



HAL
open science

Synthèse d'analogues photoactivables du glutathion : pour l'étude du système cellulaire du glutathion

Dan Bernardi

► **To cite this version:**

Dan Bernardi. Synthèse d'analogues photoactivables du glutathion : pour l'étude du système cellulaire du glutathion. Autre. Université Paul Verlaine - Metz, 2005. Français. NNT : 2005METZ015S . tel-01752474

HAL Id: tel-01752474

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752474v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention : Chimie Moléculaire

Par

Dan Bernardi

UNIVERSITE Paul Verlaine - METZ S.C.D.	
N° Inv.	2005055S
Cote	S/M ₃ 05/15
Loc	mag. rouge

**SYNTHESE D'ANALOGUES PHOTOACTIVABLES DU
GLUTATHION
POUR L'ETUDE DU SYSTEME CELLULAIRE DU
GLUTATHION**

Soutenue le 19 Octobre 2005 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

- J. Sapi Professeur à l'Université de Reims
J.J. Bourguignon Directeur de recherche au CNRS à Strasbourg

Membres du jury :

- B. Jamart-Grégoire Professeur à l'ENSIC de Nancy
A. Marsura Professeur à l'Université de Nancy
E. Battaglia Maître de conférence à l'Université de Metz
G. Kirsch Professeur à l'Université de Metz (Membre Invité)
A. Dicko Professeur à l'Université de Metz (Directeur de thèse)

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été effectué au Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique de l'Université Paul Verlaine de Metz sous la direction du Professeur A. Dicko.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur A. Dicko pour m'avoir guidé tout au long de ces recherches.

Je tiens également à exprimer ma gratitude au Professeur G. Kirsch pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et m'avoir permis de mener à bien ce travail.

Je remercie Monsieur J. Sapi, Professeur de l'Université de Reims, ainsi que Monsieur J.J. Bourguignon, Directeur de Recherche au CNRS à Strasbourg, pour avoir accepté de juger ce travail et d'honoré de leur présence le jury de cette thèse.

Je remercie également Madame B. Jamart-Grégoire, Professeur de l'Université de Nancy, Monsieur A. Marsura, Professeur de l'Université de Nancy et Monsieur E. Battaglia, Maître de conférence à l'Université de Metz pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de faire partie de ce jury.

Je remercie enfin les techniciennes d'analyse (sans lesquelles ces travaux n'auraient pu voir le jour) et mes camarades chercheurs (Aïcha, le p'tit moussaillon, Stéphanie E., Stéphanie H., Evelyne, Stéphanie R., Agathe, Göknil, Doriane, Frantz, Pino, Boon, Fabiduf, Mr. T, Juan Carlos, Docteur Djé, Nathalie L., Eric M., Marc B., Julie H., Docteur Georges) qui ont partagé durant toutes ces années mes désillusions et mes joies.

Remerciement spécial à Georges pour son soutien de tous les instants et son aide au niveau de la biblio. Merci à Stéph. H. pour les relectures de publi et de certains chapitres de ce travail. Je tiens également à remercier Mr. P. Seck, Professeur à l'Université de Luxembourg, qui en me donnant la possibilité d'encadrer des TP au Luxembourg m'a permis de toucher à l'enseignement et de mettre du beurre dans les épinars.

Les derniers mais pas les moindres, je remercie ma famille pour leur soutien inconditionnel.

Abréviations

A	
Ac. acétyl	
AcCl chlorure d'acétyl	M
Aq. aqueux, aqueuse	
B	
Bz benzoyl	m multiplet
n-BuLi Solution de n-Butyllithium	M Mol.L ⁻¹
	Me méthyl
	MeCN acétonitrile
	MeOH méthanol
C	
Cat. catalytique	N
c.c.m. chromatographie sur couche mince	NEt ₃ triéthylamine
Cf. confère	
CH ₃ CN acétonitrile	P
Conc. concentré	Pf point de fusion
	Piv Pivaloyl
D	ppm partie par million
°C degré celsius	
d doublet	Q
DBU 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene	q quadruplet
DCCI dicyclohexylcarbodiimide	quant. quantitatif
DCM dichlorométhane	
DMAP 4-(<i>N,N</i> -diméthyl)aminopyridine	R
DMF diméthylformamide	Rdt% rendement
DMSO diméthylsulfoxyde	Δ reflux
d.t.t. dithiothréitol	rem. remarque
	RMN Résonance Magnétique Nucléaire
E	
Et éthyl	S
EtOH éthanol	SM spectrométrie de masse
Et ₃ SiH triéthylsilane	
éq. équivalent	T
	t triplet
G	TA température ambiante
GC/MS chromatographie gazeuse couplée à spectrométrie de masse	THF tétrahydrofurane
	TFA acide trifluoroacétique
	Tos tosyl
H	
Hz Hertz	U
	U.V. Ultraviolet
I	
IC ₅₀ concentration inhibitrice à 50%	
IR Infrarouge	
J	
<i>J</i> constante de couplage	

SOMMAIRE

Remerciements

Abréviations utilisées

Introduction 1

Chapitre I Etude bibliographique du marquage par photoaffinité, des groupements photoactivables et des analogues du glutathion

1) Le marquage par photoaffinité	12
2) Les groupements photoactivables	19
2- 1) Les azotures d'aryles	20
2- 2) Les trifluorométhylidiazirines	21
2- 3) Les dérivés de la benzophénone	22
3) Les analogues du glutathion	23
3- 1) Synthèse d'analogues photoactivables N-fonctionnalisés du glutathion	23
3- 2) Synthèse d'analogues photoactivables du GSH	24

Chapitre II Synthèses des groupements photoactivables

1) Synthèse d'analogues du motif benzophénone	27
1- 1) Acide 5-benzoylthiophène-2-carboxylique	28
1- 2) Synthèse	30
1- 3) Acides : 4-(thiophène-2-carbonyl)benzoïque, 4-(1 <i>H</i> -pyrrole-2-carbonyl)benzoïque et 4-(1-Méthyl-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carbonyl)-benzoïque.	31
1- 4) Synthèses	32
2) Synthèse des azotures d'aryles	35
Résultats	35

3) Synthèse de l'acide 4-[3-(trifluorométhyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoïque	37
Résultats	39
4) Activation des acides carboxyliques	41
Résultats	42

Chapitre III Synthèse d'analogues N-modifiés photoactivables du glutathion dérivés de sa structure réduite et oxydée

1) A partir du GSH non protégé	46
1- 1) Résultats	47
1- 2) Comparaison de l'activité nucléophile des fonctions amine et thiol du GSH	50
a- Réactivité du GSH en milieu neutre	51
b- Réactivité du GSH en milieu basique	52
2) A partir du GSH après protection de la fonction thiol	54
2- 1) A partir du GSSG	55
2- 1- 1) N-fonctionnalisation du GSSG	55
Résultats	57
2- 1- 2) Réduction du lien disulfure	61
2- 1- 2- 1) Résultats	61
2- 1- 2- 2) Inconvénients	62
- réduction de l'acide 4-azidobenzoïque en présence de d.t.t.	62
- réduction de l'acide 4-azidobenzoïque en présence de GSH	63
2- 2) A partir du GSH S-trityle	63
2- 2- 1) Protection du GSH avec le groupement trityle	63
2- 2- 2) Déprotection du groupement trityle	64
2- 2- 3) Résultats	65
2- 2- 3- 1) S-protection du GSH	65
2- 2- 3- 2) N-fonctionnalisation du GSH S-trityle	65
2- 2- 3- 3) Déprotection du groupement trityle	67

Chapitre IV Synthèse de l'analogue I

1) Voie 1 : molécules possédant déjà un atome de soufre sur le cycle aromatique	71
1- 1) Synthèse à partir d'un dérivé du benzothiazole	71
1- 1- 1) Chemin 1: VNS	72
1- 1- 1- 1) Nitration du de 2-méthylbenzothiazole	73
1- 1- 1- 2) V.N.S.	74
Résultats	74
1- 1- 2) Chemin 2: Ortho-lithiation	76
1- 1- 2- 1) Synthèse du 6- amino-2-méthylbenzothiazole	76
1- 1- 2- 2) Synthèse du 2-méthyl-6-(pivaloylamino)benzothiazole	77
1- 1- 2- 3) Essais d'ortho-lithiation	77
1- 1- 3) Chemin 3: Reimer-Tiemann	78
Résultats	78
1- 2) Synthèse à partir d'un dérivé du thiophénol	79
1- 2- 1) Rappel bibliographique	79
1- 2- 2) Résultats	80
2) Voie 2 : synthèse de noyau aromatique porteur d'un atome de soufre	81
2- 1) Introduction d'un atome de soufre sur un cycle aromatique	81
2- 1- 1) Réaction de Herz	81
2- 1- 2) Réarrangement de Newman-Kwart	82
2- 1- 3) Voie de Jacobson	83
2- 1- 4) Sels de diazonium	83
2- 1- 5) Voie des halogénures d'aryles	84
2- 1- 5- 1) Via organomagnésiens et organolithiens	84
2- 1- 5- 2) Substitution nucléophile aromatique intermoléculaire et intramoléculaire	84
2- 2) Synthèse du 2,5-diméthylbenzothiazole	86
2- 2- 1) A partir d'un dérivé du phénol	86
2- 2- 1- 1) Réarrangement de Newman-Kwart	87
2- 2- 1- 2) Réduction d'un groupement nitro en présence d'un groupement carbamate	87
2- 2- 1- 3) Résultats	88

2- 2- 1- 3- 1) Synthèse de O-aryl diméthylthiocarbamate	88
2- 2- 1- 3- 2) Réarrangement de Newman-Kwart	90
2- 2- 1- 3- 3) Réduction du groupement nitro	90
2- 2- 2) A partir de thioamide : Voie Jacobson	91
2- 2- 2- 1) Réaction de Jacobson : étude bibliographique	91
2- 2- 2- 2) Résultats	93
2- 2- 2- 2- 1) Synthèse du thioamide	93
2- 2- 2- 2- 2) Cyclisation de Jacobson	94
2- 2- 3) A partir d'orthoaminothiocyanate	97
2- 2- 3- 1) passage de -SCN à SH et de -NO ₂ à -NH ₂	97
2- 2- 3- 2) Résultats	99
2- 2- 4) Par substitution nucléophile aromatique intramoléculaire	100
2- 2- 4- 1) Voie de Spitulnik	100
2- 2- 4- 2) Résultats	100

Chapitre V Synthèse de l'analogue II

1) Acylation par une réaction de Friedel-Crafts	104
1- 1) Rappel bibliographique	104
1- 2) Résultats	105
1- 2- 1) En présence d'AlCl ₃	105
1- 2- 2) Résultats	106
1- 3- 1) En présence de CF ₃ SO ₃ H	107
1- 3- 2) Résultats	108
2) A partir des organo-magésiens	109
2- 1) Rappel bibliographique	109
2- 2) Synthèse des synthons	110
2- 2- 1) Synthèse du N-acétyl-4-iodoanthranilate de méthyle	111
2- 2- 2) Synthèse de l'aldéhyde 2-méthyl-3-nitrobenzoïque	112
2- 3) Réaction entre le magnésien du N-acétyl-4-iodoanthranilate de méthyle et l'aldéhyde 2-méthyl-3-nitrobenzoïque	113
Résultats	115

Chapitre VI Evaluation de quelques analogues photoactivables du glutathion sur le système enzymatique lié au glutathion

1) Essais enzymatiques avec des analogues du GSSG	116
2) Essais enzymatiques et essais de photoactivation avec un analogue du GSH N-substitué	118
2- 1) Essais enzymatiques	118
2- 2) Essais de photoactivation	119
Conclusion	122
Partie expérimentale	124
Bibliographie	177
Annexe : publication	

Introduction

Depuis les bactéries jusqu'aux organismes les plus évolués, le glutathion (Figure I-1) apparaît comme un composant caractéristique des cellules vivantes. Il fut isolé pour la première fois par De Rey-Pailhade en 1880 et c'est Hopkins en 1929 qui mit en évidence les 3 résidus constitutifs de la molécule (Figure I-1): l'acide L-glutamique (Glu, **a**), la L-cystéine (Cys, **b**) et la glycine (Gly, **c**).

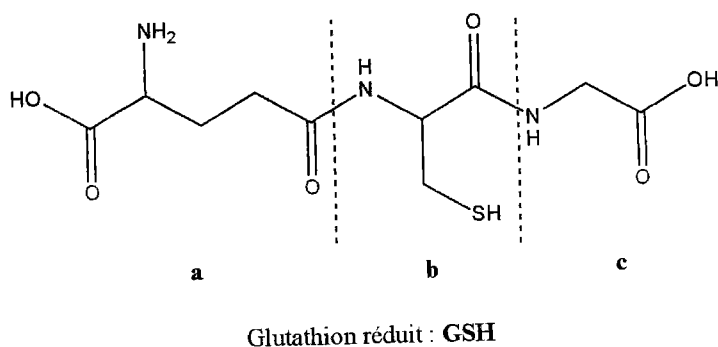


Figure I-1 Le glutathion (GSH)

Le point isoélectrique¹ du tripeptide a été déterminé à un pH de 2,8. Ce tripeptide existe majoritairement sous sa forme réduite (GSH); il constitue d'ailleurs la forme très largement prédominante des thiols intracellulaires non protéiques. Lorsqu'il est oxydé, 2 molécules sont liées par un pont disulfure (GSSG). Les proportions physiologiques de GSH et de GSSG dans la cellule sont respectivement de l'ordre de 99% et 1%^{2,3}. Le taux intracellulaire de GSH est beaucoup plus important que celui de la Cys. Il peut donc être considéré comme une source et comme un moyen de transport de Cys qui devient toxique quand elle est présente en trop grande quantité. Il participe également aux réactions de synthèse des protéines et des acides nucléiques.

Métabolisme du glutathion

Synthèse du glutathion

Le GSH est synthétisé à partir de la Cys, de la Gly et du Glu (Schéma I-1).

Synthèse du GSH
 -Intracellulaire
 -Toutes les cellules

Dégradation du GSH
 -Extracellulaire
 -Cellules avec GGT

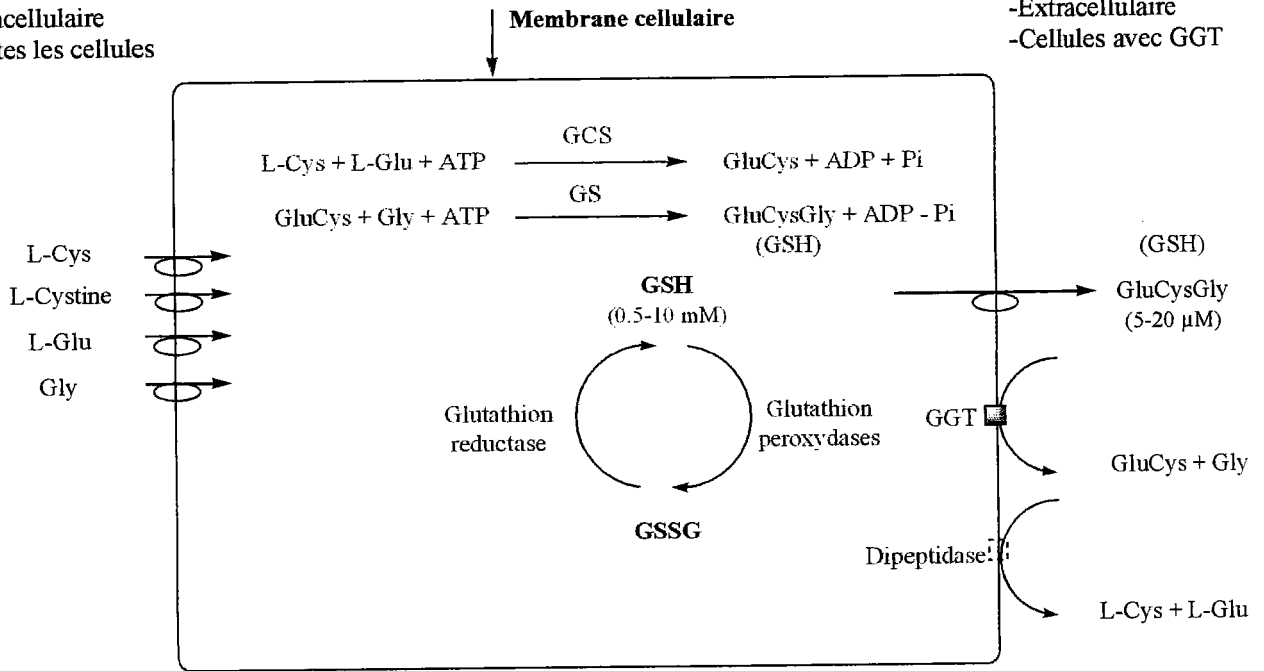


Schéma I-1

Cette synthèse est catalysée successivement par la γ -glutamylcystéine synthétase (GCS) et la glutathion synthétase (GS). Cette synthèse peptidique se produit dans chaque cellule du corps, mais principalement au niveau du foie. La première réaction catalysée par la GCS permet de former une liaison peptidique entre le groupement carboxyle porté par le carbone γ du Glu et le groupement amine de la Cys. La Cys est le substrat limitant de la réaction de synthèse du GSH⁴. Cette liaison peptidoïde confère au GSH une résistance aux peptidases intracellulaires. A l'issue de cette réaction, il se forme un dipeptide γ -glutamylcystéine qui présente une forte affinité pour la glutathion synthétase (GS). Cette enzyme va former une liaison entre le résidu cystéine et un résidu glycine ce qui conduit à la formation du GSH.

Dégradation du glutathion

En 1948, Binkley et Nakamura⁵ mettent en évidence une enzyme initiant l'hydrolyse du GSH en clivant la liaison γ -glutamyle. Cette enzyme nommée γ -glutamyl transpeptidase (GGT) est présente à la surface des cellules et son activité est assurée par le domaine extracellulaire. De plus, elle peut transférer le groupement γ -glutamyl du GSH sur un acide aminé accepteur, selon un processus appelé «transpeptidation»⁶.

Le GSH ne pouvant pas directement entrer dans la cellule, il doit être hydrolysé en acides aminés qui seront pris en charge par le système de transport des acides aminés situé dans la membrane cellulaire. Le groupement γ -glutamyl confère au GSH une résistance aux protéases et la GGT est la seule enzyme capable de cliver le GSH⁷. Celle-ci élimine le groupement γ -glutamylo du GSH relargant ainsi la cystéinylglycine. Ce dipeptide obtenu est un très bon substrat pour les dipeptidases extracellulaires qui hydrolysent le lien peptidique pour donner la Cys et la Gly.

Oxydation et réduction du glutathion

Le GSH joue un rôle dans la défense contre le stress oxydant en limitant l'oxydation des protéines et des membranes cellulaires réalisée par les peroxydes organiques et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Pour cela, les glutathion peroxydases (GP) catalysent simultanément l'oxydation du GSH en glutathion disulfure (GSSG) et la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O . De plus, certaines glutathion *S*-transférases (GST) présentent une activité glutathion peroxydase indépendante du sélénium ce qui permet de réduire les peroxydes organiques situés au niveau des membranes⁸. Le GSSG ainsi formé est réduit en GSH par l'intermédiaire d'une GSSG réductase (GR) dépendante du NADPH. Cet équilibre, assuré en permanence par les activités GP et GR, traduit parfaitement l'importance fonctionnelle primordiale du groupement sulhydryle du glutathion. Nous pouvons dire que le GSH et le GSSG forment un tampon redox intracellulaire qui sert entre autres de modulateur d'activité pour les enzymes dépendant de leur résidu Cys, sensible aux changements redox.

Rôle du glutathion dans la détoxification

Une des fonctions principales du GSH est la détoxification des xénobiotiques ou de leurs métabolites (Schéma I-2).

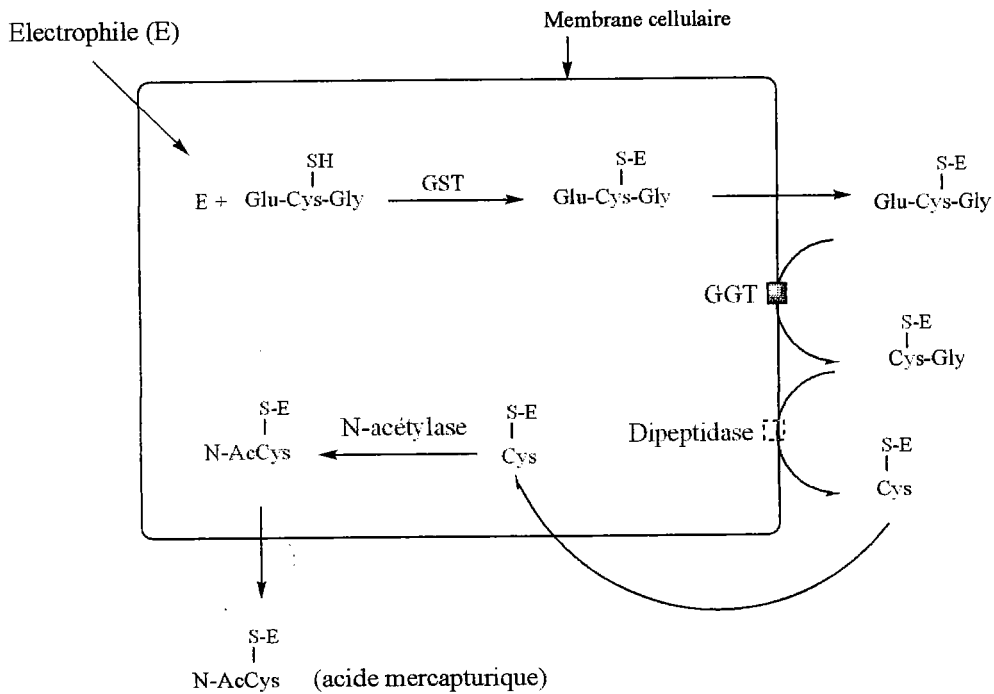


Schéma I-2

Il protège les cellules des espèces électrophiles en formant des espèces généralement moins réactives, plus hydrosolubles et par conséquent plus facilement éliminables. Cette réaction de conjugaison des espèces électrophiles au GSH se fait de manière spontanée ou catalysée par la famille des enzymes GST. Les conjugués au GSH sont généralement éliminés des cellules et dans le cas des hépatocytes sont excrétés dans la bile. Ils sont tout d'abord pris en charge par la GGT extracellulaire qui élimine le groupement γ -glutamyl du GSH libérant ainsi le conjugué cystéinylglycine. La liaison cystéinyl-glycine est ensuite rompue par la dipeptidase relargant ainsi un conjugué cystéinyl. Celui-ci est pris en charge par la N-acétylase intracellulaire⁸ ce qui engendre la formation d'un acide mercapturique qui est ensuite excrété. La transformation du conjugué en acide mercapturique commence dans la bile, l'intestin ou les reins mais la formation du conjugué N-acétylcystéine a lieu généralement dans les reins. La conjugaison permet d'éliminer les composés toxiques mais quelques fois le conjugué au GSH est plus réactif que le composé d'origine à l'instar du conjugué GS-dibromoéthane.

Le GSH forme également des complexes avec les métaux⁹ dans des réactions non-enzymatiques. Le GSH est un des meilleurs ligands pour les métaux (le mercure, l'argent, le cadmium, l'arsenic, le plomb, l'or, le zinc et le cuivre) et joue un rôle important dans leur

transport, leur stockage et leur métabolisme. C'est le groupement sulhydrique du résidu Cys qui confère au GSH ces propriétés.

Rôle du glutathion dans le mécanisme de résistance des cellules tumorales

Les cellules tumorales utilisent divers mécanismes pour développer une résistance aux agents chimiothérapeutiques parmi lesquelles on compte un mécanisme de surexpression de certaines protéines du système du glutathion, en particulier les GST, les transporteurs transmembranaires conjugués au GSH et la glutathion réductase. Une stratégie visant à sensibiliser les cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques est développée depuis plusieurs années, sur la base de la surexpression de ces protéines du système du glutathion.

Les GST catalysent la réaction du GSH avec les agents alkylants et sont dans ce cas des enzymes de détoxification. Le conjugué ainsi formé est rapidement exclu de la cellule grâce aux "pompes pour l'exportation des dérivés S-modifiés" (pompes GS-X, GS-X pump). De ce fait, la surexpression de cette enzyme peut entraîner une baisse de la concentration intracellulaire en agents cytotoxiques actifs. Les GST sont surexprimées dans un grand nombre de tumeurs humaines. La famille des GST comprend les GST α , π , μ , σ , θ , ω , ξ et κ . A ce titre, l'étude de la GST π est d'un intérêt considérable car celle-ci peut être utilisée comme marqueur d'hépatocarcinogénèse¹⁰ et est aussi surexprimée dans un grand nombre de tumeurs malignes dont le cancer des poumons, du colon, du rein, de l'ovaire, de l'œsophage et de l'estomac.

La connaissance des mécanismes de résistance a permis de développer diverses stratégies visant à sensibiliser les cellules tumorales aux agents cytotoxiques. En effet, des inhibiteurs des GST et des protéines associées à la résistance multiple aux médicaments ont été synthétisés dans l'objectif de minimiser l'inactivation du médicament ou d'inhiber l'efflux de l'agent cytotoxique, respectivement. De nombreux inhibiteurs des GST sont capables de sensibiliser les cellules tumorales aux agents cytotoxiques. Parmi eux, l'inhibiteur le mieux caractérisé est l'acide éthacrinique (EA) (Figure I-2).

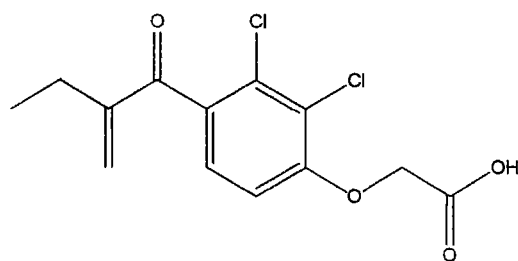


Figure I-2 Acide éthacrinique

De même, un médicament anticancéreux de type prodrogue activée par la GST π , le composé TLK-286 (Figure I-3), fait actuellement l'objet d'études cliniques prometteuses pour le traitement de tumeurs solides surexprimant cette enzyme¹¹.

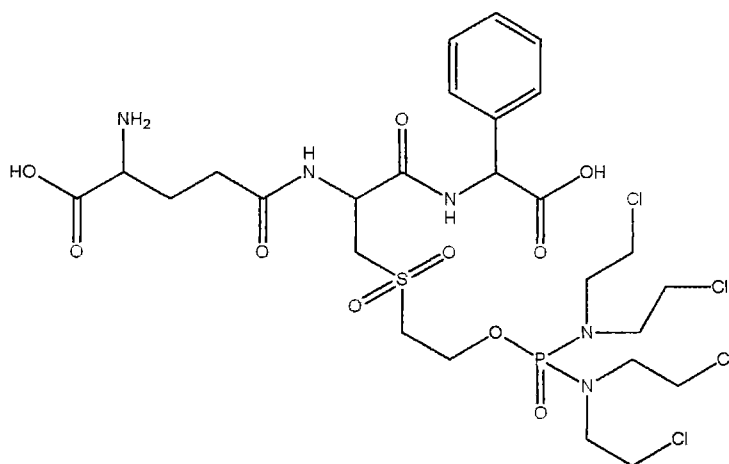


Figure I-3 TLK-286

Les transporteurs ABC appartenant à la famille MRP (protéines associées à la résistance multiple aux médicaments) et réalisant l'export des conjugués anioniques ont été identifiés dans de nombreux organismes. MRP1 est le transporteur de cette famille le mieux caractérisé à ce jour. Il est souvent surexprimé dans les cellules tumorales résistantes aux agents cytotoxiques. Les principaux substrats de MRP1 sont les conjugués anioniques au sulfate, à l'acide glucuronique et au GSH. Il réalise également l'efflux de nombreuses drogues non conjuguées telles que la vincristine en la cotransportant avec le GSH. Le rôle de ces transporteurs dans l'élimination des drogues conjuguées ou non au GSH permet d'établir une stratégie reposant sur le glutathion et visant à inhiber ces pompes à efflux dans le but de sensibiliser les cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques.

La GR permet la réduction du GSSG en GSH qui est le tripeptide essentiel pour l'élimination des peroxydes organiques et du peroxyde d'hydrogène ainsi que pour la

détoxication des xénobiotiques électrophiles. Le GSH est également impliqué dans la formation des déoxyribonucléotides et par conséquent dans la prolifération des cellules. Du fait de son rôle dans la cellule, la GR semble contribuer à la prolifération non-contrôlée des cellules tumorales ainsi qu'à leur résistance. Des niveaux élevés d'ARNm GR ainsi qu'une augmentation de l'activité de cette enzyme sont observés dans les cellules tumorales¹². Ces cellules peuvent présenter un avantage sélectif lorsqu'elles sont traitées par des composés électrophiles, des composés induisant un stress oxydant ou encore soumises à des radiations. De ce fait, l'inhibition de cette enzyme dans les cellules tumorales peut conduire à un arrêt de la prolifération cellulaire¹³.

Apoptose et glutathion

Le GSH intervient aussi dans une autre fonction physiologique essentielle : l'apoptose¹⁴. L'apoptose (Schéma I-3) est un mode physiologique de mort cellulaire essentiel pour le maintien de l'homéostasie tissulaire. La perturbation de la régulation de l'apoptose est impliquée dans une variété de maladies (SIDA, maladies neurodégénératives, cancer...). Le stress oxydant qui peut être généré par des molécules utilisées en chimiothérapie (doxorubicine, vincristine...) joue un rôle capital dans l'évolution des cellules vers un état apoptotique. En effet, l'apoptose est un processus complexe composé de plusieurs événements cellulaires que l'on peut regrouper en trois phases : l'initiation, la propagation et la dégradation cellulaire. L'initiation, induite par différents facteurs, est potentiellement réversible¹⁵.

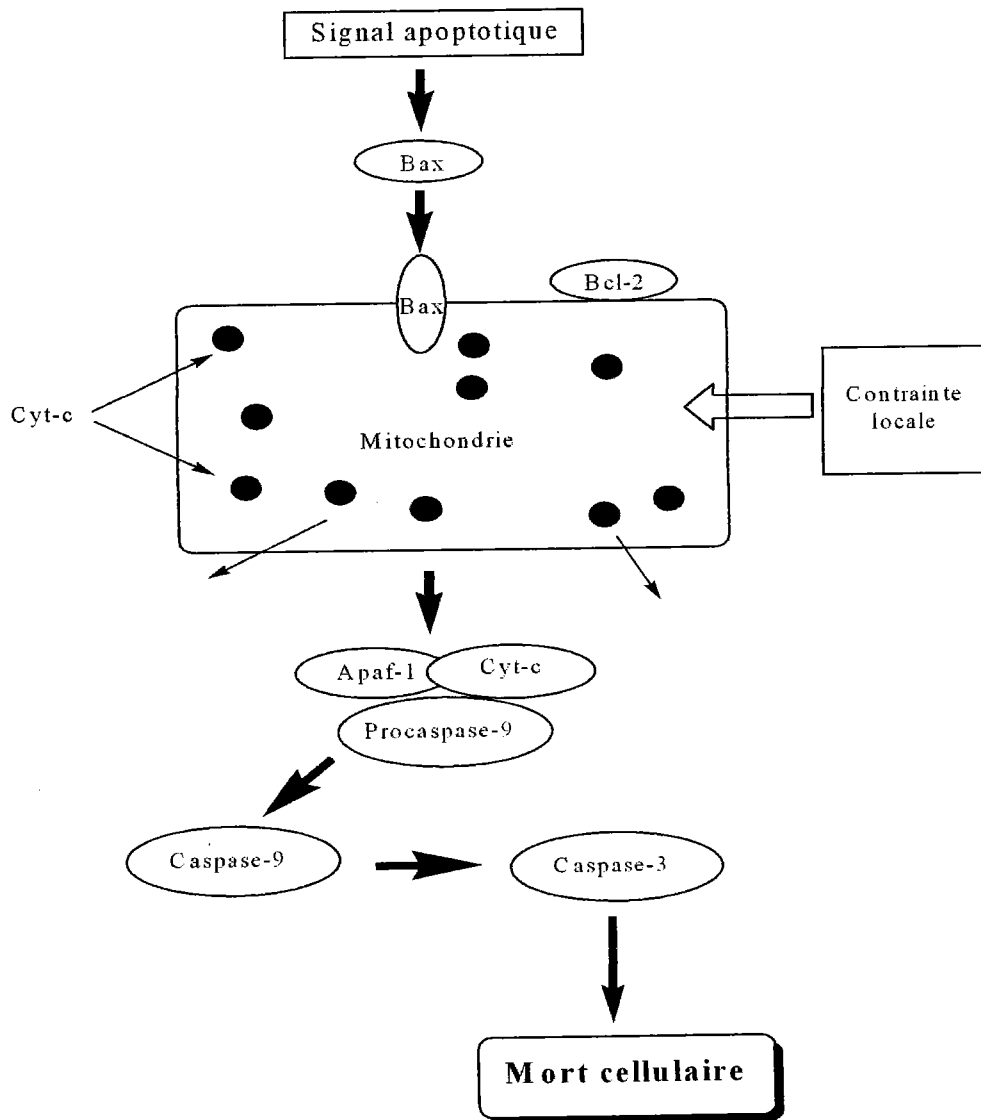


Schéma I-3

Le schéma I-3 est une description simplifiée du mécanisme moléculaire de l'apoptose. Suite à un signal apoptotique, Bax (protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2) migre vers la mitochondrie. Cette migration déclenche l'expulsion de Cytochrome c (Cyt-c). Cette expulsion est inhibée par Bcl-2 (protéine antiapoptotique) placée sur la membrane mitochondriale. D'autres contraintes locales peuvent induire l'exclusion de Cyt-c. Une fois dans le cytosol, Cyt-c forme un complexe avec Apaf-1 (facteur activant les protéases apoptotiques-1) et la procaspase-9. Ce complexe active la caspase-9 qui active elle-même la caspase-3. Quand cette caspase, appelée 'l'exécutant', est activée alors la mort cellulaire devient inévitable.

La contribution essentielle du glutathion cytosolique sous sa forme réduite dans la régulation de l'état apoptotique de la cellule devient de plus en plus claire. Plusieurs travaux menés ces dernières années tendent à prouver que la baisse de la concentration intracellulaire du GSH est un événement cellulaire nécessaire au bon déroulement du processus apoptotique. Aussi une surexpression des Bcl-2 (protéines antiapoptotiques) tendrait à augmenter la concentration du GSH dans le noyau de la cellule et ainsi interdire le processus apoptotique¹⁶.¹⁷ Il a été suggéré que la compartimentation intracellulaire du GSH (en particulier au niveau intranucléaire et mitochondrial) plus que le niveau global intracellulaire conditionne l'évolution de la cellule vers un état apoptotique. Cependant, bien que la contribution de Bcl-2 dans ce processus ait été montrée, son rôle exact reste obscur¹⁸.

Un trop faible niveau intracellulaire empêche également le processus apoptotique. En effet les caspases, initiateurs de la dégradation cellulaire, ne sont plus activées¹⁹. Celles-ci possèdent un résidu Cys dans leur site actif et ont besoin d'une concentration précise de GSH qui empêche l'oxydation de ces résidus et maintient ainsi leur activité catalytique⁹. Le glutathion interviendrait donc lors des différentes phases du processus apoptotique.

Objectif du travail

Le GSH joue un rôle essentiel dans le mécanisme de protection contre la mort cellulaire. Ainsi un taux élevé en GSH est associé à la résistance anti-apoptotique des cellules cancéreuses. De même, la surexpression des GST semble être associée au phénotype MDR lors de traitements en chimiothérapie. Le système du glutathion qui assure le métabolisme cellulaire de ce tripeptide constitue de ce fait une cible thérapeutique d'intérêt dans l'optique d'améliorer l'efficacité de traitements anticancéreux.

Le but du travail proposé dans ce mémoire est de synthétiser une série d'analogues photoactivables du glutathion (GSH ou GSSG). Les structures seront détaillées au cours du premier chapitre. Ces analogues, par leur plus ou moins grande affinité avec les partenaires du glutathion, permettront à l'équipe de biochimie du laboratoire de 1) évaluer l'effet de ces composés sur le système du glutathion dans des lignées cancéreuses 2) préciser le ou les rôles du glutathion au cours de l'apoptose en identifiant ses différents partenaires cellulaires.

Dans un premier temps, les analogues photoactivables du glutathion synthétisés au cours de ce travail seront caractérisés pour leur effet sur les enzymes du système du GSH

(GR, GST, GGT, pompes GS-X) dans des cellules dérivant de cancer, notamment les cellules d'adénocarcinomes mammaires humains MCF-7, dans le but de rechercher une molécule interagissant avec le système du glutathion et qui permettrait de sensibiliser les cellules en diminuant leur résistance aux médicaments anticancéreux.

Dans un deuxième temps, nos collègues biologistes du laboratoire exploiteront ces sondes analogues du glutathion en focalisant leur travail sur la protéine anti-apoptotiques Bcl-2, dont le lien avec le GSH reste grandement incompris. Les recherches seront orientées vers les mouvements intracellulaires du GSH et sa compartimentation intracellulaire lors de l'évolution vers l'apoptose. Les protéines impliquées dans cette compartimentation seront identifiées en exploitant les analogues photoactivables décrits dans ce travail, et nos collègues biologistes porteront d'abord leur intérêt sur l'étude des rôles respectifs et/ou coordonnés de Bcl-2 et du glutathion dans la résistance aux anticancéreux de type doxorubicine.

Présentation des chapitres

Le chapitre qui suit portera sur une étude bibliographique du marquage par photoaffinité, des groupements photoactivables et des analogues photoactivables du glutathion.

Dans le chapitre II, il sera question de la synthèse d'esters activés destinés à la synthèse d'analogues photoactivables conjugués du GSH et du GSSG. Ces esters sont construits à partir de la structure des trois principaux groupements photoactivables: les azotures d'aryle, le groupement trifluorométhyl diazirine et la benzophénone.

Le chapitre III sera consacré à la synthèse des analogues photoactivables conjugués du GSH N-modifiés, ainsi qu'à la synthèse des analogues photoactivables conjugués du GSSG N et N'-modifiés.

Dans le chapitre IV nous décrirons les différentes stratégies que nous avons développées pour atteindre un analogue photoactivable du GSH porteur du motif azoture d'aryle, ainsi que les essais correspondants.

Le chapitre V traitera de nos différentes tentatives visant à synthétiser un analogue photoactivable du GSH construit autour du motif benzophénone.

Enfin dans le chapitre VI nous reporterons les premiers résultats des essais biologiques réalisés avec certains des analogues photoactivables du glutathion.

Chapitre I Etude bibliographique du marquage par photoaffinité, des groupements photoactivables et des analogues du glutathion

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord décrire la technique de marquage par photoaffinité, puis nous allons présenter les groupements photoactivables et enfin présenter les analogues du glutathion ainsi que ceux que nous nous proposons de synthétiser au cours de ce mémoire.

1- Le marquage par photoaffinité

Le marquage par photoaffinité est une technique en plein essor. Elle est fréquemment utilisée pour étudier les molécules possédant une activité biologique. Elle consiste à substituer une molécule bioactive par son analogue photoactivable, stable à l'abri de la lumière, qui sera transformé sous irradiation U.V. en une espèce réactive. Cette dernière, en formant une liaison covalente, rendra irréversible les liaisons basées sur les affinités biologiques. C'est ainsi que le marquage des sites actifs des enzymes, des sites d'ancrage des protéines, des sites des récepteurs, des systèmes de transport ou des organelles cellulaires, est désormais possible. (Schéma I-1)

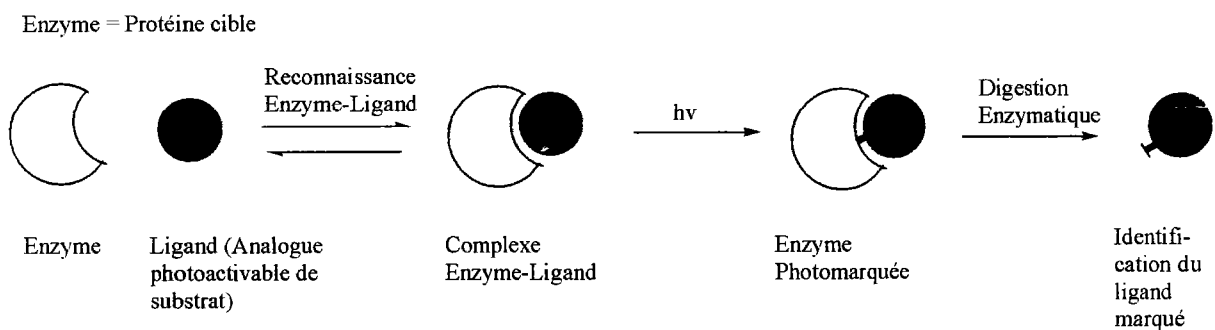


Schéma I-1

Idéalement, le dérivé photoactivable, encore appelé sonde, devrait avoir une activité biologique similaire à la molécule étudiée. Cependant des analogues ayant une activité 1000 fois moindre demeurent utiles²⁰ à partir du moment où le caractère compétitif de la fixation est démontré.

Les biologistes ont un besoin croissant pour ce type de sondes car elles permettent l'identification des protéines d'intérêt, c'est-à-dire les molécules ayant une affinité biologique pour l'analogue photoactivable. Les analogues ciblés peuvent être soit des molécules radioactives, soit des molécules porteuses de groupements qui peuvent créer des liaisons chimiosélectives avec des composés nécessaires à l'identification des protéines d'intérêt, soit des molécules ne possédant ni l'une ni l'autre de ces propriétés ce qui dans ce dernier cas peut compliquer l'identification des protéines photomarquées.

Dans les trois cas, après l'irradiation U.V. les protéines sont séparées par électrophorèse.

- Dans le cas des molécules radioactives la détection se fait directement après la séparation des protéines par électrophorèse et autoradiographie.

- Dans le cas où les protéines photomarquées possèdent un groupement qui permet la création de liaisons chimiosélectives, les adduits formés avec les protéines possédant une affinité avec la sonde sont incubés avec un marqueur tel qu'un dérivé de la biotine qui sera porteur d'un groupement complémentaire nécessaire à la chimiosélectivité. (Schéma I-2) Ensuite une nouvelle incubation en présence de streptavidine couplée à la peroxidase permettra de visualiser et d'analyser les fragments protéiniques marqués par chimiluminescence^{21, 22}. Il faut noter que le dérivé nécessaire à la chimiosélectivité peut être fluorescent ce qui permet de se passer de la chimiluminescence²³ dans ce cas.

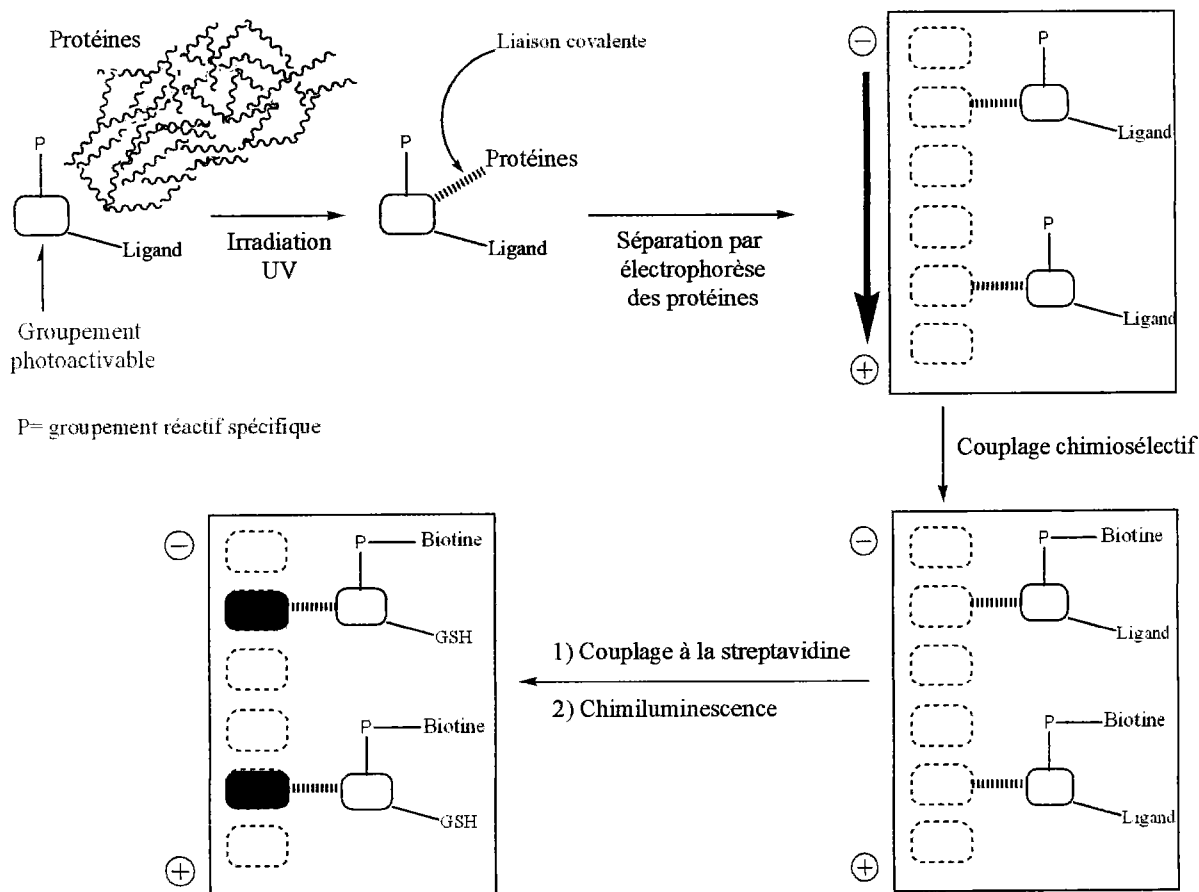


Schéma I-2

Ces liaisons chimiosélectives sont aussi regroupées sous le terme générique d'orthogonalité chimique²⁴. Ce terme fait référence à la réactivité mutuelle et exclusive qui existe entre deux groupes fonctionnels. Ces réactions doivent pouvoir être conduites à pH neutre et en milieu aqueux puisque les conditions doivent être les plus proches possibles de celles du milieu physiologique. Ainsi des paires électrophiles-nucléophiles peuvent se coupler sélectivement en présence de peptides partiellement protégés ou non protégés²⁵. (Schéma I-3)

Les groupements qui constituent la paire électrophile-nucléophile se situent un sur le motif photoactivable de la sonde et l'autre sur le composé nécessaire à la détection des protéines ayant une affinité avec la sonde. Dans les schémas I-3, I-4 et I-5 nous donnons des exemples de paires électrophiles-nucléophiles utilisées pour l'établissement de liaisons chimiosélectives en milieu biologique.

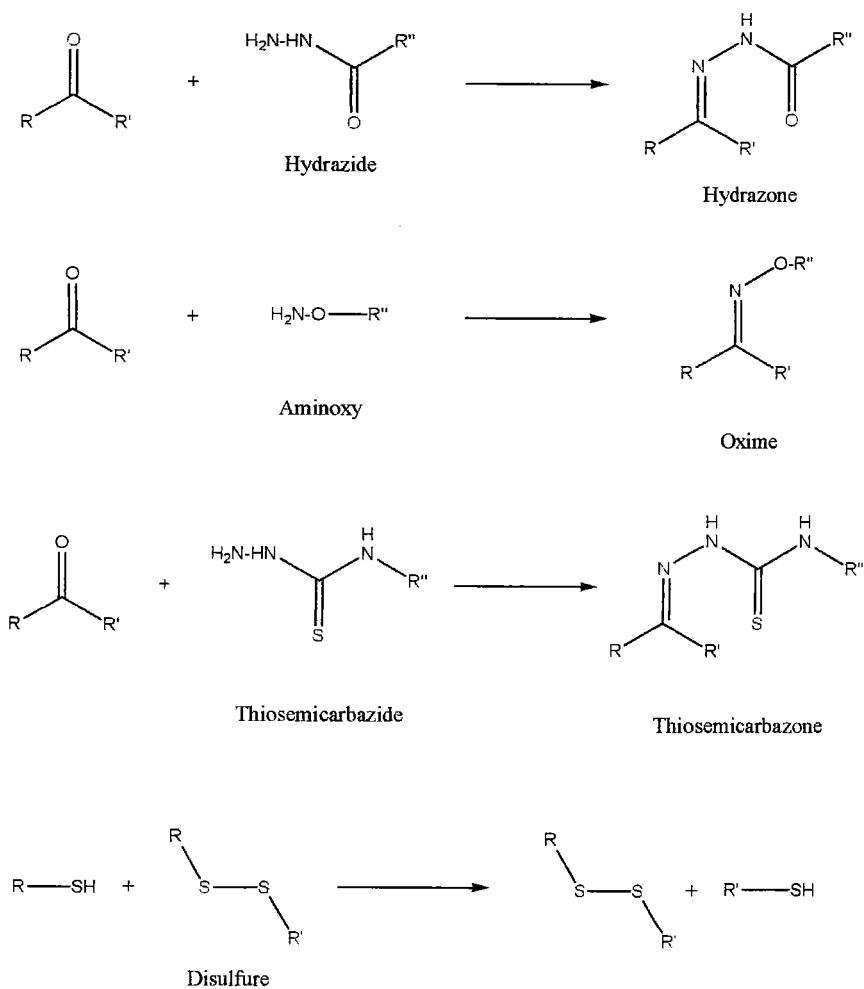


Schéma I-3

Sur le schéma I-3 nous voyons que les dérivés carbonylés (cétone et aldéhyde) réagissent avec les hydrazides, les dérivés O-alkyles de l'hydroxylamine ou les thiosemicarbazides pour donner respectivement des hydrazones, des O-alkyloximes ou des thiosemicarbazones²⁶. Nous pouvons également citer la création de liaison disulfure qui exploite la très bonne réactivité des thiols dans des conditions douces d'oxydation.

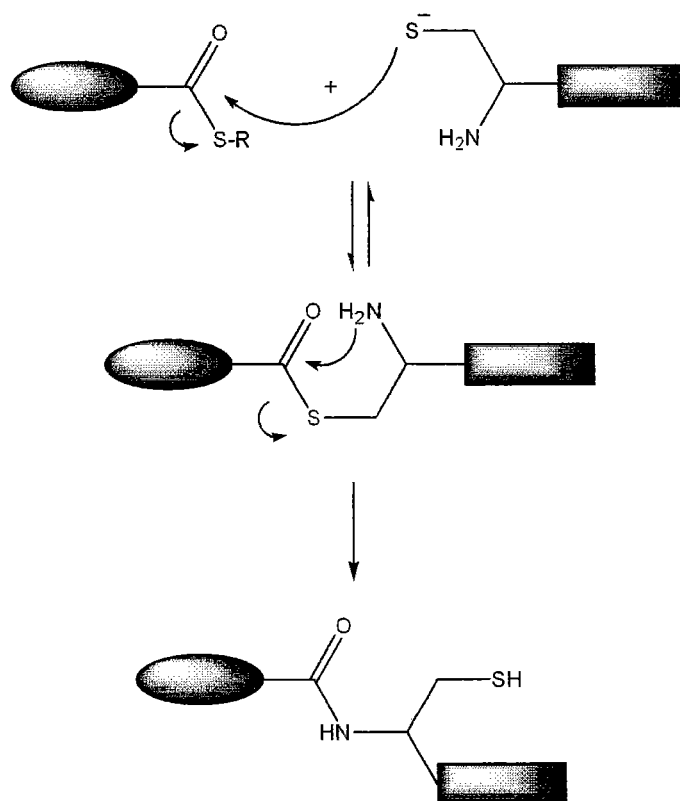
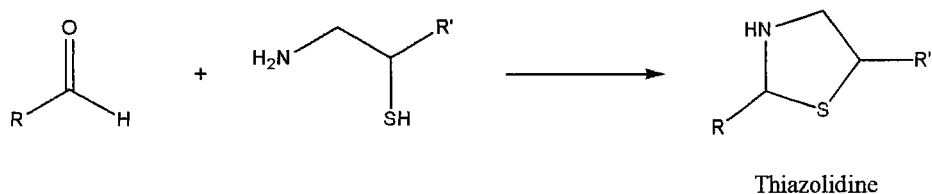
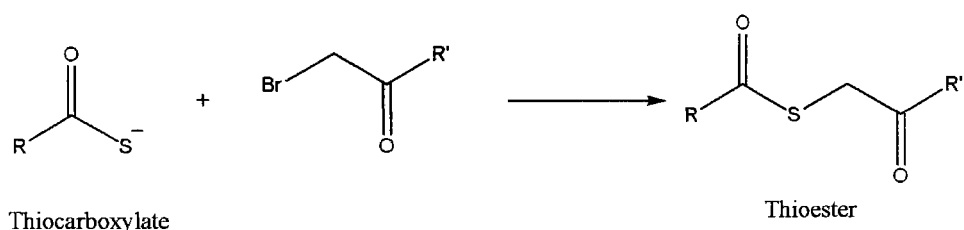


Schéma I-4

D'après le schéma I-4 nous voyons que les thiocarboxylates réagissent avec les α -halocétones pour former des thioesters. Les aldéhydes en présence d'aminothiols donnent des thiazolidines. Les aminothiols sont particulièrement intéressants. Leur réactivité particulière a été mise à profit lors de la synthèse de peptides contenant plus de 60 amino-acides dans une réaction appelée 'Native Chemical Ligation'²⁷. Cette réaction connaît un regain d'intérêt depuis quelques années^{26, 28, 29}. Un thioester d'acide aminé ou de peptide partiellement protégé va créer un lien peptidique de façon sélective avec une cystéine N-terminale. (-NH₂ et -SH

libres) La première étape est une trans-thioestérification réversible, et ce thioester nouvellement formé se réarrange pour former une liaison amide plus stable³⁰. (Schéma I-5)

Enfin nous pouvons citer la ligation dite de Staudinger-Bertozzi développée par Bertozzi et coll.^{23, 31, 32} qui met en jeu un azoture d'alkyle et un dérivé de la triphénylphosphine²⁵. (Schéma I-5)

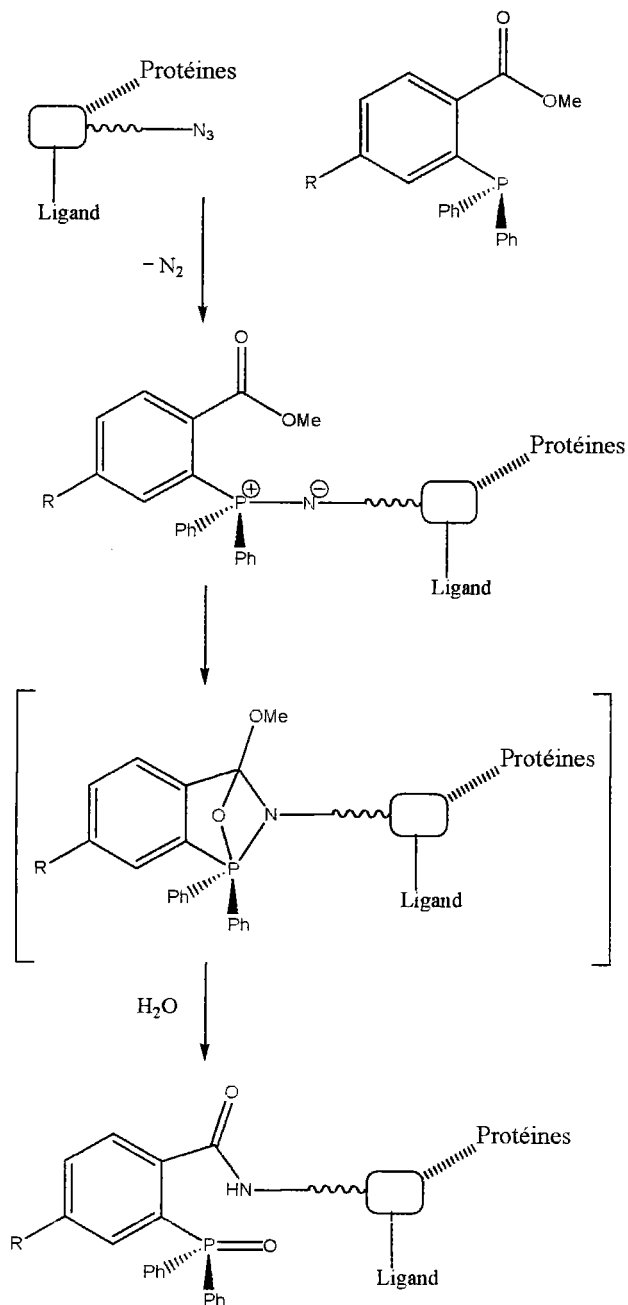


Schéma I-5

Sur le schéma I-5, le complexe protéine cible-ligand est celui formé après irradiation U.V. du groupement photoactivable qui aboutit à l'établissement d'une liaison covalente. L'alkylazide terminal réagit dans une réaction de Staudinger appliquée par Bertozzi et son équipe à l'identification des protéines. Le groupement R peut être un dérivé de la biotine ou un groupement fluorescent. Comme nous l'avons vu précédemment ces groupements permettent l'identification des protéines cibles.

Il faut noter que le groupement d'une paire électrophile-nucléophile se situant sur le motif photoactivable doit être assez robuste pour ne pas être détruit lors de l'irradiation U.V. nécessaire au marquage par photoaffinité.

- Dans le cas où les protéines photomarquées ne comportent ni élément radioactif, ni groupement permettant la création de liaisons chimiosélectives, l'identification peut être effectuée grâce à l'utilisation d'anticorps³³. Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et sont incubées avec un anticorps dirigé contre l'adduit. Ensuite un deuxième anticorps, dirigé contre le premier et couplé à la streptavidine puis à la biotine, sera utilisé. Pour finir, l'ensemble couplé à la peroxidase permettra de visualiser et d'analyser les fragments protéiniques marqués par chimiluminescence. Cette méthode est restrictive puisqu'elle dépend de la disponibilité d'un anticorps dirigé contre l'adduit d'intérêt. De plus, l'adduit doit être accessible par l'anticorps existant.

C'est cette technique que mes collègues biologistes privilégieront dans un premier temps. La reconnaissance du complexe protéine cible-substrat modifié sera de type biochimique.

La technique de marquage par photoaffinité possède 3 niveaux d'analyse. Le premier niveau permet d'identifier des protéines de liaison qui peuvent être impliquées dans des pathologies. Le second niveau permet de localiser le domaine de liaison au ligand en fragmentant le complexe protéine marquée-cible en de courts peptides. Le dernier niveau établit la conformation du site de liaison au ligand et identifie les acides aminés impliqués dans l'interaction du récepteur avec son ligand.

2- Les groupements photoactivables

Il y a un nombre limité de groupements photoactivables car ils sont tenus de répondre à des critères stricts. En premier lieu, les produits obtenus après irradiation U.V. doivent être identifiés de manière précise pour connaître le type de liaison covalente qu'ils peuvent fournir. Ils doivent également posséder :

- i) une stabilité raisonnable lorsqu'ils sont exposés à la lumière ambiante.
- ii) un état excité induit photochimiquement avec une durée de vie plus courte que la dissociation du complexe ligand-récepteur, mais suffisante pour s'approcher du site ciblé qu'il faut lier de manière covalente.
- iii) une forme activée qui réagit avec les groupements $-CH$, ou les groupements nucléophilique $-X-H$.
- iv) une longueur d'onde d'activation suffisamment élevée pour éviter la détérioration du matériel protéinique. Si ce n'est pas le cas, le temps d'irradiation UV sera réduit au minimum.

Des études comparatives ont montré que la plus grande efficacité de marquage par photoaffinité est obtenue par action de groupements tels que les azotures d'aryles, les trifluorométhylidiazirines et les benzophénones.

2-1) Les azotures d'aryles

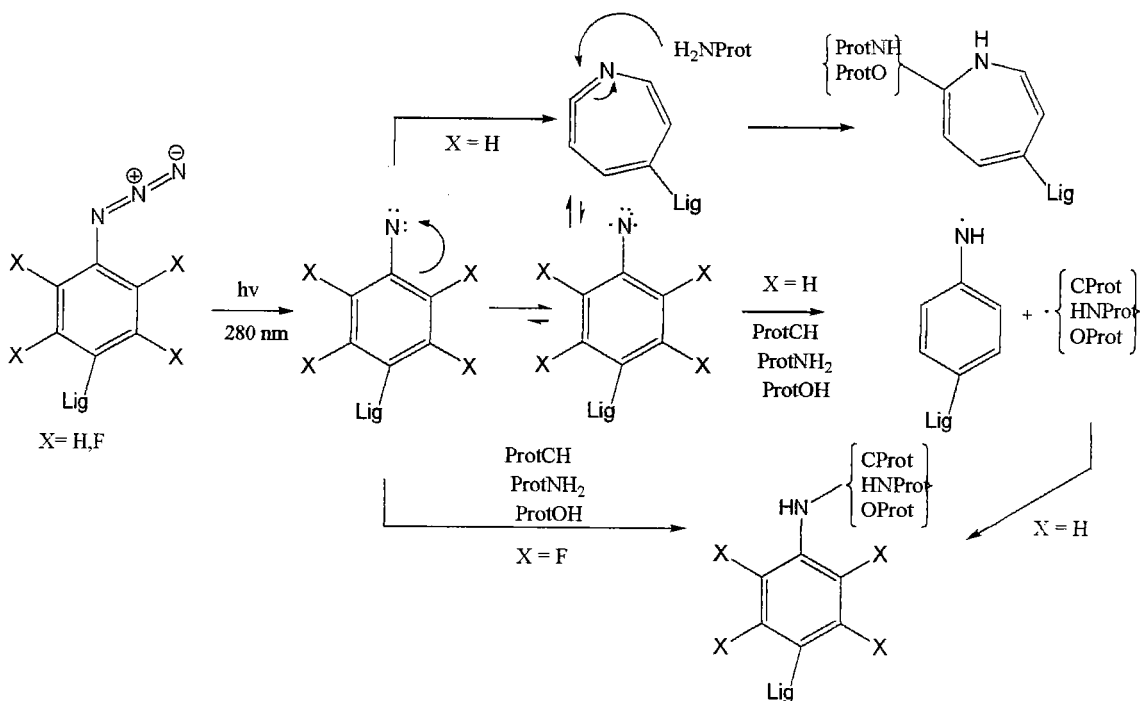


Schéma I-6

Comme le montre le schéma I-6, la photochimie des azotures aromatiques est compliquée. Plusieurs espèces sont formées lors de l'irradiation UV. De plus, le temps de vie des ces intermédiaires est long par rapport aux critères mentionnés plus en avant. Ceci pose un problème majeur à savoir le risque de ne pas avoir de modifications sélectives au niveau du site de fixation du ligand, et par conséquent ces sites de fixation seront le reflet d'une préférence du réactif et non celui de la localisation initiale du substrat. Un autre point qui ne plaide pas en la faveur des azotures aromatiques est le fait que la longueur d'onde nécessaire à leur activation peut endommager les systèmes biologiques étudiés. Pour essayer de pallier ces inconvénients plusieurs modifications ont été apportées. Soit le cycle aromatique est désactivé par la présence d'un groupement nitro ou par la présence d'atomes de fluor pour stabiliser le nitrene formé. Soit le cycle aromatique est enrichi par l'ajout d'un groupement hydroxyle qui permet de modifier la longueur d'onde d'activation de l'azoture d'aryle et de préserver ainsi les matériels biologiques étudiés. Ces améliorations permettent de rendre l'utilisation des azotures d'aryles attractive pour le marquage par photoaffinité des protéines.

2-2) Les trifluorométhyl diazirines

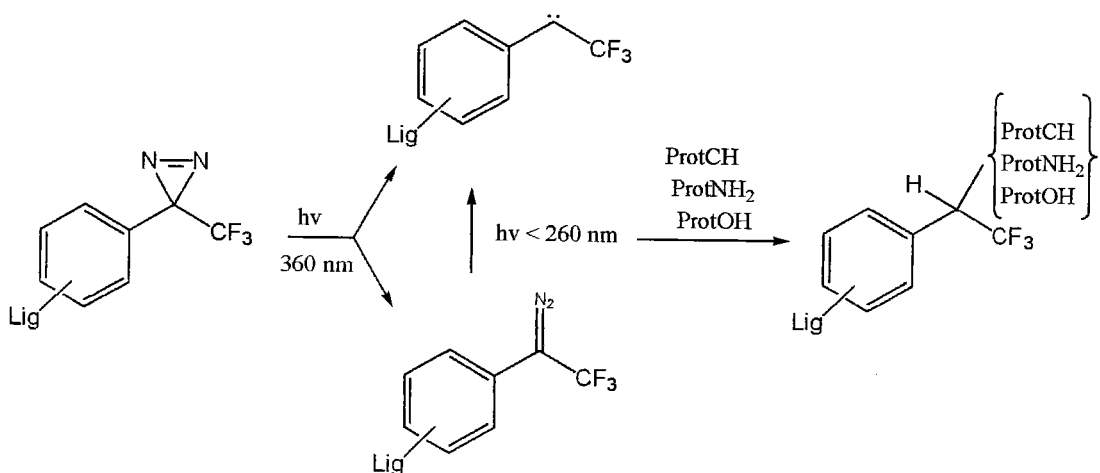


Schéma I-7

En ce qui concerne les trifluorométhylphényldiazirine (Schéma I-7), leur irradiation sous U.V. conduit à la formation d'un carbène et d'un composé diazo. Il y a plusieurs problèmes qui découlent de cette photodécomposition.

Premièrement le carbène formé est sensible au milieu oxydant et peut former des cétones. Deuxièmement pour que le composé diazo formé engendre un carbène il doit être irradié à une longueur d'onde voisine de celle qui endommage les systèmes biologiques. De plus le composé diazo a une durée de vie assez longue à la longueur d'onde d'irradiation des diazirines, ce qui crée des problèmes similaires à ceux rencontrés dans le cas des azides, et par conséquent le photomarquage peut donner des informations erronées concernant la sélectivité des modifications.

Par ailleurs il faut signaler que les diazirines sont peu stables à la lumière ambiante et elles nécessitent certaines précautions lors de leur utilisation. Il faut travailler en mode laboratoire de photographies. (Notons que nous n'avons pas remarqué un quelconque caractère explosif des diazirines).

Cependant ce groupement photoactivable possède également des points forts. Contrairement aux azides^{34, 35}, les diazirines sont stables vis-à-vis les thiols souvent présent dans les essais cellulaires (dithiotréitol ou mercaptoéthanol)^{36, 37}. De plus elles sont stables dans les milieux légèrement acide ou basique. Ce groupement lipophile est petit en volume et permet une modification minimale du ligand. Enfin, la formation directe du carbène à une longueur

d'onde égale à 360 nm est tolérée par les systèmes biologiques étudiés et sa haute réactivité lui permet de réagir avec tous les acides aminés³⁸.

2-3) Les dérivés de la benzophénone

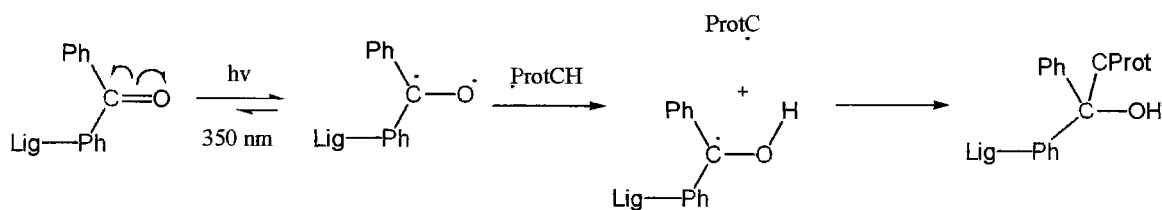


Schéma I-8

Le troisième type de groupement photoactivable (Schéma I-8) est le motif benzophénone. D'après la littérature c'est le plus efficace^{39, 40}. Chimiquement il est plus stable que les autres réactifs photoactivables. Il peut être manipulé à la lumière ambiante et sa longueur d'onde d'activation est compatible avec les systèmes biologiques étudiés. Il peut être excité de manière réversible, l'état excité revenant à son état fondamental sans perte de réactivité de la benzophénone. Le radical généré réagit de manière préférentielle avec les liaisons C-H non réactive (la distance entre l'atome d'oxygène de la liaison carbonyle et la liaison C-H ne doit pas excéder 3,1Å) et ceci même en présence d'eau ou de tout autre solvant protique. Ces propriétés font que le groupement benzophénone crée des modifications covalentes de manière très efficace et généralement avec une grande sélectivité par rapport aux sites visés. Cependant un point négatif, encore à l'étude, a été rapporté⁴¹. Des structures aux rayons X tendent à montrer que le groupement -CH₂Benzophénone (que nous n'utiliserons pas dans cette étude) possède une certaine flexibilité, et ceci peut influencer sur la sélectivité du photomarquage. Les chercheurs doivent donc rester critiques vis-à-vis des données physiques et des résultats analytiques qui découlent des travaux de photomarquage sur la cartographie des protéines ainsi que sur les distances intramoléculeaires.

Bien que le groupement benzophénone semble supérieur aux deux autres, il faut quand même noter qu'il est impossible de prédire lequel de ces groupements photoactivables donnera les meilleurs taux d'incorporation lors des essais de photoactivation. L'affinité enzyme-ligand conditionnera l'utilisation de tel ou tel groupement photoactivable. C'est pourquoi dans de

nombreuses études publiées les analogues synthétisés comprennent différents types de groupements photoactivables pour mener au mieux une étude structure-activité³⁸.

3- Les analogues du glutathion

Dans la suite de ce mémoire nous considérerons deux types d'analogues du GSH:

- les analogues pour lesquels le chromophore est inséré dans la structure du GSH.
- les analogues conjugués: dérivés obtenus par couplage du groupement photoactivable sur une des fonctions du GSH.

De part son omniprésence dans les cellules, le GSH a attiré les chercheurs depuis de nombreuses décennies. En conséquence il y a un grand nombre d'exemples d'analogues du GSH dans la littérature^{42, 43, 44, 45}. En effet nous avons vu dans l'introduction que le GSH est impliqué dans de nombreux processus de protection cellulaire et est ainsi le substrat privilégié de plusieurs enzymes. Le site d'interaction avec le GSH diffère suivant les enzymes. De ce fait, le choix de l'enzyme étudiée a parfois conditionné les changements structuraux qu'ont effectué les chercheurs sur le GSH, et ceci bien sûr pour atteindre des analogues possédant une activité biologique spécifique. Le GSH a été ainsi S-modifié par des groupements photoactivables ou non, afin d'évaluer l'effet des sondes synthétisées sur les glutathion-S-transférases⁴⁶, les protéines résistantes aux traitements anticancéreux⁴⁷ (MRP), les pompes à GSH S-modifié (GS-X Pump)⁴⁸, la glyoxalase I⁴⁹ et la glyoxalase II⁵⁰ dans des études de marquage par photoaffinité ou d'inhibition enzymatique. Levy et coll⁵¹ ont quant à eux diestérifié le GSH afin d'augmenter la concentration de GSH dans les cellules en tirant profit du fait que le plasma humain ne contient pas de glutathion diester α -diestérase.

Nous allons nous intéresser à la synthèse d'analogues du GSH porteurs de groupements photactivables.

3-1) Synthèse d'analogues photoactivables N-fonctionnalisés du glutathion

La littérature ne rapporte que peu de travaux consacrés à ce type de cibles. Les analogues décrits sont généralement S-modifiés^{48, 52, 53} ou N et S-modifiés^{54, 55, 56}. L'unique exemple

d'analogue N-modifié est proposé par Kawartsky et coll.⁵⁷ mais nous montrerons dans le chapitre III que les résultats semblent difficilement reproductibles. De même, à notre connaissance la littérature ne révèle qu'un seul exemple d'analogue photoactivable N-fonctionnalisé du GSSG⁵⁶. Nous pouvons également ajouter que dans les deux références citées précédemment les groupements photoactivables sont des azotures d'aryles.

Au cours de ce travail, nous nous proposons de réaliser l'étude structure-activité biologique d'analogues conjugués N-modifiés du GSH, car ces dérivés gardent leur fonction sulfhydryle intacte.

Nous avons choisi d'étendre notre étude à la synthèse d'analogues photoactivables qui portent comme groupement photoréactif soit le groupement azoture d'aryle, soit le groupement diazirine ou encore le groupement benzophénone.

Nous nous intéresserons également au cas de la synthèse de nouveaux analogues photoactivables du GSSG N-fonctionnalisés car comme le montre une publication récente le GSSG peut induire l'apoptose⁵⁸ et l'utilisation de sondes photoactivables analogues du GSSG pourrait être exploitée pour en comprendre le mécanisme d'action.

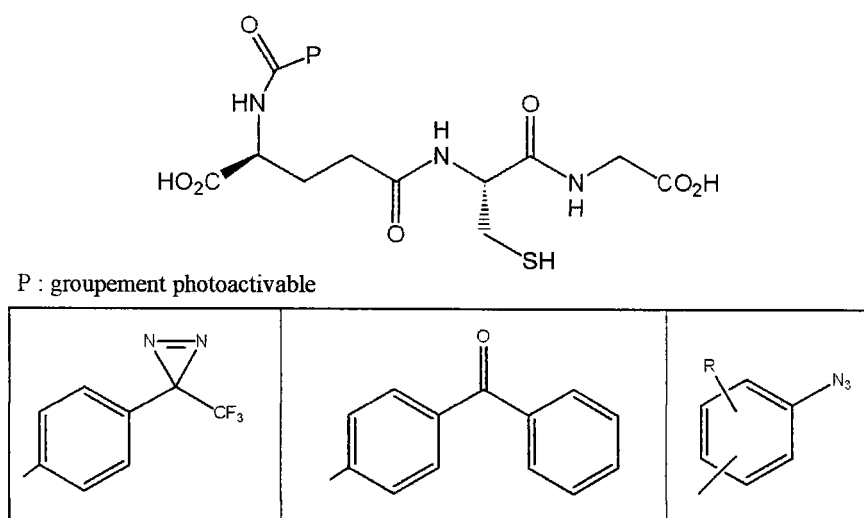


Figure I-1 Analogues ciblés du GSH

Les différentes stratégies pour atteindre les analogues photoactivables conjugués du GSH (Figure I-1) seront développées dans le chapitre III.

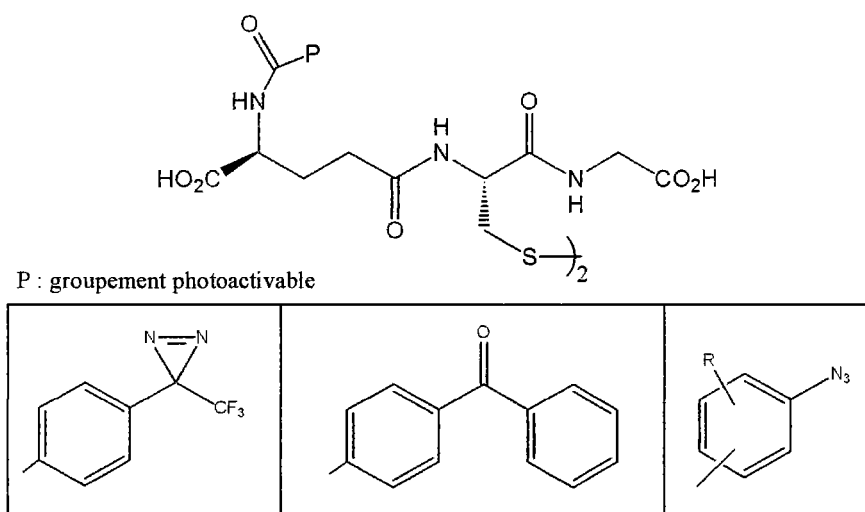


Figure I-2 Analogues ciblés du GSSG

Les différentes stratégies pour atteindre les analogues photoactivables conjugués du GSSG (Figure I-2) seront également développées dans le chapitre III.

3- 2) Synthèse d'analogues photoactivables du GSH

La littérature décrit des analogues isostères du GSH qui sont issus de la synthèse peptidique^{59, 60, 61, 62}, les modifications portent en général sur la chaîne carbonée du tripeptide, sur les liaisons amides ou sur les acides carboxyliques. Cependant nous n'avons pas trouvé d'exemples décrivant la synthèse d'analogues du GSH où un des acides-aminés qui le constituent était remplacé par une structure photoactivable.

Par conséquent, nous nous proposons de synthétiser des analogues du GSH dont la structure est construite autour d'azotures aromatiques ou de dérivés de la benzophénone. Les analogues ciblés sont présentés dans la figure I-3.

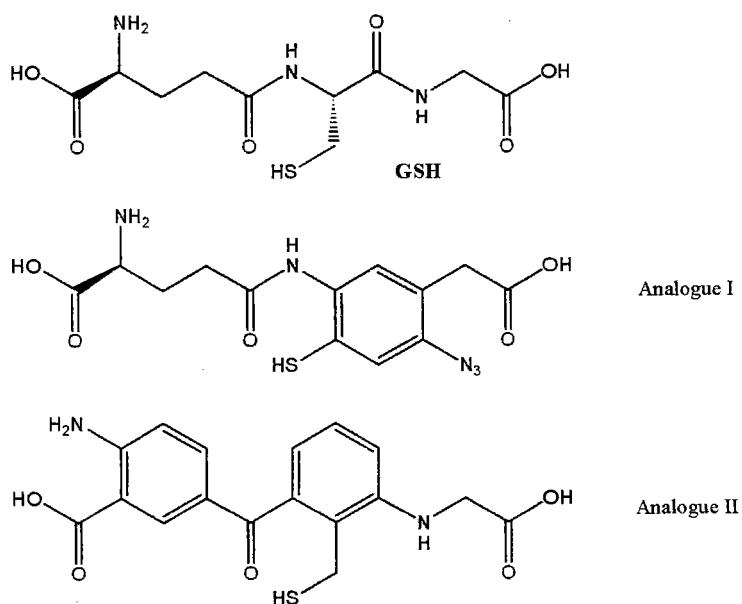


Figure I-3 Autres analogues ciblés du GSH

Les différentes stratégies mises en œuvre pour atteindre ces cibles (Figure I-2) seront exposées dans les chapitres IV (Analogue I) et V (Analogue II).

Chapitre II Synthèse des groupements photoactivables

Parmi les différents groupements photoactivables nous avons choisi de nous intéresser aux motifs : benzophénone, azoture d'aryle et diazirine. L'objet de ce chapitre est de présenter les différentes synthèses que nous avons effectuées pour atteindre ces molécules photoactivables.

Celles-ci doivent posséder une fonction acide carboxylique qui sera transformée en ester N-hydroxysuccinimique. Cette activation, fréquemment utilisée en synthèse peptidique, nous permettra de greffer le groupement photoactivable au GSH, plus précisément de le greffer au niveau de l'amine libre du résidu de l'acide glutamique.

1- Synthèse d'analogues du motif "benzophénone"

Le motif benzophénone est un groupement photoactivable, ainsi que le groupement benzoylthiophène^{63, 64}. D'après les travaux de Bosca et coll.⁶⁵ il apparaît clairement que le groupement benzoylthiophène ou le groupement benzoylpyrrole contenu dans l'acide tiaprofénique, dans le suprofen et dans le tolmetin (Figure II-1) rendent ces molécules elles aussi photoactivables. En effet, ces travaux ont rapporté que les patients traités avec ces molécules présentent des problèmes d'allergie par photosensibilisation.

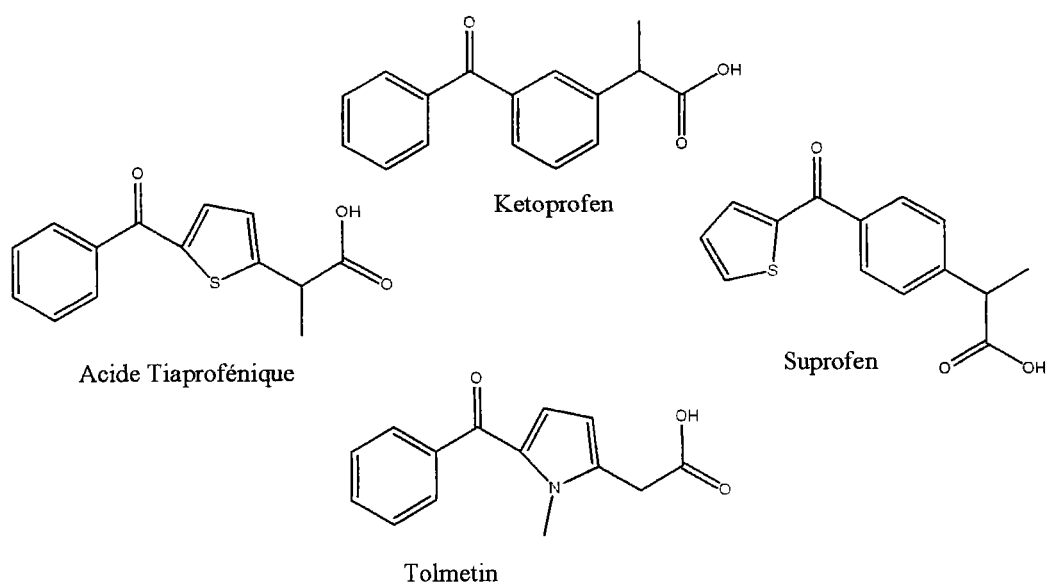


Figure II-1 Exemples de molécules photoactivables

De plus étant donné que le groupement 4-benzoylbenzoyle^{40, 65, 66, 67, 68, 69} et que le kétoprofen sont également reconnus pour avoir des propriétés photoactivables nous nous sommes proposés de synthétiser des analogues de l'acide tiaprofénique, du tolmetin et du suprofen pour atteindre des nouveaux motifs photoactivables. Ces analogues (1-4) comportent dans leur structure un noyau thiophénique ou pyrrolique et sont représentées dans la figure II-2.

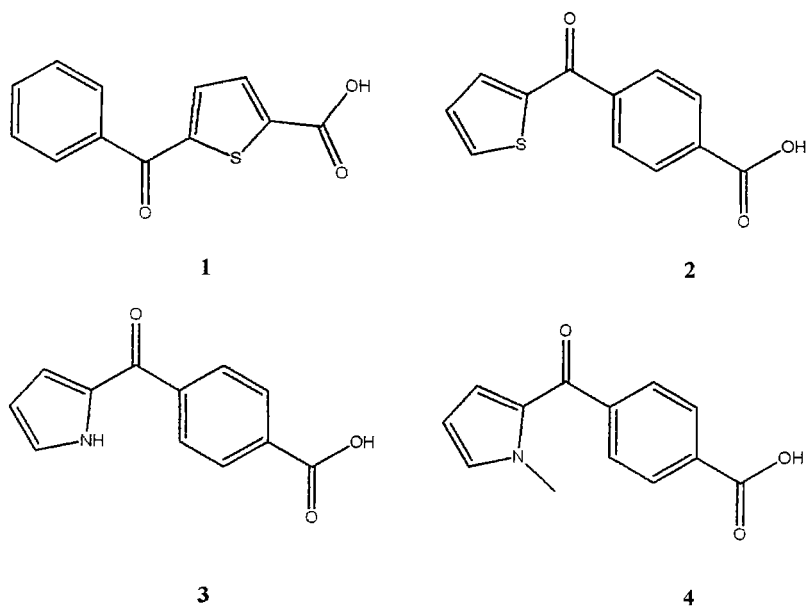


Figure II-2 Analogues de l'acide 4-benzoylbenzoïque ciblés

Nous espérons que les modifications faites sur le motif de la benzophénone fera des ces analogues des bons candidats pour l'élaboration de sondes destinées au marquage par photoaffinité.

1-1) Acide 5-benzoylthiophène-2-carboxylique

La synthèse de l'analogue de l'acide thiaprofénique a été conduite en apportant quelques modifications à une synthèse décrite dans la littérature. Dans ces travaux l'acide 5-benzoylthiophène-2-carboxylique n'y est jamais utilisé pour ses propriétés photoactivables.

La littérature propose trois voies d'accès à l'acide 5-benzoylthiophène-2-carboxylique (1).

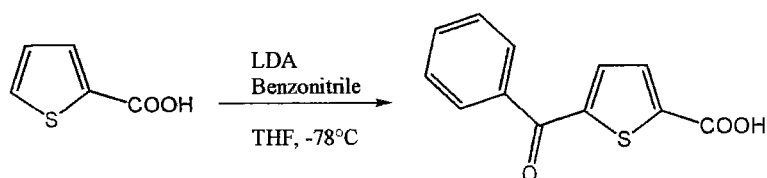


Schéma II-1

La voie 1⁷⁰ (Schéma II-1) consiste à faire réagir l'acide thiophène-2-carboxylique avec du benzonitrile à -78°C en présence de LDA. L'imine intermédiaire est hydrolysée lors du traitement de la réaction et donne le composé ciblé avec un rendement de 92%.

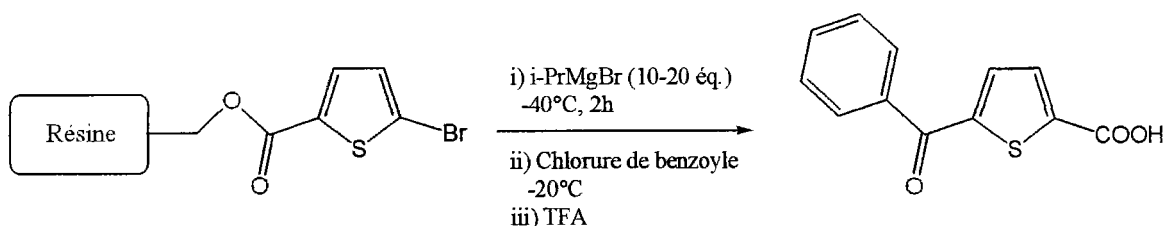


Schéma II-2

La voie 2 (Schéma II-2) développée par Knochel et coll.⁷¹ est de la chimie supportée par résine. Le magnésien de l'acide 5-bromothiophène-2-carboxylique obtenu par action du bromure d'isopropylmagnésium à -40°C est mis en réaction avec du chlorure de benzoyle à -20°C . Après déprotection avec l'acide trifluoroacétique, le composé ciblé est ainsi atteint avec un rendement de 93%.

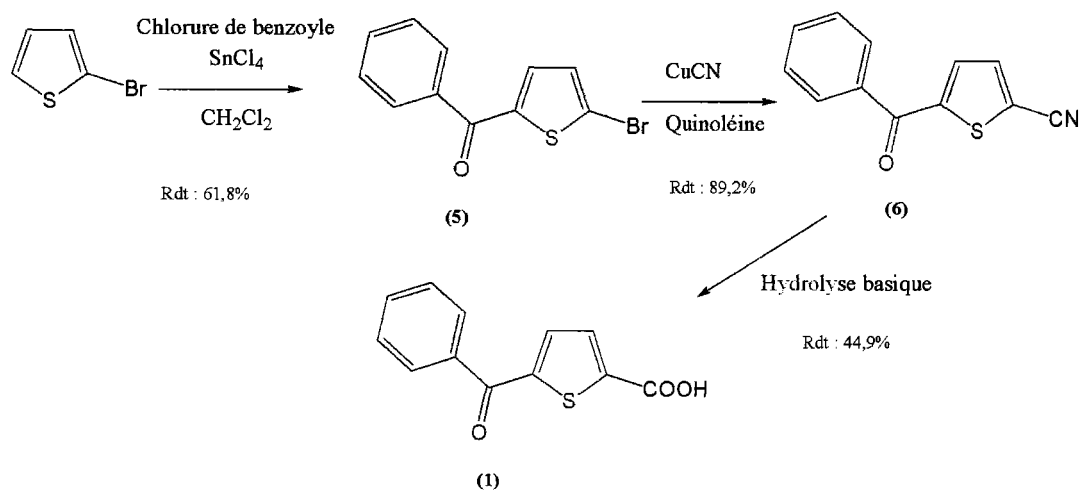


Schéma II-3

La voie 3⁷² (Schéma II-3) est une synthèse en trois étapes à partir du 2-bromothiophène. La première étape est une benzylation du 2-bromothiophène en position 5 suivant les conditions de la réaction d'acylation de Friedel-Crafts. La deuxième et la troisième étape consistent en la substitution de l'atome de brome par un groupement nitrile dont l'hydrolyse en milieu basique conduit au composé ciblé.

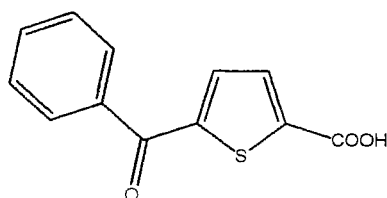
En nous inspirant de cette dernière méthode nous avons synthétisé l'acide 5-benzoylthiophène-2-carboxylique (1).

1- 2) Synthèse

L'acide 5-benzoylthiophène-2-carboxylique (1) est synthétisé en remplaçant le catalyseur de la réaction de Friedel-Crafts par du chlorure d'aluminium (AlCl_3) car par expérience nos premières tentatives nous ont montré que le tétrachlorure d'étain (SnCl_4) était difficile à éliminer lors de la purification. Donc, dans la première étape, la benzylation du 2-bromothiophène est réalisée par une réaction de Friedel-Crafts en présence d' AlCl_3 comme catalyseur. Après un traitement acide le 2-benzoyl-5-bromothiophène (5) est isolé avec un rendement de 85% et est suffisamment pur pour être utilisé sans purification particulière. La structure est confirmée par RMN ^1H , GC-MS et grâce à son point de fusion.

Lors de la deuxième étape l'atome de brome est substitué par un groupement nitrile à l'aide de cyanure de cuivre I dans le DMF à reflux. Le nitrile correspondant (**6**) est ainsi isolé avec un rendement de 30% après purification par recristallisation. La structure est également identifiée par RMN ^1H , GC-MS et grâce à son point de fusion.

Dans la dernière étape le groupement nitrile est transformé quantitativement en acide carboxylique par hydrolyse acide. La structure de l'acide 5-benzoylthiophène-2-carboxylique (**1**) (Figure II-3) est confirmée par les moyens analytiques usuels : RMN ^1H , point de fusion.



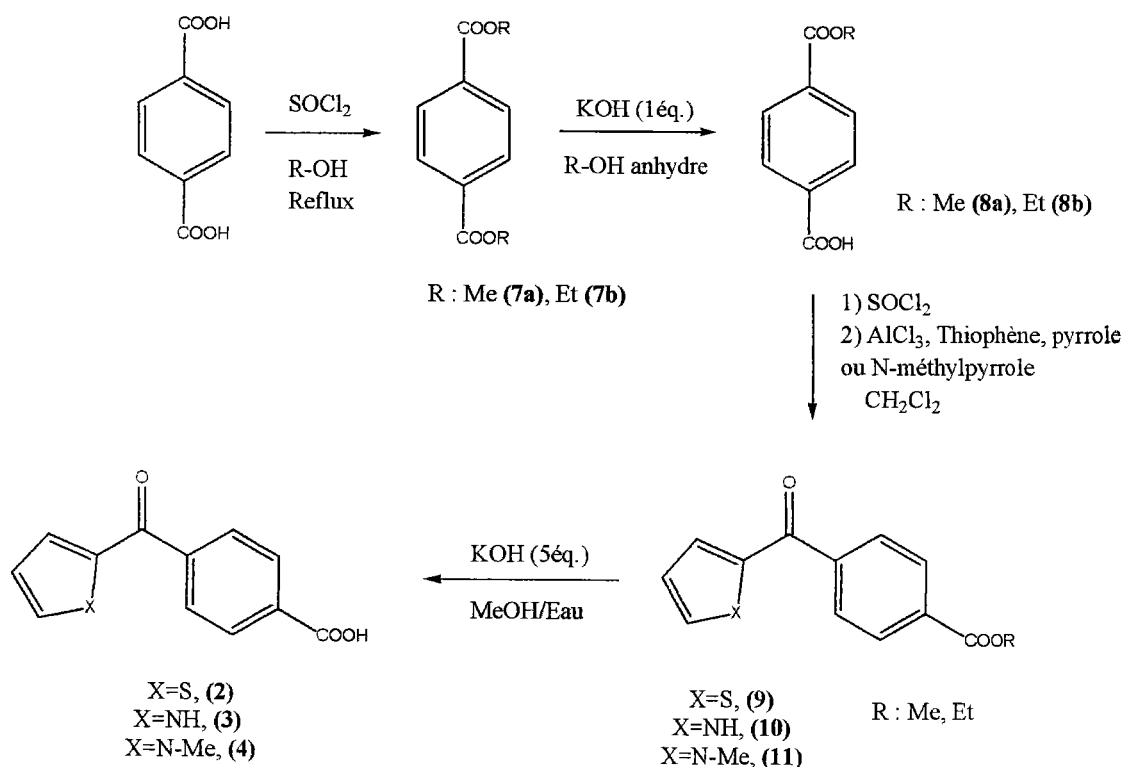
1

Figure II-3 Acide 5-benzoylthiophène-2-carboxylique

1- 3) Acides : 4-(thiophène-2-carbonyl)benzoïque, 4-(1*H*-pyrrole-2-carbonyl)benzoïque et 4-(1-Méthyl-1*H*-pyrrole-2-carbonyl)-benzoïque

A notre connaissance seule l'acide 4-(thiophène-2-carbonyl)benzoïque (**2**) apparaît dans la littérature, mais aucune synthèse n'est proposée. De plus cet acide n'est pas utilisé pour ses propriétés photoactivables mais dans la préparation d'inhibiteurs de cyclase-oxydes de squalène⁷³.

Pour atteindre les analogues de l'acide 4-benzoylbenzoïque nous proposons le schéma réactionnel ci-dessous (Schéma II-4). C'est une synthèse en cinq étapes à partir de l'acide téréphthalique.



Acides	Rendement global
2	86%
3	15%
4	21%

Schéma II-4

1- 4) Synthèses

Comme dans les travaux de Zu et coll.⁷⁴ lors de la synthèse du monoester méthylique de l'acide 2-méthoxyisophtalique, nous avons employé la même stratégie pour atteindre le monoester méthylique (**8a**) et le monoester éthylique (**8b**) de l'acide téréphtalique. La diestérification de l'acide téréphtalique est conduite dans le méthanol ou l'éthanol à reflux en présence de 10 équivalents de chlorure de thionyle. Les différents diesters sont obtenus avec des rendements de 75 et 85% respectivement pour le diester méthylique (**7a**) et le diester éthylique (**7b**). La deuxième étape est la monosaponification du diester. Dans le cas du diester méthylique la monosaponification est faite dans le méthanol à reflux en présence d'un équivalent de potasse. Le monoesterméthylique (**8a**) est obtenu avec un rendement de 50%.

Dans le cas du diester éthylique elle est faite dans l'éthanol à température ambiante en présence d'un équivalent de potasse. L'avantage par rapport à la réaction pour synthétiser le monoester méthylique est que le sel du monoester éthylique précipite dans l'éthanol, ainsi le traitement en est simplifié. Le monoester éthylique (**8b**) est obtenu avec un rendement de 66%.

La troisième étape est une acylation de Friedel-Crafts réalisée à partir du chlorure d'acide d'un monoester de l'acide téréphthalique. Le chlorure d'acide est mis en réaction avec les différents hétérocycles en présence d' AlCl_3 dans le CH_2Cl_2 . Il est à signaler que dans le cas du thiophène, le chlorure d'acide est prémélangé⁷⁵ avec le chlorure d'aluminium en suspension dans le dichlorométhane, puis à température ambiante le thiophène est ajouté. En effet ce dernier a tendance à se dégrader rapidement en présence d' AlCl_3 . Après traitement classique nous obtenons l'ester désiré (**9**) avec un rendement de 95%. Dans le cas du pyrrole ou du N-méthylpyrrole le mode opératoire est différent. Alors qu'une diacylation du thiophène est quasi impossible^{76, 77}, une diacylation du pyrrole en position 2 et 4 se fait sans problème. De plus le pyrrole est plus stable que le thiophène en présence d' AlCl_3 . Nous avons donc suivi les conditions décrites par Cadamuro et coll.⁷⁸ afin d'obtenir les dérivés monoacylés du pyrrole. Au pyrrole et AlCl_3 en solution dans CH_2Cl_2 est ajouté le chlorure d'acide. Après purification sur gel de silice nous obtenons les deux esters avec 17 (**10**) et 23% (**11**) de rendement pour le pyrrole et le N-méthylpyrrole respectivement. Cette baisse de rendement est sans doute due à la trop grande réactivité du pyrrole.

Ces différents esters sont saponifiés avec un excès de potasse dans un mélange THF/eau. Les acides 2, 3 et 4 sont obtenus avec un rendement quantitatif. Les structures sont confirmées grâce aux méthodes analytiques usuelles.

Dans le tableau qui suit (Tableau II-1), nous présentons les valeurs d'absorption UV des composés **1**, **2**, **3**, **4** et de l'acide 4-benzoylbenzoïque mesurées dans de la soude 0,05 M, (ϵ en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

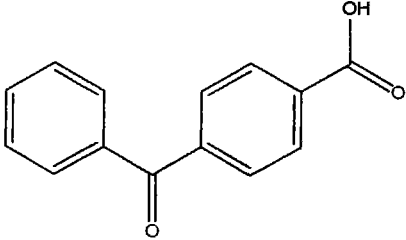
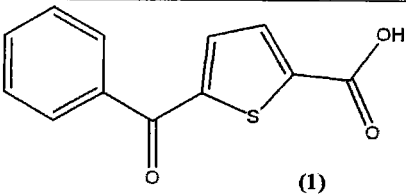
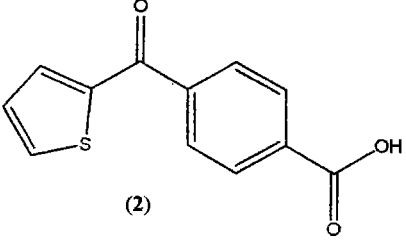
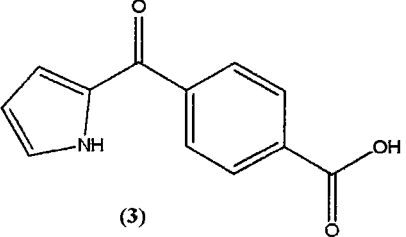
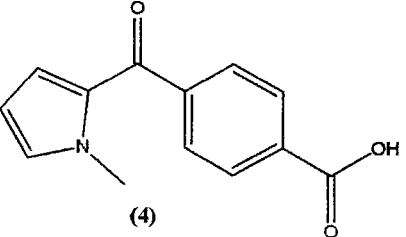
Acides	UV/Vis. (ϵ)
	263 nm (45620)
 (1)	304 nm (27630)
 (2)	300 nm (15330)
 (3)	316 nm (20100)
 (4)	315 nm (18290)

Tableau II-1 Absorption UV de l'acide 4-benzoybenzoïque et de ces analogues

D'après les valeurs UV reportées dans le tableau II-1, nous voyons que les analogues 1-4 de l'acide 4-benzoylbenzoïque voient leur longueur d'onde du maximal d'absorption déplacée vers les basses énergies. Le remplacement d'un cycle benzénique par le thiophène ou le pyrrole a donc eu un effet bénéfique. D'après ces résultats, nous pouvons dire que ces nouveaux chromophores semblent être de bons candidats pour la synthèse de nouvelles

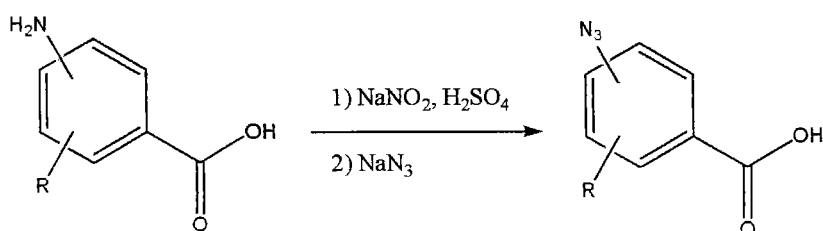
sondes dont les propriétés sont en accord avec celles demandées par la technique de marquage par photoaffinité.

2- Synthèse des azotures d'aryles

L'acide 4-azidobenzoïque⁷⁹ (**12**), l'acide 5-azido-2-nitrobenzoïque⁸⁰ (**13**) et l'acide 4-azido-2-hydroxybenzoïque⁸¹ (**14**) sont connus en tant que groupements photoactivables. Nous avons voulu étudier et élargir ces propriétés de photoactivation à d'autres azotures d'aryle.

La littérature propose d'atteindre ce type de cibles en passant par les sels de diazonium. Les azotures d'aryles⁸² sont atteints grâce à l'action de l'azoture de sodium (NaN_3) sur ces sels.

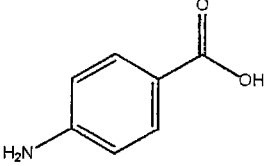
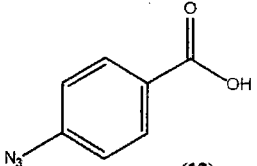
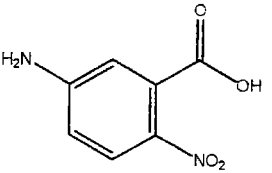
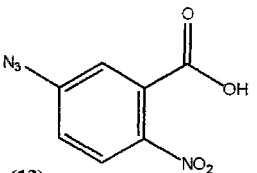
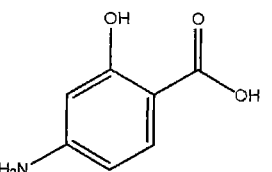
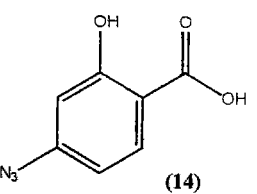
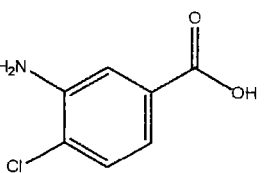
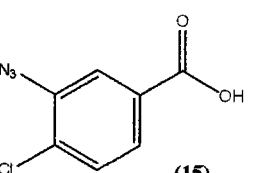
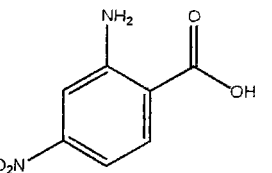
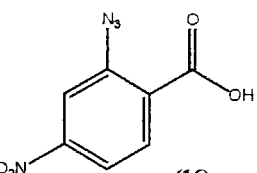
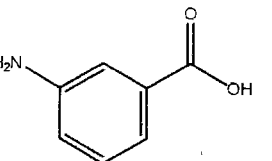
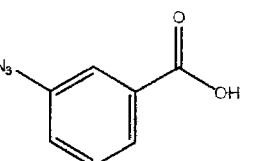
Résultats



R : H, Cl, NO_2 , OH

Schéma II-5

Les azotures d'aryles sont donc obtenus par diazotation (Schéma II-5) d'un acide aminobenzoïque commercial comme décrit précédemment et sont isolés avec des rendements compris entre 50 et 90% après purification par recristallisation dans un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane. La structure de ces composés est confirmée par RMN du proton, point de fusion et par spectroscopie infra-rouge (I.R.).

Aminoacides	Azotures d'aryle	Rendement
	 <p>(12)</p>	90 %
	 <p>(13)</p>	88%
	 <p>(14)</p>	85%
	 <p>(15)</p>	87%
	 <p>(16)</p>	50%
	 <p>(17)</p>	60%

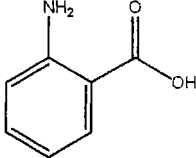
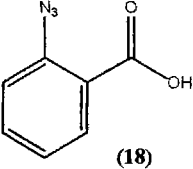
		55%

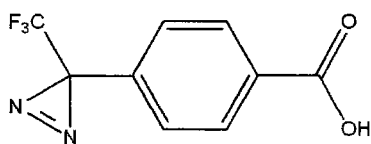
Tableau II-2 Rendements des azotures d'aryle synthétisés

D'après le tableau ci-dessus (Tableau II-2) nous remarquons que la substitution du cycle aromatique par des groupements donneurs (OH **14**, Cl **15**) ou attracteurs (NO₂, **13**) n'a pas d'influence sur le rendement de la réaction. Au contraire la position de la fonction amine par rapport à la fonction acide carboxylique est un facteur important de la réaction. Le rendement chute si c'est deux fonctions sont en ortho l'une de l'autre (**16**, **18**). Dans le cas du composé **17** nous obtenons un rendement de 60% bien que la fonction amine soit en méta par rapport à la fonction acide carboxylique. De plus ce chromophore semble se dégrader rapidement même s'il est conservé dans un réfrigérateur.

Cette réaction de diazotation avec NaNO₂ fera l'objet d'un spotlight accepté dans la revue Synlett.

3- Synthèse de l'acide 4-[3-(trifluorométhyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoïque

Le dernier groupement photoactivable que nous voulons greffer au glutathion est le motif phényl-diazirine. Nous avons opter pour la diazirine la moins substituée : l'acide 4-[3-(trifluorométhyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoïque (**24**) (Figure II-4).



(24)

Figure II-4 Acide 4-[3-(trifluorométhyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoïque

La synthèse de ce composé a été publiée la première fois par Nassal en 1983⁸⁴, alors qu'en 1993 Hatanaka et coll.⁸⁵ publient une synthèse optimisée de ce composé. En effet le rendement global passe de 28% à 40%.

Le schéma II-6 reprend la synthèse développée par Nassal.

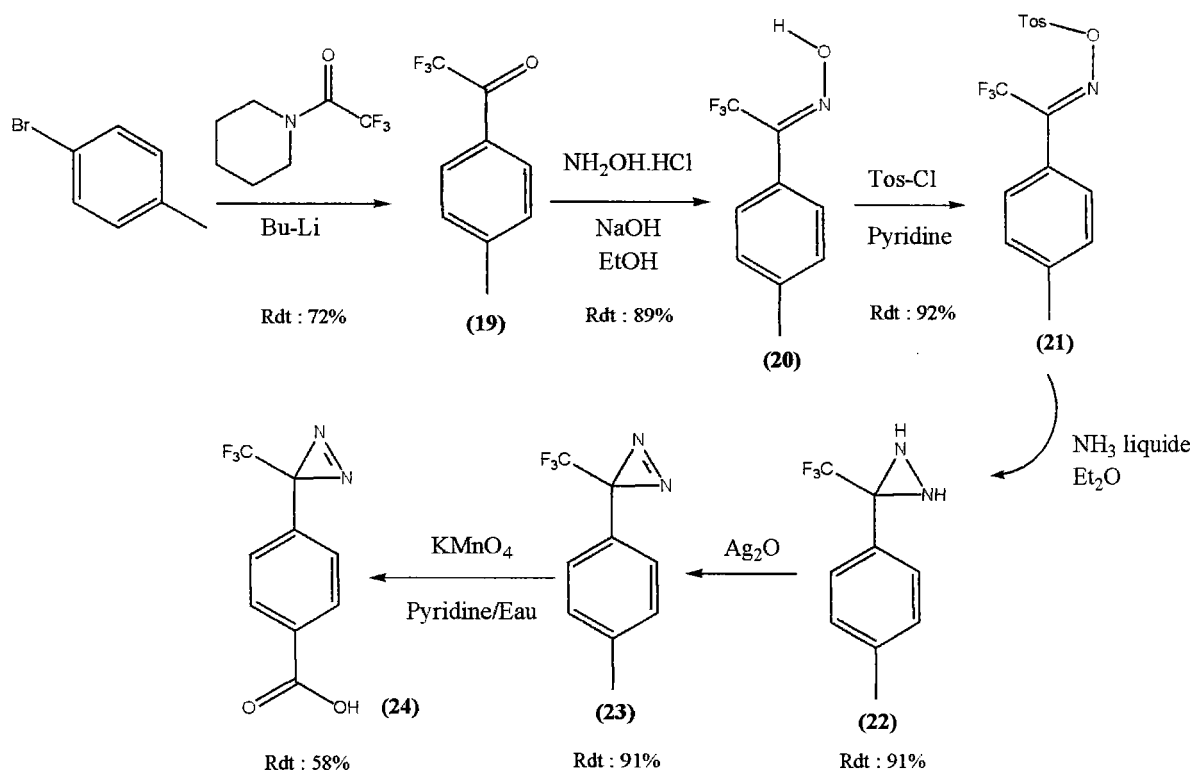


Schéma II-6

Le réactif de départ utilisé pour synthétiser le motif diazirine (schéma II-6) est un dérivé de la trifluoroacétophénone obtenu par l'action d'un lithien aromatique sur la N-trifluoroacétylpipéridine. La cétone est transformée en oxime par l'action du chlorhydrate d'hydroxylamine, puis en tosyloxime qui sous l'effet de l'ammoniac dans un réacteur scellé donne la diaziridine. Cette dernière est ensuite oxydée en diazirine par action de l'oxyde

d'argent (Ag_2O). En fin de schéma réactionnel le groupement méthyle est oxydé par le permanganate de potassium (KMnO_4) en milieu basique.

Hatanaka et coll.⁸⁵ proposent la synthèse de l'acide 4-[3-(trifluorométhyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoïque à partir de l'acide 4-bromobenzoïque afin d'éviter l'étape finale d'oxydation du groupement méthyle par KMnO_4 . (Schéma II-7) Cependant nos essais de synthèse par cette méthode n'ont pas été concluants. En effet après l'étape de formation de la cétone (**19b**) nous n'avons pas réussi à synthétiser l'oxime (**19c**) avec des rendements satisfaisants pour continuer cette suite réactionnelle.

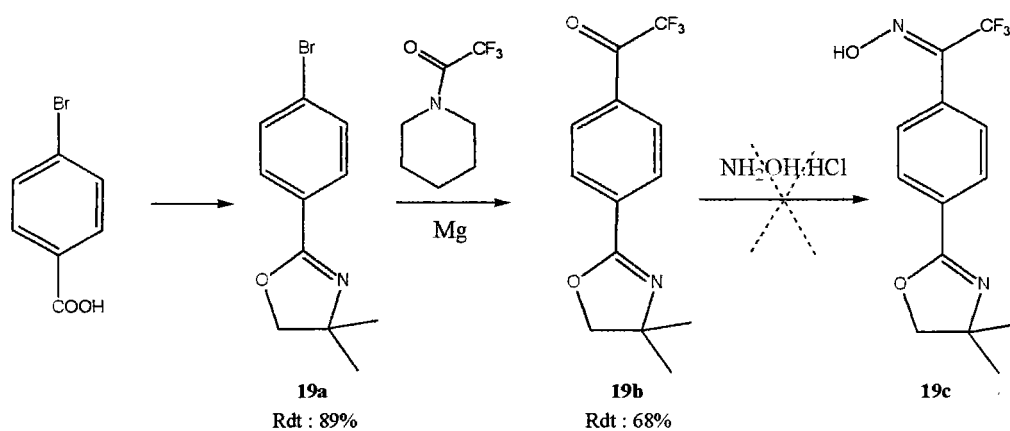


Schéma II-7

Par conséquent pour atteindre l'acide 4-[3-(trifluorométhyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoïque nous avons choisi d'adapter la synthèse de Nassal⁸⁴ (Schéma II-6).

Résultats

Afin de diminuer le nombre d'étapes de la synthèse nous présentons une méthode plus efficace pour atteindre la 2,2,2-Trifluoro-1-p-tolyl-éthanone (**19**) ci-dessous (Figure II-5).

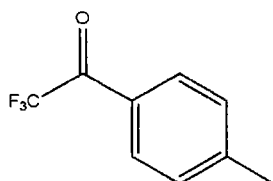


Figure II-5 La 2,2,2-Trifluoro-1-p-tolyl-éthanone

La littérature propose d'atteindre les dérivés de la trifluoroacétophénone par action soit du chlorure de trifluoroacétyle^{86, 87}, soit de l'anhydride trifluoroacétique^{88, 89, 90} sur un composé aromatique avec en général la présence d'un catalyseur.

Nous avons choisi comme agent de trifluoroacétylation l'anhydride trifluoroacétique qui est plus commode à manipuler⁹¹ par rapport au chlorure de trifluoroacétyle qui est gazeux.

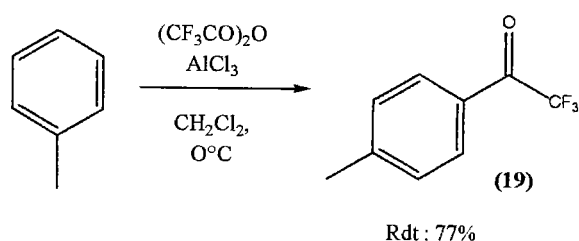


Schéma II-8

Ainsi nous avons effectué la réaction à partir de l'anhydride trifluoroacétique sur du toluène en présence d' AlCl_3 (Schéma II-8). Nous obtenons le produit désiré **(19)** en une étape avec un rendement de 77%.

L'acylation de Friedel-Crafts nous a donc permis d'éviter la synthèse de la N-trifluoroacétylpipéridine ainsi que l'usage du butyllithium (BuLi , réactif pyrophorique) comme le proposait Nassal. De plus, dans notre cas l'autre réactif de départ est le toluène.

Les deux étapes suivantes mettant en jeu le chlorhydrate d'hydroxylamine et le chlorure de tosylo nous donnent les produits désirés avec des rendements satisfaisants.

La quatrième étape est la synthèse de la diaziridine en mettant en réaction l'hydroxytosylamine et l'ammoniac liquide. Cette étape donne le produit attendu **(22)** avec un rendement de 80%.

L'étape suivante est l'oxydation de la diaziridine en diazirine. Nous avons utilisé Ag_2O . Après 1h30 min de réaction le milieu réactionnel est filtré et évaporé sous vide. Le produit brut **(23)** est ensuite mis en réaction selon le schéma réactionnel sans purification particulière.

La dernière étape est la conversion du groupement méthyle en acide carboxylique par l'action de KMnO_4 dans un mélange pyridine/eau. Il est à noter que cette réaction est relativement sensible et entraîne la formation de nombreux sous-produits. Nous obtenons l'acide désiré (24) avec un rendement de 37%.

4- Activation des acides carboxyliques

Parmi les nombreuses activations des acides carboxyliques^{92, 93} développées en synthèse organique nous avons choisi les esters activés de la N-hydroxysuccinimide. Ils semblaient bien adaptés aux synthèses que nous envisagions. Ces esters ont été synthétisés pour la première fois en 1963^{94, 95} pour les besoins de la synthèse peptidique. Ils sont atteints en faisant réagir un acide carboxylique et le N-hydroxysuccinimide en présence de dicyclohexylcarbodiimide (D.C.C.I.) à 0°C dans un solvant aprotique anhydre tels que le dioxane, le diméthoxyéthane (DME), le tétrahydrofurane (THF) ou l'acétonitrile (MeCN). Ces esters, en plus d'être très réactifs, ont l'avantage d'être solides.

Ces esters nous permettront de fonctionnaliser l'amine libre des dérivés du GSH en formant un lien amide pour obtenir des intermédiaires ou directement les analogues photoactivables conjugués ciblés. (Schéma II-9)

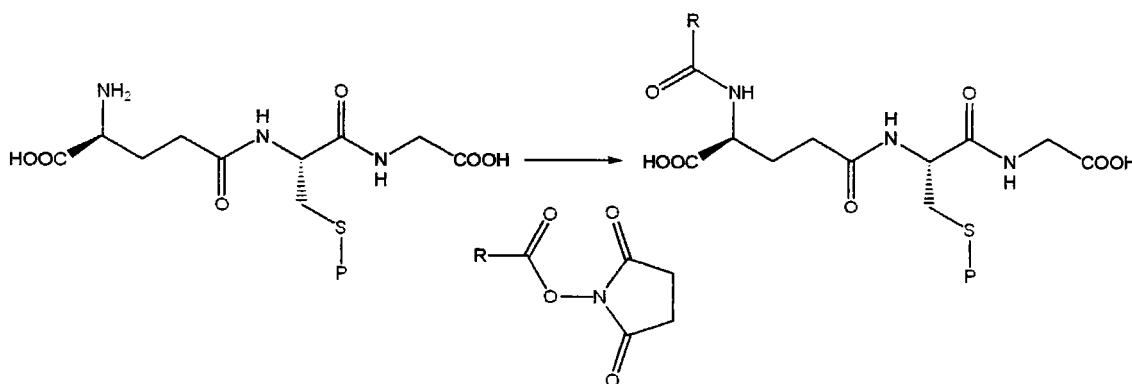


Schéma II-9

A notre connaissance la synthèse de seulement 5 de ces esters est décrite dans la littérature.

Résultats

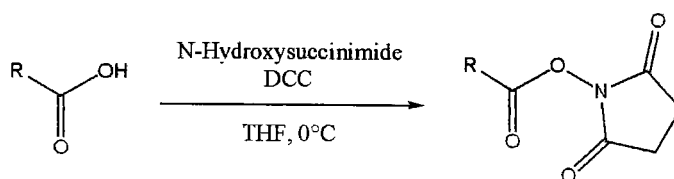


Schéma II-10

Les travaux de Latli et coll.⁹⁶ nous ont guidé dans la synthèse des esters de la N-Hydroxysuccinimide. La réaction est conduite dans le THF anhydre à 0°C (Schéma II-10). Cette réaction a été conduite sur les 11 acides photoactivables que nous avons synthétisé et sur l'acide 4-benzoylbenzoïque qui est commercial.

Les esters activés obtenus sont caractérisés avec les moyens spectroscopiques usuels, et les rendements sont rapportés dans le tableau qui suit (Tableau II-3).

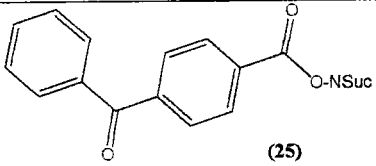
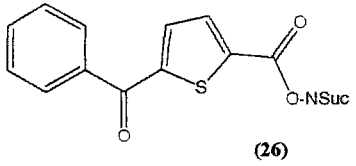
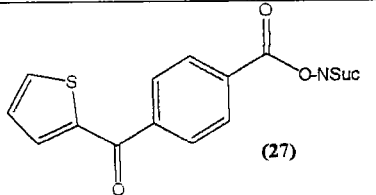
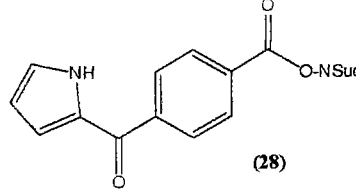
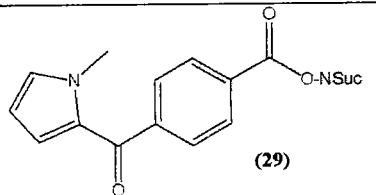
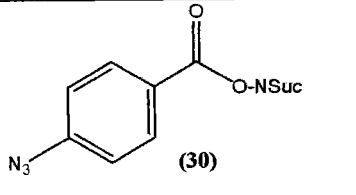
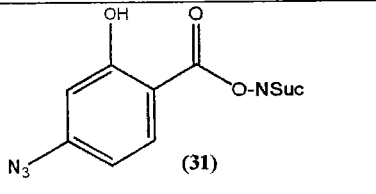
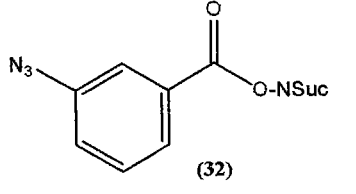
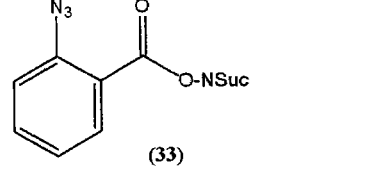
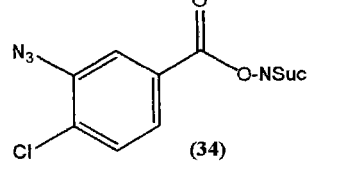
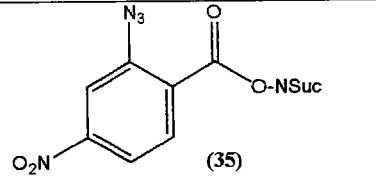
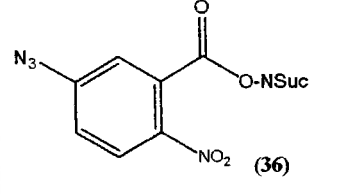
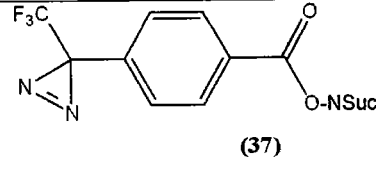
Produits	Rendement	Produits	Rendement
 <p>(25)</p>	88%	 <p>(26)</p>	90%
 <p>(27)</p>	83%	 <p>(28)</p>	85%
 <p>(29)</p>	80%	 <p>(30)</p>	87%
 <p>(31)</p>	92%	 <p>(32)</p>	84%
 <p>(33)</p>	78%	 <p>(34)</p>	85%
 <p>(35)</p>	80%	 <p>(36)</p>	83%
 <p>(37)</p>	80%		

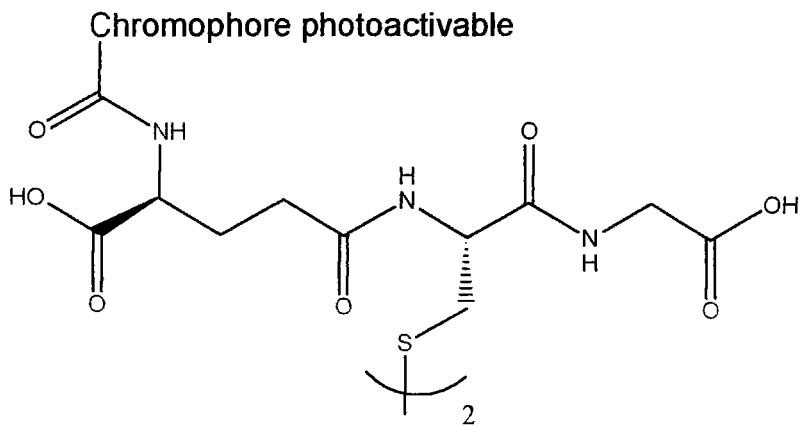
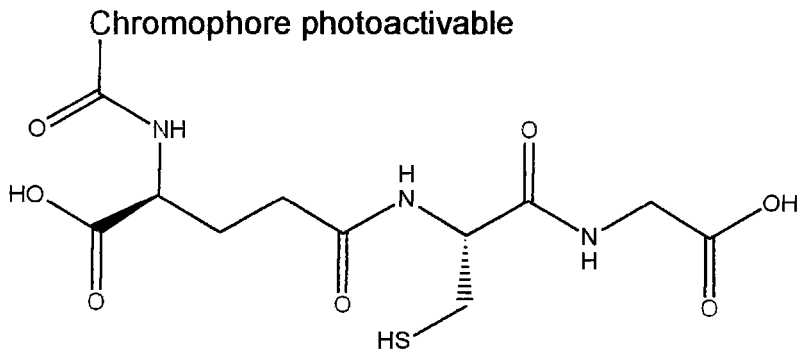
Tableau II-3 Rendements des esters activés

Nous remarquons que les rendements reportés dans le tableau II-3 sont tous quasiment similaires. Nous pouvons conclure en disant que la substitution du cycle aromatique n'est pas un facteur influent de la réaction de synthèse des esters activés.

Il faut noter que les produits obtenus sont toujours légèrement contaminés avec de la dicyclohexylurée (DCU) sous produit de la réaction. Cependant cette impureté n'est pas gênante lors de l'étape de couplage entre l'acide activé et le dérivé du glutathion. En effet celle-ci disparaît lors de la purification des peptides sur gel de silice.

Nous disposons à présent de différents chromophores sous forme d'esters activés, esters de la N-hydroxysuccinimide. Parmi les nouveaux synthétisés nous avons vu que certains ont leur longueur d'onde maximale d'absorption UV déplacée vers les basses énergies, cette propriété faisant d'eux des chromophores parfaitement adaptés à l'étude des systèmes biologiques. C'est la synthèse d'analogues photoactivables conjugués du glutathion à partir de ces molécules que nous allons développer dans le chapitre qui suit.

Chapitre III Synthèse d'analogues N-modifiés photoactivables du glutathion
dérivés de sa structure réduite et oxydée



Analogues photoactivables conjugués ciblés

Dans ce chapitre le mot analogue désignera l'expression analogue conjugué.

1- A partir du GSH non protégé

Nous allons présenter les différentes stratégies que nous avons élaborées pour atteindre les analogues photoactivables N-modifiés du GSSG et du GSH. A notre connaissance il n'existe que deux exemples de ce genre d'analogues dans la littérature, l'un concerne le GSSG⁵⁶ l'autre concerne le GSH⁵⁷. Les autres analogues proposés dans la littérature sont S-modifiés ou S et N modifiés. Or la fonction thiol est très importante car c'est elle qui confère au GSH (Figure III-1) ses propriétés oxydo-réductrices en autres. L'intérêt de ces sondes est de suivre l'évolution du GSH modifié en laissant ses propriétés oxydo-réductrices intactes.

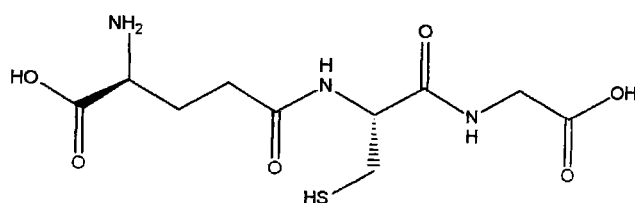


Figure III-1 Glutathion réduit : GSH

Pour atteindre ces composés nous avons choisi les trois voies d'accès suivantes.

- La première consiste à choisir le GSH comme réactif de départ.
- La deuxième consiste à utiliser le GSSG comme réactif de départ. Nous pouvons considérer que le GSSG est la forme protégée naturelle du GSH.
- Enfin la troisième voie consiste à prendre comme réactif de départ le GSH sous une forme S-protégée.

Ces différents réactifs de départ (GSH, GSH S-protégé) seront mis en réaction avec des acides activés sous forme d'ester de la N-hydroxysuccinimide pour atteindre les précurseurs des analogues photoactivables du GSH.

Cette approche paraît d'autant plus intéressante qu'elle ne nécessite aucune protection préalable du GSH. En effet, en règle générale la synthèse de peptides contenant un résidu cystéine ou histidine est compliquée par des contraintes liées à l'utilisation de groupements protecteurs de la fonction thiol car elle est connue pour être plus nucléophile que la fonction amine⁹⁷.

En 2003 Karwatsky et coll.⁵⁷ atteignent un dérivé photoactivable du GSH N-modifié en travaillant directement avec le GSH sous sa forme réduite. (Schéma III-1).

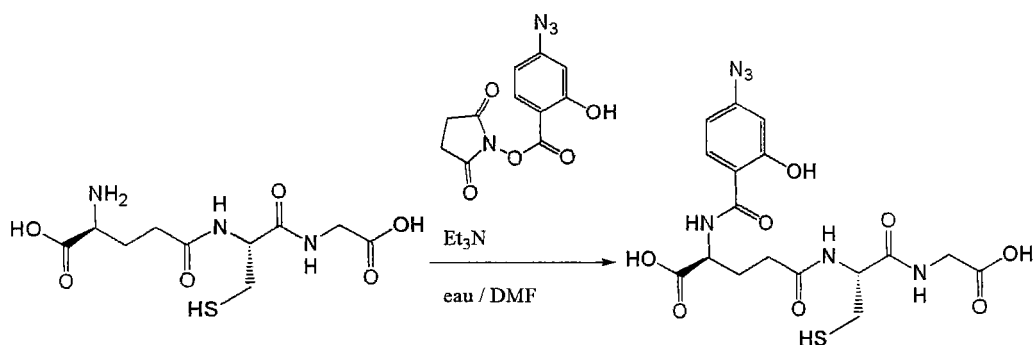


Schéma III-1

Ce protocole consiste à faire réagir le GSH avec un équivalent de l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide 4-azidosalicylique dans un mélange eau/DMF en présence de triéthylamine. Le motif photoactivable dans ces travaux est un azoture d'aryle (le 4-azido-2-hydroxybenzoyle).

1-1) Résultats

Nos différents essais de fonctionnalisation du groupement amine du GSH avec différentes structures photoactivables en suivant le protocole de Karwatsky et coll.⁵⁷ ne nous ont pas conduit au produit attendu. En fait à chaque fois nous obtenons un produit dans lequel le GSH est modifié au niveau de l'atome de soufre et non au niveau de l'atome d'azote (Schéma III-2). Ceci est facilement visualisable en effectuant un test à la ninhydrine sur chromatographie sur couche mince (c.c.m.) ou grâce à un test d'Ellman qui signale clairement l'absence de groupement thiol libre.

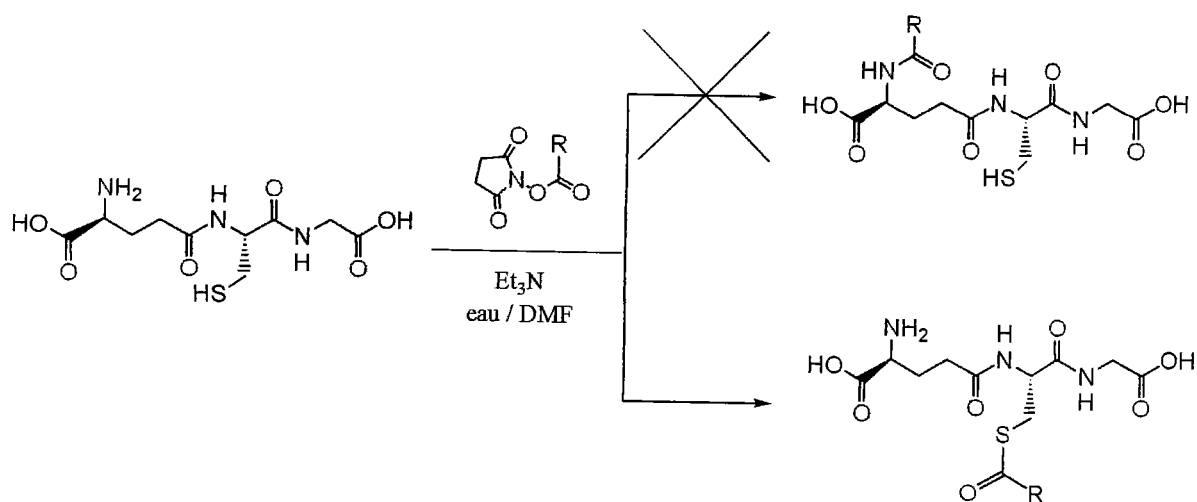


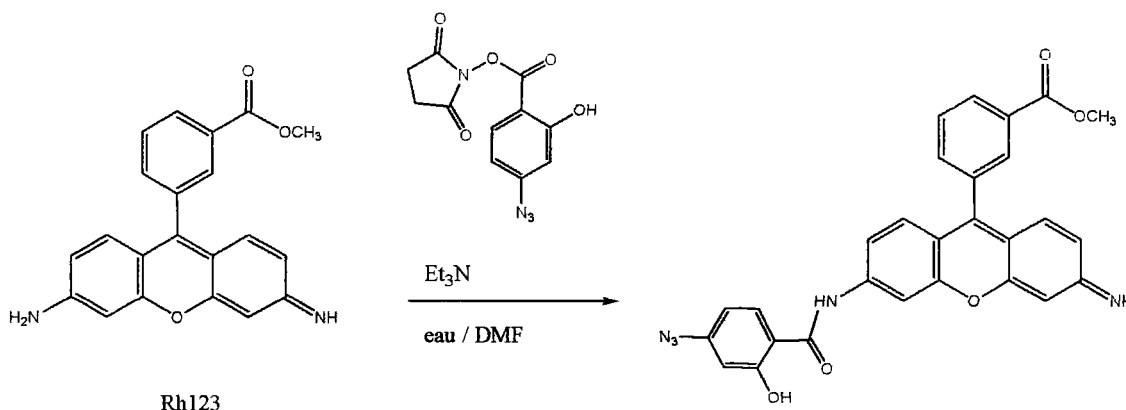
Schéma III-2

Argon(+) Air (-)	Solvant + eau	Base	additif	ninhydrine
+	DMF	Et ₃ N	/	+
-				
+	Acétone	Na ₂ CO ₃	/	+
-				
+	Acétonitrile	Na ₂ CO ₃	/	+
-				
+	Acétonitrile	Et ₃ N	/	+
-				
+	Acétonitrile	Et ₃ N	DMAP	+
-				

Tableau III-1 Variation des conditions opératoires pour atteindre un analogue N-substitué du GSH

Nous avons essayé de faire varier les conditions opératoires (gaz, co-solvant, base) comme l'indique le tableau III-1. Nos essais ont été tentés avec le groupement benzophénone comme groupement photoactivable. Lors de nos différentes tentatives nous avons toujours obtenus le produit S-modifié au lieu du dérivé N-modifié souhaité même en présence de DMAP. Ces résultats sont confirmés par un test à la ninhydrine.

Dans leurs travaux, Karwatsky et coll.⁵⁷ ne caractérisent l'analogue photoactivable du GSH que par spectrométrie de masse. Ce qui ne permet pas de différencier l'analogue N-modifié de l'analogue S-modifié du GSH qui sont deux isomères. De plus la synthèse décrite est directement inspirée d'un protocole d'une publication de Nare et coll.⁹⁸. Dans cette publication l'amine libre n'est en compétition avec aucun autre nucléophile. Selon schéma III-3.



Nous avons mené une dernière expérience pour confirmer que ce protocole ne conduit pas à l'analogue conjugué N-modifié du GSH, pour cela nous avons synthétisé son analogue conjugué S-modifié (**39**) et comparé ses caractéristiques à celles de la littérature.

Pour cela nous avons fait réagir le GSH avec l'acide 4-benzoylbenzoïque sous forme d'ester du benzotriazole (**38**). Nous n'avons pas travaillé en milieu basique mais plutôt en milieu acide en mettant à profit le caractère 'partant' du benzotriazole dans les acylbenzotriazoles. Le dérivé du benzotriazole (**38**) a été synthétisé en suivant le protocole de Katritzky et coll.⁹⁹. Enfin pour faire le thioester nous nous sommes inspiré d'autres travaux de Katritzky et coll.¹⁰⁰.

Nous avons conduit notre réaction test dans un mélange eau/acétonitrile avec dix équivalents d'acide formique par rapport au GSH pour que l'amine du GSH perde tout caractère nucléophile (Schéma III-4).

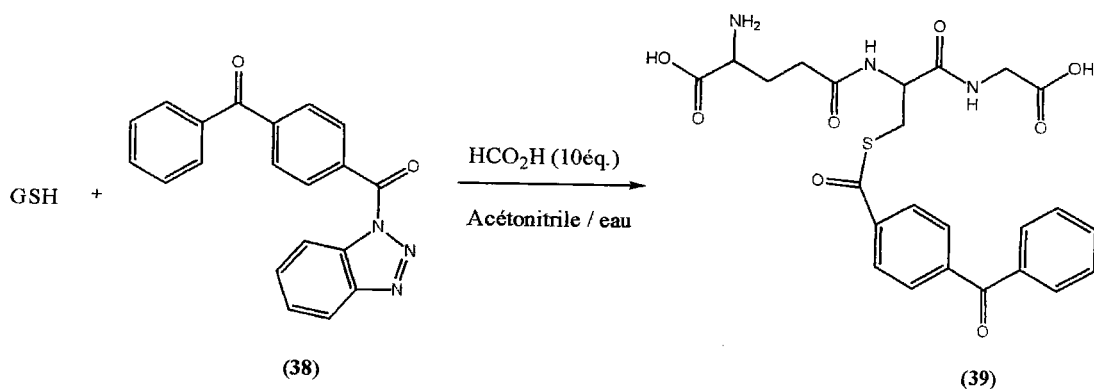


Schéma III-4

La réaction a été suivie par c.c.m. avec une visualisation sous u.v. et par la ninhydrine. Après purification sur gel de silice le spectre RMN ¹H du produit obtenu est similaire à celui obtenu avec le produit synthétisé selon le protocole de Karwatsky et coll.⁵⁷.

L'analogue conjugué S-modifié du GSH (39) visé est décrit dans la littérature par Viljanen et coll.¹⁰¹. Ce thioester a été synthétisé sur support solide en utilisant une résine de Wang et la stratégie Fmoc. Malheureusement les auteurs ne caractérisent leur produit que par spectre de masse et avec un test d'Ellman. Nous ne pouvons donc pas comparer nos données spectroscopiques, spectre RMN ¹H notamment.

Néanmoins, nos résultats sont en accord avec la littérature existante sur le GSH et sur la littérature concernant la synthèse peptidique en général^{97, 102, 103} qui a recourt à des groupements protecteurs pour masquer la réactivité des résidus Cys. En effet, de nombreux travaux démontrent qu'en milieu basique ou neutre la fonction thiol du GSH est plus réactive que sa fonction amine. En milieu légèrement basique nous sommes en présence d'un anion thiolate, meilleur nucléophile qu'une amine aliphatique primaire. De plus, Douglas et coll.¹⁰⁴ précisent bien que le groupement amine du GSH est peu réactif et que son acylation n'est pas systématique.

1- 2) Comparaison de l'activité nucléophile des fonctions amine et thiol du GSH

Les exemples qui suivent illustrent la réactivité du GSH en milieu neutre et en milieu basique.

a- Réactivité du GSH en milieu neutre

i)

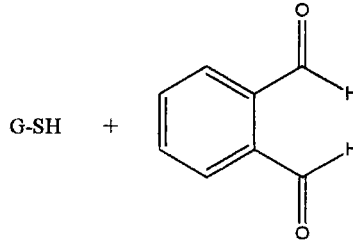


Schéma III-5

Dans le cas ci-dessus le GSH est mis en réaction avec le dialdéhyde orthophtalique pour générer une espèce fluorescente dont la structure n'est pas précisée. La réaction est conduite à un pH égal à 7. Dans ce cas également c'est la fonction thiol du GSH qui est impliquée dans la réaction car en présence de p-chlorobenzoate de mercure ou de N-méthylmaléimide, réactifs spécifiques des thiols, aucune fluorescence n'est constatée¹⁰⁵.

ii)

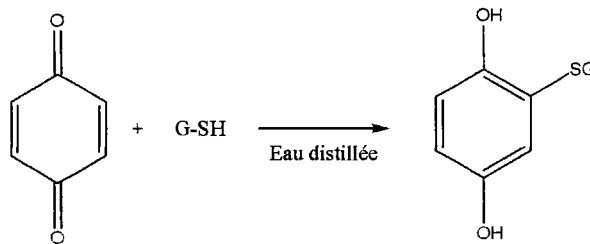


Schéma III-6

Nous pouvons également citer la réactivité du GSH en milieu neutre vis-à-vis des quinones. Potentiellement il est possible de fixer trois autres molécules de GSH. Là encore les dérivés obtenus sont S-modifiés¹⁰⁶.

iii)

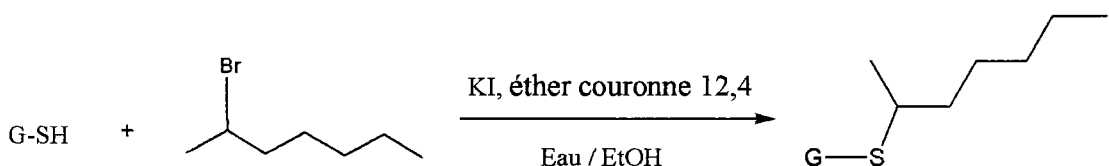


Schéma III-7

Dans ce cas-ci nous avons à faire à une substitution nucléophile. Le GSH est mis en réaction avec un bromure d'alkyle en présence d'ether couronne dans un mélange EtOH/eau¹⁰⁷.

b- Réactivité du GSH en milieu basique

i)

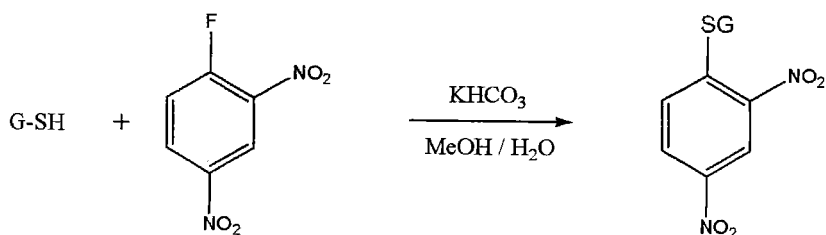
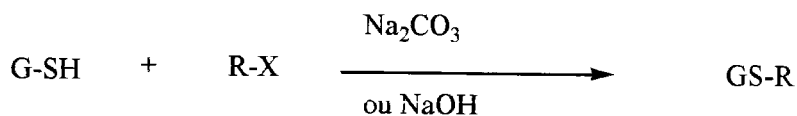


Schéma III-8

Sokolovsky et coll.¹⁰⁸ effectuent une substitution nucléophile aromatique du 2,4-dinitrofluorobenzène par le GSH en présence d'hydrogénocarbonate de potassium. Il est précisé dans ces travaux que l'amine n'est substituée que lorsqu'un deuxième équivalent de 2,4-dinitrofluorobenzène est ajouté au milieu réactionnel. Plus récemment, il est également reporté la substitution aromatique nucléophile d'un ester de l'acide 4-chloro-3-nitrobenzoïque par le GSH dans un mélange EtOH/eau en présence de NaOH¹⁰⁹. De plus, Maeda et coll.¹¹⁰ reportent une substitution nucléophile aromatique de la 2,4-dinitrobenzènesulfonyl fluoresceine par le GSH en milieu aqueux à pH= 7,4. La 2,4-dinitrobenzènesulfonyl fluoresceine sert d'alternative au réactif d'Ellman.

ii)

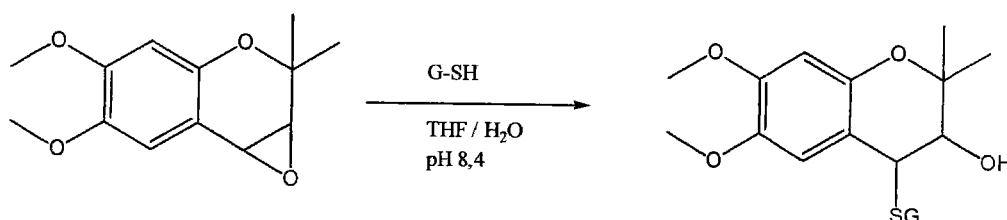


R : alkyl, benzyl

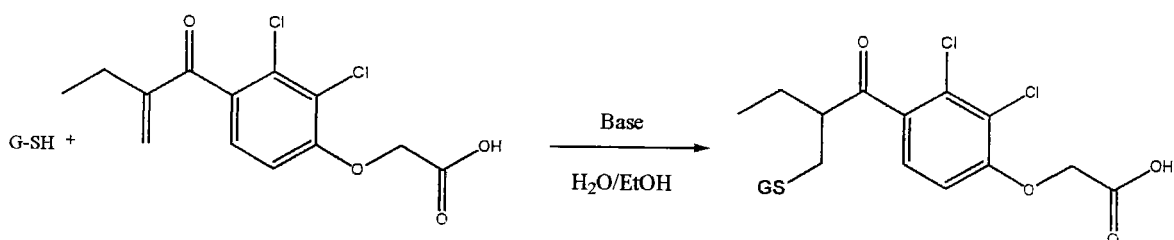
Schéma III-9

De plus de nombreux travaux montrent qu'en milieu basique le GSH participe à des substitutions nucléophiles sur divers halogénures d'alkyle et d'aryle. Les dérivés du GSH obtenus dans ces travaux sont toujours S-substitués^{111, 112, 113, 114, 115}.

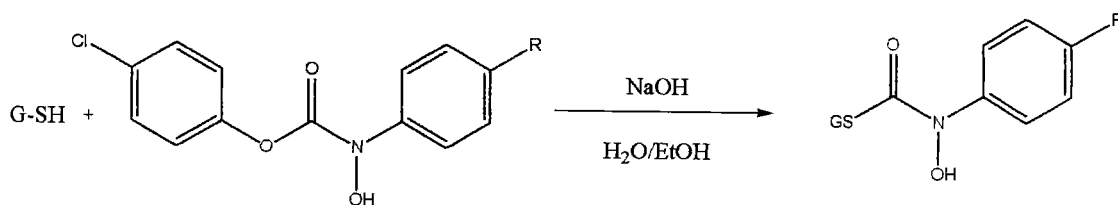
iii) Le GSH peut ouvrir des époxydes et les dérivés obtenus sont également S-substitués¹¹⁶.



iv) Le GSH peut également participer à des réactions de type addition de Michaël sur des énones α,β insaturées^{117, 118} ou sur des structures photoactivées¹¹⁹.



v) Enfin nous présentons l'exemple le plus significatif.



La réaction est conduite en milieu basique comme les travaux de Karwatsky et coll.⁵⁷ et elle est conduite en présence d'un dérivé de l'acide carbamique, un groupement qui réagit usuellement de manière spécifique avec les amines. Or en milieu basique le GSH réagit pour former un produit encore une fois S-substitué^{120, 121}.

Pour conclure cette série d'exemples nous pouvons ajouter cette remarque. Les analogues du GSH S et N-modifié sont synthétisés selon une stratégie précise et constante. C'est d'abord l'atome de soufre qui est fonctionnalisé et ensuite l'atome d'azote^{122, 123, 124, 125}. Ceci indique deux choses, la première est que le groupement sulfhydryle/thiol est plus réactif que l'amine terminale du résidu acide glutamique, et la seconde est que si la réactivité était inverse les dérivés que nous cherchons à synthétiser seraient probablement plus souvent décrits dans la littérature.

Nos résultats corroborés par ceux de la littérature indiquent que les travaux de Karwatsky et coll.⁵⁷ présentent des conclusions erronées. Pour contourner ce problème nous avons envisagé d'atteindre nos cibles à partir d'intermédiaires où le groupement sulfhydryle du GSH serait protégé.

2- A partir du GSH après protection de la fonction thiol

En première option, nous avons décidé d'atteindre les analogues photoactivables du GSH à partir du GSSG après une N-fonctionnalisation des groupements amines, suivie d'une réduction du lien disulfure permettant ainsi d'atteindre les produits cibles.

En deuxième option, nous avons envisagé un couplage direct du groupement photoactivable sur le GSH après une protection initiale du thiol. Parmi les nombreux groupements protecteurs de la fonction thiol nous avons choisi de travailler avec le groupement trityle¹²² (Figure II-2). Le GSH S-trityle (GS-Tr) après une N-fonctionnalisation et une déprotection de la fonction thiol conduit aux GSH photoactivables N-acylés souhaités. Notre choix s'est arrêté sur ce groupement protecteur car ses méthodes de déprotection semblent mieux adaptées à la structure du GSH ainsi qu'à la réactivité de certains groupements photoactivables mis en jeu.

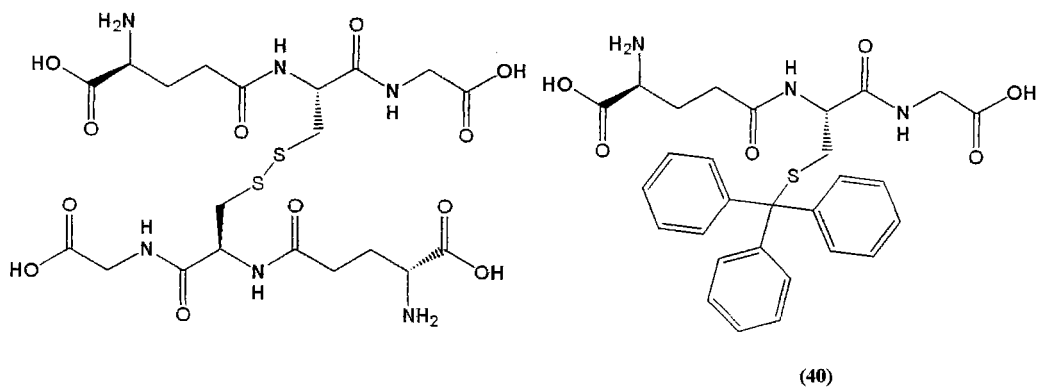


Figure II-2 GSSG et GS-Tr (40)

2-1) A partir du GSSG

2- 1- 1) N-fonctionnalisation du GSSG

Dans les années 1980, l'équipe de D'Silva a publié quelques articles sur des dérivés photoactivables du GSH. Dans ces différents articles les dérivés étaient S-modifiés ou N et S-modifiés, mais jamais seulement N-modifiés.

En 1981 D'Silva et coll.⁵⁶ décrivent la synthèse du N,N'-Bis-(4-azidobenzoyl)glutathion disulfure à partir du GS-SG (Figure II-3).

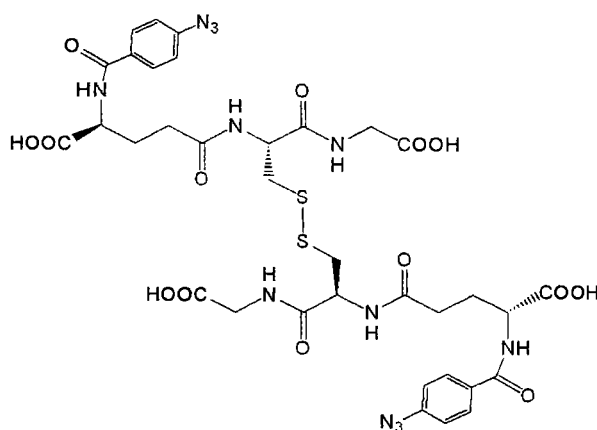
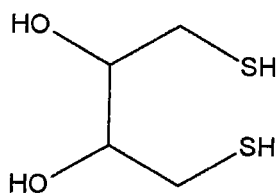


Figure II-3 N,N'-Bis-(4-azidobenzoyl)glutathion disulfure

Le protocole de synthèse est le suivant : tout d'abord, le GSSG est mis en solution dans un mélange dioxane-solution aqueuse d'hydroxyde de sodium. Un mélange de chlorure de 4-azidobenzoyl et de 4-paradiméthylaminopyridine (DMAP) (1/1 en moles, 1 équivalent par rapport au GSSG) est ensuite ajouté. Puis après 24 heures, en s'étant assuré de la valeur du pH de la solution, un deuxième équivalent du mélange précédent est ajouté. Après acidification du milieu réactionnel et une recristallisation du produit obtenu dans un mélange méthanol-éther diéthylique, D'Silva et coll. obtiennent le N,N'-Bis-(4-azidobenzoyl)glutathion disulfure avec un rendement de 34,2%.

En 1993, Kussmann et al.¹²⁶ utilisent (Schéma III-13) des méthodes classiques de synthèse peptidique pour fonctionnaliser les deux groupements amines du GSSG. Il faut noter que les groupements introduits ne sont pas des groupements photoactivables. Leur stratégie est la suivante:

- diestérification du GSSG en ester *tert*-butylique
- élongation du résidu acide glutamique et N-fonctionnalisation, grâce à la stratégie Fmoc (amine protégée avec un groupement Fmoc et couplage en présence de dicyclohexylcarbodiimide (D.C.C.) et d'hydroxy benzotriazole.)
- clivage des esters par l'acide trifluoroacétique
- réduction du lien disulfure par le dithiothréitol (d.t.t.)



dithiothréitol

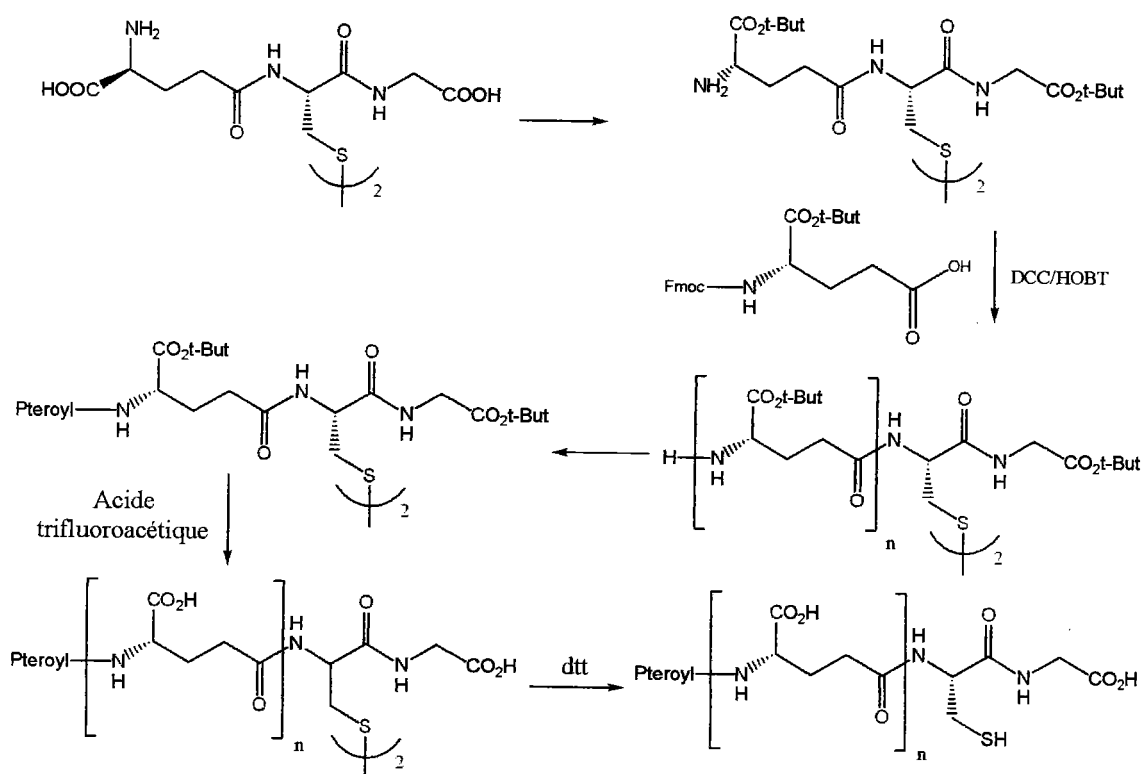


Schéma III-13

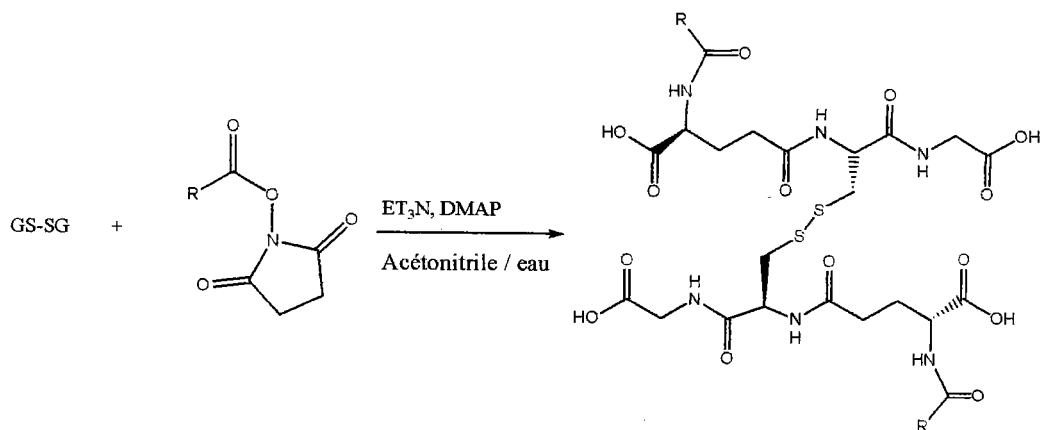
Cette synthèse a plusieurs inconvénients. Tout d'abord l'estérification du GSSG conduit à un mélange de mono-ester et de diester pas toujours facilement séparables^{127, 128}. De plus Kussman et coll.¹²⁶ précisent que la déprotection des esters par l'acide trifluoroacétique n'est pas totale. Enfin cette méthode offre de faibles rendements (15% à partir du diester du GSSG). Le point intéressant est la réduction du lien disulfure avec le d.t.t. qui est un réducteur classique.

Résultats

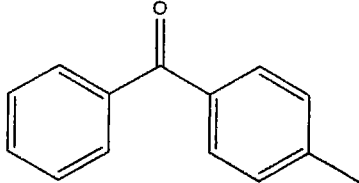
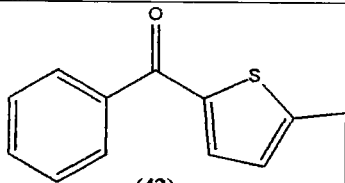
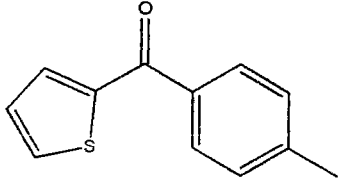
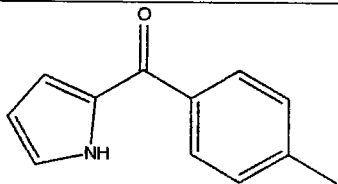
Pour atteindre les analogues du GSH, nous avons décidé d'appliquer le protocole de couplage proposé par D'Silva et coll.⁵⁶ et par la suite, de réduire le lien disulfure en présence de d.t.t. selon la méthode proposée par Kussman et coll.¹²⁶.

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, nous avons préféré travailler avec des acides activés sous forme d'ester hydroxysuccinimique⁹³ (activation usuellement utilisée lors de synthèse peptidique) plutôt qu'avec des chlorures d'acides moins stables en milieu aqueux. Cette activation a l'avantage de ne pas nécessiter de protection préalable des

fonctions acides du GSSG lors de la réaction de couplage et par ailleurs de simplifier l'étape de purification en fin de schéma réactionnel. De plus par expérience (Tableau III-1) nos différents essais nous ont permis d'adopter le mélange eau/acétonitrile pour conduire nos réactions. En ce qui concerne la base nous avons préféré travailler avec six équivalents de triéthylamine par rapport au GSSG (Schéma III-14).



Les différents produits N,N'-disubstitués obtenus après purification sur un gel de silice classique élués avec un eau/acétonitrile sont rassemblés dans le tableau III-2.

R	Rendement (%)	R	Rendement (%)
 <p>(41)</p>	88	 <p>(42)</p>	90
 <p>(43)</p>	83	 <p>(44)</p>	85

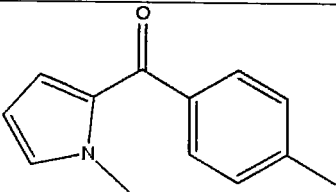
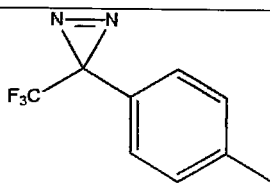
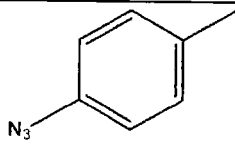
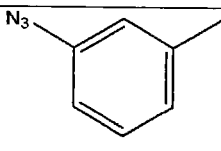
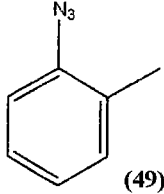
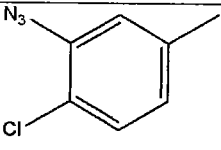
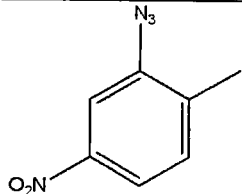
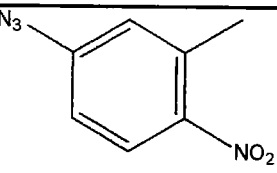
 <p>(45)</p>	83	 <p>(46)</p>	Dégradation du produit lors du traitement
 <p>(47)</p>	75	 <p>(48)</p>	20
 <p>(49)</p>	62	 <p>(50)</p>	55
 <p>(51)</p>	55	 <p>(52)</p>	85

Tableau III-2 Rendements obtenus pour les dérivés N-acylés du GSSG

La réaction pour introduire le groupement photoactivable diazirine a été conduite, mais il semble que ce groupement hautement sensible se soit détérioré malgré toutes les précautions prises.

Les produits sont caractérisés par les techniques spectroscopiques usuelles. Ils ont été obtenus avec de bons rendements compris entre 65 et 82%. Ces rendements sont supérieurs à celui annoncé (34,2 %) pour la synthèse du N,N'-Bis-(4-azidobenzoyl)glutathion disulfure. L'acylation du GSSG par les esters de la N-hydroxysuccinimide est donc plus efficace que l'acylation par un chlorure d'acide activé par la DMAP. En effet il a été montré que les ions pyridiniums étaient stabilisés en solution aqueuse et voyaient leur réactivité d'agent d'acylation fortement diminuée¹²⁹. La DMAP ne joue plus son rôle de catalyseur.

Dans le tableau III-3 sont reportées les valeurs des absorptions UV des différents analogues N,N'-disubstitués du glutathion disulfure mesurées dans de la soude 0,05 M, (ϵ en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$).

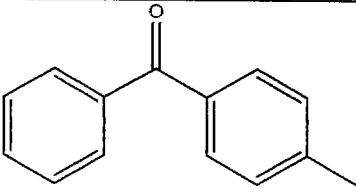
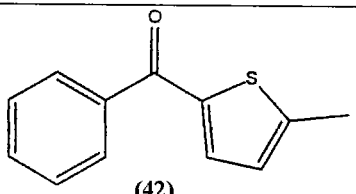
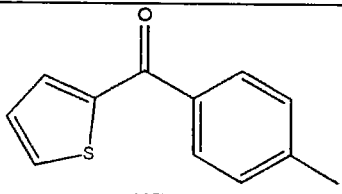
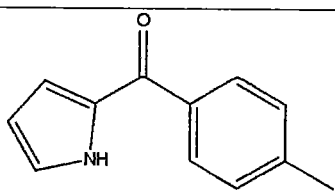
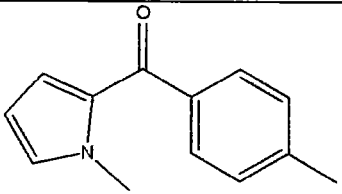
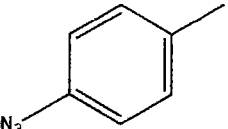
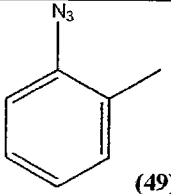
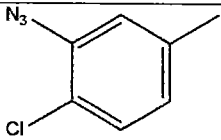
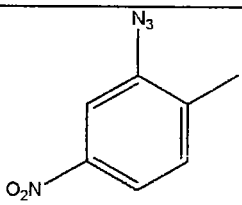
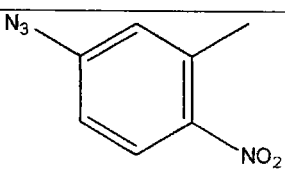
R	UV/Vis. (ϵ)	R	UV/Vis. (ϵ)
 (41)	264 nm (34580)	 (42)	307 nm (29220)
 (43)	268 nm (19680)	 (44)	255 nm (18800)
 (45)	259 nm (22830)	 (47)	319 nm (21810)
 (49)	316 nm (16810)	 (50)	272 nm (29000)
 (51)	270 nm (36000)	 (52)	250 nm (27500)
	262,5 nm (35000)		322 nm (19500)

Tableau III-3 Absorption UV des dérivés N-acylés du GSSG

Nous observons que le composé **41** a une longueur d'onde d'absorption de 264 nm et un ϵ de 34580 et que les composés **42-45** ont des longueurs d'ondes d'absorption comprises entre 292 et 319 nm ainsi que des ϵ compris entre 16790 et 29220. Les modifications que nous avons effectuées sur le chromophore benzophénone ont déplacé les longueurs d'onde vers les plus faibles énergies, le composé **44** subissant le plus grand décalage par rapport au composé de référence **41**. Ces résultats sont fort intéressants car lors de la photoactivation de ces sondes les protéines dans le milieu cellulaire ne seront pas endommagées.

Nous observons également que le composé **47** a une longueur d'onde d'absorption de 272 nm et un ϵ de 29000 et que les composés **49-52** ont des longueurs d'ondes d'absorption comprises entre 250 et 322 nm ainsi que des ϵ compris entre 19500 et 36000. Quand le groupement azoture est en ortho de la liaison carbonyle (**49** et **51**) il n'y a pas d'effet notable sur la longueur d'onde d'absorption, et ceci même en présence du groupement nitro (**51**). Quand le groupement azoture est en position méta de la liaison carbonyle nous observons des différences de comportement. Déjà quand l'azoture d'aryle n'est pas substitué la synthèse de la sonde (**48**) a été réalisée avec un rendement modeste. Nous pouvons penser que ce chromophore n'est pas stable. Quand celui est substitué, comme pour les sondes **50** et **52**, un atome de chlore en position para de la liaison carbonyle déplace la longueur d'onde d'absorption (250nm) du peptide vers les hautes énergies, alors qu'un groupement nitro en position ortho de la liaison carbonyle déplace la longueur d'onde (322 nm) du peptide vers les faibles énergies.

D'après ces résultats nous pouvons conclure que les composés **42-45**¹³⁰ et le composé **52** semblent être de bons candidats pour l'étude du système enzymatique du glutathion par la technique de marquage par photoaffinité.

2- 1- 2) Réduction du lien disulfure

2- 1- 2- 1) Résultats

En se basant sur les différents protocoles que propose la littérature^{131, 132, 133, 134} nous avons choisi de réaliser cette réduction en milieu aqueux en présence d'un excès de 5 équivalents de d.t.t. sous atmosphère d'argon (Schéma III-15). La réaction est quantitative après 7 heures

d'agitation à température ambiante. L'eau est évaporée sous pression réduite, et le résidu purifié sur gel de silice comme précédemment.

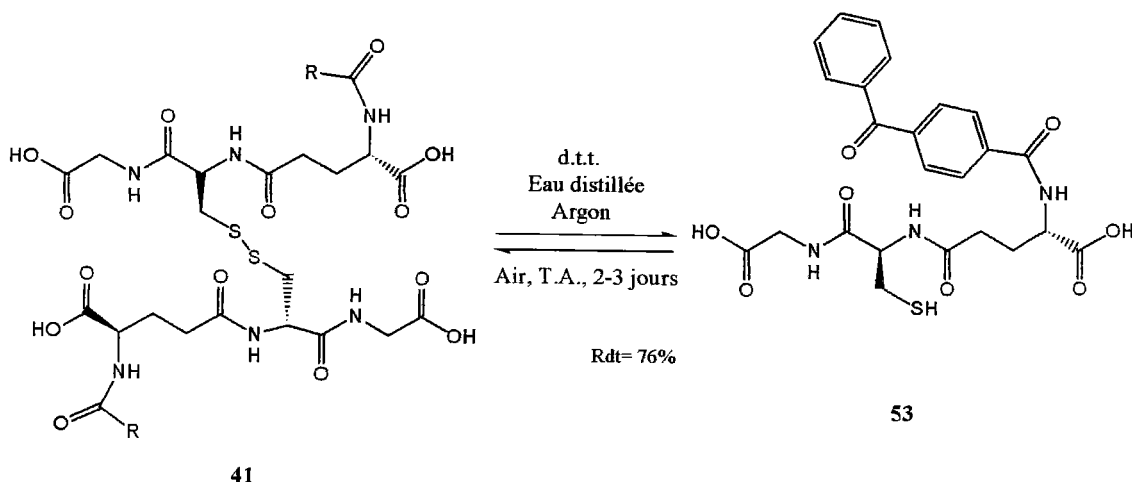


Schéma III-15

La réaction a été menée sur le composé **41**. Le composé **53** est obtenu avec un rendement de 76% après purification sur gel de silice.

2- 1- 2- 2) Inconvénients

Malheureusement cette voie de synthèse avec le GSSG comme réactif de départ ne peut être appliquée aux dérivés porteurs d'un azoture d'aryle contrairement à ce que D'Silva et coll. rapportent dans la conclusion de leur travaux concernant la réduction du GSSG N,N'substitué par un groupement azoture d'aryle. En effet ces groupements sont réduits par quasiment tous les agents de réduction classiques, spécialement par les agents de réduction du lien disulfure³⁶.

135

Pour mettre en évidence la sensibilité des azotures d'aryles vis-à-vis des agents réducteurs nous avons suivi la réduction de l'acide 4-azido benzoïque en présence de d.t.t. et en présence de GSH.

- réduction de l'acide 4-azidobenzoïque en présence de d.t.t.

Nos résultats montrent que l'acide 4-azidobenzoïque dans le DMF réagit effectivement avec le d.t.t. après deux heures d'agitation sous argon. Les c.c.m. ont clairement montré la

formation. d'acide 4-aminobenzoïque Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature³⁶.

- réduction de l'acide 4-azidobenzoïque en présence de GSH

Dans ce cas nous avons fait réagir l'acide 4-azido benzoïque avec un équivalent de GSH dans un mélange eau/acétonitrile sous atmosphère d'argon. Après 48 heures d'agitation nous avons décelé par suivi c.c.m. la présence d'acide 4-aminobenzoïque dans le milieu réactionnel.

Etant donné que le groupement azoture se réduit facilement, il nous a fallu trouver une nouvelle voie d'accès pour atteindre les analogues du GSH sous sa forme réduite porteurs de groupement azoture d'aryle. Pour cela il nous faut un groupement protecteur de la fonction sulfhydryle dont les conditions de déprotection sont compatibles avec les azotures d'aryle. Comme nous nous l'avons déjà indiqué, parmi les nombreux groupements protecteurs des thiols notre choix s'est arrêté sur le groupement trityle. Nous espérons ainsi développer une méthode de synthèse généralisable à tous les groupements photoactivables.

2- 2) A partir du GSH S-trityle

Cette stratégie se base sur les travaux de Gelinsky et coll.¹²². Les auteurs synthétisent le GSH S-trityle (**40**), l'estérifient, acylent le groupement amine et enfin enlèvent le groupement trityle avec du thioéthanol. Nous ne pouvons pas utiliser ce dernier réactif de déprotection car il réduit les azotures d'aryle.

2- 2- 1) Protection du GSH avec le groupement trityle

Le GSH S-trityle est décrit dans la littérature^{122, 123}. Le thioéther est synthétisé en faisant réagir le triphénylméthanol et le GSH dans l'acide trifluoroacétique pendant 1 h à température ambiante. Hiskey et coll. décrivent la synthèse de la S-trityl cystéine¹³⁶. Dans ce cas la réaction entre la cystéine et le triphénylméthanol se fait dans l'acide acétique en présence de fluorure de bore (BF₃.Et₂O).

2- 2- 2) Déprotection du groupement trityle

Il existe différentes méthodes pour cliver le groupement S-trityle. La plus ancienne des méthodes rapportée consiste à cliver le groupement trityle grâce à l'action de l'acide chlorhydrique dans le chloroforme¹³⁷. Ensuite nous pouvons citer l'action du nitrate d'argent dans un mélange méthanol/pyridine¹⁰³. L'acide bromhydrique¹⁰³ dans l'acide acétique au reflux est également reporté comme un bon agent pour enlever le groupement trityle ainsi que l'acide trifluoroacétique au reflux¹⁰³. Le groupement S-triphénylméthyle peut être enlevé par l'action de l'acétate de mercure (II) dans l'éthanol suivi par un traitement avec le sulfure d'hydrogène (H₂S)¹³⁸. Il peut être clivé par l'action du trifluoroacétate de thallium dans l'acide trifluoroacétique¹³⁹. Plus récemment (1989) Pearson et coll.¹⁴⁰ proposent une méthode qui semble plus douce vis-à-vis des azotures d'aryle qui consiste à faire réagir le produit porteur du groupement trityle dans un mélange acide trifluoroacétique/dichlorométhane en présence de triéthylsilane à température ambiante pendant une heure (Schéma III-16). Voir schéma. C'est cette méthode qui est la plus utilisée actuellement^{141, 142, 143, 144, 145}.

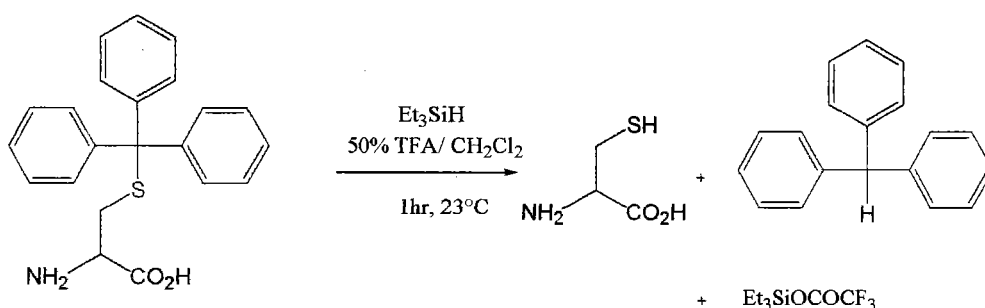


Schéma III-16

Cette méthode est particulièrement séduisante car:

- les trialkylsilanes sont des composés volatiles et nous pouvons facilement les enlever du milieu réactionnel par évaporation sous pression réduite.
- les sous-produits de la réaction sont très peu polaires et nous pouvons facilement les séparer du peptide obtenu par purification sur gel de silice.

- les azotures d'aryle ne sont bien sûr pas réduits. (Par expérience, nous savons que l'acide 4-azidobenzoïque ne réagit pas dans ces conditions opératoires.)

2- 2- 3) Résultats

2- 2- 3- 1) S-Protection du GSH

Pour la synthèse de ce composé nous avons trouvé un compromis entre les deux protocoles cités dans le paragraphe précédent. Le GSH est en suspension dans l'acide acétique, et le milieu réactionnel est chauffé à 40°C. Le triphénylméthanol est ajouté, et le milieu réactionnel agité pendant 48 heures (Schéma III-17). Le mélange réactionnel est purifié sur gel de silice.

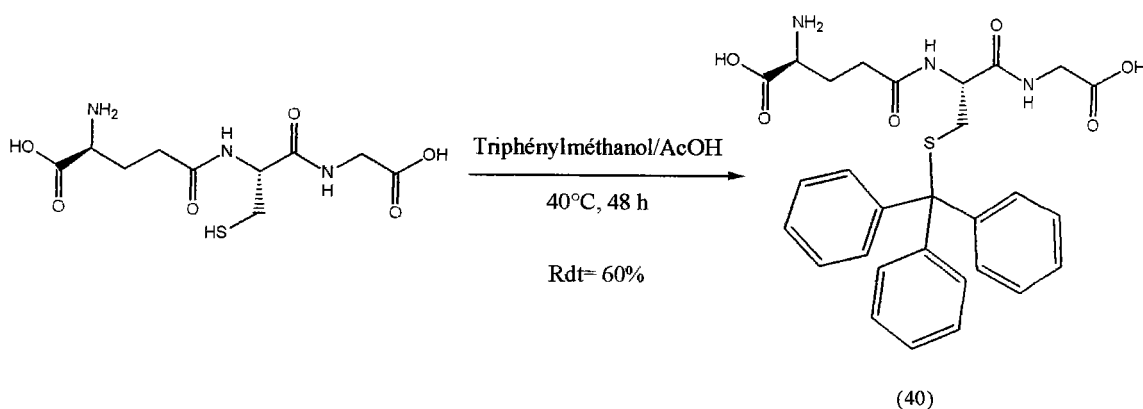


Schéma III-17

Le produit **(40)** est caractérisé par les techniques analytiques et est comparé avec les données de la littérature.¹²² Le produit est obtenu avec un rendement de 68%.

2- 2- 3- 2) N-fonctionnalisation du GSH S-protégé

Le produit protégé est couplé avec les acides activés de la même manière que pour le GSSG, sauf que dans ce cas nous n'utilisons que trois équivalents de triéthylamine au lieu de six précédemment (Schéma III-18).

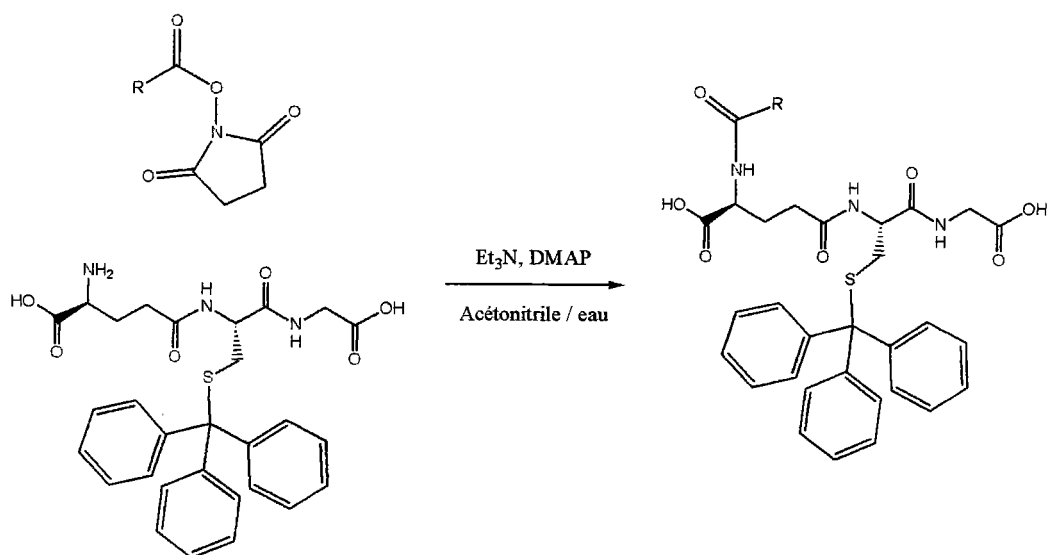


Schéma III-18

Les différents produits synthétisés ainsi que leur rendement sont regroupés dans le tableau III-4.

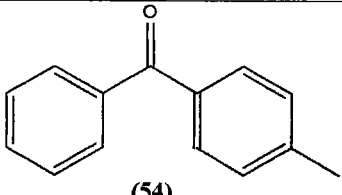
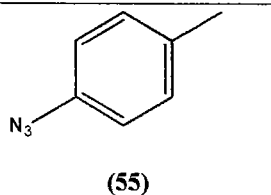
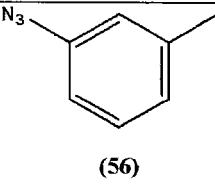
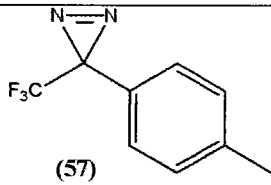
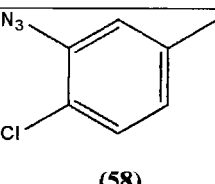
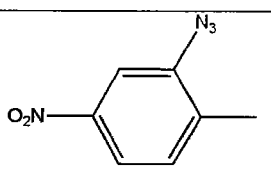
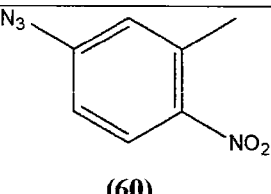
R	Rendement	R	Rendement
 (54)	65%	 (55)	55%
 (56)	35%	 (57)	Le produit s'est dégradé pendant le traitement
 (58)	63%	 (59)	48%
 (60)	66%		

Tableau III-4 Rendements de la N-fonctionnalisation du GS-Tr (40)

Encore une fois la réaction pour introduire le groupement diazirine (**57**) a été conduite, mais le groupement s'est également détérioré malgré les précautions prises pour éviter son contact avec la lumière.

Les différents produits sont obtenus avec un rendement variant entre 30 et 66%. Les structures étant confirmées par les techniques analytiques usuelles.

2- 2- 3- 3) Déprotection du groupement trityle

Nous avons réalisé nos essais en suivant les protocoles décrits par Sakowski et coll.¹⁴⁴. Le dérivé du GSH N-modifié-S-trityle est dissous dans un mélange dichlorométhane/acide trifluoroacétique. Deux équivalents de triéthylsilane sont ensuite ajoutés. (Schéma III-ci-dessous).

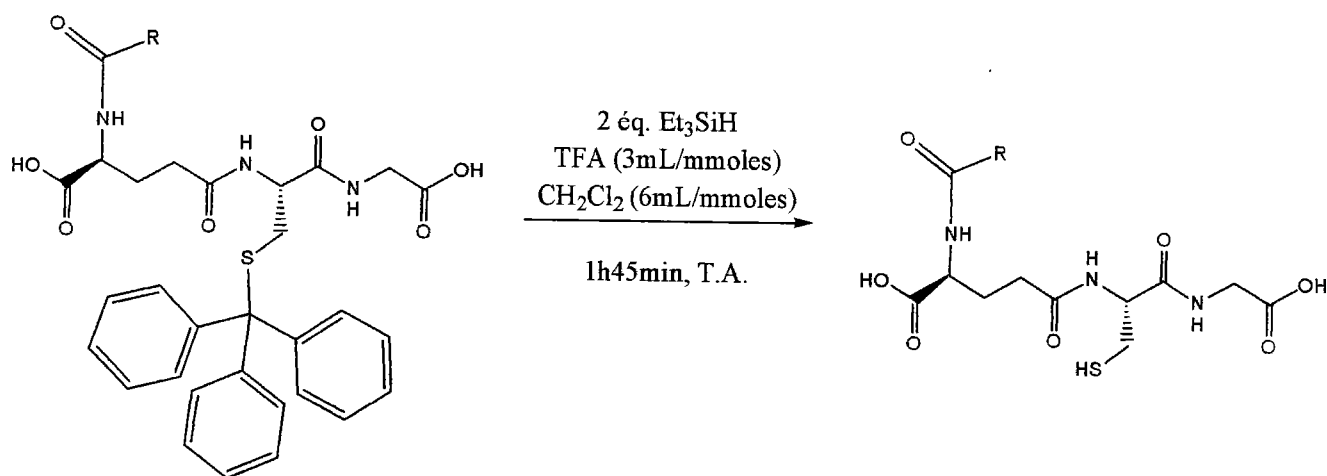


Schéma III-19

La réaction a été préalablement effectuée sur le N-(4-benzoylbenzoyl)-S-tritylglutathion pour la valider la méthode. Etant donné que les spectres RMN ¹H et RMN ¹³C du peptide déprotégé étaient identiques à ceux obtenus lors de la réduction du N,N'-(4-benzoylbenzoyl)glutathion disulfure (**41**) par le d.t.t.. Nous avons également testé ces conditions opératoires sur l'acide 4-azidobenzoïque, après 48 heures à température ambiante nous n'observons pas la présence du produit de réduction : l'acide 4-aminobenzoïque. Nous avons donc élargi la déprotection aux dérivés porteur d'un groupement arylazide.

Après 1h 45min, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur gel de silice. Les produits sont obtenus avec un rendement variant entre 65 et 75%. Les structures sont confirmées par RMN ^1H et RMN ^{13}C en prenant comme référence les spectres ^1H RMN et ^{13}C RMN du GSH et du GSSG. Il faut noter que sous argon et à 0°C , ces produits s'oxydent au bout de 7 jours. Les analyses structurales ainsi que les tests de marquage par photoaffinité doivent être conduits le plus rapidement possible.

Les produits synthétisés ainsi que leur rendement sont reportés dans le tableau III-5.

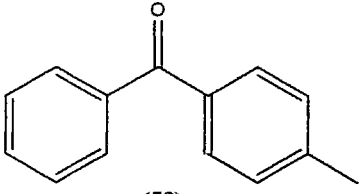
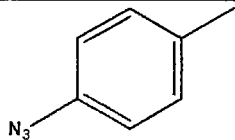
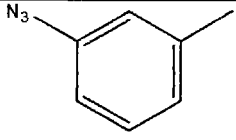
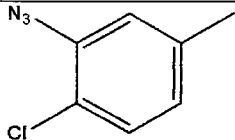
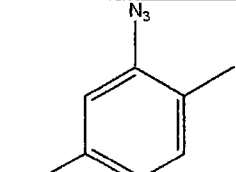
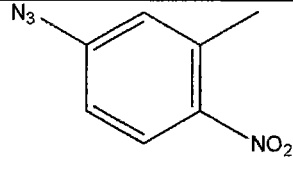
R	Rendement	R	Rendement
 <p>(53)</p>	71%	 <p>(62)</p>	En cours
 <p>(63)</p>	En cours	 <p>(64)</p>	75%
 <p>(65)</p>	74%	 <p>(66)</p>	En cours

Tableau III-5 Rendements des analogues N-substitués du GSH

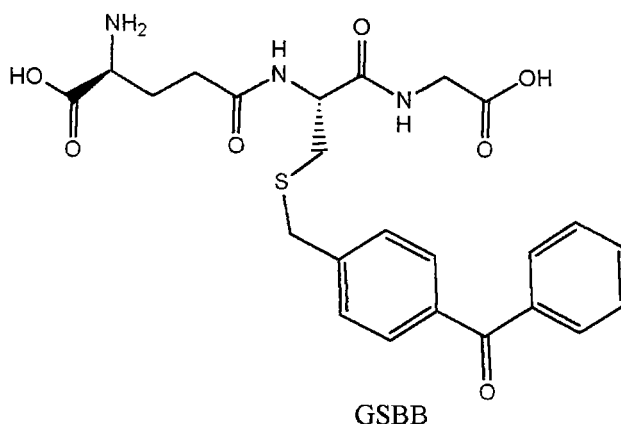
Les peptides déprotégés sont obtenus avec des bons rendements compris entre 71 et 75%.

Nous avons vu voir au cours de ce chapitre qu'une réaction directe du GSH avec des esters activés en milieu basique conduisait à la formation des thioesters correspondants. La synthèse des analogues photoactivables du glutathion nous a donc demandé une phase d'optimisation, et pour contourner ce problème nous avons synthétisé des analogues N,N' substitués du GSSG, à partir d'acides activés sous forme d'esters de la N-

hydroxysuccinimide, dont la réduction du pont disulfure avec le dtt conduit aux analogues N-substitué du GSH. Or cette synthèse ne se généralise pas aux peptides disubstitués par des azotures d'aryles. Pour atteindre des analogues N-substitués par des azotures d'aryles du GSH nous avons protégé la fonction thiol du GSH sous forme de thioéther tritylique. La N-fonctionnalisation de ce peptide S-protégé puis sa déprotection par du triéthylsilane nous ont conduit aux analogues N-fonctionnalisés ciblés.

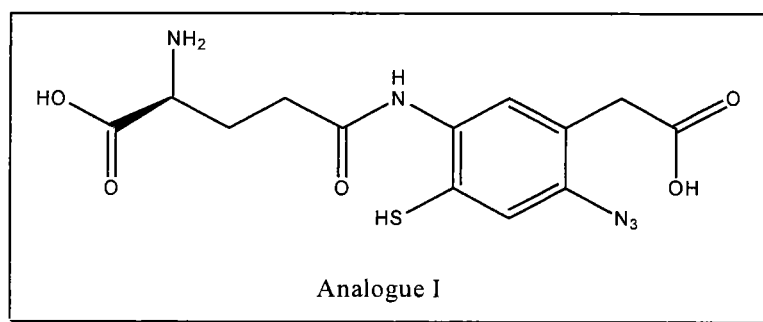
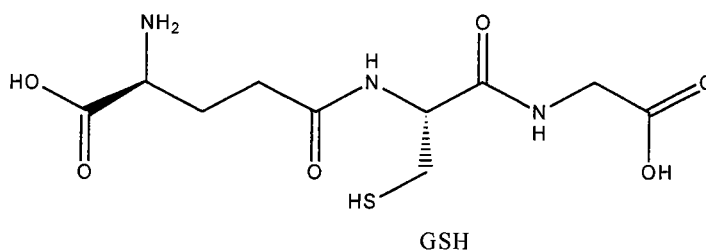
Nous avons également vu que les propriétés UV de certains de ces analogues sont particulièrement intéressantes et nous développerons dans le chapitre VI les premiers tests enzymatiques et de photoactivation menés avec ces composés sur le système enzymatique lié au glutathion.

Dernière minute le composé ci-dessous (GSBB) a été synthétisé pour ces éventuelles propriétés photoactivables. En fait des tests de photoactivation ont montré qu'il ne l'était pas, à l'inverse il se révèle être un très bon inhibiteur des GST. Les tests enzymatiques sont actuellement en cours de réalisation.



Chapitre IV Synthèse de l'analogue I

Nous nous sommes proposés de synthétiser la molécule ci-dessous, analogue photoactivable du GSH. Nous l'appellerons l'analogue I. Dans ce chapitre nous allons développer les différentes stratégies que nous avons mises en œuvre pour atteindre cette molécule.



Comme le montre le schéma de rétrosynthèse ci-dessous (Schéma IV-1), la synthèse de l'analogue I passe par la préparation initiale de dérivés aromatiques tétra-substitués par deux groupements azotés en para l'un par rapport à l'autre, un groupement soufré et un groupement alkyle dont la structure générale est représentée par le composé (67).

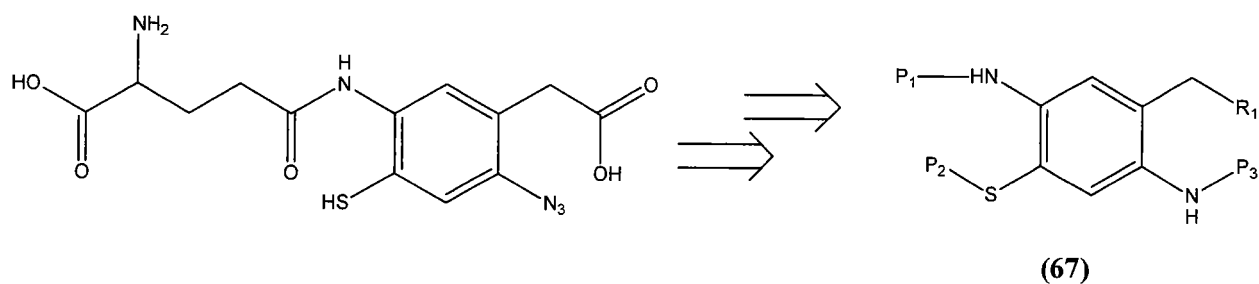


Schéma IV-1

P₁, P₂, P₃ : Groupements protecteurs

L'introduction de l'atome de soufre sur le cycle aromatique dans cette structure nous semble être une des étapes déterminantes de la synthèse. Pour cela deux alternatives se présentent: soit nous partons d'une structure qui possède déjà un atome de soufre sur le cycle aromatique, soit nous introduisons l'atome de soufre sur le cycle aromatique en cours de synthèse.

1- Voie 1 : molécules possédant déjà un atome de soufre sur le cycle aromatique

Pour atteindre une des cibles tétrasubstituées nous avons décidé de commencer notre synthèse soit avec un dérivé du benzothiazole, soit avec un dérivé du thiophénol.

1- 1) Synthèse à partir d'un dérivé du benzothiazole

L'idée est de démarrer la synthèse avec le 2-méthylbenzothiazole, le fonctionnaliser tout d'abord en position para de l'atome d'azote avec un groupement -NO₂ (le groupement -NO₂ pouvant être transformé en cours de synthèse), et ensuite créer une liaison carbone-carbone en position para de l'atome de soufre.

Une fois ces étapes faites il nous restera à ouvrir le cycle thiazole pour atteindre la structure (67) précurseur de l'analogue I (Schéma IV-2).

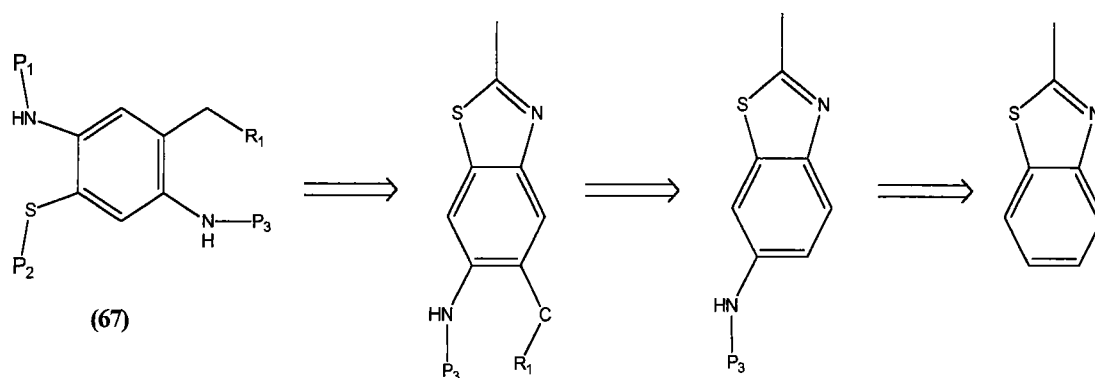


Schéma IV-2

L'introduction d'un atome d'azote sur le cycle aromatique du 2-méthylbenzothiazole se fera par nitration. La création de la liaison carbone-carbone a été envisagée de trois façons différentes.

1- 1- 1) Chemin 1: Vicarious Nucleophilic Substitution (VNS)

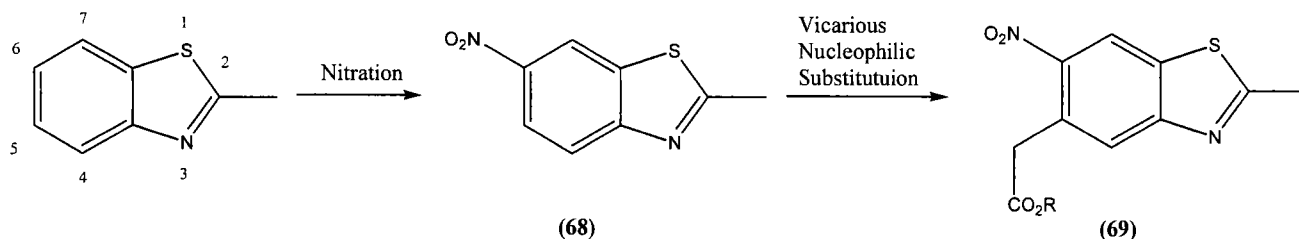


Schéma IV-3

La première étape est la nitration du 2 méthyl-benzothiazole pour obtenir le 2-méthyl-6-nitrobenzothiazole (68). La deuxième étape est la fonctionnalisation du 2-méthyl-6-nitrobenzothiazole en position ortho du groupement nitro et en position para de l'atome de soufre. Pour cela, nous avons envisagé de tester les conditions de la réaction appelée: vicarious nucleophilic substitution (VNS). (Schéma IV-3) dont le mécanisme est représenté sur le Schéma IV-4.

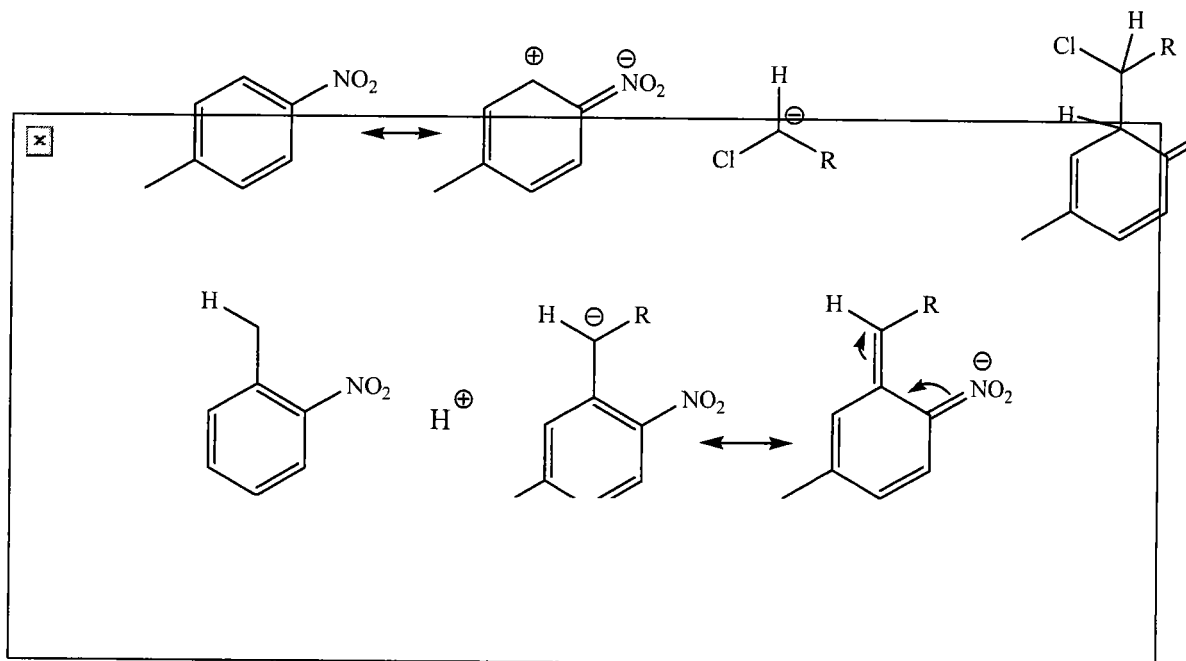


Schéma IV-4

1- 1- 1- 1) Nitration du de 2-méthylbenzothiazole

L'étape de nitration (Schéma IV-5) est effectuée en suivant le protocole de Ward & Poesche¹⁴⁶. Le benzothiazole est en solution dans l'acide sulfurique concentré et 1 équivalent d'acide nitrique concentré est ajouté en gardant la température du milieu réactionnel proche de 0°C. Après recristallisation dans l'éthanol à 95% nous obtenons le 2-méthyl-6-nitrobenzothiazole (**68**) avec un rendement de 50%.

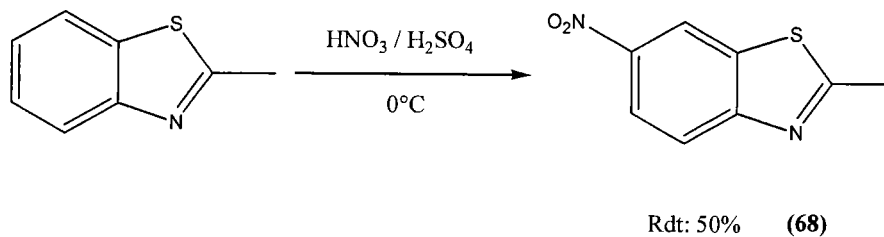


Schéma IV-5

Le produit est caractérisé par RMN ¹H, spectre de masse et par comparaison avec son point de fusion.

1- 1- 1- 2) VNS

Notre deuxième étape est la fonctionnalisation du 2-méthyl-6-nitrobenzothiazole en position 5, c'est-à-dire en ortho du groupement nitro nouvellement introduit. Pour cela, nous avons testé les conditions de la réaction appelée: vicarious nucleophilic substitution (VNS), développée par Makosza et coll.^{147, 148, 149, 150} dès 1987, et plus particulièrement par Mudryk et coll.¹⁵¹.

La synthèse décrite par ces derniers nous a particulièrement intéressée car la chaîne alkyle introduite est identique à celle que nous voulons introduire comme le montre le schéma IV-6.

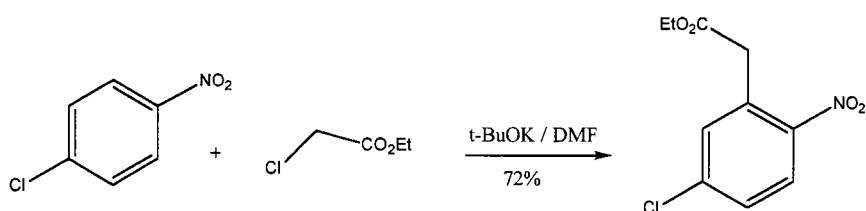


Schéma IV-6

Résultats

Nous avons donc testé ces conditions sur le 2-méthyl-6-nitrobenzothiazole (**68**) (Schéma IV-7).

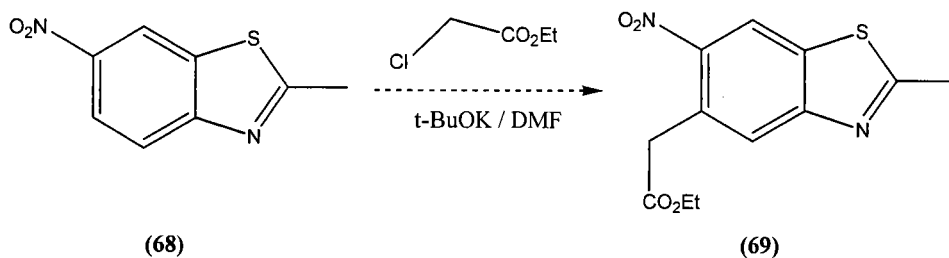


Schéma IV-7

Lors de nos différents essais, nous n'avons jamais obtenu le produit attendu (**69**) car le réactif de départ restait inchangé dans la majorité des cas.

Nos observations sont en accord avec celles de Lawrence et coll.¹⁵² qui ont rencontré des problèmes similaires lors de leurs synthèses d'oxydes de benzylphosphine. Leurs essais avec

les conditions initiales de Makosza et coll. ne les conduisent jamais aux produits ciblés. Leur réactif de départ ne réagit pas dans ces conditions.

Par ailleurs, en plus de nos observations un article récent de Makosa et coll.¹⁵³ laisse supposer qu'il est plus facile de fonctionnaliser la position 7 que la position 5 du 2-méthyl-6-nitrobenzothiazole (**68**) (Schéma IV-8) en travaillant avec des nucléophiles tels que les réactifs de Grignard.

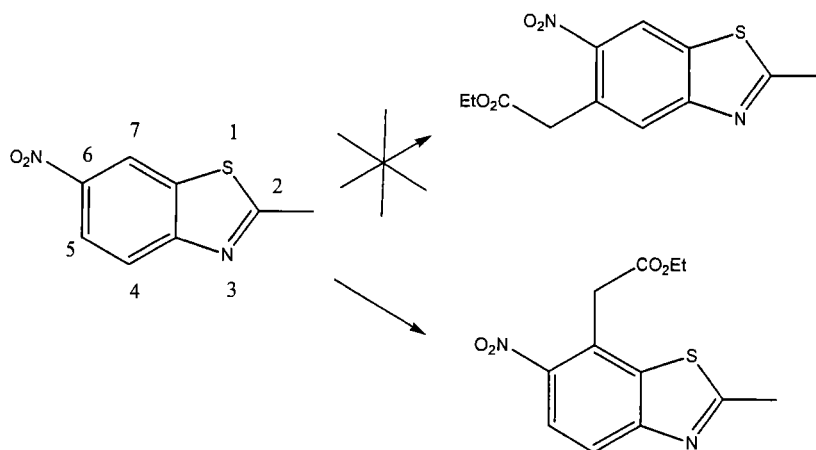


Schéma IV-8

N'atteignant donc pas notre produit cible en suivant les conditions de la V.N.S. et n'étant pas sûr d'atteindre le bon isomère en développant de meilleures conditions opératoires, nous avons décidé de réduire le 2-méthyl-6-nitrobenzothiazole (**68**) en son dérivé aminé correspondant (**70**). Ce second intermédiaire peut alors être fonctionnalisé en amide *tert*-butylique et mis en réaction dans les conditions d'ortho-lithiation d'amide aromatique (Schéma IV-9). Il peut également être engagé dans une réaction de Reimer-Tiemann (Schéma IV-13).

1- 1- 2) Chemin 2: Ortho-lithiation

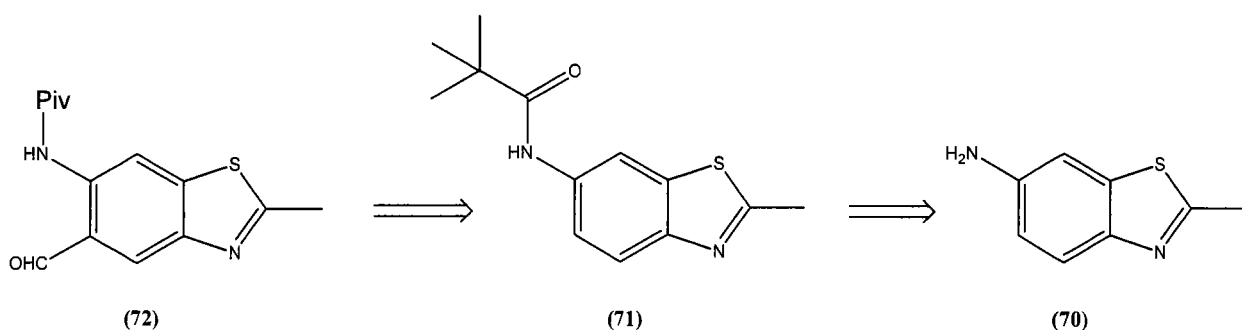


Schéma IV-9

1- 1- 2- 1) Synthèse du 6- amino-2-méthylbenzothiazole

Pour réduire le groupement nitro du 2-méthyl-6-nitrobenzothiazole (68) nous avons plusieurs options à notre disposition^{154, 155}. Nous avons décidé d'atteindre le 6-amino-2-méthylbenzothiazole (70) en suivant la méthode proposée par Ramadas et coll.¹⁵⁶.

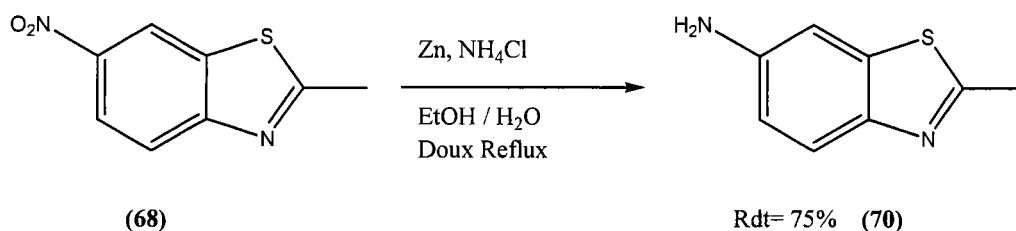


Schéma IV-10

Nous y avons cependant apporté quelques modifications (Schéma IV-10). Nous avons préféré conduire la réaction dans l'éthanol à 95% moins agressif vis-à-vis de l'organisme, plutôt que dans un mélange eau / méthanol. De plus nous avons choisi comme agent de réduction le zinc (Zn) au lieu du fer (Fe). Cependant, bien qu'il soit reporté que parfois le Zn en présence de NH₄Cl réduit le groupement -NO₂ en oxime nous avons obtenu le 6-amino-2-méthylbenzothiazole avec un rendement de 75% après recristallisation dans l'éthanol. La réduction est confirmée entre autres par un spectre de masse.

1- 1- 2- 2) Synthèse du 2-méthyl-6-(pivaloylamino)benzothiazole

Fenlon et coll.¹⁵⁷ décrivent la réaction d'une amine aromatique avec du chlorure de pivaloyle, mais leurs conditions ne sont pas satisfaisantes car notre produit n'est pas soluble dans le dichlorométhane (CH₂Cl₂). Nous avons donc choisi de réaliser la réaction dans le THF en présence d'acide pivaloïque et de dicyclohexylcarbodiimide. (Schéma IV-11).

L'amide obtenu est un bon groupement ortho orienteur lors de la formation de l'organolithien^{158, 159}.

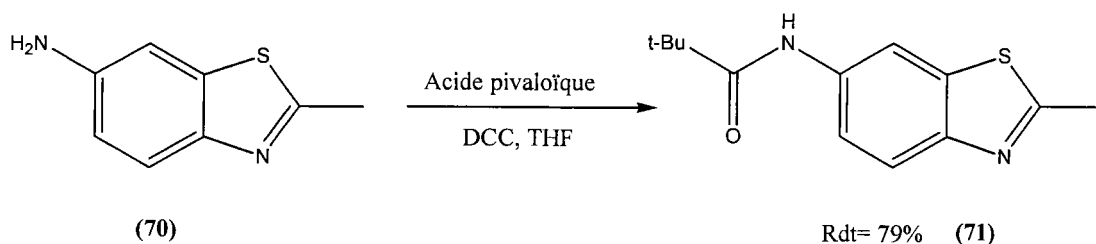


Schéma IV-11

Nous obtenons l'amide désiré (71) avec un rendement de 79%.

1- 1- 2- 3) Essais d'ortho-lithiation

Nous avons effectué les essais d'ortho-lithiation avec les conditions préconisées par Fuhrer et coll.¹⁵⁸ avec l'iodure de méthyle comme nucléophile (Schéma IV-12).

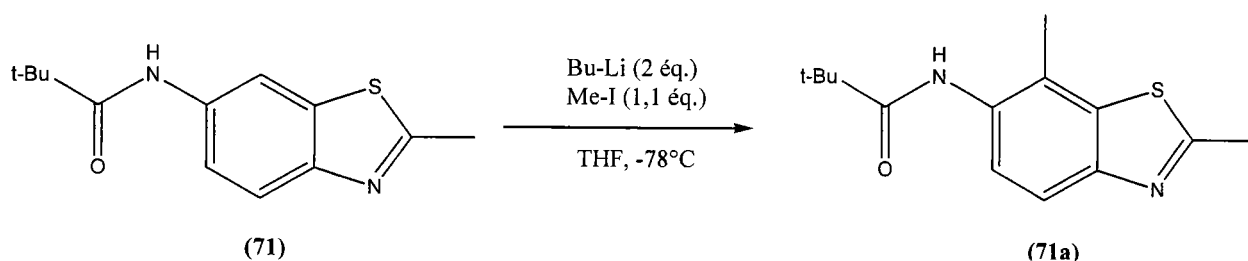


Schéma IV-12

La réaction n'est pas totale, la ccm confirme la présence de 71. Une analyse RMN ¹H du brut révèle la formation du produit 71a. Encore une fois, cette approche comme celle utilisant la VNS semble être régiosélective et ne nous permet pas d'atteindre l'isomère ciblé.

A partir de (70), nous avons simultanément développé la synthèse de (72) selon la réaction de Reimer-Tiemann.

1- 1- 3) Chemin 3: Reimer-Tiemann

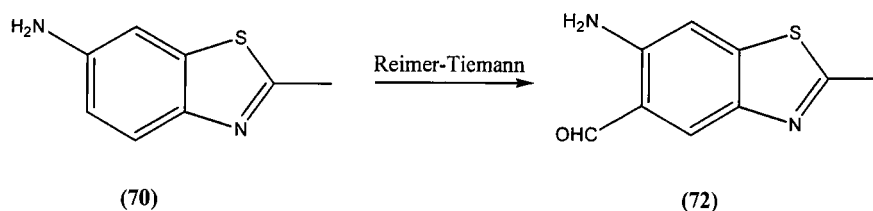


Schéma IV-13

La réaction de Reimer-Tiemann a d'abord été consacrée à la formylation des phénols¹⁶⁰, cependant Fenlon et coll.¹⁵⁷ ont réussi la formylation de diaminopyridine avec un rendement de 26% (Schéma IV-14).

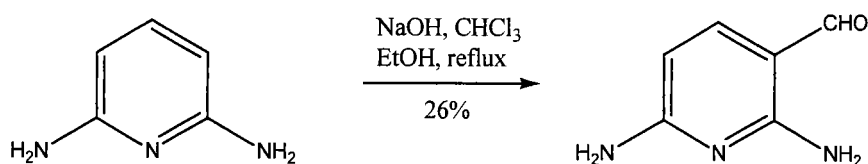


Schéma IV-14

Résultats

Nous avons testé les conditions de Fenlon et coll.¹⁵⁷ décrites ci-dessus pour atteindre le 6-amino-2-méthylbenzothiazole-5-formaldéhyde (72) (Schéma IV-15).

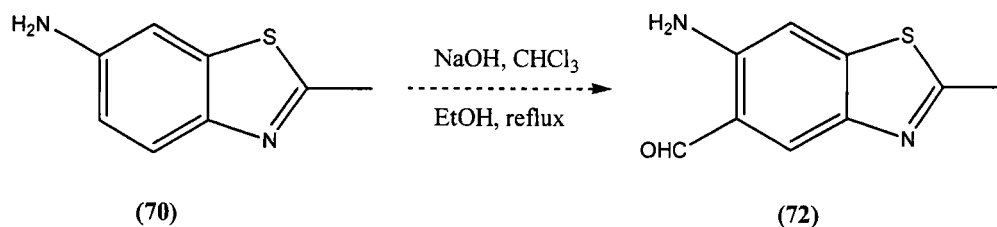


Schéma IV-15

Malheureusement lors de nos différentes tentatives notre produit s'est dégradé, et nous n'avons rien récupéré d'exploitable. Les c.c.m. montrent bien la disparition du réactif de départ (**70**) mais la RMN ^1H ne nous permet pas d'identifier le ou les produits formés.

Cette stratégie avec le benzothiazole se révèle peu concluante en ce qui concerne la VNS, l'ortho-lithiation et la réaction de Riemer-Tiemann. En effet, soit nous n'obtenons rien d'exploitable, soit la voie étudiée pose un problème de régiosélectivité. Nous nous sommes donc orientés vers la synthèse à partir de thiophénol.

1- 2) Synthèse à partir d'un dérivé du thiophénol

1- 2- 1) Rappel bibliographique

En 2002, Tale¹⁶¹ propose la synthèse de 2-aryl-5-méthylbenzothiazole à partir du parathiocrésol en présence de nitrate d'ammonium cerrique (CAN) (Schéma IV-16). Cette synthèse nous semblait fort intéressante pour atteindre notre cible tétrasubstituée. En effet à partir de 2-aryl-5-méthylbenzothiazole l'introduction du second atome d'azote en position 6 par nitration semble assez aisée.

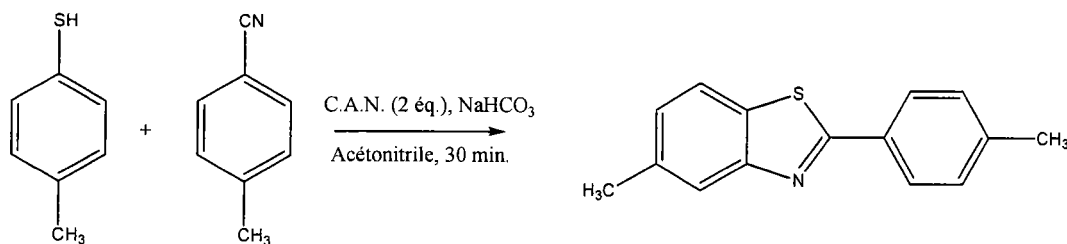


Schéma IV-16

Cette synthèse est d'autant plus intéressante que dans un article de Molander¹⁶² il est montré que de nombreux oxydants transforment les thiols en disulfure ou en produits d'oxydation des disulfures. Il est précisé qu'en présence d'un seul équivalent de C.A.N. les thiols sont majoritairement oxydés en disulfure.

1- 2- 2) Résultats

Nous avons décidé d'appliquer ce protocole au parathiocrésol et au benzonitrile (Schéma IV-17).

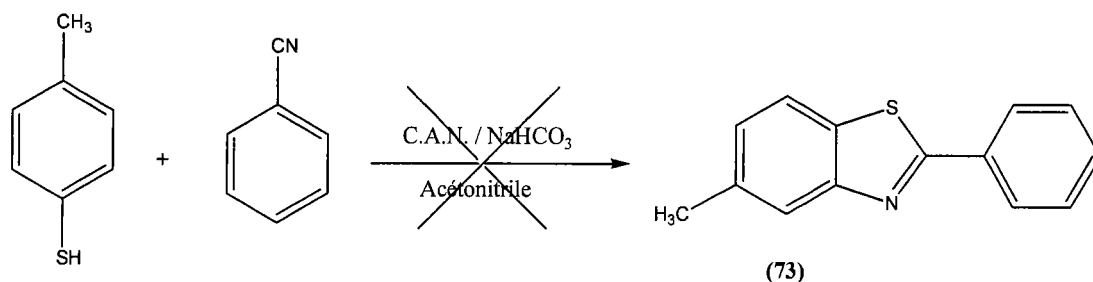


Schéma IV-17

Nos deux premiers essais n'ont pas été concluants. Pourtant d'après la c.c.m. le parathiocrésol est consommé lors de la réaction mais la RMN ^1H du produit nous révèle un système AB caractéristique des cycles aromatiques substitués en position 1-4 comme l'est le parathiocrésol. Nous avons essayé de faire varier le solvant (DMF), la base (Na_2CO_3 , triéthylamine) ou la température (reflux d'acétonitrile) mais rien n'y a fait, nous obtenons toujours le même produit.

Nous avons abandonné cette voie depuis un moment quand une nouvelle publication sur ces travaux parut. En effet, en 2003 Nair et coll.¹⁶³ ont repris les travaux de Tale¹⁶¹. Ils trouvent surprenant qu'un oxydant comme le CAN, dans les conditions décrites, n'oxydent pas le thiocrésol. Pour vérifier cela ils refont les synthèses décrites par Tale avec le 4-méthylthiophénol et le 4-nitro-benzonitrile. Ils n'obtiennent jamais le 2-arylbenzothiazole attendu mais les deux produits d'oxydation ci-dessous (Figure IV-1).

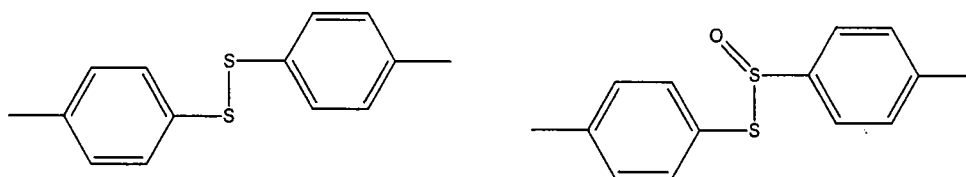


Figure IV-1 Produits d'oxydation obtenus dans les conditions de Tale

Les résultats que nous avons obtenus en RMN ^1H sont en accord avec ceux proposés par Nair et coll.¹⁶³. Cette synthèse ne conduit donc malheureusement pas au benzothiazole.

Compte tenu de ces résultats nous avons décidé de développer la seconde alternative qui consiste à introduire un atome de soufre sur un noyau aromatique en cours de synthèse.

2- Voie 2 : synthèse de noyau aromatique porteur d'un atome de soufre

La seconde alternative pour atteindre l'analogue I est de créer une liaison C-S sur un cycle aromatique possédant déjà une chaîne alkyle, l'idée étant d'arriver à un des intermédiaires ci-dessous par exemple (Figure IV-2).

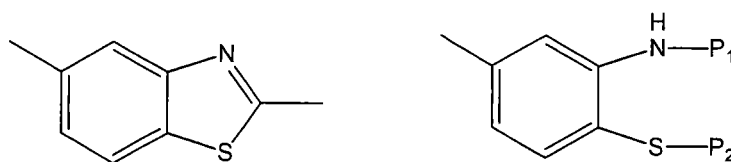


Figure IV-2 Intermédiaires clés dans la synthèse de l'analogue I

Dans un premier temps nous avons réalisé une étude bibliographique sur les différentes méthodes d'introduction d'un atome de soufre sur un noyau aromatique.

2-1) Introduction d'un atome de soufre sur un cycle aromatique

Parmi les méthodes couramment utilisées dans la littérature pour la synthèse de thiols aromatiques nous pouvons citer les suivantes.

2- 1- 1) Réaction de Herz

La première méthode présentée est la synthèse directe à partir de dérivés de l'aniline, où le groupement amine oriente une ortho-sulfuration. Le dérivé de l'aniline est mis en réaction soit avec du S_2Cl_2 dans les conditions de la réaction de Herz¹⁶⁴ (Schéma IV-18) ou avec un mélange $Br_2 / KSCN$ ^{165, 166} (Schéma IV-19). Après saponification, et hydrolyse acide on obtient l'amino-thiophénol correspondant. Cependant, ces voies d'accès à l'ortho-aminothiophénol ne sont pas toujours faciles à mettre en œuvre. Il existe plusieurs inconvénients comme une difficile extraction des produits de la phase aqueuse, d'où des

rendements modérés, ou encore une chloration en para du groupement amine sur le noyau aromatique.

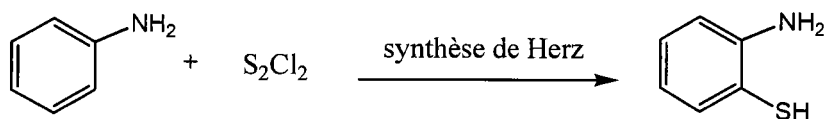


Schéma IV-18

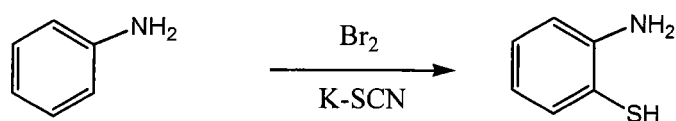


Schéma IV-19

2- 1- 2) Réarrangement de Newman-Kwart

La deuxième méthode est une synthèse à partir du phénol et de ses dérivés (Schéma IV-20). Elle permet de préparer des thiophénols à partir des phénols correspondants. De nos jours c'est la méthode la plus utilisée industriellement et elle est appelée réarrangement de Newman-Kwart^{167, 168, 169}.

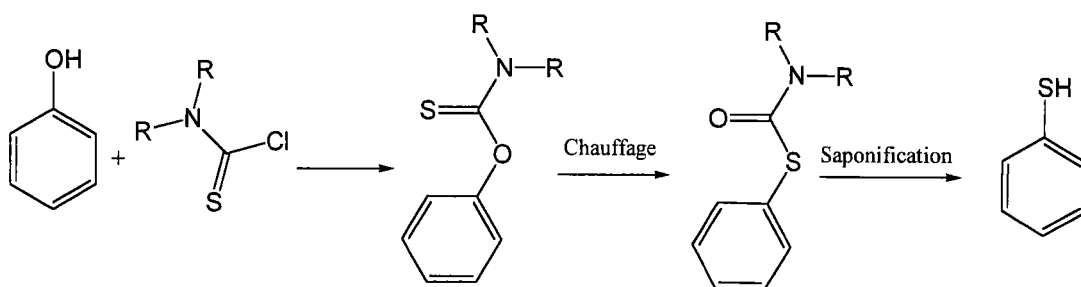
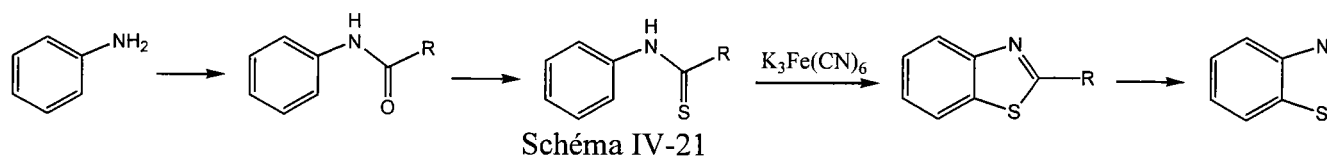


Schéma IV-20

L'action du chlorure de diméthylthiocarbamoyl sur le dérivé phénolique en présence d'une base organique à température ambiante donne un O-aryldiméthylthiocarbamate. Cette intermédiaire subit une pyrolyse à 230°C pour donner le S-aryldiméthylthiocarbamate. Le thiol aromatique est obtenu par hydrolyse alcaline à chaud.

2- 1- 3) Voie de Jacobson

La troisième méthode est de transformer une amine en amide, puis en thioamide et ensuite de le cycliser avec du ferricyanure de potassium pour obtenir un dérivé du benzothiazole. (Schéma IV-21) Dans la littérature la dernière étape est appelée cyclisation de Jacobson¹⁷⁰.



L'aminothiophénol peut être atteint soit par quaternisation de l'atome d'azote et ouverture du cycle nouvellement formé par NaBH₄, soit par hydrolyse alcaline à chaud du cycle thiazole.

2- 1- 4) Sels de diazonium

La quatrième méthode fait appel aux sels de diazonium aromatiques ArN₂⁺X⁻ (Schéma IV-22).

Les sels de diazonium réagissent avec les O-alkyl xanthates¹⁷¹ ROCSS⁻K⁺, pour donner dans un premier temps un dithiocarbamate, ArSCSOR, qui saponifié conduit à un thiol aromatique (ArSH). Cette méthode de préparation longtemps considérée comme la meilleure au niveau industrielle n'est plus utilisée car d'une part la préparation de dérivés diazoïques à grande échelle est délicate (dérivés instables, risque d'explosion) et d'autre part le CS₂ est un liquide très inflammable (synthèse des xanthates). Pour la chimie au laboratoire les sels de diazonium demeure une méthode de choix en synthèse organique.

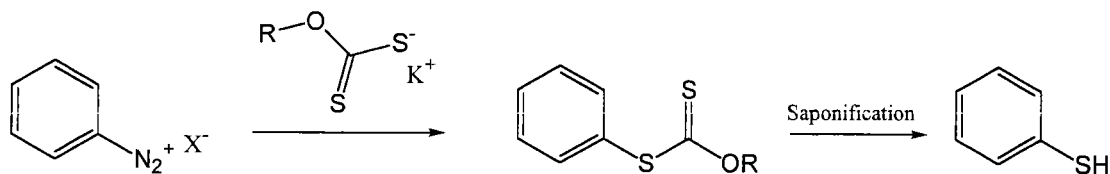


Schéma IV-22

2- 1- 5) Voie des halogénures d'aryles

Enfin la dernière méthode est une synthèse à partir d'halogénures d'aryles ArX.

2- 1- 5- 1) Via organomagnésiens et organolithiens

La synthèse à partir des organomagnésiens aromatiques est bien connue (Schéma IV-23). L'action du soufre (S_8) sur un organomagnésien du type $ArMgX$ conduit aux thiols $ArSH$, par insertion du soufre dans la liaison Csp^2-Mg puis par hydrolyse acide du thiophénolate formé. L'inconvénient de cette réaction est le risque de formation de disulfures et même de trisulfures.

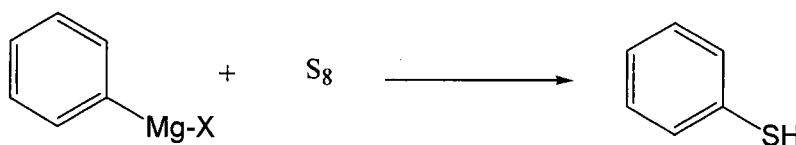


Schéma IV-23

Cette synthèse peut être également conduite avec des organolithiens aromatiques¹⁷² (Schéma IV-24).

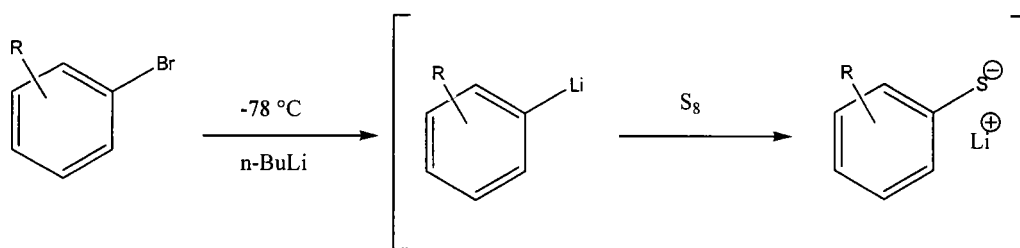


Schéma IV-24

2- 1- 5- 2) Substitution nucléophile aromatique intermoléculaire et intramoléculaire

Les thiols aromatiques $ArSH$ peuvent être obtenus par substitution nucléophile aromatique de l'halogène par l'ion $-SH$, provenant le plus souvent de $NaSH$ ou Na_2S ¹⁷³ (Schéma IV-25). Les halogénures d'aryles activés par des groupements attracteurs conduisent aux meilleurs

rendements. Les réactions secondaires sont importantes, elles conduisent notamment à la formation des thioéthers ArSAr. Il existe une variante¹⁷⁴ où le nucléophile est de la thiourée et la réaction est conduite sous irradiation dans le DMSO, mais les inconvénients restent les mêmes.

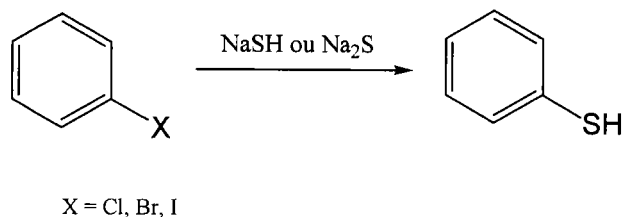


Schéma IV-25

Il existe une variante où la substitution nucléophile aromatique de l'halogène est une substitution intramoléculaire¹⁷⁵. (Schéma IV-26).

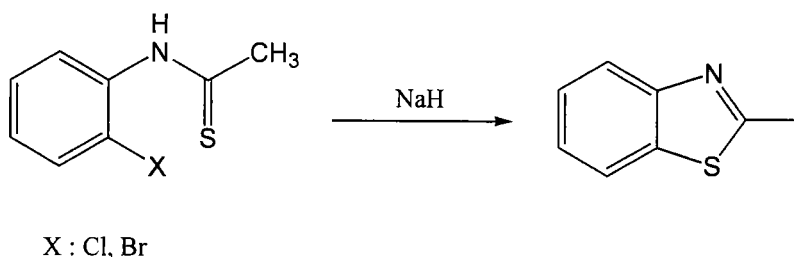


Schéma IV-26

La substitution aromatique est induite par l'action de l'hydrure de sodium (NaH). Le benzothiazole, comme mentionné précédemment, peut nous conduire à un dérivé du thiophénol.

Comme nous l'avons vu précédemment, les travaux de Nair¹⁶³ montrent la fragilité des thiols aromatiques vis-à-vis des oxydants. La synthèse du dérivé aromatique tétrasubstitué risque d'en être compliquée. De ce fait pour éviter de rallonger le schéma réactionnel par des protections et des déprotections nous avons choisi d'atteindre le composé I à partir d'un dérivé du benzothiazole.

Nous avons donc choisi de partir d'un dérivé comportant un groupement méthyle qui se retrouvera en position para de l'atome de soufre lors de la formation du 2,5-diméthylbenzothiazole (74).

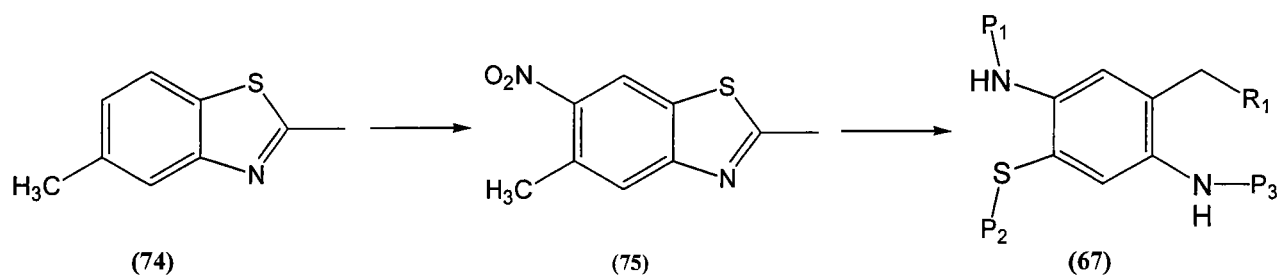


Schéma IV-27

L'introduction du second atome d'azote sur le cycle aromatique se fera par nitration (composé (75)) (Schéma IV-27). D'après les travaux de Ward et Poesche¹⁴⁶ et nos résultats, nous savons que l'atome de soufre n'est pas oxydé lors de la nitration du benzothiazole. Le cycle thiazole permet de protéger l'atome de soufre des oxydants tel que l'acide nitrique (HNO₃) et son ouverture conduira au composé tétrasubstitué (67).

2- 2) Synthèse du 2,5-diméthylbenzothiazole

2- 2- 1) A partir d'un dérivé du phénol

Notre première voie de synthèse pour atteindre le 2,5-diméthylbenzothiazole (74) s'appuie sur la réaction appelée: réarrangement de Newman-Kwart. Le réactif de départ sera le 4-méthyl-2-nitrophénol. Nous voulons atteindre dans un premier temps un dérivé de l'aminothiophénol puis le 2,5-diméthylbenzothiazole (74) Schéma IV-28.

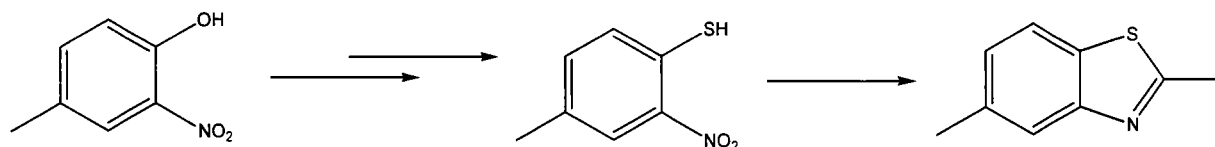


Schéma IV-28

2- 2- 1- 1) Réarrangement de Newman-Kwart

Le réarrangement de Newman-Kwart a été mis en évidence en 1966 par Newman et Kwart séparément^{167, 168}. C'est une migration intramoléculaire de deux atomes non adjacents.

Ce type de réarrangement n'est pas courant néanmoins nous pouvons en citer deux autres¹⁷⁶ (Schéma IV-29): celui de Schönberg et celui de Smiles¹⁷⁷.

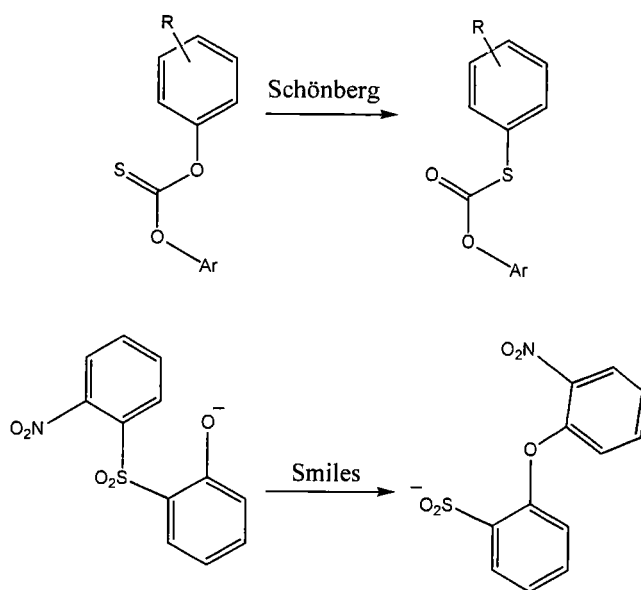


Schéma IV-29

La question qui se pose à nous est de savoir dans quel ordre réaliser les transformations : faire le réarrangement de Newmann-Kwart puis la réduction du $-\text{NO}_2$ en $-\text{NH}_2$ ou faire l'inverse. Etant donné que la présence de groupements donneurs tel que le groupement hydroxyle donne de mauvais rendement lors du réarrangement¹⁶⁷, nous avons choisi de d'abord effectuer le réarrangement puis de réduire le groupement $-\text{NO}_2$.

2- 2- 1- 2) Réduction d'un groupement nitro en présence d'un groupement carbamate

De plus le groupement nitro peut être réduit sans difficulté particulière en présence du groupement carbamate. Weinstock et coll.¹⁷⁸ effectuent une réduction avec du dihydrogène en

présence de palladium sur un produit très similaire au notre (Schéma IV-30). Ces auteurs obtiennent le dérivé aminé avec un rendement de 85%.

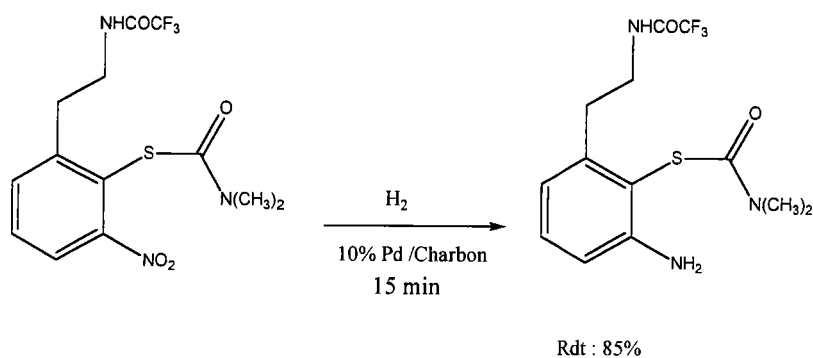


Schéma IV-30

2- 2- 1- 3) Résultats

Par conséquent nous avons envisagé la suite réactionnelle suivante (Schéma IV-31).

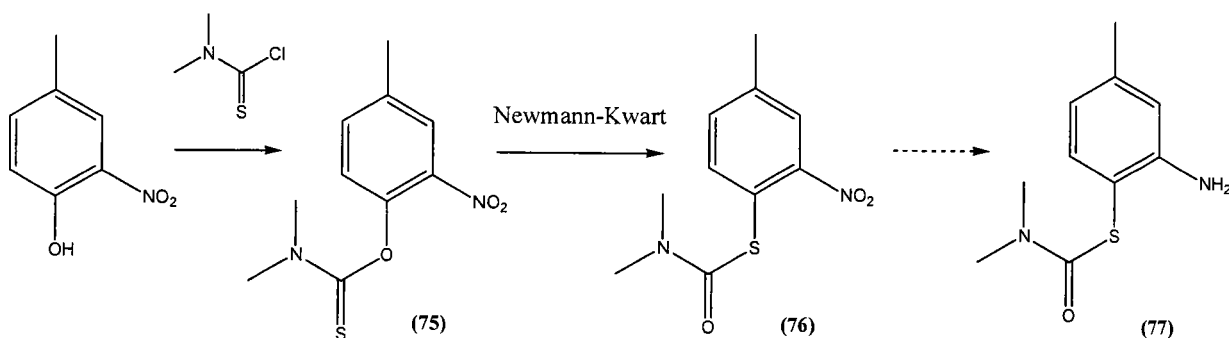


Schéma IV-31

2- 2- 1- 3- 1) Synthèse de O-aryl diméthylthiocarbamate

La première étape est l'obtention du O-aryl diméthylthiocarbamate à partir du phénol correspondant. Il y a deux techniques majoritairement utilisées qui sont présentées ci-dessous (Schéma IV-32).

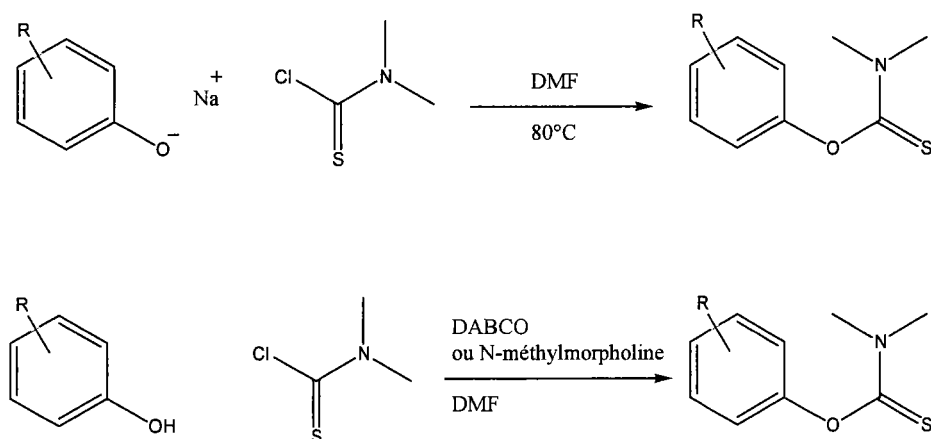


Schéma IV-32

Newman et al.¹⁶⁷ précisent que c'est le deuxième protocole qui est le plus efficace avec les phénols possédant un groupement électro attracteur, ce qui est notre cas.

Nous avons donc synthétisé le O-aryl diméthylthiocarbamate en appliquant le deuxième protocole. Nous y avons apporté un petit changement, nous avons travaillé dans le dichlorométhane plutôt que dans le DMF.

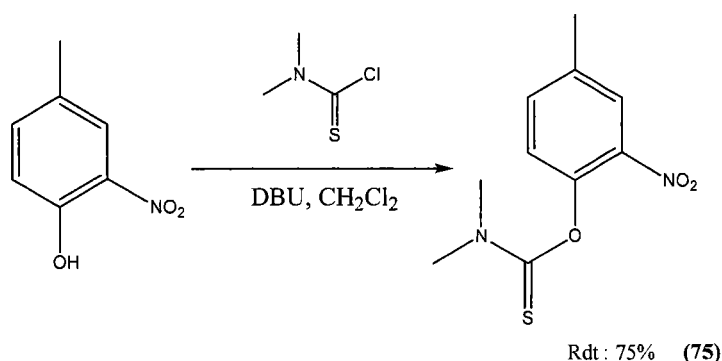


Schéma IV-33

L'action du chlorure de diméthylthiocarbamoyl sur le 4-méthyl-2-nitrophénol en présence de DBU dans le CH_2Cl_2 à température ambiante donne le O-aryldiméthylthiocarbamate (**75**) attendu (Schéma IV-33). Le chlorhydrate de la DBU qui précipite pendant la réaction est un bon indicateur de l'avancement de la réaction. Après traitement classique, le produit est purifié sur gel de silice et est obtenu avec un rendement de 75%, la structure étant confirmée par les techniques analytiques usuelles.

2- 2- 1- 3- 2) Réarrangement de Newman-Kwart

Notre deuxième étape est le réarrangement proprement dit. Le O-aryl diméthylthiocarbamate est chauffé sans solvant à 250°C pendant une durée qui varie selon la quantité de matière mise en réaction (Schéma IV-34). Dans notre cas 15 minutes ont suffi. Il se produit une vitrification. Le résidu est recristallisé pour donner le S-aryl diméthylthiocarbamate attendu (**76**) avec un rendement de 95%.

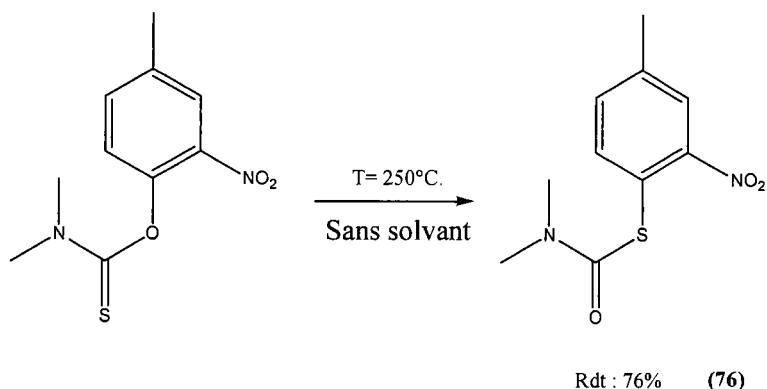


Schéma IV-34

2- 2- 1- 3- 3) Réduction du groupement nitro

Nous avons utilisé le protocole décrit par Weinstock et coll.¹⁷⁸ pour réduire le groupement nitro.

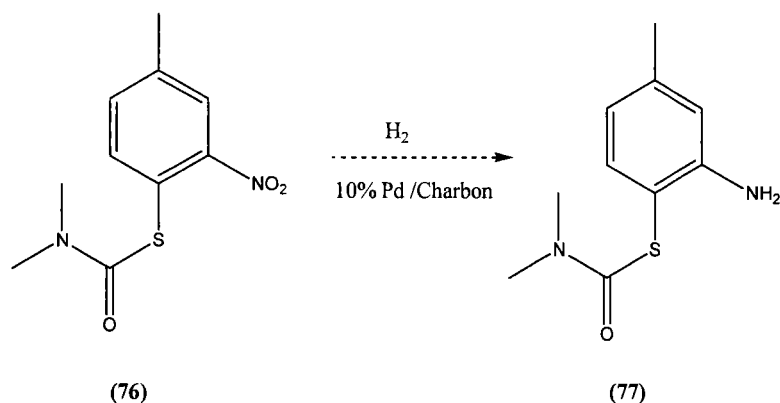


Schéma IV-35

Weinstock et coll.¹⁷⁸ obtiennent leur produit cible en 15 minutes. Dans notre cas (Schéma IV-35) la réaction aura duré 48 heures, et après purification sur gel de silice nous obtenons un produit que nous n'avons pas identifié mais qui n'est pas l'amine (**77**). Nous n'avons pas tenté d'essai de réduction supplémentaire. En effet, nous nous sommes rendu compte que l'étape de nitration pour introduire le second atome d'azote sur le cycle aromatique aurait été délicate étant donné la fragilité du thiocarbamate. Nous avons préféré ne pas continuer dans cette voie, intéressante mais inadaptée à notre cible.

2- 2- 2) A partir de thioamide : Voie Jacobson

Nous avons décidé d'atteindre le benzothiazole de la manière ci-dessous en utilisant la voie dite de Jacobson qui est une cyclisation oxydante d'un thioamide obtenu à partir d'un amide, lui-même obtenu à partir d'un dérivé de l'aniline.

2- 2- 2- 1) Réaction de Jacobson : étude bibliographique

Nous nous sommes inspirés des travaux de Hutchinson et coll.¹⁷⁹ ainsi que ceux de Jackson et coll.¹⁸⁰ (Schéma IV-36). Ces deux articles font référence aux 2-arylbenzothiazoles.

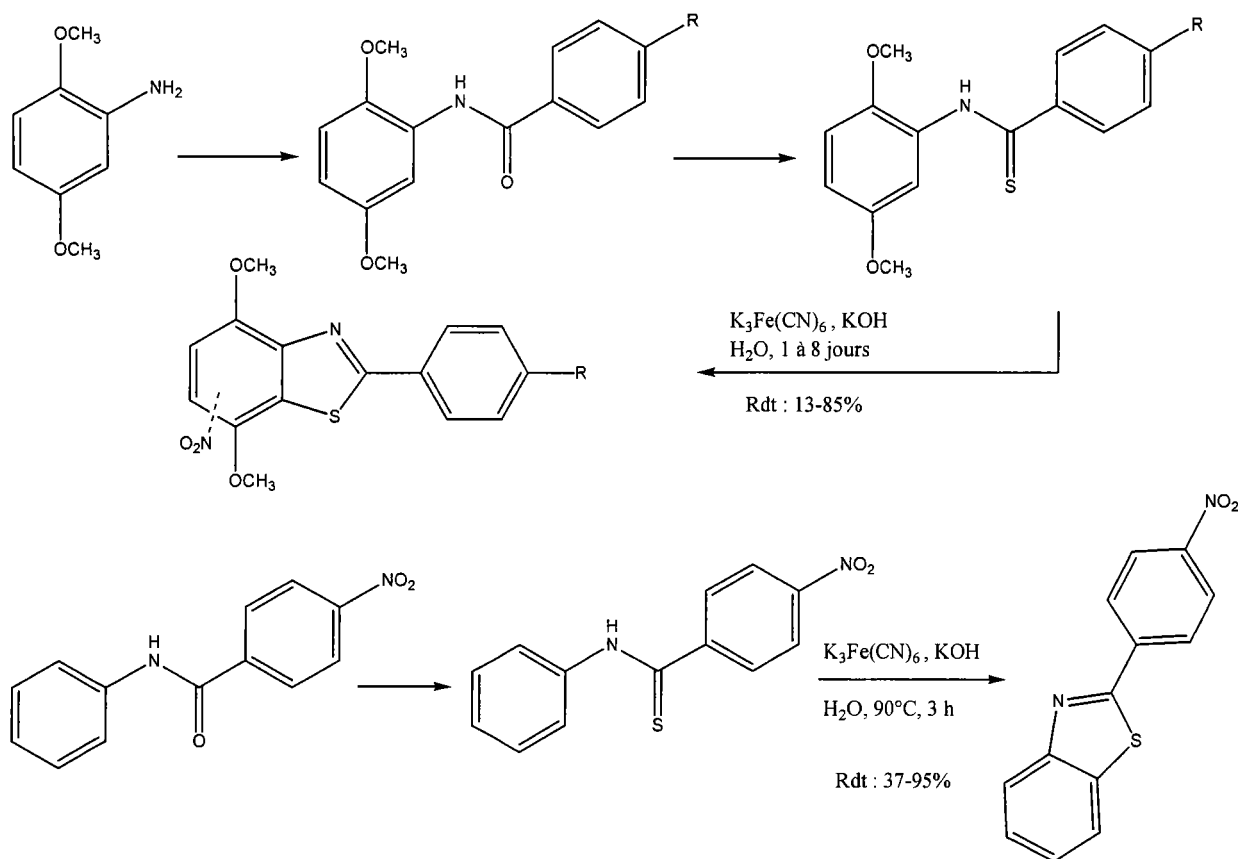
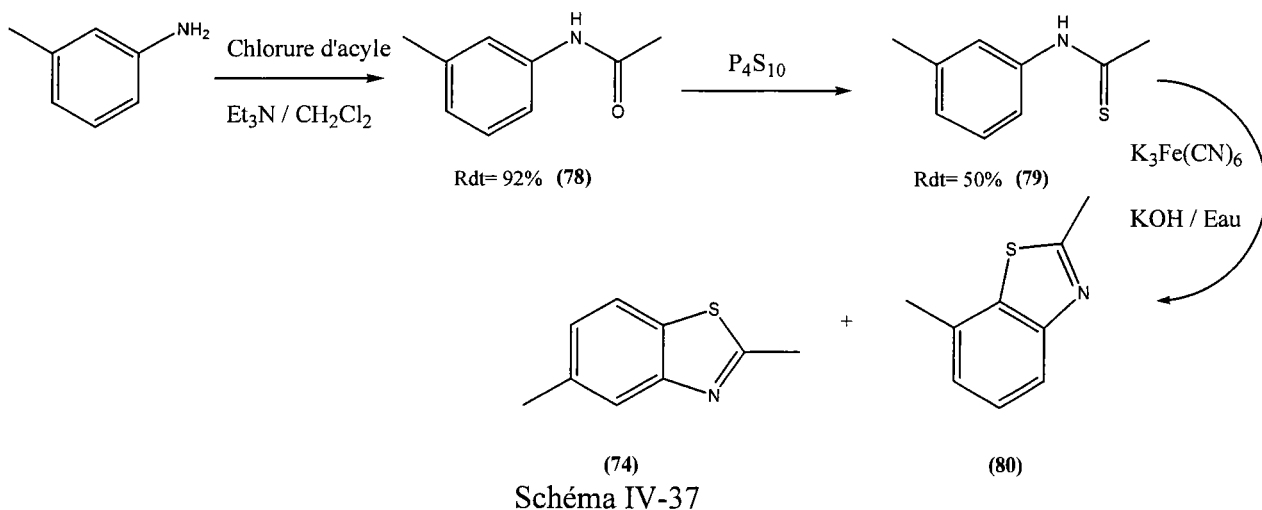


Schéma IV-36

La synthèse commence avec un dérivé de l'aniline (Schéma IV-37). L'amine aromatique est transformée en amide, qui lui est converti en thioamide avec le réactif de Lawesson ou avec du penta sulfure de phosphore (P_2S_5). Enfin le thioamide est cyclisé par action du ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en milieu alcalin pour obtenir le benzothiazole correspondant. Cette dernière étape est la plus délicate car les rendements de la réaction sont fortement influencés par les substituants portés par le noyau aromatique.



2- 2- 2- 2) Résultats

Notre produit de départ est la 3-méthylaniline ou métatoluidine. Nous la transformons en acétamide (**78**) par action du chlorure d'acétyle dans le dichlorométhane en présence de triéthylamine¹⁸¹ avec un rendement de 92%.

2- 2- 2- 2- 1) Synthèse du thioamide

Le passage de l'amide au thioamide peut se faire avec deux réactifs. Nous avons le choix entre le réactif de Lawesson¹⁸² ou P_4S_{10} ¹⁷⁵. Le réactif de Lawesson est utilisé à hauteur de 0,6 équivalent dans le toluène à 80°C et sous atmosphère inerte¹⁸³. P_4S_{10} est utilisé en quantité stoechiométrique dans le benzène à reflux ou dans le THF à reflux sous atmosphère inerte et en présence d'hydrogencarbonate de sodium^{175, 180} ($NaHCO_3$).

Nous avons effectué la réaction avec P_4S_{10} à reflux du THF en présence de $NaHCO_3$ et sous atmosphère inerte.

Nous obtenons notre thioamide (**79**) avec un rendement de 50%, la structure étant confirmée par RMN 1H , RMN ^{13}C et GCMS.

2- 2- 2- 2- 2) Cyclisation de Jacobson

La cyclisation peut se faire à chaud ou à température ambiante, nous avons opté pour la cyclisation du thioamide avec les conditions opératoires à température ambiante. Nous craignons que le thioamide ne s'hydrolyse à chaud.

Après traitement de la réaction, nous obtenons un mélange de produits avec un rendement global de 10% pour les deux isomères (Schéma IV-38). Le rapport est de 1 pour 7 (déterminé par RMN ^1H) respectivement pour l'isomère ciblé (74) par rapport à l'isomère (80). Les structures sont confirmées par RMN ^1H et GCMS.

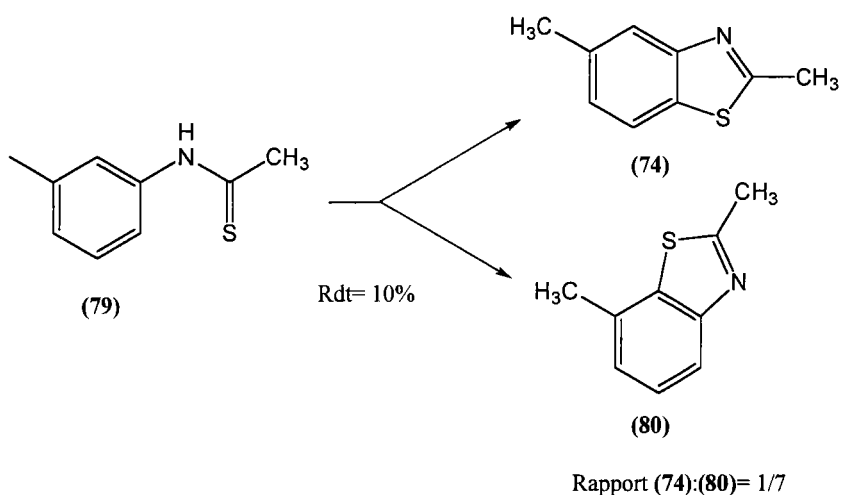
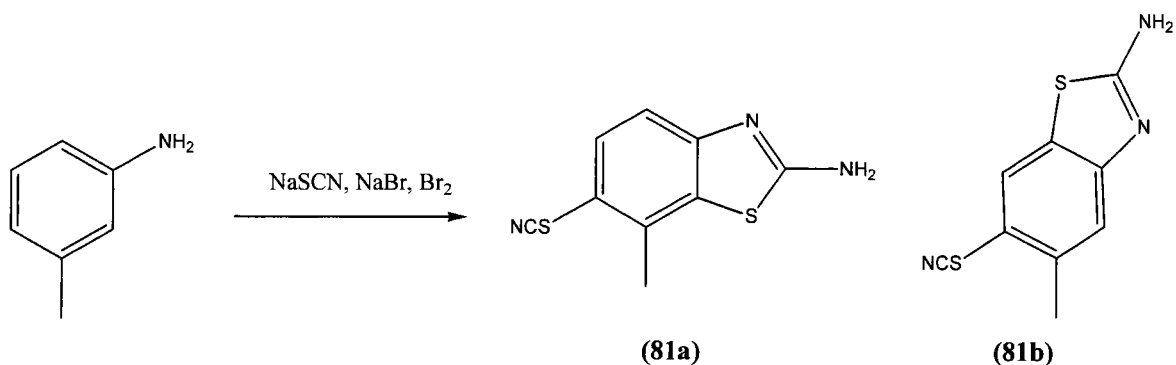


Schéma IV-38

D'après les travaux de Vara Prasad et coll.¹⁸⁴ (Schéma IV-39) nous savions que nous obtiendrions un mélange de deux isomères. Ils synthétisent des 2-aminobenzothiazoles par cyclisation oxydante grâce à l'action du thiocyanate de sodium (NaSCN) en présence de Br₂. Cependant nous pensions que le rendement serait meilleur et que surtout le rapport des deux isomères serait en faveur du composé désiré.



Rapport (81a):(81b)= 4/1

Schéma IV-39

Downer et coll.¹⁸⁵ proposent un mécanisme de réaction pour la cyclisation de Jacobson présentée ci-dessous (Schéma IV-40).

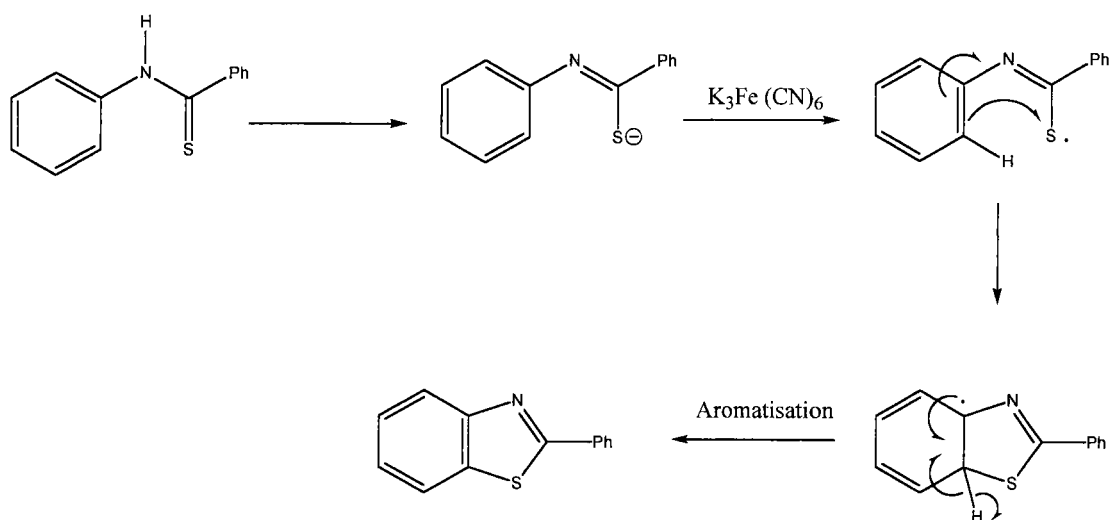


Schéma IV-40

Nous nous sommes inspirés de ce mécanisme pour essayer de trouver une explication aux résultats que nous observons (Schéma IV-41).

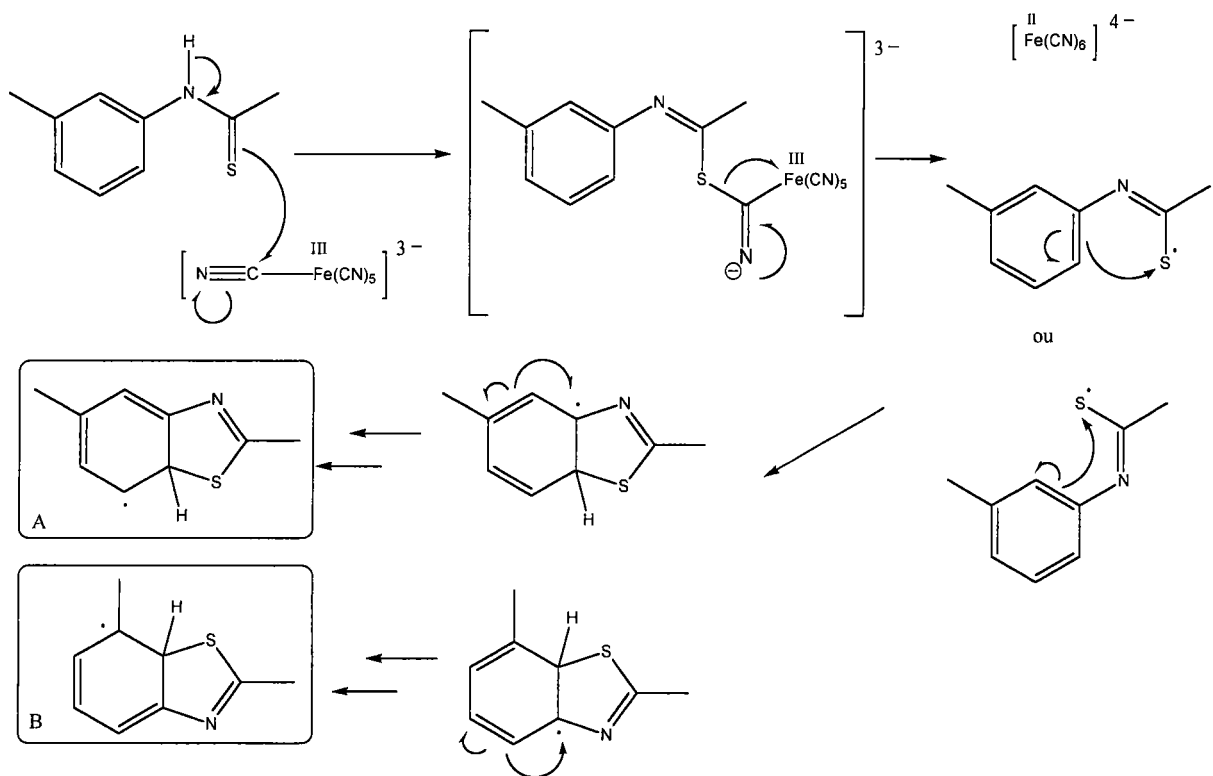


Schéma IV-41

Comme nous le constatons sur le schéma IV-41 nous pouvons penser qu'à priori nous obtenons majoritairement l'isomère **(80)** car d'après les formes mésomères le radical **(B)** est stabilisé par le groupement méthyle.

En ce qui concerne notre faible rendement, nous pouvons penser que le benzoylthioamide décrit par Downer et coll.¹⁸⁵ est sans doute plus résistant au milieu basique que l'acétylthioamide mis en jeu lors de notre réaction. En effet Jackson et coll.¹⁸⁰ montrent que dans les conditions de cyclisation de Jacobson l'acétylthioamide a tendance à se désulfurer en acétamide et celui-ci peut facilement s'hydrolyser en milieu NaOH 1,5 M à température ambiante.

Pour conclure nous pouvons dire que la cyclisation de Jacobson est mieux adaptée aux benzoylthioamide qu'aux acétylthioamides. De plus lorsque les deux positions en ortho de l'atome d'azote sont occupées par des atomes d'hydrogène la cyclisation de Jacobson n'est pas une synthèse recommandée. En effet, elle conduit à la formation de deux isomères dont la séparation par les moyens chromatographiques est particulièrement complexe, de plus, leurs proportions varient suivant la nature des groupements substituants. Enfin il faut remarquer

qu'en présence des deux oxydants ($K_3Fe(CN)_6$ ou Br_2) la réaction adopte la même régiosélectivité. La différence de proportion obtenue entre les deux isomères plutôt favorable au Br_2 pourrait être due au choix de l'oxydant lui-même.

2- 2- 3) A partir d'orthoaminothiocyanate

Compte tenu des faibles rendements et de la mauvaise orientation du benzothiazole obtenue avec la cyclisation de Jacobson nous avons décidé de synthétiser l'orthoaminothiophénol précurseur correspondant grâce aux sels de diazonium (Schéma IV-42). Les sels de diazonium font partie des réactions les plus efficaces en chimie organique.

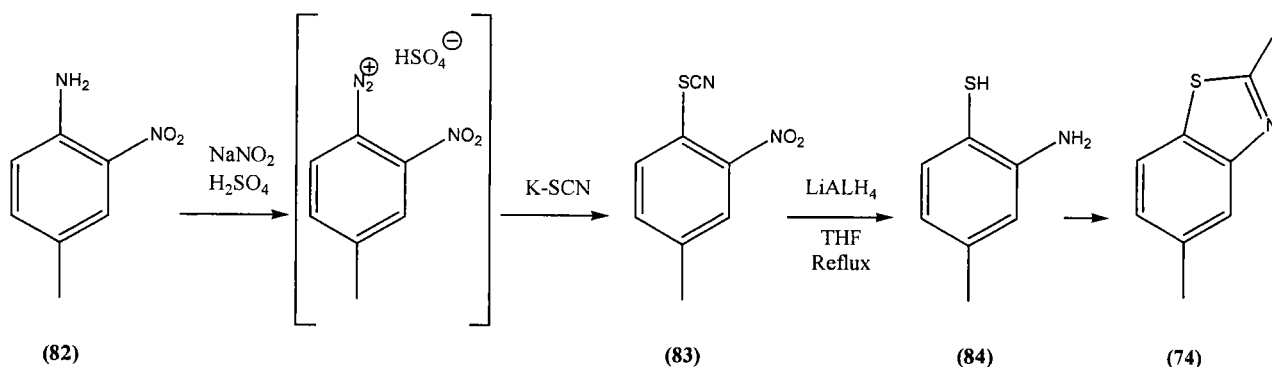


Schéma IV-42

Pour déplacer le sel de diazonium de la 4-méthyl-2-nitroaniline (**82**) et introduire l'atome de soufre sur le cycle aromatique nous avons choisi de travailler avec du thiocyanate de potassium plutôt qu'avec un xanthate. Le thiocyanate de potassium a l'avantage d'être commercial.

2- 2- 3- 1) Passage de $-SCN$ à SH et de $-NO_2$ à $-NH_2$

Bromidge et coll.¹⁸¹ obtiennent le thiophénol à partir du thiocyanate par action de l'ammoniaque à reflux dans une première étape, puis par l'action de $P(Ph)_3$ dans une seconde étape (Schéma IV-43).

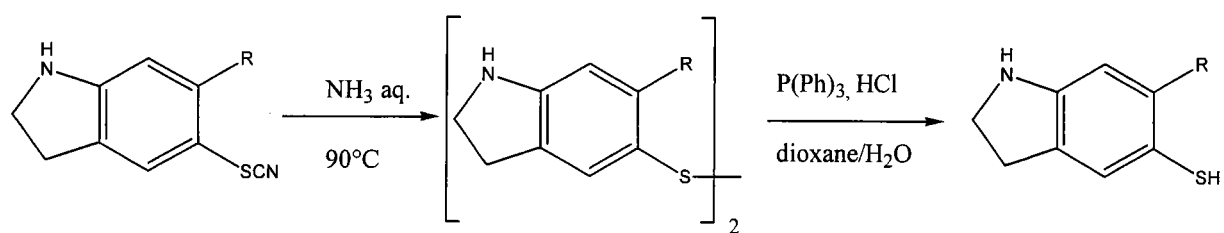


Schéma IV-43

Quant à Jendralla et coll.¹⁸⁶ ils obtiennent le thiophénol à partir du dérivé thiocyanate correspondant grâce à l'action de LiAlH_4 dans le THF à reflux (Schéma IV-44).

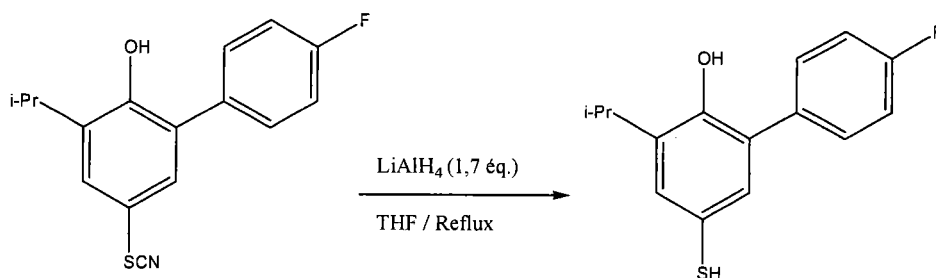


Schéma IV-44

Par ailleurs, Ekhatto et coll.¹⁸⁷ montrent que le groupement nitro d'un composé aliphatique est réduit en groupement amine par LiAlH_4 à reflux de l'éther diéthylique, les nitroarènes¹⁸⁸ sont également réduits en dérivés de l'aniline en présence de LiAlH_4 dans Et_2O .

Etant donné ces informations nous avons décidé d'atteindre directement le composé **84** par action de LiAlH_4 sur le composé **83**.

2- 2- 3- 2) Résultats

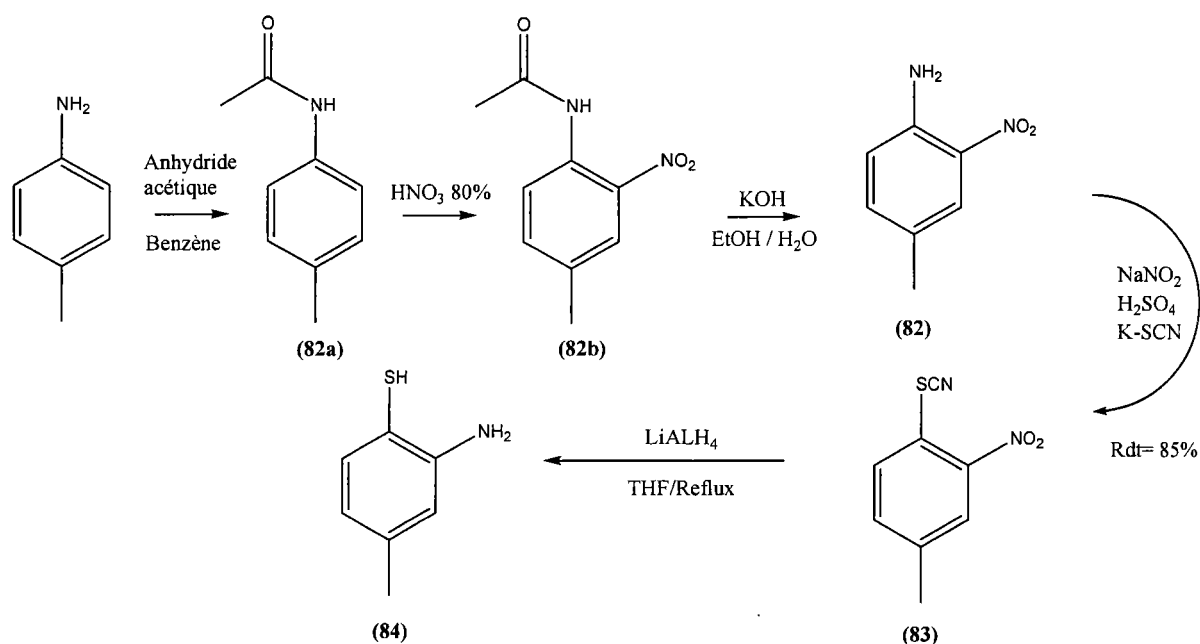


Schéma IV-45

Pour avoir les substituants positionnés comme nous le voulions sur le noyau aromatique nous avons débuté la synthèse avec de la 4-méthylaniline ou paratoluidine (Schéma IV-45).

Nous avons effectué les trois premières étapes de la synthèse comme indiquées dans la littérature¹⁸⁹ : N-acétylation (82a), nitration (82b) puis hydrolyse de l'amide. La 2-nitroparatoluidine (82) a été synthétisée à partir de la paratoluidine avec un rendement global de 57% pour les trois étapes.

La 2-nitroparatoluidine (82) est transformée en son sel de diazonium correspondant par action du nitrite de sodium (NaNO_2) en présence d'acide sulfurique (H_2SO_4). Celui-ci est mis en réaction avec du thiocyanate de potassium pour obtenir le thiocyanure (83) correspondant avec un rendement de 85%. La structure est confirmée par les techniques usuelles.

La réduction avec LiAlH_4 se fait dans le THF à reflux. Lors de notre premier essai nous n'avons pas obtenu l'aminothiophénol (84) désiré. Nous avons seulement réduit le groupement nitro et non le groupement thiocyanate, ceci étant confirmé par un spectre de masse.

Nous avons refait la réaction au reflux du THF en utilisant cette fois-ci 5 équivalents de LiAlH_4 au lieu de 1,7 pour obtenir directement le dérivé du 2-aminothiophénol. Nous avons obtenu le 2-amino-4-thiophénol (**84**) qui s'est rapidement oxydé en son disulfure correspondant. La structure est confirmée par RMN ^1H et spectre de masse. Cette oxydation pourrait être stoppée si quelques cristaux de 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylphénol sont ajoutés au thiol après son isolement.

La molécule visée (**74**) ayant été obtenue par une autre voie menée simultanément, nous n'avons pas tenté la cyclisation en benzothiazole correspondant.

2- 2- 4) Par substitution nucléophile aromatique intramoléculaire

2- 2- 4- 1) Voie de Spitulnik

Dans la suite réactionnelle précédente, nous avons vu que grâce aux sels de diazonium nous pouvions introduire un groupement thiocyanate. Or la 2-nitroparatoluidine peut également nous permettre d'appliquer la stratégie élaborée par Spitulnik¹⁷⁵ (Schéma IV-46). Celui-ci travaille avec des 2'-halogénothioacetanilide pour synthétiser des dérivés du 2-méthylbenzothiazole comme le montre le schéma ci-dessous.

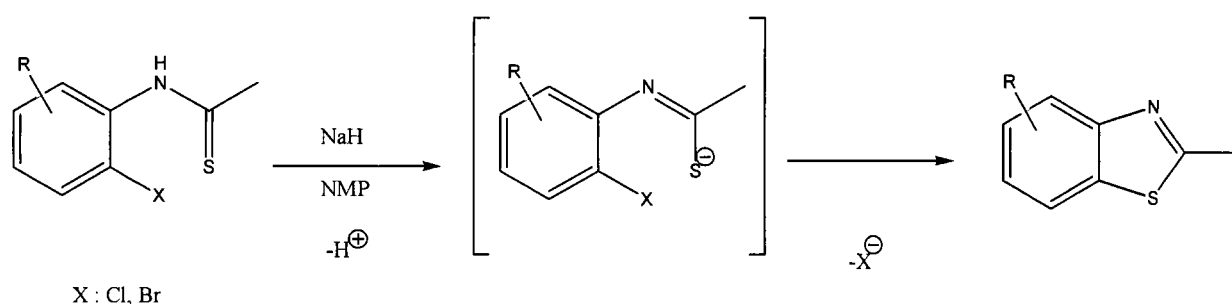


Schéma IV-46

2- 2- 4- 2) Résultats

Pour tester cette voie nous pouvons substituer le groupement amine de la 2-nitroparatoluidine par un atome d'iode en utilisant les sels de diazonium (**85**) (Réaction de Sandmeyer). Ensuite nous réduisons le groupement nitro en groupement amine (**86**), nous synthétisons l'amide (**87**)

et le thioamide (**88**) correspondant auquel nous appliquons les conditions développées par Spitulnik. Voir schéma IV-47.

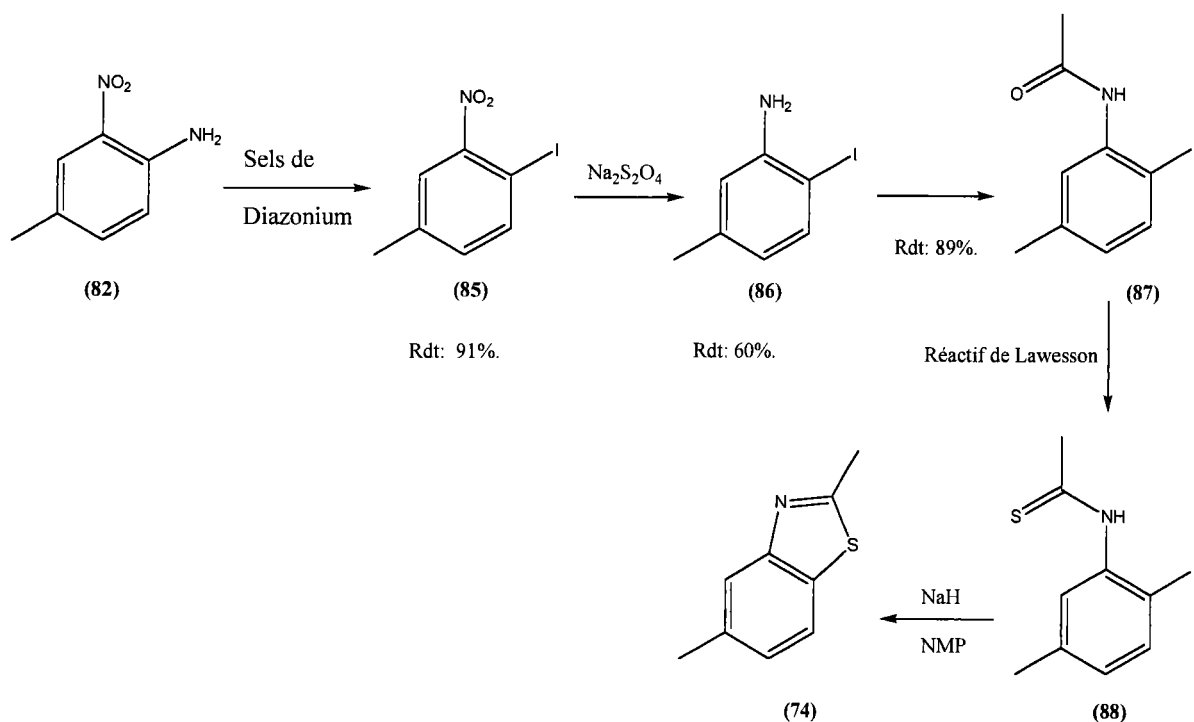


Schéma IV-47

Notre synthèse commence donc à partir de la 2-nitroparatoluidine (**82**). Tout d'abord nous utilisons les sels de diazonium pour halogéner le cycle aromatique. Nous obtenons le 4-iodo-3-nitrotoluène (**85**) avec 91% de rendement. La structure est confirmée par les méthodes analytiques usuelles.

La littérature recommande de réduire ce type de composés avec du dithionite de sodium¹⁸⁹ ou avec de l'hydrazine en présence de chlorure de fer¹⁹⁰. En effet d'autres agents de réduction, comme les métaux dans l'acide ou le palladium sur charbon, ont tendance à déhalogéner le cycle aromatique. Nous avons utilisé le dithionite de sodium comme agent de réduction. Son action donne la 2-iodométatoluidine (**86**) avec un rendement de 60%.

Ce composé (**86**) est N-acétylé par l'action du chlorure d'acétyle, et l'amide obtenu (**87**) avec un rendement de 89% est transformé en thioamide par l'action du réactif de Lawesson (RL). Lors de cette dernière étape il se forme deux produits dont aucun des spectres de masse ne correspond au thioamide attendu (**88**). En fait nous obtenons directement le 2,5-

diméthylbenzothiazole avec un rendement de 50% et un sous produit de dégradation du dérivé iodé de départ (**87**). La substitution nucléophile aromatique se décompose en deux étapes qui sont l'addition (réversible) et l'élimination. Avec les nucléophiles mous (ce qui est notre cas), l'étape cinétiquement déterminante est l'élimination. La réaction sera plus rapide lorsque la liaison C-X est la plus fragile, c'est-à-dire quand l'halogène est l'iode, ce qui est notre cas.^{191a} Ceci pourrait expliquer la cyclisation directe que nous observons. Nous pouvons imaginer que le sel de thiophosphonium issu du RL soit assez basique pour induire la substitution nucléophile aromatique. Cette méthode permet de réduire d'une étape le schéma réactionnel de Spitulnik qui nécessite l'application d'une base pour effectuer la cyclisation.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Hutchinson et coll.^{191b} qui montrent que la cyclisation des 2'-bromothioacetanilide est rendu possible par l'action du carbonate de potassium (K₂CO₃) au reflux de l'acétone. Les iodoaryles semblent être plus réactifs que les bromoaryles ou les chloroaryles vis-à-vis le nucléophile issu du thioamide.

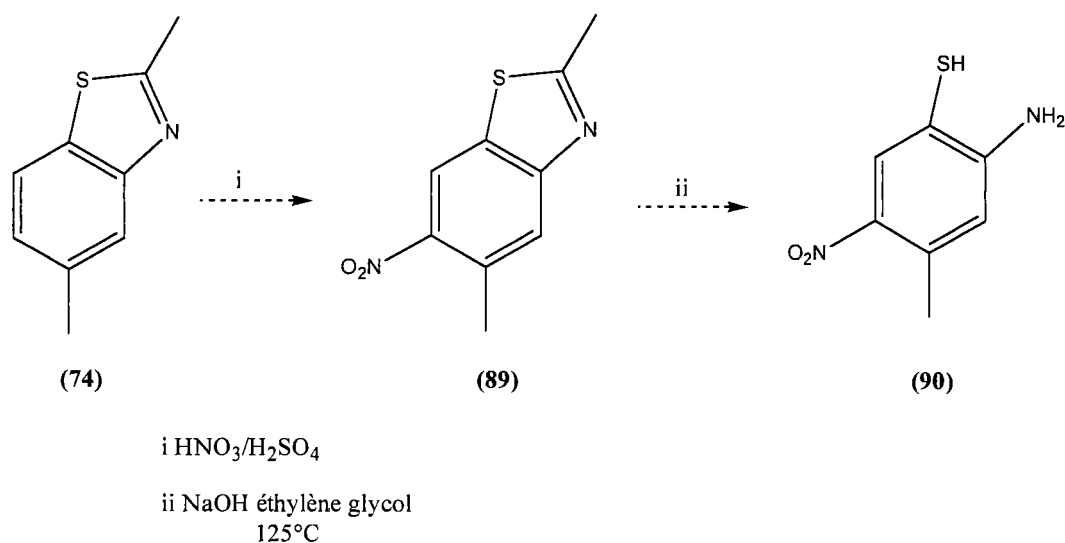
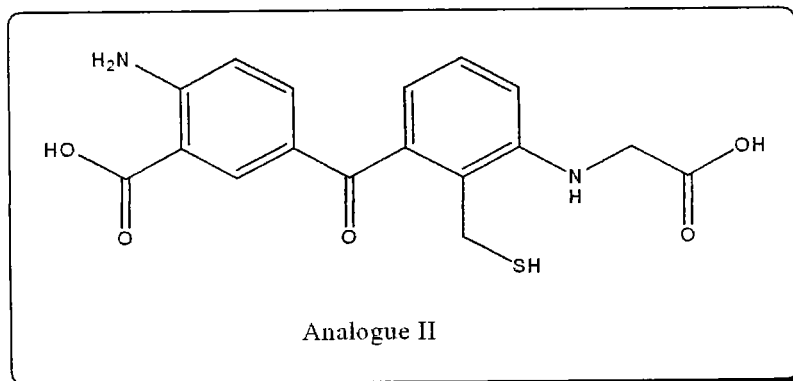
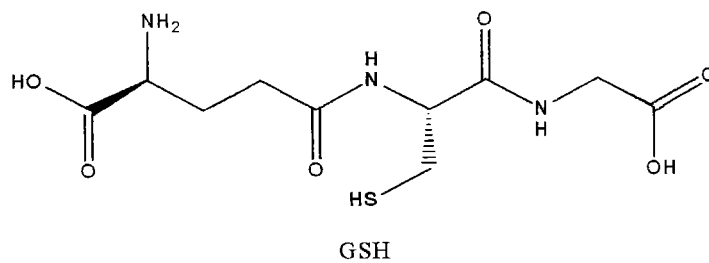


Schéma IV-48

Nous avons donc réussi à isoler avec un bon rendement le 2,5-diméthylbenzothiazole dont la nitration en position 6 (**89**) suivie de l'ouverture de l'hétérocycle (**90**) selon la méthode décrite par Van Zandt et coll.¹⁹² devrait conduire au dérivé aromatique tétra substitué sans difficulté particulière (Schéma IV-48).

Chapitre V Synthèse de l'analogue II

Nous nous sommes proposés de synthétiser la molécule ci-dessous, un analogue photoactivable isostère du GSH dont la structure est tablée sur celle de la benzophénone. Nous l'appellerons l'analogue II.



Le schéma V-1 propose une analyse rétrosynthétique montrant les différents réactifs de départ que nous pouvons choisir pour atteindre notre cible.

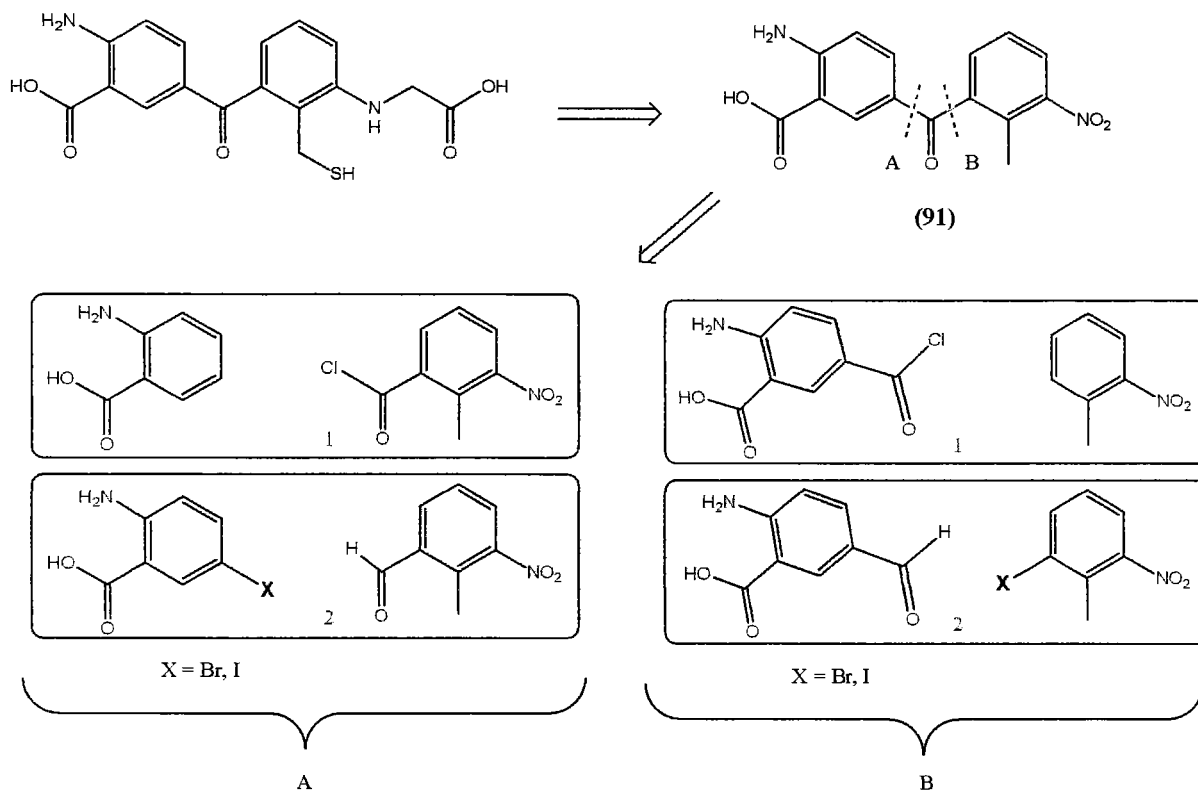


Schéma V-1

L'intermédiaire clé pour atteindre l'analogue II est la benzophénone tétrasubstituée (91). D'après le schéma rétrosynthétique ci-dessus, deux alternatives s'offrent à nous pour atteindre la molécule (91) : d'une part les acylations de type Friedel-Crafts (A1 et B1), et d'autre part les réactions de type organo-métallique (A2 et B2). Nous avons privilégié la voie A. En effet, un synthon de la voie B est un dérivé de l'acide isophtalique, et il nous a semblé difficile de différencier les fonctions acides carboxyliques au cours de la synthèse.

1- Acylation par une réaction de Friedel-Crafts

1- 1) Rappel bibliographique

L'acylation de Friedel-Crafts est une des réactions les plus connues en chimie organique¹⁹³ et elle est une des méthodes les plus importantes pour la synthèse de cétones aromatiques. Ces

cétones aromatiques peuvent être préparées à partir d'acide carboxylique en présence de composés aromatiques, les réactions étant activées par divers catalyseurs (en large excès par rapport aux autres réactifs) tels que l'acide méthane sulfonique¹⁹⁴, les catalyseurs palladiés, certains sels d'argent ou les zéolites¹⁹⁵. Ces acylations aromatiques sont surtout conduites avec des anhydrides d'acide ou des chlorures d'acide^{196, 197} en présence d'acide de Lewis (au minimum un équivalent). D'autres réactifs tels que le trichlorométhylbenzène^{198, 199} ou le benzoate de méthyle²⁰⁰ permettent la benzylation de composés aromatiques. Les différentes conditions qui émergent au fil de la littérature essaient surtout de rendre ce processus d'acylation propre vis-à-vis de l'environnement en mettant l'accent sur l'utilisation de catalyseurs en quantité catalytique^{201, 202, 203, 204}. La synthèse des benzophénones utilisant les conditions de la réaction de Friedel-Crafts est elle aussi bien documentée et nous avons essayé de nous en inspirer.

Notre choix s'est arrêté sur les travaux de Olah et coll.¹⁹⁶ et sur ceux de Hwang et coll.²⁰⁰. Les premiers utilisent des conditions classiques: chlorure d'acide et acide de Lewis en quantité stoechiométrique, les seconds font réagir un ester méthylique en présence d'acide trifluorométhanesulfonique (CF₃SO₃H).

1- 2) Résultats

1- 2- 1) En présence d'AlCl₃

Nous avons essayé de la synthétiser en testant les conditions classiques faisant appel aux acides de Lewis utilisés en quantité stoechiométrique. Notre stratégie de synthèse est décrite sur le schéma V-2.

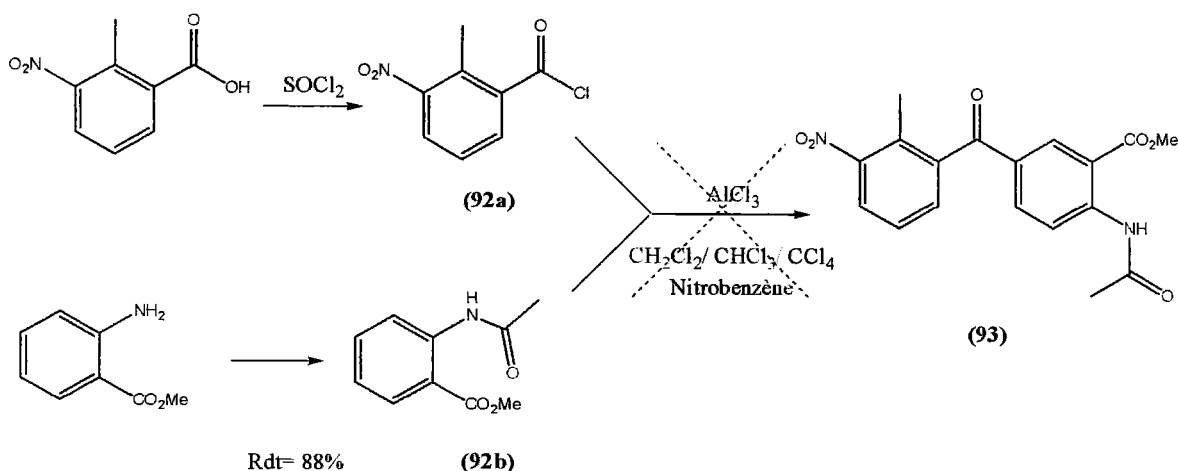


Schéma V-2

1- 2- 2) Résultats

Nos réactifs de départ sont le chlorure d'acide de l'acide 2-méthyl-3-nitrobenzoïque (**92a**) et le N-acétylanthranilate de méthyle (**92b**) obtenu avec un rendement de 88% après acétylation de l'antranilate de méthyle.

Nos premiers essais de réaction de Friedel-Crafts ont été faits dans le dichlorométhane (CH_2Cl_2). L'acide de Lewis utilisé est le chlorure d'aluminium (AlCl_3). A température ambiante aucune réaction ne se produit.

Nous avons donc décidé de changer de solvant et d'effectuer les essais de réaction dans le chloroforme (CHCl_3) pour avoir un solvant avec un point d'ébullition plus élevé. Ici encore les différents essais au reflux de CHCl_3 n'ont pas conduit au dérivé de la benzophénone ciblé. Dans ce cas ci les réactifs ne se dégradent pas mas ne réagissent pas entre eux.

Ensuite nous sommes passés de CHCl_3 au tétrachlorure de carbone (CCl_4). Le problème rencontré dans ces conditions est le fait que le synthon (**91**) n'est pas entièrement solubilisé. Nos différents essais au reflux de CCl_4 ne nous ont pas permis de solubiliser le synthon (**91**) et nous n'avons pas obtenu le produit désiré.

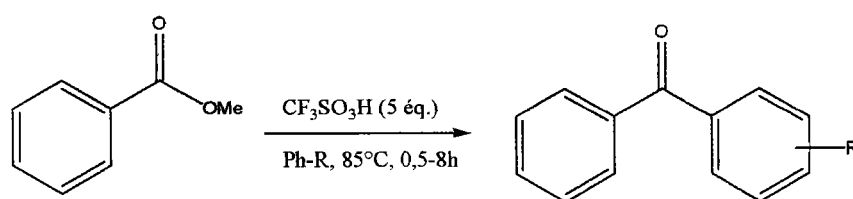
Pour contourner le problème de solubilité nous avons choisi de conduire la réaction dans le nitrobenzène. Ce solvant solubilise chaque réactif. De plus, comme son point d'ébullition est élevé la réaction a pu être menée à une température de 110°C. En fait le dérivé de l'antranilate de méthyle se dégrada, le groupement acétyle n'a pas supporté les conditions de réaction.

Notre dernière tentative a consisté à augmenter la quantité d'acide de Lewis dans le CH_2Cl_2 . L'ajout de deux autres équivalents de chlorure d'aluminium ne permet pas non plus d'atteindre le dérivé de la benzophénone. Cette modification tend à dégrader les réactifs de départ. Après traitement du milieu réactionnel, nous récupérons les réactifs de départ en mélange avec de nombreux sous-produits non identifiés.

Pour conclure nous pouvons dire que les réactions conduites en présence d' AlCl_3 ne nous ont pas permis d'atteindre le dérivé de la benzophénone ciblé. Les produits décrits dans la littérature sont souvent peu fonctionnalisés. Par expérience nous nous sommes rendu compte que les conditions drastiques de synthèse sont fatales aux groupements fonctionnels.

1- 3- 1) En présence de $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$

Les essais que nous allons présenter dans ce paragraphe ont été faits d'après les conditions proposées par Hwang et coll.²⁰⁰. Les auteurs utilisent comme agent d'acylation l'ester méthylique de l'acide benzoïque et le catalyseur est $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$. Les substrats sont des dérivés du benzène avec le cycle aromatique enrichi ou appauvri tels que le montre le schéma V-3 ci-dessous.



R : H, Cl, F, Me, OMe, CF_3 , NO_2 , etc.

Schéma V-3

Pour cette nouvelle synthèse un de nos réactifs de départ n'est plus le chlorure d'acide de l'acide 2-méthyl-3-nitrobenzoïque mais son ester méthylique.

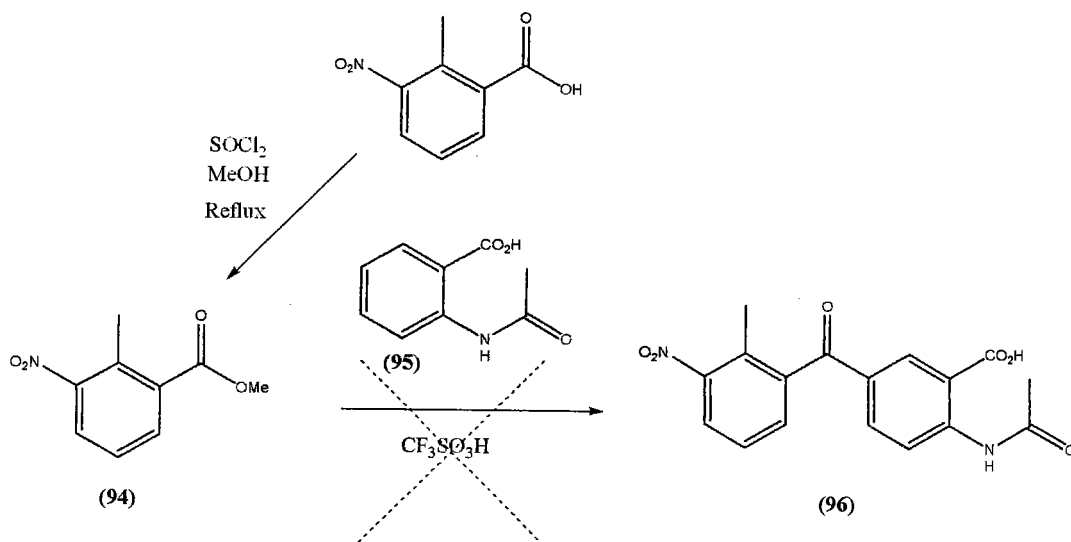


Schéma V-4

1- 3- 2) Résultats

Le 2-méthyl-3-nitrobenzoate de méthyle (94) est synthétisé de manière classique en faisant réagir l'acide correspondant dans le méthanol à reflux en présence de SOCl_2 . L'autre réactif de départ est le dérivé N-acétylé de l'acide anthranilique (95) et celui-ci a été préparé de la même manière que le dérivé N-acétylé de l'anthranilate de méthyle (92b). Les deux réactifs solides sont broyés et mélangés intimement, à ce mélange est ajouté l'acide triflique ($\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$) (Schéma V-4).

Après plusieurs essais, le produit ciblé n'est toujours pas obtenu. Après traitement nous récupérons l'ester de départ, à l'inverse l'acide s'est dégradé. La fonction amide est sans doute trop fragile dans ces conditions et hydrolysée par le $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$.

Par ailleurs, tous nos réactifs sauf l'acide triflique sont solides à 85 °C, température de la réaction. Cette hétérogénéité de la réaction, en plus de la fragilité de la fonction amide, ne nous ont pas permis d'atteindre le dérivé de la benzophénone par cette voie.

A ce stade de nos recherches nous avons décidé d'abandonner les voies mettant en jeu la réaction d'acylation qui n'a pas donné de résultats concluants. Pour atteindre des dérivés polyfonctionnalisés de la benzophénone, nous nous sommes orientés vers les réactions organo-métalliques.

2- A partir des organo-magnésiens

2- 1) Rappel bibliographique

Knochel et son équipe ont mis au point des conditions de réactions où les magnésiens réagissent avec des aldéhydes et laissent intacts de nombreux autres groupements fonctionnels tels que les esters, les amides, les nitriles²⁰⁵. En effet Knochel et son équipe ont publié de nombreux articles^{206, 207, 208, 209, 210, 211, 212} à propos de l'échange magnésium-iode ou magnésium-brome. L'idée a été non pas de faire l'échange entre le produit halogéné et le magnésium métal directement, mais de faire cet échange avec le dérivé iodé et un réactif de Grignard tel que le bromure d'isopropylmagnésium, une transmétallation en sorte. Les réactifs iodés ont été les plus cités car l'échange iode-magnésium se fait plus facilement que l'échange brome-magnésium. Il faut cependant noter que Knochel et coll.²¹³ ont mis au point des conditions qui rendent ce dernier échange possible dans des conditions moins drastiques que celles usuelles grâce à l'ajout de chlorure de lithium (LiCl). Leurs travaux montrent que l'échange halogène-magnésium peut ainsi se faire entre -20°C et -30°C. A ces températures ces réactifs de Grignard sont donc inertes vis-à-vis des groupements fonctionnels tels que les esters ou encore les amides. Cette approche a ouvert la voie de la synthèse de réactifs de Grignard polyfonctionnalisés, ce qui était interdit avec les anciennes conditions. Bien sûr d'autres groupes que celui de Knochel travaillent sur les organo-métalliques mais les travaux de Knochel semblent vraiment appropriés à notre cible.

Voici dans le schéma V-5 quelques exemples de produits synthétisés par Knochel et son équipe.

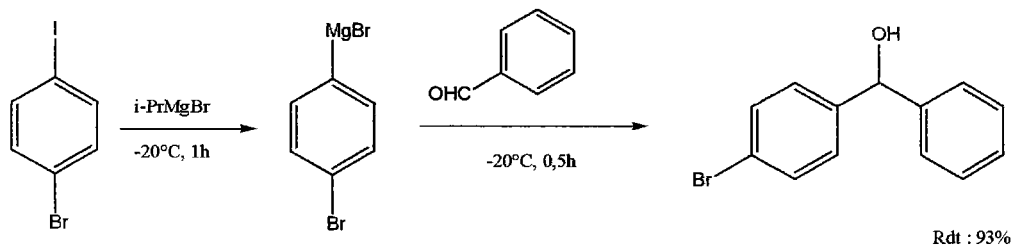
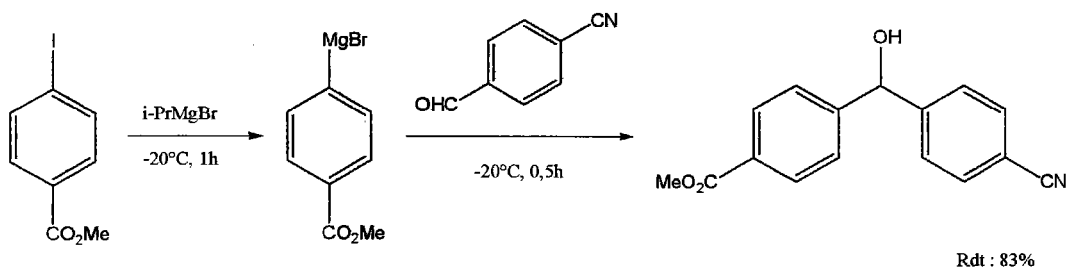
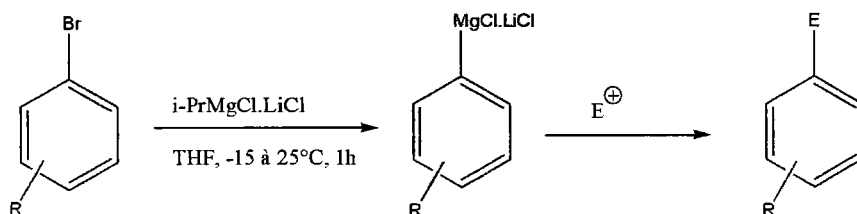


Schéma V-5

Ce dernier exemple (Schéma V-6) montre les conditions développées pour catalyser l'échange brome-magnésium.



R : F, Cl, Br, CN, CO₂R, OMe

Schéma V-6

2- 2) Synthèse des synthons

Sur la figure ci-dessous (Figure V-1) sont indiqués nos synthons de départ

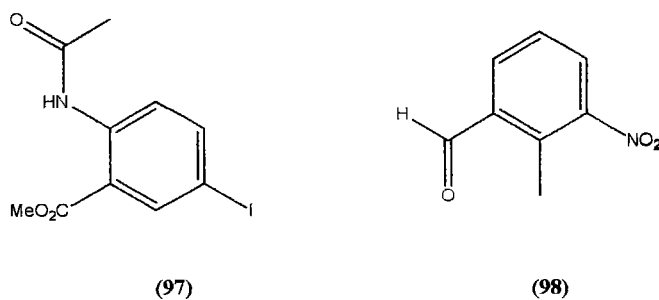


Figure V-1 Synthons ciblés

Afin de tester les conditions développées par Knochel et coll. il nous fallait d'abord synthétiser un halogénure d'aryle **(97)** et un aldéhyde **(98)**. Etant donné que les dérivés bromés ne sont pas toujours très réactifs vis-à-vis les organo-magnésiens même si Knochel et coll. ont réussi à résoudre ce problème, nous avons opté pour les dérivés iodés plus réactifs et plus largement décrits.

2- 2- 1) Synthèse du N-acétyl-4-iodoantranilate de méthyle

Ci-dessous (Schéma V-7) la synthèse que nous proposons.

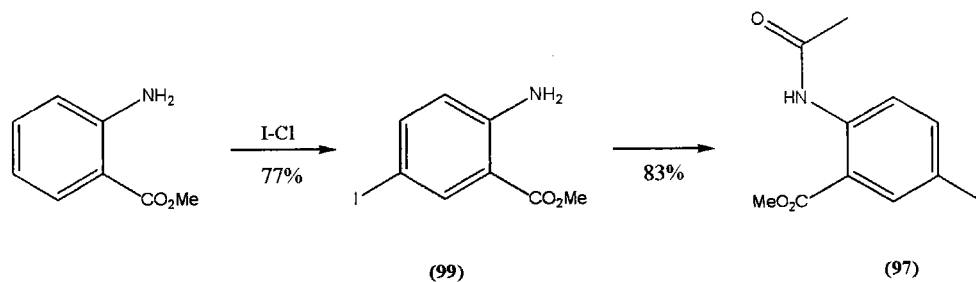


Schéma V-7

Notre première idée pour atteindre le composé **(97)** était de ioder l'acide anthranilique en position para du groupement amine, puis estérifier et acétyler ce produit. Cette synthèse a été bloquée car nous n'avons pas pu estérifier l'acide 5-iodoantranilique dans les conditions classiques d'estérification.

Nous avons donc commencé la synthèse avec de l'antranilate de méthyle que nous avons iodé en utilisant un protocole proposé par Wallingford et coll.²¹⁴. L'agent de iodation est le monochlorure d'iode (I-Cl).

Le produit (**99**), caractérisé par les techniques spectroscopiques usuelles et obtenu avec un rendement de 77% est acétylé de la même manière que l'anthranilate de méthyle. Le produit désiré (**97**) est obtenu avec un rendement de 83% et est caractérisé par RMN¹H, RMN¹³C et GCMS.

2- 2- 2) Synthèse de l'aldéhyde 2-méthyl-3-nitrobenzoïque

En suite il nous restait à synthétiser l'aldéhyde. Nous nous sommes inspirés des travaux de Zhu et coll.²¹⁵ et de Chakraborty et coll.²¹⁶. Ces deux équipes ont quasiment la même stratégie. Ils démarrent d'un dérivé de l'acide benzoïque et en font l'ester méthylique correspondant. De cet ester ils font un alcool. La seule différence est que les premiers²¹⁵ utilisent les hydrures d'aluminium-lithium (LiAlH₄) et les seconds²¹⁶ l'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL-H) comme agent de réduction. Enfin ils atteignent l'aldéhyde en utilisant comme agent d'oxydation le P.C.C. (chlorochromate de pyridinium) (Schéma V-8).

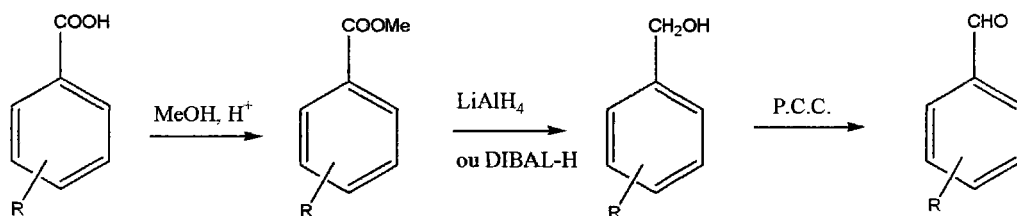


Schéma V-8

Notre synthèse inspirée des travaux mentionnés ci-dessus est représentée dans le schéma ci-dessous (Schéma V-9).

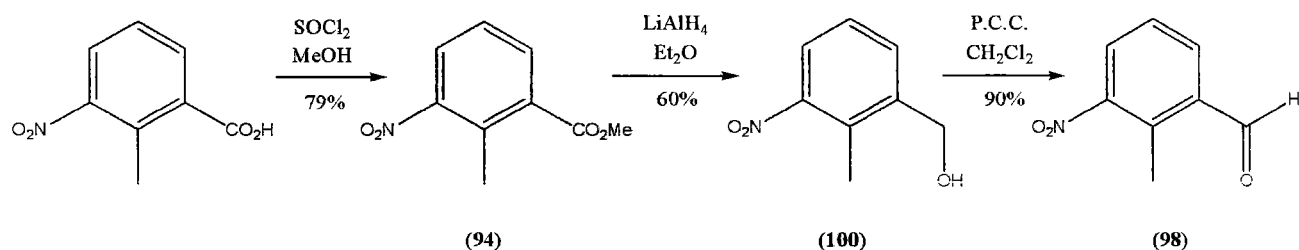


Schéma V-9

La matière première est l'acide 2-méthyl-3-nitrobenzoïque. Celui-ci est transformé en son ester méthylique (**94**) comme nous l'avons mentionné précédemment. Nous avons décidé d'atteindre l'alcool (**100**) en réduisant l'ester avec LiAlH_4 malgré la présence du groupement $-\text{NO}_2$.

Nous avons conduit la réduction avec LiAlH_4 dans l'éther diéthylique à 0°C bien que les travaux de Ekhatto et coll.¹⁸⁸ montrent que la réduction d'un groupement $-\text{NO}_2$ aliphatique en groupement $-\text{NH}_2$ amine en présence LiAlH_4 à reflux d'éther diéthylique est possible. Dans nos conditions le groupement nitro n'est pas réduit en amine et nous obtenons l'alcool ciblé (**100**) avec un rendement de 60%. Celui-ci en solution dans le dichlorométhane est oxydé en aldéhyde (**98**) avec du P.C.C. fraîchement préparé et ceci avec un rendement de 90%.

Ces trois étapes nous conduisent à notre second synthon (**98**). Celui-ci est caractérisé par RMN ^1H , ^{13}C et GC-MS.

2- 3) Réaction entre le magnésien du N-acétyl-4-iodoanthranilate de méthyle et l'aldéhyde 2-méthyl-3-nitrobenzoïque

Les groupements nitro sont connus pour réagir avec les magnésiens. Or Knochel²¹⁷ et son équipe montrent qu'il est possible de faire un réactif de Grignard possédant un groupement nitro sans dégradation de celui-ci (Schéma V-10). La réaction est conduite à -40°C et l'agent d'échange halogène-magnésium est le chlorure de phénylmagnésium. La seule contrainte est que l'halogène et le groupement nitro doivent être en ortho l'un de l'autre sur le cycle aromatique. De plus les travaux de Ottl et coll.²¹⁸ et ceux de Chang et coll.²¹⁹ (Schéma V-11), montrent que la fonction aldéhyde est plus réactive qu'un groupement nitro et ceci à basse température et même à température ambiante.

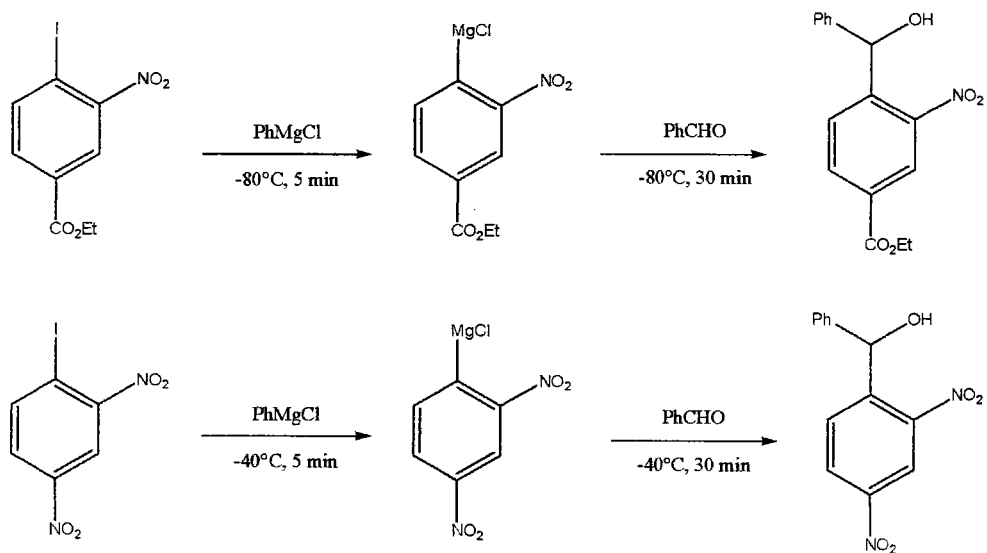


Schéma V-10

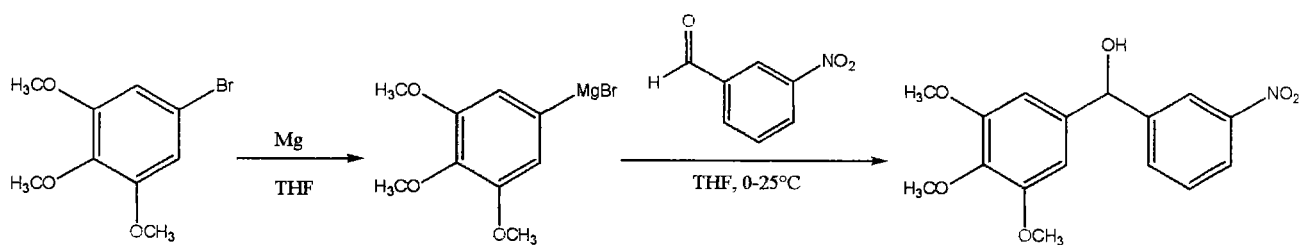


Schéma V-11

Nous avons donc mis en réaction les synthons **(97)** et **(98)** dans les conditions développées par Knochel et son équipe (Schéma V-12).

Résultats

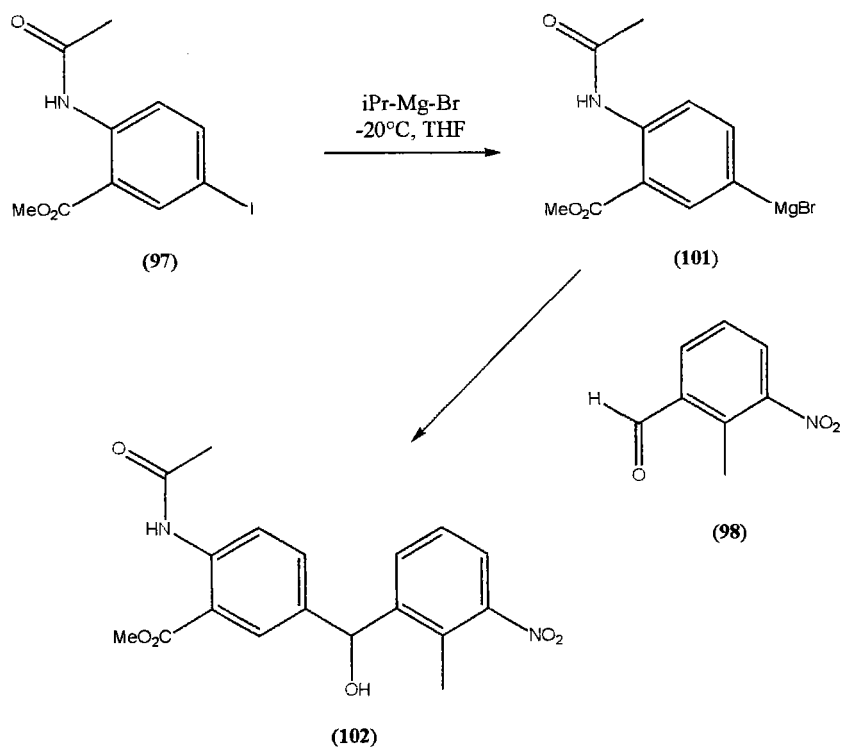


Schéma V-12

Après traitement classique du milieu réactionnel, nous obtenons le produit désiré **(102)** avec un rendement modeste de 15%. La structure est confirmée par RMN ¹H et RMN ¹³C. Nous n'avons pas effectué d'autres essais afin d'optimiser la réaction. Il nous reste à oxyder l'alcool en cétone pour atteindre le premier intermédiaire important **(91)** (Figure V-2) de notre synthèse. Cette oxydation pourra être effectuée soit en présence de bioxyde de manganèse, soit en présence de PDC, soit en présence de permanganate de potassium.

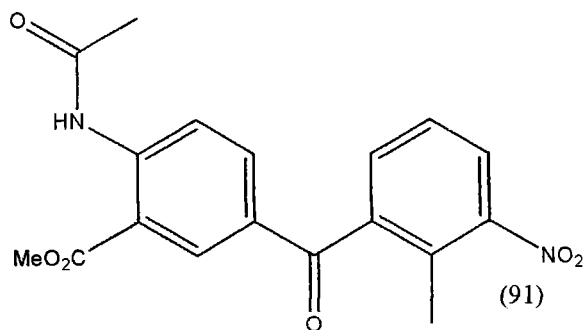


Figure V-2 Intermédiaire 91

Les différents essais pour atteindre le composé **91** par oxydation du composé **102** sont actuellement étudiés.

Chapitre VI Evaluation de quelques analogues photoactivables du glutathion sur le système enzymatique lié au glutathion

Ce chapitre présente les résultats enregistrés au cours des essais enzymatiques et de photoactivation de quelques uns de nos analogues de synthèse du glutathion afin de mettre en évidence :

- leur propriété d'agent inhibiteur permettant ainsi de sensibiliser les cellules tumorales en diminuant leur résistance aux anticancéreux.

- leur capacité à interagir avec le système du glutathion après une irradiation UV pour servir de sonde susceptible de préciser l'activité du glutathion lors du processus apoptotique.

1) Essais enzymatiques avec des analogues du GSSG

Les premiers essais ont été effectués sur la glutathion réductase (GR) avec les molécules **41**, **47** et **52** (Figure VI-1).

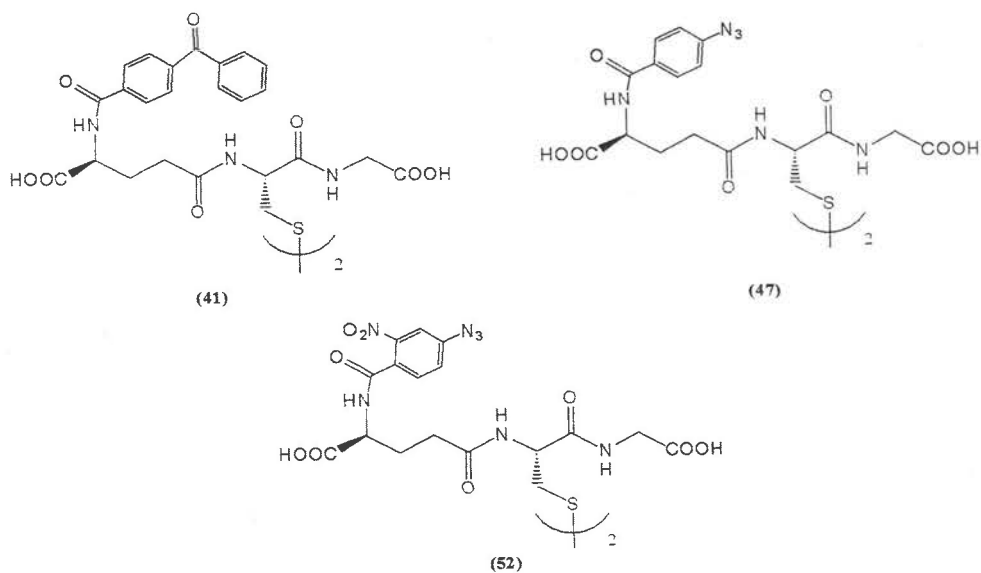


Figure VI-1 Analogues photoactivables du GSSG utilisés lors des tests enzymatiques

Tout d'abord l'enzyme ciblée est de la GR de levure purifiée (Figure VI-2). Les molécules **41** et **47** inhibent l'activité GR de 10 et 20% à une concentration de 1 mM, alors que l'analogue **52** inhibe l'activité GR d'environ 30% et ceci à une concentration de 0,2 mM (200 μ M) seulement.

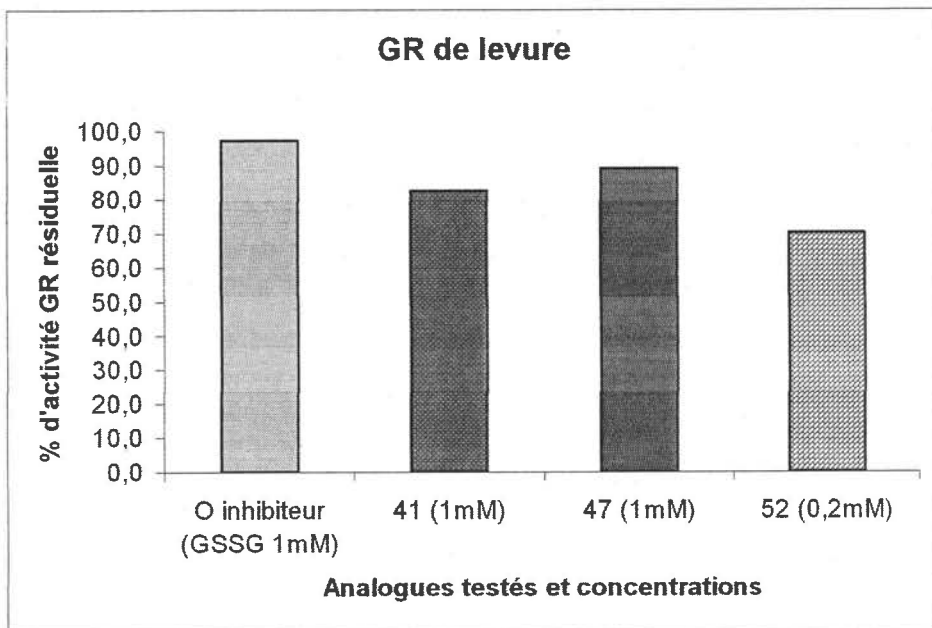


Figure VI-2 Effet de différents analogues du GSSG sur la GR de levure

D'autres expériences (non détaillées ici) montrent que l'analogue 52 n'est pas un substrat de la GR.

Au terme de ces expériences seul l'analogue 52 semble être un inhibiteur intéressant de la GR de levure. Une mesure de l'activité GR d'un homogénat cellulaire de la lignée d'adénocarcinomes mammaires humains MCF-7 (Figure VI-3) a été réalisée en présence de différentes concentrations de l'analogue 52. T représente l'expérience témoin mené sans 52 et avec une concentration en GSSG de 1 mM. L'inhibition est fonction de la concentration en 52 et la concentration correspondant à 50% d'inhibition (IC_{50}) est de l'ordre de 0,1 mM.

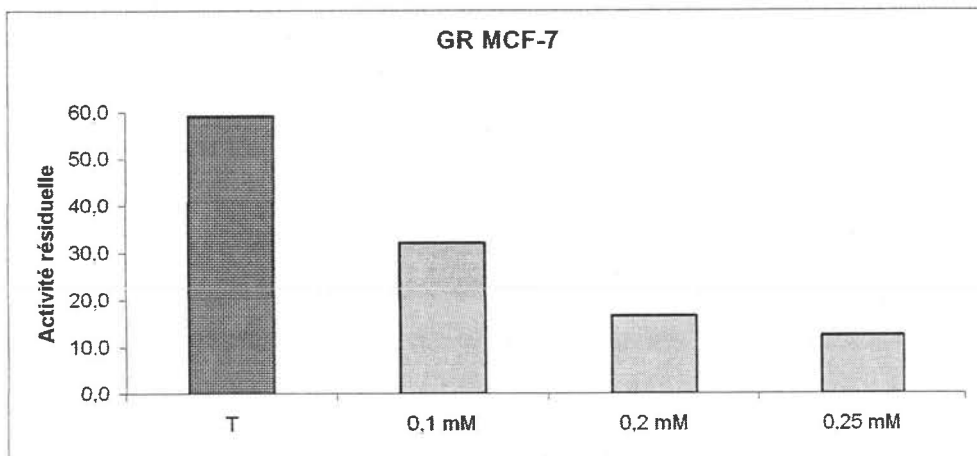


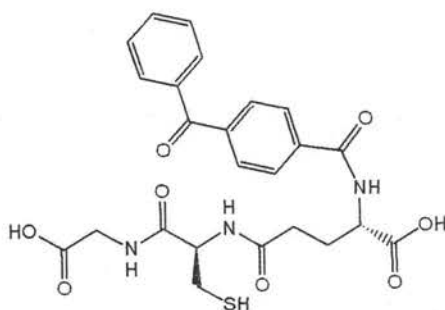
Figure VI-3 Essais d'inhibition de la GR des cellules MCF-7 en présence de différentes concentrations en analogue **52**

Les perspectives concernant l'analogue **52** sont de caractériser le plus finement possible son action sur la lignée cellulaire d'adénocarcinomes mammaires humaines MCF-7. Rappelons que la GR permet la réduction du GSSG en GSH qui est impliqué dans la formation des déoxyribonucléotides et par conséquent dans la prolifération des cellules. De ce fait, l'inhibition de cette enzyme dans les cellules tumorales peut conduire à un arrêt de la prolifération cellulaire¹³ ce qui pourrait constituer à long terme une stratégie thérapeutique.

2) Essais enzymatiques et essais de photoactivation avec un analogue du GSH N-substitué

2- 1) Essais enzymatiques

Une autre série de tests a été effectuée avec l'analogue **53** (N-(4-(benzoyl)benzoyl)glutathion) (Figure VI-4).



(53)

Figure VI-4 Analogue photoactivable du GSH utilisé lors des tests enzymatiques et de photoactivation

Les premiers essais d'inhibition ont été effectués sur de la GST P₁₋₁ (de la classe des GST π) purifiée humaine et sur de la GST purifiée de foie de rat. A une concentration de 0,5 mM de **53** l'activité résiduelle des deux enzymes est encore aux environs de 85%. Ce composé est donc un mauvais inhibiteur des GST.

Des expériences complémentaires ont montré que ce composé n'avait aucun effet cytotoxique sur la lignée d'adénocarcinomes mammaires humaine MCF-7. Du fait de la nature hydrophile du GSH, les conjugués au GSH traversent difficilement la membrane cellulaire et sont donc généralement peu cytotoxiques pour les cellules.

Les essais d'inhibition (Figure VI-5) menés en présence de l'analogue **53** sur les GR et GST des cellules MCF-7 révèlent que cet analogue n'inhibe ni la GR ni les GST de ces cellules.

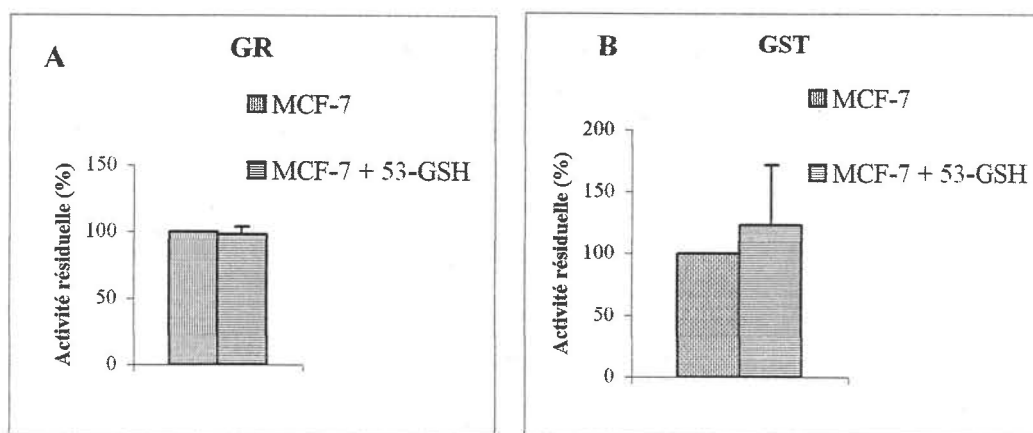


Figure VI-5 Effet du composé **53** sur les enzymes du système du glutathion dans les cellules MCF-7. Les activités ont été évaluées en présence de NBB-GSH (500 μ M) sur des homogénats cellulaires. **A.** GR, **B.** GST

L'analogue **53** ne pourra donc pas être utilisé comme inhibiteur réversible du système enzymatique lié au GSH. Nous devons vérifier s'il peut être utilisé comme sonde photoactivable.

2- 2) Essais de photoactivation

Les derniers essais ont été des essais de photoactivation de l'analogue **53** en présence de GST P₁₋₁ purifiée humaine. L'analogue **53** possède une longueur d'onde du maximal d'absorption située à 265 nm (Figure VI-6). Une irradiation UV à 365 nm montre une diminution de son maximum d'absorption à 265 nm.

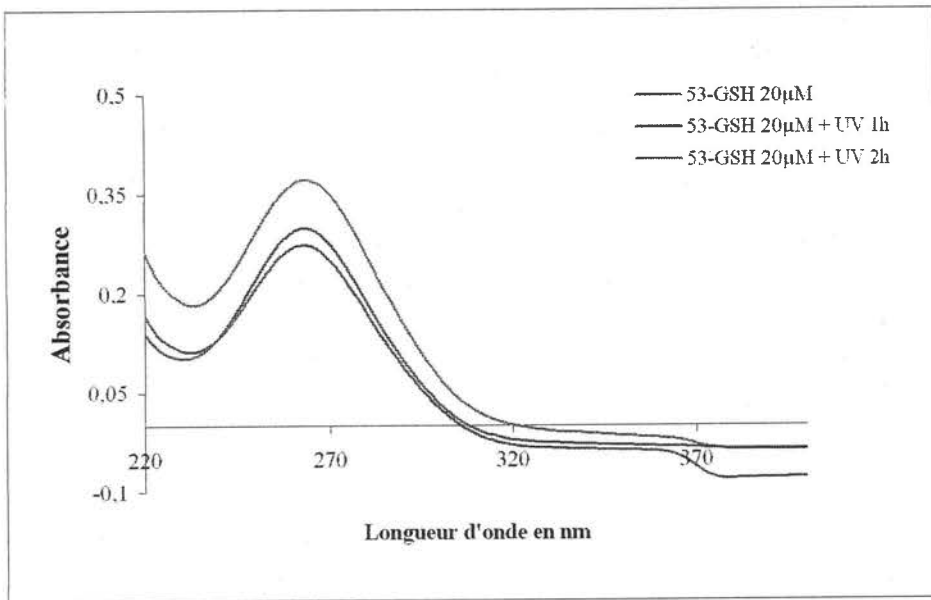


Figure VI-6 Influence d'une irradiation UV (365 nm) sur le spectre d'absorbance du composé NBB-GSH.

Après irradiation UV à 365 nm pendant une heure, une diminution de l'activité GST P₁₋₁ purifiée humaine est observée (Figure VI-7). Cette inhibition est fonction de la concentration en **53** et est strictement dépendante des UV ce qui montre le caractère photoactivable du composé.

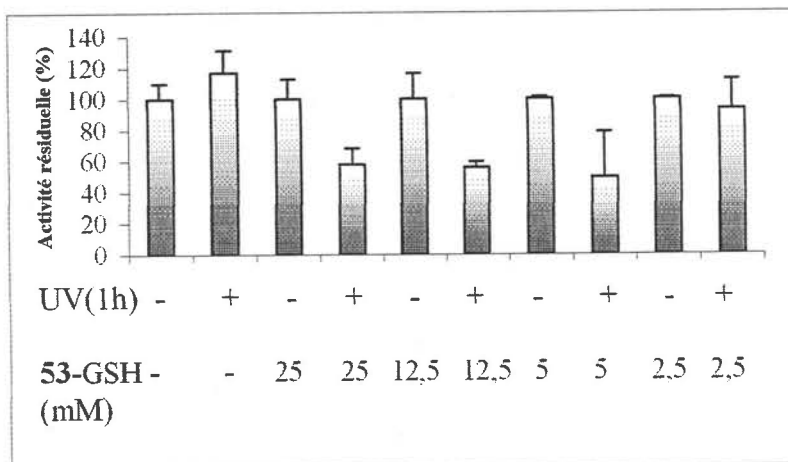


Figure VI-7 Photoactivation du composé NBB-GSH en présence de GST P₁₋₁ humaine recombinante purifiée. L'enzyme purifiée est incubée ou non en présence du composé **53** aux concentrations indiquées, en présence ou non d'UV pendant 1h, puis l'enzyme est diluée 200 fois de l'essai enzymatique.

Cet analogue du GSH est donc effectivement photoactivable et se lie de manière covalente à la GST P₁₋₁ humaine sous irradiation UV entraînant ainsi l'inactivation de cette enzyme.

Ces résultats préliminaires de photoactivation sur un modèle d'enzyme interagissant avec le GSH montre que le composé **53** est une sonde photoactivable de la GST P₁₋₁. Ceci montre bien l'intérêt de notre démarche qui devrait être extrapolée afin de mettre en évidence de nouvelles protéines interagissant avec le GSH par photoactivation de l'analogue **53** et immunomarquage de l'adduit en utilisant un anticorps anti-glutathion. Nous pourrions ainsi préciser à long terme les divers rôles du GSH au cours de l'apoptose en identifiant ses différents partenaires cellulaires et révéler des cibles potentielles pour les thérapies anticancéreuses.

Conclusion

Dans ce mémoire nous avons élaboré, en collaboration avec nos collègues biologistes, des sondes qui permettent d'évaluer leur effet sur le système enzymatique du glutathion dans les cellules tumorales et qui permettront de préciser le rôle du glutathion au cours de l'apoptose en identifiant ses différents partenaires cellulaires.

Dans un premier temps, ces travaux nous ont permis de nous sensibiliser à la technique de marquage par photoaffinité au travers d'analogues photoactivables du glutathion, ainsi qu'à l'importance du choix des groupements photoactivables requis par cette technique.

Ceci nous a conduit à synthétiser de nouveaux analogues photoactivables de l'acide 4-benzoylbenzoïque dont les longueurs d'ondes maximales d'absorption sont déplacées vers les basses énergies, mieux tolérées par les systèmes biologiques étudiés. Ces propriétés font donc d'eux de bons candidats à la conception de sondes destinées au marquage par photoaffinité.

Nous avons atteint pour la première fois des analogues photoactivables conjugués N-substitués du GSH avec deux voies de synthèse différentes. La première consiste à N-fonctionnaliser le GSSG puis à réduire le lien disulfure du composé nouvellement formé. Cependant cette voie ne s'applique pas aux analogues porteurs d'azoture d'aryle qui sont dégradés par l'agent de réduction. Pour contourner ce problème nous avons développé une seconde voie qui repose sur la protection du groupement sulfhydryle du GSH par le groupement trityle. Sa déprotection en présence de triéthylsilane ne dégrade ni le GSH, ni les azotures d'aryles. Ainsi la déprotection du GSH S-trityle N-fonctionnalisé conduit avec de bons rendements à la formation d'analogues photoactivables conjugués du GSH N-substitués par des azotures d'aryle. Cette nouvelle voie possède l'avantage d'être généralisable à d'autres motifs photoactivables.

Nous avons également réussi à améliorer le rendement de l'étape de N-fonctionnalisation du GSSG pour atteindre dans de meilleures conditions de nouveaux analogues photoactivables conjugués du GSSG. Certains de ces analogues possèdent des longueurs d'ondes maximales d'absorption parfaitement tolérées par les systèmes biologiques. Ces

propriétés font donc des ces analogues des sondes particulièrement intéressantes pour l'étude du système enzymatique du glutathion.

En parallèle à la synthèse des analogues photoactivables conjugués, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'analogues photoactivables du GSH dont un (ou plusieurs) résidu est remplacé par un groupement photoactivable.

L'essentiel de ces synthèses passent par l'élaboration de synthons aromatiques tétrasubstitué dont l'emploi en synthèse peptidique devrait conduire à la formation des analogues photoactivables souhaités.

Le chapitre IV est consacré au synthon porteur d'un groupement azoture. Sa rétrosynthèse montre le passage par un dérivé du benzothiazole. Nous avons réussi à développer à partir d'un iodure d'aryle une synthèse originale du 2,5-diméthylbenzothiazole. Le chapitre V développe une voie de synthèse d'un benzhydrol original dont l'oxydation permet d'atteindre le synthon benzophénone souhaité.

Le dernier chapitre rassemble les résultats obtenus en collaboration avec l'équipe de biologistes. Ils montrent que les divers analogues synthétisés tout au long de ce travail sont soit, inhibiteurs de certaines enzymes du système du glutathion et pourraient à plus long terme être étudiés sur des modèles animaux soit, effectivement des sondes photoactivables et pourraient être utilisés pour l'identification de nouvelles protéines interagissant avec le GSH.

Ces résultats préliminaires confortent l'intérêt de notre démarche visant à synthétiser des analogues photoactivables du glutathion.

Partie expérimentale

Températures de fusion : les points de fusion exprimés en degré Celsius (°C) sont mesurés sur un appareil binoculaire Stuart Scientific SMP3 et ne sont pas corrigés.

Spectres de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) : Les spectres RMN du proton (RMN ^1H), du carbone (RMN ^{13}C) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AC 250 (250 MHz). Les déplacements chimiques sont indiqués en parties par million (ppm); les constantes de couplage sont notées J et sont exprimées en Hz. Rappelons que les abréviations utilisées sont les suivantes: s singulet, br s sigulet large, d doublet, t triplet, q quadruplet, m multiplet. Les séquences utilisées pour les spectres de carbone 13 sont DEPT 135 pour avoir les pics des carbones quaternaires et des CH_2 en haut (positif) et les pics des carbones CH et CH_3 en bas négatif, la séquence DEPT 45 donne des spectres avec tous les pics positifs, et enfin la séquence DEPT 90 ne donne que les pics des carbones CH positifs.

Les solvants utilisés (CDCl_3 , DMSO-d_6 ou D_2O) sont indiqués entre parenthèses.

Spectres Infra-Rouges : Les spectres ont été réalisés sur un spectromètre Perkin Elmer FT-IR Baragon 1000PC equipped with a Graseby-Specac Golden Gate et sont réalisés sans pastille ni solvant.

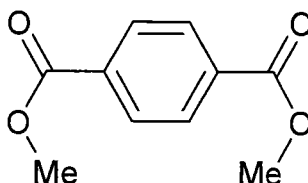
Spectres de masse : Les spectres de masse ont été réalisés sur un spectromètre Hewlett-Packard 5971 A et sur un spectromètre Agilent Technologies GC-MS en impact électronique (70 eV) après séparation par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire, notée GCMS. Les spectres de masse ont été réalisés sur un spectromètre à temps de vol MALDI-TOF Bruker Reflex IV avec la technique MALDI en mode positif avec un laser de longueur d'onde 337nm.

Spectres UV : Les spectres ont été réalisés sur un spectromètre Perkin Elmer UV/Vis Spectrometer Lambda 14.

Mode opératoire : diestérisation de l'acide téréphtalique

A 30 mmol (4,98 g) d'acide téréphtalique en solution dans 300 mL d'alcool absolu, méthanol ou éthanol, sont ajoutés à température ambiante 10 équivalents (300 mmol, 35,7 g, 21,9 mL) de chlorure de thionyle (SOCl₂). Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 8 heures. Une fois revenu à température ambiante le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans le dichlorométhane (CH₂Cl₂) et la phase organique est lavée par une solution de carbonate de sodium (2M), puis plusieurs fois à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le diester ainsi obtenu est mis en réaction sans purification particulière.

Diméthyltéréphtalate (7a)



Aspect: solide blanc.

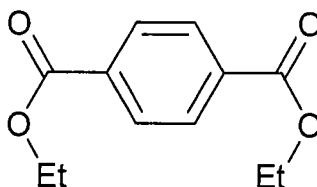
Rendement: 85%.

Point de fusion : 138-139 °C.

RMN ¹H (CDCl₃): δ_H= 8,10 (s, 4H), 3,95 (s, 6H).

GCMS : m/z (%)= 194 (22), 163 (100), 135 (20), 103 (13), 76 (9).

Diéthyltéréphtalate (7b)



Aspect: solide blanc.

Rendement: 87%.

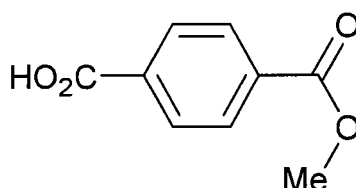
Point de fusion: 40-42 °C.

Mode opératoire : mono saponification des diesters de l'acide téréphtalique

A 1,5 mmol de diester dissous dans 4,5 mL de méthanol anhydre est ajouté 1 équivalent (1,5 mmol, 0,84 g) d'hydroxyde de potassium (KOH). Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 4 heures. Une fois revenu à température ambiante le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu repris dans 6 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite au CH_2Cl_2 pour enlever le diester n'ayant pas réagi. La phase aqueuse est acidifiée avec de l'acide chlorhydrique 1M jusqu'à $\text{pH} = 2$. La phase aqueuse est alors extraite avec de l'acétate d'éthyle, puis la phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le produit est mis en solution dans du chloroforme (CHCl_3) à ébullition et filtré à chaud pour enlever le diacide formé. Le CHCl_3 est évaporé sous pression réduite pour donner le monoester méthylique.

Pour le diester éthylique, la saponification se fait à température ambiante. Après agitation du milieu réactionnel pendant 24 heures, le milieu hétérogène est filtré. Le solide obtenu est mis en solution dans de l'acide chlorhydrique 1M. Le monoester éthylique qui précipite est filtré sur büchner et lavé à l'eau.

Mono-méthyltéréphtalate (8a)

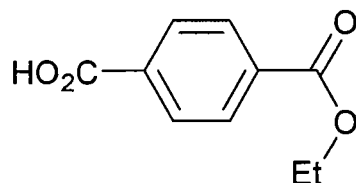


Aspect: solide blanc.

Rendement : 50%.

Point de fusion : 217-219 °C.

Mono-éthyltéréphtalate (8b)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 75%.

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 8,21-8,10$ (m, 4H), $4,47-4,38$ (q, 2H), $1,45-1,39$ (t, 3H).

RMN ^{13}C (CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 171,06, 165,87, 135,01, 134,12, 130,10, 129,45, 61,52, 14,24$.

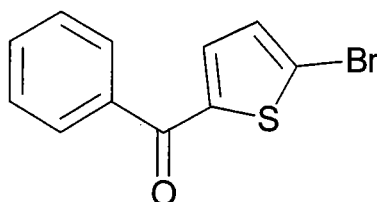
Mode opératoire : synthèse de chlorure d'acide

L'acide carboxylique (10 mmol) est mis en solution dans SOCl_2 et le mélange réactionnel est porté à reflux pendant deux heures. Une fois revenu à température ambiante le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans le benzène anhydre et celui-ci est à son tour évaporé sous pression réduite. Le chlorure d'acide obtenu est mis en réaction sans purification supplémentaire.

Mode opératoire : acylation de Friedel-Crafts appliquée aux dérivés du thiophène

A 10 mmol (1,33g) d' AlCl_3 en suspension dans 30 mL de CH_2Cl_2 à 0°C est ajouté 1 équivalent (10 mmol, 1,99 g) du chlorure d'acide du téréphtalate de méthyle en solution dans CH_2Cl_2 (5 mL). Après 10 min. d'agitation 1 équivalent (10 mmol, 0,84 g) de thiophène est ajouté en maintenant la température de la réaction inférieure à 5°C . Après deux heures d'agitation à température ambiante de l'acide tartrique 1M (20 mL) est ajouté. La phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice avec pour éluant un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane (5/95, v/v).

2-benzoyl-5-bromothiophène (5)



Aspect: solide orangé.

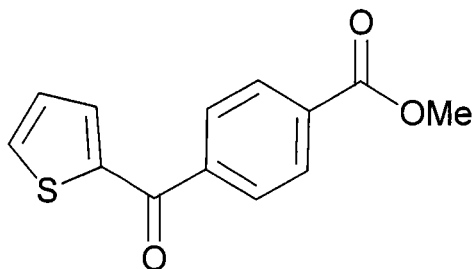
Rendement : 85 %.

Point de fusion : $54-57^\circ\text{C}$.

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 7,83-7,80$ (d, 2H), $7,63-7,56$ (m, 1H), $7,52-7,43$ (m, 2H), $7,39-7,37$ (d, 1H), $7,13-7,12$ (d, 1H).

GCMS : m/z (%) = 268 (26), 266 (25), 191 (42), 189 (43), 163 (4), 161 (4), 105 (100), 77 (56).

4-(thiophène-2-carbonyl)benzoate de méthyle (9)



Aspect: solide orangé.

Rendement : 94%.

Point de fusion : 143-146°C.

IR : $\nu = 2361, 1717$ (C=O), 1623 (C=O), $1409, 1280$ cm^{-1} .

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 8,18-8,14$ (d, 2H), $7,91-7,88$ (d, 2H), $7,77-7,65$ (d, 1H), $7,63-7,62$ (d, 1H), $7,19-7,16$ (t, 1H), $3,96$ (s, 3H).

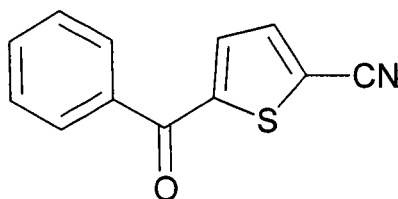
RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta_{\text{C}} = 166,22, 143,17, 141, 79, 135,15, 133,14, 129,65, 129,07, 128,13, 52,42$.

GCMS : m/z (%) = 246 (28), 231 (1), 215 (11), 187 (10), 163 (12), 111 (100), 83 (7).

Mode opératoire : synthèse du composé 6

A 11,2 mmol (2,99 g) de 2-benzoyl-5-bromothiophène en solution dans 10 mL de DMF anhydre sont ajoutés 1,45 équivalents (16,2 mmol, 1,45 g) de cyanure cuivreux (CuCN). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 5 heures. Le milieu réactionnel est versé dans une solution de chlorure de fer hydraté ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 11,23 g) dans 20 mL d'acide chlorhydrique 1,7 M. La phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée successivement par de l'acide chlorhydrique (6M), de l'eau, une solution de carbonate de sodium et de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est recristallisé dans un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane.

2-benzoyl-5-cyanothiophène (6)



Aspect: solide orangé.

Rendement : 30%.

Point de fusion : (Litt. 85-89°C).

IR : $\nu = 2338$ (C \equiv N), 1624 (C=O), 1285 cm^{-1} .

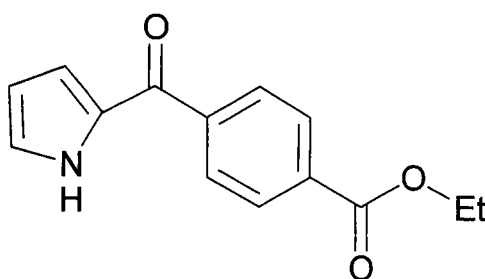
RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 7,87$ (d, 2H), 7,61 (m, 5H).

GCMS : m/z (%) = 213 (1), 105 (68), 187 (37).

Mode opératoire : acylation de Friedel-Crafts appliquée aux dérivés du pyrrole

A 10 mmol d'un dérivé du pyrrole et 1,2 équivalents (12 mmol, 1,6 g) de chlorure d'aluminium (AlCl_3) dans 15 mL de CH_2Cl_2 est ajouté goutte à goutte 1 équivalent (10 mmol, 2,12 g) du chlorure d'acide du téréphtalate d'éthyle en solution dans du CH_2Cl_2 (15 mL). Après 30 minutes d'agitation sont ajoutés 15 mL d'une solution saturée de NaHCO_3 . La phase aqueuse est extraite avec du CHCl_3 et ensuite les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium et évaporées sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice avec pour éluant un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane (5/95, v/v).

4-(1*H*-Pyrrole-2-carbonyl)-benzoate d'éthyle (10)



Aspect: solide grisâtre.

Rendement : 17%.

Point de fusion : 79-82°C.

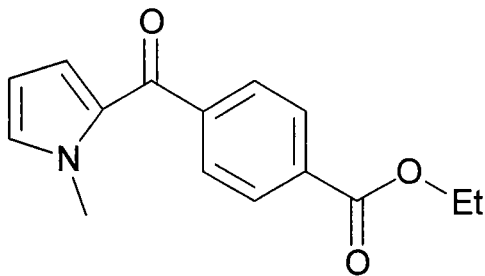
$R_f = 0,59$ (AcOEt/Cyclohexane, 1/4, v/v).

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 9,76$ (br, 1H), 8,17-8,14 (d, 2H), 7,95-7,92 (d, 2H), 7,19 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 4,47-4,38 (q, 2H), 1,45-1,40 (t, 3H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta_{\text{C}} = 183,95$, 165,93, 141,93, 133,18, 130,95, 130,06, 129,51, 119,86, 111,36, 61,35, 14,29.

GCMS : m/z (%) = 243 (52), 214 (10), 198 (29), 170 (61), 149 (4) 94 (100), 66 (21), 45 (1).

4-(1-Méthyl-1*H*-pyrrole-2-carbonyl)-benzoate d'éthyle (11)



Aspect: solide grisâtre.

Rendement : 23%.

Point de fusion : 67-69°C.

$R_f = 0,35$ (AcOEt/Cyclohexane, 1/4, v/v).

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 8,14-8,11$ (d, 2H), 7,84-7,81 (d, 2H), 6,95 (s, 1H), 6,71-6,69 (s, 1H), 6,18-6,15 (s, 1H), 4,46-4,37 (q, 2H), 4,05 (s, 3H), 1,45-1,39 (t, 3H).

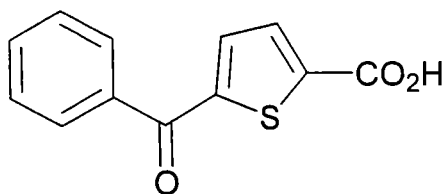
RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta_{\text{C}} = 165,31, 135,76, 130,42, 130,95, 128,82, 123,27, 108,39, 61,23, 37,41, 14,19$.

GCMS : m/z (%) = 257 (37), 228 (49), 212 (37), 184 (100), 108 (47).

Mode opératoire : synthèse du composé 1

0,35 mmol (74 mg) de 2-benzoyl-5-cyanothiophène est mise en suspension dans 6 mL d'acide sulfurique à 10%. Le milieu réactionnel sous argon est porté à reflux pendant 48 heures. Ensuite le milieu réactionnel est saturé avec NaCl et la phase aqueuse extraite avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, lavée à l'eau et distillée sous pression réduite. Le solide obtenu sera mis en réaction sans purification supplémentaire.

Acide 5-benzoylthiophène-2-carboxylique (1)



Aspect: solide beige.

Rendement : 98%.

Point de fusion : 170-172°C (Litt. 176-177°C). US patent 5,627,198.

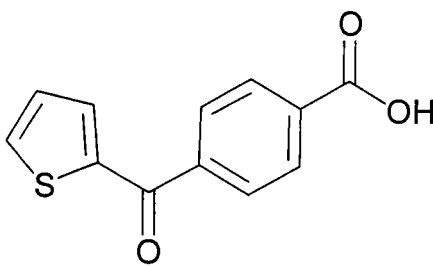
RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 7,90-7,88$ (m, 3H), 7,65-7,62 (m, 2H), 7,56-7,50 (m, 2H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta_{\text{C}} = 187,96, 166,30, 149,08, 138,92, 137,09, 134,42, 133,87, 133,02, 129,29, 128,63.$

Mode opératoire : saponification d'esters

A 1,2 mmol d'ester en solution dans un mélange eau/THF (1/2) sont ajoutés 5 équivalents (6 mmol, 336 mg) de KOH. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures et évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans un minimum d'eau et acidifié avec de l'acide chlorhydrique 0,5 M. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu sera mis en réaction sans purification supplémentaire.

Acide 4-(thiophène-2-carbonyl)-benzoïque (2)



Aspect: solide orangé.

Rendement : 90%.

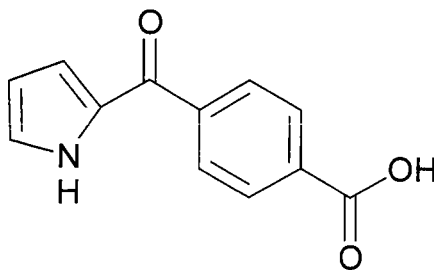
Point de fusion : 200°C (déc.).

IR : $\nu = 3100-2359$ (br, OH), 1700 (C=O), 1627 (C=O), 1413, 1278 cm^{-1} .

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 8,26-8,23$ (d, 2H), 7,96-7,92 (d, 2H), 7,79-7,77 (d, 1H), 7,64 (d, 1H), 7,19 (t, 1H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta_{\text{C}} = 185,05, 164,91, 140,80, 139,24, 133,95, 133,78, 132,22, 127,67, 127,51, 126,93.$

Acide 4-(1H-Pyrrole-2-carbonyl)-benzoïque (3)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 88%.

Point de fusion : 189-193°C.

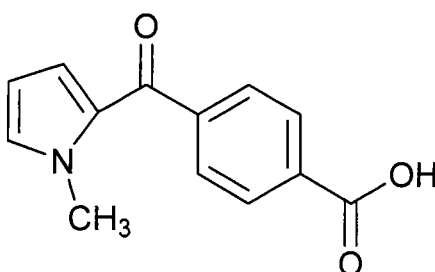
R_f = 0,15 (AcOEt/Cyclohexane, 1/4, v/v).

IR : $\nu = 3269$ (NH), 3100-2541 (br, OH), 2359, 2337, 1689 (C=O), 1618 (C=O), 1284 cm⁻¹.

RMN ¹H (CDCl₃): $\delta_{\text{H}} = 10,64$ (br, 1H), 8,11-8,08 (d, 2H), 7,86-7,83 (d, 2H), 7,12 (s, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,26 (s, 1H).

RMN ¹³C (CDCl₃) : $\delta_{\text{C}} = 183,94, 167,79, 141,99, 133,33, 130,78, 129,53, 129,53, 128,48, 119,91$.

Acide 4-(1H-1-méthyl-Pyrrole-2-carbonyl)-benzoïque (4)



Aspect: solide grisâtre.

Rendement : 91%.

Point de fusion : 192-195°C.

IR : $\nu = 3100-2541$ (br, OH), 2359, 2337, 1683 (C=O), 1621 (C=O), 1247 cm⁻¹.

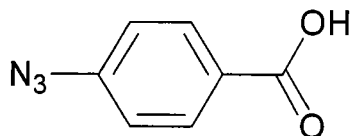
RMN ¹H (CDCl₃): $\delta_{\text{H}} = 8,21-8,18$ (d, 2H), 7,88-7,85 (d, 2H), 6,97 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,19 (s, 1H), 4,06 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃) : $\delta_{\text{C}} = 184,44, 166,97, 142,76, 133,93, 129,39, 128,83, 128,69, 128,05, 12,58, 107,78, 36,67$.

Mode opératoire : synthèse de sels de diazonium

A 20 mmol d'un dérivé de l'aniline en solution dans 11 mL d'eau distillée refroidie par un bain de glace sont ajoutés 5 mL d'acide sulfurique concentré. Ensuite 1,5 équivalents (30 mmol, 2,07 g) de nitrite de sodium (NaNO₂) en solution dans 5 mL d'eau distillée sont ajoutés goutte à goutte tout en maintenant le mélange réactionnel à une température inférieure à 5°C. Puis 1,5 équivalents (30 mmol, 1,95g) d'azoture de sodium (NaN₃) en solution dans 7 mL d'eau distillée sont ajoutés en une fois et sous forte agitation. Après ajout l'agitation est maintenue 15 minutes à température ambiante. Le milieu réactionnel est filtré sur büchner et le solide lavé abondamment à l'eau. Le solide obtenu est recristallisé dans un mélange AcOEt/Cyclohexane.

Acide 4-azidobenzoïque (12)



Aspect: solide blanc.

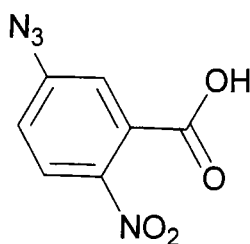
Rendement : 90%.

Point de fusion : 188-191°C (Litt. 193°C)⁷⁹.

IR : $\nu = 2132$ (N₃), 1673 (C=O), 1599, 1281 cm⁻¹.

RMN ¹H (CDCl₃): $\delta_{\text{H}} = 8,12-8,09$ (d, J= 8,5 Hz, 2H), 7,12-7,09 (d, J= 8,5 Hz, 2H).

Acide 3-azido-6-nitrobenzoïque (13)



Aspect: solide jaune.

Rendement : 88%.

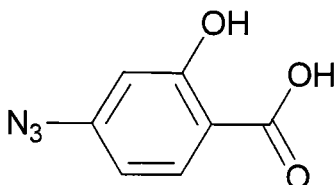
Point de fusion: 166-168°C. (Litt. 170°C)⁸⁰.

$R_f = 0,15$ (AcOEt>/Cyclohexane, 1/1, v/v).

IR : $\nu = 2132$ (N₃), 1708 (C=O), 1582, 1516, 1342 (NO₂), 1265 cm⁻¹.

RMN ¹H (CDCl₃): $\delta_{\text{H}} = 7,95-7,91$ (d, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,14-7,11 (d, 1H).

Acide 4-azido-2hydroxybenzoïque (Acide 4-azidosalicylique) (14)



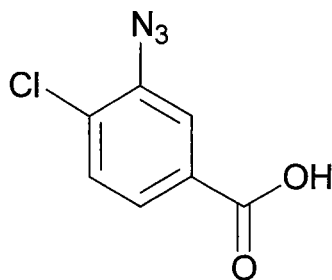
Aspect: solide blanc.

Rendement : 85%.

Point de fusion : 167-168°C (Litt. 165-167°C)⁸¹.

RMN ¹H (CDCl₃): $\delta_{\text{H}} = 7,87$ (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 6,60 (s, 1H).

Acide 3-azido-4-chlorobenzoïque (15)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 87%.

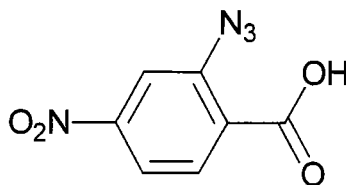
Point de fusion : 194-197°C.

$R_f = 0,36$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 1/24, v/v).

IR : $\nu = 3600\text{-}2300$ (br, OH), 2100 (N_3), 1680 cm^{-1} (C=O).

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 7,82$ (s, 1H), 7,70-7,67 (d, 1H), 7,38-7,35 (d, 1H).

Acide 2-azido-4-nitrobenzoïque (16)



Aspect: solide orange.

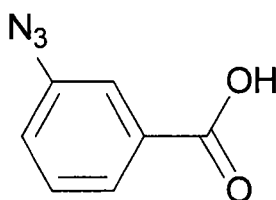
Rendement : 50%.

Point de fusion : 160°C.

$R_f = 0,11$ (AcOEt-Cyclohexane, 1/1, v/v).

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 8,02\text{-}7,99$ (m, 2H), 7,95-7,91 (d, $J = 10,25$ Hz, 1H).

Acide 3-azidobenzoïque (17)



Aspect: solide blanc.

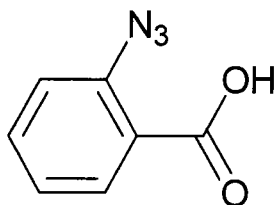
Rendement : 60%.

Point de fusion : 163-165°C.

IR : $\nu = 2129$ (N_3), 1690 (C=O), 1300 cm^{-1} .

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 7,90\text{-}7,87$ (d, $J = 7,75$ Hz, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,51-7,44 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H), 7,28-7,24 (d, $J = 10,25$ Hz, 1H).

Acide 2-azidobenzoïque (18)



Aspect: solide beige.

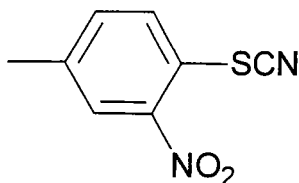
Rendement : 55%.

Point de fusion : 146-148°C.

IR : $\nu = 2101$ (N_3), 1687-1668 ($\text{C}=\text{O}$), 1250 cm^{-1} .

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 8,17\text{-}8,13$ (d, $J = 9,5$ Hz, 1H), 7,65-7,59 (t, 1H), 7,51-7,44 (t, 1H), 7,30-7,24 (m, 2H).

5-méthyl-1-nitro-2-thiocyanobenzène (83)



Aspect: solide rouge-orangé.

Rendement : 85%.

Point de fusion : 140°C.

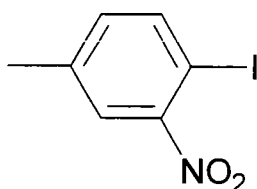
IR: $\nu = 2359, 2337, 1509/1265$ cm^{-1} (NO_2).

RMN ^1H (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 8,21$ (s, 1H), 7,93 (d, 1H), 7,61 (d, 1H), 2,50 (s, 3H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{C}} = 158, 139,89, 136,47, 128,76, 126,73, 123, 111, 20,68$.

GCMS : m/z (%) = 194 (98), 129 (96), 78 (100).

4-iodo-3-nitrotoluène (85)



Aspect: solide marron.

Rendement : 91%.

Point de fusion : 52-56°C (53-56°C).

RMN ¹H (CDCl₃, ppm) : δ_H= 7,90-7,87 (d, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,10-7,07 (d, 1H), 4,01 (br, 2H, NH₂), 2,40 (s, 3H).

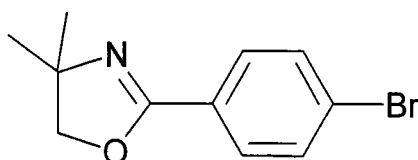
RMN ¹³C (CDCl₃, ppm) : δ_C= 151,5, 142,25, 141,37, 139,87, 125,90, 81,96, 20,71.

GCMS : m/z (%)= 263 (100), 217 (24), 136 (1), 127 (6), 90 (78), 46 (1).

Mode opératoire : synthèse du composé 19a

A 22 mmol (4,42 g) d'acide parabromobenzoïque sont ajoutés 3 équivalents (66 mmol, 7,85 g) de SOCl₂. Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 1 heure 30 minutes. Une fois le mélange réactionnel revenu à température ambiante SOCl₂ en excès est évaporé sous pression réduite. Le chlorure d'acide obtenu en solution dans 10 mL de CH₂Cl₂ est ajouté goutte à goutte à 1,5 équivalents (33 mmol, 2,94 g) de 2-amino-2-méthylpropanol en solution dans 15 mL de CH₂Cl₂ refroidis par un bain de glace. Après l'addition du chlorure d'acide la solution est agitée 16 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est filtré sur coton et CH₂Cl₂ est évaporé sous pression réduite. SOCl₂ est ajouté goutte à goutte au solide obtenu, l'addition est terminée quand il n'y a plus d'ébullition, ensuite 15 mL d'éther diéthylique (Et₂O) sont versés sur la solution revenu à température ambiante. La solution étherée est neutralisée par ajout d'une solution glacée d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 20%. La phase aqueuse est extraite par Et₂O, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu sera mis en réaction sans purification particulière.

2-(4-bromophényl)-4,4diméthyl-2-oxazoline (19a)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 75%.

Point de fusion : 37-41°C (Litt. 37-38°C)⁸⁵.

RMN ¹H (CDCl₃) : δ_H= 7,80-7,76 (d, 2H), 7,54-7,50 (d, 2H), 4,09 (s, 2H), 1,36 (s, 6H).

RMN ¹³C (CDCl₃, ppm) : δ_C= 161,23, 131,46, 129,72, 126,99, 125,73, 79,20, 67,70, 28,31

GCMS : m/z (%)= 255 (9), 253 (9), 240 (96), 238 (100), 225 (12), 223 (14), 212 (22), 210 (25), 184 (52), 182 (54), 102 (45), 76 (43), 50(32), 41 (46).

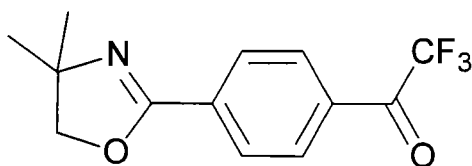
Mode opératoire : synthèse de la trifluoroacétylpipéridine

Sous atmosphère d'argon à 50 mmol (10,5 g) d'anhydride trifluoroacétique en solution dans 150 mL de Et₂O anhydre est ajouté 1 équivalent de triéthylamine (Et₃N) distillée puis goutte à goutte 1,2 équivalents (60 mmol, 5,1 g) de pipéridine sont ajoutés. L'agitation à température ambiante est maintenue pendant 20 heures. La phase organique est lavée avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le résidu est distillé sous pression réduite.

Mode opératoire : synthèse du composé 19b

Sous atmosphère d'argon, à -40°C, à 11,7 mmol (2,97 g) du 2-(4-bromophényl)-4,4diméthyl-2-oxazoline en solution dans 60 mL de Et₂O anhydre sont ajoutés goutte à goutte 1,05 équivalents de n-BuLi (2,5 M dans l'hexane, 12,3 mmol, 4,9 mL). Après cet ajout le milieu réactionnel est amené à 0°C sur une période de 2 heures. Puis à -60°C 1 équivalent (11,7 mmol, 2,1 g) de trifluoroacétylpipéridine en solution dans Et₂O anhydre est ajouté par portion. Une fois l'addition terminée, le milieu réactionnel est maintenu à -60°C pendant trois heures puis laissé revenir à température ambiante, et hydrolysé à 0°C par ajout d'une solution saturée de chlorure d'ammonium. La phase organique est lavée par une solution de chlorure d'ammonium saturée, lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice avec comme éluant un mélange acétone/cyclohexane (1/2, v/v).

2,2,2-trifluoro-1-[4-(4,4diméthyl-2-oxazolyl)phényl]-1-éthanone (19b)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 58%.

Point de fusion : 60-61°C (Litt. 62-63°C)⁸⁵.

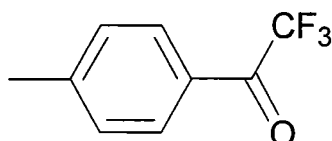
RMN ¹H (CDCl₃) : δ_H= 8,09 (s, 4H), 4,16 (s, 2H), 1,38 (s, 6H).

Mode opératoire : synthèse du composé 19

A 5,7 g (43,13 mmol) d'AlCl₃ en suspension dans 100 mL de CH₂Cl₂ à 0°C sont ajoutés &, 1 équivalents (47,75 mmol, 6,75 mL) d'anhydride trifluoroacétique dissous dans CH₂Cl₂ (30

mL). Après 15 min. d'agitation 1,23 équivalents (35 mmol, 3,22 g) de toluène sont ajoutés en maintenant la température de la réaction inférieure à 5°C. Après deux heures d'agitation à température ambiante 50 mL d'acide tartrique 1M sont ajoutés. La phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu est suffisamment pur pour être mis en réaction sans purification particulière.

2,2,2-Trifluoro-1-(4-méthylphényl)-1-éthanone (19)



Aspect: huile jaunâtre.

Rendement : 77%.

$R_f = 0,86$ (CHCl_3).

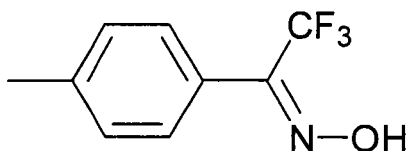
RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta_{\text{H}} = 7,98-7,95$ (d, 2H), 7,35-7,32 (d, 2H), 2,46 (s, 3H).

GCMS : m/z (%) = 188 (20), 119 (89), 91 (100), 65 (37).

Mode opératoire : synthèse du composé 20

A 39,9 mmol (2,77 g) de chlorhydrate d'hydroxylamine ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) et 1 équivalent de NaOH (39,9 mmol, 1,60 g) en solution dans 150 mL de EtOH est ajouté 0,33 équivalent de 2,2,2-Trifluoro-1-(4-méthylphényl)-1-éthanone en solution dans 20 mL de EtOH. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 16 heures. Une fois revenu à température ambiante le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est solubilisé dans CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec de l'eau, de l'acide chlorhydrique 0,01 N, de nouveau avec de l'eau et est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu sera mis en réaction sans purification particulière.

2,2,2-Trifluoro-1-(4-méthylphényl)-1-éthanone oxime (20)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 92%.

$R_f = 0,28$ (CHCl_3).

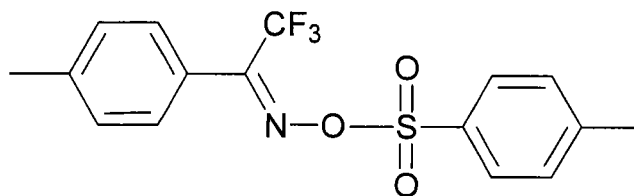
RMN ¹H (CDCl₃) : δ_H= 8,72-8,55 (d, 1H), 7,44-7,37 (m, 2H), 7,30-7,21 (m, 2H), 2,41 (br s, 3H).

GCMS : m/z (%)= 203 (100), 134 (14), 91 (77), 69 (13).

Mode opératoire : synthèse du composé 21

A 5,3 mmol (1,08 g) de 2,2,2-Trifluoro-1-(4-méthylphényl)-1-éthanone en solution dans 10 mL de CH₂Cl₂ refroidi par un bain de glace sont ajoutés 1,2 équivalents (6,36 mmoles, 0,64 g, 0,88 mL) de Et₃N, 0,08 équivalent (2*10⁻³ mmol, 0,2 mg) de 4-N,N-diméthylaminopyridine (DMAP) et 1,1 équivalent (5,8 mmol, 1,11 g) de chlorure de paratoluènesulfonyl. Une fois l'addition terminée, le milieu réactionnel est agité 1 heure à température ambiante. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié par recristallisation dans l'éther de pétrole.

2,2,2-Trifluoro-1-(4-méthylphényl)-1-éthanone O-(p-Toluènesulfonyl) Oxime (21)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 99%.

Point de fusion : 106-108°C (104-105°C)⁸⁴.

R_f= 0,84 (CHCl₃).

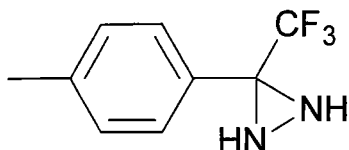
RMN ¹H (CDCl₃) : δ_H= 7,90-7,87 (d, 2H), 7,40-7,36 (d, 2H), 7,34-7,25 (m, 4H), 2,48 (s, 3H), 2,40 (s, 3H).

GCMS : m/z (%)= 187 (27), 118 (100), 91 (24), 69 (4).

Mode opératoire : synthèse du composé 22

Dans un tube scellé, 5 mL d'ammoniac liquide sont ajoutés à 1,4 mmol (499mg) de 2,2,2-Trifluoro-1-(4-méthylphényl)-1-éthanone O-(p-Toluènesulfonyl) Oxime en solution dans un minimum de CH₂Cl₂ anhydre refroidi à -78°C. Après avoir été agité 12 heures à température ambiante le mélange réactionnel est à nouveau refroidi à -78°C pour ouvrir le tube et laissé évaporer l'ammoniac gaz. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice.

3-(4-méthylphényl)-3-trifluorométhyl diaziridine (22)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 80%.

Point de fusion : 43-45°C (Litt. 45-46°C)⁸⁴.

R_f = 0,20 (CHCl₃), 0,39 (AcOEt/Cyclohexane, 1/4, v/v).

RMN ¹H (CDCl₃) : δ_H = 7,52-7,48 (d, 2H), 7,25-7,21 (d, 2H), 2,76 (br s, 1H) 2,38 (s, 1H), 2,19 (br s, 1H).

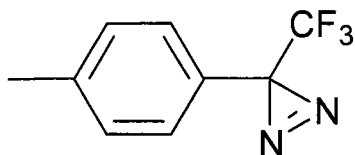
RMN ¹³C (CDCl₃) : δ_C = 21,21, 57,55 (q), 127,94, 128,70 (q), 129,34, 130,18, 140, 19.

GCMS : m/z (%) = 202 (100), 133 (67), 91 (77), 69 (61).

Mode opératoire : synthèse du composé 23

A 2,97 mmol (0,6 g) de diaziridine en solution dans de l'éther diéthylique sont ajoutés 2 équivalents (6 mmol, 1,4 g) d'oxyde d'argent (Ag₂O). Après 1h30min d'agitation, le mélange réactionnel est filtré, et la phase étherée distillée sous pression réduite à température ambiante car le produit obtenu est volatil. Le produit obtenu est mis en réaction sans purification particulière.

3-(4-méthylphényl)-3-trifluorométhyl-3H-diazirine (23)



R_f = 0,84 (CHCl₃), 0,93 (AcOEt/Cyclohexane, 1/4, v/v).

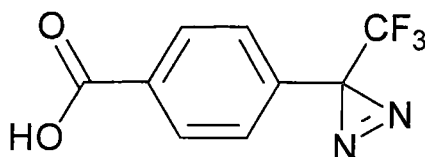
Préparation d'Ag₂O:

A 20 mmol (3,4 g) de nitrate d'argent (AgNO₃) en solution dans 10 mL d'eau est ajouté sous agitation 10 mL d'une solution de NaOH (2M). Le précipité est filtré et lavé abondamment avec de l'eau, MeOH et en enfin avec Et₂O.

Mode opératoire : synthèse du composé 24

A 1,5 mmol (0,3 g) de diazirine en solution dans 1,5 mL de pyridine et 3 mL d'eau distillée sont ajoutés 4 équivalents (6 mmol, 0,95 g) de permanganate de potassium (KMnO₄) par portion. Une fois l'addition terminée le mélange réactionnel est chauffé à 50°C pendant une nuit, puis filtré sur célite une fois revenu à température ambiante. Le filtrat est acidifié avec de l'acide chlorhydrique 6N. Le précipité obtenu est filtré sur büchner et lavé à l'eau. L'acide sera mis en réaction sans purification supplémentaire.

Acide 4-[3-(Trifluorométhyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoïque (24)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 37%.

Point de fusion : 120-123°C. (Litt. 123-125°C)⁸⁴.

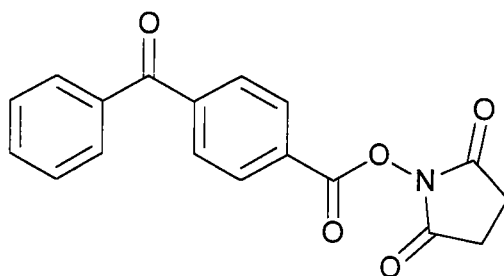
R_f = 0,41 (AcOEt/Cyclohexane, 3/2, v/v).

RMN ¹H (CDCl₃) : δ_H = 8,27-8,12 (m, 2H), 7,31-7,27 (m, 2H).

Mode opératoire : transformation d'acide en présence de la dicyclohexylcarbodiimide

A 5 mmol d'un dérivé de l'acide benzoïque en solution dans 25 mL de THF anhydre refroidi par un bain de glace sont ajoutés 1,1 équivalents (5,5 mmol, 0,63 g) de N-hydroxysuccinimide (NHS), puis 1,05 équivalents (5,25 mmol, 1,08 g) de dicyclohexylcarbodiimide (DCC). L'agitation est maintenue 1 heure à 0-5 °C puis une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est placé 2 heures au réfrigérateur puis filtré sur coton. Le THF est évaporé sous pression réduite et le solide obtenu est recristallisé dans un mélange AcOEt/Cyclohexane. Les produits obtenus contiennent toujours un peu de DCU.

4-(benzoyl)-benzoate de N-hydroxysuccinimidyle (25)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 88%.

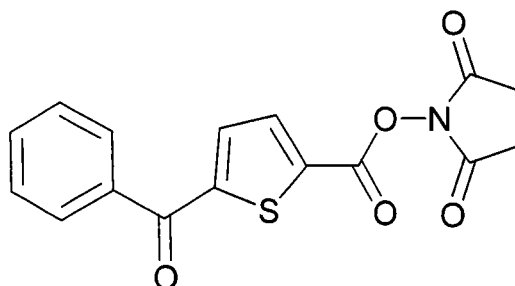
Point de fusion : 195-198°C. (Litt. 207°C).

$R_f = 0,51$ (AcOEt-Cyclohexane, 1/1, v/v).

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta_{\text{H}} = 8,28-8,24$ (d, 2H), 7,91-7,88 (d, 2H), 7,82-7,78 (d, 2H), 7,67-7,61 (t, 1H), 7,54-7,49 (t, 2H), 2,94 (s, 4H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta_{\text{C}} = 195,46, 168,96, 161,18, 142,98, 136,48, 133,19, 130,45, 130,07, 129,92, 128,53, 128,01, 25,63$.

5-benzoyl-2-thénoate de N-hydroxysuccinimidyle (26)



Aspect: solide beige.

Rendement : 90%.

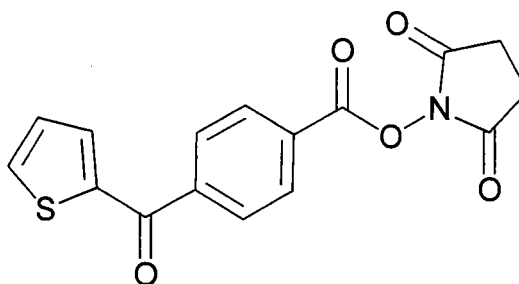
Point de fusion : 137-139°C.

IR: $\nu = 1763, 1709$ (C=O), 1627 (C=O), 1197, 1068 cm^{-1} .

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 8,02-8,01$ (d, 1H), 7,90-7,87 (d, 2H), 7,68-7,63 (m, 2H), 7,57-7,51 (m, 2H), 2,92 (s, 4H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta_{\text{C}} = 168,73, 136,81, 136,01, 133,53, 133,25, 129,34, 128,72, 25,62$.

4-(thiophène-2-carbonyl)-benzoate de N-hydroxysuccinimidyle (27)



Aspect: solide blanc.

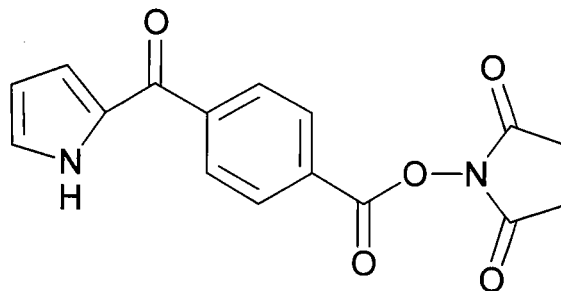
Rendement : 83%.

Point de fusion : 193-195°C.

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 8,29-8,25$ (d, 2H), 7,97-7,93 (d, 2H), 7,81-7,79 (d, 1H), 7,62-7,61 (d, 1H), 7,22-7,18 (t, 1H), 2,94 (s, 4H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta_{\text{C}} = 186,99, 168,96, 143,58, 135,38, 130,65, 129,21, 128,31, 128,04, 25,61$.

4-(1H-Pyrrole-2-carbonyl)-benzoate de N-hydroxysuccinimidyle (28)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 85%.

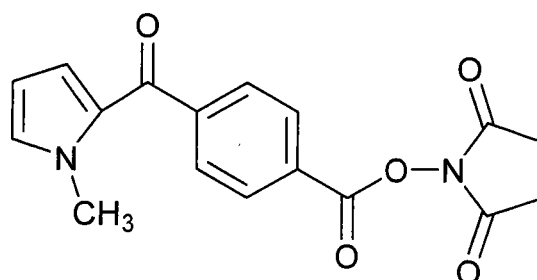
Point de fusion : 162-165°C.

IR: $\nu = 3295$ (NH), 1773, 1725 (C=O), 1610 (C=O), 1197 cm^{-1} .

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 9,78$ (br s, 1H), 8,27-8,24 (d, 2H), 8,00-7,97 (d, 2H), 7,21 (s, 1H), 6,85 (s, 1H), 6,38 (s, 1H), 2,94 (s, 4H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta_{\text{C}} = 183,33, 169,11, 161,30, 143,76, 130,54, 129,10, 127,63, 126,47, 120,35, 111,56$.

4-(1-Méthyl-1H-pyrrole-2-carbonyl)-benzoate de N-hydroxysuccinimidyle (29)



Aspect: solide grisâtre.

Rendement : 80%.

Point de fusion : 202-204°C.

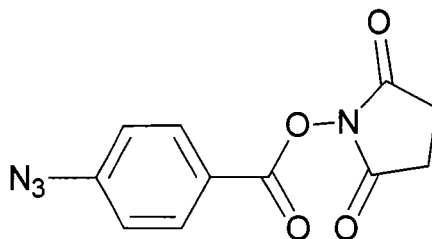
$R_f = 0,29$ (AcOEt/Cyclohexane, 1/1, v/v).

IR: $\nu = 3320, 2923, 2848, 1767, 1729$ (C=O), 1610 cm^{-1} (C=O).

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 8,25-8,21$ (d, 2H), 7,91-7,87 (d, 2H), 6,98 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 6,19 (s, 1H), 4,07 (s, 3H), 2,94 (s, 4H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta_{\text{C}} = 184,55, 168,08, 160,84, 145,54, 132,49, 130,83, 130,36, 129,81, 127,16, 123,61, 108,72, 37,53, 25,69$.

4-azidobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle (30)



Aspect: solide blanc.

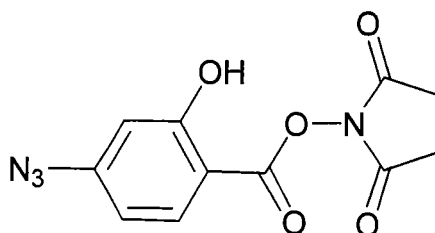
Rendement : 87%.

Point de fusion : 164-166°C (Litt. 174-177°C)⁷⁹.

RMN ¹H (CDCl₃): δ_H= 8,14-8,11 (d, J= 8,5 Hz, 2H), 7,15-7,12 (d, J= 7,5 Hz, 2H), 2,91 (s, 4H).

RMN ¹³C (CDCl₃): δ_C= 169,18, 146,89, 132,90, 132,43, 121,25, 119,25, 25,62.

4-azido-2hydroxylbenzoate de N-hydroxysuccinimidyle (31)



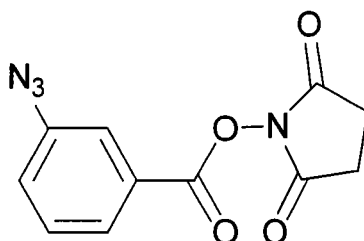
Aspect: solide blanc.

Rendement : 92%.

Point de fusion : 135-137°C (Litt. 140-142°C).

RMN ¹H (CDCl₃): δ_H= 10 (d, 1H), 9,65 (s, 1H, OH), 6,66 (d, 1H), 6,60 (d, 1H), 2,95 (br s, 4H).

3-azidobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle (32)



Aspect: solide blanc.

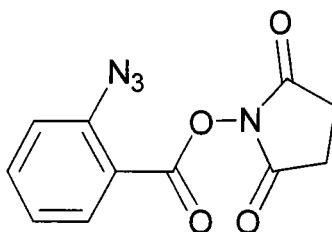
Rendement : 84%.

Point de fusion : 133-135°C.

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 7,91-7,88$ (d, $J = 7,75$ Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,53-7,47 (t, $J = 5,25$ Hz, 1H), 7,33-7,29 (d, $J = 10,25$ Hz, 1H), 2,91 (s, 4H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : $\delta_{\text{C}} = 169,56, 169,05, 161,07, 141,16, 130,31, 126,79, 125,27, 120,66, 25,62$.

2-azidobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle (33)



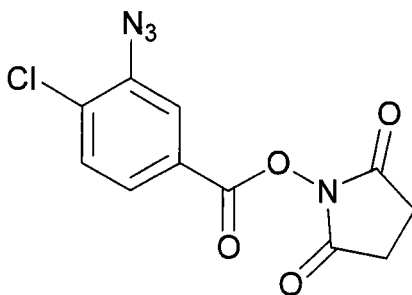
Aspect: solide blanc.

Rendement : 78%.

Point de fusion: 154-157°C.

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta_{\text{H}} = 8,11-8,08$ (d, 1H), 7,69-7,63 (t, 1H), 7,33-7,22 (m, 2H), 2,91 (s, 4H).

3-azido-4-chlorobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle (34)



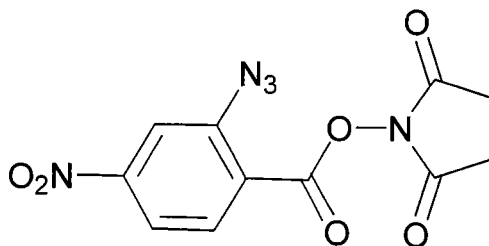
Aspect: solide blanc.

Rendement : 85%.

Point de fusion : 162-164°C.

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 7,90$ (s, 1H), 7,86-7,82 (d, $J = 10,25$ Hz, 1H), 7,55-7,52 (d, $J = 8,25$ Hz, 1H), 2,92 (s, 4H).

2-azido-4-nitrobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle (35)



Aspect: solide jaune.

Rendement : 80%.

Point de fusion : 160-162°C.

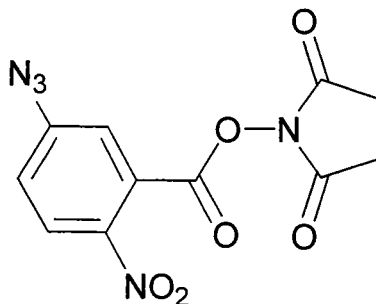
$R_f = 0,74$ (AcOEt-Cyclohexane, 3/2, v/v).

IR: $\nu = 2132$ (N_3), 1690 (C=O), 1521, 1344 (NO_2), 1199 cm^{-1} .

RMN 1H ($CDCl_3$): $\delta_H = 8,25-8,22$ (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,07-8,03 (d, $J = 10,75$ Hz, 1H), 2,93 (s, 4H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : $\delta_C = 168,64, 158,80, 143,56, 133,84, 122,11, 118,97, 114,80, 111,09, 29,69$.

3-azido-6-nitrobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle (36)



Aspect: solide jaune.

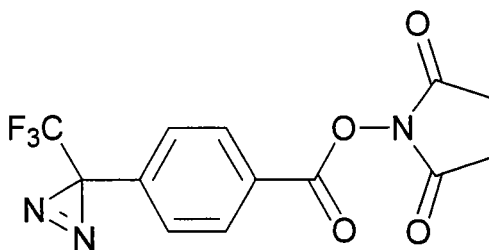
Rendement : 83%.

Point de fusion: 113-116°C.

$R_f = 0,45$ (AcOEt/Cyclohexane, 1/1, v/v).

RMN 1H ($CDCl_3$): $\delta_H = 8,20-8,17$ (d, $J = 8,75$ Hz, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,34-7,30 (d, $J = 8,75$ Hz, 1H), 2,93 (s, 4H).

4(1-azi-2,2,2-trifluoroéthyl)benzoate de N-hydroxysuccinimidyle (37)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 80%.

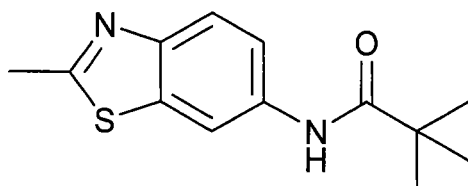
Point de fusion : 100°C (Litt. 106°C)⁸⁴.

$R_f = 0,39$ (AcOEt/Cyclohexane, 3/2, v/v).

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta_{\text{H}} = 8,18-8,15$ (d, 2H), 7,34-7,30 (d, 2H), 2,92 (s, 4H).

Pour (71), le 6-amino-2-méthylbenzothiazole (70) est mis en réaction avec 1,05 équivalents d'acide pivaloïque et 1,05 équivalents de DCC.

2,2-Diméthyl-N-(2-méthyl-benzothiazol-6-yl)-propionamide (71)



Aspect: solide blanc.

Rendement: 79%.

Point de fusion : 125-127°C.

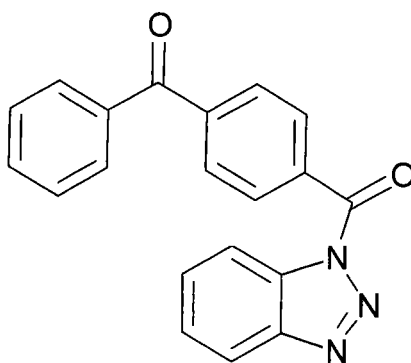
$R_f = 0,53$ (AcOEt-Cyclohexane, 1/1, v/v)

RMN ^1H (CDCl_3) : $\delta_{\text{H}} = 8,18-8,15$ (d, 2H), 7,34-7,30 (d, 2H), 2,92 (s, 4H).

Mode opératoire : synthèse du composé 38

A 4 mmol (476 mg) de benzotriazole en solution dans 2 mL de dichlorométhane est ajouté 0,25 équivalent (1 mmol, 119 mg) de SOCl_2 . L'agitation se poursuit 0,5 heures et est ajouté 0,25 équivalent (1 mmol, 226 mg) d'acide 4-benzoylbenzoïque. Après 2 heures le précipité est filtré et lavé avec CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide est recristallisé dans un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane.

Benzotriazol-1-yl-(4-benzoyl-phényl)-méthanone (38)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 97%.

Point de fusion : 158-160°C.

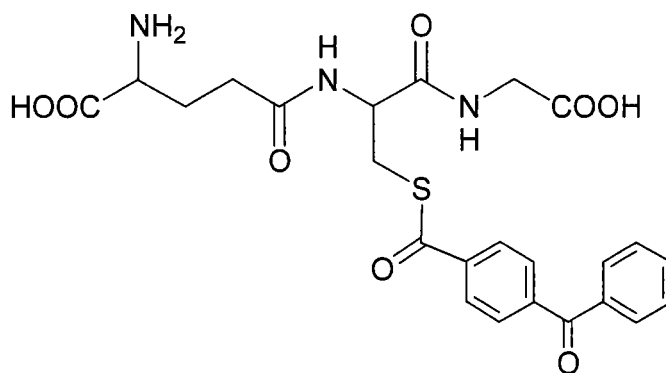
RMN ¹H (CDCl₃, ppm) : δ_H= 8,45-8,42 (d, 1H), 8,34-8,31 (d, 2H), 8,22-8,19 (d,1H), 7,99-7,96 (d, 2H), 7,89-7,86 (d, 2H), 7,79-7,73 (t, 1H), 7,65-7,50 (m, 4H).

RMN ¹³C (CDCl₃, ppm) : δ_C= 197, 167, 148, 141,70, 136,72, 134,48, 133,13, 132,16, 131,53, 130,70, 130,17, 129,63, 128,55, 126,64, 120,35, 114,80.

Mode opératoire : protocole Karwatsky⁵⁷

A une solution de GSH (0,03 mmol, 10 mg) dans 75 µL est ajouté 500 µL de DMF. Ensuite l'acide activé (1 équivalent) en solution dans 500 µL de DMF est ajouté goutte à goutte, ainsi que 40 µL (7,5 équivalents) de Et₃N. Le milieu réactionnel est agité pendant 48 heures. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié sur gel de silice avec comme éluant un mélange acétonitrile/eau (9/1, v/v).

S- (4-benzoylbenzoyl) glutathion (39)

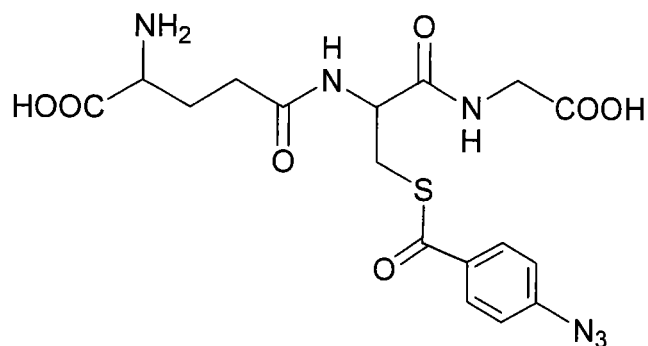


Aspect: solide blanc.

Rendement : 60%.

RMN ¹H (D₂O, ppm) : δ_H= 8,02 (m, 2H), 7,83-7,79 (m, 5H), 7,61 (m, 2H), 3,86 (m, 5H, Cysα + Gluα + Glyα + Cysβ₁), 3,49 (dd, 1H, Cysβ₂), 2,58 (m, 2H, Gluγ), 2,22 (m, 2H, Gluβ).

S- (4-azidobenzoyl)glutathion

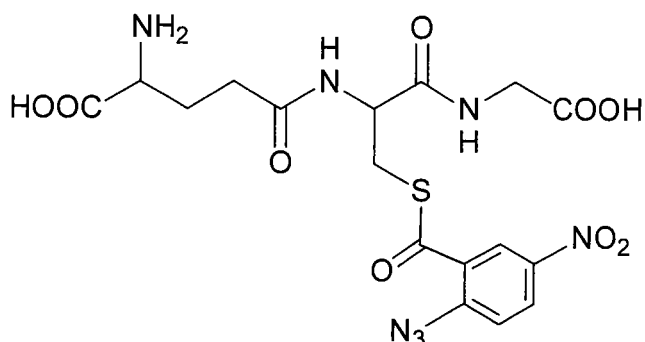


Aspect: solide blanc.

Rendement : 55%.

RMN ¹H (D₂O, ppm) : δ_H= 8,07-8,04 (d, 2H), 7,28-7,25 (d, 2H), 3,82 (m, 5H, Cysα + Gluα + Glyα + Cysβ₁), 3,49 (dd, 1H, Cysβ₂), 2,52 (m, 2H, Gluγ), 2,16 (m, 2H, Gluβ).

S- (3-azido-4-nitrobenzoyl)glutathion

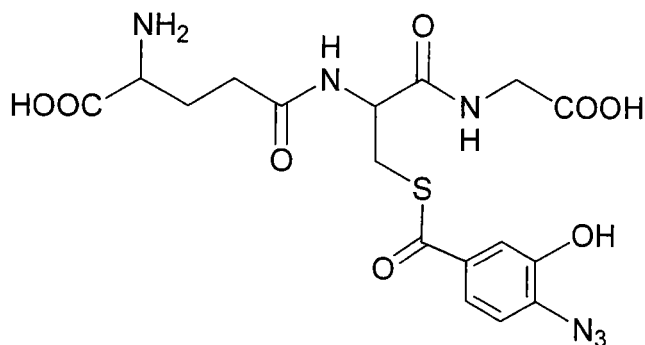


Aspect: solide jaunâtre.

Rendement : 57%.

RMN ¹H (D₂O, ppm) : δ_H= 8,29-8,25 (d, 1H), 7,44-7,40 (d, 1H), 7,34 (s, 1H), 3,80 (m, 5H, Cysα + Gluα + Glyα + Cysβ₁), 3,52 (dd, 1H, Cysβ₂), 2,59 (m, 2H, Gluγ), 2,21 (m, 2H, Gluβ).

S- (4-azido-3-hydroxybenzoyl)glutathion



Aspect: solide blanc.

Rendement : 69%.

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 8,03-7,99$ (d, 1H), 6,81-6,75 (m, 2H), 3,80 (m, 5H, Cys α + Glu α + Gly α + Cys β_1), 3,52 (dd, 1H, Cys β_2), 2,59 (m, 2H, Glu γ), 2,21 (m, 2H, Glu β).

Mode opératoire : synthèse du composé 39

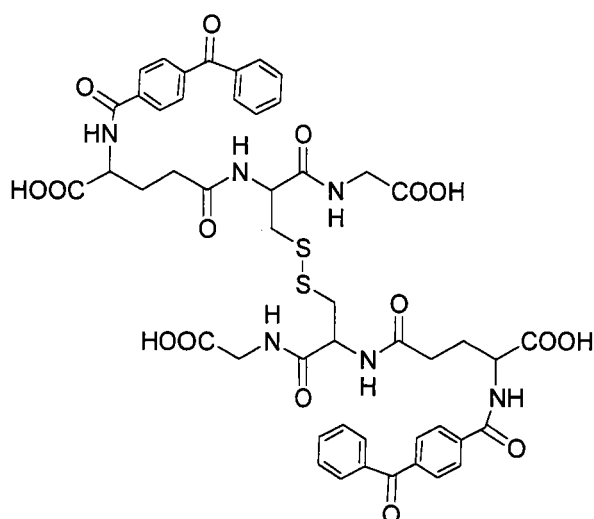
A une solution de GSH (0,03 mmol, 10 mg) dans 100 μL est ajouté 300 μL d'acétonitrile. Ensuite **38** (1 équivalent, 0,03 mmol, 9,8 mg) en solution dans 300 μL d'acétonitrile est ajouté goutte à goutte, ainsi que 10équivalents (13,8 mg, 12 μL) d'acide formique. Le milieu réactionnel est agité pendant 48 heures et le milieu réactionnel est purifié sur gel de silice avec comme éluant un mélange acétonitrile/eau (9/1, v/v).

Mode opératoire : N-acylation du glutathion oxydé

A 0,045 mmol (27,5 mg) de glutathion oxydé dissoute dans un mélange eau distillée (450 μL) / acétonitrile distillé (1400 μL) sont ajoutés 5 équivalents (0,225 mmol, 22,7 mg, 32 μL) de Et_3N distillée. Après 5 minutes d'agitation à température ambiante sont ajoutés 2,1 équivalents d'ester hydroxysuccinimique. Le mélange réactionnel est agité 36 heures à température ambiante puis purifié sur gel de silice avec comme éluant un mélange acétonitrile/eau (9/1, v/v).

Pour les réactions concernant les azides et la diazirine l'agitation se fait à l'abri de la lumière.

N,N'-Bis-(4-benzoylbenzoyl)glutathion disulfure (41)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 85%.

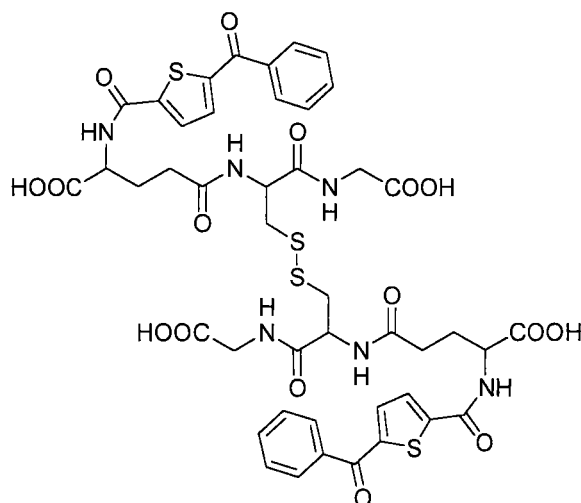
Point de fusion : 250°C (déc.).

RMN ¹H (D₂O, ppm) : δ_H= 7,95-7,92 (m, 4H), 7,82-7,78 (m, 10H), 7,66-7,63 (m, 4H), 4,77 (t, 2H, Cysα), 4,49 (t, 2H, Gluα), 3,77 (s, 4H, Glyα), 3,28 (dd, 2H, Cysβ₁), 2,96 (dd, 2H, Cysβ₂), 2,58 (m, 4H, Gluγ), 2,40 (m, 2H, Gluβ₁), 2,20 (m, 2H, Gluβ₂).

RMN ¹³C (D₂O, ppm) : δ_C= 199,58, 177,92, 175,72, 171,82, 168,85, 139,47, 137,42, 136,25, 133,86, 130,40, 130,32, 128,68, 127,35, 55,30, 52,61, 43,39, 38,67, 31,96, 27,10.

MALDI-TOF : 1029 (M+H), 1051 (M+Na), 1067 (M+K).

N,N'-Bis-(5-benzoylthiophene-2-carbonyl)glutathion disulfure (42)



Aspect: solide beige.

Rendement : 88%.

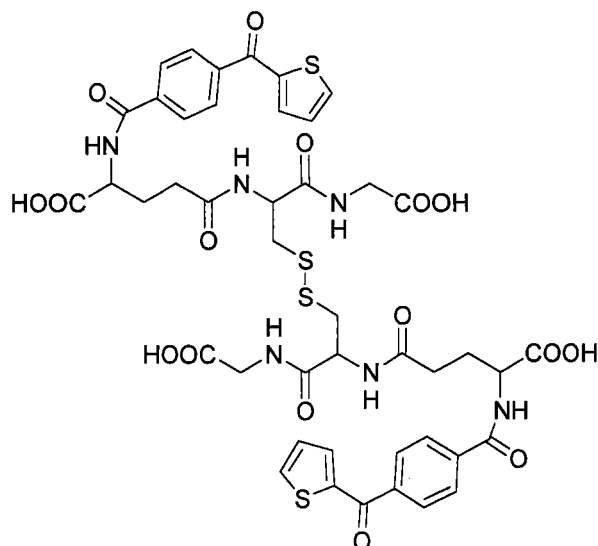
Point de fusion : 245°C (déc.).

RMN ¹H (D₂O, ppm) : δ_H= 7,81-7,71 (m, 8H), 7,59 (m, 6H), 7,66-7,63 (m, 4H), 4,77 (t, 2H, Cysα), 4,42 (t, 2H, Gluα), 3,79 (s, 4H, Glyα), 3,35 (dd, 2H, Cysβ₁), 2,96 (dd, 2H, Cysβ₂), 2,55 (m, 4H, Gluγ), 2,36 (m, 2H, Gluβ₁), 2,15 (m, 2H, Gluβ₂).

RMN ¹³C (D₂O, ppm) : δ_C= 190,24, 175,57, 171,93, 162,25, 145,51, 145,06, 136,37, 136,12, 133,52, 130,28, 129,54, 128,69, 52,53, 38,70, 31,83, 27,09.

MALDI-TOF : 1063 (M+Na), 1067 (M+K).

N,N'-Bis-(4-(Thiophene-2-carbonyl)-benzoyl)glutathion disulfure (43)



Aspect: solide beige.

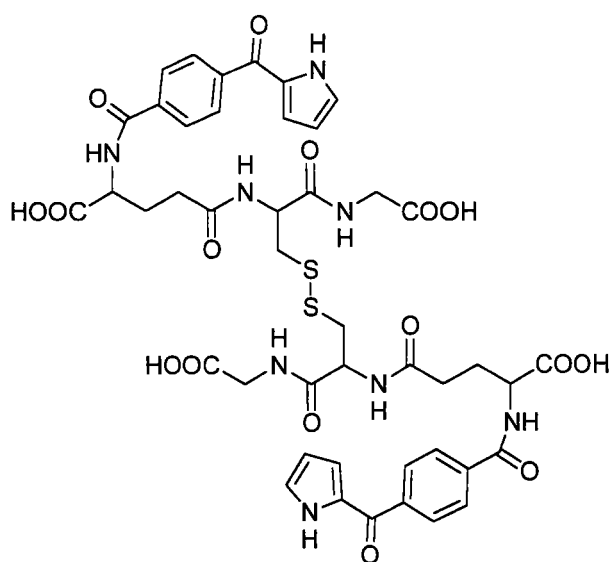
Rendement : 80%.

Point de fusion : 230°C (déc.).

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,95\text{-}7,92$ (m, 4H), 7,82-7,78 (m, 10H), 7,66-7,63 (m, 4H), 4,77 (t, 2H, Cys α), 4,49 (t, 2H, Glu α), 3,77 (s, 4H, Gly α), 3,28 (dd, 2H, Cys β_1), 2,96 (dd, 2H, Cys β_2), 2,58 (m, 4H, Glu γ), 2,40 (m, 2H, Glu β_1), 2,20 (m, 2H, Glu β_2).

RMN ^{13}C (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{C}} = 190,35, 175,61, 171,89, 168,6, 141,61, 139,83, 137,94, 137,19, 137,01, 129,39, 129,01, 127,42, 52,49, 38,46, 31,83, 27,06$.

N,N'-Bis-(4-(1H-Pyrrole-2-carbonyl)-benzoyl)glutathion disulfure (44)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 80%.

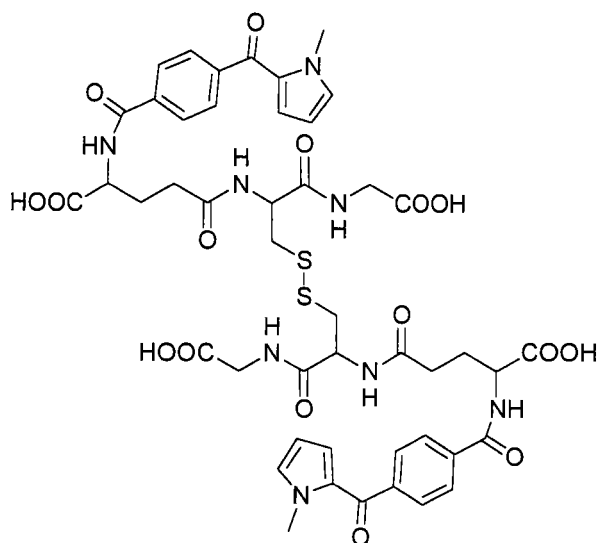
Point de fusion : 239°C.

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,79$ (m, 8H), 7,39 (m, 2H), 6,90 (m, 2H), 6,42 (m, 2H), 4,75 (t, 2H, Cys α), 4,42 (t, 2H, Glu α), 3,79 (s, 4H, Gly α), 3,35 (dd, 2H, Cys β_1), 2,96 (dd, 2H, Cys β_2), 2,54 (m, 4H, Glu γ), 2,36 (m, 2H, Glu β_1), 2,15 (m, 2H, Glu β_2).

RMN ^{13}C (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{C}} = 185,72, 175,67, 171,83, 168,99, 140,50, 136,49, 130,16, 129,07, 128,65, 127,29, 122,59, 111,47, 52,47, 38,44, 31,87, 26,97$.

MALDI-TOF : 1007 (M+H), 1029 (M+Na).

N,N'-Bis-(4-(1H-1-méthyl-Pyrrole-2-carbonyl)-benzoyl)glutathion disulfure (45)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 77%.

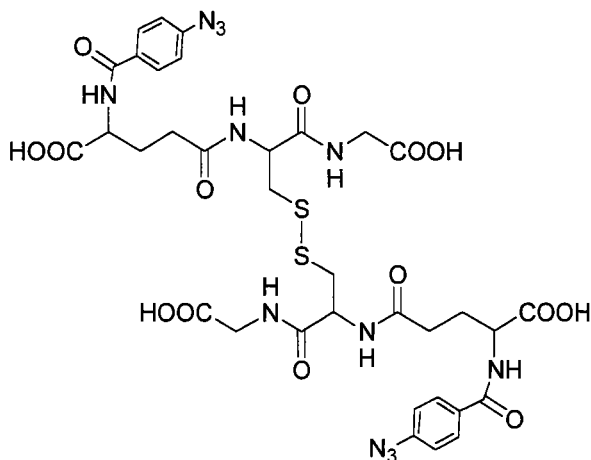
Point de fusion : 220°C (déc.).

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,89-7,86$ (d, 4H), 7,76-7,73 (d, 4H), 7,24 (s, 2H), 6,80 (s, 2H), 6,25 (s, 2H), 4,75 (t, 2H, Cys α), 4,42 (t, 2H, Glu α), 3,97 (s, 6H), 3,71 (s, 4H, Gly α), 3,23 (dd, 2H, Cys β_1), 2,96 (dd, 2H, Cys β_2), 2,54 (m, 4H, Glu γ), 2,36 (m, 2H, Glu β_1), 2,15 (m, 2H, Glu β_2).

^{13}C NMR (62,5 MHz, D_2O): $\delta = 186,54, 175,67, 171,86, 168,83, 141,85, 136,15, 134,72, 129,63, 129,19, 127,10, 125,69, 109,02, 52,49, 46,69, 38,45, 36,86, 31,84, 27,09$.

MALDI-TOF : 1057 (M+Na)

N,N'-Bis-(4-azidobenzoyl)glutathion disulfure (47)



Aspect: solide blanc.

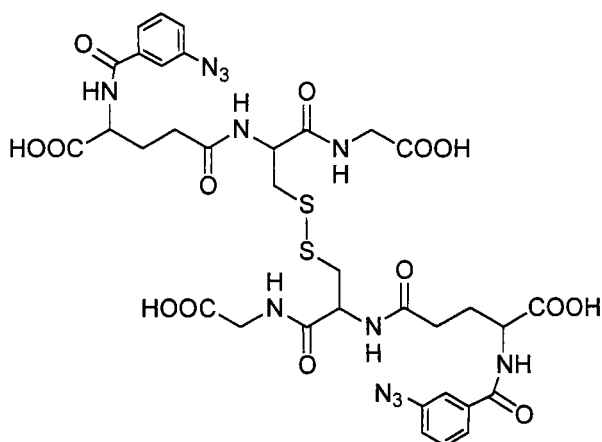
Rendement : 75%.

Point de fusion : 225°C (Litt. 127-129°C)⁵⁶.

RMN ¹H (D₂O, ppm) : δ_{H} = 7,92-7,89 (d, 4H), 7,29-7,26 (d, 4H), 4,87-4,82 (t, 2H, Cys α), 4,51 (t, 2H, Glu α), 3,79 (s, 4H, Gly α), 3,35-3,31 (dd, 2H, Cys β_1), 3,05-3,02 (dd, 2H, Cys β_2), 2,62 (m, 4H, Glu γ), 2,39 (m, 2H, Glu β_1), 2,25 (m, 2H, Glu β_2).

RMN ¹³C (D₂O, ppm) : δ_{C} = 178,15, 174,04, 146,03, 132,06, 131,38, 121,41, 57,72, 54,89, 45,76, 41,00, 34,52, 29,55.

N,N'-Bis-(3-azidobenzoyl)glutathion disulfure (48)

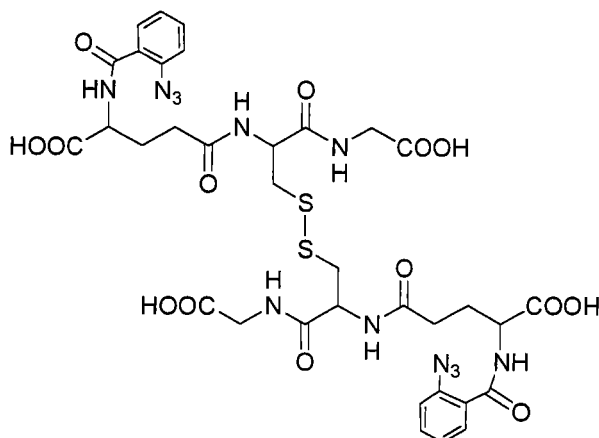


Aspect: solide beige.

Rendement : 20%.

RMN ¹H (D₂O, ppm) : δ_{H} = 7,65-7,53 (m, 8H), 4,51 (t, 2H, Cys α), 4,30 (t, 2H, Glu α), 3,77 (s, 4H, Gly α), 3,32 (m, 2H, Cys β_1), 3,05 (m, 2H, Cys β_2), 2,62 (m, 4H, Glu γ), 2,50 (m, 2H, Glu β_1), 2,25 (m, 2H, Glu β_2).

N,N'-Bis-(2-azidobenzoyl)glutathion disulfure (49)



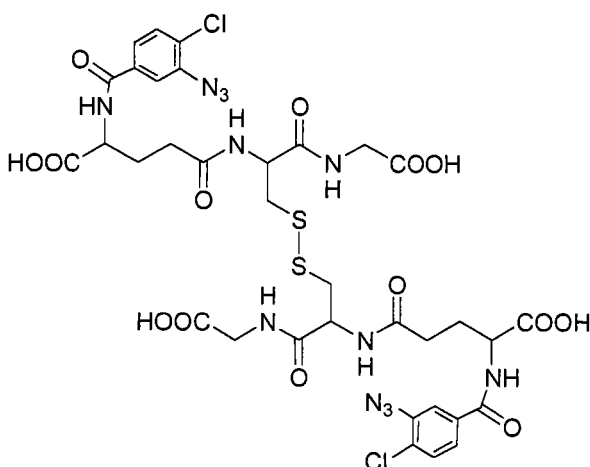
Aspect: solide beige.

Rendement : 62%.

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,75\text{-}7,72$ (d, 2H), 7,59 (t, 2H), 7,34-7,28 (m, 4H), 4,80 (m, 2H, Cys α), 4,44 (m, 2H, Glu α), 3,70 (s, 4H, Gly α), 3,22 (m, 2H, Cys β_1), 2,91 (m, 2H, Cys β_2), 2,52 (m, 4H, Glu γ), 2,25 (m, 2H, Glu β_1), 2,17 (m, 2H, Glu β_2).

RMN ^{13}C (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{C}} = 175,73, 171,87, 167,62, 137,54, 132,76, 130,09, 124,97, 124,81, 119,32, 55,18, 52,53, 43,41, 38,43, 31,74, 27,24$.

N,N'-Bis-(3-azido-4-chlorobenzoyl)glutathion disulfure (50)



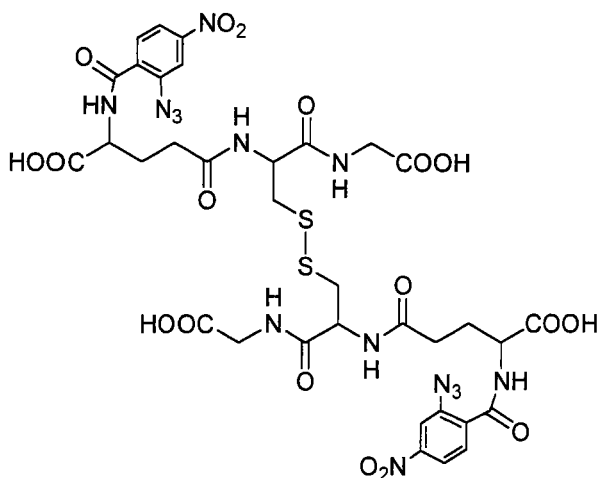
Aspect: solide blanc.

Rendement : 67%.

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,65$ (s, 2H), 7,53 (s, 4H), 4,80-4,78 (t, 2H, Cys α), 4,45 (t, 2H, Glu α), 3,74 (s, 4H, Gly α), 3,34-3,28 (dd, 2H, Cys β_1), 2,94-2,89 (dd, 2H, Cys β_2), 2,58-2,56 (m, 4H, Glu γ), 2,34 (m, 2H, Glu β_1), 2,19 (m, 2H, Glu β_2).

RMN ¹³C (D₂O, ppm) : δ_C= 177,87, 176,05, 175,71, 167,43, 137,16, 133,10, 130,57, 127,46, 124,27, 118,40, 55,24, 52,36, 43,27, 38,29, 31,81, 26,96.

N,N'-Bis-(2-azido-4-nitrobenzoyl)glutathion disulfure (51)



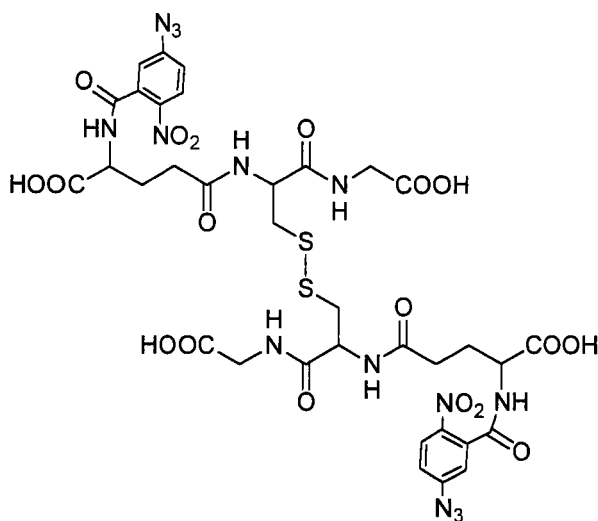
Aspect: solide jaune-orangé.

Rendement : 55%.

RMN ¹H (D₂O, ppm) : δ_H= 8,25 (s, 2H), 8,18 (d, 2H), 7,97 (d, 2H), 4,80 (t, 2H, Cysα), 4,57 (t, 2H, Gluα), 3,84 (s, 4H, Glyα), 3,20 (dd, 2H, Cysβ₁), 3,05 (dd, 2H, Cysβ₂), 2,62 (m, 4H, Gluγ), 2,41 (m, 2H, Gluβ₁), 2,13 (m, 2H, Gluβ₂).

RMN ¹³C (D₂O, ppm) : δ_C= 177,49, 176,22, 175,69, 171,95, 166,02, 149,38, 139,29, 131,01, 130,95, 119,56, 114,62, 55,16, 52,44, 43,39, 38,28, 31,55, 27,17.

N,N'-Bis-(3-azido-6-nitrobenzoyl)glutathion disulfure (52)



Aspect: solide jaune.

Rendement : 85%.

RMN ¹H (D₂O, ppm) : δ_H= 8,33-8,29 (d, 2H), 7,43-7,41 (d, 4H), 4,52 (t, 2H, Gluα), 3,85 (s, 4H, Glyα), 3,35 (dd, 2H, Cysβ₁), 3,10 (dd, 2H, Cysβ₂), 2,57 (m, 4H, Gluγ), 2,37 (m, 2H, Gluβ₁), 2,10 (m, 2H, Gluβ₂).

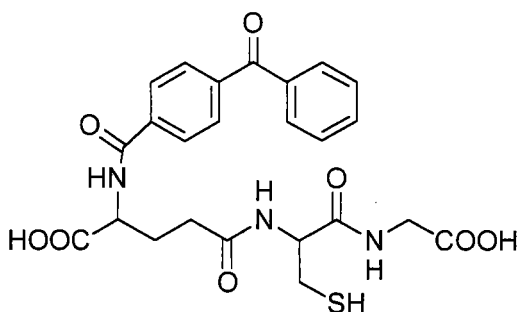
Il manque le signal de Cysα sans doute à cause de l'irradiation du signal de HDO.

RMN ¹³C (D₂O, ppm) : δ_C= 175,69, 171,88, 168,10, 147,24, 141,00, 133,48, 127,16, 120,79, 119,16, 55,17, 52,59, 43,35, 38,48, 31,74, 27,28.

Mode opératoire : synthèse du composé 53

Sous atmosphère d'argon, à 0,0098 mmoles (10mg) de N,N'-Bis-(4-benzoylbenzoyl)glutathion disulfure (41) en solution dans 200 µL d'eau distillée désoxygénée par ultrason sont ajoutés 5 équivalents (0,049 mmoles, 7,56 mg) de dithiothréitol (dt). L'agitation à température ambiante est maintenue pendant 6 heures. L'eau est évaporée sous pression réduite et le résidu est purifié sur gel de silice avec un mélange eau/acétonitrile pour éluant.

N-(4-benzoylbenzoyl)glutathion (53)



Aspect: solide beige.

Rendement : 76%.

RMN ¹H (D₂O, ppm) : δ_H= 7,97-7,86 (m, 6H), 7,80 (d, 1H), 7,67-7,64 (t, 2H), 4,58 (t, 1H, Cysα, t, 1H, Gluα), 3,77 (s, 2H, Gly), 2,94-2,92 (d, 2H, Cysβ), 2,59 (m, 2H, Gluβ), 2,20 (m, 1H, Gluβ₁), 2,10 (m, 1H, Gluβ₂).

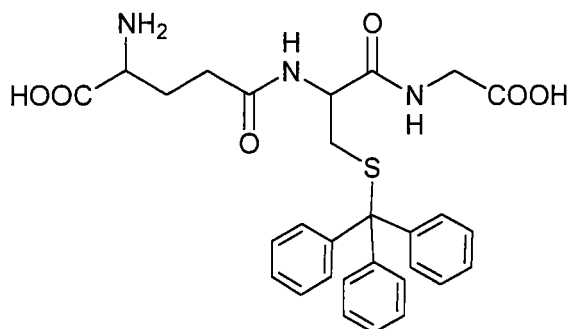
RMN ¹³C (D₂O, ppm) : δ_C= 200,03, 175,69, 171,72, 169,34, 139,71, 137,33, 136,33, 133,83, 130,40, 130,37, 128,60, 127,32, 55,42, 55,04, 42,72, 32,15, 27,01, 25,61.

Mode opératoire : synthèse du composé 40

A 1 mmol (307 mg) de GSH en suspension dans 1 mL d'acide acétique glacial est ajouté 1 équivalent (1 mmol, 260 mg) de triphénylméthanol (alcool tritylique). Le mélange réactionnel est chauffé à 50°C pendant 6 heures. Une fois revenu à température ambiante l'acide acétique

est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur gel de silice avec un mélange acétonitrile /eau (9/1, v/v).

S-(trityl)glutathion (**40**)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 60%.

$R_f = 0,34$ (eau/acétonitrile, 1/4, v/v).

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,49\text{-}7,46$ (m, 6H), $7,33\text{-}7,30$ (m, 9H), $4,00$ (t, 1H, Cys α), $3,74$ (m, 3H, Glu α + Gly α), $2,73$ (d, 2H, Cys β), $2,48$ (m, 2H, Glu γ), $2,16$ ((m, 2H, Glu β).

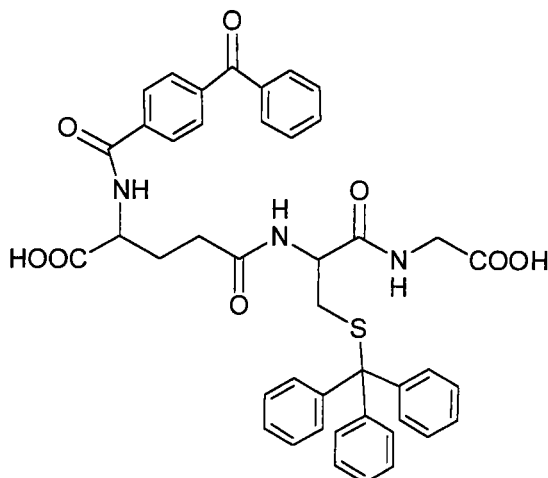
RMN ^{13}C (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{C}} = 175, 40, 174,08, 173,92, 171,24, 144,14, 129,32, 128,11, 126,95, 66,99, 54,67, 54,15, 43,13, 33,18, 31,57, 26,32$.

Mode opératoire : N-acylation du GSH-S-Trityl (**40**)

A $0,09$ mmol ($49,4$ mg) de glutathion S-Trityl (**40**) dissoutes dans un mélange eau distillée (550 μL) / acétonitrile distillé (1500 μL) sont ajoutés 3 équivalents de Et_3N distillée. Après 5 minutes d'agitation à température ambiante sont ajoutés 1,1 équivalents ($0,099$ mmol) d'ester hydroxysuccinimique. Le mélange réactionnel est agité 24 heures à température ambiante puis purifié sur gel de silice avec comme éluant un mélange acétonitrile/eau (9/1, v/v).

Pour les réactions concernant les azotures d'aryle ou la diazirine l'agitation se fait à l'abri de la lumière.

N-(4benzoylbenzoyl)-S-(trityl)glutathion (54)



Aspect: solide blanc.

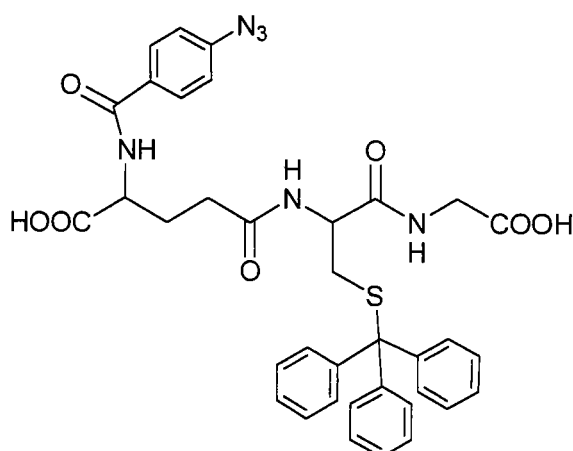
Rendement : 65%.

$R_f = 0,62$ (eau/acétonitrile, 1/4, v/v).

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,88$ (m, 2H), 7,59 (m, 5H), 7,39 (m, 2H), 7,24 (m, 6H), 7,09 (m, 9H), 4,57 (m, 1H, Cys α), 4,00 (m, 1H, Glu α), 4,70 (m, 2H, Gly α), 2,59 (m, 2H, Cys β), 2,48 (m, 3H, Glu γ + Glu β_1), 2,09 (m, 1H, Glu β_2).

MALDI-TOF : 758 (M+H), 780 (M+Na), 796 (M+K).

N-(4-azidobenzoyl)-S-(trityl)glutathion (55)

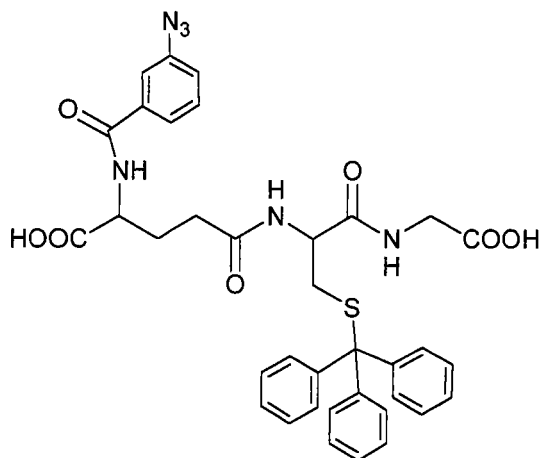


Aspect: solide blanc.

Rendement : 55%.

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,81$ (d, 2H), 7,70-7,30 (m, 15H), 7,20 (d, 2H), 4,57 (m, 1H, Cys α), 4,00 (m, 1H, Glu α), 4,70 (m, 2H, Gly α), 2,70 (m, 2H, Cys β), 2,48 (m, 2H, Glu γ), 2,40 (m, 1H, Glu β_1), 2,09 (m, 1H, Glu β_2).

N-(3-azidobenzoyl)-S-(trityl)glutathion (56)

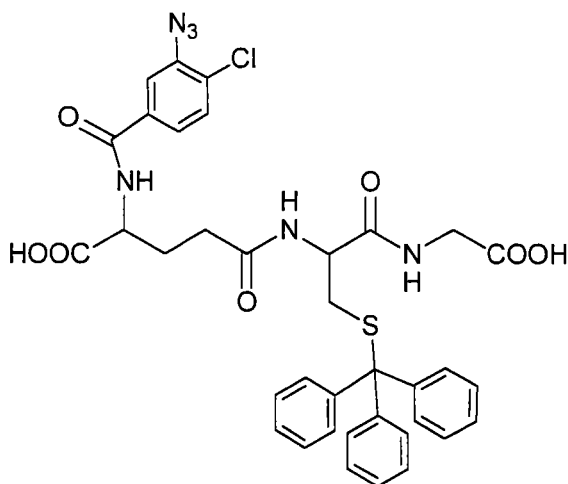


Aspect: solide blanc.

Rendement : 35%.

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,60$ -7,30 (m, 18H), 4,40 (m, 1H, Cys α), 3,90 (m, 1H, Glu α), 3,60 (m, 2H, Gly α), 2,70 (m, 2H, Cys β), 2,48 (m, 2H, Glu γ), 2,30 (m, 1H, Glu β_1), 2,09 (m, 1H, Glu β_2).

N-(3-azido-4-chlorobenzoyl)-S-(trityl)glutathion (58)

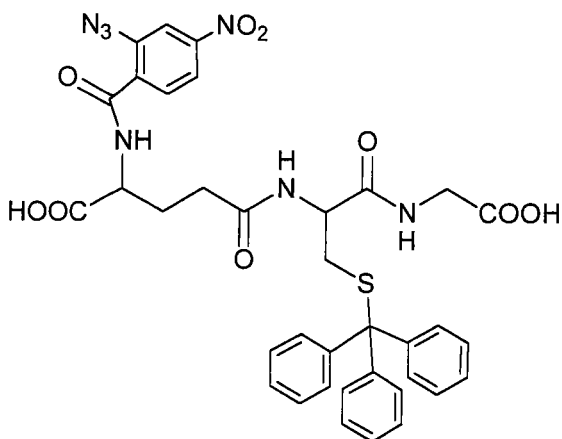


Aspect: solide blanc.

Rendement : 63%.

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,88$ (m, 2H), 7,59 (m, 5H), 7,39 (m, 2H), 7,24 (m, 6H), 7,09 (m, 9H), 4,57 (m, 1H, Cys α), 4,00 (m, 1H, Glu α), 4,70 (m, 2H, Gly α), 2,59 (m, 2H, Cys β), 2,48 (m, 3H, Glu γ + Glu β_1), 2,09 (m, 1H, Glu β_2).

N-(2-azido-4-nitrobenzoyl)-S-(trityl)glutathion (59)

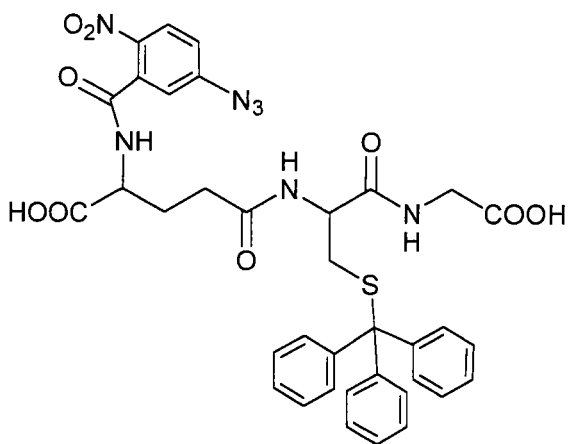


Aspect: solide jaune pâle.

Rendement : 48%.

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 8,10$ (s, 1H), 8,05 (d, 1H), 7,83 (d, 1H), 7,43 (m, 15H), 4,45 (m, 1H, Cys α), 3,85 (m, 1H, Glu α), 3,75 (m, 2H, Gly α), 2,70 (m, 2H, Cys β), 2,48 (m, 2H, Glu γ), 2,37 (m, 1H, Glu β_1), 2,09 (m, 1H, Glu β_2).

N-(3-azido-6-nitrobenzoyl)-S-(trityl)glutathion (60)



Aspect: solide jaune pâle.

Rendement : 66%.

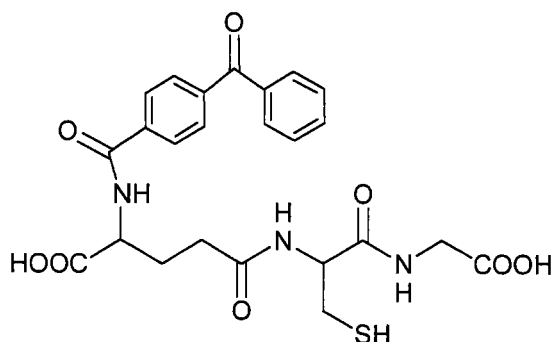
$R_f = 0,43$ (eau-acétonitrile, 1/1, v/v).

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 8,25$ (d, 1H), 7,60-7,25 (m, 17H), 4,45 (m, 1H, Cys α), 3,85 (m, 1H, Glu α), 3,75 (m, 2H, Gly α), 2,78 (m, 2H, Cys β), 2,48 (m, 2H, Glu γ), 2,37 (m, 1H, Glu β_1), 2,09 (m, 1H, Glu β_2).

Mode opératoire : déprotection du groupement trityle

A 0,026 mmol (19,7 mg) de N-acyl-S-(trityl)glutathion en solution dans un mélange CH_2Cl_2 (1 mL)/ acide trifluoroacétique ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, 0,5 mL) sont ajoutés 2 équivalents (0,052 mmol, 6 mg, 8 μL) de triéthylsilane (Et_3SiH). Après 1 heure 30 minutes d'agitation à température ambiante le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice avec comme éluant un mélange acétonitrile/eau (9/1, v/v).

N-(4benzoylbenzoyl)glutathion (53)



Aspect: solide beige.

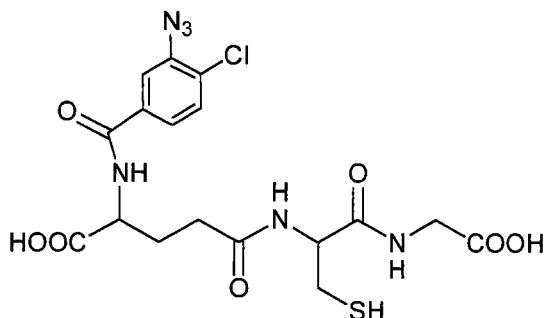
Rendement : 71%.

$R_f = 0,46$ (eau/acétonitrile, 1/4, v/v).

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,97-7,86$ (m, 6H), 7,80 (d, 1H), 7,67-7,64 (t, 2H), 4,60 (t, 1H, Cys α), 4,57 (t, 1H, Glu α), 3,75 (s, 2H, Gly), 2,96-2,94 (d, 2H, Cys β), 2,60-2,58 (m, 2H, Glu β), 2,40 (m, 1H, Glu β_1), 2,20 (m, 1H, Glu β_2).

RMN ^{13}C (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{C}} = 200,06, 175,80, 175,66, 171,55, 169,37, 139,69, 137,46, 136,36, 133,83, 130,42, 130,39, 128,62, 127,33, 55,45, 55,42, 43,24, 32,25, 27,23, 25,67$.

N-(3-azido-4-chlorobenzoyl)glutathion (64)



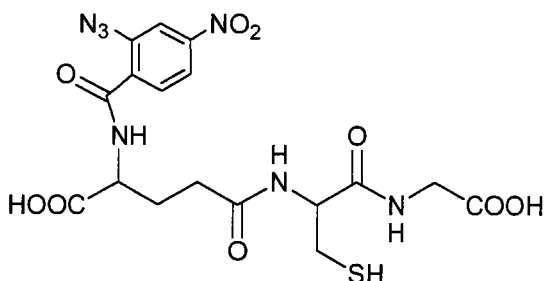
Aspect: solide blanc.

Rendement : 75%.

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,78$ (s, 1H), 7,63-7,59 (m, 2H), 4,60 (t, 1H, Cys α), 4,45 (q, 1H, Glu α), 3,70 (s, 2H, Gly), 2,96-2,94 (d, 2H, Cys β), 2,59 (m, 2H, Glu β), 2,35 (m, 1H, Glu β_1), 2,20 (m, 1H, Glu β_2).

RMN ^{13}C (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{C}} = 176,09, 175,83, 171,46, 168,15, 137,52, 133,44, 130,75, 127,71, 124,37, 118,82, 55,54, 55,40, 43,21, 32,33, 27,13, 25,77$.

N-(2-azido-4-nitrobenzoyl)glutathion (65)



Aspect: solide jaune.

Rendement : 74%.

RMN ^1H (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 8,31$ (s, 1H), 8,17 (d, 1H), 7,96-7,92 (d, 1H), 4,62 (t, 1H, Cys α), 4,49 (m, 1H, Glu α), 3,79 (s, 2H, Gly), 2,97 (d, 2H, Cys β), 2,61 (m, 2H, Glu β), 2,40 (m, 1H, Glu β_1), 2,20 (m, 1H, Glu β_2).

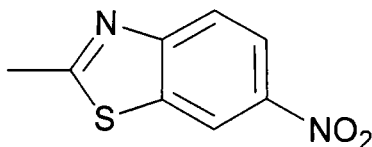
RMN ^{13}C (D_2O , ppm) : $\delta_{\text{C}} = 175,69, 171,91, 162,70, 149,52, 139,37, 130,99, 119,68, 114,78, 111,77, 55,47, 52,43, 43,35, 32,04, 27,46, 25,67$.

Mode opératoire : synthèse du composé 68

50 mmol de 2-méthylbenzothiazole (7,45 g) sont dissoutes dans 25 mL d'acide sulfurique concentré. Le mélange réactionnel est refroidit par un bain de glace et maintenu à une

température inférieure à 5°C tout au long de l'ajout des 2,1 mL d'acide nitrique fumant ($d=1,544$ g/mL). L'agitation est maintenue pendant 30 min à cette température et ensuite le mélange réactionnel est décomposé dans un mélange glace/eau. Le précipité est filtré et lavé abondamment à l'eau. Le solide est ensuite recristallisé dans de l'éthanol à 95%.

2-méthyl-6-nitrobenzothiazole (68)



Aspect: solide jaune.

Rendement : 50%.

Point de fusion : 164-167°C (Litt. 167-169°C)¹⁴⁶.

$R_f=0,42$ (AcOEt-Cyclohexane, 1/4, v/v).

RMN ¹H (CDCl₃, ppm) : $\delta_H=9,10$ (s, 1H), 8,32-8,28 (d, 1H), 8,10-8,06 (d, 1H), 2,88 (s, 3H).

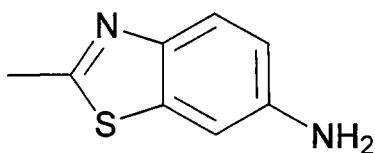
RMN ¹³C CDCl₃, ppm) : $\delta_C=174,71, 156,96, 144,30, 136,11, 122,47, 121,53, 119,22, 20,41$

GCMS : m/z (%)= 194 (100), 164 (31), 148 (58), 107 (41), 63 (83).

Mode opératoire : synthèse du composé 70

A 10 mmol (1,94 g) de 2-méthyl-6-nitrobenzothiazole dissoutes dans 50 mL d'éthanol à 95% sont ajoutés 3 équivalents de zinc (Zn, 30 mmol, 1,96 g) en poudre et 5 équivalents (50 mmol, 2,67 g) de chlorure d'ammonium (NH₄Cl). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 3 heures et filtré à chaud. L'éthanol est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris dans de l'acétate d'éthyle (AcOEt). La phase organique est lavé à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide est recristallisé dans l'éthanol.

6-amino 2-méthyl-benzothiazole (70)



Aspect: solide beige.

Rendement : 75%.

Point de fusion : 277°C (déc.).

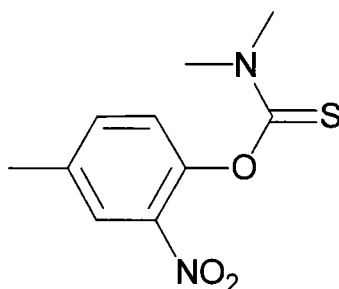
$R_f=0,75$ (AcOEt-Cyclohexane, 1/1, v/v).

GCMS : m/z (%)= 164 (100), 119 (9), 96 (10), 69 (18), 52 (11), 45 (10).

Mode opératoire : synthèse du composé 75

A 10 mmol (1,53 g) de 4-méthyl-2-nitrophénol en solution dans 25 mL de CH₂Cl₂ sont ajoutés 2 équivalents (20 mmol, 2,24 g) de 1,4 diazabicyclo[2-2-2] octane (DABCO) et 2 équivalents (20 mmol, 2,47 g) de chlorure de diméthylthiocarbamoyle. La solution est agitée 24 heures à température ambiante. La phase organique est lavée avec de l'acide chlorhydrique (HCl aqueux) 1N, avec de l'eau puis séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié sur gel de silice avec comme éluant un mélange CH₂Cl₂-cyclohexane (2/3, v/v).

O-(4-méthyl-2-nitrophényl)-N,N-diméthylthiocarbamate (75)



Aspect: solide verdâtre.

Rendement : 75%.

Point de fusion : 136-139°C.

$R_f = 0,87$ (CH₂Cl₂-cyclohexane (3/2, v/v)).

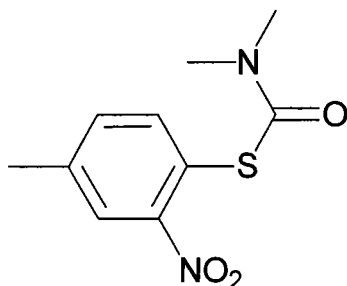
RMN ¹H (CDCl₃, ppm) : $\delta_H = 7,92$ (s, 1H), 7,47-7,44 (d, 1H), 7,15-7,11 (d, 1H), 3,46 (s, 3H), 3,39 (s, 3H), 2,44 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, ppm) : $\delta_C = 186,21, 150,01, 144,98, 136,95, 135,04, 126,14, 125,82, 43,48, 39,01, 20,77$.

Mode opératoire : réarrangement de Newmann-Kwart (composé 76)

Dans un ballon on introduit 10 mmoles (2,4 g) de O-phényl-diméthylthiocarbamate. Le ballon est chauffé dans un bain métallique à 250°C pendant 10 minutes. Après retour à température ambiante le solide obtenu est purifié sur gel de silice avec comme éluant un mélange CH₂Cl₂-cyclohexane (2/3, v/v).

S-(4-méthyl-2-nitrophényl)-N,N-diméthylthiocarbamate (76)



Aspect: solide jaunâtre.

Rendement : 76%.

Point de fusion : 93-96°C.

$R_f = 0,56$ (CH_2Cl_2 -cyclohexane (3/2, v/v)).

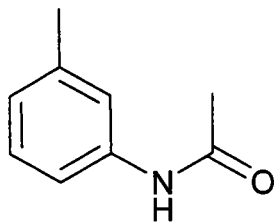
RMN ^1H (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,73$ (s, 1H), 7,57-7,54 (d, 1H), 7,39-7,36 (d, 1H), 3,09-3,01 (br d, 6H, en fait deux 2fois 3H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{C}} = 164,69$, 152,00, 140,92, 138,06, 132,95, 125,15, 120,62, 37,01(2C), 20,97.

Mode opératoire : N-acétylation

A 100 mmol du dérivé de l'aniline en solution dans CH_2Cl_2 est ajouté 2 équivalents (200 mmol, 20,2 g) de Et_3N . Après 5 minutes d'agitation 1,1 équivalents (110 mmol, 11,22 g) d'anhydride acétique sont ajoutés goutte à goutte. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, la phase organique est lavée avec HCl 0,5 M, avec de l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et enfin évaporée sous pression réduite. Le produit est recristallisé dans un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane.

N-acétyl-3-méthylaniline (78)



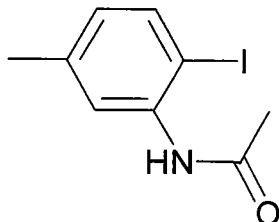
Aspect: solide blanc.

Rendement : 92%.

$R_f = 0,44$ (AcOEt-Cyclohexane, 1/4, v/v).

RMN ^1H (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 8,42$ (br s, 1H, NH), 7,35 (s, 1H), 7,26-7,18 (m, 2H), 6,93-6,90 (d, 1H), 2,32 (s, 3H), 2,15 (s, 3H).

N-acétyl-2-iodo-5-méthylaniline (87)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 89%.

Point de fusion : 152-154°C.

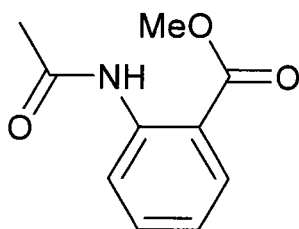
$R_f = 0,46$ (AcOEt/Cyclohexane, 2/3, v/v).

RMN ^1H (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 8,04$ (s, 1H), 7,65-7,61 (d, 1H), 7,36 (br s, 1H, NH), 6,70-6,67 (d, 1H), 2,33 (s, 3H), 2,24 (s, 3H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{C}} = 172,10, 140,20, 139,52, 138,13, 126,94, 122,62, 96, 21,08, 20,70$.

GCMS : m/z (%) = 275 (8), 233 (34), 148 (100), 43 (64).

N-acétylanthranilate de méthyle (92b)



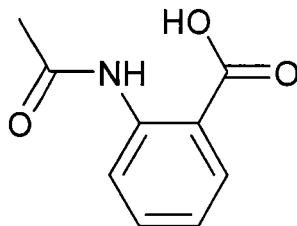
Aspect: solide blanc.

Rendement : 88%.

Point de fusion : 103-104°C.

RMN ^1H (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 11,05$ (br s, 1H, NH), 8,72-8,68 (d, 1H), 8,04-7,99 (d, 1H), 7,57-7,50 (t, 1H), 7,10-7,04 (t, 1H), 3,92 (s, 3H), 2,24 (s, 3H).

Acide N-acétylanthranilique (95)



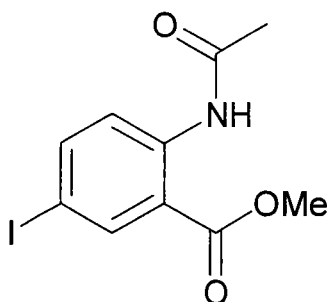
Aspect: solide blanc.

Rendement : 80%.

Point de fusion : 180-182°C(Litt. 184-187°C Acrôs Organics).

RMN ¹H (CDCl₃, ppm) : δ_H= 10,92 (br s, 1H, NH), 8,75-8,72 (d, 1H), 8,14-8,11 (d, 1H), 7,61-7,58 (t, 1H), 7,16-7,10 (t, 1H), 2,27 (s, 3H).

N-acétyl-4-iodo-anthranilate de méthyle (97)



Aspect: solide rose.

Rendement : 83%.

Point de fusion : 133-134°C.

R_f= 0,33 (AcOEt-Cyclohexane, 1/4, v/v).

RMN ¹H (CDCl₃, ppm) : δ_H= 10,97 (br s, 1H, NH), 8,52-8,48 (d, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,82-7,77 (d, 1H), 3,93 (s, 3H), 2,21 (s, 3H).

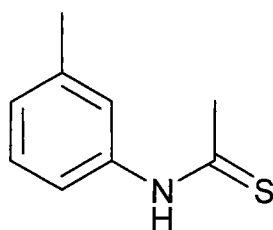
RMN ¹³C (CDCl₃, ppm) : δ_C= 169,08, 167,49, 143,16, 141,21, 139,24, 122,21, 116,55, 84,80, 52,60, 25,52.

GCMS : m/z (%)= 319 (66), 277 (98), 245 (100), 63 (28), 43 (50).

Mode opératoire : synthèse du composé 79

A 30 mmol de N-acétyl-3-méthylaniline dissoutes dans 150 mL de THF anhydre est ajouté 1,12 équivalents (33,6 mmol, 7,47 g) de pentasulfure de phosphore (P₄S₁₀) et 4 équivalents (120 mmol, 10,08 g) d'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO₃). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 4 heures sous atmosphère inerte. Une fois revenu à température ambiante le milieu réactionnel est versé sur 500 g de glace et quand celle-ci a entièrement fondu le précipité est filtrée sur büchner et lavé à l'eau. Le solide est recristallisé dans un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane.

N-thioacétyl-3-méthylaniline (79)



Aspect: solide orangé.

Rendement : 50%.

Point de fusion : 69-71°C.

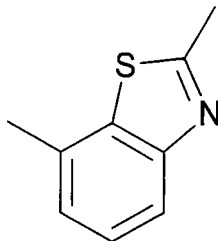
R_f = 0,56 (AcOEt-Cyclohexane, 1/1, v/v).

RMN ¹H (CDCl₃, ppm) : δ_H = 8,61 (br s, 1H, NH), 7,46 (s, 1H), 7,32-6,97 (m, 3H), 2,73 (s, 3H), 2,51 (s, 3H).

Mode opératoire : cyclisation de Jacobsen

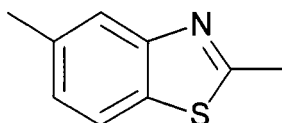
A une solution de NaOH 1,5 M (150 mL) refroidie par un bain de glace sont ajoutées 12 mmol (1,98 g) de thioamide. Ensuite une solution fraîchement préparée de K₃Fe(CN)₆ (20%, 15 mL par gramme de thioamide) est ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 72 heures. Ensuite la phase aqueuse est extraite par CH₂Cl₂ et la phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice avec comme éluant un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane (5/95, v/v). Nous obtenons un mélange de deux produits.

2,7-diméthylbenzothiazole (majoritaire) (80)



RMN ^1H (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,81-7,74$ (d, 1H), $7,39-7,33$ (t, 1H), $7,15-7,12$ (d, 1H), $2,85$ (s, 3H), $2,53$ (s, 3H).

2,5-diméthylbenzothiazole (minoritaire) (74)

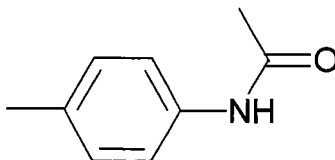


RMN ^1H (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,74$ (s, 1H), $7,69-7,66$ (d, 1H), $7,15-7,12$ (d, 1H), $2,81$ (s, 3H), $2,48$ (s, 3H).

Mode opératoire : synthèse du composé 82a

A 0,5 mol (53,5 g) de p-Toluidine en solution dans 100 mL de benzène anhydre refroidit par un bain de glace est ajouté goutte à goutte 1 équivalent (0,5 mol, 51 g) d'anhydride acétique. L'agitation est maintenue 16 heures à température ambiante. La solution hétérogène est filtrée sur büchner et le solide obtenu est lavé à l'éther de pétrole. Le solide est recristallisé dans un mélange AcOEt/ Cyclohexane.

N-acétyl-4-méthylaniline (82a)



Aspect: solide blanc.

Rendement : 90%.

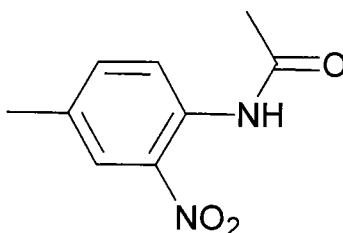
Point de fusion : $149-153^\circ\text{C}$ (Litt. $147-149^\circ\text{C}$)¹⁸⁹.

RMN ^1H (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,51$ (br, 1H, NH), $7,37-7,33$ (d, 2H), $7,10-7,06$ (d, 2H), $2,28$ (s, 3H), $2,12$ (s, 3H).

Mode opératoire : synthèse du composé 82b

A 40 mL d'acide nitrique 80% à température ambiante sont ajoutés par portion 67 mmol (9,98 g) de N-acétylparatoluidine. Après 20 minutes d'agitation 300mL d'eau glacée sont ajoutées et le milieu réactionnel filtré sur büchner. Le solide est lavé plusieurs fois à l'eau et recristallisé dans l'éthanol 95%.

N-acétyl-4-méthyl-2-nitroaniline (82b)



Aspect: solide jaune.

Rendement : 70%.

Point de fusion : 95-98°C (Litt. 91-92°C)¹⁸⁹.

R_f = 0,40 (CH₂Cl₂).

IR: ν = 3355 (NH), 1709 (C=O), 1509, 1344 cm⁻¹ (NO₂).

RMN ¹H (CDCl₃, ppm) : δ_{H} = 10,16 (br, 1H, NH), 8,59-8,55 (d, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,43-7,39 (d, 1H), 2,34 (s, 3H), 2,23 (s, 3H).

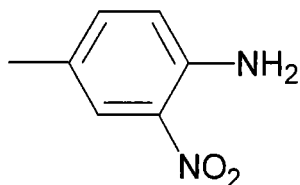
RMN ¹³C (CDCl₃, ppm) : δ_{C} = 168,82, 137,12, 136,65, 133,36, 132,28, 125,32, 122,03, 25,38, 20,38

GCMS : m/z (%) = 194 (20), 152 (100), 106 (46), 77 (26), 43 (80).

Mode opératoire : synthèse du composé 82

Dans un ballon contenant 4,5 mL d'eau et 27 mL d'éthanol 3g (0,053 mol) de KOH sont ajoutés. A température ambiante 0,5 équivalent (0,027 mol, 4 g) de N-acétyl-2-nitroparatoluidine sont mis en réaction par portion. Ensuite le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 1 heure, une fois celui-ci revenu à température ambiante 50 mL d'eau sont ajoutés. Le milieu réactionnel est alors filtré sur büchner et le solide lavé plusieurs fois à l'eau. Le solide est recristallisé dans l'éthanol 95%.

4-méthyl-2-nitroaniline (82)



Aspect: solide rouge-orangé.

Rendement : 91%.

Point de fusion : 119-122°C (Litt. 114-115°C)¹⁸⁹.

R_f = 0,71 (CH₂Cl₂).

IR: $\nu = 3468/3341$ (NH₂), 1636, 1593, 1511/1245 cm⁻¹ (NO₂).

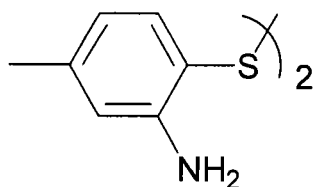
RMN ¹H (CDCl₃, ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,92$ (s, 1H), 7,21-7,17 (d, 1H), 6,74-6,71 (d, 1H), 5,92 (br, 2H, NH₂), 2,27 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, ppm) : $\delta_{\text{C}} = 142,61, 137,10, 131,96, 126,61, 125,29, 118,68, 20,00$.

GCMS : m/z (%) = 152 (100), 122 (4), 106 (56), 94 (12), 77(62).

Mode opératoire : synthèse du composé 84

A 10 mmol (1,94 g) de 5-méthyl-1-nitro-2-thiocyanobenzène (**83**) en solution dans 75 mL de THF anhydre refroidit par un bain de glace sont ajoutés par portion 5 équivalents (50 mmol, 1,9 g) de LiAlH₄. Le mélange réactionnel est agité 3 heures à reflux, puis après être revenu à température ambiante refroidit par un bain de glace et les hydrures sont traités par ajout goutte à goutte d'une solution d'acide tartrique 1N. Après avoir ajouté 300 mL d'eau, la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le thiol obtenu s'est rapidement oxydé en son disulfure correspondant.



Aspect: solide rouge-orangé.

Rendement : 50%.

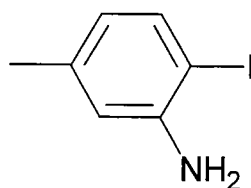
RMN ¹H (CDCl₃, ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,07-7,04$ (d, 1H), 6,54 (s, 1H), 6,44-6,40 (d, 1H), 4,00 (br, 2H, NH₂), 2,25 (s, 3H).

GC-MS : m/z = 276.

Mode opératoire : synthèse du composé 86

A 3,8 mmol (0,99 g) de 4-iodo-3-nitrotoluène dissoutes dans 30 mL d'éthanol à 95% sont ajoutés 4 équivalents (15,2 mmol, 2,65 g) de dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 4 heures et une fois revenu à température ambiante il est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. L'amine obtenue sera mise en réaction sans purification supplémentaire.

2-iodo-5-méthylaniline (86)



Aspect: huile rouge-orangé.

Rendement : 60%.

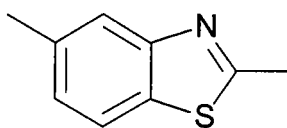
$R_f = 0,75$ (AcOEt/Cyclohexane, 2/3, v/v).

RMN ^1H (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 8,04$ (s, 1H), 7,52-7,49 (d, 1H), 7,45-7,42 (d, 1H), 2,47 (s, 3H).

Mode opératoire : synthèse du composé 74

Sous argon à 0,18 mmol (50 mg) de **87** en solution dans du toluène (2 mL) anhydre est ajouté 1 équivalent du réactif de Lawesson (0,18 mmol, 80 mg). Le milieu réactionnel est chauffé à 80°C pendant 2 heures. Une fois revenu à température ambiante le milieu réactionnel est filtré puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Les analyses sont effectuées sur le produit brut.

2,5-diméthylbenzothiazole (74)



Aspect: huile rouge-orangé.

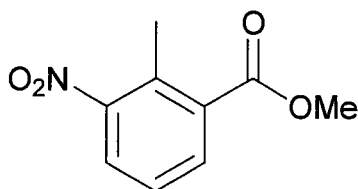
Rendement : 50%.

RMN ^1H (CDCl_3 , ppm) : $\delta_{\text{H}} = 7,74$ (s, 1H), 7,69-7,66 (d, 1H), 7,15-7,12 (d, 1H), 2,81 (s, 3H), 2,48 (s, 3H).

Mode opératoire : synthèse du composé 94

A 30 mmol (5,43 g) d'acide 2-méthyl-3-nitrobenzoïque en solution dans 100 mL de MeOH sont ajoutés à température ambiante 1,05 équivalents de SOCl₂. Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 3 heures, puis une fois revenu à température ambiante il est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans CH₂Cl₂ et la phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. L'ester est mis en réaction sans purification particulière.

2-méthyl-3-nitrobenzoate de méthyle (94)



Aspect: solide beige.

Rendement : 79%.

Point de fusion : 70-73°C (Litt. 66°C)¹⁸⁹.

R_f = 0,76 (AcOEt-Cyclohexane, 1/1, v/v), R_f = 0,52 (AcOEt-Cyclohexane, 1/4, v/v).

RMN ¹H (CDCl₃, ppm) : δ_H = 8,00-7,97 (d, 1H), 7,86-7,82 (d, 1H), 7,41-7,35 (t, 1H), 3,94 (s, 3H), 2,62 (s, 3H).

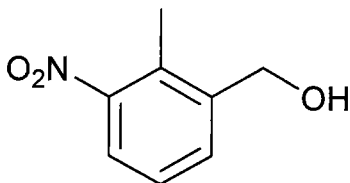
RMN ¹³C (CDCl₃, ppm) : δ_C = 166,82, 133,56, 133,34, 133,02, 126,66, 126,37, 52,57, 16,14.

GCMS : m/z (%) = 195 (30), 164 (72), 91 (100).

Mode opératoire : synthèse du composé 100

A 15 mmol (2,93 g) de 3-nitro-2-méthyl-benzoate de méthyle en solution dans 75 mL de Et₂O anhydre refroidit par un bain de glace sont ajoutés par portion 2 équivalents (30 mmol, 1,14g). de LiAlH₄. Le mélange réactionnel est agité 2 heures à température ambiante, puis refroidit par un bain de glace et les hydrures sont traités par ajout goutte à goutte d'une solution 1N d'acide tartrique. La phase organique est ensuite lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. L'alcool obtenu sera mis en réaction sans purification particulière.

Alcool 2-méthyl-3-nitrobenzylique (100)



Aspect: solide orange.

Rendement : 60%.

Point de fusion : 56-59°C.

R_f = 0,42 (AcOEt-Cyclohexane, 1/1, v/v).

RMN ¹H (CDCl₃, ppm) : δ_H = 7,74-7,70 (d, 1H), 7,67-7,64 (d, 1H), 7,37-7,30 (t, 1H), 4,78 (s, 2H), 2,45 (s, 3H).

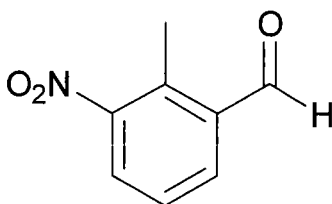
GCMS : m/z (%) = 167 (6), 150 (42), 132 (100).

Mode opératoire : synthèse du composé 98

A 10 mmol (1,67g) d'alcool 3-nitro-2-nitro-benzylique dissoutes dans 25 mL de CH₂Cl₂ refroidi par un bain de glace est ajouté 1 équivalent de PCC. Le mélange réactionnel est agité deux heures à température ambiante, dilué avec Et₂O puis filtré sur célite. La phase organique est évaporée sous pression réduite et est mis en réaction sans purification supplémentaire.

Préparation du pcc: 0,25 mol de trioxyde de chrome est ajoutée sous forte agitation à 46 mL d'une solution de HCl 6M. Après 3 minutes le mélange réactionnel est refroidit par un bain de glace et 1 équivalent de pyridine est ajouté goutte à goutte sur une période de 10 minutes. Le chlorochromate de pyridine est filtré sur büchner et séché pendant une heure sur pentaoxyde de phosphore et sous pression réduite. Le PCC est mis en réaction sans purification particulière.

Aldéhyde 2-méthyl-3-nitrobenzoïque (98)



Aspect: solide jaune clair.

Rendement : 90%.

Point de fusion : 53-57°C.

$R_f = 0,36$ (AcOEt-Cyclohexane, 1/4, v/v).

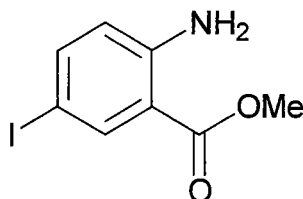
RMN ^1H (CDCl_3 , ppm): $\delta_{\text{H}} = 10,42$ (s, 1H), 8,07-8,03 (d, 1H), 7,98-7,95 (d, 1H), 7,55-7,49 (t, 1H), 2,77 (s, 3H).

GCMS : m/z (%) = 165 (15), 148 (21), 91 (70), 65 (100).

Mode opératoire : synthèse du composé 99

A 50 mmol (7,55 g) d'anthranilate de méthyle en suspension dans 62,5 mL d'eau est ajouté 5 mL d'acide chlorhydrique concentré. La solution est amenée à 20°C. Une solution de chlorure d'iode est préparée en ajoutant un équivalent (50 mmol, 8,13 g) de chlorure d'iode (I-Cl) à une solution contenant 9 mL d'acide chlorhydrique concentré et 31,25 mL d'eau. Cette solution est amenée à 5°C en ajoutant de la glace. La solution de I-Cl est rapidement ajoutée à la solution d'anthranilate de méthyle. Le milieu réactionnel est agité une heure à température ambiante et est filtré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'eau froide et est recristallisé dans un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane.

4-iodoanthranilate de méthyle (99)



Aspect: solide marron.

Rendement : 77%.

Point de fusion : 184-186°C.

$R_f = 0,52$ (AcOEt-Cyclohexane, 1/4, v/v).

GCMS : m/z (%) = 277 (100), 245 (73), 150 (3).

Mode opératoire : synthèse du composé 102

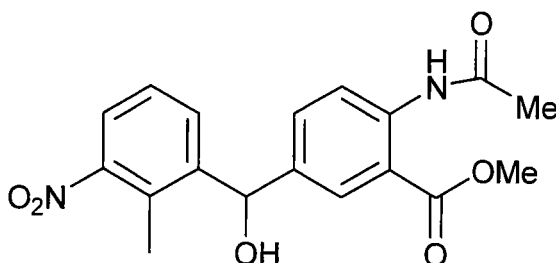
Sous argon, à -20°C, à 5 mmol (1,59g) de N-acétyl-4-iodo-anthranilate de méthyle dans 10 mL de THF anhydre est ajouté goutte à goutte 1,1 équivalents (5,5 mmol) de bromure d'isopropylmagnésium en solution dans Et_2O anhydre. Après 1 heure à -20°C est ajouté 1,5 équivalents (7,5 mmol, 1,24 g) d'aldéhyde 2-méthyl-3-nitrobenzoïque en solution dans du THF anhydre. Le milieu réactionnel est amené à température ambiante sur un période de 45 minutes. La réaction est terminée par l'ajout de 5 mL de MeOH. Ensuite le milieu réactionnel est décomposé sur 25 mL d'eau et la phase aqueuse extraite avec AcOEt. La phase organique

est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice avec comme éluant un mélange AcOEt-Cyclohexane (3/7, v/v).

Préparation du bromure d'isopropylmagnésium :

Sous argon, à 450 mmol (10,8 g) de tournures de magnésium en suspension dans 50 mL de Et₂O anhydre est ajouté goutte à goutte 0,33 équivalent (150 mmol, 18,5 g) de 2-bromopropane en solution dans 200 mL de Et₂O anhydre. Dès que Et₂O se trouble et qu'il se produit un léger reflux, un cristal de diiode est ajouté. Après l'ajout de 2-bromopropane l'agitation est maintenue 2 heures à température ambiante. La concentration de la réaction est déterminée par la méthode de Paquette. (Lin, H. S.; Paquette, L. *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 2503.)

N-acétyl-5-[(2'-méthyl-3'-nitrophényl)(hydroxy)méthyl]anthranilate de méthyle (102)

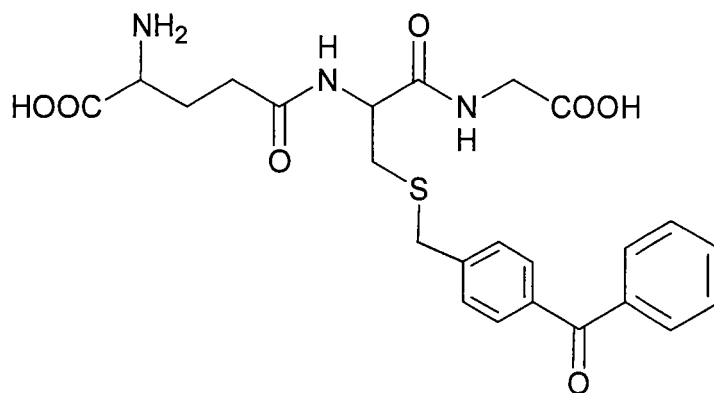


Aspect: solide blanc.

Rendement : 15%.

RMN ¹H (CDCl₃, ppm): δ_H= 10,40 (br s, 1H), 8,91-8,87 (d, 1H), 8,45-8,38 (m, 2H), 7,90-7,79 (m, 3H), 3,97 (s, 3H), 2,31 (s, 3H), 2,21 (s, 3H).

GSBB



RMN ^1H (D_2O , ppm): $\delta_{\text{H}} = 7,87\text{-}7,60$ (m, 9H), 4,53 (m, 1H, Cys α), 3,97 (s, 2H, CH_2 benzylique), 3,84-3,82 (m, 3H, Glu α + Gly α), 3,10-3,2,92 (m, 2H, Cys β), 2,57 (t, Glu γ), 2,22 (m, 2H, Glu β).

RMN ^{13}C (D_2O , ppm): $\delta_{\text{C}} = 200,48, 174,83, 173, 99, 171,83, 144,32, 136,92, 135,74, 133,53, 130,92, 130,28, 129,05, 128,63, 54,22, 53,03, 43,44, 35,51, 32,75, 31,52, 26,31$.

MALDI-TOF : 502 (M+H).

Bibliographie

- 1 Boyland, E.; Chasseaud, L. F. *Adv. Enzymol.* **1969**, 32, 173.
- 2 Meister, A. *Science* **1983**, 220, 472.
- 3 Meister, A.; Anderson, M. E. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, 52, 711.
- 4 Anderson, M. E. *Chemico-Biol. Inter.* **1998**, 111-112, 1.
- 5 Binkley, F.; Nakamura, K. *J. Biol. Chem.* **1948**, 173, 411.
- 6 Hanigan, M. H.; Pitot, H. C. *Carcinogenesis* **1985**, 6, 165.
- 7 Meister, A. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 17205.
- 8 Hayes, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I. R. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, 45, 51.
- 9 Hammond, C. L.; Lee, T. K.; Ballatori, N. *J. Hepatology* **2001**, 34, 946.
- 10 Schultz, M.; Dutta, S.; Tew, K. D. *Advanced Drug Delivery* **1997**, 26, 91.
- 11 Tew, K. D. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2005**, 14, 1.
- 12 Müller, J. G.; Bücheler, U. S.; Kayser, K.; Schirmer, R. H.; Werner, D.; Krauth-Siegel, R. L. *Cellular and Molecular Biology* **1993**, 39, 389.
- 13 Deponce, M.; Urig, S.; Arscott, L. D.; Fritz-Wolf, K.; Reau, R.; Herold-Mende, C.; Koncarevic, S.; Meyer, M.; Davioud-Charvet, E.; Ballou, D. P.; Williams, C. H. Jr; Becker, K. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 20628.
- 14 Dehalle, S.; Duvoix, A.; Schnekenburger, M.; Morceau, F.; Dicato, M.; Diederich, M. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2003**, 1010, 1.
- 15 Hall, A. G. *Eur. J. Clin. Invest.* **1999**, 29, 238.
- 16 Lim, M. L. R.; Lum, M.; Hansen, T. M.; Roucou, X.; Nagley, P. *J. Biomed. Sci.* **2002**, 9, 488.
- 17 Voehringer, D. W.; McConkey, D. J.; McDonnell, T. J.; Brisbay, S.; Meyn, R. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 2956.
- 18 O'Neill, J.; Manion, M.; Schwartz P., Hockenbery, D. M. *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**, 1705, 43.
- 19 Hentze, H.; Latta, M.; Künstle, G.; Lucas R.; Wendel A. *Toxicology Lett.* **2003**, 139, 111.

Chapitre I

- 20 Dorman, G.; Prestwich, G.D. *Trends Biotechnol.* **2000**, 18, 64.

- 21 Hosoya, T.; Hiramatsu, T.; Ikemoto, T.; Nakanishi, M.; Aoyama, H.; Hosoya, A.; Iwata, T.; Maruyama, K.; Endo, M.; Suzuki, M. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 327.
- 22 Ovaas, H.; van Swieten, P. F.; Kessler, B. M.; Leeuwenburgh, M. A.; Fiebiger, E.; van den Nieuwendijk, A. M. C. H.; Galardy, P. J.; van der Marel, G. A.; Ploegh, H. L.; Overkleeft, H. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3626.
- 23 Lemieux, G. A.; de Graffenried, C. L.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708.
- 24 Rademann, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4554.
- 25 Kellam, B.; De Bank, P. A.; Shakesheff, K. M. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 327.
- 26 Hodgson, D. R. W.; Sanderson, J. M. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 422.
- 27 Wieland, T.; Bokelmann, E.; Bauer, L.; Lang, H.U.; Lau, H. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *586*, 129.
- 28 Lu, W.; Qasim, M. A.; Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8518.
- 29 Lovrinovic, M.; Spengler, M.; Deutsch, C.; Niemeyer, C. M. *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 64.
- 30 Yeo, D.S.Y.; Srinivasan, R.; Chen, G.Y.J.; Yao, S.Q. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4664.
- 31 Saxon, E.; Luchansky, S.J.; Hang, H.C.; Yu, C.; Le, S.C.; Bertozzi, C.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893.
- 32 Saxon, E.; Bertozzi, C.R. *Science* **2000**, *287*, 207. Lemieux, G.A.; Bertozzi, C.R. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 506.
- 33 Horney, M. J.; Evangelista, C. A.; Rosenzweig, S. A. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2880.
- 34 Cartwright, I.L.; Hutchinson, D.W.; Armstrong, V.W. *Nucleic Acid Res.* **1976**, *3*, 2331.
- 35 Staros, J.V.; Bayley, H.; Standring, D.N.; Knowles, J.R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *80*, 568.
- 36 Evans, R.K. *Biochemistry* **1987**, *26*, 269.
- 37 Brunner, J.; Senn, H.; Richards, F. M. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313.
- 38 Tate, J. J.; Persinger, J.; Bartholomew, B. *Nucl. Ac. Res.* **1998**, *26*, 1421.
- 39 Flemming, S.A. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479.
- 40 Dorman, G.; Prestwich, G.D. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 5661.
- 41 Saviano, M.; Improta R.; Benedetti E.; Carrozzini B.; Cascarano G. L.; Didierjean C.; Toniolo C.; Crisma M. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 541.
- 42 Burg, D.; Hameetman, L.; Filippov, D. V.; Van der Marel, G. A.; Mulder, G. J. *Bioorg Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1579.
- 43 Burg, D.; Filippov, D. V.; Hermanns, R.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Mulder, G. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 195.
- 44 Burg, D.; Wielinga, P.; Zelcer, N.; Saeki, T.; Mulder, G. J.; Borst, P. *Mol. Pharmacol.*

2002, 62, 1160.

- 45 Lucente, G.; Luisi, G.; Pinnen, F. *Il Farmaco* **1998**, 53, 721.
- 46 Seddon, A. P.; Bunni, M.; Douglas, K. T. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1980**, 95, 446.
- 47 Quian, Y.; Grant, C. E.; Westlake, C. J.; Zhang, D.; Lander, P. A.; Shepard, R. L.; Dantzig, A. H.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 35225.
- 48 Furuta, K.; Tomokiyo, K.; Kuo, M. T.; Ishikawa, T.; Suzuki, M. *Tetrahedron* **1999**, 55, 7529.
- 49 Vince, R.; Daluge, S.; Wadd, W. B. *J. Med. Chem.* **1971**, 14, 402.
- 50 Murthy, N. S. R. K.; Bakeris, T.; Kavarana, M. J.; Hamilton, D. S.; Lan, Y.; Creighton, D. *J. J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2161.
- 51 Levy, E. J.; Anderson, M. E.; Meister, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 9171.
- 52 Furuta, K.; Hosoya, T.; Tomokiyo, K.; Okuda, S.; Kuniyasu, A.; Nakayama, H.; Ishikawa, T.; Suzuki, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2661.
- 53 Seddon, A. P.; Douglas, K. T. *FEBS Lett.* **1980**, 110, 262.
- 54 Al-Timari, A.; Douglas, K. T. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 870, 160.
- 55 Douglas, K. T.; Al-Timari, A.; D'Silva, C.; Gohel, D. I. *Biochem. J.* **1982**, 207, 323.
- 56 D'Silva, C.; Seddon, A.P.; Douglas, K.T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, 3029.
- 57 Karwatsky, J.; Daoud, R.; Cai, J.; Gros, P.; Georges, E. *Biochemistry*, **2003**, 42, 3286.
- 58 Filomeni, G.; Rotilio, G.; Ciriolo, M.R. *FASEB J.* **2003**, 17, 64.
- 59 Cacciatore, I.; Caccuri, A. M.; Di Stefano, A.; Luisi, G.; Nalli, M.; Pinnen, F.; Ricci, G.; Sozio, P. *Il Farmaco* **2003**, 58, 787.
- 60 Amssoms, K.; Oza, S. L.; Ravaschino, E.; Yamani, A.; Lambeir, A. M.; Rajan, P.; Bal, G.; Rodriguez, J. B.; Fairlamb, A. H.; Augustyns, K.; Haemers, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2553.
- 61 Amssoms, K.; Oza, S. L.; Augustyns, K.; Yamani, A.; Lambeir, A. M.; Bal, G.; Van der Veken, P.; Fairlamb, A. H.; Haemers, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2703.
- 62 a) Duckert, J. F.; Balas, L.; Rossi, J. C. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 3709. b) O'Brien, M. L.; Vulevic, B.; Freer, S.; Boyd, J.; Shen, H.; Tew, K. D. *J. Pharm. Exp. Ther.* **1999**, 291, 1348.

Chapitre II

- 63 Pérez-Prieto, J.; Stiriba, S. E.; Bosca, F.; Lahoz, A.; Domingo, L. R.; Mourabit, F.; Monti, S.; Miranda, M. A. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 8618.

- 64 Arnold, D. R.; Birtwell, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4599.
- 65 Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Photochem. Photobio. B : Biology* **1998**, *43*, 1.
- 66 Berens, C.; Courtoy, P. J.; Sonveaux, E. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 56.
- 67 Clack, J. L.; Stein, P. J. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2406.
- 68 Thiele, C.; Fahrenholz, F. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2741.
- 69 Williams, N.; Coleman, P. S. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 2834.
- 70 US Patent 5,627,198.
- 71 Abarbri, M.; Thibonnet, J.; Bérillon, L.; Dehmel, F.; Rotländer, M.; Knochel, P., *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4618.
- 72 US Patent 4,282,246.
- 73 US Patent 5,998,433.
- 74 Zu, J.; Wang, X.; Chen, Y.; Jiang, X.; Chen, X.; Li, Z. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6221.
- 75 Gronowitz, S. *Heterocyclic Compounds Thiophene and its Derivatives*, Vol. 44, Part 2, Wiley Interscience, 1986.
- 76 Schlögl, K.; Pelousek, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1962**, *651*, 1.
- 77 Hartough, H. D.; Kosak, A. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 1012.
- 78 Cadamuro S.; Degani I.; Dughera S.; Fochi R.; Gatti A.; Piscopo L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1993**, 273.
- 79 Galardy, R.E.; Craig, L.C.; Jamieson, J.D.; Printz, M.P. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 3510.
- 80 McMahan, S.A.; Burgess, R.R. *Biochemistry* **1994**, *33*, 12092.
- 81 Latli, B.; Tomizawa, M.; Casida, J.E. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 7.
- 82 Mendenhall, G. D.; Smith, P. A. S. *Organic Syntheses, CV 5*, 829.
- 83 Bernardi, D. Synlett **2005**, accepté.
- 84 Nassal, M. *Liebigs Ann. Chem.*, **1983**, 1510.
- 85 Hatanaka, Y.; Nakayama, H.; Kanaoka, Y. *Heterocycles* **1993**, *35*, 997.
- 86 Simons, J.H.; Ramler, E.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*, 389.
- 87 Simons, J. H.; Black, W.T.; Clark, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 5621.
- 88 Cohen, S. G.; Wolosinski, H. T.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 3439.
- 89 Fear, E. J. P.; Throver, J.; Veitch, J. *J. Chem. Soc.* **1956**, 3199.
- 90 Lahann, J. ; Choi, I. S.; Lee, J.; Jensen, K. F.; Langer, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3166.
- 91 Bégué, J. P. ; Bonnet-Delpon, D. *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 3207.
- 92 Katritzky, A. R.; Suzuki, K.; Singh, S. K. *Arkivoc* **2004**, *i*, 12.
- 93 Green, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd Ed.; Wiley :

New-York, 1991.

- 94 Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3039.
95 Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1839.
96 Latli, B.; Tomizawa, M.; Casida, J. E. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 7.

Chapitre III

- 97 Cavelier, F.; Daunis, J.; Jaquier, R. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1990**, *2*, 210.
98 Nare, B.; Prichard, R. K.; Georges, E. *Mol. Pharm.* **1994**, *45*, 1145.
99 Katritzky, A. R.; Zhang, Y.; Singh, S. K. *Synthesis* **2003**, 2795.
100 Katritzky, A. R.; Shestopalov, A. A.; Suzuki, K. *Synthesis* **2004**, 1806.
101 Viljanen, J.; Tegler, L.; Broo, K. S. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 718.
102 Hiskey, R. G.; Mizoguchi, T.; Igeta, H. *J. Org. Chem.* **1996**, *30*, 1188.
103 Zervas, L.; Photaki, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 3887.
104 Douglas, K. T.; Al-Timari, A.; D'Silva, C.; Gohel, D. I. *Biochem. J.* **1982**, *207*, 323.
105 Zuman, P. *Chem. Rev.* **2004**, *108*, 3217.
106 Lau, S. S.; Hill, B. A.; Highet, R. J.; Monks, T. J. *Molecular Pharmacology* **1988**, *34*, 829.
107 Burg, D.; Hameetman, L.; Filippov, D. V.; van der Marel, G. A.; Mulder, G. J. *Bioorg Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1579.
108 Sokolovsky, M.; Sadeh, T.; Patchornik, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1212.
109 Lyon, R. P.; Hill, J. J.; Atkins, W. M. *Biochemistry* **2003**, *42*, 10418.
110 Maeda, H.; Matsuno, H.; Ushida, M.; Katayama, K.; Saeki, K.; Itoh, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2922.
111 Vince, R.; Wadd, W. B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, *35*, 593.
112 Vince, R.; Daluge, S.; Wadd, W. B. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 402.
113 Vince R., Daluge S.; Wadd W. B. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 35.
114 Radkowsky, A. E.; Kosower, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4527.
115 Furuta, K.; Tomokiyo, K.; Tien Kuo, M.; Ishikawa, T.; Suzuki, M. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 7529.
116 Conchillo, A.; Camps, F.; Messeguer, A. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1728.
117 Burg, D.; Filippov, D. V.; Hermanns, R.; der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Mulder, G. *J. Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 195.
118 Shi, B.; Greaney, M. F. *Chem. Commun.* **2005**, 886.

- 119 Gartner, C. A.; Wen, B.; Wan, J.; Becker, R. S.; Jones II, G.; Gygi, S. P.; Nelson, S. D. *Biochemistry* **2005**, *44*, 1846.
- 120 Murthy, N. S. R. K.; Bakeris, T.; Kavarana, M. J.; Hamilton, D. S.; Lan, Y. Creighton, D. *J. J. Med. Chem* **1994**, *37*, 2161.
- 121 Grillo, M. P.; Benet, L. Z. *Drug. Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 55.
- 122 Gelinsky, M.; Vogler, R.; Vahrenkamp, H. *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *334*, 230.
- 123 Diaz, S.; Gonzalez, A.; Gonzalez de Riancho, S.; Rodriguez, A. *J. Organomet. Chem.* **2000**, *610*, 25.
- 124 Al-Timari, A.; Douglas, K. T. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *870*, 160.
- 125 Douglas, K. T.; Al-Timari, A.; D'Silva, C.; Gohel, D. I. *Biochem. J.* **1982**, *207*, 323.
- 126 Kussmann, M.; Wiehr, D.; Knepper, T.; Przybylski, M. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1993**, *338*, 453.
- 127 Anderson, M. E.; Meister, A. *Anal. Biochem.* **1989**, *183*, 16.
- 128 Levy, E. J.; Anderson, M. E.; Meister, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9171.
- 129 Höfle, G.; Steglich, W.; Vorbrüggen, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, 569.
- 130 Bernardi, D.; Dicko, A.; Kirsch, G. *Synthesis*, accepté.
- 131 Dai, Q.; Piccirilli, J. A. *Org. Lett.* **2004**, 2169.
- 132 Singh, R.; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2332.
- 133 Lees, W. J.; Singh, R.; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 7328.
- 134 Cleland, W. W. *Biochemistry* **1964**, *3*, 480.
- 135 Larock, R. C. *Comprehensive Organic Transformations A Guide To Functional Group Preparations*, VCH Publishers, Inc., 1989, 409.
- 136 Hiskey, R. G.; Adams, J. B. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 1340.
- 137 Velluz, L.; Amiard, J.; Bartos, J.; Goffinet, B.; Heymes, R. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1956**, 1464.
- 138 Carroll, F. I.; Dickson, B. M.; Wal, M. E. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 33.
- 139 Fujii, N.; Otaka, A.; Funakoshi, S.; Bessho, K.; Yajima, H. *Chem. Comm.* **1987**, 163.
- 140 Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L.; Guindon, C. A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739.
- 141 Lee, H. B.; Pattarawarapan, M.; Roy, S.; Burgess, K. *Chem. Commun.* **2003**, 1674.
- 142 Grieco, P.; Campiglia, P.; Gomez-Monterrey, I.; Lama, T.; Novellino, E. *Synlett* **2003**, 2216.
- 143 Kawakami, T.; Akaji, K.; Aimoto, S. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1403.
- 144 Sakowski, J.; Böhm, M.; Sattler, I.; Dahse, H.; Schlitzer, M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*,

2886.

145 Badyal, J.; Cameron, A. M.; Cameron, N. R.; Coe, D. M.; Cox, R.; Davis, B.G.; Oates, L. J.; Oye, G.; Steel, P.G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8531.

Chapitre IV

146 Ward, E. R.; Poesche, W. H. *J. Chem. Soc.* **1961**, 2825.

147 Makosza, M.; Winiarski, J. *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 282.

148 Makosza, M. *Russ. Chem. Rev.* **1989**, *58*, 747.

149 Makosza, M. *J. Pol. Chem.* **1992**, *66*, 1.

150 Makosza, M.; Wojciechowski, K. *Heterocycles* **2001**, *54*, 445.

151 Mudryk, B.; Makosza, M. *Synthesis* **1988**, 1007.

152 Lawrence, N. J.; Liddle, J.; Jackson, D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2002**, 2260.

153 Makosza, M.; Wojciechowski, K. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2631.

154 March, J. *Advanced Organic Chemistry Reactions Mechanisms and Structure*, 4th Ed.; Wiley: New York, 1992, 1216.

155 Larock, R. C. *Comprehensive Organic Transformations A Guide To Functional Group Preparations*, VCH Publishers, Inc., 1989, 411.

156 Ramadas, K.; Srinivasan, N. *Synth. Comm.* **1992**, *22*, 3189.

157 Fenlon, E. E.; Murray, T. J.; Baloga, M. H.; Zimmerman, S. C. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6625.

158 Fuhrer, W.; Gschwend, H. W. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1133.

159 Turner, J. A. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3401.

160 Wynberg, H.; Meijer, E. W. *Org. React.* **1982**, *28*, 1.

161 Tale, R. H. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1641.

162 Molander, G. A. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 29.

163 Nair, V.; Augustine, A. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 543.

164 Warburton, W. K. *Chem. Rev.* **1957**, *57*, 1011.

165 Patil, D. G.; Chedekel, M. R. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 997.

166 Matsuoka, H.; Ohi, N.; Mihara, M.; Suzuki, H.; Miyamoto, K.; Maruyama, N.; Tsuji, K.; Kato, N.; Akimoto, T.; Takeda, Y.; Yano, K.; Kuroki, T. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 105.

167 Newman, M. S.; Karnes, H. A. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3980.

168 Kwart, H.; Evans, R. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 410.

169 Newman, M. S.; Hetzel, F. W. *Org. Synth.* **1971**, *51*, 139.

- 170 Jacobson, P. *Chem. Ber.* **1886**, *19*, 1067.
- 171 Tarbell, D. S.; Fukushima, D. K. *Org. Synth.* **27**, 81.
- 172 Ham, J.; Yang, I.; Kang, H. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3236.
- 173 Roberts, C. F.; Hartley, R. C. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6145.
- 174 Arguello, J. E.; Schmidt, L. C.; Penénory, A. B. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4133.
- 175 Spitulnik, M. J. *Synthesis* **1976**, 730.
- 176 Relles, H.M.; Pizzolato, G. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 2249.
- 177 Wang, H.; Liao, Y.; Guo, Y.; Tang, Q.; Lu, L. *Synlett* **2005**, 1239.
- 178 Weinstock, J.; Gaitanopoulos, D. E.; Stringer, O. D.; Franz, R. G.; Hieble, J. P.; Kinter, L. B.; Mann, W. A.; Flaim, K. E.; Gessner, G. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1166.
- 179 Hutchinson, I.; Chua, M.; Browne, H. L.; Trapani, V.; Bradshaw, T. D.; Westwell, A. D.; Stevens, M. F. G. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1446.
- 180 Jackson, Y. A.; Lyon, M. A.; Townsend, N.; Bellabe, K.; Soltanik, F. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2000**, 205.
- 181 Bromidge, S. M.; Dabbs, S.; Davies, D. T.; Duckworth, D. M.; Forbes, I. T.; Ham, P.; Jones, G. E.; King, F. D.; Saunders, D. V.; Starr, S.; Thewlis, K. M.; Wyman, P. A.; Blaney, F. E.; Naylor, C. B.; Bailey, F.; Blackburn, T. P.; Holland, V.; Kennett, G. A.; Riley, G. J.; Wood, M. D. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1598.
- 182 Schultz, C.; Link, A.; Leost, M.; Zaharevitz, D. W.; Gussio, R.; Sausville, E. A.; Meijer, L.; Kunick, C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2909.
- 183 Thomsen, I.; Clausen, K.; Scheibye, S.; Lawesson, S. O. *Org. Synth.* **1984**, *62*, 158.
- 184 Vara Prasad, J. V. N.; Panapoulos, A.; Rubin, J. R. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4065.
- 185 Downer, N.K.; Jackson, Y.A. *Org. Biol. Chem.* **2004**, *2*, 3039.
- 186 Jendralla, H.; Chen, L. *Synthesis* **1990**, 827.
- 187 Ekhatov, V.; Robinson, C. H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1988**, 3239.
- 188 March, J. *Advanced Organic Chemistry Reactions Mechanisms and Structure*, 4th Ed.; Wiley: New York, 1992, 1208.
- 189 Tietze, L. F.; Eicher, Th. *Reactions and Syntheses in the Organic Chemistry Laboratory*, University Science Books, Mill Valley, California.
- 190 Sakamoto, T.; Kondo, Y.; Uchiyama, M.; Yamanaka, H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 1941.
- 191 a) Loupy, A. *Effets de Milieu en Synthèse Organique : Des Effets de Solvants aux Méthodes d'Activation non classiques*, Dunod : France, 1997, 155. b) Hutchinson, I.; Stevens, M. F. G.; Westwell, A. D. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *41*, 425.

192 Van Zandt, M. C.; Jones, M. L.; Gunn, D. E.; Geraci, L. S.; Jones, H.; Sawicki, D. R.; Sredy, J.; Jacot, J. L.; DiCioccio, A. T.; Petrova, T.; Mitschler, A.; Podjarny, A. D. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3141.

Chapitre V

- 193 Olah, G. A. *Friedel-Crafts Chemistry*, Wiley-Interscience: New-York, 1973.
- 194 Premasagar, V.; Palaniswamy, V. A.; Eisenbraun, E. J. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2974.
- 195 Paul, V.; Sudalai, A.; Daniel, T.; Srinivasan, K. V. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2601.
- 196 Olah, G. A.; Kobayashi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 6964.
- 197 Scheifele, H. J.; DeTar, D. F. *Org. Synth. Coll. Vol. IV*, 34.
- 198 Khadilkar, B. M.; Borkar, S. D. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1641.
- 199 Ayyangar, N. R.; Lahoti, R. J.; Srinivasan, K. V.; Daniel, T. *Synthesis* **1991**, 322.
- 200 Hwang, J. P.; Surya Prakash, G. K.; Olah, G. A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7199.
- 201 Desmurs, J. R.; Labrouillère, M.; Le Roux, C.; Gaspard, H.; Laporterie, A.; Dubac, J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8871.
- 202 Ranu, B. C.; Ghosh, K.; Jana, U. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9546.
- 203 Olah, G. A.; Malhotra, R.; Narang, S. C.; Olah, J. A. *Synthesis* **1978**, 672.
- 204 Pearson, D. E.; Buehler, C. A. *Synthesis* **1972**, 533.
- 205 Knochel, P.; Dohle, W.; Gommermann, N.; Kneisel, F. F.; Kopp, F.; Korn, T.; Sapountzis, I.; Anh Vu, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4302.
- 206 Jensen, A. E.; Dohle, W.; Sapountzis, I.; Lindsay, D. M.; Vu, V. A.; Knochel, P. *Synthesis* **2004**, 565.
- 207 Duplais, C.; Bures, F.; Sapountzis, I.; Korn, T. J.; Cahiez, G.; Knochel, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2968.
- 208 Varchi, G.; Kofink, C.; Lindsay, D. M.; Ricci, A.; Knochel, P. *Chem. Commun.* **2003**, 396.
- 209 Abarbri, M.; Thibonnet, J.; Bérillon, L.; Dehmel, F.; Rottländer, M.; Knochel, P., *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4618.
- 210 Abarbri, M.; Knochel, P. *Synlett* **1999**, 1577.
- 211 Boymond, L.; Rottländer, M.; Cahiez, G.; Knochel, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1701.
- 212 Bérillon, L.; Leprêtre, A.; Turck, A.; Plé, N.; Quéguiner, G.; Cahiez, G.; Knochel, P. *Synlett* **1998**, 1359.

- 213 Krasovskiy, A.; Knochel, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3333.
- 214 Wallingford, V. H.; Krueger, P. A. *Organic Syntheses*, CV 2, 349.
- 215 Zhu, J.; Beugelmans, R.; Bourdet, S.; Chastanet, J.; Roussi, G. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6389.
- 216 Chakraborty, T. K.; Venkat Reddy, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5462.
- 217 Sapountzis, Y.; Dube, H.; Lewis, R.; Gommermann, N.; Knochel, P. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2445.
- 218 Ottl, J.; Gabriel, D.; Marriott, G. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 143.
- 219 P.; Chang, J. Y.; Chang, C. W.; Chang, C. Y.; Mahindroo, N.; Kuo, F. M.; Hsieh, H. P. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2897.

New Photoactivatable Analogues of Glutathione Disulfide

Dan Bernardi, Amadou Dicko, Gilbert Kirsch*

Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique, Université Paul Verlaine-Metz, 1 Boulevard Arago, 57078 METZ Cedex 3, France

Fax +33(38)7315801; E-mail: kirsch@sciences.univ-metz.fr

Received 12 July 2005; revised 17 August 2005

Abstract: New photoactivatable analogues of glutathione disulfide (GSSG) bearing new benzophenone-like photophores were synthesized by using an improved coupling reaction.

Key words: glutathione disulfide, photoaffinity labeling, benzophenone, heterocycles

Photoaffinity labeling (PAL) is a frequently used technique for studying the interactions of biologically active molecules. A photolabile analogue of the compound under investigation, which is stable in the dark, is converted by illumination into a reactive intermediate. This, by forming a covalent bond, stabilizes the interaction based on biological affinity.

Many authors are interested in the study of apoptosis. The apoptotic process is a genetically controlled programmed cell death and is often deficient in cancer cells. In the literature there is a great number of reports on pro- or anti-apoptotic enzymes, which have glutathione in its reduced form (GSH) as substrate.¹ Most of these studies² are led using the PAL technique. Indeed it is known that GSH plays an important role in apoptosis.³ Recently, Filomeni et al.⁴ showed that the oxidized form of GSH (GSSG) induces also apoptosis. In mammalian cells, less than about 0.2% of the total GSH occurs as GSSG. Oxidation of GSH to form GSSG is carried out either by direct interaction with free radicals, or more often, when GSH acts as a co-factor for antioxidant enzymes such as GSH peroxidases during the reduction of H₂O₂. GSSG is also formed when glutaredoxin reductase uses GSH to reduce the disulfide bond in glutaredoxin.

To the best of our knowledge, the only reference reporting a GSSG photoactivatable analogue was reported in 1991 by D'Silva et al.⁵ They have proposed the synthesis of *N,N'*-bis-(4-azidobenzoyl)glutathione disulfide (Figure 1) in 35% yield by coupling *p*-azidobenzoyl chloride on GSSG in the presence of 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridine (DMAP) in a mixture aqueous NaOH–dioxane. This bifunctional aryl azide derivative of GSSG was used to study yeast glutathione reductase.⁶

We decided to investigate the role of GSSG in apoptosis. Indeed, cancer cells study⁷ is the topic of intense current interest in our laboratory.

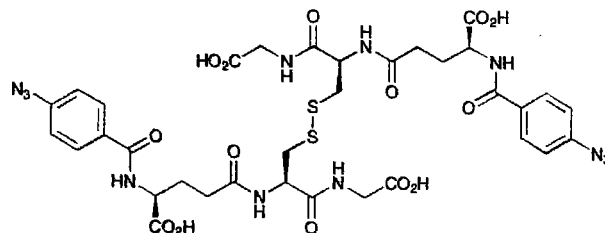
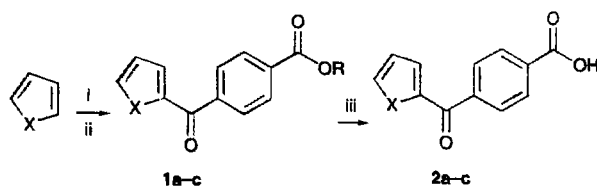


Figure 1 The structure of *N,N'*-bis(4-azidobenzoyl)glutathione disulfide.

In this paper we report the synthesis of new photoactivatable probes (Figure 2) using GSSG as starting material. We have chosen to synthesize analogues of GSSG bearing a benzophenone-like moiety as photoactivatable group. Indeed the benzophenone photophore⁸ has been described as being among the most efficient group for labeling receptors and enzymes. Moreover, attention is increasingly focused on heterocyclic analogues (thiophene, pyrrole) of the benzophenone moiety.⁹

We report here the synthesis of three new photophores and their use in the preparation of several photoactivatable probes.

The new photophores were prepared by coupling the monoester of terephthalic acyl chloride on the thiophene or pyrrole ring using a Friedel–Crafts reaction in the presence of AlCl₃ as catalyst (Scheme 1). Esters **1a–c** were obtained in poor to good yields (Table 1) after chromatographic purification. They were hydrolyzed under basic medium to give the corresponding acids **2a–c** in moderate to good yields (Table 1). Those compounds were activated before their coupling to GSSG, as we will discuss later.



Scheme 1 Reagents and conditions: (i) monoester terephthalic acid, SOCl₂, reflux, 2 h; (ii) AlCl₃, CH₂Cl₂, r.t.; (iii) KOH (5 equiv), appropriate alcohol, r.t., overnight.

Two other compounds were also used to form GSSG probes. Acid **2d** is commercially available. Acid **2e** was prepared according to the literature procedure¹⁰ in a three-

SYNTHESIS 2005, No. 1, pp 0001–0005

Advanced online publication: xx.xx.2005

DOI: 10.1055/s-2005-xxxxx; Art ID: Z13505SS

© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

Imprimatur:

Date, Signature

Z13505SS.fm, 11/23/05

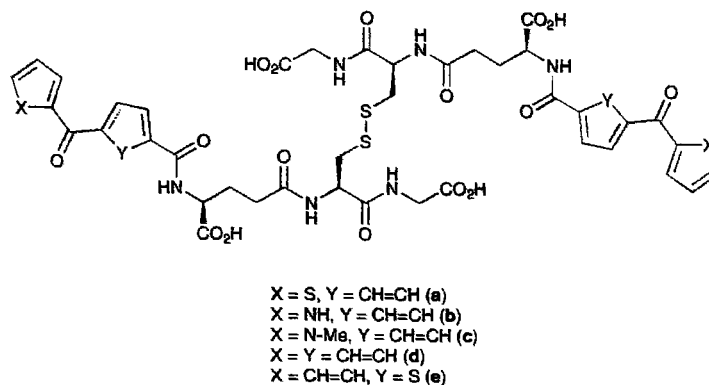


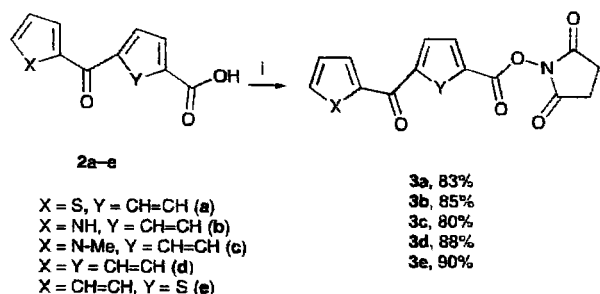
Figure 2 The structures of new photoactivatable analogues of GSSG.

Table 1 Preparation of Esters **1** and Acids **2**

Entry	X	Esters 1 (%)	Acids 2 (%)
a	S	94	90
b	NH	17	88
c	NMe	23	91

step synthesis from 2-bromothiophene. It should be noted that **2e** has not yet been used for its possible photophoric properties.

The low yield reported by D'Silva et al.⁵ prompted us to investigate other methods and more effective reagents for the N-acylation of GSSG. Among the activating groups usually employed in peptide chemistry,¹¹ the *N*-oxysuccinimidyl group was well suited to our purpose.



Scheme 2 Reagents and conditions: (i) NHS, DCC, THF, 0 °C, overnight.

Acids **2a–e** were activated by action of *N*-hydroxysuccinimide (NHS) in the presence of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) as shown in Scheme 2. As expected, the targeted *N*-oxysuccinimidyl esters **3a–e** were obtained in good yields after filtration of the dicyclohexylurea (DCU) formed during the reaction. It should be noted that **3a–e** were always contaminated with DCU. This impurity was eliminated during the purification of the coupling step.

In the last step (Scheme 3), the coupling reactions with GSSG were carried out in a mixture of MeCN–water (3:1)

in the presence of 6 equivalents of Et₃N for 36 hours. Purification on silica gel yielded the expected analogues **4a–e** in good yields. These compounds were fully characterized by NMR and mass spectra. It may be noticed that some signals of the GSSG backbone are missing in the ¹³C NMR spectra (see experimental section). However these results are similar to those reported by Gartner et al.¹²

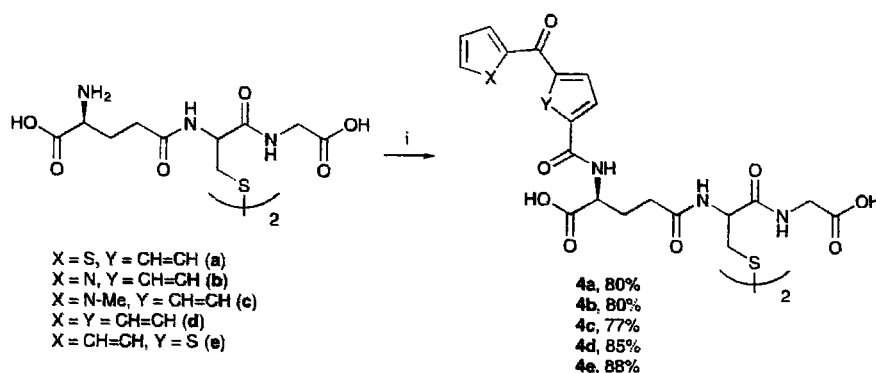
The ultraviolet absorption spectra of **2a–e** and **4a–e** were measured in 0.05 M NaOH. In comparison with the reference acid **2d**, we observed a bathochromic shift for all the other acids. (Table 2) Acid **2b** had the highest absorption maximum at 316 nm. Concerning the probes **4a–e** (Table 1), **4b** and **4e** had absorption wavelengths higher than 300 nm, i.e. at 319 nm and 307 nm, respectively. It may be noticed that **4c** showed another absorption maximum at 316 nm but with a lower intensity ($\epsilon = 16810$). These different absorption maxima are very interesting because the photoaffinity labeling can be performed at wavelengths, which are non-destructive for biological systems.

In conclusion, the synthesis of new photoactivatable analogues of GSSG as well as the synthesis of new chromophores have been accomplished. As expected, three of the new photoactivatable analogues of GSSG exhibit promising photochemical properties. This makes them good photolabeling reagents for GSSG utilizing systems. Moreover, the coupling reaction, which is simple and ef-

Table 2 Ultraviolet Absorption of Acids **2** and GSSG Analogues **4**

Entry	Acids 2 λ_{\max}	ϵ^a	Probes 4 λ_{\max}	ϵ^a
a	300	15330	268	19680
b	316	20100	319	21810
c	315	18290	259	22830
d	263	45620	264	34580
e	304	27630	307	29220

^a In L mol⁻¹ cm⁻¹.



Scheme 3 Reagents and conditions: (i) 3a–e, Et₃N (6 equiv), H₂O, MeCN, r.t., 36 h

ficient, proceeds in partially aqueous solution under mild conditions and is expected to be quite general for the synthesis of a wide range of GSSG photoactivatable analogues.

4-Benzoylbenzoic acid was purchased from Acros. Melting points were determined on a Stuart SMP3 melting point apparatus and are uncorrected. ¹H and ¹³C spectra were recorded on a AC Bruker 250 MHz spectrometer in CDCl₃ or DMSO-*d*₆. Mass spectra measurements were performed on a Hewlett-Packard 5971 A GC-MS spectrometer. MALDI spectra were recorded on a system equipped with a pulsed nitrogen laser (337 nm), operating in positive-ion reflector mode, using 19 kV acceleration voltage and a matrix of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid.

Esters 1; General Procedure¹³

The appropriate monoalkylterephthalate was refluxed in SOCl₂ with two drops of DMF until a homogeneous solution was obtained. The excess SOCl₂ was then removed by evaporation under reduced pressure leaving crude acyl chloride, which was not further purified.

A solution of appropriate acyl chloride (10 mmol) in anhyd CH₂Cl₂ (15 mL) was added dropwise at r.t. over 10 min to a stirred mixture of the appropriate pyrrole (10 mmol) and anhyd AlCl₃ (1.60 g, 12 mmol) in the same solvent. After being stirred at r.t. for 30 min, the reaction mixture was quenched with ice and sat. aq NaHCO₃ (15 mL). The organic phase was separated and combined with the CHCl₃ extracts (2 × 15 mL) of the aqueous phase. The combined organic phases were washed with H₂O, dried over MgSO₄, and evaporated under reduced pressure. The crude residue was chromatographed on silica gel column, with EtOAc–cyclohexane (5:95) as eluent.

In the case of thiophene, the acyl chloride was mixed with anhyd AlCl₃ in anhyd CH₂Cl₂ and thiophene (0.84 g, 10 mmol) was slowly added. After being stirred at r.t. for 1.5 h, the reaction mixture was quenched with ice and 1 M tartaric acid (15 mL).

Methyl 4-(2-Thienylcarbonyl)benzoate (1a)

Mp 143–146 °C.

IR (neat): 2361, 1717 (C=O), 1623 (C=O), 1409, 1280 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.14–8.18 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 7.88–7.91 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 7.65–7.77 (d, *J* = 6.75 Hz, 1 H), 7.62–7.63 (d, *J* = 4.75 Hz, 1 H), 7.16–7.19 (t, *J* = 4.3 Hz, 1 H), 3.96 (s, 3 H).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 186.45, 166.22, 143.17, 141.79, 135.15, 133.14, 129.65, 129.07, 128.13, 52.42.

GC-MS: *m/z* (%) = 246 (28), 231 (1), 215 (11), 187 (10), 163 (12), 111 (100), 83 (7).

Ethyl 4-(1H-Pyrrole-2-carbonyl)benzoate (1b)

Mp 79–82 °C.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 9.76 (br s, 1 H), 8.14–8.17 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 7.92–7.95 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 7.19 (s, 1 H), 6.87 (s, 1 H), 6.37 (s, 1 H), 4.38–4.47 (q, *J* = 5.4 Hz, 2 H), 1.40–1.45 (t, *J* = 4.75 Hz, 3 H).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 183.95, 165.93, 141.93, 133.18, 130.95, 130.06, 129.51, 119.86, 111.36, 61.35, 14.29.

GC-MS: *m/z* (%) = 243 (52), 214 (10), 198 (29), 170 (61), 149 (4), 94 (100), 66 (21), 45 (1).

Ethyl 4-(1-Methyl-1H-pyrrole-2-carbonyl)benzoate (1c)

Mp 67–69 °C.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.11–8.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.81–7.84 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 6.95 (s, 1 H), 6.69–6.71 (d, *J* = 5.75 Hz, 1 H), 6.15–6.18 (d, *J* = 6.75 Hz, 1 H), 4.37–4.46 (q, *J* = 5.38 Hz, 2 H), 4.05 (s, 3 H), 1.39–1.45 (t, *J* = 4.83 Hz, 3 H).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 185.09, 165.31, 143.39, 132.52, 130.06, 129.09, 128.71, 123.15, 108.27, 61.11, 37.29, 14.13.

GC-MS: *m/z* (%) = 257 (37), 228 (49), 212 (37), 184 (100), 108 (47).

Acids 2; General Procedure¹⁴

Esters 1 (5 mmol) were dissolved in the appropriate anhyd alcohol (20 mL). KOH (1.4 g, 25 mmol) was added to the solution and the mixture was stirred at r.t. overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in 1 M HCl (30 mL). The solution was then extracted with CH₂Cl₂ (2 × 20 mL). The combined organic phase was washed with H₂O (2 × 20 mL), dried over MgSO₄ and removed under reduced pressure.

4-(2-Thienylcarbonyl)benzoic Acid (2a)

Mp 200 °C.

IR (neat): 3100–2359 (br, OH), 1700 (C=O), 1627 (C=O), 1413, 1278 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ = 8.23–8.26 (d, *J* = 8.25 Hz, 2 H), 7.92–7.96 (d, *J* = 8.25 Hz, 2 H), 7.77–7.79 (d, *J* = 5.75 Hz, 1 H), 7.64 (d, *J* = 4.75 Hz, 1 H), 7.19 (t, *J* = 4 Hz, 1 H).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ = 185.05, 164.91, 140.80, 139.24, 133.95, 133.78, 132.22, 127.67, 127.51, 126.93.

UV-Vis: λ_{max} (ε) = 271 (14500), 300 (15330) nm.

4-(1H-Pyrrole-2-carbonyl)benzoic Acid (2b)

Mp 190–192 °C.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 10.64 (br s, 1 H), 8.08–8.11 (d, *J* = 7.75 Hz, 2 H), 7.83–7.86 (d, *J* = 7.75 Hz, 2 H), 7.12 (s, 1 H), 6.79 (s, 1 H), 6.26 (s, 1 H).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 183.94, 167.79, 141.99, 133.33, 130.78, 129.53, 129.53, 128.48, 119.91, 110.78.

UV–Vis: λ_{max} (ε) = 255.5 (11730), 316.5 (20100) nm.

4-(1-Methyl-1*H*-pyrrole-2-carbonyl)benzoic Acid (2c)

Mp 193–195 °C.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ = 8.18–8.21 (d, *J* = 8.25 Hz, 2 H), 7.85–7.88 (d, *J* = 8.25 Hz, 2 H), 6.97 (s, 1 H), 6.72 (s, 1 H), 6.,19 (s, 1 H), 4.06 (s, 3 H).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ = 184.44, 166.97, 142.76, 133.93, 129.39, 128.83, 128.69, 128.05, 122.58, 107.78, 36.67.

UV–Vis: λ_{max} (ε) = 255.5 (11220), 315 (18290) nm.

N-Hydroxysuccinidimyl Esters 3, General Procedure¹⁵

A solution of acid **2** (1 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (115 mg, 1 mmol) in anhyd THF (2 mL) was cooled to 0 °C. DCC (216 mg, 1.05 mmol) was added and stirring was continued at this temperature for 4 h. The reaction mixture was allowed to stand overnight in a refrigerator and then filtered. The solution was concentrated under reduced pressure. The residue was triturated in Et₂O–light petroleum (1:1), filtered out, and then dried *in vacuo* to afford the expected compound.

Compounds **3a–e** were always contaminated with DCU.

N-Hydroxysuccinidimyl-4-(2-thienylcarbonyl)benzoate (3a)

Mp 193–195 °C.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.25–8.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.97–7.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.79–7.81 (d, *J* = 6 Hz, 1 H), 7.61–7.62 (d, *J* = 4.25 Hz, 1 H), 7.18–7.22 (t, *J* = 4.63 Hz, 1 H), 2.94 (s, 4 H).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 186.99, 168.96, 162.03, 143.58, 142.89, 135.38, 135.35, 130.65, 129.21, 128.31, 128.04, 25.61.

N-Hydroxysuccinidimyl-4-(1*H*-pyrrole-2-carbonyl)benzoate (3b)

Mp 162–165 °C.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 9.78 (br, 1 H), 8.24–8.27 (d, *J* = 8.25 Hz, 2 H), 7.97–8.00 (d, *J* = 8.25 Hz, 2 H), 7.21 (s, 1 H), 6.85 (s, 1 H), 6.38 (s, 1 H), 2.94 (s, 4 H).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 183.33, 169.11, 161.30, 143.76, 130.54, 129.10, 127.63, 126.47, 120.35, 111.56.

N-Hydroxysuccinidimyl-4-(1-methyl-1*H*-pyrrole-2-carbonyl)benzoate (3c)

Mp 202–204 °C.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.21–8.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.87–7.91 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 6.98 (s, 1 H), 6.67–6.68 (d, *J* = 3.75 Hz, 1 H), 6.17–6.20 (d, *J* = 6.75 Hz, 1 H), 4.07 (s, 3 H), 2.94 (s, 4 H).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 184.55, 168.08, 160.84, 145.54, 132.49, 130.83, 130.36, 129.81, 127.16, 123.61, 108.72, 37.53, 25.69.

N-Hydroxysuccinidimyl-4-benzoylbenzoate (3d)

Mp 195–198 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.24–8.28 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 7.88–7.91 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 7.78–7.82 (d, *J* = 6.75 Hz, 2 H), 7.61–7.67 (m, 1 H), 7.49–7.54 (m, 2 H), 2.94 (s, 4 H).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 195.46, 168.96, 161.18, 142.98, 136.48, 133.19, 130.45, 130.07, 129.92, 128.53, 128.01, 25.63.

N-Hydroxysuccinidimyl-5-benzoylthiophene-2-carboxylate (3e)

Mp 137–139 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.01–8.02 (d, *J* = 4.25 Hz, 1 H), 7.87–7.90 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 7.63–7.68 (m, 2 H), 7.51–7.57 (m, 2 H), 2.92 (s, 4 H).

¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 168.73, 136.81, 136.01, 133.53, 133.25, 129.34, 128.72.

GSSG Analogues 4; General Procedure

N-Hydroxysuccinidimyl esters **3** (1 equiv) were added at r.t. to a solution of GSSG (10 mg, 0.016 mmol) in a solution of MeCN (0.3 mL) and H₂O (0.1 mL) in the presence of Et₃N (0.013 mL, 6 equiv). The reaction mixture was then stirred at r.t. for 36 h and concentrated under reduced pressure. The crude residue was chromatographed on silica gel column, with MeCN–H₂O (9:1) as eluent.

N,N'-Bis[4-(2-thienylcarbonyl)benzoyl]glutathione Disulfide (4a)

Yield: 80%; mp 230 °C (decomp.).

¹H NMR (250 MHz, D₂O): δ = 7.92–7.95 (m, 4 H), 7.78–7.82 (m, 10 H), 7.63–7.66 (m, 4 H), 4.77 (t, 2 H, Cysα), 4.49 (t, 2 H, Gluα), 3.77 (s, 4 H, Glyα), 3.28 (dd, 2 H, Cysβ₁), 2.96 (dd, 2 H, Cysβ₂), 2.58 (m, 4 H, Gluγ), 2.40 (m, 2 H, Gluβ₁), 2.20 (m, 2 H, Gluβ₂).

¹³C NMR (62.5 MHz, D₂O): δ = 190.24, 175.57, 171.93, 162.25, 145.51, 145.06, 136.37, 136.12, 133.52, 130.28, 129.54, 128.69, 52.53, 38.70, 31.83, 27.09 (some peaks were not observed).

MS (MALDI-TOF): *m/z* = 1063 [M + Na]⁺.

UV–Vis: λ_{max} (ε) = 268 (19680), 292 (16790) nm.

N,N'-Bis[4-(1*H*-pyrrole-2-carbonyl)benzoyl]glutathione Disulfide (4b)

Yield: 80%; mp 239 °C (decomp.).

¹H NMR (250 MHz, D₂O): δ = 7.79 (m, 8 H), 7.39 (m, 2 H), 6.90 (m, 2 H), 6.42 (m, 2 H), 4.75 (t, 2 H, Cysα), 4.42 (t, 2 H, Gluα), 3.79 (s, 4 H, Glyα), 3.35 (dd, 2 H, Cysβ₁), 2.96 (dd, 2 H, Cysβ₂), 2.54 (m, 4 H, Gluγ), 2.36 (m, 2 H, Gluβ₁), 2.15 (m, 2 H, Gluβ₂).

¹³C NMR (62.5 MHz, D₂O): δ = 185.72, 175.67, 171.83, 168.99, 140.50, 136.49, 130.16, 129.07, 128.65, 127.29, 122.59, 111.47, 52.47, 38.44, 31.87, 26.97 (some peaks were not observed).

MS (MALDI-TOF): *m/z* = 1007 [M + H]⁺, 1029 [M + Na]⁺.

UV–Vis: λ_{max} (ε) = 255.5 (18800), 319.5 (21810) nm.

N,N'-Bis-[4-(1-methyl-1*H*-pyrrole-2-carbonyl)benzoyl]glutathione Disulfide (4c)

Yield: 77%; mp 220 °C (decomp.).

¹H NMR (250 MHz, D₂O): δ = 7.86–7.89 (d, 4 H), 7.73–7.76 (d, 4 H), 7.24 (s, 2 H), 6.80 (s, 2 H), 6.25 (s, 2 H), 4.75 (t, 2 H, Cysα), 4.42 (t, 2 H, Gluα), 3.97 (s, 6 H), 3.71 (s, 4 H, Glyα), 3.23 (dd, 2 H, Cysβ₁), 2.96 (dd, 2 H, Cysβ₂), 2.54 (m, 4 H, Gluγ), 2.36 (m, 2 H, Gluβ₁), 2.15 (m, 2 H, Gluβ₂).

¹³C NMR (62.5 MHz, D₂O): δ = 186.54, 175.67, 171.86, 168.83, 141.85, 136.15, 134.72, 129.63, 129.19, 127.10, 125.69, 109.02, 52.49, 46.69, 38.45, 36.86, 31.84, 27.09 (some peaks were not observed).

MS (MALDI-TOF): *m/z* = 1037 [M + Na]⁺.

UV–Vis: λ_{max} (ε) = 259 (22830), 316 (16810) nm.

***N,N'*-Bis-(4-benzoylbenzoyl)glutathione Disulfide (4d)**

Yield: 85%; mp 240 °C (decomp.).

¹H NMR (250 MHz, D₂O): δ = 7.92–7.95 (m, 4 H), 7.78–7.82 (m, 10 H), 7.63–7.66 (m, 4 H), 4.77 (t, 2 H, Cysα), 4.49 (t, 2 H, Gluα), 3.77 (s, 4 H, Glyα), 3.28 (dd, 2 H, Cysβ₁), 2.96 (dd, 2 H, Cysβ₂), 2.58 (m, 4 H, Gluγ), 2.40 (m, 2 H, Gluβ₁), 2.20 (m, 2 H, Gluβ₂).¹³C NMR (62.5 MHz, D₂O): δ = 199.58, 177.92, 175.72, 171.82, 168.85, 139.47, 137.42, 136.25, 133.86, 130.40, 130.32, 128.68, 127.35, 55.30, 52.61, 43.39, 38.67, 31.96, 27.10.MS (MALDI-TOF): *m/z* = 1029 [M + H]⁺, 1051 [M + Na]⁺, 1067 [M + K]⁺.UV-Vis: λ_{max} (ε) = 264.5 (34580) nm.***N,N'*-Bis-(5-benzoylthiophene-2-carbonyl)glutathione Disulfide (4e)**

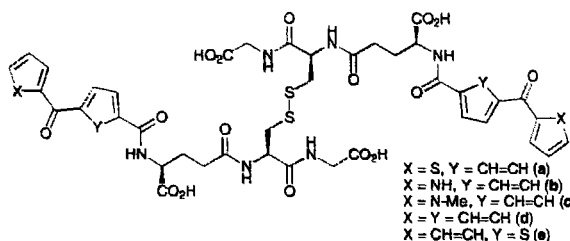
Yield: 88%; mp 245 °C (decomp.).

¹H NMR (250 MHz, D₂O): δ = 7.71–7.81 (m, 8 H), 7.59 (m, 6 H), 4.77 (t, 2 H, Cysα), 4.42 (t, 2 H, Gluα), 3.79 (s, 4 H, Glyα), 3.35 (dd, 2 H, Cysβ₁), 2.96 (dd, 2 H, Cysβ₂), 2.55 (m, 4 H, Gluγ), 2.36 (m, 2 H, Gluβ₁), 2.15 (m, 2 H, Gluβ₂).¹³C NMR (62.5 MHz, D₂O): δ = 190.35, 175.61, 171.89, 168.6, 141.61, 139.83, 137.94, 137.19, 137.01, 129.39, 129.01, 127.42, 52.49, 38.46, 31.83, 27.06 (some peaks were not observed).MS (MALDI-TOF): *m/z* = 1063 [M + Na]⁺, 1079 [M + K]⁺.UV-Vis: λ_{max} (ε) = 307 (29220) nm.**Acknowledgment**

We are grateful to Dr. G. Sommen for his help in bibliographic research and to Dr. S. Hesse for her helpful discussions. We are grateful to LSMCL Metz (France) for mass spectra.

References

- (1) (a) Lyon, R. P.; Hill, J. J.; Atkins, W. M. *Biochemistry* **2003**, *42*, 10418. (b) Lim, M. L. R.; Lum, M.; Hansen, T. M.; Roucou, X.; Nagley, P. J. *Biomed. Sci.* **2002**, *9*, 488. (c) Hanigan, M. H. *Chemico-Biol. Interact.* **1998**, *111–112*, 333. (d) Keppler, D.; Leier, I.; Jedlitschky, G.; König, J. *Chemico-Biol. Interact.* **1998**, *111–112*, 153. (e) Kauvar, L. S.; Sanderson, P. E.; Henner, W. D. *Chemico-Biol. Interact.* **1998**, *111–112*, 225.
- (2) (a) Quian, Y.; Grant, C. E.; Westlake, C. J.; Zhang, D.; Lander, P. A.; Shepard, R. L.; Dantzig, A. H.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35225. (b) Furuta, K.; Tomokiyo, K.; Kuo, M. T.; Ishikawa, T.; Suzuki, M. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7529. (c) Furuta, K.; Hosoya, T.; Tomokiyo, K.; Okuda, S.; Kuniyasu, A.; Nakayama, H.; Ishikawa, T.; Suzuki, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2661.
- (3) Hall, A. G. *Eur. J. Clin. Invest.* **1999**, *29*, 238.
- (4) Filomeni, G.; Rotilio, G.; Ciriolo, M. R. *FASEB J.* **2003**, *17*, 64.
- (5) D'Silva, C.; Seddon, A. P.; Douglas, K. T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, 3029.
- (6) Douglas, K. T.; Seddon, A. P.; D'Silva, C.; Bunni, M. *Biochem. Soc. Trans.* **1982**, *10*, 124.
- (7) Braut, L.; Migianu, E.; Néguesque, A.; Battaglia, E.; Bagrel, D.; Kirsch, G. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, in press.
- (8) Dorman, G.; Prestwich, G. D. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661.
- (9) (a) Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Photochem. Photobiol., B: Biology* **1998**, *43*, 1. (b) Lahoz, A.; Hernandez, D.; Miranda, M. A.; Perz-Prieto, J.; Morera, I. M.; Castell, J. V. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1486. (c) Moser, J.; Hye, A.; Lovell, W. W.; Earl, L. K.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. *Toxicol. in Vitro* **2001**, *15*, 333. (d) Arnold, D. R.; Birtwell, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4599.
- (10) ***, ????. ; US Patent, 5627198, ***??*?***.
- (11) Green, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd ed.; Wiley: New York, **1991**.
- (12) Gartner, C. A.; Wen, B.; Wan, J.; Becker, R. S.; Jones, G. II; Gygi, S. P.; Nelson, S. D. *Biochemistry* **2005**, *44*, 1846.
- (13) Cadamuro, S.; Degani, I.; Dughera, S.; Fochi, R.; Gatti, A.; Piscopo, L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 273.
- (14) Zu, J.; Wang, X.; Chen, Y.; Jiang, X.; Chen, X.; Li, Z. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6221.
- (15) Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1839.



graphical abstract

Résumé

De part son omniprésence dans les processus cellulaires, le glutathion est une cible de choix pour les chercheurs. Le système enzymatique qui lui est lié est souvent surexprimé dans les cellules tumorales. Le but de ce travail est de proposer des sondes qui serviront soit à mieux connaître le mécanisme de la mort cellulaire génétiquement programmée (apoptose), soit à inhiber le système enzymatique du glutathion pour améliorer l'efficacité des traitements anticancéreux.

Pour cela nous avons synthétisé pour la première fois des analogues photoactivables N-substitués conjugués du GSH. Nous avons également synthétisé de nouveaux analogues photoactivables conjugués du GSSG avec des longueurs d'ondes de photoactivation parfaitement tolérées par les systèmes biologiques. Nous avons également atteint des intermédiaires clé dans la synthèse d'autres analogues photoactivables du GSH.

Les résultats préliminaires de tests d'inhibition et de photoactivation menés avec certains de ces analogues nous ont permis de montrer que certains pourraient servir de sonde ou d'inhibiteur du système enzymatique du glutathion.

Summary

The ubiquitous glutathione (GSH or GSSG) is the topic of many researchs. In most cancers, overexpression of glutathione-dependent enzymes is often found. The aim of this work is to design probes which will be used to better understand the mechanism of apoptosis or to inhibit the glutathione-dependent enzymes in order to sensitise cells to anti-cancer agents.

To do that, we have for the first time synthesised photoactivatable N-substituted conjugated analogues of GSH. We have also synthesised new photoactivatable analogues of GSSG with photoactivation wavelengths non-destructive for biological systems. Moreover we have reached key intermediates in the synthesis of other photoactivatable analogues of GSH.

The preliminary results of inhibition assays as well as of photolabeling assays performed with some of these analogues allowed us to show that some could serve as probe or as inhibitor of the glutathione-dependent enzymes.