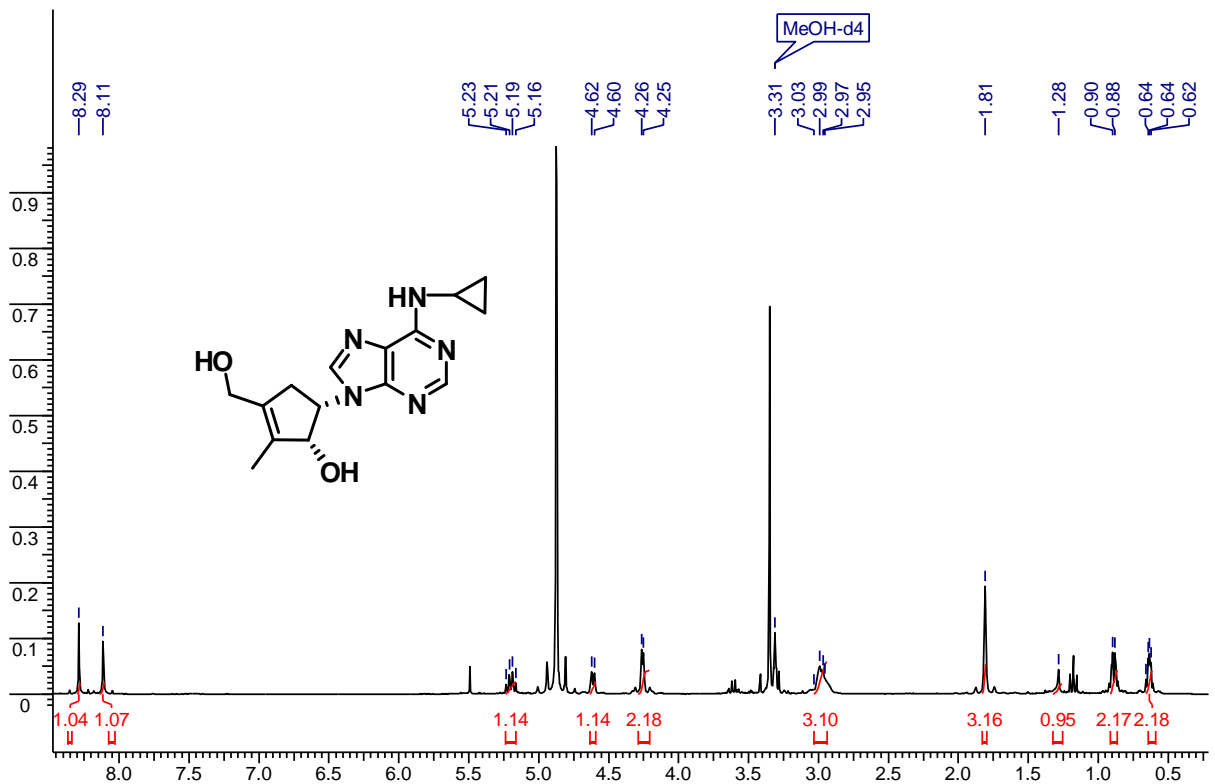
RMN ^{13}C 75 MHz solvant : chloroforme composé (\pm)-**31b**

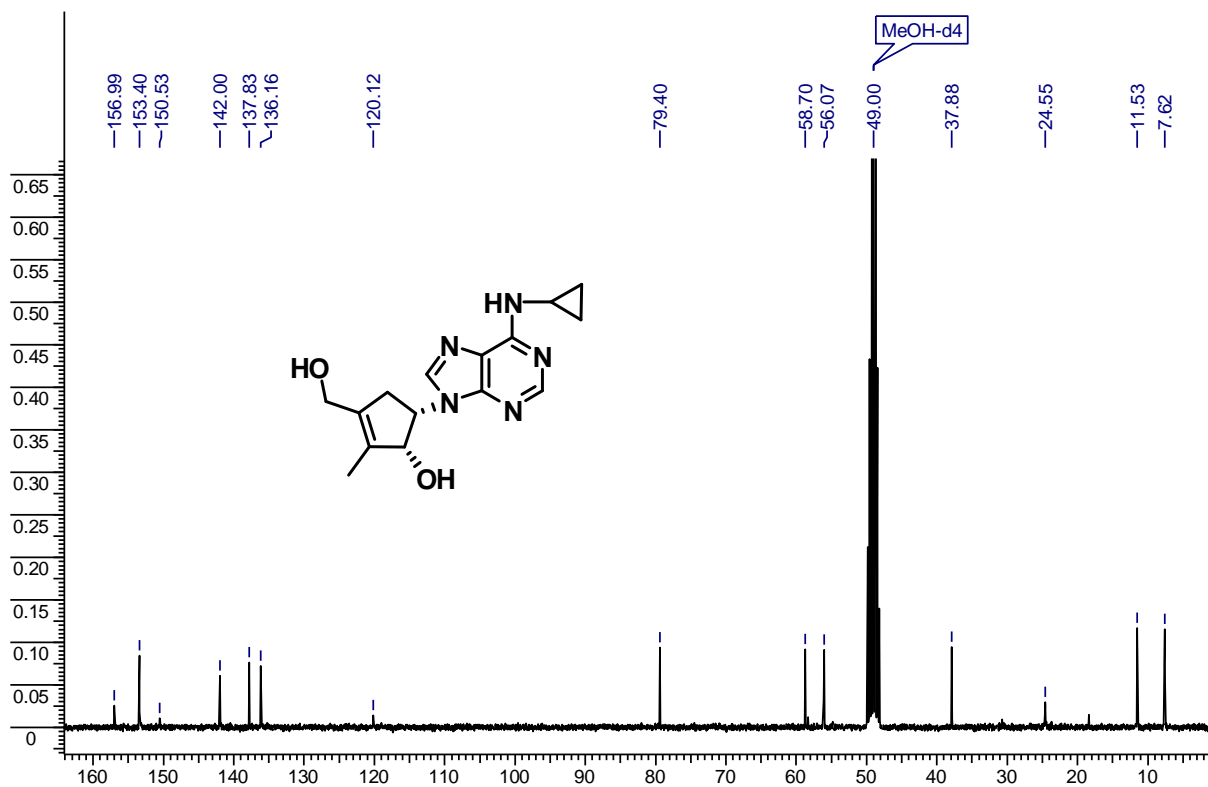
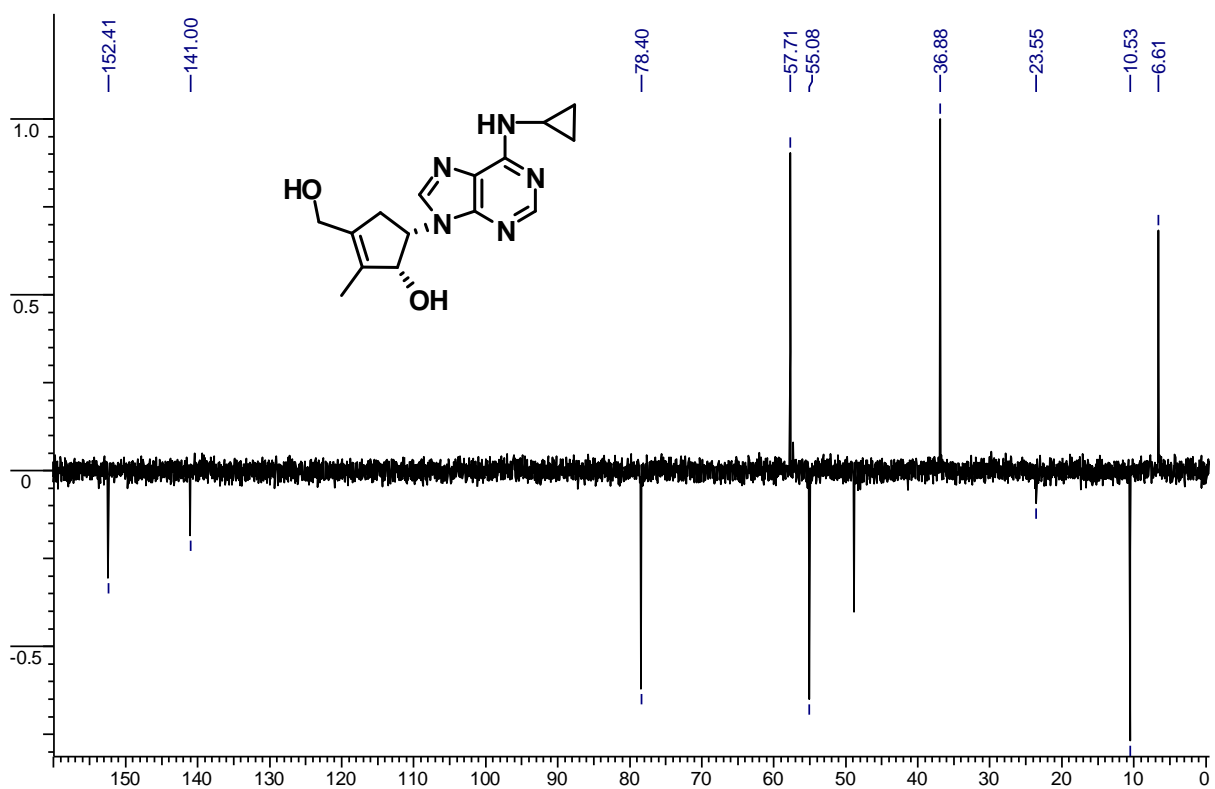


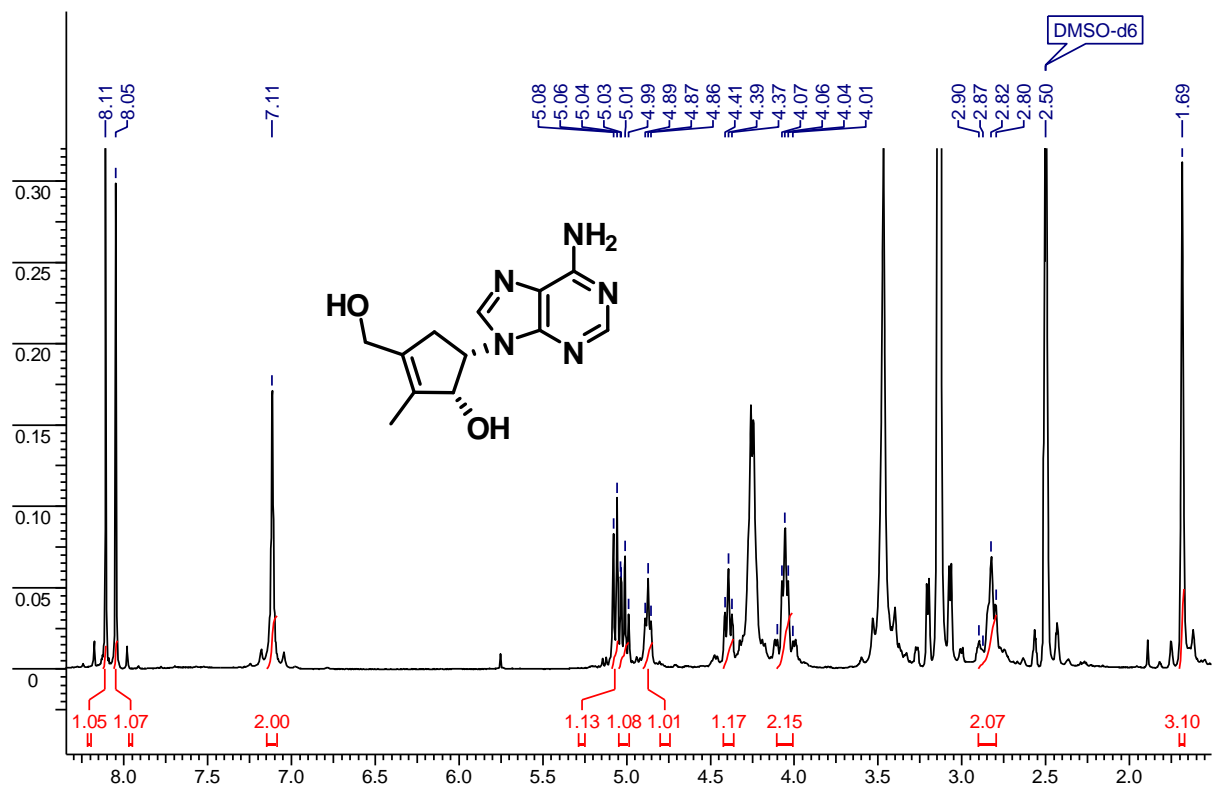
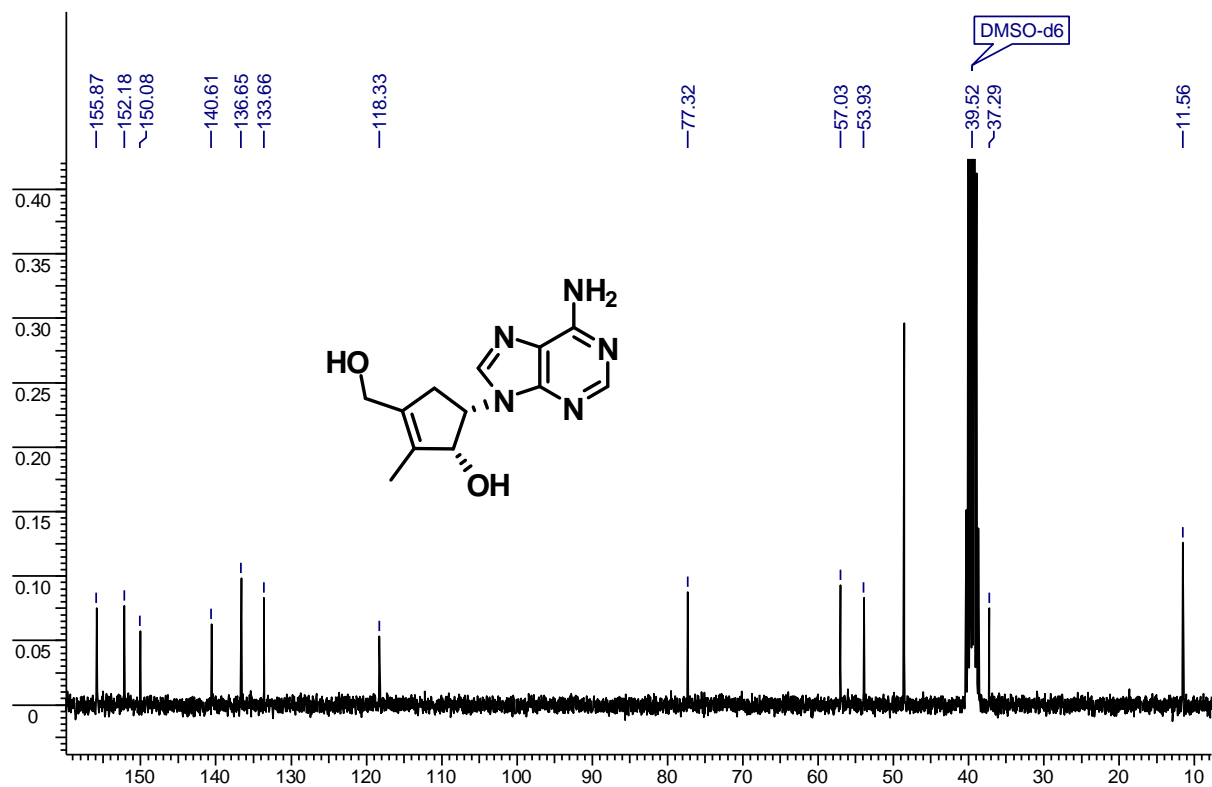
DEPT 75 MHz solvant : chloroforme composé (±)-**31b**



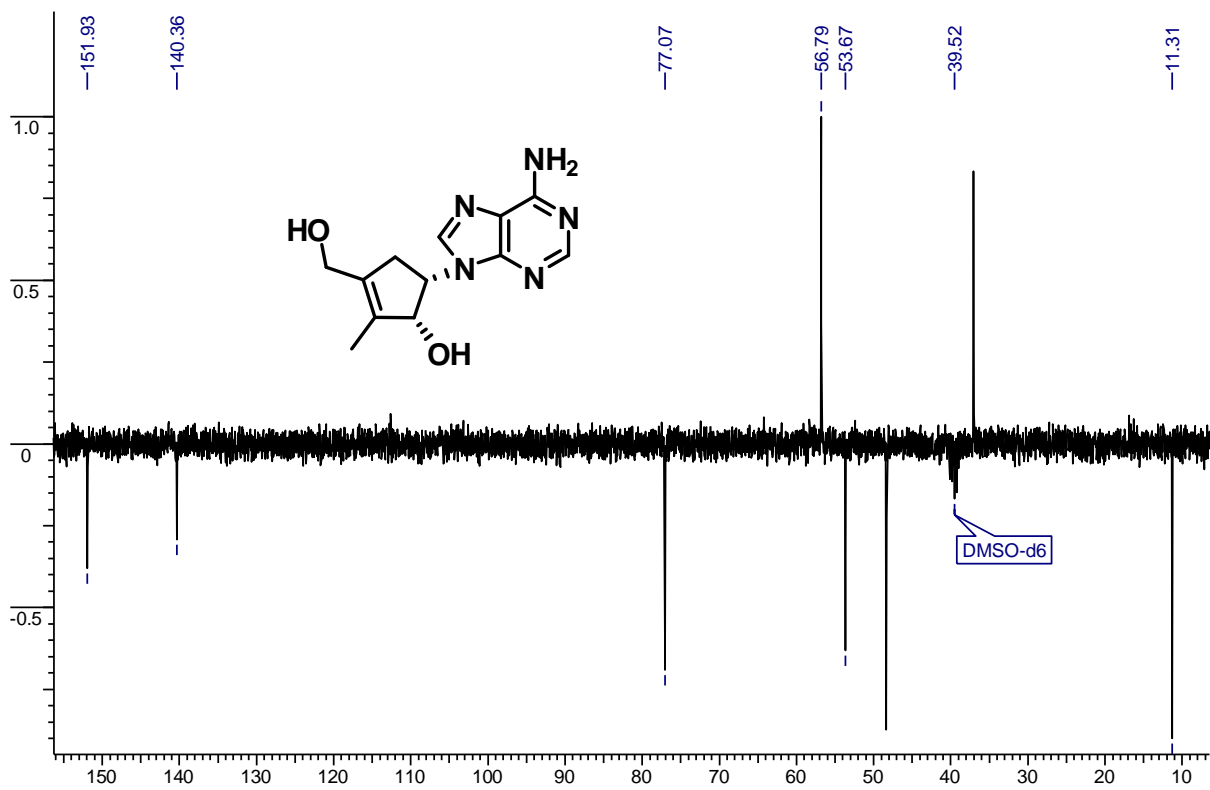
RMN ^1H 300 MHz solvant : MeOH- d_4 composé (±)-**2a**



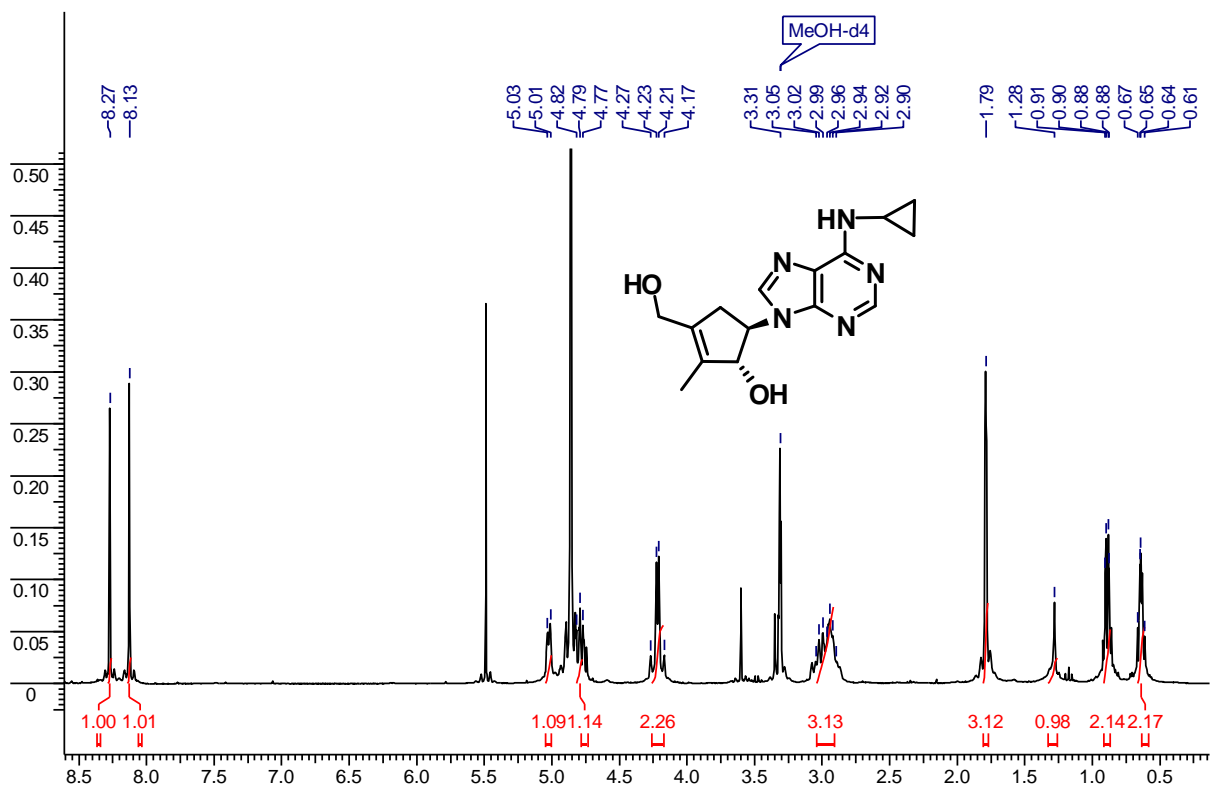
RMN ^{13}C 75 MHz solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**2a**DEPT 75 MHz solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**2a**

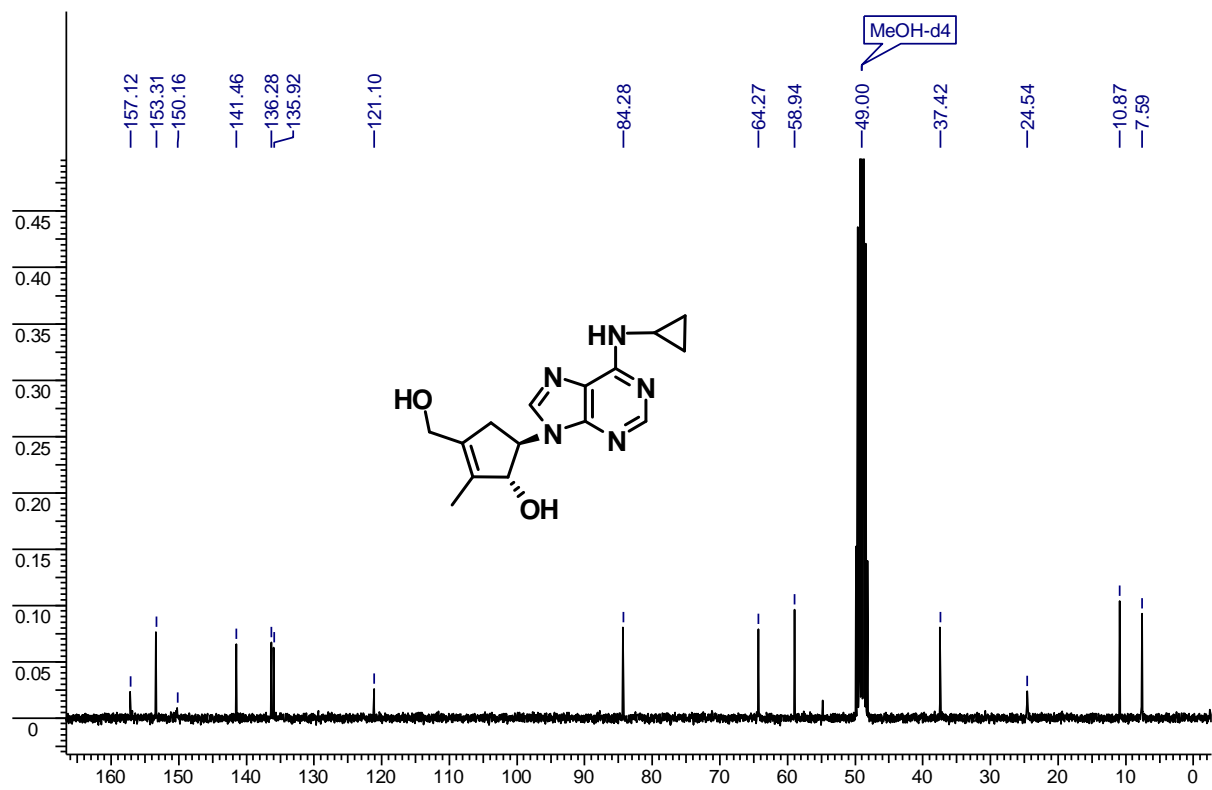
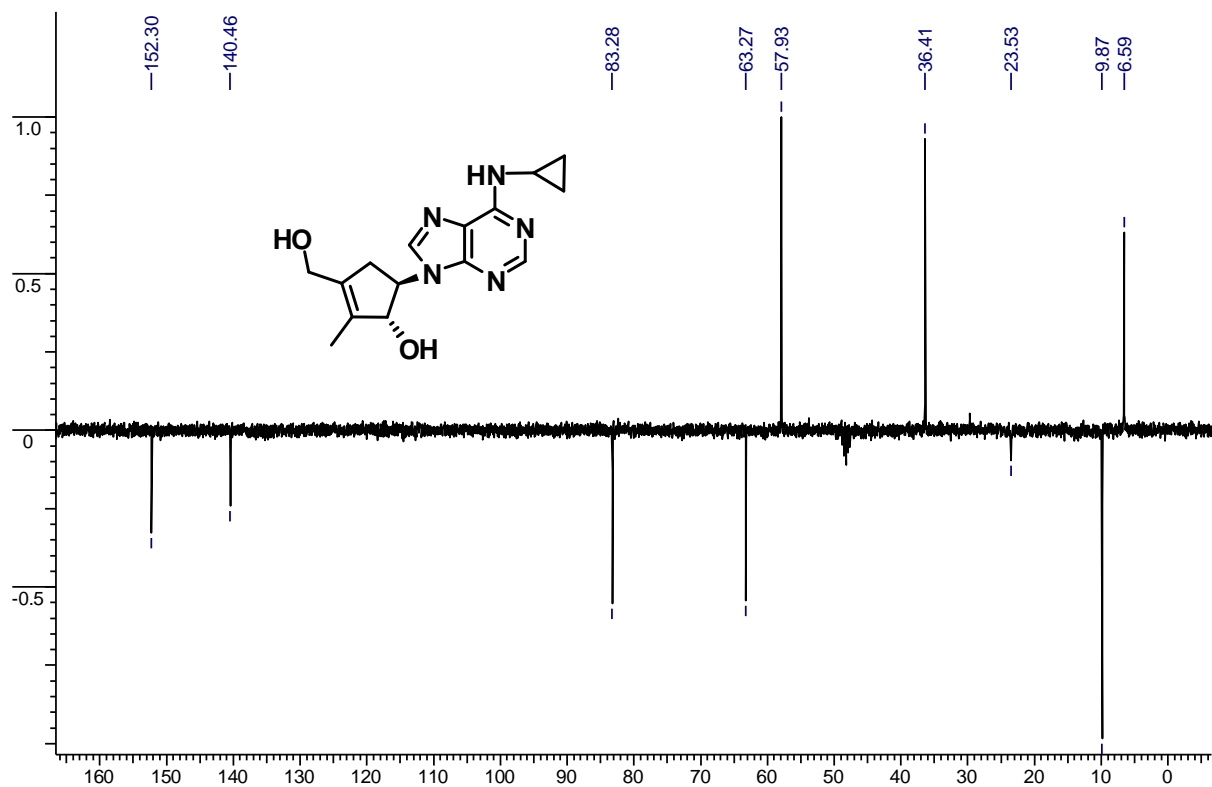
RMN ^1H 300 MHz solvant : $\text{DMSO-}d_6$ composé (\pm)-**2b**RMN ^{13}C 75 MHz solvant : $\text{DMSO-}d_6$ composé (\pm)-**2b**

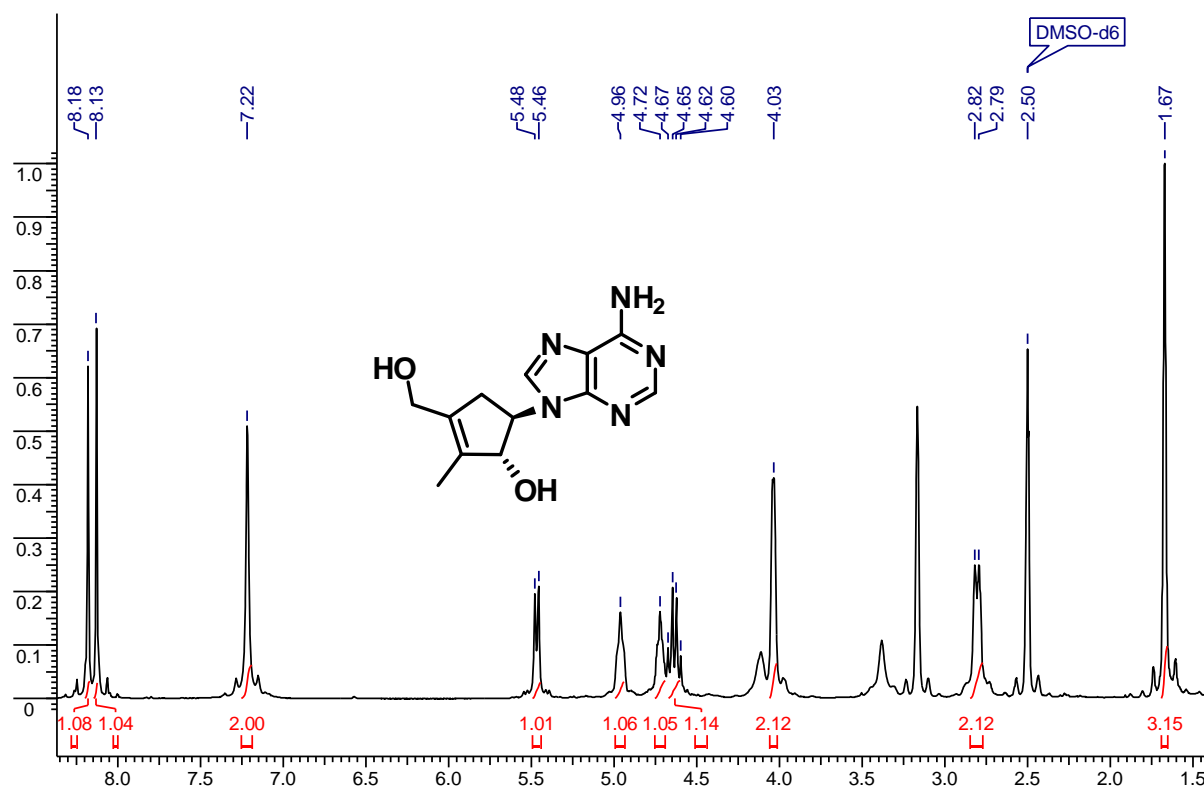
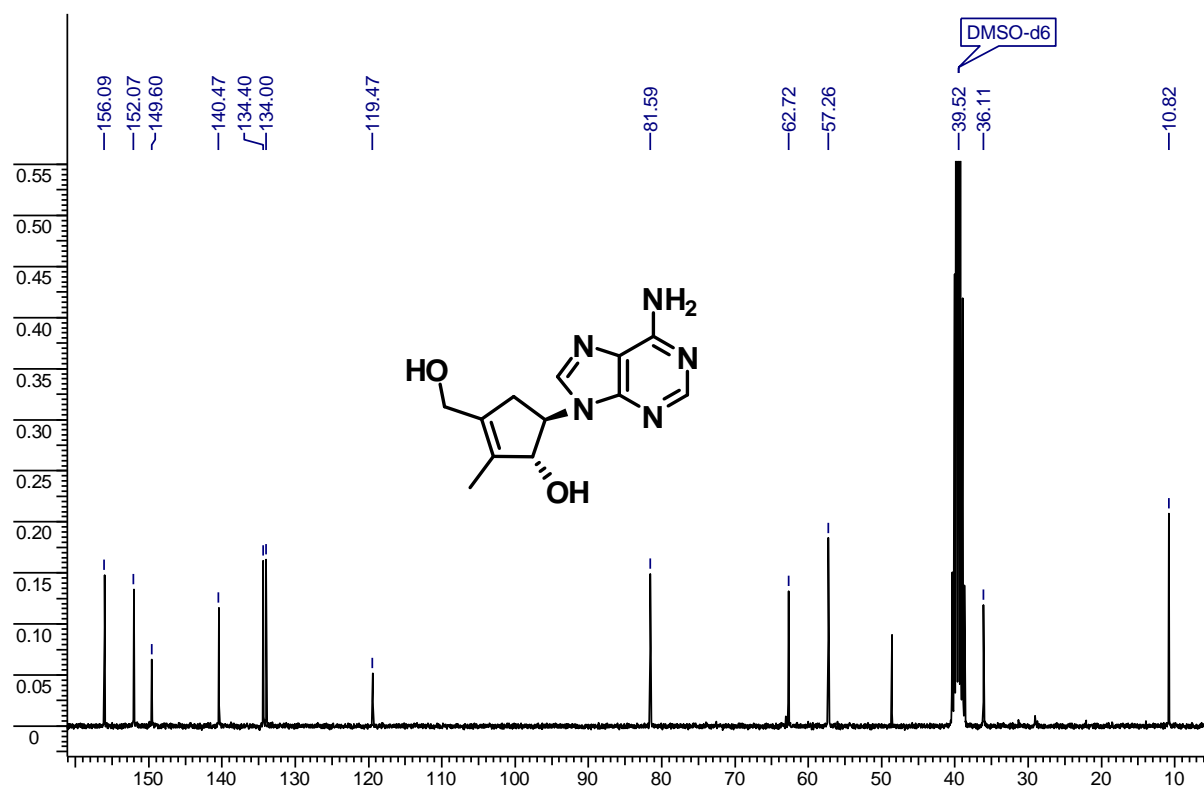
DEPT 75 MHz solvant : DMSO- d_6 composé (\pm)-**2b**

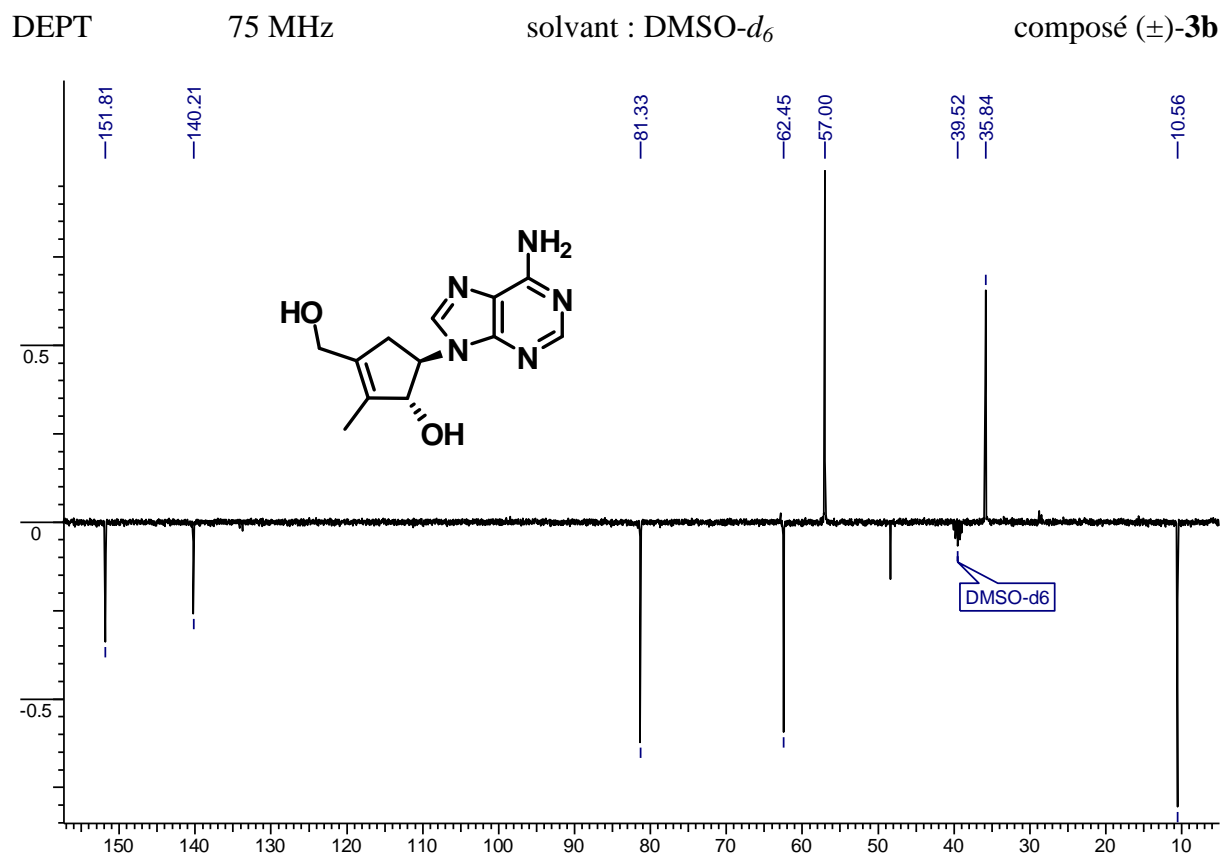


RMN ^1H 300 MHz solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**3a**

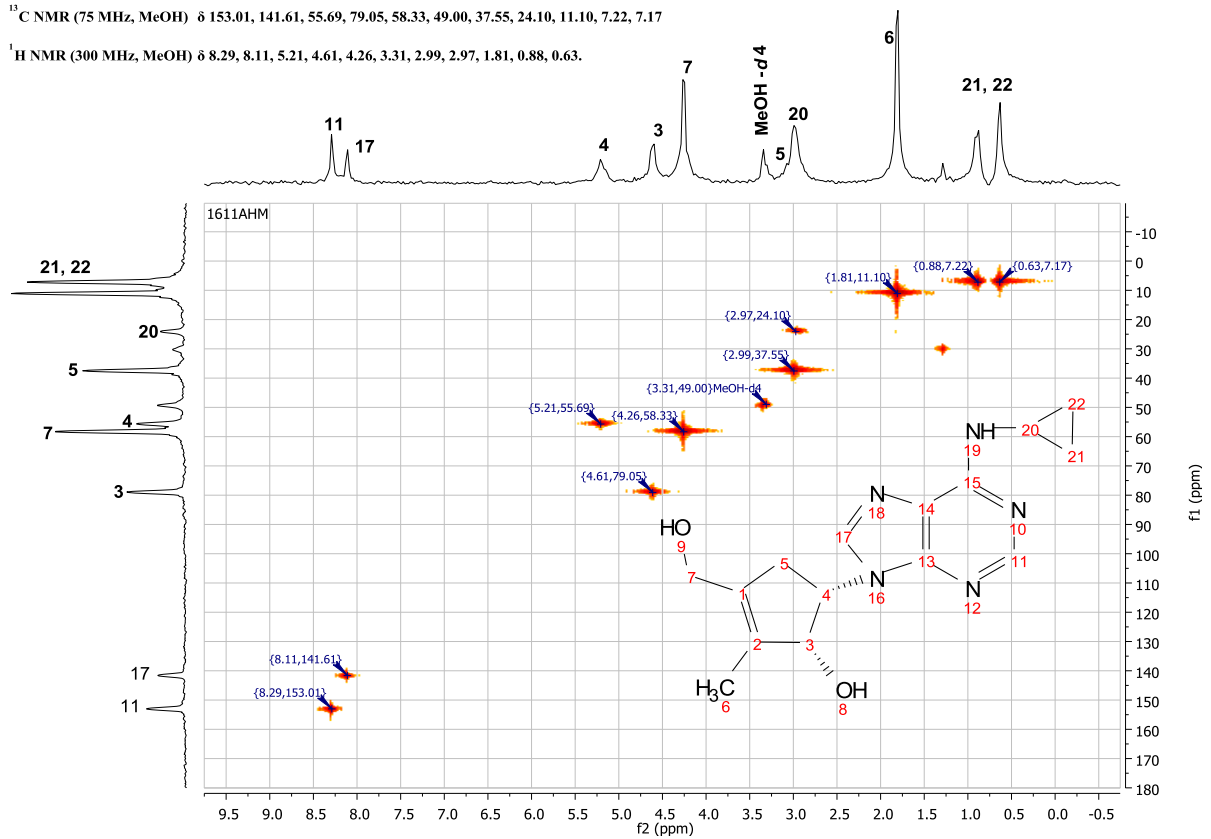


RMN ^{13}C 75 MHz solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**3a**DEPT 75 MHz solvant : MeOH- d_4 composé (\pm)-**3a**

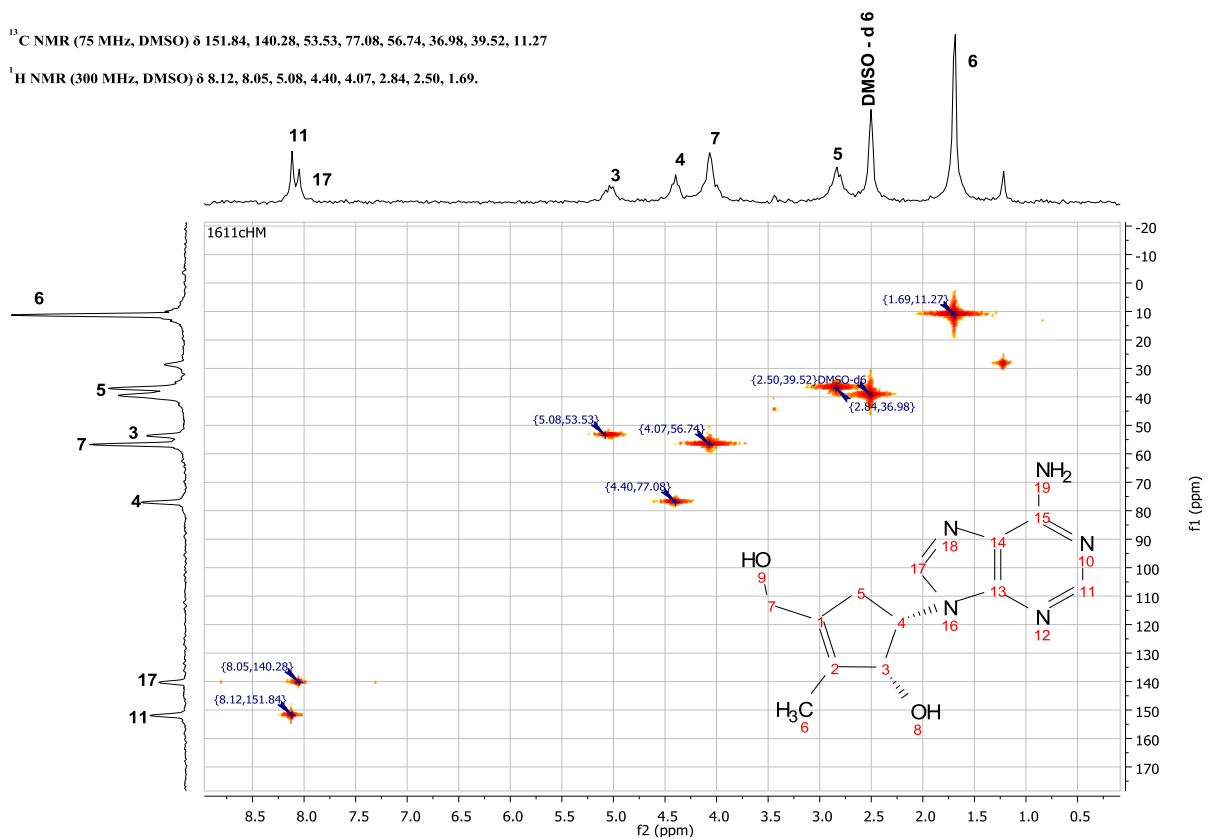
RMN ^1H 300 MHz solvant : $\text{DMSO-}d_6$ composé (\pm)-**3b**RMN ^{13}C 75 MHz solvant : $\text{DMSO-}d_6$ composé (\pm)-**3b**



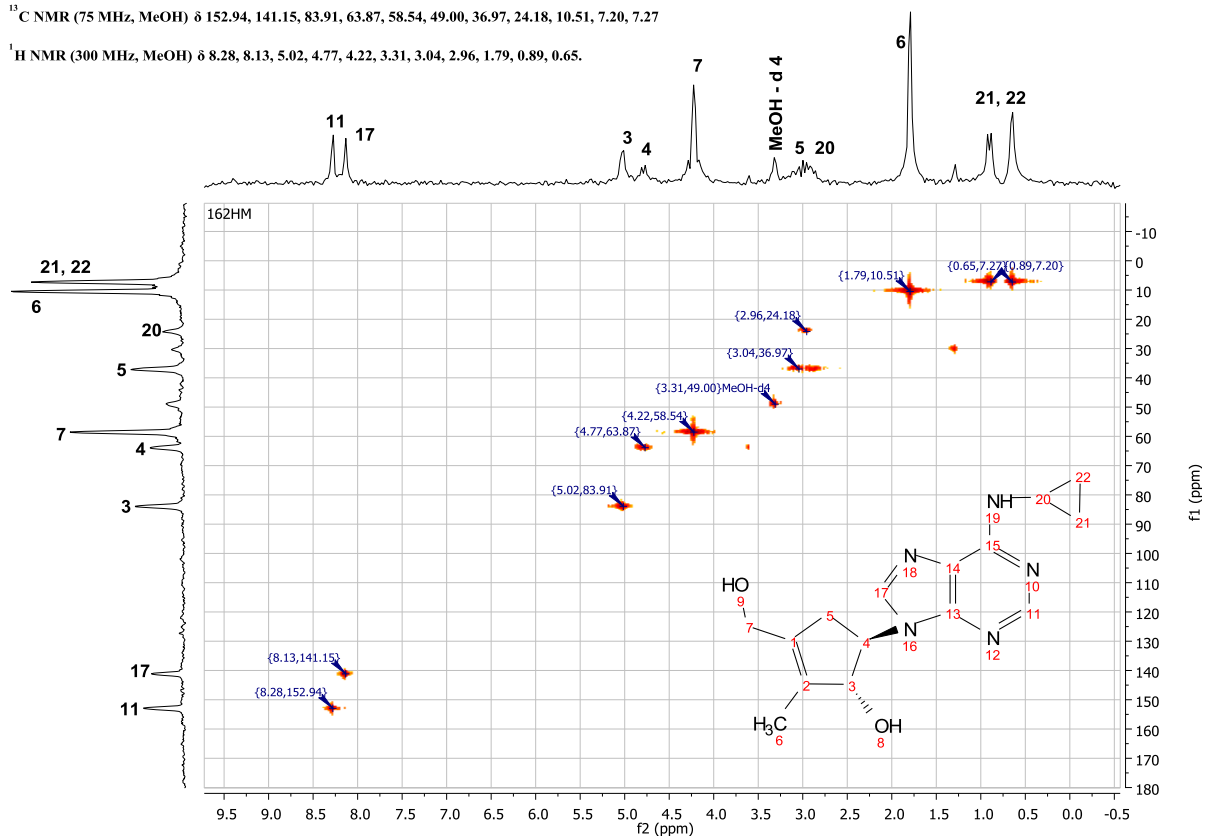
HMQC

solvant : MeOH-*d*₄composé (±)-**2a**¹³C NMR (75 MHz, MeOH) δ 153.01, 141.61, 55.69, 79.05, 58.33, 49.00, 37.55, 24.10, 11.10, 7.22, 7.17¹H NMR (300 MHz, MeOH) δ 8.29, 8.11, 5.21, 4.61, 4.26, 3.31, 2.99, 2.97, 1.81, 0.88, 0.63.

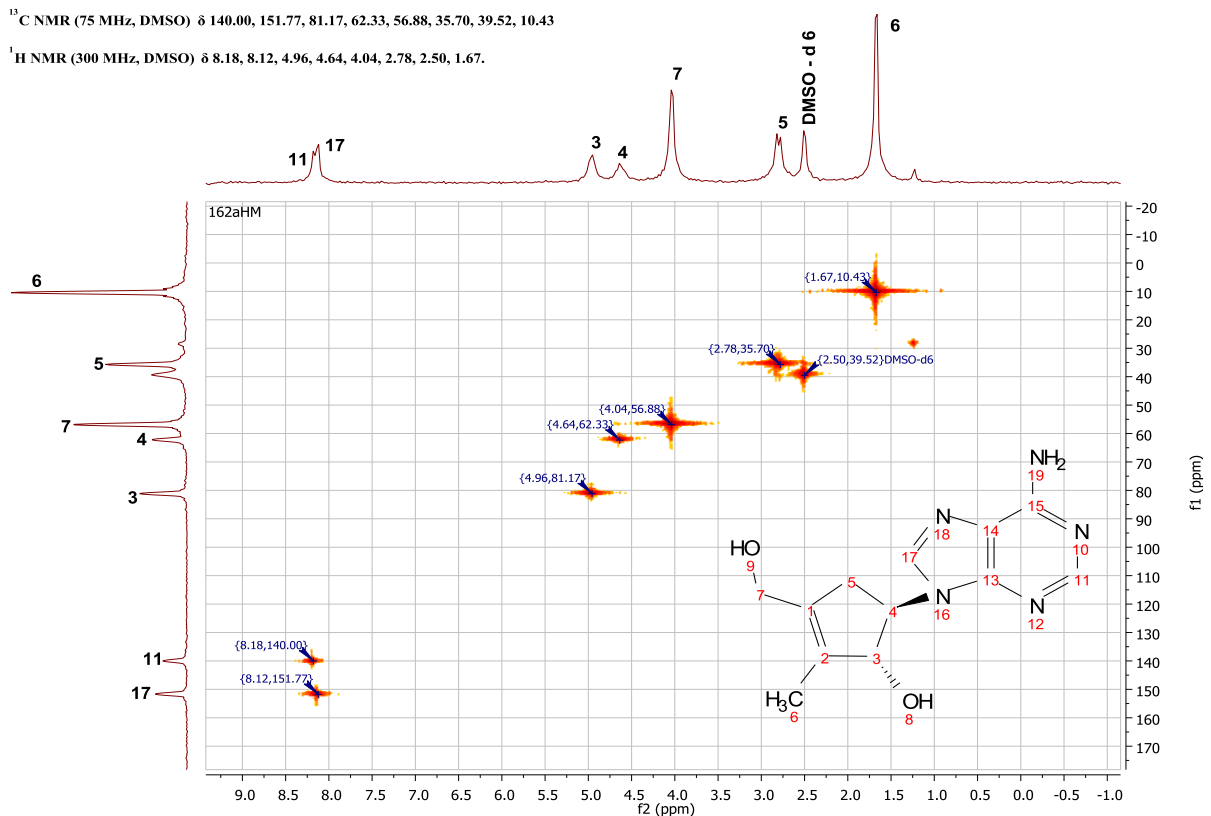
HMQC

solvant : DMSO-*d*₆composé (±)-**2b**¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 151.84, 140.28, 53.53, 77.08, 56.74, 36.98, 39.52, 11.27¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.12, 8.05, 5.08, 4.40, 4.07, 2.84, 2.50, 1.69.

HMQC

solvant : MeOH-*d*₄composé (±)-**3a**¹³C NMR (75 MHz, MeOH) δ 152.94, 141.15, 83.91, 63.87, 58.54, 49.00, 36.97, 24.18, 10.51, 7.20, 7.27¹H NMR (300 MHz, MeOH) δ 8.28, 8.13, 5.02, 4.77, 4.22, 3.31, 3.04, 2.96, 1.79, 0.89, 0.65.

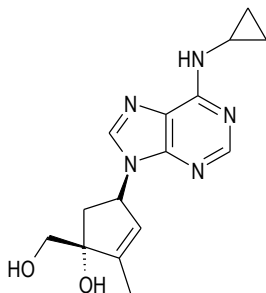
HMQC

solvant : DMSO-*d*₆composé (±)-**3b**¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 140.00, 151.77, 81.17, 62.33, 56.88, 35.70, 39.52, 10.43¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.18, 8.12, 4.96, 4.64, 4.04, 2.78, 2.50, 1.67.

Spectrométrie de masse après ionisation electrospray (ESI-MS) des molécules cibles (±)-1a-b, (±)-2a-b et (±)-3a-b

1. Mesure de la masse exacte du composé (±)-1a par MS haute résolution

1.1. Echantillon



Composé : (±)-1a

Formule brute : C₁₅H₁₉N₅O₂

Masse monoisotopique : 301.1539 Da

1.2. Conditions expérimentales

Matériel

Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse QStar Elite (Applied Biosystems SCIEX) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) assistée pneumatiquement.

L'échantillon a été ionisé en mode electrospray positif dans les conditions suivantes : tension electrospray (ISV) : 5500 V ; tension d'orifice (OR) : 20 V ; pression du gaz de nébulisation (air) : 20 psi.

Le spectre de masse haute résolution (MS) a été obtenu avec un analyseur temps de vol (TOF). La mesure de masse exacte a été effectuée en triplicat avec un double étalonnage interne.

Méthode

L'échantillon est dissout dans 400 µL de méthanol puis dilué au 1/10⁴ dans une solution de méthanol à 3mM d'acétate d'ammonium.

Etant donnée la masse du composé ciblé, les ions choisis pour références internes sont l'ion pseudo-moléculaire, [M+H]⁺, et l'adduit ammonium, [M+NH₄]⁺, de deux oligomères du poly(éthylène glycol) (PEG300) attendus respectivement à m/z 283.1751 et m/z 344.2278.

La solution de l'échantillon est dopée avec l'étalon interne puis introduite dans la source d'ionisation par infusion à un débit de 10 µL/min.

1.3. Résultats

L'ionisation electrospray en mode positif de la molécule recherchée génère principalement l'ion pseudo-moléculaire, $[M+H]^+$, dont la masse exacte théorique est 302.1612 Da. Les mesures de masse haute résolution ont été effectuées pour cet ion. Les données expérimentales obtenues sont présentées dans le Tableau 3. Un exemple de spectre de masse haute résolution obtenu après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (\pm)-**1a** est présenté (Figure 26).

		m/z	erreur (mDa)	erreur (ppm)
valeur théorique		302.1612	-	-
valeurs expérimentales	1	302.1606	- 0.6	- 2.0
	2	302.1611	- 0.1	- 0.3
	3	302.1611	- 0.1	- 0.3

Ces mesures expérimentales sont associées à un ion de composition élémentaire $C_{15}H_{20}N_5O_2$ qui comporte 9 insaturations.

Tableau 3 : Mesures de masse haute résolution de l'ion $[M+H]^+$, obtenues après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (\pm)-**1a**.

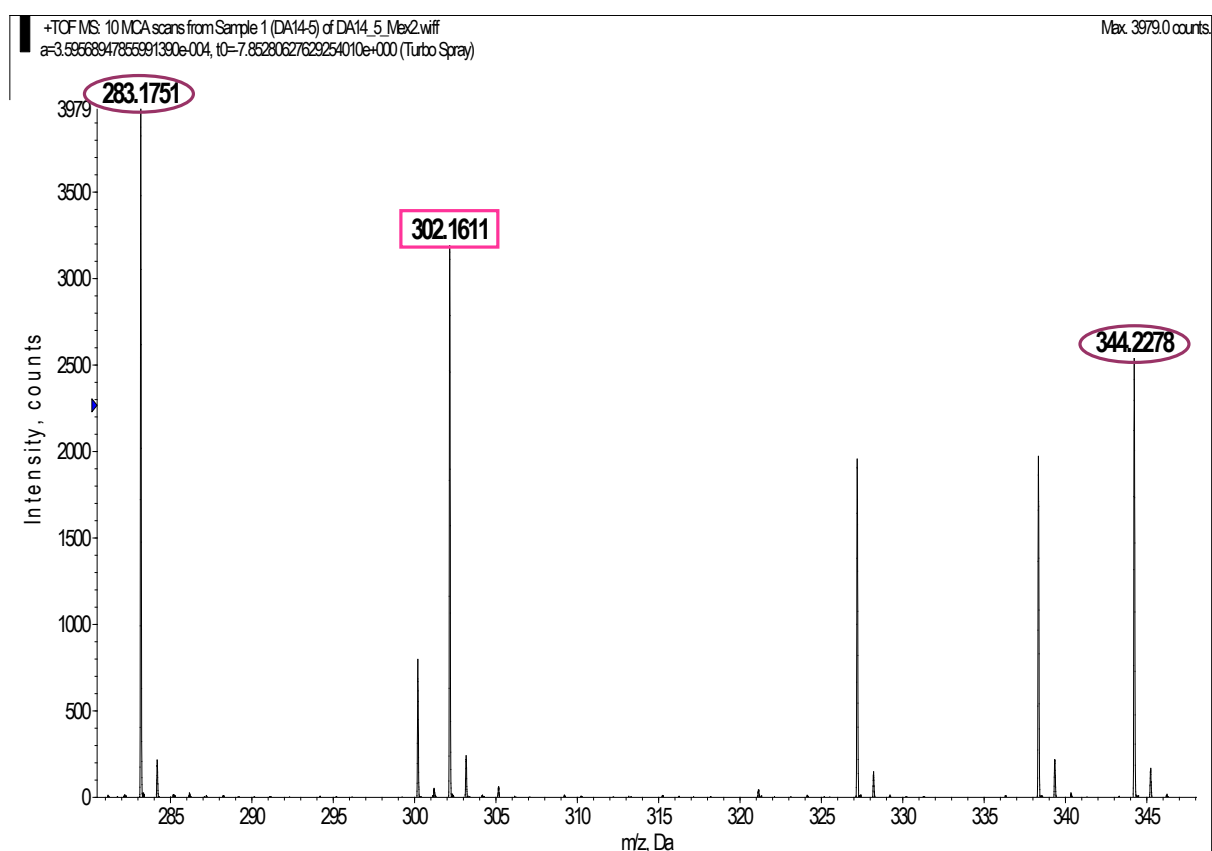


Figure 26 : Spectre de masse haute résolution en mode electrospray positif de l'échantillon (\pm)-**1a** (exp. n° 2).

L'ion ciblé est détecté à m/z 302.1611 et les pics retenus pour l'étalonnage interne sont observés respectivement à m/z 283.1751 et m/z 344.2278.

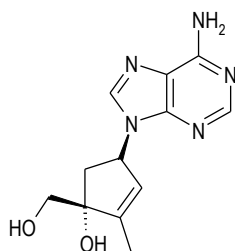
1.4. Conclusion

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution de l'échantillon (\pm)-**1a** permet de conclure à la présence d'un composé de formule brute $C_{15}H_{19}N_5O_2$, soit une masse monoisotopique exacte de **301.1539**, et comportant **9 insaturations** avec une **erreur inférieure à 2 ppm**.

Il pourrait donc s'agir du composé dont la structure a été proposée.

2. Mesure de la masse exacte du composé (\pm)-**1b** par MS haute résolution

2.1. Echantillon



Composé : (\pm)-1b****

Formule brute : $C_{12}H_{15}N_5O_2$

Masse monoisotopique : 261.1226 Da

2.2. Conditions expérimentales

Matériel

Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse QStar Elite (Applied Biosystems SCIEX) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) assistée pneumatiquement.

L'échantillon a été ionisé en mode electrospray positif dans les conditions suivantes : tension electrospray (ISV) : 5500 V ; tension d'orifice (OR) : 20 V ; pression du gaz de nébulisation (air) : 20 psi.

Le spectre de masse haute résolution (MS) a été obtenu avec un analyseur temps de vol (TOF). La mesure de masse exacte a été effectuée en triplicat avec un double étalonnage interne.

Méthode

L'échantillon est dissout dans 400 μL de méthanol puis dilué au $1/10^5$ dans une solution de méthanol à 3mM d'acétate d'ammonium.

Etant donnée la masse du composé ciblé, les ions choisis pour références internes sont les ions pseudo-moléculaires, $[\text{M}+\text{H}]^+$, de deux oligomères du poly(éthylène glycol) (PEG300) attendus respectivement à m/z 239.1489 et m/z 283.1751.

La solution de l'échantillon est dopée avec l'étalon interne puis introduite dans la source d'ionisation par infusion à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

2.3. Résultats

L'ionisation electrospray en mode positif de la molécule recherchée génère principalement l'ion pseudo-moléculaire, $[\text{M}+\text{H}]^+$, dont la masse exacte théorique est 262.1299 Da.

Les mesures de masse haute résolution ont été effectuées pour cet ion. Les données expérimentales obtenues sont présentées dans le Tableau 4.

Un exemple de spectre de masse haute résolution obtenu après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (\pm)-**1b** est présenté (Figure 27).

		m/z	erreur (mDa)	erreur (ppm)
valeur théorique		262.1299	-	-
valeurs expérimentales	1	262.1295	- 0.4	- 1.5
	2	262.1297	- 0.2	- 0.8
	3	262.1297	- 0.2	- 0.8
Ces mesures expérimentales sont associées à un ion de composition élémentaire $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_2$ qui comporte 8 insaturations.				

Tableau 4 : Mesures de masse haute résolution de l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$, obtenues après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (\pm)-**1b**.

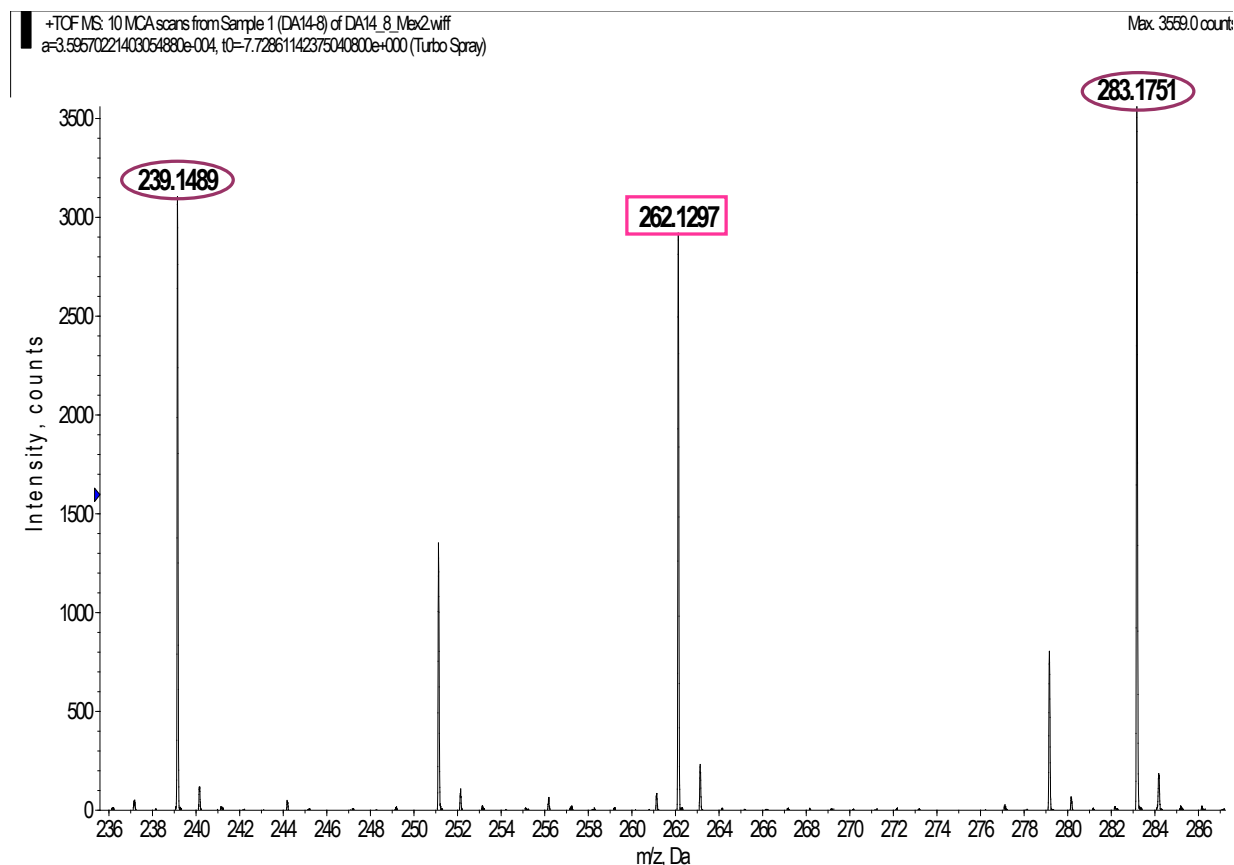


Figure 27 : Spectre de masse haute résolution en mode electrospray positif de l'échantillon (\pm)-**1b** (exp. n° 2).

L'ion ciblé est détecté à m/z 262.1297 et les pics retenus pour l'étalonnage interne sont observés respectivement à m/z 239.1489 et m/z 283.1751.

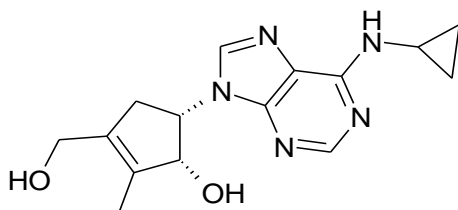
2.4. Conclusion

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution de l'échantillon (\pm)-**1b** permet de conclure à la présence d'un composé de formule brute $C_{12}H_{15}N_5O_2$, soit une masse monoisotopique exacte de **261.1226**, et comportant **8 insaturations** avec une **erreur inférieure à 2 ppm**.

Il pourrait donc s'agir du composé dont la structure a été proposée.

3. Mesure de la masse exacte du composé (\pm)-2a par MS haute résolution

3.1. Echantillon



Composé : (\pm)-2a

Formule brute : C₁₅H₁₉N₅O₂

Masse monoisotopique : 301.1539 Da

3.2. Conditions expérimentales

Matériel

Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse QStar Elite (Applied Biosystems SCIEX) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) assistée pneumatiquement.

L'échantillon a été ionisé en mode electrospray positif dans les conditions suivantes : tension electrospray (ISV) : 5500 V ; tension d'orifice (OR) : 15 V ; pression du gaz de nébulisation (air) : 20 psi.

Le spectre de masse haute résolution (MS) a été obtenu avec un analyseur temps de vol (TOF). La mesure de masse exacte a été effectuée en triplicat avec un double étalonnage interne.

Méthode

L'échantillon est dissout dans 300 μ L de méthanol puis dilué au 1/10³ dans une solution de méthanol à 3mM d'acétate d'ammonium.

Etant donnée la masse du composé ciblé, les ions choisis pour références internes sont l'adduit ammonium, [M+NH₄]⁺, et l'ion pseudo-moléculaire, [M+H]⁺, de deux oligomères du poly(éthylène glycol) (PEG300) attendus respectivement à m/z 300.2016 et m/z 327.2013.

La solution de l'extrait est dopée avec l'étalon interne puis introduite dans la source d'ionisation par infusion à un débit de 10 μ L/min.

3.3. Résultats

L'ionisation electrospray en mode positif de la molécule recherchée génère la formation de l'ion pseudo-moléculaire, [M+H]⁺, dont la masse exacte théorique est 302.1612 Da.

Les mesures de masse haute résolution ont été effectuées pour cet ion. Les données expérimentales obtenues sont présentées dans le Tableau 5.

Un exemple de spectre de masse haute résolution obtenu après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (\pm)-**2a** est présenté (Figure 28).

		m/z	erreur (mDa)	erreur (ppm)
valeur théorique		302.1612	-	-
valeurs expérimentales	1	302.1611	- 0.1	- 0.3
	2	302.1610	- 0.2	- 0.7
	3	302.1607	- 0.5	- 1.7

Ces mesures expérimentales sont associées à un ion de composition élémentaire $C_{15}H_{20}N_5O_2$ qui comporte 9 insaturations.

Tableau 5 : Mesures de masse haute résolution de l'ion $[M+H]^+$ obtenues après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (\pm)-**2a**.

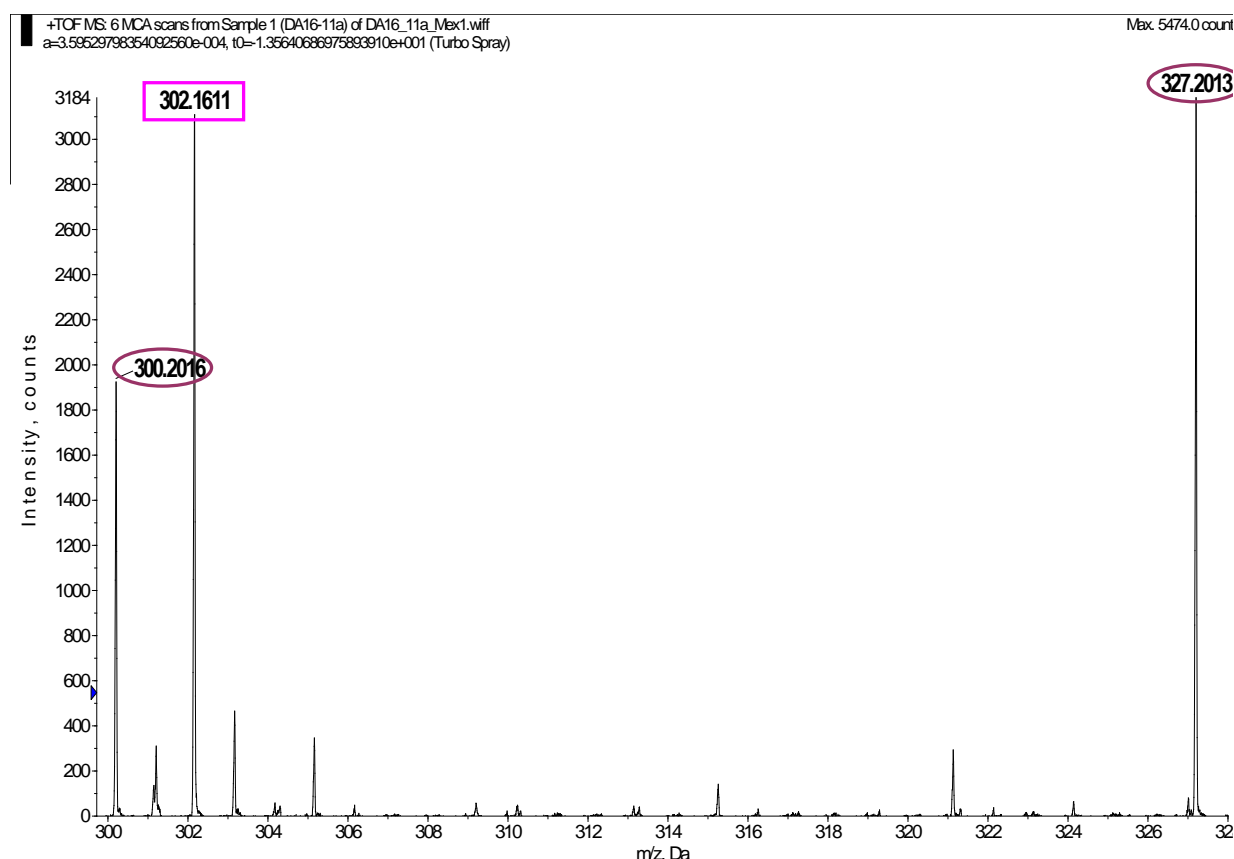


Figure 28 : Spectre de masse haute résolution en mode electrospray positif de l'échantillon (\pm)-**2a** (exp. n° 1).

L'ion ciblé est détecté à m/z 302.1611 et les pics retenus pour l'étalonnage interne sont observés respectivement à m/z 300.2016 et m/z 327.2013.

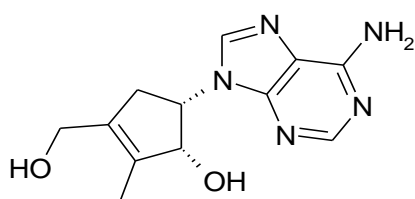
3.4. Conclusion

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution de l'échantillon (\pm)-**2a** permet de conclure à la présence d'un composé de formule brute $C_{15}H_{19}N_5O_2$, soit une masse monoisotopique exacte de **301.1539** et comportant **9 insaturations** avec une **erreur inférieure à 2 ppm**.

Il pourrait donc s'agir du composé dont la structure a été proposée.

4. Mesure de la masse exacte du composé (\pm)-**2b** par MS haute résolution

4.1. Echantillon



Composé : (\pm)-2b****

Formule brute : $C_{12}H_{15}N_5O_2$

Masse monoisotopique : 261.1226 Da

4.2. Conditions expérimentales

Matériel

Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse QStar Elite (Applied Biosystems SCIEX) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) assistée pneumatiquement.

L'échantillon a été ionisé en mode electrospray positif dans les conditions suivantes : tension electrospray (ISV) : 5500 V ; tension d'orifice (OR) : 20 V ; pression du gaz de nébulisation (air) : 20 psi.

Le spectre de masse haute résolution (MS) a été obtenu avec un analyseur temps de vol (TOF). La mesure de masse exacte a été effectuée en triplicat avec un double étalonnage interne.

Méthode

L'échantillon est dissout dans 300 μ L de méthanol puis dilué au 1/20 dans une solution de méthanol à 0.1mM de chlorure de sodium.

Etant donnée la masse du composé ciblé, les ions choisis pour références internes sont les adduits sodium, $[M+Na]^+$, de deux oligomères du poly(éthylène glycol) (PEG300) attendus respectivement à m/z 261.1308 et m/z 305.1570.

La solution de l'extrait est dopée avec l'étalon interne puis introduite dans la source d'ionisation par infusion à un débit de 10 μ L/min.

4.3. Résultats

L'ionisation electrospray en mode positif de la molécule recherchée génère la formation de l'adduit sodium, $[M+Na]^+$, dont la masse exacte théorique est 284.1118 Da. Les mesures de masse haute résolution ont été effectuées pour cet ion. Les données expérimentales obtenues sont présentées dans le Tableau 6. Un exemple de spectre de masse haute résolution obtenu après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (\pm)-**2b** est présenté (Figure 29).

		m/z	erreur (mDa)	erreur (ppm)
valeur théorique		284.1118	-	-
valeurs expérimentales	1	284.1120	+ 0.2	+ 0.7
	2	284.1119	+ 0.1	+ 0.4
	3	284.1120	+ 0.2	+ 0.7

Ces mesures expérimentales sont associées à un ion de composition élémentaire $C_{12}H_{15}N_5O_2Na$ qui comporte 8 insaturations.

Tableau 6 : Mesures de masse haute résolution de l'ion $[M+Na]^+$ obtenues après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (\pm)-**2b**.

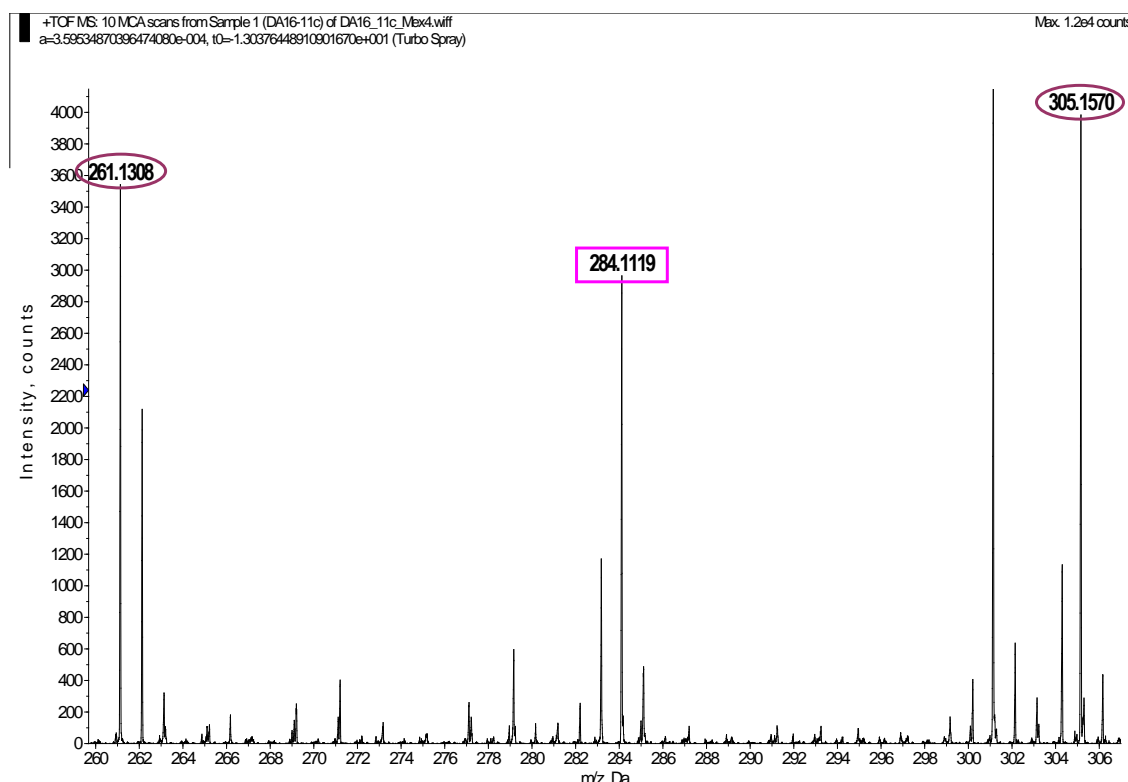


Figure 29 : Spectre de masse haute résolution en mode electrospray positif de l'échantillon (\pm)-**2b** (exp. n° 2).

L'ion ciblé est détecté à m/z 284.1119 et les pics retenus pour l'étalonnage interne sont observés respectivement à m/z 261.1308 et m/z 305.1570.

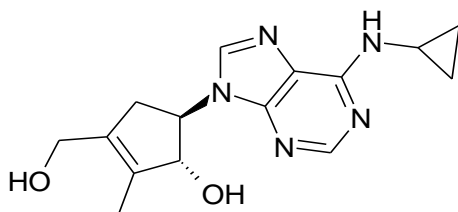
4.4. Conclusion

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution de l'échantillon (\pm)-**2b** permet de conclure à la présence d'un composé de formule brute $C_{12}H_{15}N_5O_2$, soit une masse monoisotopique exacte de **261.1226** et comportant **8 insaturations** avec une **erreur inférieure à 1 ppm**.

Il pourrait donc s'agir du composé dont la structure a été proposée.

5. Mesure de la masse exacte du composé (\pm)-**3a** par MS haute résolution

5.1. Echantillon



Composé : (\pm)-3a****

Formule brute : $C_{15}H_{19}N_5O_2$

Masse monoisotopique : 301.1539 Da

5.2. Conditions expérimentales

Matériel

Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse QStar Elite (Applied Biosystems SCIEX) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) assistée pneumatiquement.

L'échantillon a été ionisé en mode electrospray positif dans les conditions suivantes : tension electrospray (ISV) : 5500 V ; tension d'orifice (OR) : 20 V ; pression du gaz de nébulisation (air) : 22 psi.

Le spectre de masse haute résolution (MS) a été obtenu avec un analyseur temps de vol (TOF). La mesure de masse exacte a été effectuée en triplicat avec un double étalonnage interne.

Méthode

L'échantillon est dissout dans 300 μ L de méthanol puis dilué au $1/10^3$ dans une solution de méthanol à 3mM d'acétate d'ammonium.

Etant donnée la masse du composé ciblé, les ions choisis pour références internes sont l'adduit ammonium, $[M+NH_4]^+$, et l'ion pseudo-moléculaire, $[M+H]^+$, de deux oligomères du poly(éthylène glycol) (PEG300) attendus respectivement à m/z 300.2016 et m/z 327.2013.

La solution de l'extrait est dopée avec l'étalon interne puis introduite dans la source d'ionisation par infusion à un débit de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$.

5.3. Résultats

L'ionisation electrospray en mode positif de la molécule recherchée génère la formation de l'ion pseudo-moléculaire, $[M+H]^+$, dont la masse exacte théorique est 302.1612 Da.

Les mesures de masse haute résolution ont été effectuées pour cet ion. Les données expérimentales obtenues sont présentées dans le Tableau 7.

Un exemple de spectre de masse haute résolution obtenu après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (\pm)-**3a** est présenté (Figure 30).

		m/z	erreur (mDa)	erreur (ppm)
valeur théorique		302.1612	-	-
valeurs expérimentales	1	302.1604	- 0.8	- 2.6
	2	302.1609	- 0.3	- 1.0
	3	302.1606	- 0.6	- 2.0
Ces mesures expérimentales sont associées à un ion de composition élémentaire $C_{15}H_{20}N_5O_2$ qui comporte 9 insaturations.				

Tableau 7 : Mesures de masse haute résolution de l'ion $[M+H]^+$ obtenues après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (\pm)-**3a**.

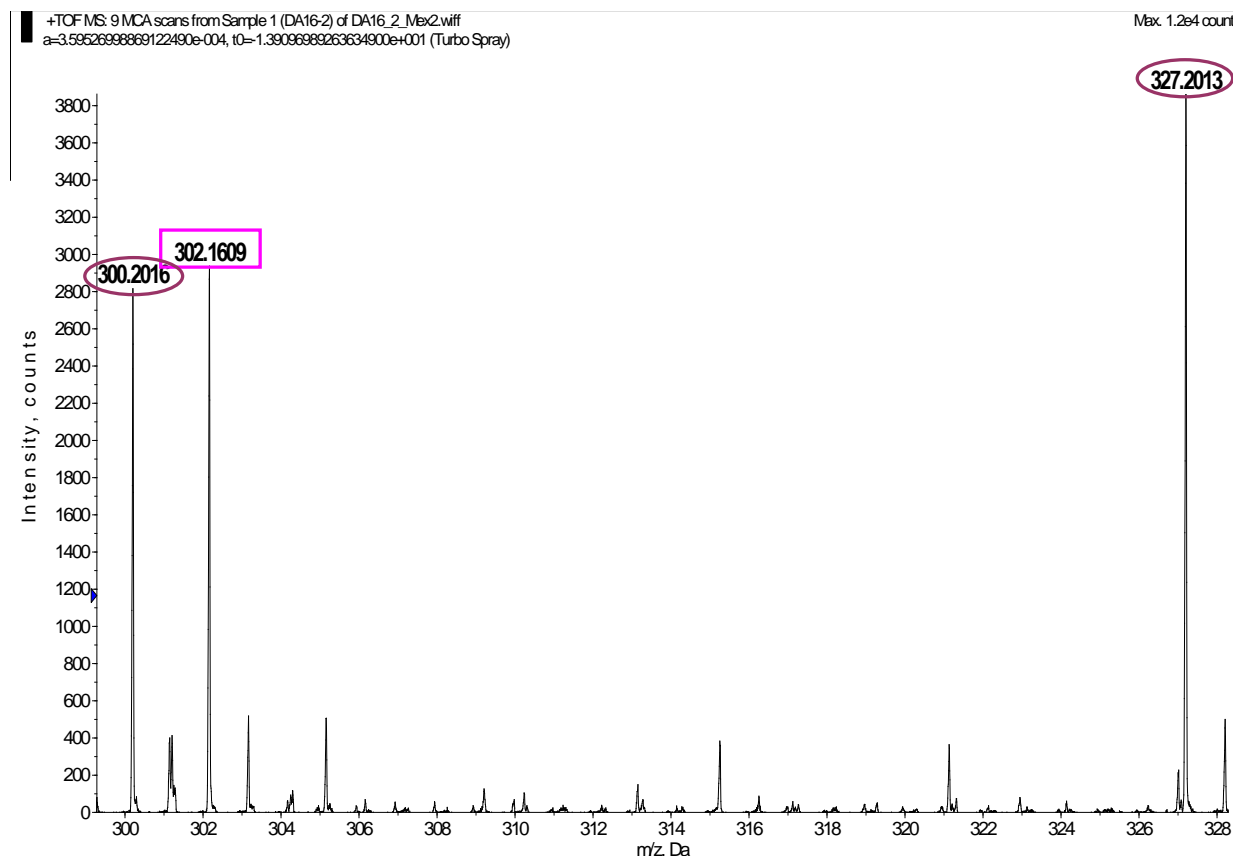


Figure 30 : Spectre de masse haute résolution en mode electrospray positif de l'échantillon (\pm)-**3a** (exp. n° 2).

L'ion ciblé est détecté à m/z 302.1609 et les pics retenus pour l'étalonnage interne sont observés respectivement à m/z 300.2016 et m/z 327.2013.

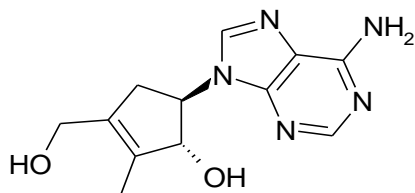
5.4. Conclusion

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution de l'échantillon (\pm)-**3a** permet de conclure à la présence d'un composé de formule brute $C_{15}H_{19}N_5O_2$, soit une masse monoisotopique exacte de **301.1539** et comportant **9 insaturations** avec une **erreur inférieure à 3 ppm**.

Il pourrait donc s'agir du composé dont la structure a été proposée.

6. Mesure de la masse exacte du composé (\pm)-3b par MS haute résolution

6.1. Echantillon



Composé : (\pm)-3b

Formule brute : C₁₂H₁₅N₅O₂

MM : 261.1226 Da

6.2. Conditions expérimentales

Matériel

Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse QStar Elite (Applied Biosystems SCIEX) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) assistée pneumatiquement.

L'échantillon a été ionisé en mode electrospray positif dans les conditions suivantes : tension electrospray (ISV) : 5500 V ; tension d'orifice (OR) : 45 V ; pression du gaz de nébulisation (air) : 23 psi.

Le spectre de masse haute résolution (MS) a été obtenu avec un analyseur temps de vol (TOF). La mesure de masse exacte a été effectuée en triplicat avec un double étalonnage interne.

Méthode

L'échantillon est dissout dans 300 μ L de méthanol puis dilué au 1/10² dans une solution de méthanol à 0.1mM de chlorure de sodium.

Etant donnée la masse du composé ciblé, les ions choisis pour références internes sont les adduits sodium, [M+Na]⁺, de deux oligomères du poly(éthylène glycol) (PEG300) attendus respectivement à m/z 261.1308 et m/z 305.1570.

La solution de l'extrait est dopée avec l'étalon interne puis introduite dans la source d'ionisation par infusion à un débit de 10 μ L/min.

6.3. Résultats

L'ionisation electrospray en mode positif de la molécule recherchée génère la formation de l'adduit sodium, [M+Na]⁺, dont la masse exacte théorique est 284.1118 Da.

Les mesures de masse haute résolution ont été effectuées pour cet ion. Les données expérimentales obtenues sont présentées dans le Tableau 8.

Un exemple de spectre de masse haute résolution obtenu après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (\pm)-**3b** est présenté (Figure 31).

		m/z	erreur (mDa)	erreur (ppm)
valeur théorique		284.1118	-	-
valeurs expérimentales	1	284.1116	- 0.2	- 0.7
	2	284.1119	+ 0.1	+ 0.4
	3	284.1118	0	0

Ces mesures expérimentales sont associées à un ion de composition élémentaire $C_{12}H_{15}N_5O_2Na$ qui comporte 8 insaturations.

Tableau 8 : Mesures de masse haute résolution de l'ion $[M+Na]^+$ obtenues après ionisation electrospray en mode positif de l'échantillon (\pm)-**3b**.

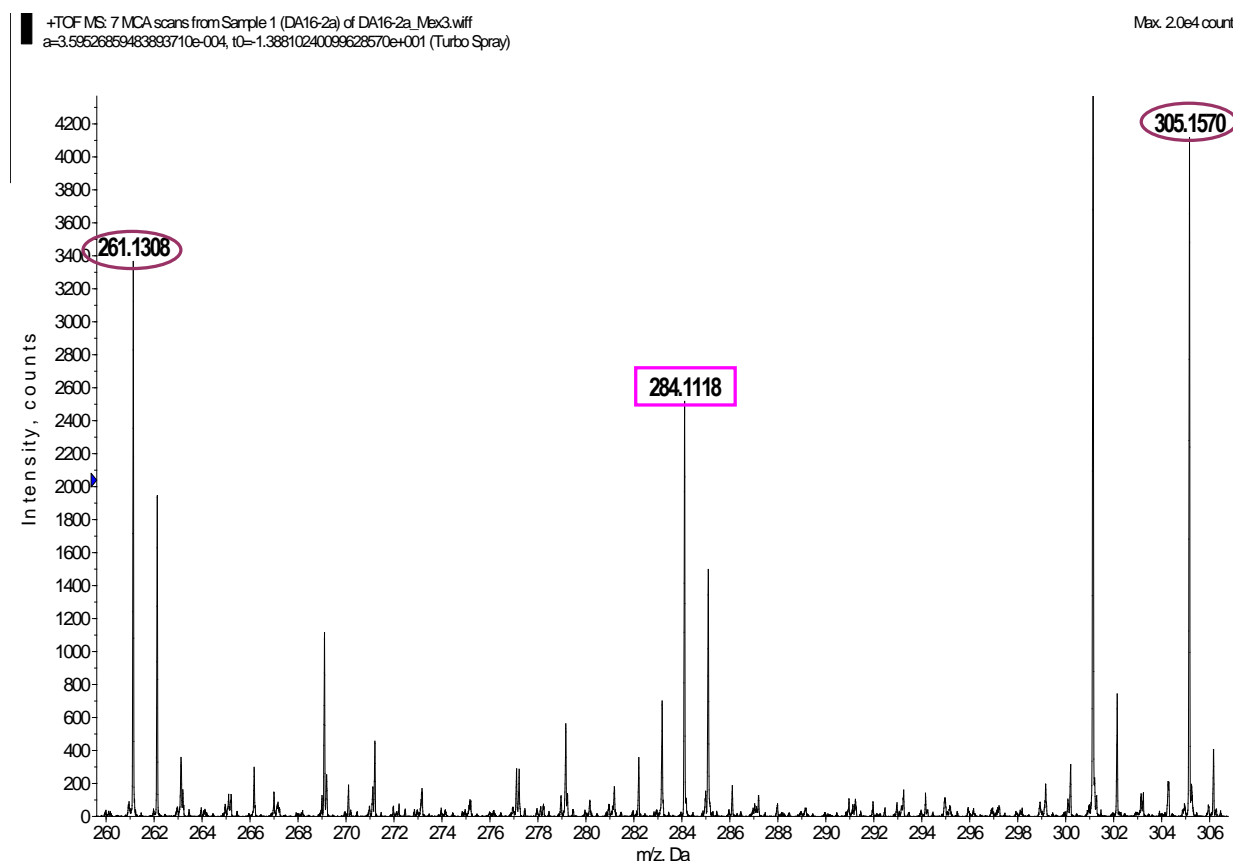


Figure 31 : Spectre de masse haute résolution en mode electrospray positif de l'échantillon (\pm)-**3b** (exp. n° 3).

L'ion ciblé est détecté à m/z 284.1118 et les pics retenus pour l'étalonnage interne sont observés respectivement à m/z 261.1308 et m/z 305.1570.

6.4. Conclusion

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution de l'échantillon (\pm)-**3b** permet de conclure à la présence d'un composé de formule brute $C_{12}H_{15}N_5O_2$, soit une masse monoisotopique exacte de **261.1226** et comportant **8 insaturations** avec une **erreur inférieure à 1 ppm**.

Il pourrait donc s'agir du composé dont la structure a été proposée.